

Kuidas näha elusate rakkude sisse?

Dmitri Lubenets, Toivo Maimets, Sulev Kuuse

Evolutsiooni käigus on inimese silmad arenenud nii, et kõige paremini suudame eristada värvusi ja valguse intensiivsust. See on peapõhjus, miks tavalises valgusmikroskoopias on laialt levinud tava preparaati värvida. Tänapäeval lubavad molekulaarbioloogia meetodid spetsiifiliselt ära märgistada rakusiseid organelle, kuid enamasti tuleb rakud enne surmata.

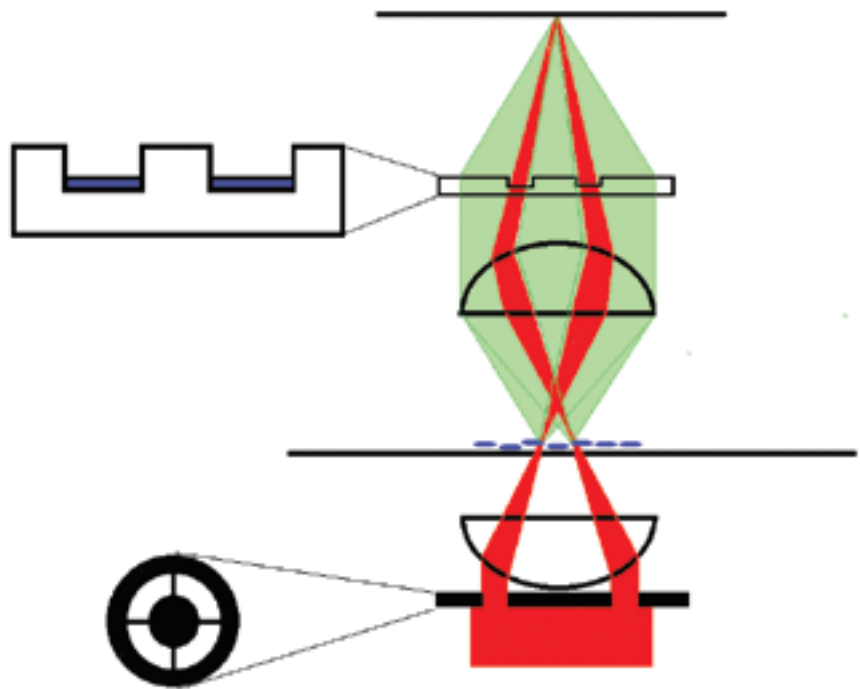
Elusate materjali on keerulisem värvida, tihti ei olegi see võimalik, kuna terviklik rakumembraan ja mittespetsiifilised raku membraanpumbad takistavad seda. Selle tõttu nõudis elusate rakkude vaatlus mikroskoobis isegi 20. sajandi alguses väga palju aega ja tööd. Teadlastel oli hädasti vaja leitud meetod, mis lubaks korralikult visualiseerida läbipaistvaid preparaate.

Faasikontrastmikroskoobi (ingl *phase-contrast microscope*) teoreetilist põhimõtet kirjeldas 1930. aastatel hollandi füüsik **Fritz Zernike**, kellele anti 1953. aastal Nobeli auhind. Esimese sedalaadi mikroskoobi töötas 1942. aastal välja Carl Zeiss.

Oletame, et inimene vaatab mikroskoobiga preparaati, mille eri rakud paiknevad üksteise suhtes mingil kaugusel. Kui vaadeldav preparaati on läbipaistev, siis valgus ei neeldu. Eri rakud ja rakusisesed struktuurid näevad intensiivsuse, kirkuse poolest välja peaaegu samasugused kui preparaadi taust ning eri detaile on raske eristada.

Samas on teada, et valguse levimise kiirus muutub tihedamas keskkonnas aeglasemaks. See tähendab, et footonid, mis kulgevad rakkudest mööda, jõuavad inimese silma natuke kiiremini kui footonid, mis liiguvad rakkudest läbi. Sellist fenomeni nimetatakse valguse faasinihkeks.

Faasinihke korral on oluline

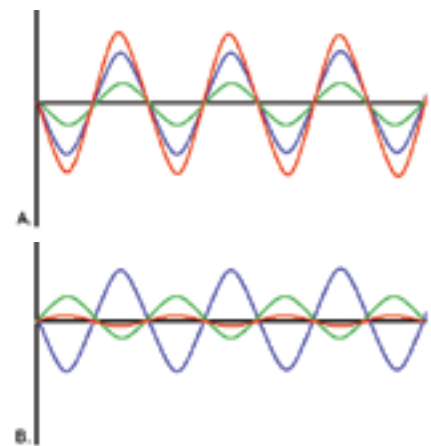


◇ 1. Faasiplaat (ülal) ja kondensorirõngas (all) tagavad valguse kustutatud interferentsi ja võimaldavad rakkudest saada näivalt ruumilise kujutise. Valgusallikas on joonisel all (kujutatud punasega), sinine katkendjoon on uuritav preparaati

asjaolu, et valguse lainepikkus ega intensiivsus ei muutu. Fritz Zernike geniaalsus seisneski selles, et ta mõtles välja, kuidas muundada nähtamatu faasinihe valguse intensiivsuse muutuseks ja tekitada silmale nähtav tume või hele kontrast.

Enne preparaadile sattumist läbib valgus spetsiaalse kondensorirõnga ehk faasirõnga (◇ 1) ja preparaati valgustatakse valguskoonusega, mille keskel on must ala. Sattudes läbipaistvate rakkude peale, jätkab enamik footoneid oma liikumist täiesti muutumatuna. Faasinihe tekitab juhuslikult, kuid katsete põhjal on tõestatud, et keskmiselt jäävad footonid hiljemaks veerandi lainepikkuse võrra. Hiljaks jäävad footonid hajutatakse suvalistes suundades ning nad sisenevad objektiivi teise nurga all kui oma teekonnal muutumata jäänud footonid.

Edasi satuvad kõik footonid faasiplaadile. See nihutab need footonid, mida preparaadi läbimine pole muutnud, faasis esiteks ette (veerandi lainepikkuse võrra) ja vähendab



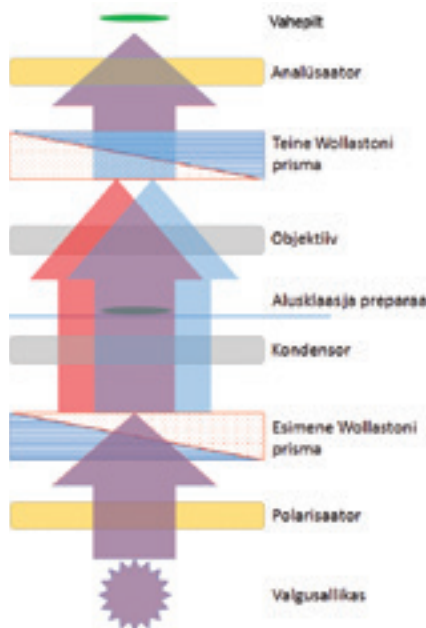
◇ 2. A. Kui valguslained on samas faasis (sinine ja roheline joon), siis nende summaarne intensiivsus on suurenenud (punane joon). B. Eri ehk vastasfaasides toimivate valguslainete (sinine ja roheline joon) korral on liitlaine intensiivsus väiksem (punane joon)

selle valguse intensiivsust 70–75%. Kondensorirõngas ja faasiplaat on vajalikud selleks, et suurendatud kujutise tekkekohas saaks teoks veel üks optiline fenomen: kustutatav inter-

ferents (ingl *destructive interference*), mille tõttu valguse intensiivsus väheneb. Kõige lihtsamini saab seda seletada graafiliselt (◇ 2).

Kuigi faaside nihutamise võttes on faasikontrastmikroskoopias hädavajalikud, ei saa üksnes nendega piisavalt kontrastset pilti, kuna valgusallikast lähtuva valguse intensiivsus on liiga suur. Just selle pärast on faasiplaat pimendatud poolläbipaistva kattega, mis laseb läbi ainult 25–30% peale langevast valgusest. Nii muundab faasikontrastmikroskoop preparaadi stimuleeritud faasinihked valguse intensiivsuse muutuseks ning enne nähtamatud struktuurid ilmnevad kui tumedad alad mõõdukalt heledal taustal.

Lahutatud interferentskontrasti mikroskoopia ehk DIC-mikroskoopia 1950. aastatel leiutati veel üks mikroskoopiameetod, millega saab läbiipaistvaid preparaate teha nähtavaks. Seda nimetatakse **lahutatud interferentskontrasti mikroskoopiaks** ehk **DIC-mikroskoopiaks** (ingl *differential interference contrast microscopy*, DIC) või väljatöötaja Georges Nomarski järgi **Nomarski mikroskoopiaks** ehk **Nomarski interferentsmikroskoopiaks** (ingl *Nomarski microscopy*, *Nomarski interference microscopy*, NIC). Ka



◇ 3. Eristava ehk lahutava interferentskontrasti mikroskoobi üldjooneline diagramm

DIC-meetod põhineb valguse interferentsi fenomenil, kuid tehnilised võtted, millega saavutatakse vajalik valguse faasiinihe, on DIC-i puhul teistsugused. See mikroskoop meenutab tavalist valgusmikroskoopi, ent peale tavakomponentide on sellel kaks valgust polariseerivat seadet ja kaks eristavat prisma (◇ 3).

Mikroskoobi koostisosa on kaks kokkuliimitud kvartsi- või kaltsiidik-

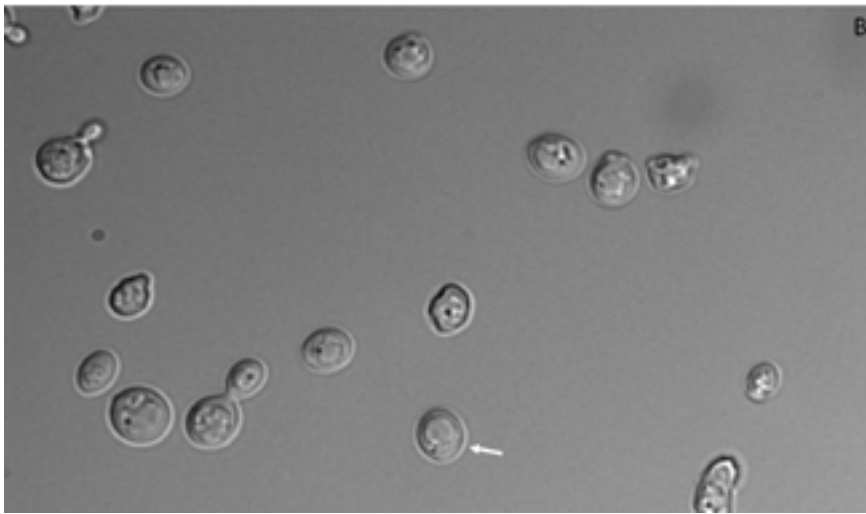
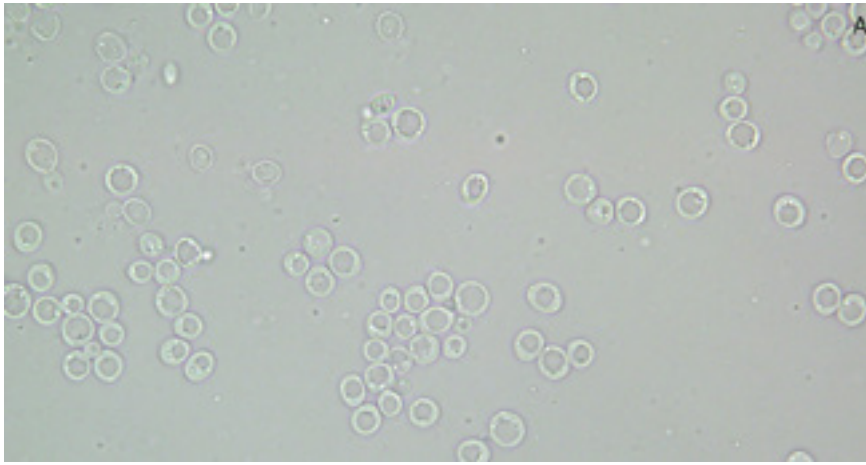
ristalist Wollastoni prisma; neist esimene asub enne kondensorit ja teine objektiivi järel. Esimene prisma jaotab langeva valguskiire kaheks ruumiliselt lahutatud kiireks. Need liiguvad läbi preparaadi kumbki oma rada ja satuvad teise Wollastoni prismasse, mis ühendab need taas.

Esimesesse prismasse tohib sattuda üksnes kindla polarisatsiooniga valgus, mille tagab eriline seade – polarisaator. Järgmine polariseeriv seade, analüsaator, asub teise prisma taga. Tänu analüsaatorile muutub valguse polarisatsioon nii, et kokku pandud valguskiirte vahel toimub kustutav või võimendav interferents. Nõnda tekib aimulaadse kolmemõõtmelise mustriga pilt, mida vaadates on tunne, et preparaati on valgustatud ainult ühelt küljelt (vt ◇ 5). Samuti tundub, et vaadeldav objekt on kolmemõõtmeline, kuid alati tuleb mees pidada, et see on optiline illusioon, mis võimendab reaalsust.

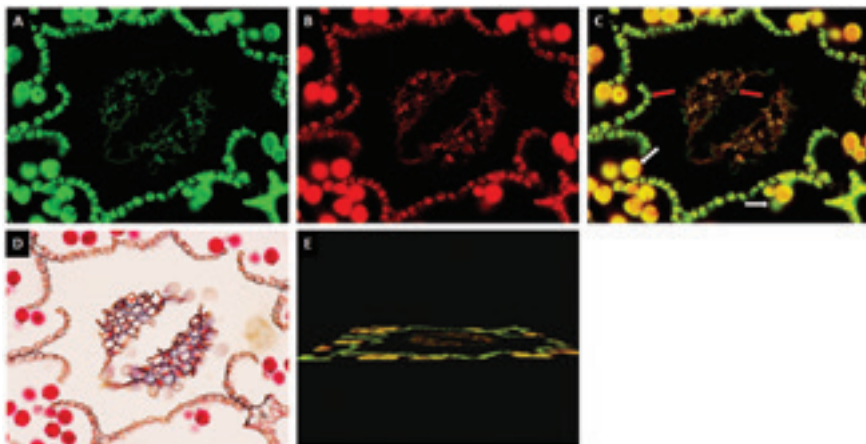
Tänapäeval saab tavalise valgusmikroskoobi abil edukalt jälgida rakkude morfoloogiat ja kõiki teisi põhikujutisi, mis neelavad, hajutavad või muudavad valguse faasi (◇ 4). Väiksemad rakusisesed struktuurid, nagu valgud, nukleiinhapped või ioonid, on valgusmikroskoopia lahutusvõimest palju väiksemad ja jäävad seetõttu nähtamatuks. Selleks et teha



◇ 4. Nüüdisaegne fluorestsentsmikroskoop. A – skeemil on näidatud nähtava valguse teekond (alumine valgusallikas) ja fluorestsentsvalguse teekond (ülemine valgusallikas) läbi objektiivi objektini ja registreeriva okulaarini. B – fluorestsentsvõimekusega uurimismikroskoop Olympus BX41 (Jaapan), arvutikuva inimese emaka endomeetriumi (kasutatud programmi CellB, Soft Imaging System, Olympus).



◇ 5. Pagaripärm *Saccharomyces cerevisiae*. A – fotografeeritud tavalise valgusmikroskoobiga, suurendus 100 x. B – DIC-mikroskoobis nähtav preparaat, suurendus 100 x, okulaar 10 x. Fotot vaadates tundub, et rakud on valgustatud ühelt küljelt (valge nool)



◇ 6. Fluorestsentsmikroskoobi kujutised teekummeli õie ristlõikest. A – preparaadi autofluorestsents rohelises spektris. B – preparaadi autofluorestsents punases spektris. C – piltide A ja B kokkulangemise tulemus. Fookuses olevad objektid on märgistatud punaste nooltega, fookusest väljas olevad objektid aga valgete nooltega. D – samast kohast võetud pilt värvilise kaamera abil läbiva nähtava valguse käes. E – pildil C olev kujutis on vaatelejale arvuti abil terava nurga alla keeratud. On näha, et fluorestsentsmikroskoobiga tehtud objekti visuaal on tegelikult tasapinnaline. Mikroskoop Olympus BX81, objektiiv 60 x. Töödeldud pilditööstustarkvaraga Imaris (Bitplane AG, Zürich, Šveits)

need visuaalseks, tuleb nad seostada fluorestseeruva märkega ning kasutada mikroskoopi, mille optika on kohandatud fluorestsentsi kindlaks tegema.

Kõik **fluorestsentsmikroskoopia** (ingl *fluorescence microscopy*) võtted põhinevad eriliste molekulide kasutamisel, mis ergastava valguse toimel kiirgavad fluorestseerivat valgust. Erakordse tundlikkuse tõttu võimaldab see meetodika ning jälgida nende kogust ja liikumist rakus.

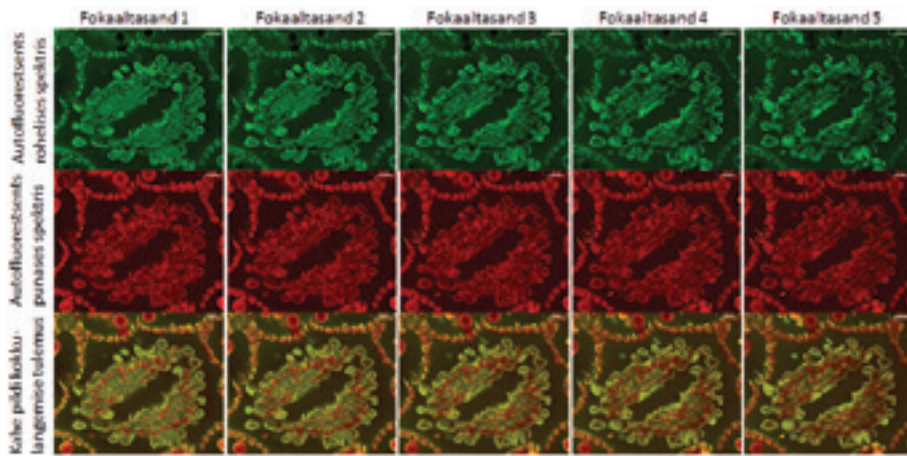
Mõnikord võib rakk või rakusene valgust kiirata iseenesest. Säärase objekti kohta öeldakse, et tal on suur **autofluorestsents**. Kuid palju sagedamini pakuvad huvi molekulid, mis ei fluorestseeru, ja neid tuleb märgistada eriliste fluorestseerivate värvidega: **fluorokroomidega**.

Alternatiivse meetodika puhul märgistatakse fluorokroomidega antikehasid, mis seostuvad teatud valgulise epitoobi ehk antikehaga äärmiselt spetsiifiliselt. Teatud tingimustes (nt fikseerides) pääsevad sellised antikehad rakkude sisse, seostuvad oma sihtmärgiga ning võimaldavad nõnda uuritavat kaudselt vaadelda.

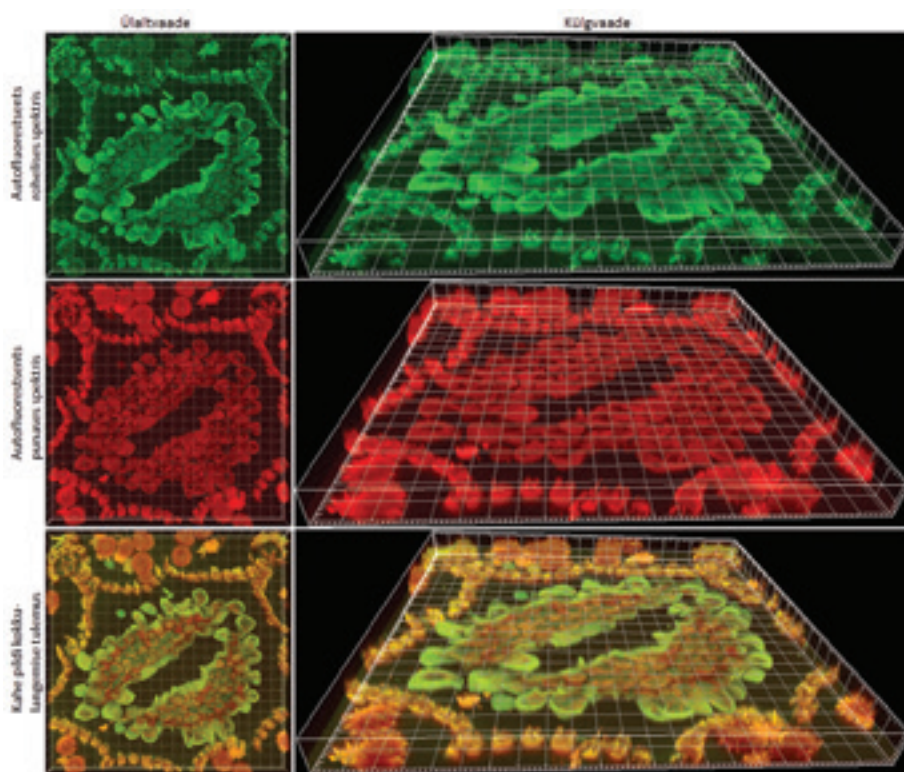
Praegusajal on fluorestsentsmikroskoopia üks enim levinud mooduseid. Selle populaarsus hakkas suurenema aastast 1941, kui Ameerika immunoloog **Albert Hewett Coons** leiutas meetodi, millega sai fluorokroomide liita valkudele. Samuti etendas suurt rolli optika ja optoelektronika areng, mille tõttu oli võimalik avastada fluorestsentsi paremini ja tundlikumalt.

Nüüdisaegne fluorestsentsmikroskoop sisaldab spetsiaalseid optilisi filtreid ja võimsamat valgusallikat. Seda optikariista on suhteliselt lihtne kasutada, kuid siiski peab teadlane oskama mikroskoopi korrektselt seadistada ning valima katse tarbeks õiged fluorokroomid.

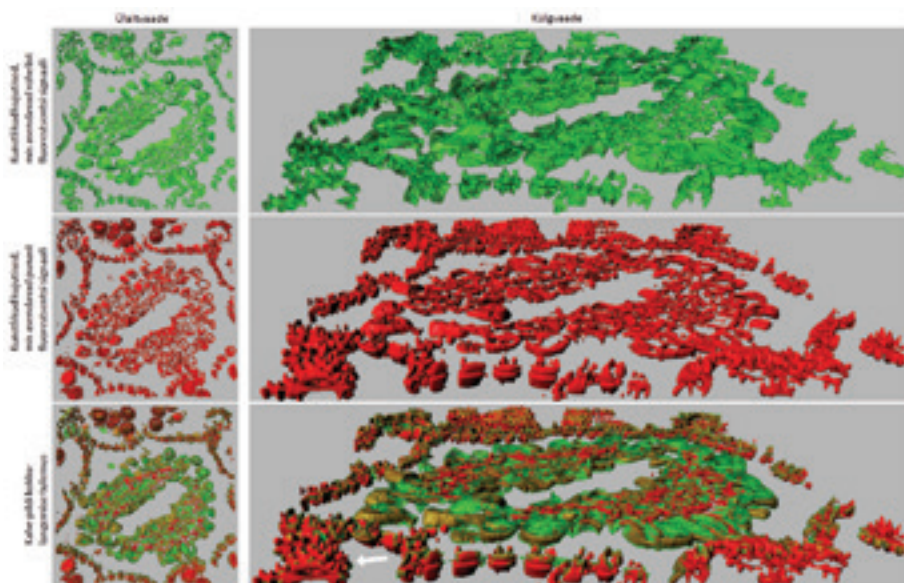
Selleks et fluorestsentsi saaks vaadata tavalise valgusmikroskoobiga, peab sellel olema võimas valgusallikas ja optiliste filtrite komplekt. Objektiivid peavad olema hea kvaliteediga, sest objektiivi läätsete abil valgustatakse nii preparaati kui ka võetakse vastu fluorestsentsisignaali.



◇ 7A. Kummeliõie sarivõte konfokaalmikroskoobiga. Iga foto on pildistatud eri fokaaltasandil. Autofluorestsentsisignaaliid roheli- ses ja punases spektris on toodud eraldi ja ka liidetuna ühele fotole. Pildistatud konfokaalmikroskoobiga Olympus FV1000, objektiiv 60 x, mõõtjoone pikkus 20 µm. Töödeldud pilditööstlustarkvaraga Imaris (Bitplane AG, Zürich, Šveits)



◇ 7B. Kummeliõie eri fokaaltasandite pildid on kokku pandud üksteise peale. Joonisel on näidatud tulemus pealt- ja külüvaates. On näha, et konfokaalmikroskoobiga tehtud pildisari moodustab kolmemõõtmelise struktuuri. Piltide töötlemiseks on kasutatud tarkvara Imaris (Bitplane AG, Zürich, Šveits). Konfokaalmikroskoop Olympus FV1000, objektiiv 60 x



◇ 7C. Kolmemõõtmelise struktuuri detailanalüüs. Tõeline signaal on asendatud tehiskujutisega, kus värv vastab fluorestsentsi värvile. Kui originaalpilti on sedaviisi modifitseeritud, siis on mugavam analüüsi teha, sest saab paremini kontrollida tehiskujutiste kuju ja läbipaistvust. Fotodel kujutatud jooniste piirkonnad on kummeliõie samast kohast, kuid joonisel 8C on valge joonega tähistatult näha, et õietolm on tegelikult sfäärilise kujuga (valge nool). Pilte on töödeldud tarkvaraga Imaris (Bitplane AG, Zürich, Šveits). Konfokaalmikroskoop Olympus FV1000, objektiiv 60 x

Teiste sõnadega, põhiotstarbe kõrval täidab objektiiv ka kondensori rolli.

Tüüpiline fluorestsentsmikroskoobi optiline rada on kujutatud joonisel 5. Esmalt jõuab valgusallikast valgus filterkuubikusse, mille abil õige lainepikkusega valgus suunatakse objektiivi kaudu preparaadile. Proovis olevad fluorokroomid ergastuvad ja tekib fluorestsentsvalgus, mis omakorda, läbides objektiivi ja filterkuubiku, jõuab vaatleja silmadesse.

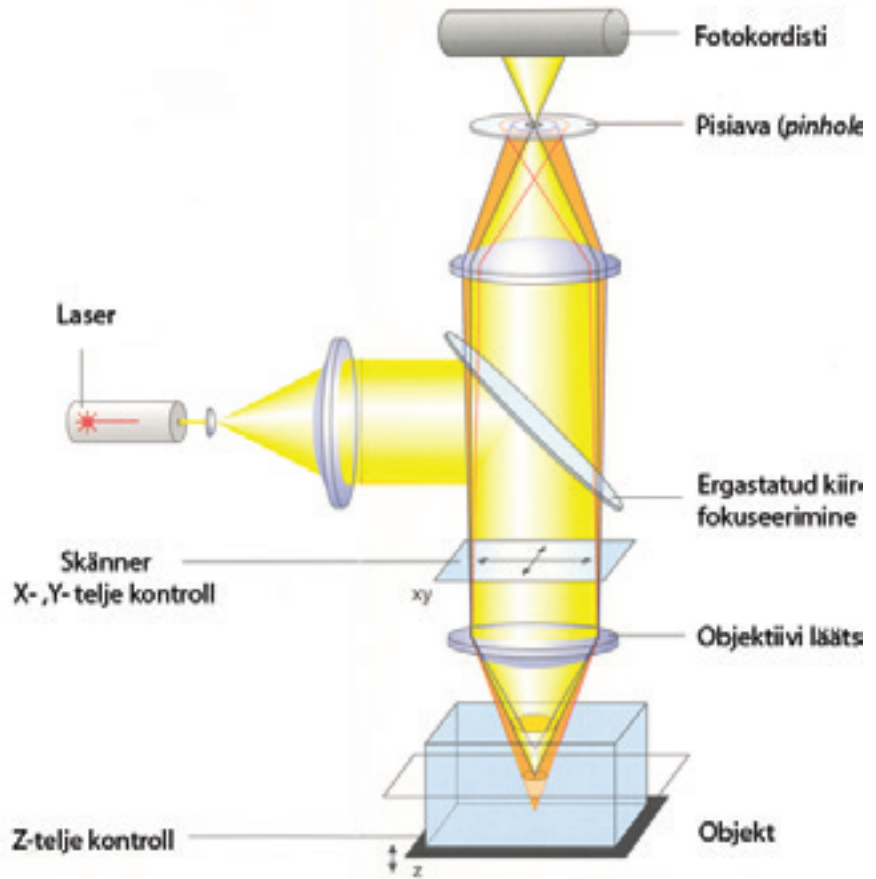
Fluorestsentsmikroskoobi valgusallikas võib olla laser või spetsiaalne lamp. Laserid annavad väga tugeva monokromaatilise ja muutumatu faasivahega valguse, neid kasutatakse eriliste mikroskoopiavõtete puhul sageli. Tavalise fluorestsentsmikroskoobi puhul on kõige levinumad elavhõbe- või ksenoonlambid.

Konfokaalmikroskoopia

Fluorestsentsmikroskoopia tähtsust maailma eluteaduses ei saa alahinnata. See lubab preparaati uurida väga üksikasjalikult, ent teatud ülesandeid võib siiski olla raske teha. Täpselt nagu tavaline valgusmikroskoop, annab ka fluorestsentsmikroskoop terava pildi ainult fokaaltasandist. Kõik ergud fluorestsentssignaalid, mis tulevad fokaaltasandist väljastpoolt, näivad lõpp-pildil olevat fookusest väljas. See tähendab, et suuremad kumerad rakud või jämedad koelõigud paistavad ebamäärased. Seetõttu on tulemust sageli keeruline tõlgendada. Peale selle näeb tavalise mikroskoobiga seda, kus paikneb fluorestsentseeruv objekt horisontaaltasapinnal ehk x- ja y-teljel. Ent asetsemise kohta vertikaaltasapinnal ehk z-teljel pole õigupoolest võimalik midagi järeldada (◇ 6).

Harilik fluorestsentsmikroskoopia ei anna vastuseid sellele, milline on preparaadi kolmemõõtmeline struktuur. Nendele küsimustele saab vastused konfokaalmikroskoopia abil.

Konfokaalmikroskoopia (ingl *confocal microscopy*) põhimõtete patentis Harvardi ülikooli töötaja **Marvin Minsky** 1957. aastal, ent töötav instrument ilmus turule mitu aastat hiljem. Sisuliselt skaneerib see



◇ 8. Konfokaalmikroskoobi skeem

Fotokordisti abil saab signaali ilma taustamüra tekketa võimendada umbes miljon korda.

aparaat objekti punkti punkti järel ning korruga ainult teatud sügavuses.

Tehniliselt rajaneb konfokaalmikroskoop traditsioonilisel fluorestsentsmikroskoobil, kuid elavhõbe- või ksenoonlambi asemel valgustatakse preparaati laseriga (◇ 8).

Konfokaalmikroskoobis valgustatakse igal ajahetkel ainult väikest ala proovist. Seetõttu võib väljuv signaal olla väga nõrk. Sestap kasutatakse signaali tabamiseks spetsiaalset optilist detektorit: fotokordistit (ingl *photomultiplier tube*, PMT). Fotokordisti abil saab signaali ilma taustamüra tekketa võimendada umbes miljon korda.

Kordistist väljuvad elektroonilised impulsid, mille tugevus on proport-

sionaalne sissetuleva valguse intensiivsusega. Elektrooniline signaal tuleb arvutisse, kus seda tõlgendatakse ja tuuakse esile pikslina. Sel moel, kui laserikiir liigub mööda preparaati, püüab signaali tabamissüsteem pidevalt tulevaid footoneid kinni, muudab neid elektrisignaalideks ja reastab pikslid õiges järjekorras, tekitades sellega arvuti kuvaril lõpp-pildi. Kõik need etapid kulgevad niivõrd kiiresti, et pilt tundub arvuti ekraanil tekkivat reaalselt.

Saamaks pilti objekti eri tasapindadest, on konfokaalmikroskoobi preparaadilaud tavaliselt mootoriga ning võimeline liikuma üles ja alla 10 nm täpsusega. Skaneerides proovi eri tasanditel, on võimalik saada pildisari, kus igal pildil on kujutatud preparaadi õhuke ristlõige. Kasutades eriprogramme, võib kogu sarja fotod ühendada üheks ruumiliseks kujundiks: kolmemõõtmeliseks struktuuriks, mis võimaldab proovi väga üksikasjalikult analüüsida (◇ 7). ■