

Co vše lze vidět bez značení?

Aleš Benda

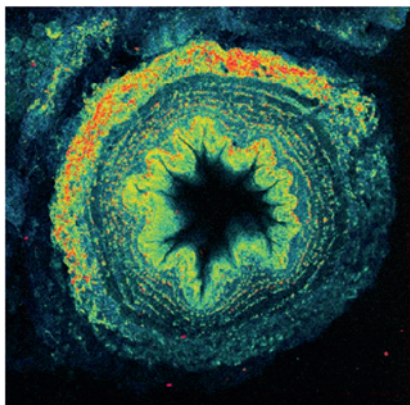
Fluorescenční mikroskopie je oblíbeným a mocným nástrojem zejména díky své specifitě a vysokému poměru signálu k šumu, což je dáno z velké míry nízkým autofluorescenčním pozadím většiny studovaných vzorků. Co se stane, když do fluorescenčního mikroskopu vložíme fluorescenčně neoznačený vzorek? Uvidíme vůbec něco? A proč bychom měli vlastně pracovat s neoznačenými vzorky?

Důvodem k práci s fluorescenčně neoznačenými vzorky není jen lenost či časové a ekonomické náklady, ale zejména snaha nijak nedomodifikovat či neporušit vzorek. Fluorescenční barviva, ať už přidaná ke vzorku ve formě sond pronikajících do vzorku a značících specifické orgány, nebo ve formě geneticky vložených fluorescenčních proteinů, nejsou pro buňky přirozenou součástí a mohou modifikovat buněčné vlastnosti a chování. Pro každou sondu je třeba otestovat, jaké koncentrace začnou způsobovat modifikace buňky, vedoucí až k její smrti. Každý geneticky modifikovaný fluorescenčně označený protein je třeba zkontrolovat, jestli si zachoval svoji původní funkci a jestli jeho množství v buňce odpovídá běžným fyziologickým podmínkám. Idea zobrazovat bez značení tak má své nesporné potenciální výhody. Ale co jsme vlastně schopni bez značení vůbec vidět?

Občas se s nadsázkou říká, že nativní autofluorescenční signál je pouze otázkou výkonu použitého laseru. Příliš mnoho světla však buňkám škodí, zejména v UV oblasti, proto omezte hledání potenciálních zdrojů fluorescenčního signálu na buňkami tolerované hodnoty. Oblíbeným cílem autofluorescenčního zobrazování jsou koenzymy NAD(P)H a FAD, které se aktivně účastní metabolismu buňky. Poměr oxidovaných a redukovaných stavů těchto metabolitů spolu s jejich celkovými koncentracemi je velmi vhodný k dokumentaci metabolické aktivity buněk. Měření metabolické aktivity mimo jiné umožňuje rozlišit zdravou tkáň od rakovinného bujení. Jakým způsobem lze tedy metabolickou aktivitu zobrazovat?

Shodou okolností jsou redukované formy koenzymů NAD(P)H, a oxidovaná forma FAD slabě fluorescenční. Oproti fluoro-

forům používaných pro specifické značení mají sice řádově horší svítivosti, ale kvalitu nahrazují kvantitou, tudíž se signál z celé buňky stává dostatečně silným pro analýzu. Jistou nevýhodou, zejména pro NAD(P)H, je nutnost použití UV světla, konkrétně kolem 370 nm, pro jejich excitaci. Jednak živé buňky opravdu nemají UV světlo rády, jednak na většině konfokálních mikroskopů chybí vhodný laser a optimalizovaná optika pro práci s takto krátkými vlnovými délkami. Jak se s tím poprat?



Autofluorescenční obrázek lidské cévy

Řešením je použít dva fotony k excitaci místo jednoho. Jeden UV foton 370 nm má totiž energii stejnou jako dva blízké infračervené fotony 740 nm. Současná absorpce dvou fotonů je velmi nepravděpodobný jev, o několik desítek řádů méně pravděpodobný než běžná jednofotonová absorpce. Není divu, že technologie nutná k využití dvoufotonové excitace pro zobrazování byla vyvinuta až v devadesátých letech dvacátého století. Potřebujeme totiž extrémně silné a velmi krátké (kolem sto femtosekund) laserové záblesky s vysokou opakovací frekvencí (desítky megahertzů), dokonalou odolnou optiku, rychlé skenery a citlivé detektory. Dvoufotonová excitace blízkým infračerveným spektrem má další výhody – díky menšímu rozptylu a absorpci světlo lépe proniká do hloubky biologických vzorků a excitace je dosaženo pouze v malém objemu, což automaticky umožňuje 3D zobrazování.

Výkonné lasery umožňují využít k zobrazování i jiné principy generování signálu než fluorescenci. Oblíbená je metoda gene-

race druhé harmonické frekvence (SHG; *second harmonic generation*), kdy díky lokální asymetrii uspořádání makromolekul, typicky vláken kolagenu či myosinu u živočišných buněk, nebo škrobu či celulosy u rostlinných, dochází ke generování světla o přesně poloviční vlnové délce oproti použitému zdroji. Například při použití infračervené vlnové délky 900 nm dochází ke vzniku modrého světla o vlnové délce 450 nm, které se lehce odlišuje od fluorescencie. Zobrazování nativních struktur tkání, včetně svalů, je užitečné při studiu mnoha degenerativních nemocí.

Další možností je využití generace třetí harmonické frekvence (THG; *third harmonic generation*), kdy ke vzniku signálu dochází na optických rozhraních, například mikrokápenek, díky kombinaci tří fotonů za generování jednoho o třetinové vlnové délce. Zde je již nutno použít vlnové délky nad 1200 nm, aby generovaný signál byl ve viditelné oblasti a detegovatelný. Zajímavou aplikací je zobrazování červených krvinek, které umožňuje vizualizovat drobné kapiláry v tkáních, včetně rychlosti proudění krve.

Výčet alternativ k fluorescenci tímto nekončí. Lákavým zdrojem informací o vzorku je Ramanův rozptyl světla, protože Ramanovo spektrum je vysoce specifické a umožňuje potenciálně identifikaci nativních molekul skrz jejich vibrační hladiny. Bohužel Ramanův signál je velmi slabý, a tak přímé zobrazování není příliš praktické. Na druhou stranu kdyby Ramanův signál byl příliš silný, tak by vadil fluorescenčnímu snímání, protože se spolu spektrálně překrývají. Existuje však koherentně zesílený anti-Stokesův ramanovský rozptyl (CARS), který pomocí dvou překrývajících se infračervených paprsků sesynchronizuje přechod mezi vybranými vibračními stavy, a tím výrazně zesílí generovaný signál. Nejčastěji a nejnadhodněji se zobrazují lipidové mikrokápenky díky vysoké koncentraci skupin CH_2 .

Jak je patrné, i bez značení se toho dá vidět celkem dost, pokud máte vhodné přístrojové vybavení. Mikroskopy vybavené silnými infračervenými lasery najdete na Fyziologickém ústavu AV ČR a v BIOCEVU.