

Ára: 150,- Ft.

TARTALOMJEGYZÉK

<i>Kulcsár Kálmán: A kulturális jogok és a demokratikus biztonság Európában</i>	257
<i>Romsics Ignác: Nemzeti traumánk: Trianon</i>	272
<i>Danjanovich Sándor—Jenei Attila: Új lehetőségek a sejtbiológiában és az orvostudományban</i>	282

Kutatás és környezet

<i>Mészáros Ernő: Módosított üvegházhatás?</i>	292
<i>Major György: A felhőzet hatására melegszik éjszaka a Föld?</i>	298

Eszmék — értékek

<i>Vajda Mihály: Fichte és a német küldetés</i>	303
---	-----

Viták — vélemények

<i>Benkő Loránd: Többközpontú e a magyar nyelv?</i>	310
<i>Ádám György: Csüggedt sodródást vagy átgondolt cselekvést?</i>	319
<i>Bencze Gyula: Nincs hova hátrálni</i>	323

Interjú

<i>Kosztolányi Dezső: Bartók Béla—Gombocz Zoltán</i>	326
--	-----

Kitekintés

<i>John Maddox a tudomány iránti bizalmatlanságról (Czelnai Rudolf); Bolygónk megmentése — intenzív mezőgazdasággal (Matskási István); Egy világos jövőkép (Sz.Zs.); Szövevényeszetből műorr, mű-máj? (Fenyő Béla); Internet kiskaté (Holl András)</i>	333
<i>Összeállította: Szentgyörgyi Zsuzsa</i>	

Szakmagyar

<i>A folyamatos nyelvújítás néhány sajátosságáról (Kálmán László)</i>	343
---	-----

Testületi hírek

<i>Az elnökség napirendjén (Horváth László)</i>	345
<i>Az MTA CLVII. közgyűlésének határozata</i>	346
<i>Akadémikusok levele a miniszterelnöknek; Gál Zoltán és Katona Béla látogatása az Akadémián</i>	347

Jegyzet

<i>Tudományos előadások, meg az írásvetítő? (Wiegandt Richárd)</i>	349
--	-----

A szellemi értékek hasznosítása

<i>Bedő Zoltán—Láng László—Cseh Lajos: Növénynevelési kutatási eredmények jogvédelme</i>	351
--	-----

Tudományos élet

<i>Örmény—magyar közös kutatások (Schütz Ödön)</i>	355
--	-----

Megemlékezések

<i>Bozóky László (Tarján Imre)</i>	357
<i>Hazay István (Biró Péter)</i>	359

A tudomány történetéből

<i>Szabadfalvi József: Egy jogfilozófusnak indult karrier története</i>	361
---	-----

Könyvszemle

<i>Huszár Tibor: A hatalom rejtett dimenziói (Bolvári-Takács Gábor)</i>	369
<i>Kiss Lajos: Kniezsa István—Melich János (Büky László)</i>	371
<i>Csapodi Csaba — Csapodiné Gárdonyi Klára: Ariadne (Végh Ferenc)</i>	373
<i>Garai László: Quo vadis, tovaris? (Balogh Tibor)</i>	375
<i>Káosz és jövőkutatás (Tóth Attiláné)</i>	376
<i>Rózsa György: Kulturális örökség és információs társadalom (Köpeczi Béla)</i>	378
<i>Beérkezett könyvek</i>	379

Magyar Tudomány

NEMZETI TRAUMÁNK: TRIANON

A FELHŐZET ÉS AZ AEROSZOLOK
HATÁSA A KLÍMÁRA

A TUDOMÁNY IRÁNTI
BIZALMATLANSÁGRÓL

96/3

Új lehetőségek a sejtbiológiában és az orvostudományban

Pásztázó erő-mikroszkópiák és az optikai csipesz

A biológia és orvostudomány fejlődésében a mikroszkópos módszerek igen jelentős szerepet játszanak. Jelenleg is a betegségek nagy részének fellelője és a gyógyulási pontok meghatározása egyaránt igényli a fény-, vagy elektronmikroszkópos vizsgálatot, illetve a diagnózis alátámasztását. A patológiai vizsgálatok korszerűtlen része az, ami már a műtét alatt, vagy a gyógyítás során meghatározza a diagnózist és csak kis számú esetben hagy maga után bizonytalanságot. A sejtbiológia legjelentősebb megállapításai, sőt magának a sejtnak mint az élet alapegységének felfedezése is mikroszkópos vizsgálatok eredménye volt. A mikroszkópia igen jelentős fejlődésen ment át az elmúlt másfél-két évszázadban.

Még a modern optikai mikroszkópos módszerek is beleütköznek azonban az Ernst Abbe által 1873-ban meghatározott elvbe, amely kimondja a feloldóképesség hullámhossz-függését és ezzel behatárolja a fénymikroszkópok által láthatóvá tehető biológiai struktúrák nagyságát. A múlt század végi és századunk elejének fizikai felfedezései lehetőséget teremtettek ahhoz, hogy Knoll és Ruska megépíthessék 1932-ben az első elektronmikroszkópot, sőt Knoll már 1935-ben képes volt megalkotni az első pásztázó elektronmikroszkópot. Az elektronmikroszkópia megkerüli a látható fényt alkalmazó optikai módszereket, amelyek feloldóképességének egészen napjainkig komoly korlátai voltak. Egy optikai berendezés felbontóképességét a leképezési folyamatoknál mindig jelen levő elhajlási jelenségeken kívül a leképezéshez használt sugárzás hullámhossza is meghatározza. A fénymikroszkóp esetében ez azt jelenti, hogy csak azokat a tárgyrészleteket lehet leképezni, amelyeknek távolsága nagyobb néhány tízed mikrométernél, másképpen a tárgy két, ennél a távolságnál kisebb távolságra levő pontja nem választható szét. A röntgen- vagy gammasugarak hullámhossza rövidebb, tehát kedvezőbb leképezési körülményeket kellene nyújtaniuk, de képalkotásra nem alkalmazhatóak, mivel gyakorlatilag nincs számukra megfelelő tulajdonságokkal rendelkező törőközeg. Ilyen szempontból előnyösebbek az elektronsugarak. Így akár az atomok

láthatóvá tétele előtt is megnyílt az út. Az elektronmikroszkóplás módszerek elvi hátránya a fénymikroszkópiákkal szemben, hogy a vizsgálat rendszerint olyan preparálási eljárásokat és vizsgálati körülményeket követel meg, amelyek igen távol állnak a vizsgált anyag természetes állapotától. A vizsgálatok vákuumba helyezett, vízmentes, esetleg vezetőanyaggal bevont mintát igényelnek. Ezek a hátrányok halmozottan jelentkeznek biológiai, pl. sejtrendszerek vizsgálatánál.

Knoll és Ruska a legnagyobb tudományos elismerést — a Nobel-díjat — korábbi szakalkotó tevékenységük után meglehetősen későn, 1982-ben kapták meg. Sokkal később, mint pl. Palade, aki biológiai rendszereken, sejtstruktúrákon végzett elektronmikroszkópos vizsgálataiért kapta meg a kitüntetést 1975-ben.

Az 1980-as évek valószínű forradalmat hoztak a mikroszkópos vizsgálatok fejlődésében. Egyedi atomok egyértelmű láthatóvá tételéért Binnig és Rohrer 1982-ben kapott Nobel-díjat. Módszerük az alagúteffektuson alapuló pásztázó mikroszkópia, (újabbán már nem csak) elektromosan vezető felzínnek mintázatairól adott atomi felbontású képet (Scanning Tunneling Microscopy, STM). Grafit lemez felzín szénatomjai voltak az elsők, amelyeket ilyen módon láthattunk. Ennek egyik feltétele a pásztázás felbontásának a zínre minden határon túli javítása volt. Ez azt jelenti, hogy a pásztázás (lényegében felbontási soronként történő letapogatás) pontossága ma elvileg elérhetetlen a hidrogénatom átmérőjének tízedét is.

Az igazi áttörést és a főleg, de nem kizárólag felzín struktúrák természetes körülmények közötti, atomi, sőt szubatomi zínű láthatóvá tételét az atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscopy, AFM) feltalálása és zínre azonnali megkonstruálása idézte elő (Binnig, Quate, és Gerber, 1986).

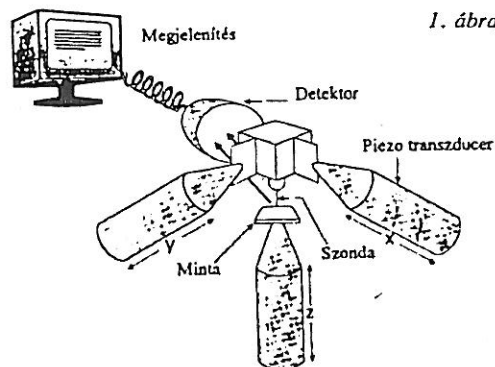
Ettől függetlenül, de ugyanazt a pásztázó technikát felhasználva alakult ki — több kutató független erőfeszítése révén — a közel-mező optikai pásztázó mikroszkópia, (Nearfield Scanning Optical Microscopy, NSOM), amely az Abbe-elvet kerülte meg és tett lehetővé lényegében atomi felbontást fénymikroszkóppal. Az Abbe-elv megkerülését zseniálisan oldották meg: lényegében kihagyták az optikát a mikroszkópból és ezzel az optikai törvényekből származó nehézségeket is. A 80-as években megindult modern képalkotó forradalom sorozatban hozott létre további mikroszkópiákat (scanning capacitance, s. thermal, s. acoustic, s. thermal wave imaging, scanning X-ray, phase measuring interferometric stb.), amelyek elterjedtsége sokkal limitáltabb, mint a fentieké. A pásztázáson és a minta, valamint a mérőrendszer közötti erő kölcsönhatáson alapuló módszerek száma kb. harmincra tehető és még nőhet. Összefoglaló néven pásztázó szondás mikroszkópiáknak is lehet fordítani (Scanning Probe Microscopies) ezek együttesét. Másik lehetséges elnevezésük a pásztázó erő-mikroszkópiák (Scanning Force Microscopies, SFM). A néha magyarra nehezen lefordítható változatos elnevezésekben a lényeges vonás a pásztázás felhasználása és az anyag felzín és valamilyen követhető fizikai paraméter közötti kölcsönhatás, ez jelenti az alapját a leképezésnek. Nagyon sokféle lehet ez a detektálható kölcsönhatás: mágneses, elektromos, termikus, „mechanikai” stb. Teljesen természetes, hogy valamennyiük esetében felmerül az a probléma, hogy az így nyert „kép” nem azonos azzal a képpel (bár ahhoz sokszor nagyon közel állhat), amit szemmel „láthatnánk”. Változatlanul

érvényes az az elv, hogy az atomi világ és a makroszkopikus világ képszerű megjelenítése nem keverhető össze, hiszen a fizika törvényei ezt nemigen teszik lehetővé. De ez a probléma felemlíthető csaknem valamennyi mai képalkotó eljárás esetében, amikor pl. ionkoncentráció-különbségeket szindifferenciálkká alakító „image analízátorok” lassan nemcsak a kutatás, de a laboratóriumi diagnosztika mindennapos részét képezik.

A pásztázás elve

Ahhoz, hogy bármilyen anyagi objektumról atomi méreteket is feloldó képet lehessen kapni, két problémát kellett megoldani. A vizsgált rendszert függetleníteni kell a környezet mozgásától, rezgéseitől, hiszen ezek a rezgések megakadályozzák a kívánt felbontás elérését. Az atomi felbontású kép megfelelő leképezése érdekében kellő finomságú letapogatást, a pásztázást is ki kellett fejleszteni. A rezgések csillapítása igen változatos módon történhet, de a leggyakoribb módszer az egész mérő- és mért rendszer rugalmas felfüggesztése.

A nagyfelbontású, tízed vagy század angström pontosságú pásztázás megoldása a múlt században felismert piezoelektromos jelenségen alapszik. Ez a leginkább közös vonás valamennyi modern optikai, vagy nem optikai mikroszkópiában. A nagyítás mint a letapogatott képterület és a letapogatott tárgyterület nagyságának aránya, elektronikusan szabályozható. A tulajdonképpeni kép keletkezése azon alapszik, hogy a szonda és a mindenkorli tárgypont közötti kölcsönhatásban keletkező jeleket a legkülönfélébb módokon detektorokkal regisztrálják és végül egy képcső elektronsugarának vezérléséhez használják. A piezoelektromos anyagok összenyomásra elektromos tulajdonságokat mutatnak (felszíni töltésdifferencia), míg mechanikai paramétereik igen gyorsan és nagy pontossággal változtathatók a rájuk kapcsolt feszültség függvényében. A mechanikai megnyúlás igen gyors és század angström pontosságú lehet. A lényegében „fordított” piezoelektromos hatáson alapuló transzducerek segítségével a mikroszkópok tárgyasztala, vagy a tárgyat letapogató fizikai kölcsönhatást létesítő „fej”, a tér minden irányában mozgatható. Két piezoelektromos kristály alkalmazásával az X–Y tengely mentén meander vonalakban mozgatható a tárgy vagy a kölcsönhatást létesítő fej. A harmadik transzducer mozgatása a Z irányban bontja fel a kölcsönhatásokat és ebből számítógépes technika, ill. a képalkotó elektronika rakja össze a háromdimenziós képet. Az 1. ábra mutatja a piezoelektromos pásztázó berendezés lényegét képező transzducerek különböző elrendezéseit. A detektorokkal kapott jel a pásztázással szinkronban megjeleníthető és kétdimenziós képpé alakítható. A hosszabb



1. ábra

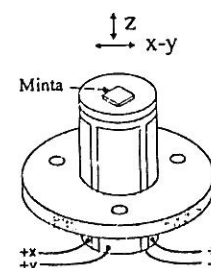
piezoelektromos kristályok megnyúlása nagyobb, így nagyobb pásztázási terület hosszabb transzducerekkel érhető el, ugyanolyan feszültségtartományon belül. A szokásos, egyetlen pásztázással letapogatható felületek 20 x 20, 40 x 40, és 128 x 128 nm² nagyságúak.

Az atomerő mikroszkópia (AFM, SFM)

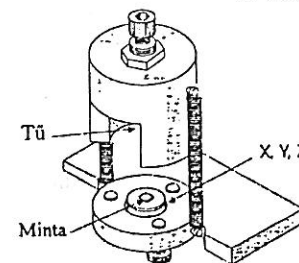
Az AFM a fent említett pásztázó-szondás mikroszkópcsaládnak az egyik tagja. Az első ilyen jellegű módszer, az itt részletesen nem tárgyalt pásztázó alagút-effektusos mikroszkópia volt. Az elektronok jól ismert, két különböző vezetőképességű felület között fellépő alagút-effektusát használja ki a módszer. Így ez a módszer csak elektromosan vezető anyagok felületének (felületi elektron-sűrűségének) vizsgálatára alkalmazható.

Az AFM minden fajta, tehát nem vezető anyagok vizsgálatára is kiválóan alkalmazható. Gerd Binnig ötlete volt 1986-ban, hogy ha egy közel atomi méretre kihegyezett tűt mozgatunk pásztázó transzducerek segítségével atomok, molekulák, vagy nagyobb objektumok felett, a felszíntől igen kis távolságra és a tű felfüggesztése olyan, hogy az atomokat nem tudja egymástól elszakítani, mert ahhoz kicsi a felfüggesztés rugóállandója, a tű mozgása a felszíni topográfiai viszonyokat tükrözheti. A számítások, amelyeket Quate és Gerber professzorokkal együtt végzett el, azt mutatták, hogy ez a lehetőség valóban fennáll. Mivel akkor az STM már rendelkezésre állt, annak a pásztázó berendezését használták és gyémánt porból ragasztottak fel „tűket” vékony sztanliol lemezre, hogy a vizsgált felszínt ne szakítsa szét. A kísérlet sikeres volt és ez vezette meg az alapját az atomerő mikroszkópiai vizsgálatoknak. A mai készülékekben a „tű”-t (ill. a sztanliol lemezke mozgását a tűt tartó V alakú sztanliol lemez) csúcsára vetített és onnan visszaverődő lézersugár mozgása képezi le, egy ún. hasított (kvadráns) diódára, vagy a házi videózásban is használt videokamera CCD érzékelőre. Az alkalmazott lézer azonos a CD lemezjátszókból is ismert kis méretű lézerekkel. Az elv nem változik, ha a tárgyasztal, vagy a tű mozgatásával végezzük a pásztázást. A legegyszerűbb AFM tehát a minta felszínének topográfijáról adott információt. A 2. ábra egy AFM berendezés vázlatát mutatja.

Az 1986-ban elvégzett első kísérletek sikerén felbuzdulva, ma már számos cég állít elő AFM készüléket. Ezeknek a haszna, hogy az iparban a különböző felszíni struktúrák (mikroelektronikai chippek, vezető és nem-vezető anyagfelszínek stb.) nagy felbontású vizsgálata viszonylag olcsón, az elektronmikroszkópos vizsgálatok nehézsége nélkül végezhető el. Azokat a készülékeket, amelyek-



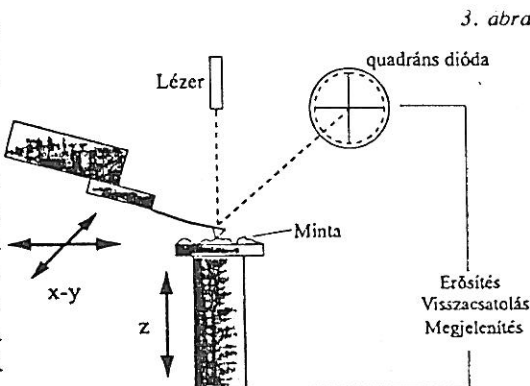
2. ábra



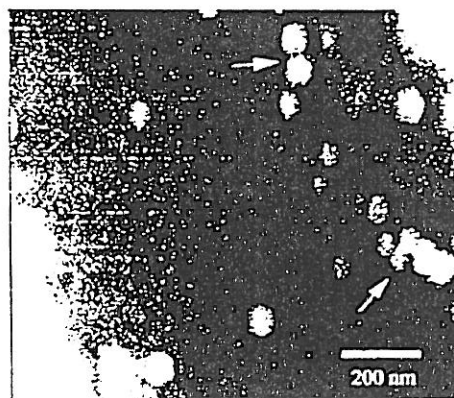
nek a letapogató feje a pásztázó egység és így gyakorlatilag bármilyen felületre ráhelyezhető. „stand alone” készülékeknek nevezzük.

A biológiai alkalmazás rendkívül gyorsan terjed, mivel a módszer a plazmamembrán alatti struktúrák vizsgálatára is alkalmassá tehető. A 3. ábra mutatja a készülék vázlatos működési elvét. Az X–Y irányban mozgatható tű segítségével tapogalja le a berendezés a minta felszínét. A tű „tartólapjára” fókuszált lézersugár egy kvadráns diódára verődik. Ennek a diódának a segítségével detektálható a tűhegy mozgása a felszínen. A dióda jelei megfelelő erősítés után, szinkronban a pásztázással, közvetlenül megjeleníthetők. Az így kapott kép a felszín finom struktúrájáról ad információt. A minta Z-irányú mozgathatóságához ugyanezen jelet lehet visszacsatolásként alkalmazni. A visszacsatolt jel segítségével a minta és a szonda közötti erőhatást (a relatív helyzetet) állandó értéken képes tartani a rendszer. Ezzel a felszín magasságviszonyairól lehet pontos képet kapni. Ezeket az információkat külön képen jeleníthetjük meg. A mérés fizikai alapjai meglehetősen bonyolultak. A legegyszerűbb és közérthető megközelítés szerint legalábbis részben a tű és a vizsgált anyag elektronfelhőinek az egymást taszító ereje nem engedi — a gyenge rugóállandó mellett —, hogy a tű behatoljon az anyagba. Ugyanakkor a sztanol rugóállandója elég erős ahhoz, hogy a tűt a felszínhez nyomja. Számos mérést tesz lehetővé a Z-irányú visszacsatolás. Mérhető a felszín atomi, molekuláris struktúráján kívül, megfelelő előkezelés után a citoskeleton, sőt a sejtmag szerkezete is. Ha tisztá molekulaszuszpenziókat vizsgálunk, a molekulák konformációs változásai is követhetők. A sejtek felszínén immunológiai módszerekkel megjelölt antigének és receptorok eloszlása és mintázata láthatóvá tehető. Az immunogold módszer lehetővé teszi különböző nagyságú kolloidális aranygömböcskékkel specifikusan jelzett antigének, egyedi molekulák azonosítását.

Megmérhető a molekuláris és atomi struktúrák összelartó ereje. A módszer nagy előnye az elektronmikroszkópiával szemben, hogy közel fiziológiai körülmények közötti méréseket tesz lehetővé. Nem kevés nehézséget okoz azonban az, hogy specifikus jelzések nélkül ritkán lehet azonosítani az éppen vizsgált struktúrákat. A 4. ábrán látható kép mutatja, hogy az aranygömböcskékkel jelzett sejtfel-



3. ábra



4. ábra

színi antigének nem egyenletesen oszlanak el, hanem mintákat képezhetnek, amelyeknek a sejtek közötti kommunikációban lehet szerepe.

A sejtek AFM vizsgálatának egyik fő akadálya a sejtek igen változatos domborzatú felszíne. Az AFM vizsgálatok fő jelszava „the flatter the better”, azaz minél laposabb valami, annál jobban vizsgálható. Ezért igaz az a paradoxon, hogy molekulaszuszpenzió konformáció-változást azonosítani könnyebb akár angström szinten is, mint megtalálni egy 30 nm átmérőjű kolloidális aranyjelzést egy nem nagyon lapos sejt felszínén. Ennek ellenére a sejtek számos olyan tulajdonsága vált így vizsgálhatóvá, amelyek elektronmikroszkóppal ugyan megfigyelhetők lennének, de az artefaktumok iránti kételyt a preparálási és mérési körülmények miatt nehéz kiiktatni. A letapogatást végző tű gyártása maga is technikai vívmány, hiszen a tű hegye néhány angström átmérőjű gömb. Természetesen a letapogatással nyert „kép” nem teljesen tökéletes, mert a tű alakja is befolyásolhatja azt. Magát a pásztázást is különböző üzemmódokban lehet végezni. Ezek közül a sejtbiológiai kísérletekhez különösen megfelelőnek tűnik az oszcilláló (tapping) üzemmódban és vizes (bufferelt) közegben üzemeltetett, néhány nm átmérőjű tű. Ebben az üzemmódban nincs időben állandó kölcsönhatás a felület és a pásztázó szonda között. A sajátfrekvenciáján gerjesztett tű rezgésének amplitúdója a felülethez közeledve a kölcsönhatásnak köszönhetően változik. Ezt az amplitúdóváltozást képes detektálni és korrigálni a rendszer a képalkotás közben.

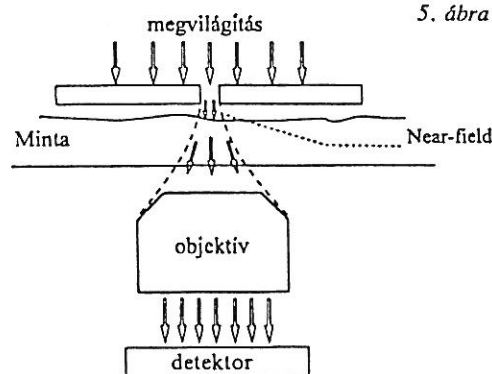
Szembetűnő lényeges különbség az elektronmikroszkópos és AFM mérések között az előbbi megállapításból is nyilvánvaló, mivel AFM-mel vizes közegben is lehet dolgozni, ami lehetetlen az elektronmikroszkópos vizsgálatok során.

Közei mező optikai mikroszkópia (NSOM)

Elvileg az előzőektől teljesen különböző, valódi optikai módszer a közei mező optikai mikroszkópia. Ez egy olyan nagyfelbontású képalkotó eljárás, amely független az alkalmazott fénysugár hullámhosszától, ami a legtöbb optikai képalkotó eljárás korlátja. Mondhatnánk úgy is, hogy az Abbe-elv megkerülésére Lewis, Fischer, Pohl és társai kihagyták az optikát az alkalmazott rendszerből. Ez az eljárás olyan nem destruktív felületvizsgáló módszer, mely alkalmas natív környezetben, a pásztázó elektronmikroszkóp felbontásához hasonló nagyságrendű leképezésre. A felbontási küszöb a fénymikroszkóp (250 nm) és az AFM között van.

Az NSOM nagy előnye a még jelenleg az AFM-nél csak valamivel gyengébb felbontóképessége (jelenleg 10–40 nm) mellett, hogy fluoreszcenciás, vagy más spektroszkópiai módszerekkel kombinálva a vizsgált felszíni minták elemei az immunofluoreszcencia eszközeivel azonosíthatók, a fluoreszcencia, egyéb módozataival kibővíthetők.

Így a módszer legnagyobb haszna, hogy nagy felbontás mellett kinetikai információval is szolgálhat, amelyet a leképezés során, az anyag felszínéhez igen közel elhelyezett (near field) résen (apertúrán) keresztül az anyagra vetülő fény visszaverődése, szóródása, vagy az anyagon áthaladó fény igen keskeny és a felszínhez igen közeli résen át leképezett és raszterpontokból pásztázással felépített



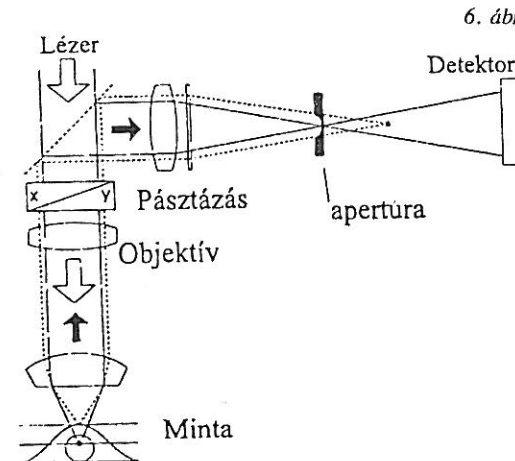
5. ábra kép ad meg. Az 5. ábra az elv egyfajta vázlatos alkalmazását mutatja. A gerjesztő fény egy kis apertúrán keresztül halad át, melynek átmérője az alkalmazott fény hullámhosszánál rövidebb tartományba esik. Ezzel a módszerrel csak közvetlenül a rés alatt aktuálisan elhelyezkedő területről származik a továbbított jel. A mikroszkópobjektív gyűjti össze a mintán áthaladó fényt. A felbontást elsősorban az apertúra átmérője határozza meg. Az apertúra mozgásával (pásztázás) előállítható a minta

nagyfelbontású kétdimenziós képe. A rés elhelyezése és megfelelő mozgatása (vagy a felszín mozgatása a rés előtt), illetve a fénynek a tárgyra történő rá-, illetve elvezetése a legkönnyebben úgy valósítható meg, hogy a patch clamp kísérletekből ismert kapillárist használjuk fel. Ez egy olyan 30–50 nm apertúrájú vékony cső, amely a már előzőekben megismert pásztázó elektronikával könnyedén összeépíthető.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia (CLSM)

Tematikailag a pásztázás bevezetése és a hagyományos mikroszkópos feloldási lehetőségek drámai kibővülése miatt a Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM is a mai modern mikroszkópiák közé tartozik, annak ellenére, hogy tulajdonképpen hagyományos optikai mikroszkópia. A lényegi különbség közle és a pásztázó szondás (erő) mikroszkópiák, pl. SFM, NSOM és a CLSM között az atomi felbontás hiánya. A viszonylag nagy feloldású transzmissziós elektronmikroszkópos technikák egyik nagy hátránya, hogy nagyon nehezen állítható elő jó minőségű háromdimenziós kép. Ezeket a problémákat a mintakészítés még fokozza (beágyazás, mechanikai szeletelés stb). A konvencionális optikai mikroszkópos technikáknál ez a mintakészítési probléma kiküszöbölhető, hiszen élő sejtek dinamikus tulajdonságai is vizsgálhatók. Az első kézenfekvő probléma a felbontáson túl az, hogy a vizsgált mintaterület magasabban, illetve mélyebben levő (fókuszon kívül eső) részeiről érkező információ csökkenti az előállított kép kontrasztosságát. Ez a jelenség főként vastag mintákra érvényes. A vastagabb biológiai preparátumok, szövetek, sejtsoportok vizsgálatában a CLSM meg tudta oldani azt a problémát, hogy a különböző egymáshoz közel lévő rétegek egyszerre történő, összefolyó leképezése helyett, optikailag élesen elválasztható vékony rétegekből kapott képeket vegyen fel, azokat komputerben tárolja, és a vékony rétegekből a képeket tetszőlegesen összerakja.

A 6. ábra mutatja a pásztázás nyújtotta előnyöket. A kép egyes pontjait szűk apertúrán keresztül, rasterpontszerűen képződnek le. Ezzel a hagyományos mikroszkópos képhez képest keskeny, jól definiált rétegből nyert éles képeket lehet



6. ábra kapni. A számítógépes tárolási és újraelőhívási lehetőség azzal jár, hogy pl. adott sejt belsejébe „betekinthetünk”, anélkül, hogy azt elmeszennénk.

A lézersugár közvetlenül a mintára fókuszált, a pásztázó rendszer és a nagy numerikus apertúrájú lencse segítségével. A pásztázó lézersugár által gerjesztett fluoreszcens fény a tér minden irányába szóródik. Ennek a fénynek egy része az objektív lencse által összegyűjtődik és így visszajut a pásztázó rendszerbe, majd onnan egy félgáteresztő tükör segítségével jut a detektorra. A lencse fókuszában levő helyről érkező nyaláb a gerjesztő fénnel azonos úton ellentétes irányban halad a nyalábosztó irányába. A nyalábosztó és a detektor közé helyezett apró lyuk csak ezt a nyalábot enged át a detektor felé. A fókuszon kívül eső fluoreszcens fény (szaggatott vonal) nem jut el a detektorig ebben a rendszerben, növelve ezzel a kontrasztot. A fókusz valahol az apertúra mögött van (1. 6. ábra).

A kétdimenziós képi ábrázoláshoz a lézer egy adott területet pásztáz végig és az indukált fluoreszcens fény detektálódik és konvertálódik video jellé, ami a képernyőn megjelenik. A lézer jelentősége abból fakad, hogy a keskeny apertúrán (gyakorlatilag nm nagyságrendű átmérőjű lyuk; pinhole) áthaladó fénysugár intenzitása igen legyengül. A lézerfény intenzitása azonban még ekkor is elegendő ahhoz, hogy elektronikusan értékelhető jelet kapjunk. A kép nyilván annál élesebb, minél kisebb a fénypont szétterülése (mennyire jól definiált az ún. pointspread-function). A modern nagy teljesítményű asztali számítógépek ugyancsak hozzájárultak ahhoz, hogy a Davidovitz és munkatársai által 1969-ben megkonstruált CLSM elterjedjen és valóban igen jól használható készülékké váljon. A kiinduló pont Nomarski (1955) differenciális fáziskontraszt optikai mikroszkópja volt, ami a Zernike-féle hagyományos fáziskontraszt mikroszkópot jelentősen felülmúlta abban, hogy az optikai „visszatartás” mértékét regisztrálta pontonként.

Az igazi előny a CLSM javára az, hogy a reflektált vagy áthaladó fénysugarakat optikai lencse fókuszálja a kimenő apertúrára, mielőtt egy fotodetektor érzékeli. Ezzel a fókusz mélysége nagymértékben csökken, ami a konfokálisnak a feltétele. Így csak azonos keskeny rétegből származó sugarak jutnak az egy pásztázási mező által kialakított képre. Tehát az elv egyszerű és lényegében a készülék alig valamivel bonyolultabb, mint a hagyományos optikai mikroszkóp, mégis forradalmasította az új biológiai ismeretek szerzésének lehetőségét.

Természetesen, a képalkotás, ha keskenyebb rétegből és élesebb fókuszokban történik is, hagyományos optikai képalkotás, így az Abbe-féle feloldási korlátok érvényben vannak. Az itt felsorolt mikroszkópiák forradalmasíthatják nem csupán

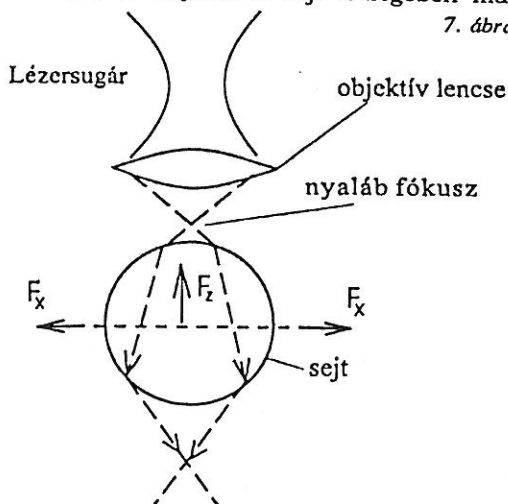
a területi, alkalmazott fizikát, de a sejtbiológiát és sok szempontból a biokémiát is. E módszereknek a rutin laboratóriumi diagnosztikába történő bevezetése valószínűleg csak idő kérdése. A felhasználást és széles körű alkalmazást bizonyára pozitívan fogja befolyásolni, hogy e módszerek ugyan egyelőre nem olcsók, de a készülékek ára összehasonlíthatatlanul kevesebb az elektronmikroszkópok ma is igen magas áránál és a mérési módszerek gyakorlatilag a minták natív állapotában alkalmazhatók.

A sejtbiológiai manipulációk új fegyvere: az optikai csipesz

A sejtek pusztta megfigyelését a sejtbiológiában korán felváltotta, vagy kiegészítette a sejteken végzett műveletek sora. Lényegében a biokémiai preparatív módszerek igen gyakran nem egyebek, mint sejtek nagy tömegén véghezvitt eljárások, amelyek végén valamilyen sejtalkotórészt a sejt feltárása, összetörése után és árán tisztán állítunk elő. A modern szövettenyésztő eljárások bevezetése és az egyedi sejtanalízist nagyszámú sejten rövid idő alatt lehetővé tevő áramlási citometria sem teszi azonban lehetővé egyedi sejtek közötti kölcsönhatások reprodukálható megfigyelését.

Az „optikai csipeszek” (optical tweezer) bevezetése különleges lehetőséget kínál a sejtbiológiában. Egyetlen sejtet, mikroszkópos megfigyelés és megfelelő protokoll szerinti kezelés után fel tudunk emelni anélkül, hogy észrevehető mértékben sérülne és szinte tetszőleges helyre (másik közegbe, másik sejt mellé stb.) áthelyezhetjük, miközben a rendelkezésünkre álló optikai és spektroszkópiás módszerekkel megfigyeléseket végezhetünk.

A 7. ábra mutatja az optikai csipesz elvét, ami egyáltalában nem csipesz, mint azt nevének magyar fordítása sugallná. A sejteket gyakorlatilag nem károsító lézersugár a csipesz. A sejt közegében más

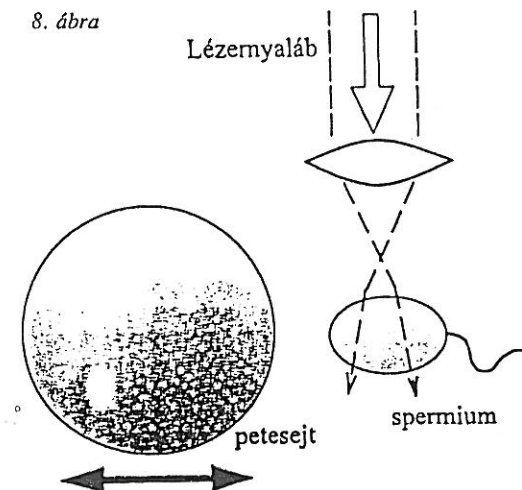


7. ábra

sebességgel haladó (pl. infravörös) fénysugár megtörik. Ha a sejt nincs messze a fókuszált sugár fókusz-távolságától, akkor a fénynyomásból származó erők eredője (F_z) emeli a sejtet és egyensúlyt tart a gravitációs erővel. Az ábra mutatja az eredő erőket és a sugármeneteket. A fénytörésből, illetve visszaverődésből származó vízszintes erőkomponensek (F_x), a sugármenet hossz tengelyébe húzzák be az objektumot és ott egyenlítik ki egymást.

A 8. ábra egy lehetséges gyakorlati alkalmazást mutat be, amikor egy petesejtbe spermiumot juttatunk be. Természetesen a poten-

8. ábra



ciális alkalmazások száma a sejtbiológiában, de számos más tudományágban is igen nagy. A felemelt kicsiny objektum lehelyezése a lézer kikapcsolásával történik. A felemelt sejt alatt a tárgyasztal tetszőlegesen elmozdítható, ami számos manipulációs lehetőséget enged meg.

Az állati és növényi sejtek és sejtalkotórészek biológiájának egészen új dimenziói tárulhatnak fel a természetes körülmények között is alkalmazható új mikroszkópos és sejtmanipulációs módszerek alkalmazása nyomán. Az így nyert új ismeretek biotechnológiailag és orvostudományi felhasználása még igen kezdeti áll-

IRODALOM:

- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, Ch., Weibel, E., Phys. Rev. Lett. 1983, 50, 120
 Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, Ch. Phys. Rev. Lett. 1986, 56, 930
 Scanning Probe Microscopies SPIE Vol. 1639 1992
 Damjanovich, S., Vereb, Gy., Schaper, A., Jenet, A., Matko, J., Starink J. P., Fox, G. G., Arndt-Jovin, D. J., and Jovin, T. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 1122
 Pohl, D. W., Denk, W., Lanz, M. Appl. Phys. Lett. 1984, 44, 651
 Betzig, E., Trautman, J. K.; Harris, T. D.; Weiner, J. S., Kostelak, R. L., Science 1991, 251, 1468
 Betzig, E., Trautman, J. K., Science 1992, 257, 189