

Laboratorinis darbas

# **Biologinių objektų vaizdinimas**

2008  
Vilnius

# Biologinių objektų vaizdinimas

## 1. Darbo tikslas.

Išmokti konfokalinės mikroskopijos bei kitais fluorescenciniais metodais atlikti audinių, ląstelių ir jų sudedamųjų dalių vaizdinimą.

## 2. Darbo uždaviniai.

1. Išmokti dirbti su konfokaliniu mikroskopu, nudažyti viduląstelines ląstelės struktūras, gauti trimatį ląstelės vaizdą. UV ar Ti:safyro lazerio trumpais impulsais paveikti ląstelės, bei iširti šių ląstelių gyvybingumą.
2. Surinkti optinę sistemą vaizdinimui in vivo. Gauti autofluorescencinį Wistar žiurkės ausies vaizdą. Intraveniškai suleisti Wistar žiurkėms FITC-dekstrano ir užregistruoti jo pasiskirstymą įvairiuose organuose, gauti šių organų fluorescencinius vaizdus.

## 3. Teorinė dalis.

### I. Mikroskopijos principai

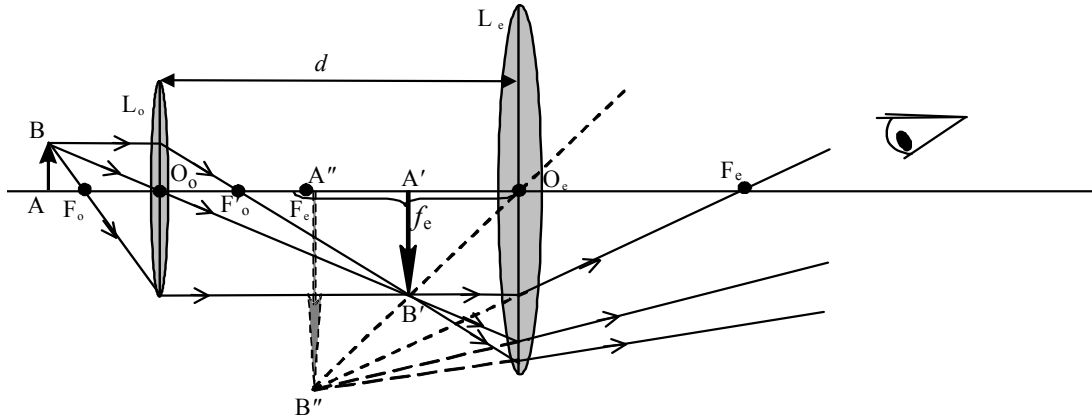
Žodis *mikroskopas* (gr.: *mikros* - mažas + *skopeo* - žiūrėti) pirmą kartą buvo panaudotas mokslinės organizacijos „Academia dei Lincei“, kuriai priklausė ir Galileo Galilei'us. *Mikroskopas* - tai prietaisas skirtas sukurti padidintam stebimo objekto atvaizdai. Mikroskopo raida prasideda 1590 metais, kai Hans'as ir Zacharias Janssen'ai Olandijoje sukonstravo pirmąjį sudėtinį mikroskopą. 1660 metais Italijoje Marcello Malpighi pirmą kartą pamatė augalų kapiliarus, 1665 metais Anglijoje Robert Hooke'as išleido knygą „*Micrographia*“, joje aprašė mikroskopą, bei įvedė terminą „ląstelė“. 1683 metais Antoni van Leeuwenhoek'as sukonstravo mikroskopą kuris galėjo didinti 275 kartus, tuo pačiu perteikė mikroorganizmų išvaizdą.

Šiuo metu yra naudojama daug mikroskopinių metodų, kurie įgalina įvairiapusiškai stebėti mikropasaulio struktūrą, bei procesus vykstančius jame. Priklausomai nuo tiriamo bandinio ir savybių, kurias norima išanalizuoti yra naudojami įvairūs mikroskopai: šviesaus lauko apšvietimo, tamsaus lauko apšvietimo, fazės kontrasto, interferencijos kontrasto, fluorescenciniai, konfokaliniai, dvifotoniniai,  $\sigma$ , stovinčių bangų, poliarizaciniai, elektroniniai, atominių jėgų.

Mikroskopui yra keliami trys pagrindiniai reikalavimai:

1. Vaizdo didinimas - sukurti padidintą stebimo objekto atvaizdą.
2. Mikroskopo skiriamoji geba - išskirti stebimo objekto atskiras dalis.
3. Sukurtas atvaizdas turi būti suprantamas žmogaus akiai ar specialiam vaizdo registravimo prietaisui.

Norėdami nagrinėti mikroskopijos principus turime suprasti fizikinius reiškinius, kurie vyksta nagrinėjamose sistemose. Bendru atveju visuose mikroskopuose reikalinga tiksli ir suderinta optinė sistema. 1 pav. Pavaizduota principinė mikroskopo schema sudaryta tik iš *objektyvo* ir *okuliaro*. Objektyvas  $L_o$  yra arčiausiai bandinio esantis (įvadinis) lęšis, okuliaras  $L_e$  – arčiausiai stebėtojo akies esantis (išvadinis) lęšis. Paprastai lęšiai parenkami taip, kad okuliaro židinio nuotolis  $f_e$  būtų didesni už objektyvo židinio nuotolį  $f_o$ . Bandinys AB įtvirtinamas prieš objektyvą truputi didesniu nei  $f_o$  atstumu. Stebint pro okuliarą, priklausomai nuo to ar atvaizdas susidaro arčiau ar toliau nuo okuliaro lyginant su okuliaro židiniu  $F_e$ , matomas tikras arba menamas, neapverstas arba apverstas, ir padidintas objekto atvaizdas.



1 pav. Mikroskopo sukuriamas padidintas objekto atvaizdas

Pagrindinė mikroskopą apibūdinanti charakteristika yra jo didinimas. Mikroskopo *tiesinis didinimas*  $N$  priklauso nuo objektyvo  $N_o$  ir okuliario  $N_e$  didinimo.

$$N = N_o \cdot N_e. \quad (1)$$

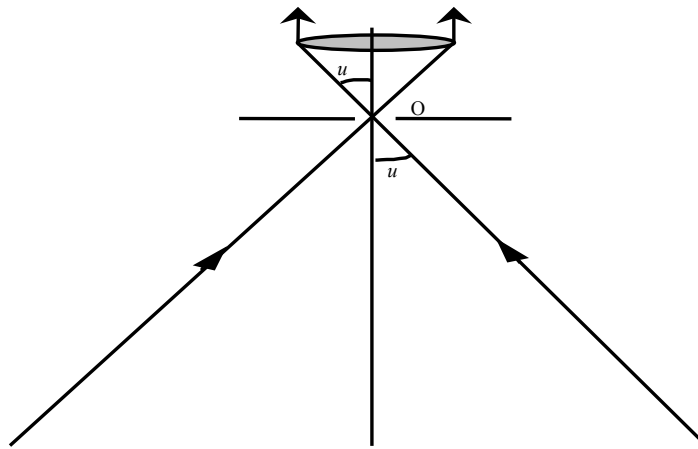
Paprastai objektyvo  $N_o$  didinimas būna nuo 10 iki 100 kartų, o  $N_e$  siekia nuo 7 iki 15 kartų. Taigi klasikiniu mikroskopu yra padidinama 1000 (kartais 1500) kartų. Mikroskopuose dažniausiai naudojamos sudėtinės objektyvo ir okuliario sistemos, kurių kiekviena sudaryta iš keleto lęšių. Tai įgalina pakankamai nesudėtingai keisti didinimą keičiant objektyvus ir okuliarus. Antroji svarbi mikroskopo charakteristika yra jo *skiriamoji geba*  $R$ . Ji apibūdinama, kaip galimybė išskirti du arti vienas kito esančius objektus. Mikroskopo skiriamoji geba nėra adekvati jo didinimui. Didelis didinimas gali sukurti didelį stebimo objekto atvaizdą, tačiau jis bus neryškus, susiliejęs. Mikroskopo skiriamąją gebą nulemia spindulių difrakcija mikroskopo optinėje sistemoje. Dėl difrakcijos, objektyvo sukuriama be galo mažo šviečiančio taško atvaizdas bus šviesus diskas, apsuptas tamsiais ir šviesiais žiedais. Mikroskopo mažiausias išskiriamas atstumas tarp dviejų taškų  $\delta$ , kuriuo nutolę vienas nuo kito du atskiri taškai, suprantami, jog tai yra du atskiri taškai, ir lemia mikroskopo skiriamąją gebą. Jei atstumas yra mažesnis nei  $\delta$ , mikroskopas

neiškiria taškų kaip atskirų objektų, jie susilieja į vieną tašką, nes jų sukuriama difrakciniai žiedai persikloja.

Šis minimalus nuotolis  $\delta$  nusakomas lygybe:

$$\delta = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin u}, \quad (2)$$

kur  $\lambda$  - objektą apšviečiančios šviesos bangos ilgis,  $n$  – terpės, kuri yra tarp stebimo objekto ir objektyvo, lūžio rodiklis,  $u$  – *apertūrinis kampas* (objektyvas iš objekto taško, esančio lęšio optinėje ašyje, matomas kampas, kurio dydis  $2u$ ) (2 pav.)



2 pav. Mikroskopo apertūrinio kampo nustatymo schema

Pagal Rayleigh sąlygą, mažiausias santykinis apšvietimo pokytis, kurį dar pastebi akis, yra 4 %, tuomet  $\delta = 0,42 \mu\text{m}$ . Abbe parodė, kad koherentiškai apšviesto objekto:

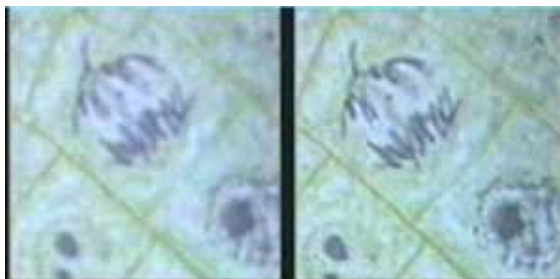
$$\delta = \frac{0,5\lambda}{n \cdot \sin u}. \quad (3)$$

Dydis  $n \sin u = \text{NA}$  yra vadinamas skaitmeninė apertūra. Tai svarbi objektyvo savybė, kiekybiškai nusakanti jo gebėjimą surinkti šviesą. Didesnės skaitmeninės apertūros objektyvai surenka šviesos spindulius didesniu kampas. Todėl stengiamasi, kad objektyvo židinio nuotolis būtų kuo mažesnis, taip didėja apertūrinis kampas  $u$ , teoriškai jis gali būti  $u = 90^\circ$  ( $2u = 180^\circ$ ), tačiau

realiai pasiekiamas  $u = 72^\circ$ . Skaitmeninė apertūra yra nurodoma ant mikroskopo objektyvo.

Mikroskopo skiriamoji geba  $R$  yra atvirkščiai proporcinga  $\delta$ , todėl didėja mažėjant  $\lambda$ , bei didėjant  $n$  ir  $u$ . Tačiau  $\lambda$  mažinimas yra ribojamas akies jautrumo riba ties 450 nm. Optinio mikroskopo  $\delta$  naudojant matomą šviesą, kai maksimalus lęšio apertūrinis kampas  $70^\circ$ , o oro  $n=1$ , yra  $0,3 \mu\text{m}$ . Bet galima naudoti kitas atvaizdo registravimo priemones, pvz.: fotografines. Tokiu būdu skiriamoji geba gali būti padidinama iki daugiau nei dviejų kartų. Taigi stebint bandinius ne tiesiogiai, bet pasitelkiant specialius detektorius ir atvaizdo apdorojimo priemones, galima stebėti smulkesnius objektus.

Mikroskopo skiriamoji geba padidinama, jei užpildančioji terpė tarp objektyvo ir bandinio paviršiaus yra ne oras, kurio  $n=1$ , bet *imersinis* skystis (vanduo, įvairios imersinės alyvos). Imersinių skysčių lūžio rodiklis gali siekti 1,5 ar net 1,8. Taigi imersinės medžiagos gali padidinti mikroskopo skiriamąją gebą iki 50 % ir net daugiau (3 pav.). Bandinio apšvietimui naudojant tą pačią 450 nm matomą šviesą, kai maksimalus lęšio apertūrinis kampas lieka tas pats ( $70^\circ$ ), o imersinio skysčio  $n=1,5$ , tai mikroskopo skiriamoji geba padidėja 1,5 karto, t.y. nuo  $0,3 \mu\text{m}$  iki  $0,2 \mu\text{m}$ .



3 pav. Skiriamosios gebos padidinimas naudojant imersinę alyvą: kairėje be imersinės alyvos, dešinėje su imersine alyva.

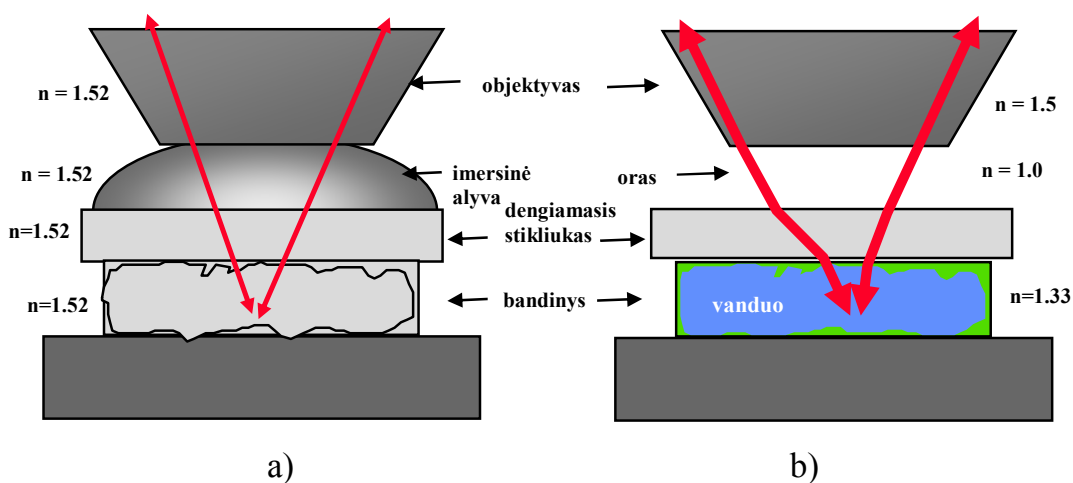
Sistemos dalių ir ją supančios aplinkos lūžio rodiklių vertės turi būti kuo artimesnės. Tačiau realiai to nėra, dėl to gaunami šviesos spindulių iškraipymai, 4 b pav. Siekiant šito išvengti taip pat naudojami imersiniai objektyvai. Ant

objektyvo priekinio paviršiaus ir bandinio užlašinama imersinio skysčio, kuris užtikrina vienodą lūžio rodiklį.

Kad atvaizdas būtų kokybiškas įvairios optinės sistemos dalys turi didinti vienodai. Tai apibrėžia Abbe' s sinusų (aplanatizmo) teorema:

$$\frac{h'}{h} = \frac{n \cdot \sin u}{n' \cdot \sin u'}. \quad (4)$$

Čia  $n$  ir  $n'$  – terpių lūžio rodikliai atitinkamai iš objekto ir atvaizdo pusės,  $h$  ir  $h'$  – atitinkamai objekto ir atvaizdo matmenys.



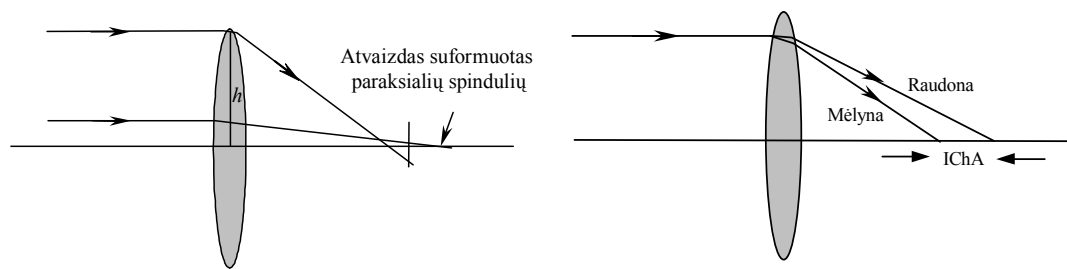
4 pav. Šviesos spindulių iškraipymai atsirandantys dėl skirtingų medžiagų optinių tankių: a) - jų nėra, b) – kiekviena skirtingo lūžio rodiklio terpė paveikia sklindančius šviesos spindulius

Tiesiog ryškia šviesa apšviečiant bandinį, stebimame vaizde neišskiriamos struktūrinės dalys – nėra kontrasto. Struktūrinės dalys išryškėja dėl fazių skirtumo. Šviesaus lauko mikroskope yra naudojama Köhler'io apšvietimas, jis pritaikoma taip: tolygiai apšviestas matymo laukas gaunamas apšviečiant visą matymo lauką iš viršaus (objektyvo pusės), o pats bandinys papildomai apšviečiamas labai plataus kūgio šviesos pluoštu iš apačios. Gaunamos dvi persiklojančios vaizdo plokštumos. Tokiu būdu gaunamas kontrastas ir aiškios tiriamo objekto dalys.

Kadangi tiriami spindulių pluoštai yra platūs ir nehomocentriniai, o stebimi objektai nėra taškiniai dydžiai, bet erdviniai kūnai, mikroskopijoje

susiduriama su optinėmis ydomis, dėl to padidintas objekto vaizdas būna iškraipytas. Pagrindinės optinės ydos, tai: *sferinė* ir *chromatinė aberacijos*, *astigmatizmas*, *distorsija*.

Sferinė aberacija atsiranda dėl to, kad platesnio lygiagrečių šviesos spindulių pluošto spinduliai, praėję pro lęšį, nebesusirenka viename taške (5 pav.). Centriniai spinduliai sklindantys arčiau optinės ašies kerta ašį toliau, negu kraštiniai spinduliai, todėl taškas atvaizduojamas kaip rutuliukas.



5 pav. Sferinė ir chromatinė aberacijos

Gludžiamą lęšio sferinė aberacija yra neigiama, o sklaidomą – teigiama. Optinėje sistemoje naudojant gludžiamuosius lęšius kartu su sklaidomaisiais, sferinę aberacija galima labai sumažinti.

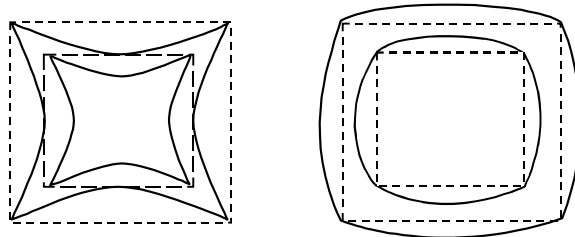
Chromatinė aberacija atsiranda dėl medžiagų šviesos lūžio rodiklio priklausomybės nuo šviesos bangos ilgio (5 pav.). Paprastai, bangos ilgiui mažėjant, lūžio rodiklis didėja, taigi, eidami per lęšį, violetiniai spinduliai lūžta smarkiau nei raudonieji. Šiuo atveju taškas yra atvaizduojamas erdvėje nesutampančių skirtingų spalvų rinkiniu, o daikto atvaizdas – iškraipytas ir spalvotais kraštais. Ši yda taip pat naikinama parenkant du lęšius - gludžiamąjį ir sklaidomąjį.

Astigmatizmas gali atsirasti dėl kelių priežasčių. Viena jų, tai, kad nuo kiekvieno daikto taško į optinę sistemą sklindantys spinduliai sudaro nedidelio kampo homocentrinį pluoštelį. Jei šie spinduliai, perėję per optinę sistemą, lieka homocentriniais, tai atvaizdas vadinamas *stigmatiniu* – kiekvieną daikto tašką



atitinka atvaizdo taškas. Tačiau, kad taip būtų pluoštelį sudarantys spinduliai turi būti beveik lygiagretūs, o pats pluoštelis simetrinis. Bet jei jis krentą į lęšį dideliu kampu, pluoštelio homocentriškumas nyksta, vaizdas tampa astigmatiniu – išsiskleidžia į šviesią tiesę arba virsta pailgu šviesos skrituliu. Astigmatizmas gali atsirasti ir dėl to, kad optinė sistema neturi griežtos ašinės simetrijos.

Distorsija atsiranda, kai daikto atvaizdą sudaro nors ir siauras, bet dideliu kampu į optinę ašį krintantis spindulių pluoštas. Objekto atskirų dalių didinimas priklauso nuo spindulių kritimo kampo, dėl to centrinės atvaizdo dalys yra padidintos daugiau arba mažiau nei kraštinės dalys. Distorsija gali būti dviejų rūšių: “statinaitės” arba “pagalvėlės” formos (6 pav.). Abiem distorsijos atvejais atvaizdas susidaro ne plokštumoje, bet paraboliniame paviršiuje. Ši yda taisoma parenkant kelis lęšius su priešingomis distorsijos formomis. Šiuo metu gaminama įvairių stiklo rūšių ir galima sukurti tokius lęšius, kurie koreguoja optinę aberaciją. Be to lęšiai padengiami sintetiniu atspindį mažinančiu sluoksniu.



6 pav. Pagalvėlės ir statinaitės formos distorsijos

Yra žinoma daugybė būdų kaip išvengti nepageidautinų reiškinių apsunkinančių mažų objektų stebėjimą, tai: poliarizuotos šviesos naudojimas, fazinio kontrasto išgavimas, skirtingos interferencijos kontrastas, fluorescencija, tamsaus lauko apšvietimas, Rheinberg‘o apšvietimas, Hoffman‘o moduliacijos kontrastas, optinių filtrų panaudojimas (jie gali būti skysčio, tepalo ar želės konsistencijos). Moderniuose mikroskopuose yra integruoti mikroprocesoriai,

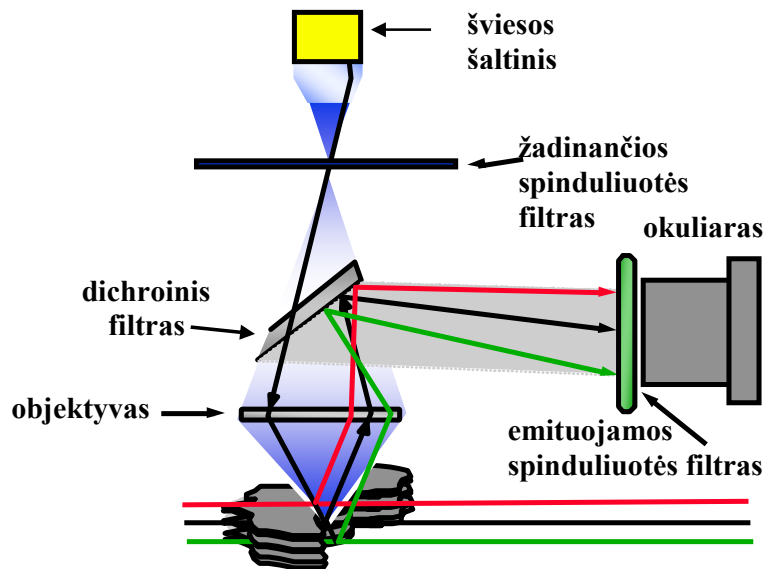
kurie automatiškai koreguoja: šviesos intensyvumą, ekspozicijos trukmę priklausomai nuo fotografavimo trukmės bei atlieka kitas funkcijas.

## **II Fluorescencinė mikroskopija**

Fluorescencinių, konfokalinių, dvifotonių ir konfokalinių dvifotonių mikroskopų veikimo principas paremtas *fluorescencija*. Fluorescencija vyksta, kai molekulei sugėrus šviesos kvantą, išorinės orbitalės elektronas peršoka į vieną iš laisvų molekulės elektroninių lygmenų ir molekulė tampa energetiškai sužadinta. Ji energiją transformuoja į savo atomų virpersinę ar rotacinę energiją arba išspinduliuoja šviesos kvanto pavidalu. Fluorescenciją stebima ar fiksuojama fotojautriais prietaisais ar medžiagomis. Konkrečios molekulės ji yra specifinė, taigi galima identifikuoti kokia tai yra molekulė. Fluorescencijai sužadinti reikalingi stiprūs šviesos šaltiniai. Naudojamos Xe, Xe/Hg lempos arba lazeriai (Ar, UV diodiniai, Kr, He-Ne, He-Cd, Kr-Ar).

Fluorescencijos metu visuomet yra išspinduliuojama didesnio bangos ilgio šviesa nei sugerama. Žadinančios šviesos bangos ilgis yra išskiriamas šviesos filtru, arba naudojamas lazeris.

Išskirtos spektrinės srities šviesos pluoštelis dichroiniu veidrodžiu nukreipiamas į objektyvą, kuris fokusuoja jį į tiriamą objektą. Tiriamo objekto fluorescencija surenkama objektyvu ir dichroiniu veidrodžiu nukreipama per filtrą (atkertantį žadinančios šviesos likutį), į vaizdo plokštumą, nuo kurios per okuliarą akimi ar specialiu prietaisu registruojamas gaunamas vaizdas (7 pav.). Vienas iš fluorescencinės mikroskopijos trūkumų yra šalutinė fluorescencija atsirandanti ne židinio plokštumoje, jos įnašas sudaro triukšmus objekto atvaizde ir gali nuslėpti ar iškraipyti svarbias atvaizdo dalis.



7 pav. Fluorescencinio mikroskopo optinė schema

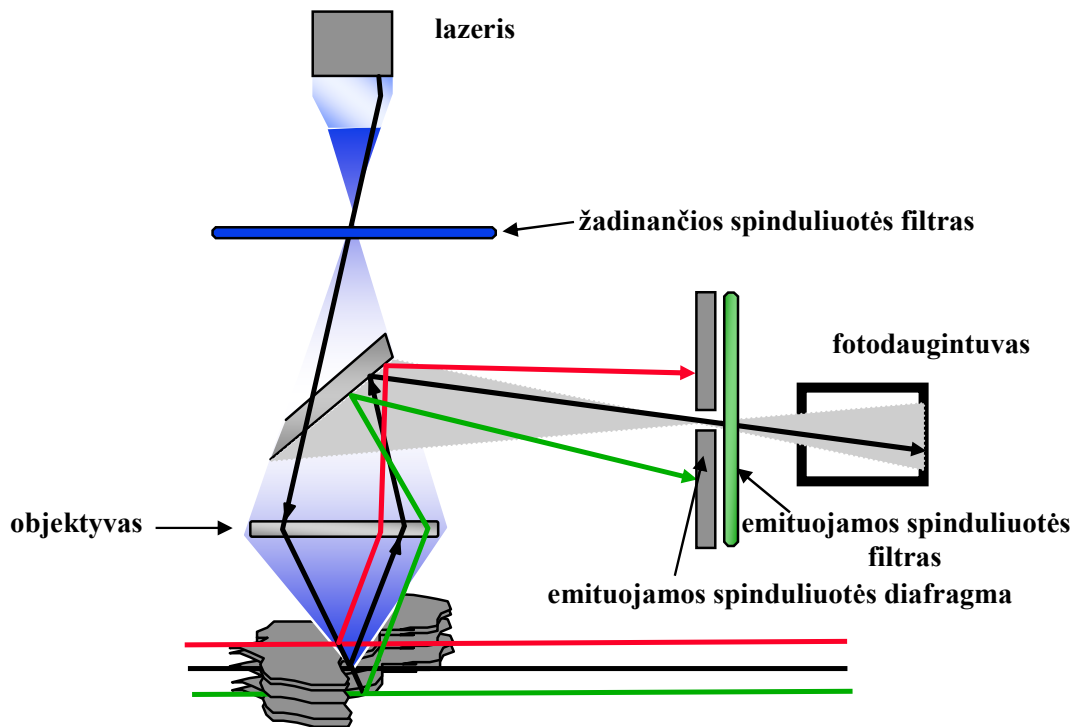
Be to molekulių fluorescenciją sudėtinga analizuoti dėl to, kad esant didelei fluorescuojančių molekulių sankaupai, sunku identifikuoti atskirų molekulių grupių fluorescenciją. Todėl ląstelių sudėtinėms dalims vizualizuoti ar metaboliniams virsmams tarp molekulių detektuoti naudojami papildomi žymekliai – vadinamieji fluorescenciniai dažalai, kurie selektyviai kaupiasi atskirose ląstelių organelėse arba jų fluorescencijos parametrai jautriai reaguoja į vykstančius ląstelėse procesus. Labiausiai paplitę dažalai ląstelėms vizualizuoti – rodaminas, Cy3, fluoresceinas. Fluorescencinės mikroskopijos metodais galima matuoti ir lokalią  $Ca^{2+}$  jonų koncentraciją bei viduląstelinį pH, kas yra svarbu tiriant ląstelėse vykstančius procesus, pvz.: nervinių impulsų perdavimą.

### Konfokalinė mikroskopija

Fluorescencija yra pirminis energijos šaltinis *konfokalinėje*, dar kitaip vadinamoje židinio plokštumos, skenavimo mikroskopijoje. Esminis skirtumas lyginant su fluorescencine mikroskopija yra papildoma diafragma, įstatyta prieš

fluorescencijos registravimo prietaisą. Ji nufiltruoja ne iš židinio plokštumos sklindančią fluorescenciją, tai leidžia selektyviai registruoti fluorescencijos intensyvumą iš mažo tūrio (didesnė nei  $0,2 \mu\text{m}$  skiriamoji geba).

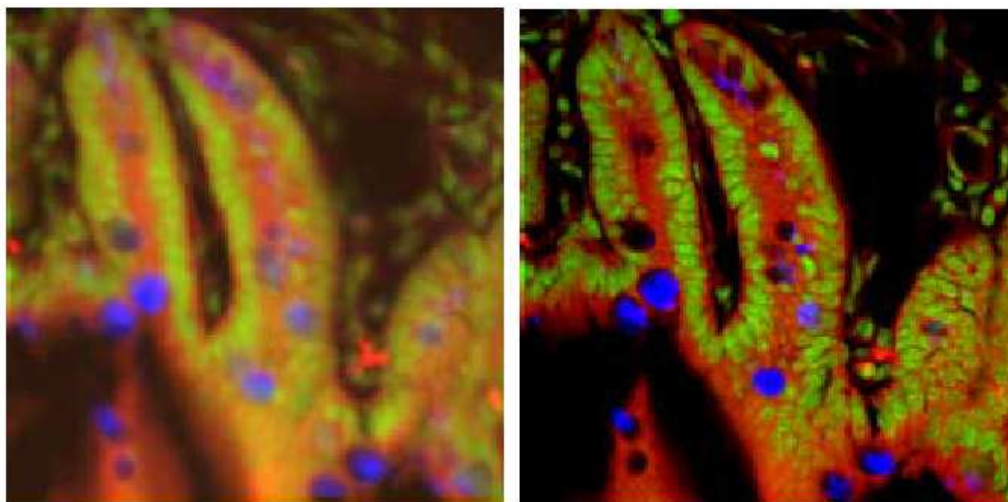
Atvaizdo sudarymas vyksta taip: labai mažas objekto tūris apšviečiamas žadinančia fokusuota lazerio spinduliuote ir registruojamas fluorescencijos intensyvumas iš to objekto tūrio. Žadinanti lazerio spinduliuotė yra nuosekliai slenkama visomis galimomis padėtimis židinio plokštumoje (arba gali būti judinamas pats stebimas objektas), vyksta skenavimas x ir y ašimis. Jei lazerio spinduliuotė fokusavimas yra keičiamas išilgai optinės ašies, bet esant toms pačioms x ir y koordinatėms – skenuojama z ašimi. Trimatis vaizdas gaunamas paeiliui skenuojant visomis x, y ir z ašimis.



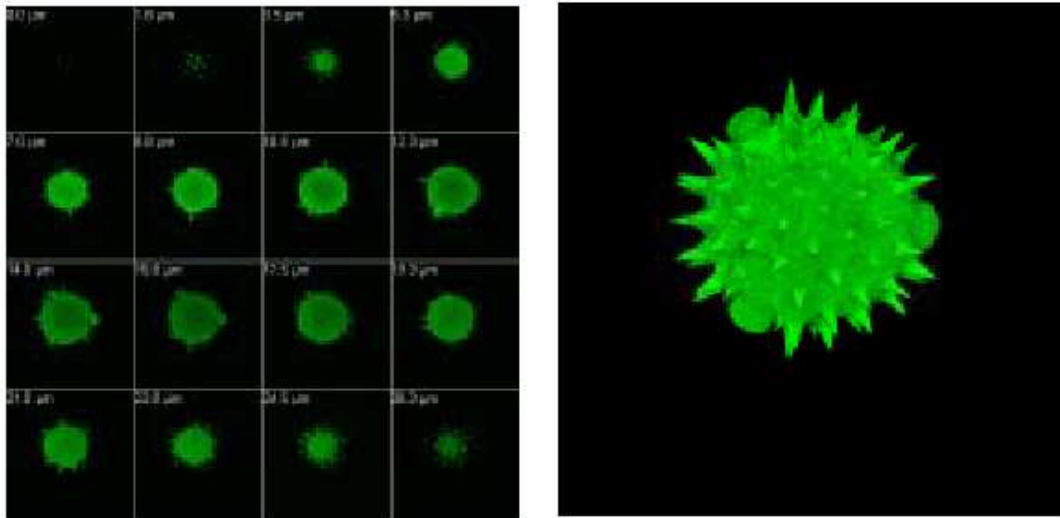
8 pav. Konfokalinio mikroskopo optinė schema.

Atskirų tūrių fluorescencijos intensyvumai persiunčiami į kompiuterį ir apdorojami, suformuojamas nuskenotas fluorescencijos vaizdas kompiuterio ekrane (8 pav.).

Konfokalinės mikroskopijos ištobulinimas ir paprastų bei patogių konfokalinių mikroskopų sukūrimas leidžia juos plačiai naudoti ląstelių tyrimams biologijoje. Paskutiniuosius dešimt metų konfokalinės mikroskopijos naudojimas išplito nuo vien specialistams prieinamo mažų objektų stebėjimo metodo iki standartinio įrenginio laboratorijose. Sparti technologinė pažanga, didelis informacijos nuskaitymo, kaupimo ir apdorojimo greitis, įgalina fluorescenciniais skenavimo mikroskopais gauti trimatį vaizdą. Lazeriniu skenavimo konfokaliniu mikroskopu galima nuskenuoti objektą keliose židinio plokštumose, išsidėsčiusiose objekto tūryje skirtingame gylyje. Kompiuteriu derinant pjūvių vaizdus suformuojamas trimatis vaizdas. Programiškai galima koreguoti gautą vaizdą, matuoti ne visus taškinis tūrius, o vėliau juos suvidurkinti, ir tuo būdu gauti pilna objekto atvaizdą per trumpesnę laiką. Kadangi fluorescencija vyksta iš labai mažo taškinio tūrio, tai konfokaliniu mikroskopu galima tirti gana storus bandinius (iki  $100\ \mu\text{m}$  gyvame bandinyje, kiekvieno „optinio sluoksnio“ storis  $<0,5\ \mu\text{m}$ ) arba netgi nustatyti jų matmenis .



9 pav. Biobjekto (pelės tiesiosios žarnos fragmento) atvaizdas gautas paprastu fluorescenciniu (kairėje) ir fluorescenciniu konfokaliniu ( dešinėje) mikroskopais.



10 pav. Žiedadulkės trimačio atvaizdo sudarymas. Atlikta 116 skenavimų z ašimi skirtingose xy plokštumose, kiekvienos plokštumos storis 250 nm (kairėje). Kompiuteriu apdorojus duomenis gautas trimatis biobjekto atvaizdas (dešinėje).

Tačiau plečiantis konfokalinės mikroskopijos panaudojimo galimybėms, tuo pačiu griežtėja ir patiems mikroskopams keliami reikalavimai, ypač jautriems optiniams komponentams. Maži vaizdo iškraipymai lėšiuose dėl optinės aberacijos apšviesto lauko mikroskopijoje tampa ypatingai reikšmingi konfokalinėje mikroskopijoje. Todėl labai svarbu tinkamai parinkti reikiamą objektyvą konkrečiam stebėjimui.

Chromatinė aberacija konfokalinėje mikroskopijoje pasireiškia taip – skirtingų spalvų žadinanti spinduliuotė nevienodai sufokusuojama ant bandinio paviršiaus, tuo pačiu ir skirtingų spalvų šviesos emisija yra surenkama iš skirtingų bandinio paviršiaus taškų. Horizontalus atvaizdo iškraipymas atvaizdo plokštumoje yra vadinamas *plokštumos chromatinė aberacija*. Dėl šio reiškinio atvaizdo didinimas priklauso nuo šviesos spalvos. Plokštumos chromatinės aberacijos poveikis gali būti sumažinamas atvaizdo taškus sutelkiant į mikroskopo didinamo lauko centrą.

Tačiau egzistuoja ir *ašinė chromatinė aberacija* dėl kurios vaizdas yra iškraipomas išilgai optinės ašies. Tai yra rimta problema jei spalvota konfokalinė mikroskopija yra naudojama tirti daugelio dažalų poveikiui. Be to,

tam, kad konfokaliniame mikroskope būtų pasiekta didžiausias teorinė skiriamoji geba, reikalinga praktiškai ideali optinė sistema difrakcijos atžvilgiu.

Fundamentinis konfokalinės mikroskopijos apribojimas yra diskretus tikslumas, kuriuo atliekami matavimai, t.y. kokia fluorescencijos dalis yra registruojama, koks jos santykis su „tamsia“ (nefluorescuojančia) objekto dalimi. Konfokalinės mikroskopijos metodu surenkami duomenys yra viso bandinio tūrio diskretūs fluorescencijos intensyvumo įvertinimai kiekvienam jo *taškiniui tūriui*. Nors mes matome objekto atvaizda vientisą, tačiau jis yra gaunamas ne vienu metu didinant visus jo taškus kaip klasikiniame mikroskope, bet matuojant šviesos kvantus sklindančius atskirai iš kiekvieno jo taško. Griežto skirtumo tarp šių dviejų metodų galima ir neižvelgti, tačiau jų kaip skirtingų vaizdo sudarymo būdų interpretavimas padeda paaiškinti kai kurias problemas, kurios nėra suvokiamos didinant objekto vaizdą įprastiniu metodu. Pavyzdžiui tai, kad konfokalinėje mikroskopijoje reikia atsižvelgti į fotonų skaičiavimo statistiką, duomenų apdorojimo trukmę, žadinančios spinduliuotės poveikį bandiniui. Plataus (viso) matymo lauko mikroskopijoje į šiuos reiškinius nekreipiama dėmesio. Bet kokios kvantuotos sąveikos dydžio skaičiavimo tikslumas yra apribojamas paklaidomis. Tarkime turime 10 % paklaidą surinkdami 100 fotonų iš fluorescuojančio taškinio tūrio. Jei norime paklaidą sumažinti iki 1 %, tai turime registruoti 10000 fotonų. Tai pasireiškia visose mikroskopijos rūšyse, tačiau konfokalinėje mikroskopijoje tam skiriama daugiau dėmesio, nes kiekvienas fotonas yra skaičiuojamas pavieniui. Todėl norint turėti tikslesnį vaizdą reikia registruoti daugiau fotonų. Sklindančios šviesos spinduliuotės intensyvumas mažėja. Jeigu žadinančios spinduliuotės šaltinis yra lazeris, tai intensyvumo silpimo galime nepaisyti, kadangi pasiekusi objektą spinduliuotė yra vis dar labai intensyvi.

$$\text{taškinis plotas} = \delta_X \cdot \delta_Y$$

$$\text{taškinis tūris} = \delta_X \cdot \delta_Y \cdot \delta_Z$$

Svarbūs parametrai:

skiriamoji geba -

$\delta_X, \delta_Y, \delta_Z$ ;

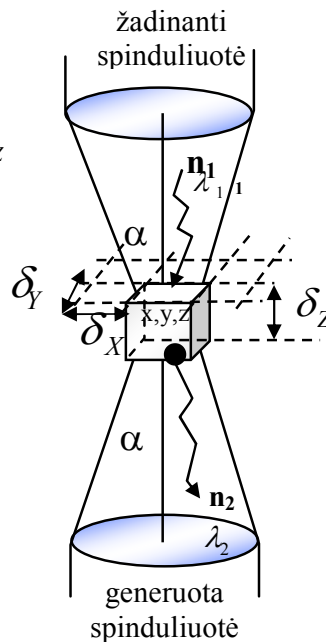
koordinatės -  $x, y, z$ ;

žadinančios ir generuotos spinduliuotės

bangos ilgiai -  $\lambda_1, \lambda_2$ ;

žadinančių ir generuotų

fotonų skaičius -  $n_1, n_2$ .



11 pav. Konfokalinę mikroskopiją ribojantys parametrai: skiriamoji geba -  $\delta_X, \delta_Y, \delta_Z$ ; koordinatės -  $x, y, z$ ; žadinančios ir generuotos spinduliuotės bangos ilgiai -  $\lambda_1, \lambda_2$ ; žadinačių ir generuotų fotonų skaičius -  $n_1, n_2$ .

Tačiau jei naudojamos Hg lempos, tai iki 98-99 % energijos gali išsisklaidyti. Todėl reikalinga labai tiksli optinė sistema, kuri kuo daugiau šviesos surinktų ir nukreiptų į fokusuojamą bandinio vietą, nes nuo jos intensyvumo priklauso fluorescuojančių fotonų kiekis, o nuo to – ekspozicijos trukmė. Šiuo metu naudojant lazerinę žadinačią spinduliuotę jos efektyvumas yra eile didesnis, nei didžiausios galios apšvietimo lempų.

Tačiau didinant žadinančios spinduliuotės intensyvumą svarbu atsižvelgti į tai, jog bandinys netiesiškai reaguoja į lazerio spinduliuotę, kai jo galia  $> 1$  mW. Bandinys pradeda šilti. Jei sukuriamas elektrinis laukas pakankamai stiprus, atsiranda netiesiniai pokyčiai medžiagoje (tokie kaip dvifotonė sugertis), bei ypatingai svarbus *fluorescencijos išisotinimas*. Fluorescencijos išisotinimas vyksta, kai dėl spinduliuotės intensyvumo  $\sim 10W/m^2$  visos fluorescuojančios molekulės dalys jau yra sužadintos. Tai gali būti labai svarbu



jei naudojamas fluorescencinis dažalas yra ribotos gyvavimo trukmės arba jo koncentracija yra maža.

Nors *foto degradacijos* reiškiniai dar nėra visiškai ištirti, bet manoma, kad jei jau sužadinta molekulė absorbuoja antrą fotoną, vyksta fotoblyškimas. Tuo būdu dirbant su žadinančios spinduliuotės intensyvumais artimais sočiai fluorescencinis dažalas blyšksta. Fotoblyškimas yra neigiamas reiškinys gyvai ląstelei, todėl didelėmis spinduliuotės galiomis žadinti biobjekto fluorescencijos negalima, jei norima tirti gyvoje ląstelėje ar joje vykstančius procesus. Taigi norėdami gauti tikslų gyvo objekto atvaizdą turime vykdyti prieštaraujančius vienas kitam veiksmus: iš vienos pusės siekdami didesnio tikslumo bandinio fluorescenciją žadinti turime ilgiau arba didesnės galios spinduliuote, tačiau tuo pačiu taip kenkiama pačiam bandiniui, ir gauname, ne gyvos, bet mirštančios dėl foto degradacijos ląstelės atvaizdą. Taigi „fizikinis tikslumas“ atvirkščiai proporcingas „biologiniam tikslumui“. Didesnė skiriamoji geba reikalauja surinkti tokį pat fotonų kiekį iš mažesnio taškinio tūrio. Norint gauti 2 kartus didesnę skiriamąją gebą mes turime atlikti 4 kartus daugiau matavimų, jei formuojamas atvaizdas yra dvimatis, ir 8 kartus daugiau - jei atvaizdas trimatis. Pagal Nyquist'o kriterijų - tam tikram bangos ilgiui  $\lambda$  tėra tik vienas objektyvo suderinimas optimaliam objekto atvaizdo sudarymui. Visi kiti objektyvo suderinimai, esant tam pačiam žadinančios spinduliuotės bangos ilgiui arba suformuoja prastesnę skiriamąją gebą, arba yra apšviečiama didesniu intensyvumu nei reikia.

*Fotoninis efektyvumas*  $\gamma$  yra registruotų ir generuotų fotonų santykis, be to  $\gamma=f(\lambda)$ . Stengiamasi, kad jo vertė būtų kuo didesnė, nes bandinio išspinduliuoti fotonai perneša informaciją reikalingą formuoti atvaizdai. Fluorescencinėje konfokalinėje mikroskopijoje reikalingi nuo 3 iki 10 kartų jautresni fotonų detektoriai. Net geriausiai suderinta diafragma nufiltruoja apie 15 % fotonų ateinančių iš židinio plokštumos. Nuo lūžio rodiklio  $n$  priklauso atgal atspindėjusios šviesos kiekis. Pats biologinis objektas irgi atspindi dalį

žadinančios šviesos. Jei šis atspindėtas švieso pluoštas patenka į dichroinį filtrą, tai ji tiesiog nufiltruojama, taigi ir jos nešama informacija prarandama. Ši atspindėta šviesa nėra fluorescencinės kilmės, bet ją galima atskirti nuo fluorescencinio atvaizdo jo nesugandinant. Jos sukuriamas atvaizdas gali papildyti fluorescencinį atvaizdą, suteikdamas informacijos apie bandinio paviršiaus optinį nehomogeniškumą. Apie pačios diafragmos naudingumą irgi yra prieštaringų nuomonių, nes nufiltruojant fotonus, kurie nėra fokusuojamoje plokštumoje, negaunama ir informacijos apie kitas plokštumas. O tai irgi yra svarbu, nes objektai nėra materialūs taškai, bet erdviniai kūnai. Jei fotonai iš nežidinio plokštumos gali sukurti atvaizdą, kuris papildytų iš židinio plokštumos sudarytą atvaizdą, tuomet naudingiau bus diafragmos skersmenį padidinti. Tiesiog prieš didinant ar mažinant diafragmos skersmenį reikia atsakyti į klausimą, ar iš židinio plokštumos registruotų fotonų sudarytas atvaizdas mums yra nepilnas, kad mes jį turime papildyti atvaizdais gautais iš kitų plokštumų, žinant, jog tai neigiamai įtakoja atvaizdo kokybę. Tiriant, svarbu kuo daugiau žinoti apie patį bandinį. Jei stebimas mikroobjektas yra  $0.2 \mu\text{m}$ , o už jo esantis didesnis objektas yra  $1 \mu\text{m}$  ir 10 kartų daugiau fluorescuojantis, tuomet įprastu mikroskopu mes išvis negalėsime stebėti mikroobjekto, nes suformuotas jo ir didesniojo objekto atvaizdas persiklos, dėl keliskart padidėjusių fluorescencijos triukšmų skleidžiamų didesniojo objekto. Taigi, šiuo atveju mikroobjektas gali būti tiriamas tik tiksliai suderintu konfokaliniu mikroskopu, kadangi žadinančios šviesos spinduliuotės intensyvumas židinio plokštumoje yra bent 10 kartų didesnis.

Diafragmos dydžiui nustatyti yra eilė skaičiavimo metodų, kadangi tai apima daugybę kintamųjų: atvaizdo ryškumą, tikslumą, didinimą, šviesos bangos ilgį ir kiti. Didžiausio ryškumo ar labiausiai padidintas objekto atvaizdas nebūtinai bus tiksliausias. Todėl reikia atsižvelgti į parametrus, kurie yra svarbūs tiriant bandinį, ir siekiant geriausio rezultato reikia kiekvienu konkrečiu atveju išbandyti apskaičiuotą optimalų diafragmos skersmenį ar jis yra

geriausias. Vienas paprastesnių būdų apskaičiuoti optimalų diafragmos skersmenį yra naudoti šią supaprastintą formulę :

$$d = 0.03679 \cdot f, \quad (5)$$

kur  $d$  – diafragmos skersmuo,  $f$  – objektyvo židinio nuotolis.

Pritaikius tinkamo skersmens diafragmą konfokalinio mikroskopo  $\delta_{xy}$  ( $\delta_{xy}$  - taškinio tūrio išplitimas XY plokštumoje) skiriamoji geba lyginant su paprastu mikroskopu padidinama  $\sqrt{2}$  karto:

$$\delta_{xy} = \frac{1}{\sqrt{2}} \cdot \frac{1,22\lambda}{2NA}. \quad (6)$$

Sudėtingiau nustatyti  $z$  ( $\delta_z$  taškinio tūrio išplitimas  $z$  ašyje) ašies skiriamąją gebą. Viena geriausių tai nusakančių formulių:

$$\delta_z = \frac{1,77\lambda}{(NA)^2}. \quad (7)$$

Konfokalinis mikroskopas negali varžytis su plataus lauko apšvietimo mikroskopu, lyginant objekto vaizdo sudarymo greitį. Todėl konfokalinio mikroskopo pranašumas išryškėja tuomet, kai yra tiriamas nedidelis bandinio tūris.

Paprastai mikroskopuose stengiamasi išgauti kuo didesnę skiriamąją gebą. Kadangi skiriamoji geba fluorescenciniame konfokaliniame mikroskope yra valdomas parametras, tai iškyla klausimas, kokia ji turi būti, arba, ar gali ji būti per didelė? Šiuo atveju reikia atsižvelgti į tai jog stebimame taške dėl žadinančios spinduliuotės vyksta fotodegradacija. Žinodami, jog didindami erdvinę skiriamąją gebą, mes tuo pačiu ir didiname ekspozicijos trukmę (reikalingas pakankamas generuotų fotonų skaičius, norint, kad atvaizdas būtų tikslus), taigi aukojame „biologinį tikslumą“. Bandinių fotoblyškimas gali būti mažinamas specialiais preparatais, tačiau dažnai jie tuo pačiu sumažina ir generuojamų fotonų skaičių, be to ne visus juos galima naudoti bioobjektams apsaugoti. Todėl skiriamosios gebos parinkimas dažniausiai priklauso nuo to, kokio dydžio mikroobjektai yra stebimi. Tai kompromisinis variantas, tarp

bandinio fotodegradavimo ir didelės skiriamosios gebos. Be jau aptartų fizikinių trūkumų ir jų sprendimo būdų, konfokaliniu mikroskopu, dėl mažo stebėjimo lauko, yra sudėtinga surasti norimą tirti bandinio sritį. Be to įranga yra brangi.

### **III Fluorescencinės diagnostikos principas.**

Biomedicininė diagnostika yra viena pagrindinių sričių, kur fluorescencinės spektroskopijos dėka pasiekta didelių rezultatų įvairių tipų tyrimuose. Fluorescencinės spektroskopijos metodais buvo analizuojama daugybė skirtingų bandinių, pradedant nuo įvairių biocheminių medžiagų atmainų iki gyvų žmonių organų. Šie tyrimai sąlygojo fluorescencinės diagnostikos metodo atsiradimą ir tolesnę vystymąsi. Taigi metodo esmė yra neinvaziniu būdu, tiksliau (lyginant su išpjauamos biopsijos bei citologiniais tyrimais) bei realiu laiku nustatomos ankstyvos vėžinių susirgimų stadijos ar kiti organizmo pakitimai. Šio metodo pagalba gaunama informacija apie ląstelinę ir tarpląstelinę audinio struktūrą. Naudojant žymeklius, ar kitaip apdorojant bandinius galima padidinti audinio elementų kontrastą ir taip pat histopatologinių tyrimų tikslumą. Registruojami spektrai bei fluorescenciniai vaizdai, vėliau analizuojant lyginami duomenys gauti iš sveikų bei pažeistų audinių.

Medicininei diagnostikai dažniausiai taikomi fluorescenciniai tyrimai.

Fluorescencinės diagnostikos metodai gali būti skirstomi į:

- Metodus, kurių pagalba detektuojami endogeniniai fluoroforai audiniuose;
- Metodus, kur audinių detekcijai papildomai naudojami egzogeniniai fluoroforai.

Fluorescencija, sąlygota natūralių, jau esančių audiniuose, fluorescuojančių chromoforų, vadinama autofluorescencija. Kitu atveju fluorescenciją gali sąlygoti į organizmą įvesti egzogeniniai chromoforai, kurie yra susintetinami tiksliai žinomiems audiniams, arba aktyvuojami dėl funkcinių audinių pakitimų. Fluorescencinėje analizėje tam tikro bangos ilgio žadinančioji spinduliuotė

sužadina audinio ar egzogeninio fluoroforo molekules ir tuo būdu indukuoja fluorescencijos emisiją.

Siekiant suklasifikuoti skirtingus tyrimų tipus ir atliktus klinikinius tyrinėjimus biomedicininė fluorescencinė spektroskopija skirstoma į tris kategorijas:

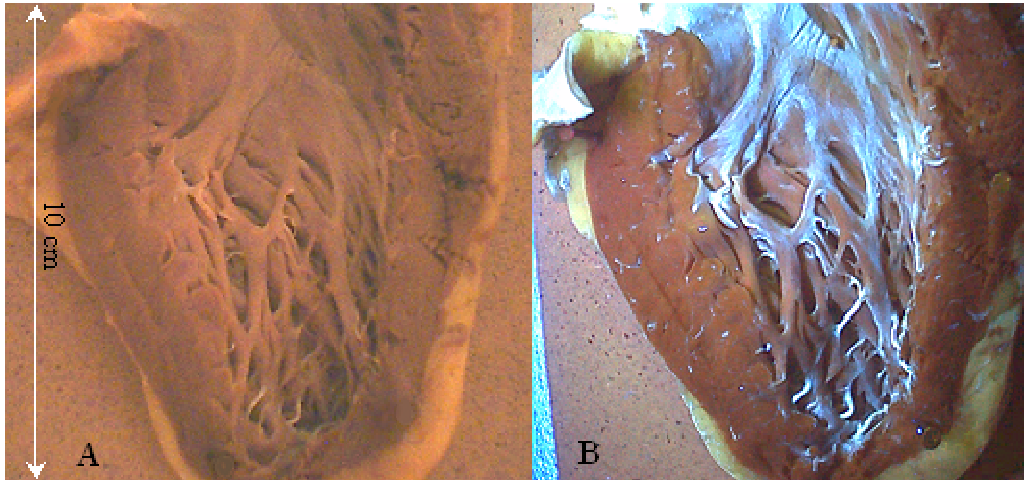
- Pavienių junginių biocheminė fluorescencinė analizė
- Analizė *in vitro*
- Analizė *in vivo*

Biocheminė fluorescencinė analizė yra fundamentalių ar bendrųjų tyrimų pagrindas, čia nagrinėjami pagrindiniai biocheminiai junginiai sudarantys skirtingų biologinių bandinių pagrindą (pvz. triptofanas, NAD, NADH, hemoglobinas). Šių tyrimų dėka yra žinomos ir charakterizuojamos atskirų fluoroforų pagrindinės fluorescencinės savybės. Antrosios kategorijos, analizė *in vitro*, papildomai skirstoma į ląstelių bei audinių tyrimus. Ši analizė papildomai teikia informacijos susijusios su kompleksinėmis sistemomis – ląstelėmis ir audiniais. Analizė *in vivo* suteikia svarbių žinių apie vykstančius esminius biologinius procesus ir padeda suvokti galimas problemas, kurios gali kilti vykdant tyrimus su kompleksinėmis biologinėmis sistemomis (pvz. Interferensijos efektą). Ląstelinės analizės metu stebint endogeninius ar egzogeninius fluoroforus ląstelių lygmenyje gaunama daug informacijos apie daugybę skirtingų procesų, svarbių cheminių reakcijų vykstančių ląstelių organelėse. Mikroskopinė audinių analizė padeda suprasti sąveiką tarp ląstelių ir yra artimiausia tyrimų rūšis tikriesiems *in vivo* tyrimams.

Kai *in vitro* tyrimai supaprastina biologinės sistemos analizę ir suteikia naudingos informacijos apie pagrindines biologines funkcijas bei reakcijas atsiranda poreikis vystyti *in vivo* analizės techniką ligų diagnostikai. Siekiant nustatyti skirtumus tarp sveikų ir ligos pažeistų audinių, naudojama fluorescencinė spektroskopija. Analizės metodas *in vivo* taip pat gali būti skirstomas į tyrimus su gyvūnais bei žmonių klinikinius tyrimus.

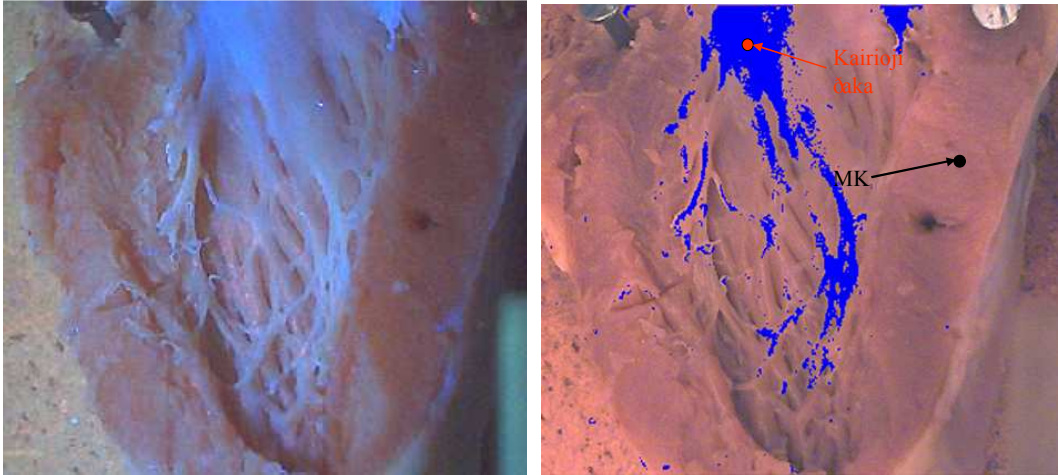
Tyrimams su gyvūnais labai svarbu, kad jų pagrindinių organų biocheminė struktūra būtų kuo panašesnė į žmogaus, taip pat gyvūnu turėtų būti paprasta rūpintis ir jis atitiktų kitus konkrečiam bandymui keliamus reikalavimus. Taigi dažniausiai tyrimams naudojamos pelės bei žiurkės, kadangi jos 98% genetiškai atitinka žmogų. Transgeninės pelės su persodintais navikais yra labiausiai tinkamas optinės biopsijos, ar fotodinaminės terapijos tyrimų modelis.

**Širdies laidžiosios sistemos fluorescencinis vaizdinimas.** Širdies laidžioji sistema yra specializuotas raumeninės kilmės audinys, generuojantis ir perduodantis bioelektrinį impulsą, sukeltą miokardo (MK) susitraukimą. Pažeidus širdies laidžiąją sistemą, sutrinka širdies veikla (ji gali sulėtėti – atsiranda bradikardija, tapti neritmiška – prasideda širdies aritmija). Todėl atliekant širdies operaciją, svarbu tiksliai nustatyti širdies laidžiosios sistemos ribas. Vienas iš nustatymo būdų – yra fluorescencinis vaizdinimas. Tyrimams buvo pasirinkta tarpskilvelinė pertvara, kadangi joje Hiso pluoštas išsiskiria į dvi šakas. Vienoje pertvaros pusėje stebima dešinioji šaka yra siūlo pavidalo, kai tuo tarpu kitoje – kairėje pusėje esanti šaka išsišakoja sudarydama sudėtingą laidžiosios sistemos tinklą. Bandinys buvo tvirtinamas ant padėkliuko, apšviečiamas 365 nm bangos ilgio spinduliuote, kuri gauta iš gyvsidabrio lempos spinduliuotės spektro atitinkamais filtrais išskiriant reikiamas juostas. Vaizdai buvo fiksuojami skaitmenine kamera. Tuo pačiu nuotraukos buvo daromos ir dienos šviesoje, kad galėtume palyginti du vaizdus - vieną, kurį chirurgai įprastai mato operacijos metu, ir kitą, kurį galima būtų gauti panaudojant vaizdinimo sistemą (12 pav.).



12 pav. Širdies tarpkilvelinė pertvara ir joje matoma kairė Hiso pluošto šaka. Vaizdas dienos šviesoje (A), vaizdas apšvietus 365 nm bangos ilgio spinduliuote (B)

Fluorescencinėje nuotraukoje (B) matyti pertvaros viršuje švytinti plati kairioji Hiso pluošto šaka, kuri tęsiasi iki pat skilvelių apačios. Pjūvių vietose miokarde matomi ploni siūliukai yra Purkinje skaidulos. Iš šių pavyzdžių matyti, kad širdies laidžiosios sistemos struktūra yra labai sudėtinga, todėl vienareikšmiškai nusakyti Hiso pluošto šakų išsidėstymo nenaudojant jokių vaizdinimo priemonių neįmanoma. Tarpkilvelinės pertvaros šonuose bei viršuje išsiskiria gerokai intensyviau nei laidžioji sistema švytinčios vietos. Atlikus išsamesnius tyrimus paaiškėjo, kad intensyviau už miokardą švyti ne tik širdies laidžioji sistema, bet ir kitos kolageno ir elastino turinčios struktūros, pvz. vožtuvas, kraujagyslių sienelės. Šie audiniai gali būti priskirti jungiamojo audinio tipui. Norint eliminuoti šių audinių fluorescenciją, buvo atlikti papildomi fluorescencijos matavimai. Tyrimams parinkta širdis, kurios tarpkilvelinėje pertvaroje JA buvo nedaug. Eksperimento metu buvo lyginami tos pačios širdies įvairių vietų fluorescencijos spektrai. (13 pav.). Atlikti spektriniai tyrimai parodė, kad širdies laidžioji sistema vyti intensyviau už miokardą, tačiau silpniau už vožtuvą, kuriame yra labai daug jungiamojo audinio.



13 pav. Tarpkilvelinė pertvara. A – vaizdas apšvietus 365 nm bangos ilgio spinduliute, B – vaizdas dienos šviesoje bei kompiuteriu sumodeliuotas ŠLS išsidėstymas

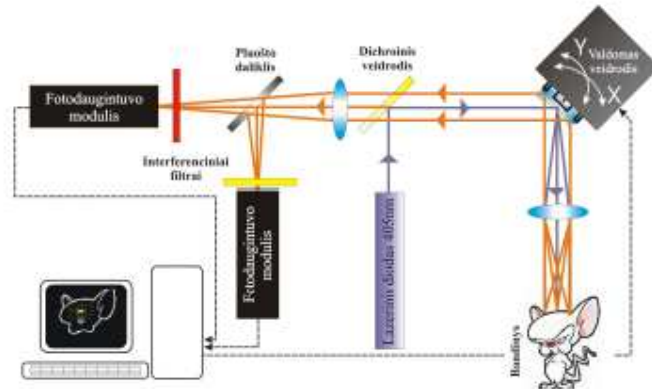
### **Rastrinė fluorescencijos vaizdinimo sistema biomedicininiais taikymams.**

Pažangios optinės metodikos daugelyje medicinos sričių užima reikšmingą vietą tiek diagnostikoje, tiek ir terapijoje. Vieni perspektyviausių fluorescenciniai diagnostikos metodai, kurie sparčiai diegiami ankstyvų navikinių darinių lokalizacijai, ar ikivėžinių audinio pakitimų diagnostikai įvairiuose organuose ypač tais atvejais kuomet įprastinių metodų taikymas nėra efektyvus. Pakitusi piktybinių ląstelių biochemija - specifinių fermentų aktyvumas, pernašos mechanizmai (metabolizmo ciklas) - įtakoja registruojamos fluorescencijos intensyvumą, spektrų formos skirtumus bei naudojamo sensibilizatoriaus susikaupimą. Viena perspektyviausių šiuolaikinių optinių metodikų diegimo krypčių yra mobilių ir greitaeigių fluorescencijos vaizdinimo sistemų kūrimas navikinių darinių lokalizacijai in vivo. Tokios sistemos leidžia neinvaziniu būdu įvertinti navikinio darinio išplitimo ribas, vaizdinti biomolekulių pasiskirstymą biologinėse struktūrose, o taip pat gali būti naudojamos kaip pagalbinė priemonė kiekybiškai įvertinti sensibilizatoriaus susikaupimą navikiniuose audiniuose bei nustatyti optimalius terapijos efektyvumo rodiklius.

Rastrinės fluorescencijos vaizdinimo sistemos (14 pav.) turi keletą privalumų lyginant su plataus lauko sistemomis. Visų pirma, fluorescencijos intensyvumas

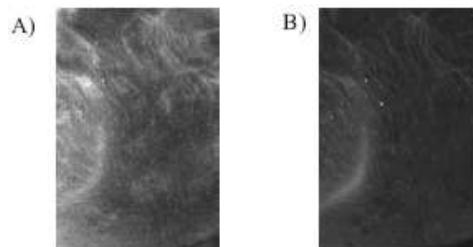


tiesiškai priklauso nuo biomolekulių koncentracijos audinio segmente, antra, registruojamas vaizdas mažiau iškraipomas audinio paviršiaus struktūros netolygumo. Sukurta rastrinė fluorescencijos vaizdinimo sistema įgalintų biologinių sistemų pažaidų lokalizaciją ankstyvose stadijose, naviko ribų - pažaidos erdvinės srities įvertinimą kas itin svarbu praktiniams taikymams medicinoje.



14 pav. Rastrinės fluorescencijos vaizdinimo sistemos schema

Sukurtos sistemos tyrimai parodė, kad rastrinė fluorescencijos vaizdinimo metodika įgalina realiu laiku gauti papildomos tiriamo objekto informacijos registruojant fluorescenciją. Kaitaliojant optinius filtrus fluorescencijos registravimo sistemoje, galime valdyti registruojamo fluorescencijos signalo spektrinės srities dydį, kas leidžia padidinti atskyrų struktūrinių elementų kontrastingumą bei pagerinti taikomos metodikos tikslumą itin mažų objekto erdviųjų sričių įvertinimui (15 pav.).



15 pav. Wistar žiurkės ausies segmentas. Žadinant 405 nm spinduliuote užregistruoti fluorescencijos vaizdai, keičiant fluorescencijos signalo spektrinės srities dydį, naudojant interferencialinį filtrą 525 nm(A) ir 650 nm(B). Pirmuoju atveju vertiname lipopigmentų, flavinų indėlių, o antruoju endogeninio protoporfirino IX atsaką.

#### IV Mikroskopuojamo bandinio dažymas

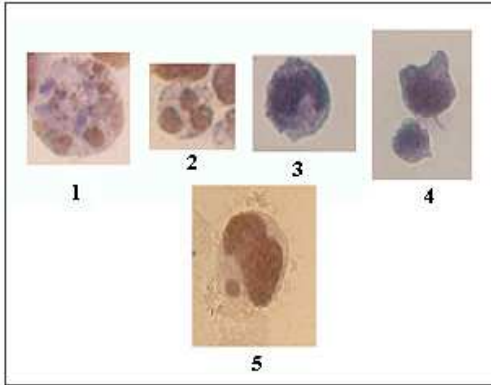
Esant šviesinio mikroskopo skiriamajai gebai apie  $0,2\mu\text{m}$ , teoriškai galima vizualizuoti ląstelės organelės, pavyzdžiui, mitochondrijas, kurių ilgis siekia apie  $1\mu\text{m}$ . Tačiau daugelis ląstelių yra bespalvės, todėl norint išskirti ląstelių audinių komponentus bei ląstelių organelės, histologiniai preparatai yra dažomi. Kai kurie dažai ištirpsta dažomoje medžiagoje, tuo tarpu kiti dažai audinių ir ląstelių organoidus nudažo vykstant sudėtingoms cheminėms reakcijoms.

Histologiniams preparatams tirti paprastai naudojami dviejų ar net kelių dažų mišiniai. Tokiu būdu galima išryškinti dvi ar daugiau audinių struktūrų, nudažyti jas skirtingomis spalvomis. Dažai yra sudėtingos cheminės struktūros organiniai junginiai. Daugelis jų yra sausi arba tirpalų pavidalo. Naudojami dažai pagal chemines savybes yra skirstomi į tris pagrindines grupes: bazinius, arba dažančius branduolius, rūgščius, arba citoplazminius, ir neutralius.

*Baziniais dažais* dažomos histologinės struktūros, dažniausiai ląstelių branduoliai. Iš šios grupės labiausiai paplitę yra hematoksiliniai dažai. *Hematoksilinas* – tai dažai, gaunami iš centrinėje Amerikoje augančio medžio *Haemotoxylon campechianum*. Hematoksilinas audinius nudažo nuo rausvai violetinės iki šviesiai žydros spalvos.

Iš *rūgštinių dažų* dažniausiai naudojamas *eožinas*. Tai sintetiniai dažai, jo tirpalas būna intensyviai rausvos spalvos. Tokia pat spalva jis nudažo ir audinius.

Neutralūs dažai - tai įvairių rūgščių ir bazių junginiai. Dažymas hematoksilino ir eožino mišiniu yra pats universaliausias ir labiausiai paplitęs histologinių preparatų dažymo būdas. Nudažytuose preparatuose būna ryškios visos ląstelinės struktūros. Šiuo metodu tiriamos normalių arba pakitusių organų (vėžinių) bei audinių struktūros. Morfologiškai analizuojant ląstelės žūtį, vertinamos pagrindinės ląstelės žūties formos: apoptozė (apoptotinės ląstelės) ir



16 pav. Apoptotinių ląstelių morfologinės formos

nekrozė (nekrotinės ląstelės). Nudažius histologinį pjūvį hematoksilinu/eozinu, tiriamos ląstelės, turinčios būdingus apoptuojančioms ląstelėms požymius: ląstelių susitraukimą, branduolio kondensaciją bei apoptotinių kūnelių susidarymą. Įvairiose ląstelių kultūrose galima stebėti įvairias apoptozės morfologijos formas: pusrūgulo,

pjautuvo ar pasagos (16 pav.). 16 paveikslėlyje 1) apoptotinė ląstelė, kurioje matyti hematoksilinu pasidažę apoptotiniai kūneliai vizualizuoti 3.3' – diaminobenzidinu po imunohistocheminės reakcijos; 2) apoptotiniai kūneliai susidaro labai taisyklingos apvalios formos; 3) branduolio chromatinas kondensuodamasis hematoksilinu pasidažo intensyviau; 4) iš ląstelės pradeda pumpuruotis apoptotiniai kūneliai; 5) apoptotinius kūnelius fagocituoja įvairios kaimyninės ląstelės (fagocitai).

**Fluorescenciniai žymekliai** Vienas iš būdų vaizdinti nefluorescuojančius organizmo elementus - panaudoti fluorescencinius žymeklius (markerius). Tai cheminiai junginiai, kurie patekę į organizmą kaupiasi tam tikrose ląstelėse ar jų komponentuose. Žymeklių būna įvairių, jie gali būti skirstomi pagal chemines savybes, reakciją su atitinkamomis organizmo ląstelėmis, išsilaikymo navikiniame audinyje trukmę, bei kitus parametrus. Kai kurie žymekliai yra specifiniai navikams, arba tik pavieniams navikiniams susirgimams. Taip pat dauguma gerai žinomų žymeklių matomi ir ne navikiniuose audiniuose.

Fluorescencinėje analizėje naudojamas žymeklis turi pasižymėti tokiomis savybėmis:

1. jis turi tvirtai jungtis tik tam tikroje makromolekulės srityje,
2. jo fluorescencija turi būti jautri aplinkos sąlygoms,
3. jis neturi daryti jokios įtakos tiriamos makromolekulės savybėms.

Šiuos tris kriterijus būtina visada patikrinti.

*Neutralusis raudonis.* Jis citoplazmą nudažo žalsva – gelsva spalva, metachromatinius grūdelius tamsiai raudonai, o vakuoles skaisčiai geltonai.

*Akridino oranžinis.* Citoplazma nudažoma žaliai, metachromatiniai grūduliai ryškiai raudonai, vakuolės rožiniai, o branduolys šviesiai žaliai.

*Auraminas.* Juo galima diferencijuoti tuberkuliozės lazdeles. Žarnyno lazdelės kolonijos pažymėtos fluoroforais išdiferencijuojamos per 6 valandas nuo jų pasėjimo. Dėka mažos koncentracijos (0,001 – 0,00001 %) ir mažo toksiškumo, šie dažai gali būti panaudojami tiriant gyvų bakterinių ląstelių struktūrą.

*Fluoresceinas.* Naudojamas teismo ekspertizėje ir serologijoje, kad aptikti nematomą kraujo dėmę. Fluoresceino sugerties spektro maksimumas yra 490 nm, o fluorescencijos – 519 nm. Be to, fluoresceinas turi izoabsorbcinį tašką (vienoda absorbcija visoms pH vertėms) 460 nm bangų ilgyje.

Kita fluoresceino atmaina yra *fluoresceino izotiocionatas (FITC)*. Tai biologinis dažas naudojamas nustatant antigenus ir antikūnius.

*Teksaso raudonasis.* Tai raudonai fluorescuojantis dažas, kurio molekulinė masė 625 D. Jo sužadinimo maksimumas yra 595 nm, o fluorescencijos – 615 nm. Teksaso raudonasis yra baltymų žymeklis, su kuriais jis lengvai jungiasi. Baltymas susijungęs su fluorofortu veikia kaip fluorescencinis žymėjimo agentas. Antikūnas su fluorescencine žyme susijungia su atitinkamu antigenu, taip antigenų išsidėstymas bus matomas kaip ryškūs taškai, kai bus apšviečiamas. Teksaso raudonuoju gali būti pažymėtos ir kitokios molekulės bei įvairūs toksinai. Jis taip pat gali būti prijungtas prie DNR ar RNR grandinių nustatant DNR seką. Dar naudojamas ir realaus laiko PGR (polimerazinėje grandininėje reakcijoje).

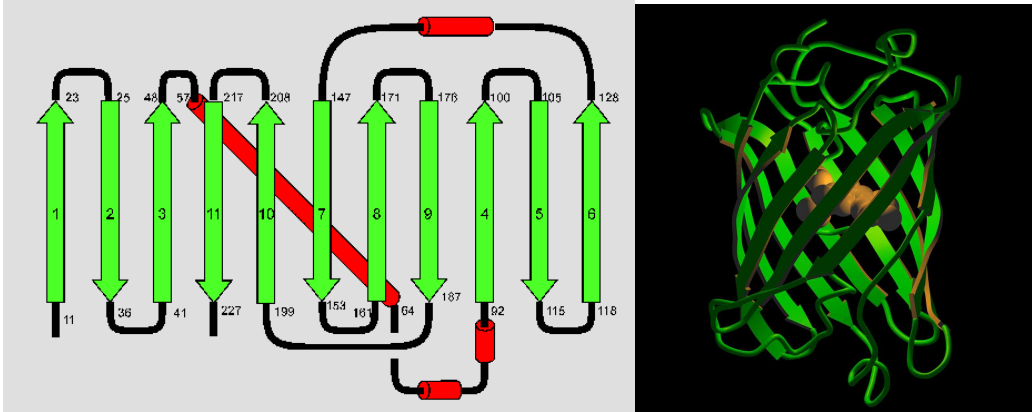
*Etidžio bromidas.* Paprastai naudojamas kaip nukleorūgščių dažas agarų gelio elektroforezėje. Kai paveikiamas ultravioletine šviesa, jis fluorescuoja raudona – oranžine spalva. Etidžio bromidui susijungus su DNR, jo fluorescencija žymiai padidėja, kiek mažiau susijungus su RNR. Susijungus su kitokiais

junginiais, jo fluorescencija nepakinta arba pakinta labai nežymiai. Etidžio bromido jautrumas aplinkai buvo panaudotas nustatyti antrinės ir tretinės nukleorūgščių struktūros pakitimams. Etidžio bromidas veikia kaip mutagenas, nes jis įsijungia į dvigubą DNR spiralę, tokiu būdu iškraipant molekulę. Tai blokuoja biologinius procesus, tokius kaip DNR replikacija ir transkripcija.

*Rodaminas*. Tai grupė cheminių junginių iš kurių gali būti rodaminas B ir rodaminas 6G. *Rodaminas B* biologijoje naudojamas kaip fluorescencinis dažas, kartais kombinuojamas su auraminu O vizualizuojant atsparias rūgštims bakterijas, ypač mikobakterijas.

Audinių ir jų elementų žymėjimui naudojami baltyminiai žymekliai, įvairūs nanodariniai bei kvantiniai taškai. Pirmą kartą žaliai fluorescuojantį baltymą – GFP (17 pav.) iš *Aequorea victoria* medūzos išskyrė Osamu Shimomura (1960 m). Medūzoje fluorescencija įvyksta, kai liuminescencinis baltymas aequorinas sureaguoja su  $Ca^{2+}$  jonu, kuris sukelia melsvą švytėjimą. Dalis šios liuminescencinės energijos perduodama GFP, kuris pakeičia bendrą spalvą į žalią. Šio proceso, kaip molekulinės biologijos įrankio, panaudojimas nebuvo žinomas, kol 1992 m. Douglas Prasheris atkartojo GFP geno nukleotidų seką. GFP baltymas sudarytas iš 238 aminorūgščių (23 kDa), turi unikalią statinės formą, kurią sudaro 11 beta klosčių ir viena alfa spiralė, kurios centre telpa chromoforas. Ši statinė leidžia chromoforui susiformuoti ir apsaugo jį nuo supančios mikroaplinkos poveikio. Šis žaliai fluorescuojantis baltymas suteikė daug galimybių: jei būtų pagaminta pakankamai GFP, tuomet būtų galima aptikti ir sekti GFP judėjimą ląstelėje, nes ląstelės švitinimas UV spinduliais sąlygotų jo fluorescenciją. Ląstelės ir molekulinėje biologijoje GFP genas naudojamas kaip atitinkamų reiškinių indikatorius. Modifikuotos šio baltymo formos gali būti naudojamos kaip biojutikliai. GFP ir jo darinių, kaip fluorescencinių žymeklių galimybės naudojamos fluorescencinėje mikroskopijoje, ląstelių biologijoje bei kitose srityse. Dauguma mažų fluorescuojančių molekulių (pvz. FITC), naudojamų gyvose ląstelėse, yra labai

fototoksiškos, tuo tarpu fluorescenciniai baltymai (kaip GFP) dažnai yra mažiau kenksmingi gyvoms ląstelėms. GFP yra gana mažas baltymas, tai svarbu, nes dėl mažo baltymo prijungimo prie dominuojančio baltymo mažai tikėtina, kad pastarojo funkcinis aktyvumas pakistų.



17 pav. GFP (žaliai fluorescuojančio baltymo) struktūra.

Daugumai kitų bioluminescensija pasižyminčių molekulių reikia papildomai kitų medžiagų tam, kad jos šviestų, GFP to nereikia. Tai suteikia GFP daugiau universalumo ir paprastumo kaip žymekliui lyginant su kitais baltymais žymekliais.

Fluorescuojančių baltymų yra įvairių, jie pagal fluorescencijos spalvą skirstomi:

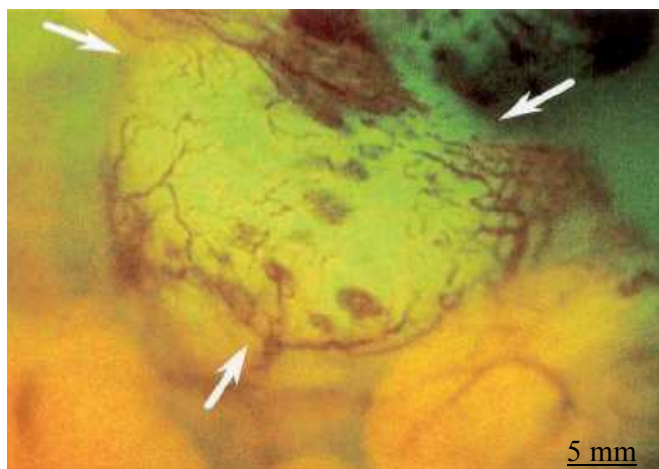
- Žaliai fluorescuojantys baltymai;
- Mėlynai fluorescuojantys baltymai;
- Žalsvai mėlynai fluorescuojantys baltymai;
- Geltonai fluorescuojantys baltymai;
- Raudonai fluorescuojantys baltymai;

Svarbiausi fluorescuojančių baltymų parametrai ir savybės:

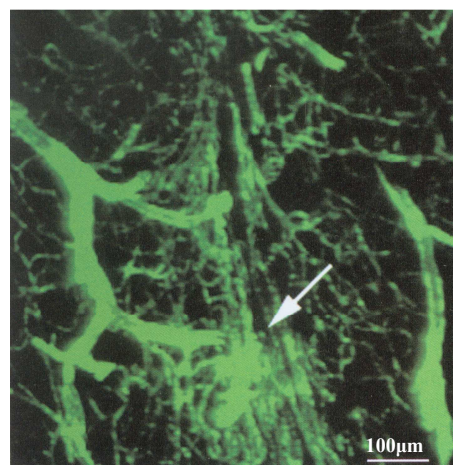
- Sugerties spektro smailė;
- Fluorescencijos spektro smailė;
- Molinis ekstincijos koeficientas;
- Fluorescencijos kvantinis našumas;
- *In vivo* struktūra: Monomeras, Dimeras, Tetrameras
- Fotostabilumas

- Fotoblukimo kinetika

Norint pamatyti naviko vaskuliarinę struktūrą, buvo atliekami bandymai su skirtingais žymekliais. Kaip matome 18 pav., naviko ląsteles pažymėjus GFP matoma žalia naviko fluorescencija, kurios kontraste išryškėja kraujagyslės. Kitu atveju buvo panaudotas fluorescencinis žymeklis fluoresceino izotiocianino dekstranas (FITC dekstranas), kuris selektyviai kaupiasi kraujagyslėse (pažymi endotelį, jungiasi prie eritrocitų ir trombocitų) (20 pav.). Šis preparatas buvo suleistas eksperimentiniams gyvūnams (žiurkėms) stebėti smegenų audinio FNT indukuotą neovaskuliarizaciją. Inkubacijos laikas 2 min., vėliau smegenys išimtos histologinei analizei atlikti. Žadinimui naudotas argono lazeris. Iš FITC dekstrano fluorescencijos galima buvo atskirti stambesnes kraujagysles ir smulkiuosius kapiliarus. Pastaruoju metu sparčiai tobulėjant nanotechnologijoms atsirado daugiau galimybių audinių fluorescencijai stebėti. Kvantiniai taškai pradėti sėkmingai taikyti kaip kraujagyslinio tinklo žymenys *in vivo*. Siekiant pademonstruoti kvantinių taškų potencialą giluminiam diagnostiniam vaizdinimui *in vivo* buvo atlikti tyrimai į veną suleidus pelei vandeninio kvantinių taškų tirpalo.

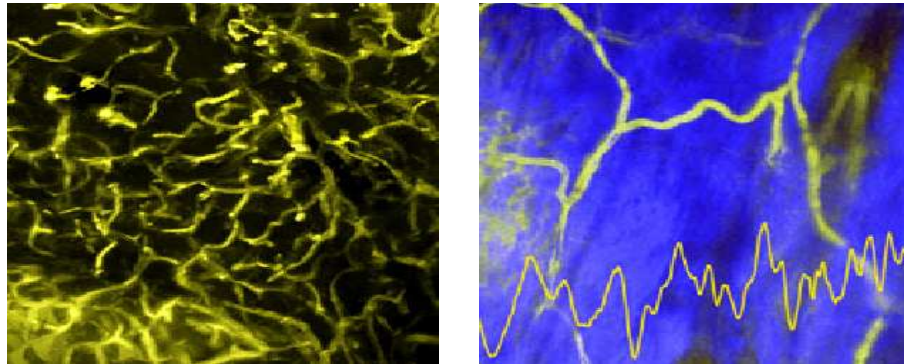


18 pav. Fluorescuojant navikui išryškėja kraujagyslių tinklas



19 pav. naudojant kraujagyslėse besikaupiantį žymeklį, fluorescuoja kraujagyslės.

Buvo atliktas bandymas vaizdinant dviejų tipų audinius (odos ir riebalinį), vaizdinimo metu kvantinių taškų pagalba per nepažeistą odą iki giluminio pelės odos sluoksnio (900nm gylyje) buvo aiškiai matoma kraujagyslinė sistema (20 pav.). Taip pat buvo galima lengvai nustatyti kraujo tėkmės greitį naudojant linijinį skenavimą bei nustatyti širdies ritmą iš pasikartojančio kapiliaro sienelių bangavimo odos kryptimi. Palyginus taikytą kvantinių taškų metodą su tradiciniu (suleidžiant FITC-dekstraną), buvo nustatyta, kad vaizdinant tame pačiame gylyje ir naudojant 5 kartus mažiau galios, matosi nepalyginamai daugiau detalių.



20 pav. Išsišakojusios kapiliarų struktūros vaizdinimas gyvajame audinyje panaudojant kvantinius taškus. Nuotrauka padaryta dvifotonio žadinimo mikroskopu

FITC-dekstrano pagalba tik apytiksliai buvo galima atlikti kraujo tėkmės matavimą perpus mažesniame gylyje, nei pasiekiamas naudojant kvantinius taškus.

Taip pat navikinių audinių diagnostikai ir žymėjimui naudojami egzogeniniai fluoroforai. Jų pagalba stebima tiek ląstelių ir jų dalių funkcijos, tiek žymimas visas navikas, priklausomai nuo naudojamo žymeklio rūšies. Dažniausiai naudojami ir geriausiai charakterizuojami šie fotosensibilizatoriai: hematoporfirinas (HpD), fenoforbidas-a (mTHPC), benzoporfirino darinys



(BPD), etipurpurinas (SnET2), hipericinas, 5-aminolevulino rūgštis (ALA) ir fotofrinas (HpDs).

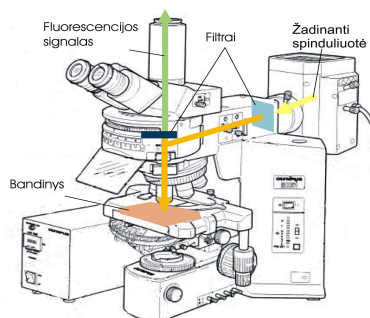
#### **4. Praktinės užduotys.**

1. Kokį mažiausią objektą išskiria optinis mikroskopas, jei apšvietimui vartojama žalia šviesa ( $\lambda = 550\text{nm}$ ), objektyvas neimersinis, apertūros kampas  $\varphi = 60^\circ$ ?
2. Mikroskopas, kurio objektyvo židinio nuotolis yra 1 cm, didina 100 kartų. Kaip pasikeis to mikroskopo didinimas, jei vartosime 2 mm židinio nuotolio objektyvą?

#### **5. Aparatūra ir darbo metodika.**

##### **Audinių ir ląstelių vaizdinimas fluorescencinės ir konfokalinės mikroskopijos metodais**

Laboratoriniame darbe „Biologinių objektų vaizdinimas“ vaizdinant ląsteles bei audinių pjūvius bus naudojamas konfokalinis mikroskopas Nikon Eclipse EZ-C1<sup>1</sup> arba fluorescencinis mikroskopas Nikon Eclipse e400 (21 pav.).

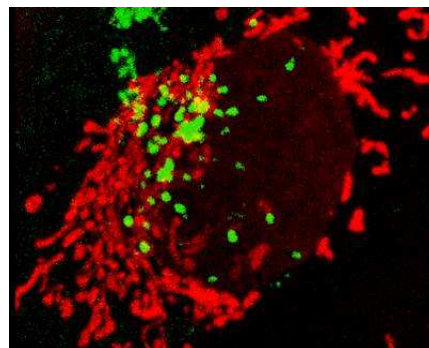


21 pav. Histologinių pjūvių ir ląstelių fluorescencijos vaizdų registravimo aparatūros schema.

---

<sup>1</sup> Prieš pradėdant darbą su konfokaliniu mikroskopu **būtina perskaityti naudojimosi instrukciją**

Histologiniams preparatams paruošti bus naudojama parafininė technika ir standartinis Hematoksilino/Eozino dažymo protokolas (erzinas – raudonai fluorescuojantis dažas, naudojamas citoplazmos, kolageno bei raumeninių skaidulų žymėjimui, hematoksilinas dažo pavienius ląstelių branduolius). Taigi paruoštų bandinių vaizdus stebėsime per mikroskopo Nikon Eclipse EZ-C1 okuliarą, o jų fluorescenciniai vaizdai bus fiksuojami kompiuterio ekrane. Žadinimo bangos ilgis bus parenkamas atsižvelgiant į naudojamų fluorescencinių žymenų sugertį. Fluorescencijos atkirtimui bus naudojamas specialus filtrų rinkinys. Konfokalinio mikroskopo šviesos šaltinis yra lazerinė spinduliuotė, nes tik jos pagalba galima gauti geros formos šviesos pluoštą, kas yra būtina, norint jį tiksliai sufokusuoti. Lazerių generuojamo šviesos spindulio fronto forma yra Gauso kreivės pavidalo, todėl pereinant šiam pluoštui pro lęšius, jis nėra iškraipomas. Turint siaurą lazerio impulsą, vaizdas bus gaunamas skenuojant tašką po taško, liniją po linijos. Bandinys bus judinamas, keičiant jo padėtį visose trijose x,y,z ašyse. Kad gautus taškus sujungti į vieną bendrą vaizdą bus naudojamos kompiuterinės programos, kurios iš kiekvieno taško gautą informaciją surenka ir apdoroja. Konfokalinio mikroskopo pagalba bus gaunami objekto pjūviai, o skenavimas vyks išilgai z ašies. Nuskenavus bus sukuriamas 3D vaizdas (22 pav.). Terminiškai sukeltiems ląstelių pažeidimams bus naudojamos įvairios lazerinės sistemos. Ląstelių gyvybingumo įvertinimui, t.y žuvusių ląstelių aptikimui bus naudojami nukleorūgščių dažai. Raudonai fluorescuojantys, ląstelės nelaidūs etidžio ir propidžio dažai – etidžio bromidas, etidžio homodimeras –1 ir propidžio jodidas bus naudojami rūšiuojant žuvusias ląsteles.

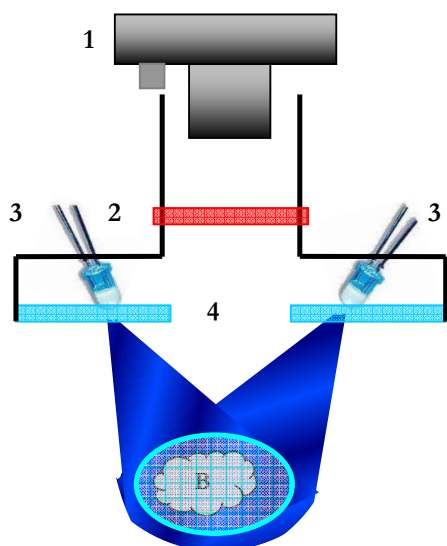


22 pav. 3D fluorescencinis vaizdas osteosarkomos ląstelės inkubuotos su (CdSe)ZnS-MUA(žalia) bei endoplazminio tinklo žymekliu Syto64

## Optinė sistema organų vaizdinimui bei kraujagyslių vaizdinimui in vivo

Wistar žiurkių organų vaizdinimui bus surenkama optinė sistema pavaizduota 23 pav. Optinę sistemą sudaro: fluorescencijos žadinimui sumontuoti atitinkamo bangos ilgio šviesos diodai, EMCCD (Andor) kamera organų fluorescencinių vaizdų registravimui ir šviesos filtras reikalingas žadinančios spinduliuotės atkirtimui.

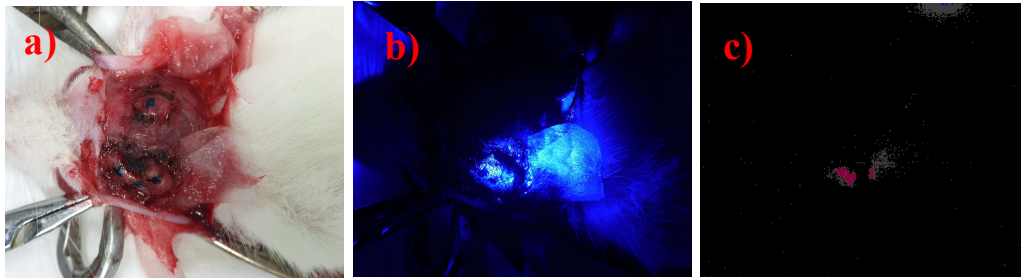
Kelių centimetrų atstume nuo šviesos diodų bus suformuojamas tolygus žadinančios šviesos intensyvumo pasiskirstymo laukas. Eksperimentinių gyvūnų organų fluorescencijos vaizdų registravimui bus naudojama EMCCD kamera, kuri bus įtvirtinama virš tiriamo objekto statmenai jo paviršiui. Kadangi bus tiriami autofluorescencijos vaizdai, tai žadinimui patartina paimti 405nm



23 pav. Organų fluorescencijos vaizdinimo schema 1- EMCCD kamera; 2- filtras fluorescencijos atkirtimui; 3-LED šviestukai; 4- žadinančios spinduliuotės atkirtimo filtras ; B-bandinys.

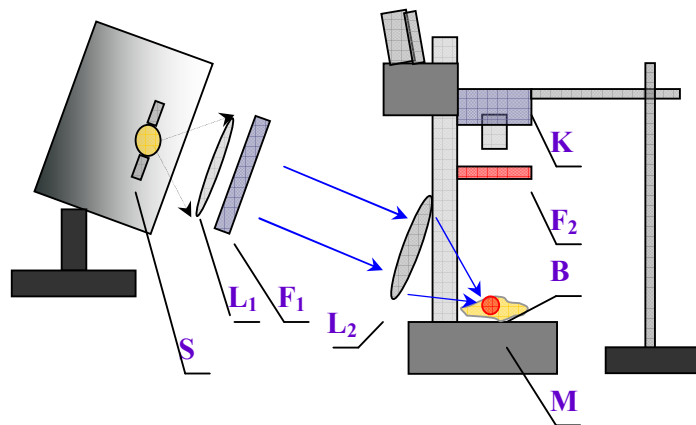
bangos ilgio spinduliuote tam, kad selektyviai sužadinti endogeninius porfirinus, o jų fluorescencijos registravimą atlikti 600-700 nm spektrinėje srityje. Kiekvieno organo atveju bus padaromos trys nuotraukos: žadinančios spinduliuotės fone, endogeninių porfirinų fluorescencijos vaizdas, kai tarp EMCCD kameros objektyvo ir bandinio įterpiamas filtras (kuris eliminuoja žadinančios spinduliuotės įtaką  $< 600$  nm) ir baltoje šviesoje (24 pav.). Baltos ir žadinančios

spinduliuotės objekto vaizdai užregistruojami EMCCD kamerai dirbant auto režimu, o endogeninių porfirinų fluorescencija registruojama pasirenkant keletą ekspozicijos trukmių. Gauti vaizdai užvardijami ir išsaugomi kompiuterio atmintyje tolimesnei analizei.



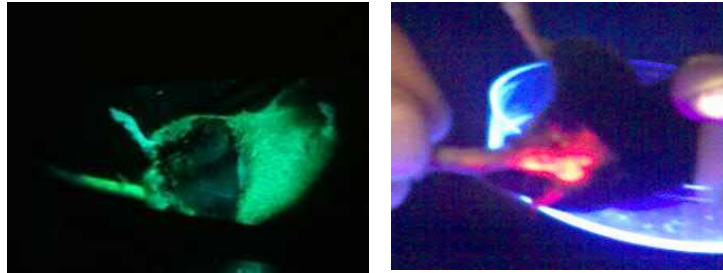
24 pav. 5 –PpIX fluorescencijos vaizdas eksperimentiniuose smegenų navikuose. (a) – kambario šviesos fone; (b) – žadinančios šviesos fone (d) – fluorescencijos vaizdas;

Kraujagyslių vaizdinimui in vivo surenkama optinė sistema pavaizduota 25 pav. Optinė sistema sudaro: EMCCD kamera fluorescencijos vaizdų registravimui, UV/VIS lempa su atkirtimo filtrais, pasirenkant reikalingą žadinimo bangos ilgį, šviesinis mikroskopas, kraujagyslių fluorescencinių vaizdų gavimui, mikrometrinis staliukas, skirtas didesnių plotų skenavimui, filtras fluorescencijos atkirtimui. Vaizdinimas bus atliekamas baltoje šviesoje bei apšvietus mėginį UV šviesa. Prieš atliekant kraujagyslių vaizdinimą in vivo reikia pagaminti FITC-dekstrano tirpalą 50mg medžiagos buvo ištirpinti 1 ml fiziologinio tirpalo, bei leisti pelėms po 0.02 – 0.3 ml, 1 g. Skirtinga vaisto koncentracija pasirenkama siekiant optimizuoti kraujagyslių vaizdinimą audinių segmente.



25 pav. Eksperimentinis in vivo kraujagyslių fluorescencijos vizualizacijos kompleksas. S – UV/VIS lempa; L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> – lęšiai; F<sub>1</sub> – žadinančios spinduliuotės atkirtimo filtras; M – mikroskopas; B – bandinėlis; F<sub>2</sub> – fluorescencijos atkirtimo filtras; K – EMCCD kamera;

Po FITC-dekstrano suleidimo registruojami kraujagyslių fluorescenciniai vaizdai laikui bėgant. Kaip alternatyva FITC-dekstranui galima pasiimti CdTe-COOH arba (CdSe)ZnS kvantinius taškus (26 pav.) Tyrimo metu eksperimentinis gyvūnas bus padėtas ant mikrometrinio stalelio, sukant mikrometrinį stalelį galima atlikti skirtingų vietų skenavimą.



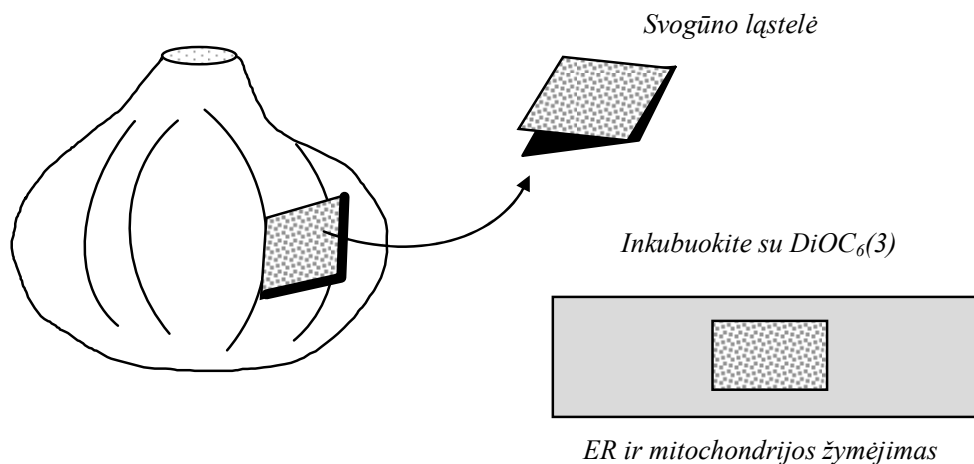
26 pav. Pėlių kurioms suleisti FITC-dekstranas (kairė) ir (CdSe)ZnS kvantiniai taškai (dešinė) fluorescenciniai vaizdai, žadinant UV spinduliuote.

## 6. Darbo eiga

### 1 užduotis

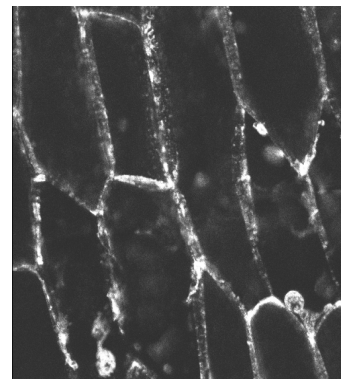
➤ Darbas su konfokaliniu mikroskopu Nikon Eclipse EZ-C1<sup>2</sup>. Histologinių pjūvių ir ląstelės organelių vaizdinimas.

1) Pradžioje pratestuokite konfokalinį mikroskopą, įprastas gyvos ląstelės testavimo bandinys yra svogūno ląstelės epitelis.



<sup>2</sup> Prieš įjungiant perskaitykite instrukciją

Svogūno ląstelės mitochondrijų ir endoplazminio tinklo žymėjimui naudokite fluorescencinį žymeklį DiOC<sub>6</sub> (3). Šio žymeklio stoko koncentracija yra 0,5mg/ml etanolyje. Inkubavimui su svogūno ląstelėmis praskieskite 1000 kartų distiliuotu vandeniu. Prieš atliekant inkubavimą su svogūno ląstelėmis išmatuokite DiOC<sub>6</sub> žymeklio fluorescencijos ir sugerties spektrus UV-VIS spektrometru Varian 50 Scan ir Cary Eclipse spektrofluorimetru. Atsižvelgiant į DiOC<sub>6</sub> žymeklio optines charakteristikas, parinkite žadinimo spinduliuote ir fluorescencijos atskyrimui konfokaliniam mikroskope filtrų rinkinį.



27 pav. Svogūno ląstelės inkubuotos su DiOC<sub>6</sub> žymeklių fluorescencinis vaizdas

*Bandinio paruošimas.* Paimkite svogūną, nulupkite svogūno lukštą, atpjaukite dalį svogūno ir inkubuokite su DiOC<sub>6</sub> (3) kol nusidažys svogūno ląstelės epitelis. Pradžioje gaukite svogūno ląstelės autofluorescencinį vaizdą. Po inkubacijos svogūno ląstelę padėkite ant mikroskopo stikliuko ir pabandykite užregistruoti fluorescencinį vaizdą (27 pav.). Gavę fluorescencinį vaizdą pabandykite, keisdami objektyvus gauti detalesnę svogūno ląstelės struktūrą. Nustatykite tikslią žymeklio DiOC<sub>6</sub> lokalizaciją ląstelėse ar jis tikrai nudažė mitochondrijas? Kodėl jis jūsų manymu dažo būtent mitochondrijas? Praskenuokite jūsų svogūno ląstelę z kryptimi ir gaukite 3D nuotrauką.

2) Prieš pradėdami darbą su navikinėmis ląstelėmis apie jų paruošimą fluorescenciniai mikroskopijai perskaitykite literatūroje<sup>3</sup>. Šiame etape jus dirbsite su Hepatomos A22 (MH-A22) ląstelėmis. Konfokalinės mikroskopijos pagalba nustatykite skirtingo tipo fotosensibilizatorių<sup>4</sup> lokalizaciją pelių hepatomos ląstelėse. Gaukite hepatomos ląstelės fluorescencinius vaizdus po 2h, 4h, 8h, 16h, 24h inkubavimo su dviem skirtingais fotosensibilizatoriais.

<sup>3</sup>Stephen Rogers. Cell Biology Applications of Fluorescence Microscopy.

<http://www.olympusfluoview.com/applications/protocols/index.html>

<sup>4</sup> Parenka dėstytojas

Nustatykite kokiais keliais šie fotosensibilizatoriai patenka į hepatomos ląsteles. Bandydami nustatyti tikslią fotosensibilizatorių lokalizaciją naudokite atitinkamus fluorescencinius žymeklius. Gaukite šių ląstelių 3D vaizdus su keliais skirtingais fotosensibilizatoriais.

3) Pelių hepatomos A22 ląsteles paveikite skirtingo bangos ilgio spinduliuote<sup>5</sup>, keisdami žadinančios spinduliuotės intensyvumą bei švitinimo laiką. Įvertinkite žuvusių ląstelių skaičių, nudažydami ląsteles akridino oranžu arba etidžio bromidu. Gaukite žuvusių ląstelių fluorescencijos vaizdus. Nustatykite žuvusių ląstelių skaičiaus priklausomybes nuo bangos ilgio, intensyvumo ir šviesos dozės.

4) Pabandykite išskirti iš žiurkės pilvaplėvės makrofagus. Išskyre juos po mikroskopu pasižiūrėkite ar jums pavyko jas švariai išskirti. Inkubuokite makrofagus su skirtingo dydžio, skirtingos cheminės sudėties ir skirtingo paviršiaus modifikavimo kvantiniais taškais. Po 2h, 4h, 8h, 16h inkubavimo tirpalai su makrofagais ir kvantiniais taškais praplaunami. Praplovimo frakcijos surenkamos tolimesnei analizei. Gaukite makrofagų su kvantiniais taškais po skirtingų inkubavimo laikotarpių fluorescencinius vaizdus. Ar makrofagai sufagocitavo kvantinius taškus? Jei taip, ties kuria inkubavimo trukme? Nustatykite skirtingų kvantinių taškų lokalizaciją makrofage. Palyginti, gautus rezultatus, nuo ko priklauso konkretaus kvantinio taško fagocitozė. Norėdami įsitikinti, kad kvantiniai taškai tikrai yra makrofago viduje gaukite makrofago 3D vaizdą.

## **2 užduotis**

➤ *Optinių sistemų vaizdinimui in vivo konstravimas ir fluorescencinių vaizdų in vivo registravimas*

1) Sukonstruoti organų fluorescencinio vaizdinimo sistemą, kuri parodyta 24 pav. Parinkti filtrus ir žadinimo šaltinius įvairių organų autofluorescencinių vaizdų registravimui. Iš Wistar žiurkės išpreparuoti šiuos organus: ausis,

---

<sup>5</sup> Keli lazeriniai šaltiniai arba UV/VIS lempa

blūžnis, inkstas, kepenys, plaučiai, raumuo ir smegenys. EMCCD kameros pagalba, keičiant ekspozicijos trukmę, užregistruoti jų autofluorescencinius vaizdus. Kitai Wistar žiurkei suleisti į uodegos veną 15mg/kg fotofrino II. Praėjus 72h po fotofrino II suleidimo nužudyti ir išpreparuoti tuos pačius organus kaip ir pirmai žiurkei. Užregistruoti fotofrino II pasiskirstymą skirtinguose organuose ir palyginti su prieš tai gautais autofluorescenciniais organų vaizdais. Nuotraukos gaunamos baltoje šviesoje ir žadinančios spinduliuotės fone. Vėliau norint nustatyti tikslią fotosensibilizatoriaus lokalizaciją organe fluorescencinis vaizdas yra uždedamas ant vaizdo padaryto baltoje šviesoje.

2) Sukonstruoti optinę sistemą kraujagyslių vaizdinimui in vivo pagal schemą pavaizduota 25 pav. Paruošti FITC-dekstrano tirpalą. 50mg medžiagos ištirpinti 1 ml fiziologinio tirpalo, bei leisti pelėms po 0.02 – 0.3 ml, 1 g. Pasirinkti skirtinga vaisto koncentraciją, siekiant optimizuoti kraujagyslių vaizdinimą audinių segmente. Išmatuoti FITC-dekstrano fluorescencijos ir sugerties spektrus. Pagal juos parinkti žadinimo šaltinį ir fluorescencijos atkirtimo filtrus. Suleisti skirtingas FITC-dekstrano koncentracijas į pelės uodegos veną. Užregistruoti kraujagyslės fluorescencinį vaizdą in vivo. Padaryti fluorescencines nuotraukas baltoje šviesoje, autofluorescencijos fone bei nufiltravus autofluorescenciją.

3) Į pelės uodegos veną suleisti skirtingos modifikacijos kvantinius taškus. Užregistruoti jų fotoluminescenciją kraujotakoje in vivo. Gauti kraujagyslinio tinklo fluorescencinius vaizdus. Palyginti kraujagyslių fluorescencinių nuotraukų kontrastą su 2) punkte gautomis nuotraukomis.

## **7. Kontroliniai klausimai.**

1. Konfokalinės mikroskopijos veikimo principas.
2. Kuom konfokalinis mikroskopas yra pranašesnis už fluorescencinį?

Detaliai paaiškinkite.

3. Pagrindinės optinės ydos.



4. Ką reikėtų daryti norint padidinti mikroskopo skiriamąją gebą?
5. Fluorescenciniai žymekliai. Jei jums reikėtų nudažyti goldžio aparatą kurį pasirinktumėte?
6. Rastrinė fluorescencijos vaizdinimo sistema biomedicininiam taikymams

## **8. Literatūra.**

1. B. Matsumoto Cell Biological Applications of Confocal Microscopy, Second Edition (Methods in Cell Biology) (Methods in Cell Biology, 70) (Paperback)
2. David L. Spector. Basic Methods in Microscopy: Protocols And Concepts from Cells, a Laboratory Manual (Paperback)
3. <http://www.nikon.com/>
4. Jianghong Rao, Anca Dragulescu-Andrasi, Hequan Yao Fluorescence imaging in vivo: recent advances *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 18, No. 1. (February 2007), pp. 17-25.