

KONFOKAL MİROSKOBU : IŞIK MİKROSKOBU TEKNOLOJİSİNDE SON ON YILDAKİ EN ÖNEMLİ GELİŞME

Alp Can*

Meral Tekelloğlu**

Çeşitli isimlerle anılan ve bu mikroskop tekniği, son birkaç dekat ele alındığında ışık mikroskobu teknolojisindeki en büyük yeniliktir (15). İsimlendirme konusunda genellikle bugüne kadar kesin bir görüş birliğine varılamamışsa da 1989 yılında Londra'da, Fizik Elektron Mikroskopi ve Analiz Grubu ile Kraliyet Mikroskopi Derneği'nin ortaklaşa düzenledikleri konferansta kullanılan terim «konfokal mikroskobu» dur (5).

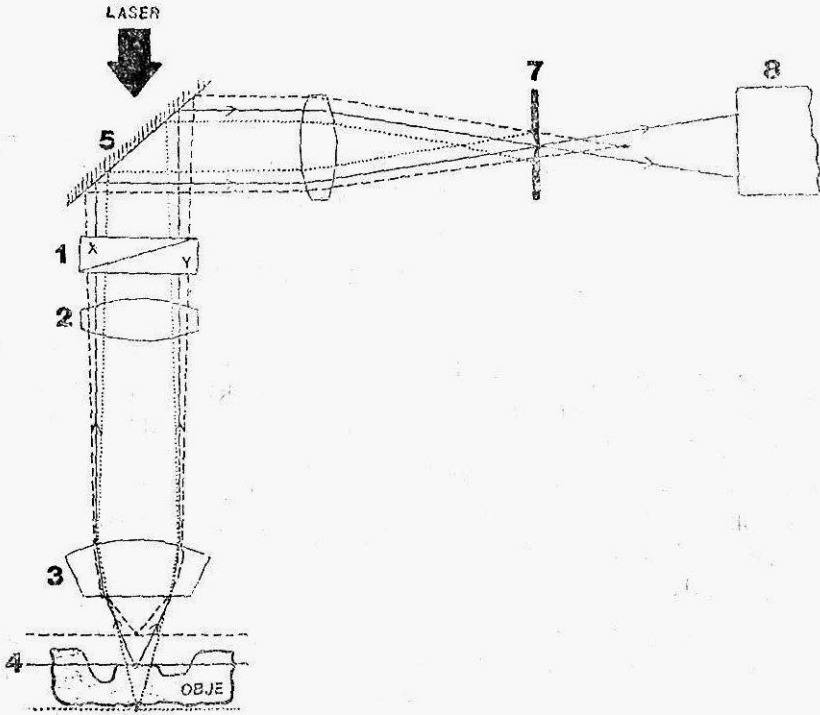
Bu mikroskobun son 3-4 yılda bu denli ilgi görmesinin altında yatan en önemli faktör ise, mikro yapılarda üç boyutlu (3D) görüntü oluşturulabilmesi ve incelenecek materyalin herhangi bir düzleminden gelen ışınları ayırıp bunun önünden veya arkasından gelenleri görüntü dışı bırakarak son derece yüksek kontrast ve rezolusyona sahip görüntü oluşturmalarıdır (14). Gerçi üç boyutlu görüntü oluşumu konvansiyonel ışık mikroskobu tekniğinde de çok sayıda seri kesitin alınıp kamera lusida çizimi v.s. gibi işlemler yardımıyla ampirik olarak yapılabilir, fakat bu işlem hem çok zaman alıcı hem de yeterince güvenilir değildir. Bazen de seri kesit alma gibi işlemler intrinsek veya bilimsel açıdan sakıncalı olabilir (arkeolojik parçalar veya fosiller gibi). Ayrıca, bu mikroskop, kesit alınması mümkün olmayacak veya kesit alındığında yapısı kısmen bozulacak kompleks veya frajil materyallerin non-invazif şekilde incelenmesine de olanak tanır (1).

GÖRÜNTÜ OLUŞTURMA PRENSİBİ VE AVANTAJLARI

Bu mikroskobu normal ışık mikroskobundan farklı kılan en önemli özellik, ışığın doku üzerinde istenilen düzlemde odaklanabilmesi ve

* A. Ü. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Araştırma Görevlisi.

** A. Ü. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Profesörü.



Şekil 1 : Konfokal mikroskopunun laser eşliğindeki çalışma prensibi şematik olarak gösterilmiştir. Yukarıdan gelen laser ışını, tarama ünitesi (1) ve tüp lensini (2) geçtikten sonra objektif (3) yardımıyla obje üzerinde belirli bir düzlemde odaklanır (4). Bu düzlemde yansıyan ışınlar yukarı doğru önce objektif lensini, sonra sırayla tüp lensini ve tarama ünitesini geçerek 45 derecelik bir ayna (5) ile, iğne deliği diyaframa (7) ve fotodedektöre (8) ulaştırılmak üzere yansıtılır. Konfokal modunda devrede bulunan iğne deliği diyafram, sadece laserin obje üzerindeki odaklanmış düzleminden gelen ışınları [düz çizgi] geçirir. Objede farklı planlardan gelen ışınlar ise (.....ve——) iğne deliği diyafram üzerindeki delikte odaklanmadığı için arkaya geçemezler. Böylece görüntü, sadece istenilen odak düzleminden gelen ışınların iğne deliği diyaframı geçerek fotodedektörü ulaştırılması ile oluşur. Görüntüyü bozacak odak dışı ışınlar ise diyafram tarafından engellenmiştir.

sadece bu düzlemdeki cisimlerden gelen görüntüleri yansıtmasıdır (Şekil 1). Bu düzlemin üstünde veya altında bulunan cisimlerin görüntüsü (fokus dışı) ise tamamen devre dışı bırakılmaktadır (13,14). Bu işlemin önemi şudur; konvansiyonel ışık mikroskopunda, görüntü kalitesini (rezolüsyon ve kontrast) etkileyen en önemli faktör, farklı

planlardan gelen çok sayıdaki görüntünün birarada izlenmesi sonucu istenmeyen bir flu görüntünün oluşmasıdır. Oysa konfokal mikroskopu bunu tamamiyle önlemektedir. Bu tekniğin tıbbi alanlardaki yararları aşağıda anlatılmıştır.

İstenmeyen cisimlerin görüntüsünün fokus dışı bırakılma mekanizması kısaca şöyledir; bu mikroskop ışık kaynağı olarak nokta ışık kaynağı kullanır (10), bu amaçla son birkaç yıldır ışık kaynağı olarak laser ışın demeti kullanılmaktadır. Nokta ışık kaynağı, incelencek cisim üzerinde nokta şeklindeki alanı aydınlatarak son derece keskin bir görüntünün oluşmasına katkıda bulunur. Bir başka ve önemli özellik ise, gelen görüntünün çok sayıda küçük delik içeren bir diyaframdan geçmesidir. Bu diyafram, sadece odaklanan plandan gelen görüntüyü arkasına geçirmekte, bunun dışındaki istenmeyen görüntüleri ise geçirmemektedir (3,15). İşte temelde bu iki özellik yardımıyla konfokal mikroskopu, çok yüksek rezolüsyona (lateral düzlemde 0.2 mikron, uzaysal düzlemde 0.4 mikron) ve kontrasta sahip görüntü oluşturur.

Bir başka avantajı, yukarıdaki özellikleri yardımıyla dokuyu uzaysal düzlemde de inceleme olanağı sağlamasıdır. Böylece, klasik ışık mikroskopunda incelenen doku kesitlerinin yaklaşık 100 katı (500 mikron) kalınlığındaki dokular incelenebilir. Bu avantajı, özellikle floresan modunda çalışırken çok önem kazanır. Zira kalın bir doku parçasında, farklı planlardan gelen zayıf floresan işaretli objelerin de görüntüsü alınabilir (3,10,14). Bu işlem bugün klâsik ışık mikroskopunun sağlayamadığı son derece gereksinim duyulan bir özelliktir.

Son beş yılda, daha iyiye doğru yapılan çalışmalar sonucunda bugün, artık konfokal mikroskop mükemmele hemen hemen ulaşmış durumdadır. Günümüzde kullanılan mikroskoplarda ışık kaynağı, çok ince ve düz bir ışık olan laser (light amplification by stimulated emission of radiation)'dir. Böylece objenin noktasal aydınlatılması sağlanır. Bir başka üstünlük tarama ünitesidir. Yani görüntü, laserin objeyi nokta nokta taramasıyla oluşur ki, bu da üç boyut oluşumundaki önemli farktörlerden biridir. Bu tarama işlemi insan gözünün bir simülasyonu şeklinde cisimleri 7-10 derecelik açı farkıyla iki kez tarar ve daha sonra, bu iki açıdan gelen görüntüleri bilgisayar eşliğinde bir-

leştirerek önemli bir özelliğimiz olan «binoküler stereopsis» gibi son derece yüksek işlem kapasitesi gerektiren olayı başarmış olur (11).

Konfokal mikroskoba uygulanabilen çok yararlı bir başka özellik, bilgisayar eşliğinde kullanılabilir olmasıdır. Bunun en önemli avantajı, çok sayıdaki görüntüyü hafızada saklayabilme ve daha sonra saklanan tüm görüntülerin çağırılarak üç boyutlu görüntü oluşturmalarıdır (15). Bu işlemle aynı zamanda kantitatif çalışma yapmak da mümkündür. Bir başka avantajı da istenirse kolayca, laseri ve iğne-delici diyaframı devre dışı bırakarak non-konfokal modunda (klasik ışık mikroskobu karşılığıdır) çalışma yapmaya olanak tanınmasıdır.

KULLANILDIĞI TIP ALANLARI

Genel kapsamda, bu mikroskobu kullanarak çalışma yapılan tıp alanları; hücre biyolojisi, patoloji, immünoloji, genetik, nöroloji, farmakoloji ve toksikoloji, mikrobiyoloji ve biyofizik ile bu alanlara ilişkin çalışmaların yapıldığı konulardır.

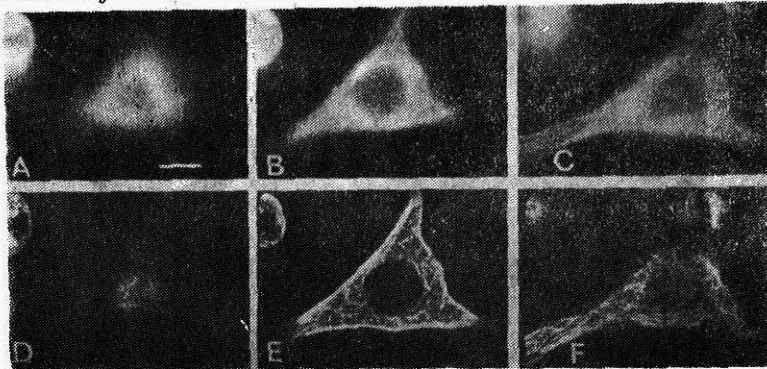
Günümüzde en çok kullanılan konfokal mikroskobu modu, floresan olanıdır (3,4). Bunun dışında, yansıtılan ışık (reflected light) ile geçirilen ışık (transmitted light) modunda da kullanım mümkündür (3,7). Tıbbi alana yönelik çalışmaların çoğunluğu, bir takım floresan (immün floresan veya doğal floresan) boyalar ile floresan modunda yapılmaktadır. Bunun yanında, transmitted ışığın kullanıldığı çalışmaların başında kromozomlara yönelik kalitatif ve kantitatif çalışmalar gelmektedir.

Şimdi, bir örnekle üç boyutlu görüntü oluşumunu açıklayalım : İnceleme yapılacak hücre, insan beyni kortikal nöronlarından biri olsun. Bu hücrenin boyutları yaklaşık 150x150x80 mikron kadardır. Gözlem sırasında rezolüsyon gücü 0.5 mikron olan bir objektif kullanıyoruz ve bu nedenle hücremizde, her kesit en fazla 0.5 mikron olacak şekilde bir dizi optik kesit alarak incelememizi yapıyoruz. Hücrenin düşey ekseninde tümünü inceleyebilmek için (80 mikron) toplam 160 adet görüntü topluyoruz. Topladığımız görüntüler mikroskoba bağlı bilgisayardaki basit bir program ile hafızada saklanıyor. Görüntü toplama işlemi bittiğinde tümünü hafızadan çağırıp üç boyutlu final görüntümüzü oluşturuyoruz.

Bu bölümde, bu mikroskop yardımıyla yapılmış bazı tipik çalışmalarından da örnekler vermek istiyoruz.

Bunlardan bir bölümü diagnostik patolojiye yönelik olanlardır. Bu alanda en çok çalışma, tümör hücreleri üzerinde olmuştur. Tümör hücrelerinin proliferasyonunu sağlayan anormal diferansiasyona neden olan onkogenler izlenerek bunlardaki translokasyon ve transkripsiyon anomalileri ortaya konmuştur. Tümör hücrelerine ilişkin, bir başka araştırma da tümörün invazyonu ve metastazına ilişkin döneme aittir. Son yıllarda bazı tümör türlerinde hücre çekirdek şekli ile tümörün invazyonu arasında bir ilişki olduğunu gösterilmiştir (6,12, 16). Örneğin lenf nodu metastazı olan bir meme kanser hücresi ile granülosa hücreli tümörlerde hücre şeklinde kantitatif bir takım değişimler gözlenmektedir. İşte bu değişimleri üç boyutlu ortaya koyması açısından konfokal mikroskopu seçilecek tek mikroskoptur. Böylece elde edilen bulgu ile tümör prognozu hakkında direkt bir ilişki saptanmış olur.

Konfokal mikroskopunun floresan işaretleyiciler ile birlikte kullanıldığı çalışmalar arasında, hücre bölünmesi sırasında özgün bir dizilim gösterdiği varsayılan mikrotubulinin ve mitoz iplikçiklerinin topografik şeklinin antitubulin antikorları ile işaretlenerek floresan yöntemlerle gösterilmesi (Şekil 2) (17), plazmasitom hücre kültürlerinde endoplazma retikulumunun hücre içi üç boyutlu dizilimi (8), nematod embriyonlarının blastosist safhasındaki pluripotent hücrele-

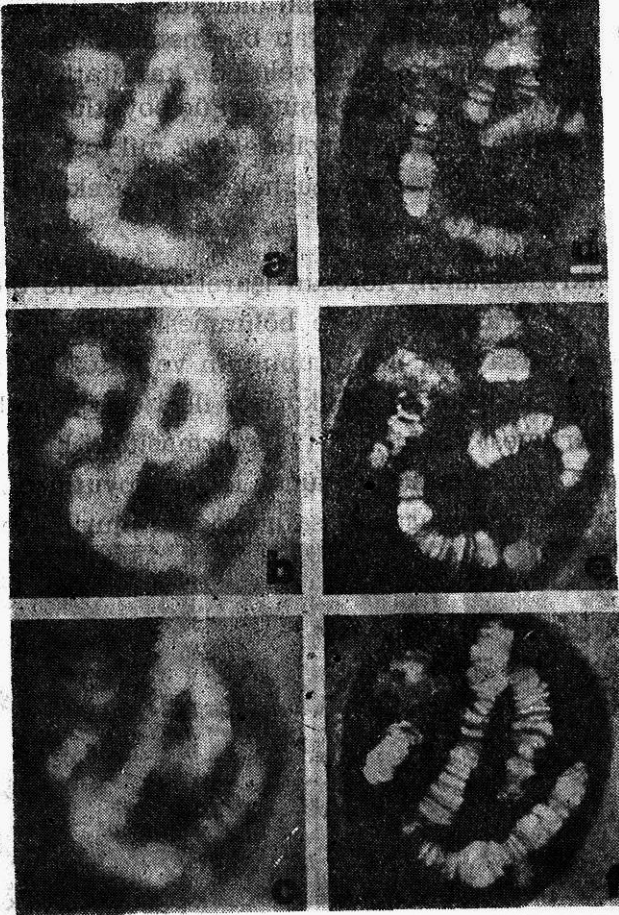


Şekil 2 : İmmün floresan yöntemle antitubulin antikorları ile işaretlenmiş HeLa hücrelerinin interfaz dönemindeki mikrotübül yapısı konvansiyonel ışık (A-C) ve konfokal (D-F) mikroskopları ile gözlenmiştir. Konfokal görüntülerdeki yüksek kontrast ve fokus dışı görünümün bulunmayışı dikkati çekiyor. Beyaz çubuk = 10 mikron. [Kaynak No : 17]

rin bölünme mekanizmalarının incelenmesi (17), normal olarak endoplazma retikulumuna bağlı olan bir grup hücre içi proteinin hücre içi sitoplazmik dağılımı (9) gibi değerli çalışmalar vardır.

Genetik alanındaki çalışmalar, klasik ışık mikroskopunun çözüm gücünün üstünde olan kromozom üzerindeki enine bantların lokalizasyonunda kullanılmıştır (10) (Şekil 3).

Bir başka grup araştırmacı, insan polimorfonükleer lökosit kültürlerinde floresan konjuge antikorlar ile bu hücrelerin kemotaksi özelliğini sağlayan reseptörlerin identifikasyonunu ve bunların kemo-



Şekil 3 : «Chironomus thummi»den alınan politen kromozomlarının nonkonfokal (a-c) ve konfokal (d-f) floresan görüntüleri izlenmekte. Konfokal modundaki görüntülerdeki yüksek kontrast ve rezolüsyon belirgin olarak izleniyor. Optik kesitler 4 mikron aralıklarla hücre çekirdeği düzeyinden alınmıştır. Beyaz çubuk = 10 mikron. (Kaynak No : 10)

taksi sırasındaki davranışlarını hücre yüzeyinde üç boyutlu olarak göstermişlerdir (2).

Yukarıda sözü edilen çalışmalarda bulgular klasik ışık mikroskobu sonuçları ile kıyaslanarak, bunun sağlayamadığı yönler konfokal mikroskobu ile gösterilerek bu tekniğin üstünlüğü ortaya konmuştur.

SONUÇ

Konfokal mikroskobu, hücresel çalışmalarda kullanılan çok güçlü ve yeni bir araç olup konvansiyonel ışık mikroskobunun tüm modelleri ile uyumludur. Özel doku hazırlama tekniği gerektirmemesi yanında son derece kısa bir süre içinde canlı veya henüz alınmış bir dokuda inceleme yapma olanağı sağlar.

Teknolojinin son yeniliklerinin kısa süre içinde adapte edilebildiği bu mikroskop tipi, bu konuda yayınlanan makalelerin sayısındaki hızlı artıştan da anlaşılacağı gibi, gerek üç boyutlu görüntü, gerekse belli düzlemdeki görüntüyü çok net oluşturabilmesi açısından, biyolojik yapılarda bugüne kadar öne sürülen bazı hipotezlerde köklü değişikliklere neden olmaktadır.

Ülkemiz açısından değerlendirirsek, hücre araştırmalarını zor ve pahalı kılan doku hazırlama ve değerlendirme işlemlerini en az insan hatası ile minimuma indirmesi yönü ile bile konfokal mikroskobunu, kullanmamız gereken bir araç olarak görmekteyiz. Bu yöntem kullanılarak yapılacak çalışmaların bilimsel dayanağının diğer tekniklere kıyasla daha fazla olması da getireceği bir başka ve belki de daha önemli avantajdır. Rutin laboratuvar çalışmalarında olmasa bile yapılacak her türlü mikroskobik araştırmada, özellikle immünoloji, genetik, patoloji ve nörolojik bilimlerde başvurulması gerekli bir araçtır. Yapılan çalışmalar, bazı durumlarda konfokal mikroskobun geçirim ve tarama elektron mikroskobuna üstünlük sağladığını da göstermiştir.

ÖZET

Konvansiyonel ışık mikroskobu ile kıyaslandığında konfokal mikroskobu, özellikle ışık kaynağı olarak laserin kullanıldığı durumlarda ışık duyarlığında ve uzaysal düzlemdeki çözüm gücündeki artış ile ka-

rakterizedir. Bu özellikler, hücre ve dokulardaki ince yapıyı daha spesifik, hassas ve kesin şekliyle üç boyutlu olarak ortaya çıkarma ve değerlendirme olanağı tanır. Bu mikroskobun en önemli özelliklerinden birisi de fokus dışı görüntülerin, düzlem kesit alma özelliği ve iğne deliği diyafram yardımıyla final görüntüyü etkilemesini önlemesidir. Bu özellikleri ile bu mikroskobun klinik alanlardaki kullanım potansiyeli tartışılmış ve etkisinin son derece yararlı olduğu sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

Confocal Microscope :

Most Important Improvement On Light Microscopy In The Last Decade

Compared with conventional light microscopy (LM), confocal microscopy (CM) is characterized in part by increased light sensitivity and higher spatial resolution particularly in using the laser beam as a light source. These characteristics permit the detection and discrimination of minor structures in cells and tissues in three dimensions with a more specific, sensitive and accurate way. One of the most important feature of this microscope is to avoid the effects of out-of-focus images in the final image by means of object plane sectioning and pin-hole diaphragm. Potential clinical applications related to these characteristics of confocal microscopy are discussed and concluded that its clinical impact is obvious.

KAYNAKLAR

1. Baak JPA ve ark : Potential clinical uses of laser scan microscopy. Appl Optics 26 : 3414, 1987.
2. Bultmann B ve ark : Lateral diffusion of chemotactic peptide receptors within the cytoplasmic membrane of human PMNs demonstrated by Laser Scan Microscopy. Adv Biosci 66 : 47, 1987.
3. Cogswell CJ Sheppard CJR : Imaging using confocal brightfield techniques. Inst Phys Conf Ser No : 93, 633, 1989.

4. Dixon AJ : Principles and applications of confocal fluorescence microscopy. Inst Phys Conf Ser No : 98, 643, 1989.
5. Elder HY, Goodhew PJ : Three dimensional microscopy and confocal microscopy. In EMAG-MICRO 89., 1989, Eastern Press, sayfa : 609-642.
6. Epstein JI Berry SJ Eggleston JC : Nuclear roundness factor : A predictor of progression in untreated stage A2 prostate cancer. Cancer 54 : 1666, 1984.
7. Jorgens R Godecke U : The second generation LSM more than merely cosmetic correction. Mikro express : 31, 1989.
8. Koch GLE, Macer DRJ Smith MJ : Visualisation of the intact endoplasmic reticulum by immunofluorescence with antibodies to the major ER glycoprotein, endoplasmin. J Cell Sci 87 : 535, 1987.
9. Monro S Pelham HRB : A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell 48 : 899, 1987.
10. Nicoud M-R ve ark : 3-D Imaging of cells and Tissues Usin Confocal Laser Scanning Microscopy and Digital Processing. Eur J Cell Biol 47 : 234, 1988.
11. Pawley JB : The micro world has three dimensions and sometimes four. Inst phys Conf Ser No : 98, 609, 1989.
12. Sassen RCI Baak JPA : Morphometry in the differential diagnosis of granulosa-cell tumors of the ovary. Anal Quant Cytol Histol 8 : 245, 1986.
13. Shotton DM : The current renaissance in light microscopy. I. Dynamic studies of living cells by video enhanced contrast microscopy. Proc Royal Microscopical Soc 22 : 37, 1987.
14. Shotton D : The current Renaissance in Light Microscopy. II. Blur-Free Optical Sectioning of Biological Specimens by Confocal Scanning Fluorescence Microscopy. Proc Royal Microscopical Soc 25 : 289, 1988.
15. Siegel A Hellmuth T Seidel P Geist A : Generation of 3-D Images via Laser Scanning Microscopy. Eur J Cell Biol Suppl 25, Vol 48, 35, 1989.

16. Van der Linden HC Baak JPA Lindeman J Hermans J Meijer CJLM : Morphometry and breast cancer II. Characterisation of breast cancer cells with high malignant potential in patients with spread to lymph nodes : Preliminary Results. *J Clin Pathol* 39 : 603, 1986.
17. White JG Amos WB Fordham M : An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol* 105 : 41, 1987.