Wysokoprzepustowa automatyczna mikroskopia fluorescencyjna – twórcze rozwinięcie klasyki

fot. iStock

Mikroskopia HCS/HCA jest uzupełnieniem mikroskopii klasycznej, której rola w dokumentowaniu morfologii, biochemii czy różnicowania komórek jest nie do przecenienia.

Marek Michałowski

Gdy w XV wieku bracia Hans i Zachariasz Jansenowie budowali pierwszy przyrząd umożliwiający dziesięciokrotne powiększenie obrazu, w wieku XVII Antoni van Leeuwenhoek konstruował swoje soczewki, dzięki którym po raz pierwszy człowiek zobaczył bakterie, czy wreszcie gdy Robert Hook za pomocą swojego mikroskopu wprowadził nas w świat komórek, żaden z nich nie przewidywał prawdopodobnie, że mikroskopia optyczna stanie się podstawowym narzędziem nie tylko w badaniach naukowych, ale także w diagnostyce laboratoryjnej oraz kontroli jakości w wielu dziedzinach przemysłu.

Niniejszy artykuł koncentruje się na prezentacji aktualnych możliwości, zalet i ograniczeń jednej z odmian mikroskopii optycznej, jaką jest wysokoprzepustowa automatyczna mikroskopia fluorescencyjna, umożliwiająca wielopłaszczyznową analizę matematyczną danych z uzyskiwanych obrazów.

Ewolucja mikroskopii optycznej

Klasyczna mikroskopia optyczna pozwala na obserwację w świetle przechodzącym materiału barwionego z użyciem związków chemicznych poprawiających kontrast lub specyficznie wiążących się z określonymi strukturami komórkowymi. Taki sposób barwienia ogranicza możliwości obserwacji jedynie do materiału utrwalonego. Zastosowanie kontrastu fazowego opracowanego przez Fritsa Zernike'a oraz kontrastu interferencyjno-różnicowego, który wynalazł polski fizyk Jerzy Nomarski, pozwoliło na obserwacje preparatów żywych komórek, ich ruchów, podziałów i różnicowania morfologicznego.

Rozwój optyki, fizyki, elektroniki i metod rejestracji obrazu doprowadził do ewolucji mikroskopii optycznej oraz opracowania mikroskopów fluorescencyjnych, których odmianą są mikroskopy konfokalne.

Tego typu urządzenia zwiększają możliwości identyfikacji substruktur komórkowych, ich lokalizacji lub migracji czy określania fenotypu komórek. Mikroskopia fluorescencyjna umoż- ▶

liwia obrazowanie materiału utrwalonego, jak i obrazowanie przyżyciowe.

Mikroskop epifluorescencyjny zbudowany jest ze źródła światła wzbudzającego fluorescencję, którym może być lampa rtęciowa, ksenonowa, metalo-halogenkowa, LED (ang. *light-emitting diode*, dioda elektroluminescencyjna), SSI (podobne do źródeł LED; ang. *solid-state illiminator*, źródło światła na ciele stałym) lub laser, oraz systemu filtrów optycznych i luster dichroicznych kierujących wiązkę poprzez obiektyw na preparat. Wzbudzone światło jest zbierane przez obiektyw i przekazywane na filtry emisyjne, a następnie do detektora (ludzkie oko, fotopowielacz czy kamera cyfrowa). W chwili obecnej kamery typu CCD zastępowane są nowocześniejszymi kamerami typu CMOS lub sCMOS.

W mikroskopach fluorescencyjnych rejestrujemy obraz światła fluorescencyjnego o zdefiniowanej długości fali, emitowanego przez wzbudzone barwniki fluorescencyjne. Barwniki mogą być związane z przeciwciałami monoklonalnymi rozpoznającymi określone antygeny na powierzchni lub wewnątrz komórki (po raz pierwszy wykorzystał to Albert Coons w 1941 r.), z białkami fluorescencyjnymi produkowanymi przez komórki (np. GFP, za którego odkrycie Chalfie, Shimomura i Tsien otrzymali nagrodę Nobla w 2008 roku; DsRED, MCherry), a także mogą być dostarczane do komórek bezpośrednio (wówczas przydatną cechą barwników jest ich zdolność wiązania do określonych przedziałów komórkowych lub organelli).

W mikroskopach konfokalnych (podstawy tej techniki opracował i opatentował w 1961 r. Marvin Minsky) wzbudzone światło zbierane jest z poszczególnych płaszczyzn ogniskowania (planów fokalnych) za pomocą pojedynczej szczeliny optycznej umieszczonej pomiędzy obiektywem i detektorem. Dzięki temu uzyskujemy obraz wyłącznie z płaszczyzny ogniskowania, bez rejestrowania fluorescencji emitowanej przez barwniki znajdujące się powyżej lub poniżej tej płaszczyzny, co pozwala na znaczną redukcję tła fluorescencji i w konsekwencji – uzyskiwanie obrazów o powiększonym kontraście i rozdzielczości. Otrzymanie obrazu całego preparatu wymaga jego skanowania, osobno dla każdego planu fokalnego.

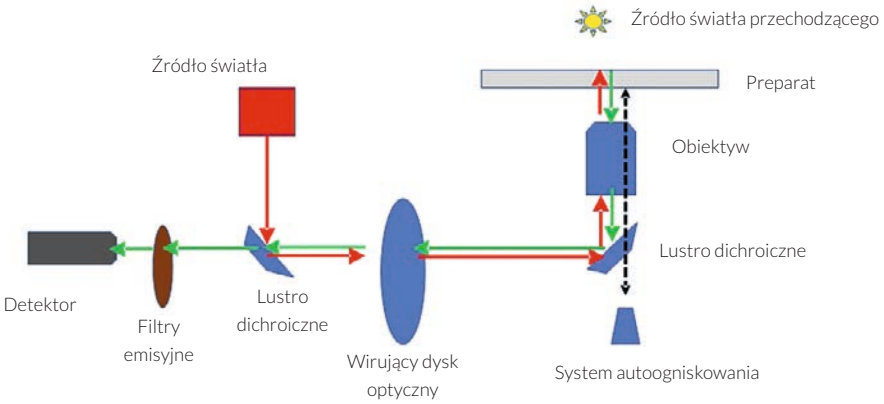
Klasyczne mikroskopy fluorescencyjne i będące ich odmianą laserowe, skaningowe mikroskopy konfokalne, umożliwiły badaczom poznanie ultrastruktur komórkowych, procesów fizjologicznych i biochemicznych w komórce, mechanizmów regulacyjnych, a także mechanizmów różnicowania komórek czy ich ruchu. Pozwoliły również na inne podejście do analizy preparatów tkankowych oraz organizmów modelowych. Wynikiem obrazowania w mikroskopach fluorescencyjnych są pliki graficzne (JPG, TIFF itp.), które następnie mogą być poddawane dalszej obróbce i analizie przy użyciu specjalistycznego, zewnętrznego oprogramowania.

Rozwój oprogramowania i sprzętu pozwolił na częściową automatyzację procesu obrazowania, jednakże wymaga ona stałej obecności operatora zarówno podczas każdorazowego dobierania parametrów mikroskopowych procesu, rejestracji obrazów, a także podczas ich analizy. Bardzo często uzyskiwane obrazy muszą być eksportowane do innych programów pozwalających na opracowywanie i analizę. Klasyczne mikroskopy epifluorescencyjne czy konfokalne lokalizowane są z reguły w dedykowanych pomieszczeniach, które wymagają zaciemnienia. Największymi ograniczeniami dla tych typów mikroskopii są mała przepustowość oraz brak możliwości standaryzacji procesu obrazowania i analizy obrazów.

Rozbudowane mikroskopy epifluorescencyjne czy konfokalne charakteryzują się znaczną liczbą urządzeń peryferycznych podłączonych do głównego korpusu, co naraża je na wpływ warunków zewnętrznych i uszkodzenia.

Oczywistą zaletą takich rozwiązań jest możliwość precyzyjnego dobierania parametrów obrazowania i analizy dla każdego poszczególnego preparatu. Ma to istotne znaczenie w przypadku badań strukturalnych lub biochemicznych, jednak jest możliwe dla bardzo ograniczonej liczby preparatów.

W przypadku rozbudowanych doświadczeń, w których należy zobrazować preparaty materiału poddawanego różnym wariantom eksperymentu, przepustowość klasycznej mikroskopii epifluorescencyjnej czy konfokalnej może okazać się niewystarczająca. Wyobraźmy sobie eksperyment, w którym mamy zbadać wpływ jakiegoś związku na aktywację określonego enzymu. Musimy zdefiniować podawane dawki (cytotoksyczność) związku, metodę jego podawania (np. warunki pH, obecność jonów, detergentów itp.), optymalną metodę detekcji i wiele innych czynników. Mamy więc do wykonania bardzo dużą liczbę obrazowań i analiz obrazu



Ryc. 1. Ogólny schemat budowy i drogi świetlnej systemów HCS/HCA

już na etapie opracowywania oraz walidacji metodyki eksperymentu. Ograniczona przepustowość klasycznych mikroskopów epifluorescencyjnych czy konfokalnych powoduje, że badacze często rezygnują z części zaplanowanych eksperymentów ze względu na limity czasowe i dostępność mikroskopów.

Rozwiązaniem tych problemów okazał się opracowany w 1884 roku przez Paula Nipkowa wirujący dysk optyczny zawierający spiralnie ułożone otworki spełniające funkcje wielu szczelin optycznych. Pozwoliło to na połączenie szybkości obrazowania mikroskopu epifluorescencyjnego z możliwościami jakościowymi obrazowania mikroskopu konfokalnego przy zachowaniu niskiej fototoksyczności.

Kolejnym krokiem było skonstruowanie systemów wysokoprzepustowej automatycznej mikroskopii fluorescencyjnej (ang. *High-Content Screening* – HCS/*High-Content Analysis* - HCA). Są to systemy pozwalające na automatyczne uzyskiwanie bardzo dużych ilości wyników w krótkim czasie, w wystandaryzowanych warunkach. Wyniki obrazowania są automatycznie przekształcane w dane liczbowe, wykresy itp., uwzgledniające statystykę.

W tej części artykułu zostaną przedstawione najpopularniejsze rozwiązania technologiczne z tego zakresu.

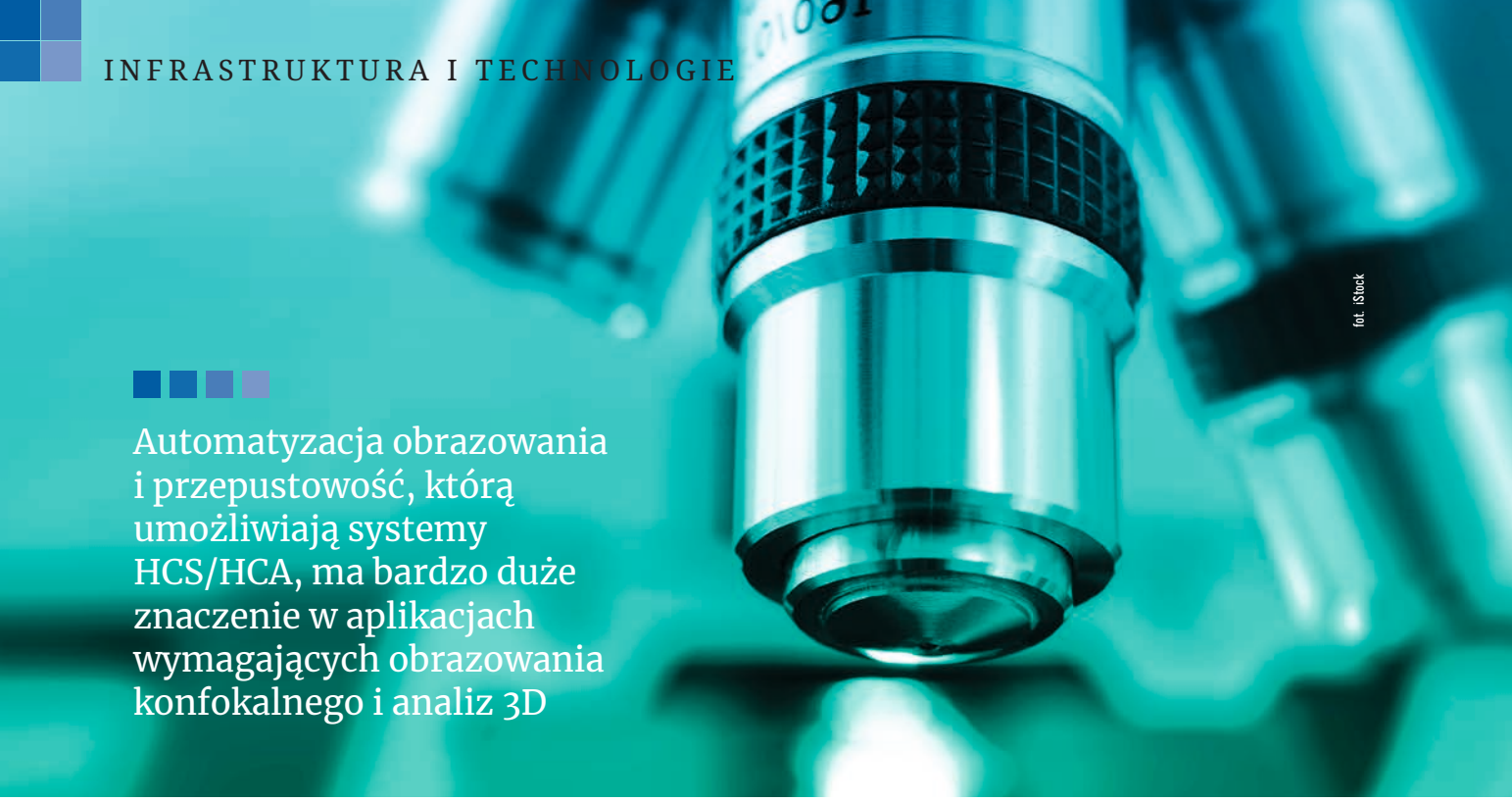
W systemach HCS/HCA całe urządzenie jest zintegrowane, a w jego skład wchodzą:

1. źródła światła wzbudzającego fluorescencję,
2. źródło światła do obrazowania w świetle przechodzącym,
3. system automatycznego ogniskowania,
4. lustra dichroiczne i filtry wzbudzeniowe wraz z układem sterowania,
5. system dysków optycznych (dla opcji konfokalnej),
6. filtry emisyjne wraz z układem sterowania,
7. optyka do obrazowania w świetle przechodzącym,
8. obiektywy zamontowane na rewolwerze z automatyką wyboru obiektywu i pozycjonowania,
9. układ detekcji,
10. układ mechaniczny sterujący ruchami i pozycjonowaniem stolika,
11. system pozwalający na obrazowanie przyżyciowe (opcjonalnie),
12. system dozowania reagentów (opcjonalnie).

Systemy HCS/HCA nie wymagają dedykowanych, zaciemnionych pomieszczeń laboratoryjnych.

Jako źródła światła w systemach HCS/HCA najczęściej stosowane są:

a) Lampy LED, których zaletami są niska fototoksyczność oraz możliwość zdefiniowania długości fali wzbudzającej fluorescencję. Lampy LED charakteryzują się wąskim widmem emisji, co gwarantuje stabilność energetyczną światła wzbudzającego fluorescencję.
   Mają zastosowanie przy wielokrotnym obrazowaniu tych samych obiektów w czasie, do obrazowania epifluorescencyjnego oraz konfokalnego. Stosowane są również źródła światła oparte na ciele stałym (*Solid-State Iluminator* - SSI), których charakterystyka jest zbliżona do lamp LED.
b) Lasery, których zaletami są zdefiniowana długość fali oraz duża ilość energii dostarczana do fluorochromów, dzięki czemu skraca się czas ekspozycji i uzyskiwania obrazów fluorescencji nawet dla obiektów, z którymi związana jest niewielka ilość fluorochromu. Wadami światła laserowego są wysoka fototoksyczność oraz powodowanie zjawiska wyświecania fluorochromów (tzw. fotobleachingu). ▶



fot. iStock

Automatyzacja obrazowania i przepustowość, którą umożliwiają systemy HCS/HCA, ma bardzo duże znaczenie w aplikacjach wymagających obrazowania konfokalnego i analiz 3D

c) Znacznie rzadziej można spotkać dzisiaj rozwiązania HCS/HCA oparte o lampy metalo-halogenkowe czy rtęciowe spotykane w klasycznych mikroskopach fluorescencyjnych. Jest to spowodowane znacznie mniejszą stabilnością widma emitowanego przez te lampy oraz krótszą żywotnością takich źródeł światła.

Stosowane w systemach HCS/HCA automatyczne lustra dichroiczne czy zestawy filtrów nie różnią się od analogicznych elementów optycznych w mikroskopach klasycznych. W systemach HCS/HCA istotna jest sprawność automatyki zmieniającej pozycjonowanie luster i filtrów.

Obrazowanie konfokalne w systemach HCS/HCA jest uzyskiwane za pomocą wirujących dysków optycznych posiadających odpowiednio rozmieszczone na swojej powierzchni szczeliny optyczne. W zależności od konstrukcji systemu mogą być stosowane dyski pojedyncze lub podwójne.

Dyski pojedyncze stosuje się, jeżeli źródłem światła wzbudzającego fluorescencje są lampy LED lub SSI. W przypadku zastosowania laserów jako źródła światła z reguły stosuje się podwójne dyski optyczne, z których pierwszy wyposażony jest w soczewki skupiające promienie lasera na szczelinach rozmieszczonych na drugim dysku. Pozwala to na doprowadzenie do preparatu znacznie większej ilości fotonów i co za tym idzie – skrócenie czasu ekspozycji. W niektórych aparatach HCS/HCA zamiast obrazowania konfokalnego stosuje się programową dekonwolucję obrazów (proces polegający na zdefiniowaniu funkcji opisującej zakłócenie i programowym odfiltrowaniu tej funkcji w celu poprawy jakości sygnału).

Niektóre z dostępnych na rynku systemów HSC/HCA wyposażone są w obiektywy z automatyczną immersją wodną, która umożliwia uzyskiwanie znacznie jaśniejszych i ostrzejszych obrazów w stosunku do obiektywów bez immersji. W systemach automatycznych nie ma możliwości stosowania immersji olejowej.

Detektorem w systemach HCS/HCA jest monochromatyczna kamera cyfrowa (najczęściej sCMOS). W niektórych systemach stosuje się do 4 kamer sCMOS umożliwiających symultaniczną rejestrację 4 kanałów fluorescencji, co wymaga wdrożenia metodyki pozwalającej na maksymalne ograniczenie zjawiska *crosstalk* (zachodzenie na siebie widm emisji barwników fluorescencyjnych powodujące częściową rejestrację sygnału pochodzącego z jednego barwnika w kanale drugiego barwnika). Zastosowanie 4 kamer pozwala na znaczne skrócenie procesu obrazowania wielokolorowego, co ma istotne znaczenie w trybie konfokalnym.

Niektóre systemy HCS/HCA są wyposażone w układy dozowania. Ma to zastosowanie jedynie w przypadkach badania szybkich kinetyk (np. wyrzut wapnia) na poziomie pojedynczych komórek.

Systemy HCS/HCA posiadają z reguły jedno zintegrowane oprogramowanie do: zarządzania

pracą systemu, przygotowywania protokołów wykonawczych, akwizycji zdjęć, ich automatycznej analizy oraz przekształcania danych obrazowych na matematyczne, wraz z obliczeniami statystycznymi.

Jak działają systemy HCS/HCA?

W istocie są to zabudowane mikroskopy epifluorescencyjne i/lub konfokalne, ale pracujące automatycznie, bez konieczności stałego nadzoru użytkownika. Aparat wykonuje czynności zapisane w protokole wykonawczym. Praca z systemem rozpoczyna się od uruchomienia zapisanego protokołu wykonawczego, jego modyfikacji lub stworzenia nowego. Protokół definiuje wszystkie funkcje mikroskopowe (wybór źródła światła, filtrów, luster dichroicznych, obiektywu, przysłony, czasu ekspozycji, trybu rejestracji obrazu itp.) oraz metodykę analizy obrazu (uczymy aparat rozpoznawać konkretne obiekty o określonej charakterystyce, w niektórych aparatach możliwa jest opcja uczenia maszynowego dotyczącego np. znajdowania obiektów podobnych czy wreszcie analiz fenotypowych). Analiza obrazu polega na kwantyfikacji zawartych w nim informacji o intensywności fluorescencji interesujących nas obiektów w stosunku do kontroli. Protokół wykonawczy określa również sposób matematycznego przedstawienia wyników oraz trybu ich graficznej prezentacji.

Z poziomu protokołu definiuje się także parametry inkubacji próbek w trybie obrazowania przyżyciowego oraz ewentualną współpracę aparatu z systemem automatycznego przygotowywania próbek. Aparat może sekwencyjnie realizować różne protokoły wykonawcze.

Faktycznym wynikiem pracy systemu HCS/HCA są dane matematyczne lub ich prezentacja graficzna, jednakże dane matematyczne uzyskuje się na podstawie analizy zdjęć wykonywanych i gromadzonych przez urządzenie. Systemy HCS/HCA generują bardzo duże ilości danych, do których przechowywania muszą być przeznaczone dedykowane serwery lub wirtualne magazyny danych (chmury).

Z czego to wynika?

Jeżeli do eksperymentu potrzebujemy np. 2 płytek 96-dołowych, zakładając obrazowanie w jednym polu widzenia na dołek z zastosowaniem 3 barwników fluorescencyjnych, w trybie epifluorescencyjnym, to z takiego eksperymentu uzyskamy 576 zdjęć w formacie np. 16 bit TIFF. Z reguły konieczne jest wykonanie obrazowań większej liczby pól widzenia z każdego dołka płytki, co znacznie zwiększa ilość gromadzonych danych. Jeżeli obrazujemy w trybie konfokalnym dla wielu płaszczyzn ogniskowania – liczba zdjęć, a więc danych, wzrasta znacząco.

Jednakże posiadając takie ilości danych, możemy analizować je w sposób istoty statystycznie. Gromadzenie danych na dedykowanych serwerach lub w chmurach pozwala na ich ponowną analizę *off-line* oraz dostęp do wyników z dowolnego miejsca posiadającego możliwość podłączenia internetu.

Zalety systemów HCS/HCA

1. Możliwość wykonywania obrazowania i analizy obrazu dla wielu próbek z gwarancją identycznych warunków dla każdego pojedynczego obrazowania, co zapewnia pełną standaryzację uzyskiwanych wyników. Umożliwia to planowanie i realizację bardzo rozbudowanych eksperymentów z wykorzystaniem wystandaryzowanego narzędzia pomiarowego.
2. Możliwość przeprowadzania różnego typu analiz dla tych samych obrazów (analiz danych intensywności fluorescencji obiektów z wykorzystaniem różnych algorytmów, np. do analiz morfologicznych, ilościowych, funkcjonalnych).
3. Bardzo duża przepustowość w stosunku do klasycznej mikroskopii optycznej.
4. Możliwość bezobsługowej pracy systemu (po uruchomieniu protokołów) w trybie 24/7.
5. Gromadzenie wyników w bazie danych z możliwością późniejszej analizy merytorycznej i statystycznej *off-line*.

Do czego wykorzystuje się systemy HCS/HCA?

Wszystkie typy aplikacji mikroskopowych oparte o obrazowanie fluorescencyjne, a także obrazowanie w świetle przechodzącym, są dostępne dla systemów HCS/HCA (należy pamiętać, ▸

Ograniczenia systemów HCS/HCA

1. Systemy HCS/HCA z założenia nie pozwalają na indywidualny dobór parametrów obrazowania dla każdego pojedynczego preparatu (szkiełka, dołka płytki), w związku z tym z punktu widzenia estetycznego obrazy uzyskiwane z klasycznych mikroskopów fluorescencyjnych mogą być bardziej szczegółowe czy obiektywnie ładniejsze. W końcu celem obrazowania HCS/HCA jest uzyskanie danych liczbowych, a nie ilustracji fotograficznej; parametry obrazowania i analizy obrazu dobiera się pod tym kątem.
2. Oczywiście istnieje ryzyko uzyskania błędnych wyników wynikających z wysokiej przepustowości systemu z jednej strony i zmienności materiału biologicznego z drugiej. Bardzo istotny jest proces walidacji materiału biologicznego, który ma być obrazowany oraz samych parametrów obrazowania i analizy obrazu.
3. Gromadzenie bardzo dużych ilości danych wymagające dedykowanych serwerów lub wirtualnych magazynów danych.

- że z reguły aparaty te są wyposażone w kamery monochromatyczne, więc klasyczne barwienia stosowane w mikroskopii światła przechodzącego są w tym wypadku niedostępne).

Aparaty HCS/HCA pozwalają na kwantyfikację wyników obrazowania w badaniach strukturalnych, jak i funkcjonalnych.

Różnica w stosunku do klasycznej mikroskopii optycznej polega na podejściu do eksperymentu. W systemach klasycznych wykonuje się znacznie mniej zdjęć, z których każde jest indywidualnie traktowane na etapie ustawień parametrów obrazowania, rejestracji i analizy. W systemach HCS/HCA uzyskujemy znacząco więcej zdjęć wykonanych w identycznych warunkach i poddanych identycznej analizie. Dlatego klasyczna mikroskopia optyczna wykorzystywana jest głównie do obrazowania wyników eksperymentów lub przedstawiania zjawisk, natomiast mikroskopia HCS/HCA pozwala na przeprowadzanie eksperymentów bazujących na standaryzacji i analizie wieloparametrowej danych eksperymentalnych uzyskiwanych na drodze obrazowania bardzo dużej ilości badanych obiektów.

Przykładem może być badanie wpływu wybranych inhibitorów na cykl komórkowy. Nie jest możliwe uzyskanie istotnych statystycznie wyników działania kilku różnych inhibitorów podawanych równolegle w wielu stężeniach na tę samą linię komórkową metodami klasycznej mikroskopii fluorescencyjnej. Ale ta technika umożliwi uzyskanie znakomitych zdjęć pokazujących wpływ inhibitorów w wybranych stężeniach do zobrazowania wyników uzyskanych innymi metodami (np. cytometrii przepływowej). Ten sam eksperyment przeprowadzony w systemie HCS/HCA dostarczy wiarygodne (analogiczne dla cytometrii) wyniki matematyczne, jednocześnie umożliwiając analizę obrazów pod kątem mechanizmu działania badanych inhibitorów.

Automatyzacja obrazowania i przepustowość, którą umożliwiają systemy HCS/HCA ma bardzo duże znaczenie w aplikacjach wymagających obrazowania konfokalnego i analiz 3D (np. w badaniu sferoidów, preparatów tkankowych czy organizmów modelowych). Możliwość prowadzenia rozbudowanych eksperymentów pozwalających na analizę 3D w czasie rzeczywistym daje systemom HCS/HCA istotną przewagę nad systemami klasycznymi.

Podsumowując, przeanalizujmy zalety i ograniczenia systemów HCS/HCA.

Podsumowanie

Opisane w artykule systemy HCS/HCA są twórczym rozwinięciem klasycznej mikroskopii fluorescencyjnej, ale nie stoją wobec niej w opozycji. Mikroskopia HCS/HCA jest uzupełnieniem mikroskopii klasycznej, której rola w dokumentowaniu morfologii, biochemii czy różnicowania komórek jest nie do przecenienia. Klasyczna mikroskopia fluorescencyjna ma przede wszystkim zastosowanie w badaniach strukturalnych, w których zdjęcie jest akceptowalnym wynikiem eksperymentu.

W badaniach strukturalnych i funkcjonalnych systemy HCS/HCA pozwalają na uzyskiwanie wyników liczbowych istotnych statystycznie. Systemy HCS/HCA pozwalają również na usprawnienie pracy laboratorium i uzyskiwanie większej liczby wyników, a oprogramowanie pozwala na ich analizę, której wyniki łatwo wykorzystać w publikacjach.