

JAROSŁAW KORCZYŃSKI

*Pracownia Mikroskopii Konfokalnej
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: j.korczynski@nencki.gov.pl*

NOWY WYMIAR MIKROSKOPII – SKANUJĄCY LASEROWY MIKROSKOP KONFOKALNY

WPROWADZENIE

W końcu drugiej połowy XIX i na początku XX w. mikroskopia świetlna znów przeżywa swój renesans, jako jedna z głównych technik badawczych w naukach przyrodniczych. Niewątpliwym powodem wzrostu popularności tej techniki było powstanie mikroskopii fluorescencyjnej, która oferowała znacznie większe możliwości badawcze od konwencjonalnej mikroskopii optycznej, wykorzystującej do obrazowania światło przechodzące przez próbkę lub przez nią odbite. Na tak duży sukces mikroskopii fluorescencyjnej mogły mieć wpływ dwa czynniki.

Po pierwsze nastąpił znaczący rozwój technik przygotowywania preparatów w oparciu o fluorescencyjne znaczniki (fluorochromy). Możliwe stało się dołączanie różnokolorowych, fluorescencyjnych cząsteczek, za pomocą przeciwciał, do ściśle określonych antygenów w wybranych częściach utrwalonego preparatu, a następnie używając światła wzbudzającego o odpowiedniej długości fali sprawić, że tylko te poszczególne wybarwione struktury będą widoczne na obrazie. Przełomowe było również wyizolowanie w latach 60. z meduzy *Aequorea victoria* zielonego białka fluorescencyjnego (ang. green fluorescence protein, GFP) (SHIMOMURA i współaut. 1962). Metodami inżynierii genetycznej udało się utworzyć cząsteczki fuzyjne złożone z białka GFP i badanego białka, co pozwoliło na uwidocznienie lokalizacji danego białka w komórce lub zobaczenie zmian tej lokalizacji pod wpływem różnych czynników. Dodatkowo brak toksyczności tej metody wobec organizmów żywych oraz łatwa wizualizacja

białka GFP w mikroskopie fluorescencyjnym pozwoliły na prawie nieinwazyjne badanie materiału biologicznego, bez zmiany jego morfologii, w warunkach środowiskowych odpowiadających fizjologicznym realiom. Ukoronowaniem badań nad białkami fluorescencyjnymi było przyznanie Osamu Shimomurze, Martinowi Chalfiemu i Rogerowi Tsienowi w 2008 r. Nagrody Nobla z dziedziny chemii za odkrycie i rozwój zielonego białka fluorescencyjnego. Ostatnie postępy w udoskonalaniu naturalnie występujących i syntetycznych fluorochromów, w tym białek fluorescencyjnych i kropek kwantowych, dodatkowo poprawiły ich poziom fotostabilności oraz swoistości znakowania.

Drugim powodem sukcesu mikroskopii fluorescencyjnej był równoległy rozwój samych urządzeń optycznych do wizualizacji preparatów barwionych fluorochromami, prowadzący do powstania konfokalnych mikroskopów fluorescencyjnych. Dzięki zastosowaniu nowatorskich rozwiązań, jak punktowe skanowanie preparatu oraz coraz doskonalsza optyka mikroskopowa, obrazy preparatów pochodzące z mikroskopu konfokalnego charakteryzują się większą rozdzielczością i lepszym kontrastem niż obrazy z konwencjonalnego mikroskopu fluorescencyjnego (mikroskopu szerokiego pola). Ten rodzaj mikroskopii osiągnął już nie tylko teoretyczny próg rozdzielczości dla mikroskopii świetlnej określony równaniem przez Ernsta Abbego (Wzór 1), lecz nawet przekroczył ten limit wykorzystując pewne własności fluorochromów oraz możliwości cyfrowej

obróbki obrazu mikroskopowego (LEUNG i CHOU 2011). Dodatkowo, dzięki wyeliminowaniu z obrazowania światła, które nie pochodzi z płaszczyzny ostrości preparatu, mikroskop konfokalny umożliwił wykonywanie serii ostrych zdjęć preparatów barwionych fluorescencyjnie, a tym samym pozwolił na konstruowanie i analizę trójwymiarowego modelu badanego materiału (w wymiarach XYZ).

$$d(xy) = \frac{\lambda}{2n \times \sin \alpha} \quad (\text{Wzór 1})$$

gdzie: $d(xy)$ – rozdzielczość w płaszczyźnie XY; λ – długość fali światła padającego na preparat; α – kąt aperturowy soczewki obiektywu; n – współczynnik załamania światła (bezwymiarowa liczba opisująca jak światło rozprzestrzenia się przechodząc przez środowisko, w którym jest badana próbka).

Dalsze udoskonalenia technologiczne systemów konfokalnych zwiększyły liczbę wymiarów mikroskopowego obrazowania. Najpierw został dodany czwarty wymiar, poprzez tworzenie trójwymiarowych rekonstrukcji obrazu powtarzanych w czasie (obrazowanie 4D, w wymiarach XYZT). W ko-

lejnych etapach okazało się, że mikroskopia konfokalna może służyć nie tylko do wiernego odwzorowania struktury badanego preparatu, ale również, wykorzystując właściwości fizykochemiczne fluorochromów, może nam powiedzieć wiele o procesach zachodzących w próbce oraz jej właściwościach. Analiza widma emitowanego światła, jego intensywności, czy też czasu życia fluorescencji (ang. fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM), może dostarczyć nam bowiem wielu informacji o środowisku, w którym znajduje się cząsteczka barwnika fluorescencyjnego (KORCZYŃSKI i WŁODARCZYK 2009). Prowadzi to do obrazowania z wykorzystaniem pięciu, sześciu i większej liczby wymiarów pokazujących przestrzennie.

Dzięki wspomnianym wyżej udoskonaleniom, zarówno znaczników fluorescencyjnych, jak i systemów mikroskopowych, skanujące laserowe mikroskopy konfokalne zyskały olbrzymią popularność w środowiskach badaczy. Niniejsza publikacja przedstawia podstawowe informacje związane z budową i działaniem tych mikroskopów, które zrewolucjonizowały metody badań w naukach przyrodniczych.

HISTORIA MIKROSKOPII KONFOKALNEJ

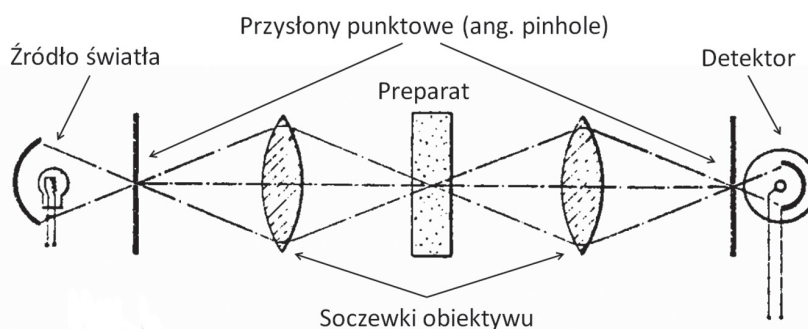
Za ojca mikroskopii konfokalnej uważany jest Marvin Minsky. W latach 50. XX w., podczas swojego podoktorskiego stażu na Uniwersytecie Harvarda, Minsky próbował badać w mikroskopie świetlnym połączenia neuronów w nieutralizowanej tkance mózgowej. Napotykał jednak wiele ograniczeń, które miał konwencjonalny mikroskop świetlny podczas obserwacji trójwymiarowych struktur w skrawkach badanego materiału, stąd też jego celem stało się stworzenie mikroskopu obrazującego te elementy w jak najlepszej rozdzielczości przestrzennej. Minsky twierdził, że aby tego dokonać mikroskop świetlny powinien:

- oddzielnie analizować światło pochodzące kolejno z poszczególnych punktów preparatu;
- zbierać światło pochodzące jedynie z płaszczyzny ogniskowej obiektywu, unikając światła dającego nieostry obraz, emitowanego z pozostałych warstw preparatu.

W zbudowanym przez siebie pierwszym skanującym mikroskopie konfokalnym Minsky użył cyrkonowej lampy łukowej o dużej mocy, z której światło przechodziło przez

wąską przysłonę oświetlając tylko mały punkt na preparacie. Światło pochodzące z preparatu było następnie zbierane przez obiektyw znajdujący się po drugiej stronie próbki. W miejscu ponownego skupienia się światła, w punkcie konfokalnym, znajdowała się druga przysłona przepuszczająca światło pochodzące tylko z płaszczyzny ostrości preparatu do umieszczonego za nią detektora, którym był fotopowielacz (Ryc. 1). Aby utworzyć obraz całego preparatu, ten pierwszy mikroskop konfokalny był wyposażony w ruchomy stolik, który przesuwając się umożliwiał oświetlanie kolejnych punktów na badanym materiale. Używając dwóch elektromagnesów do przesuwania stolika mikroskopowego w osiach X i Y oraz specjalnego oprogramowania komputerowego do składania obrazu, Minsky był w stanie uzyskać obraz jednego przekroju optycznego preparatu w czasie 10 sekund (MINSKY 1988).

Opatentowany w 1961 r. wynalazek Marvina Minskiego pozostał jednak przez długi czas niedoceniony. Było to spowodowane głównie brakiem źródeł światła o wystarczająco dużej intensywności dla punktowego



Ryc. 1. Schemat mikroskopu konfokalnego typu trans zamieszczony w patencie Marvina Minskiego (US 3013467).

W mikroskopie konfokalnym punktowe źródło światła, oświetlony punkt preparatu oraz jego obraz leżą w ogniskowych soczewek obiektywu (leżą w płaszczyznach konfokalnych) i stąd wywodzi się nazwa tej mikroskopii.

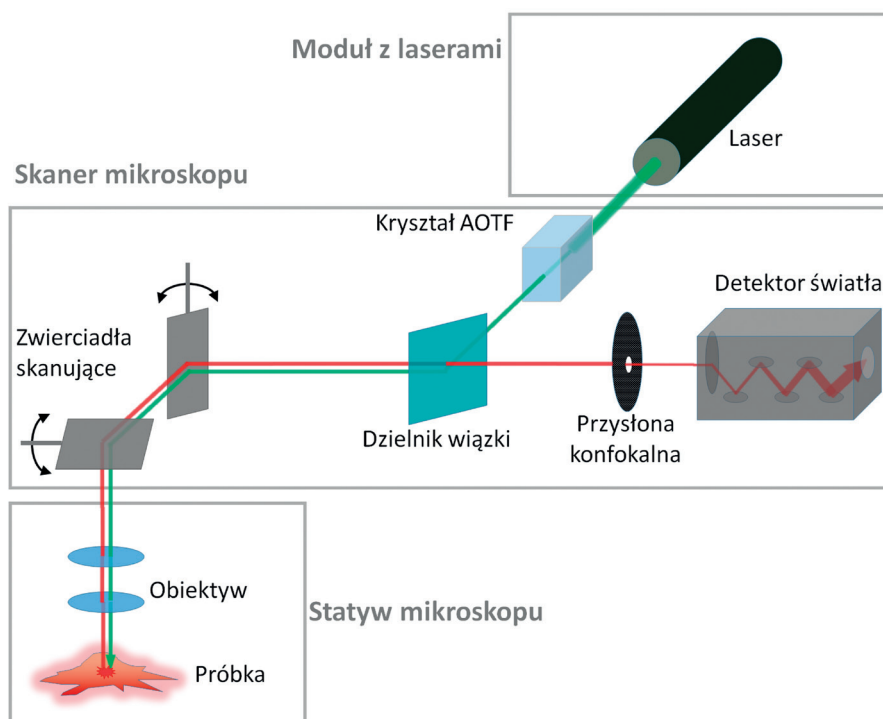
oświetlania próbki oraz zbyt małej mocy obliczeniowej dostępnych wówczas systemów komputerowych do analizy obrazu. Dopiero w 1979 r., krótko po wygaśnięciu patentu Minskiego, Fred Brakenhoff stworzył własną konstrukcję skanującego mikroskopu konfokalnego wykorzystując laser jako źródło światła (BRAKENHOFF i współaut. 1979). Pierwsze komercyjnie dostępne systemy konfokalne pojawiły się w 1987 r. (CLAXTON

i współaut. 2005). Następnie, w latach 90., postępy w optyce i elektronice stworzyły możliwość wykorzystania w mikroskopii konfokalnej laserów o stabilnej, wysokiej mocy, wydajnych zwierciadeł skanujących oraz detektorów o wysokim współczynniku odczytu sygnału do szumu. W tym czasie zaczęło powstawać wiele nowych technik, które mogły być użyte dzięki skanującemu laserowemu mikroskopowi konfokalnemu.

DZIAŁANIE MIKROSKOPU KONFOKALNEGO

Nowoczesne mikroskopy konfokalne zachowały najważniejsze elementy z pierwszego projektu Marvina Minskiego: obecność przysłony konfokalnej oraz punktowe skanowanie próbki. Jeśli chodzi natomiast o różnice, to pierwszy projekt systemu konfokalnego był mikroskopem typu trans, gdzie fala światła wzbudzającego przechodzi przez próbkę, a detekcja fluorescencji odbywa się po jej drugiej stronie (Ryc. 1). Natomiast większość obecnie używanych mikroskopów konfokalnych, to mikroskopy epifluorescencyjne. Oznacza to, że oświetlenie próbki światłem wzbudzającym, jak i obserwacja wyemitowanej fluorescencji zachodzą z tej samej strony próbki (Ryc. 2). W takim mikroskopie obiektyw pełni również rolę kondensora, co znosi potrzebę wzajemnej kalibracji obydwu tych elementów, jak w mikroskopach typu trans. Dodatkową zaletą mikroskopów epifluorescencyjnych jest możliwość badania pod mikroskopem wierzchnich warstw grubszych preparatów, ponieważ światło nie musi przenikać przez całą grubość próbki,

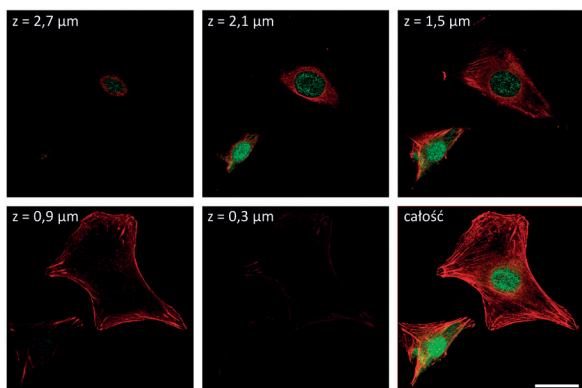
aby dotrzeć do detektora. Kolejną różnicą między pierwszymi i obecnymi systemami konfokalnymi jest sposób skanowania. Marvin Minsky nie chciał wprowadzać ruchomych elementów w ścieżkę optyczną swojego mikroskopu, aby uniknąć potrzeby dodatkowych kalibracji systemu. Skan próbki w płaszczyźnie XY dokonywał się więc poprzez ruch stolika mikroskopowego względem nieruchomej wiązki światła z lampy fluorescencyjnej. Rozwiązanie to miało swoje dobre strony: uzyskiwany obraz mógł być większy niż pole widzenia użytego obiektywu oraz wiązka światła wzbudzającego padała na każdy punkt preparatu pod tym samym kątem, próbka była więc oświetlona w każdym miejscu równomiernie, przez co unikano powstawania aberracji optycznych (SEMWOGERERE i WEEKS 2008). Zalety te nie przysłaniały jednak wad tego systemu związanych z wolną akwizycją obrazu oraz z niebezpieczeństwem przesuwania się próbki podczas ciągłych ruchów stolika mikroskopowego. W nowszych mikroskopach konfokalnych światło emito-



Ryc. 2. Schemat budowy skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego.

wane przez laser przechodzi przez głowicę skanującą składającą się z przynajmniej dwóch, poruszanych za pomocą silników galwanometrycznych, luster. Jedno z nich odchyła wiązkę światła na boki, umożliwiając skan linii w osi X, drugie lustro, poruszające się w pozycji góra-dół, pozwala na skan kolejnych linii z osi Y (Ryc. 2). Jednolite oświetlenie obrazu jest tutaj zapewnione przez obiektywy z korekcją planarną. Nadal również można zobrazować większe powierzchnie za pomocą ruchu zmotoryzowanego stołka mikroskopowego, który już będzie się przesuwiał pomiędzy całymi, sąsiadującymi ze sobą polami widzenia obiektywu. Przy tej metodzie skanowania mikroskop może wykonywać do kilku zdjęć preparatu (w formacie 512×512 pikseli) na sekundę. Prędkość ta może wzrosnąć nawet do kilkudziesięciu zdjęć na sekundę przy wykorzystaniu skanera rezonansowego, w którym lustra w głowicy skanującej, zamiast sterowania silnikami, wibrują ze stałą częstotliwością do 12 000 Hz przesuując z dużą szybkością wiązkę światła lasera po preparacie (DIASPRO i współaut. 2008). Czytelnika zainteresowanego możliwościami mikroskopów konfokalnych w zakresie badania szybkich procesów odsyłam do artykułu Wojciecha Brutkowskiego w tym numerze KOSMOSU.

Podsumowując powyższe rozwiązania, w dzisiejszych skanujących laserowych mikroskopach konfokalnych światło wzbudzające pochodzące z lasera jest kierowane przez optyczny dzielnik wiązek w kierunku preparatu. Następnie wiązka światła jest cyklicznie odchyłana przez zwierciadła skanujące, dzięki czemu po przejściu przez obiektyw oświetla kolejne punkty badanej próbki. Światło fluorescencji wyemitowanej przez wzbudzone fluorochromy na preparacie trafia z powrotem do obiektywu i przechodzi tą samą ścieżką optyczną do dzielnika wiązek. Element ten, którym jest zwykle zwierciadło dichroiczne, odbija światło lasera, a przepuszcza światło fluorescencji pochodzące z badanego materiału (które zgodnie z regułą Stokesa będzie miało większą długość fali niż światło zaabsorbowane przez cząsteczkę). W ten sposób obie te wiązki światła zostają od siebie oddzielone. Światło fluorescencji przechodzi następnie przez jeden z najważniejszych elementów mikroskopu konfokalnego, przysłonę konfokalną (ang. pinhole), znajdującą się na ścieżce optycznej mikroskopu przed detektorem. Pełni ona funkcję filtra przestrzennego przepuszczając jedynie światło pochodzące z płaszczyzny ostrości obiektywu. W ten sposób światło o gorszych parametrach optycznych, wyemitowane przez fluorochro-



Ryc. 3. Obrazy wybranych przekrojów optycznych z różnych poziomów preparatu wykonanych przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5.

Liczby pokazują wysokość danego poziomu nad szkiełkiem nakrywkowym (w osi Z). Ostatnie zdjęcie (w ramce) powstało przez nałożenie wszystkich wykonanych przekrojów optycznych na siebie. Preparat: komórki glejaka C6 z wybarwionym cytoszkieletem aktynowym (barwnik czerwony Alexa 546) oraz wyznakowanym białkiem wiążącym aktynę – kofiliną (barwnik zielony Alexa 488). Skala 20 μm.

my z warstw znajdujących się powyżej i poniżej płaszczyzny fokalnej, nie uczestniczy w procesie tworzenia obrazu. Zmieniając płaszczyznę ostrości preparatu, bądź to ruszając obiektywem, bądź stolikiem mikroskopowym w osi Z, możliwa jest analiza światła pochodzącego z kolejnych poziomów próbki, czyli tworzenie tzw. przekrojów optycznych preparatu. W ten sposób, po zebraniu wystarczającej liczby następujących po sobie przekrojów optycznych, jest możliwe utworzenie rekonstrukcji danego mikroskopijnego obiektu (Ryc. 3). Z powodu wykluczenia przez przyślonę konfokalną większości fluorescencji emitowanej przez preparat, w mikroskopach konfokalnych muszą być stosowane czułe detektory wykrywające światło o niskiej intensywności, a niekiedy nawet pojedyncze fotony światła emitowane przez próbkę. Komercyjnie dostępne systemy stosują zwykle w tym celu fotopowielacze, czyli punktowe detektory, które potrafią szybko rejestrować ciągły strumień światła o zmiennej intensywności,

pochodzący ze skanowanych na preparacie kolejnych punktów. Następnie oprogramowanie komputerowe wiąże czasowo ilość fotonów światła, która dotarła do detektora, z miejscem na preparacie, które było w tym czasie oświetlane przez wiązkę lasera, co pozwala na umieszczenie piksela o danej intensywności w odpowiednim punkcie na siatce tworzącej obraz skanowanego preparatu mikroskopowego. W związku z powyższą procedurą tworzenia obrazu z pojedynczych punktów, w skanującym laserowym mikroskopie konfokalnym użytkownik może widzieć konfokalny obraz jedynie na monitorze komputera sterującego systemem konfokalnym. Aby więc zobaczyć badany preparat w okularach mikroskopowych i ustawić jego właściwą pozycję w osiach X, Y i Z, nadal wykorzystuje się dodatkowe oświetlenie próbki lampą fluorescencyjną (rtęciową lub metalohalogenkową), która jest podłączona do statywu mikroskopu konfokalnego.

ELEMENTY BUDOWY MIKROSKOPU KONFOKALNEGO

ŹRÓDŁO ŚWIATŁA

Jak już zostało wspomniane w poprzednim rozdziale, w mikroskopie konfokalnym do detektora trafia niewielka część światła emitowanego przez preparat. W uzyskaniu jasnego i kontrastującego obrazu badanej próbki kluczowe stają się więc trzy elementy:

- dobra jakość znakowania fluorescencyjnego preparatu,
- wysoka intensywność światła wzbudzającego fluorescencję,
- wysoka czułość detektorów mikroskopu konfokalnego.

Aby spełnić drugi z przedstawionych wymogów uzyskania dobrego obrazu w mikro-

skopie, Marvin Minsky użył w swoim pierwszym mikroskopie konfokalnym cyrkonowej lampy łukowej, będącej mocnym (jak na tamte czasy) źródłem światła dla mikroskopii optycznej. Obecnie w mikroskopach konfokalnych używa się w tym celu laserów, których promieniowanie ma charakterystyczne właściwości, trudne lub wręcz niemożliwe do osiągnięcia w innych typach źródeł światła. Lasery działają na zasadzie wzmocnienia światła przez wymuszoną emisję promieniowania (ang. light amplification by stimulated emission of radiation). Teoretyczne podstawy mechanizmów takiego wzmocnienia światła dał w 1917 r. sam Albert Einstein, a urzeczy-

wistnieniem teorii promieniowania laserowego było zbudowanie w 1960 r. przez Amerykanina Teodora Maimana pierwszego lasera rubinowego (ZIĘTEK 2008).

Światło emitowane przez lasery jest:

- monochromatyczne – promieniowanie o bardzo małej szerokości linii emisyjnej (zwykle jest to jedna długość fali), co równoważone jest bardzo dużą intensywnością światła w wybranym obszarze widma;

- koherentne – fale emitowane przez laser posiadają tę samą fazę, podczas gdy naturalne źródła światła emitują fale o różnych fazach;

- skolimowane – wiązka światła laserowego ma niewielką rozbieżność, którą łatwo utrzymać nawet na dłuższych dystansach (ZIĘTEK 2008).

Poza powyższymi cechami, promieniowanie lasera jest tylko specyficznym rodzajem światła i nie posiada tak szkodliwych cech charakterystycznych dla promieniowania krótkofalowego (jak promieniowanie X czy promieniowanie substancji radioaktywnych).

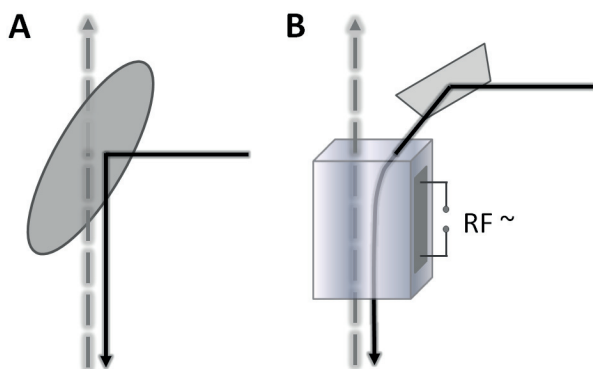
Wszystkie powyższe właściwości lasera sprawiają, że jest to idealne źródło światła do wzbudzania fluorescencji w skanującym mikroskopie konfokalnym. Punktowa wiązka światła laserowego, po przejściu przez obiektyw, oświetla jednorazowo bardzo niewielki obszar o średnicy 0,25 do 0,8 μm (w zależności od apertury numerycznej obiektywu), co podnosi rozdzielczość uzyskiwanego obrazu. W pozostałych źródłach światła nie ma możliwości osiągnięcia takiego stopnia kolimacji wiązki, nawet po zastosowaniu skomplikowanych układów optycznych (CLAXTON i współaut. 2005). Na rynku jest dostępny szereg laserów dla mikroskopów konfokalnych emitujących światło w różnych zakresach widma od ultrafioletu (laser UV 355 nm) do bliskiej podczerwieni (laser LDM 685 nm) (<http://www.lasos.com/products>). Dodatkowo, producenci barwników fluorescencyjnych szybko dopasowują swoją ofertę do istniejących na rynku konfiguracji laserów w systemach konfokalnych. Obecnie wiele badań jest prowadzonych nad rozwojem laserów szerokopasmowych (ang. supercontinuum) emitujących światło o niemal każdej długości fali w zakresie światła widzialnego (stąd są nazywane laserami białymi – ang. white light laser) (MORIOKA i współaut. 1993).

Wiązka światła lasera przechodzi w mikroskopach konfokalnych przez akustooptycznie strojony kryształ (ang. acousto-optic tunable filter, AOTF). Kryształ ten

działa jak elektronicznie strojony filtr wzbudzenia, który nie tylko potrafi przepuszczać jedynie światło lasera o zadanej długości fali, ale jednocześnie może modulować intensywność tego światła. Zmiany w częstotliwości fal akustycznych przechodzących przez dwójłomny kryształ AOTF zmieniają właściwości dyfrakcji tego kryształu, umożliwiając tym samym bardzo szybkie strojenie parametrów wybranych linii lasera. W ten sposób można szybko i płynnie sterować mocą światła lasera skierowanego na preparat, bez potrzeby regulacji ustawień mocy samych laserów (DIASPRO i współaut. 2008). Dzięki temu na skanowanym obrazie preparatu można zdefiniować pola o różnych intensywnościach światła wzbudzającego, co jest szczególnie pomocne przy prowadzeniu eksperymentów z wyświecaniem fluorochromów w wybranym miejscu (ang. fluorescence recovery after photobleaching, FRAP; fluorescence loss in photobleaching, FLIP) lub ich fotoaktywacją (ang. photoactivation, PA).

DZIELNIKI WIĄZEK ŚWIATŁA

W mikroskopach epifluorescencyjnych zarówno wiązka światła wzbudzającego, jak i wiązka światła wyemitowanego przez próbkę przechodzi przez obiektyw. Rodzi to potrzebę rozdzielania przed detektorem tych dwóch strumieni światła, aby móc badać jedynie światło pochodzące z fluorescencji preparatu. W tym celu wykorzystuje się zjawisko przesunięcia Stokesa, które powoduje, że przy konwencjonalnym, jednofotonowym wzbudzeniu fluorochromu, światło emisji fluorescencji ma zawsze dłuższą falę niż światło zaabsorbowane przez daną cząsteczkę barwnika fluorescencyjnego. Dzielnikami wiązek światła w mikroskopach konfokalnych, podobnie jak w zwykłych mikroskopach fluorescencyjnych, są zwykle zwierciadła dichroiczne. Są to elementy optyczne mające za zadanie przepuszczać promieniowanie w wybranych obszarach widma, a odbijać resztę światła (Ryc. 4). Zwierciadła dichroiczne są zbudowane z naprzemiennie ułożonych warstw pokrycia optycznego, które selektywnie wzmacniają wybrane długości fali światła. Technologia nakładania tych warstw jest niezwykle precyzyjna, nakłada się je w próżni, co pozwala na ściśle sterowanie ich grubością oraz liczbą. To natomiast umożliwia produkcję zwierciadeł dichroicznych o zadanych, ściśle określonych właściwościach – od bardzo wąskiego pasma przepuszczalności światła do całkiem szerokiego (RIETDORF



Ryc. 4. Schemat przebiegu wiązki światła wzbudzającego (czarna, ciągła linia) oraz światła emitowanego przez preparat (linia szara, przerywana) przez (A) zwierciadło dichroiczne i (B) kryształ AOBS.

Fale akustyczne o odpowiedniej częstotliwości (RF ~) przechodzące przez kryształ AOBS zmieniają miejscowo jego współczynnik załamania światła i powodują zagięcie wiązki światła wzbudzającego.

i STELZER 2006). Efektywność nowoczesnych zwierciadeł przekraczać może nawet 90%, tj. straty w intensywności światła odbijanego lub przepuszczanego przez ten element optyczny mogą być mniejsze niż 10%. Również dostępne są zwierciadła dichroiczne potrafiące przepuszczać światło nawet z kilku odmiennych barw fluorescencji jednocześnie odbijając pozostałe barwy. (<http://www.chroma.com/products/individual-filters-mirrors/widefield-microscopy/dichroic-mirrors>).

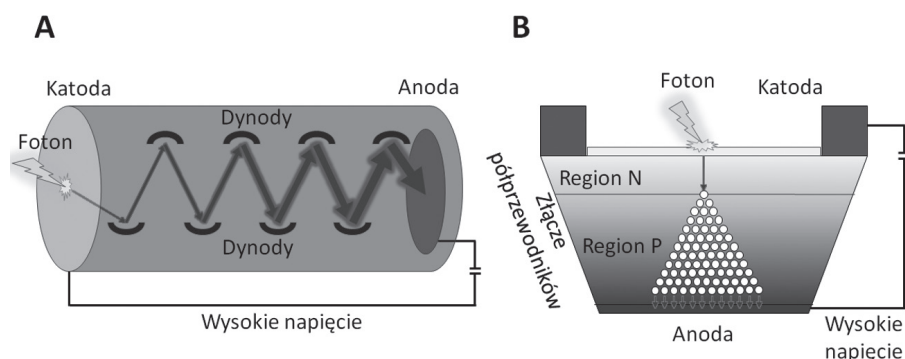
Zupełnie innym rozwiązaniem jest zastosowanie akusto-optycznego dzielnika wiązki światła (ang. acousto optical beam splitter, AOBS), kryształu działającego na podobnych zasadach jak opisywany przy źródłach światła AOTF. W kryształach AOBS fale akustyczne o odpowiedniej częstotliwości zmieniają miejscowo jego współczynnik załamania światła, co powoduje odchylenie wiązki światła wzbudzającego o ściśle określonej długości fali (wiązki światła o szerokości spektralnej 1-3 nm). W ten sposób akusto-optyczny dzielnik może powodować specyficzne odchylenie do 8 różnych wiązek światła laserowego jednocześnie i skierować je w stronę badanej próbki. Fluorescencja emitowana przez próbkę, mająca długość fali inną niż linie monochromatycznego światła wzbudzającego, przechodzi przez kryształ bez ugięcia w stronę detektorów (Ryc. 4). Pojedynczy kryształ

AOBS może służyć do rozdzielania dowolnych kombinacji światła wzbudzającego i emitowanego w zakresie promieniowania widzialnego. Dodatkową zaletą tego rozwiązania jest krótki czas przełączania pomiędzy poszczególnymi ustawieniami dzielnika (mierzone w mikrosekundach) oraz 95% efektywność rozdzielenia światła (RIETDORF i STELZER 2006).

DETEKTORY ŚWIATŁA

Aby wykryć słabe światło emitowane przez fluorochromy z punktu oświetlonego laserem na pojedynczej płaszczyźnie optycznej preparatu, detektory w mikroskopach konfokalnych muszą się odznaczać dużą czułością określaną przez wysoki współczynnik sygnału do szumu (ang. signal to noise ratio). Dostępnym powszechnie stosuje się więc w tym celu fotopowielacze (ang. photomultiplier tube, PMT), wykorzystywane również w czasach Marvina Minskiego.

Fotopowielacz jest urządzeniem, które zamienia strumień fotonów na impulsy elektryczne. Składa się on z fotokatody, z układu dynod oraz z anody. Foton padając na fotokatodę wybija z niej elektron w wyniku zjawiska fotoelektrycznego. Za sprawą przyłożonego wysokiego napięcia pomiędzy elektrodami, elektron jest przyspieszany i uderza o pierwszą dynodę wybijając z niej N elektronów. Następnie tych N elektronów jest przyspieszanych w kierunku drugiej dynody, gdzie każdy z padających elektronów wybija N nowych elektronów. W ten sposób po przejściu układu składającego się z M dynod uzyskamy impuls złożony z N^M elektronów (Ryc. 5). Proces ten jest bardzo szybki – przetwarzanie sygnału w fotopowielaczu zajmuje mniej niż 10^{-9} s (ART 2006). Oprócz rzeczywistego sygnału fotopowielacz generować może również szumy. Przy braku fotonów światła lub przy zwiększaniu napięcia przyłożonego prądu, emitowane są z fotokatody i dynod elektrony tworzące tzw. prąd ciemny. Aby pozbyć się tego szumu, fotopowielacze mogą być chłodzone lub światło wchodzące do fotopowielacza jest poddawane modulacji. W takim przypadku fotopowielacz rejestruje tylko tę część sygnału wyjściowego, która zmienia się z taką samą częstotliwością jak sygnał modulujący wiązkę światła (ART 2006). Dodatkowym elementem brany pod uwagę przy ocenie rejestratorów światła jest ich wydajność kwantowa (ang. quantum efficiency). Jest to stosunek ilości fotonów uderzających o powierzchnię światłoczułą detektora, do wielkości wzbudzonego w tym urządzeniu ła-



Ryc. 5. Schemat budowy i działania punktowych detektorów światła używanych w mikroskopii konfokalnej: (A) fotopowielacza (PMT) i (B) fotodiody lawinowej (APD).

dunku (np. na matrycach CCD) lub do ilości wybitych z tej powierzchni elektronów (np. w omawianych fotopowielaczach). Mimo swoich licznych zalet konwencjonalne fotopowielacze, wyposażone w katody wykonane z metali alkalicznych, posiadają niezbyt wysoką wydajność kwantową wynoszącą około 25%. Współczynnik ten wzrasta do 45% w fotopowielaczach z fotokatodą wykonaną ze stopu arsenku galu i fosforu galu (GaAsP) tworzącą materiał półprzewodnikowy (MIRZOYAN i współaut. 2006).

Na materiałach półprzewodnikowych oparta jest również budowa kolejnych detektorów światła w mikroskopach konfokalnych – fotodiod lawinowych (ang. avalanche photodiode, APD). W fotodiodach światło oświetlające złącze dwóch półprzewodników jest przekształcane na strumień elektronów, analogicznie jak w fotopowielaczach. Następnie, na skutek spolaryzowania złącza półprzewodników przez przyłożone do nich odpowiednie wysokie napięcie, wytwarzane jest pole elektryczne, w którym powstałe fotoelektrony są przyspieszane i powodują wybijanie w materiale kolejnych elektronów, których liczba rośnie lawinowo (Ryc. 5). Pierwotna wiązka elektronów zostaje w ten sposób wzmocniona do kilku milionów razy, w zależności od przyłożonego napięcia. Fotodiody lawinowe, o złączu półprzewodników spolaryzowanym przyłożonym napięciem powyżej 1000 V, pozwalają nawet na wykrywanie pojedynczych fotonów przez detektory SPAD (ang. single-photon avalanche diode) (STERN i COLE 2009). Diody APD, w porówna-

niu z detektorami PMT, cechuje wyższa wydajność kwantowa sięgająca nawet 80%, generują mniejszy szum, rzadziej ulegają uszkodzeniom i wolniej zużywają się podczas użytkowania. Fotopowielacze natomiast potrafią szybciej rejestrować ciągły strumień światła o zmiennej intensywności pochodzący z preparatu i posiadają większy zakres czułości na światło o różnej intensywności, dzięki czemu detektory te, dalej konstruowane według podobnych schematów co w latach 30. XX w., nadal są wykorzystywane w budowie mikroskopów świetlnych (ART 2006).

Ciekawym rozwiązaniem jest połączenie fotopowielacza z półprzewodnikową diodą APD w jeden detektor hybrydowy. Fotony światła uderzając w fotokatodę takiego detektora, dzięki efektowi fotoelektrycznemu wybijają elektrony, które następnie są przyspieszane w polu elektrycznym i uderzają z jeszcze większą energią w fotodiodę. W diodzie następuje dodatkowe lawinowe wzmocnienie sygnału. Detektory hybrydowe zapewniają nie tylko wysoką czułość wykrywania słabego sygnału fluorescencji oraz wykonywanie zdjęć z wysoką rozpiętością tonalną (ang. high dynamic range), co jest domeną fotopowielaczy, ale również zapewniają mniej zaszumiony obraz dzięki użyciu fotodiody, która redukuje występowanie ciemnego prądu (SUYAMA i LARES 2008). Detektory tego typu wymagają dokładnej kalibracji obu elementów składowych oraz są wrażliwe na zakłócenia elektromagnetyczne w otoczeniu mikroskopu (HOLIK i współaut. 2011).

DWUFOTONOWA MIKROSKOPIA KONFOKALNA

Coraz bardziej popularnym rodzajem mikroskopii konfokalnej jest mikroskopia dwufotonowa. Usuwa ona jedną z wad kon-

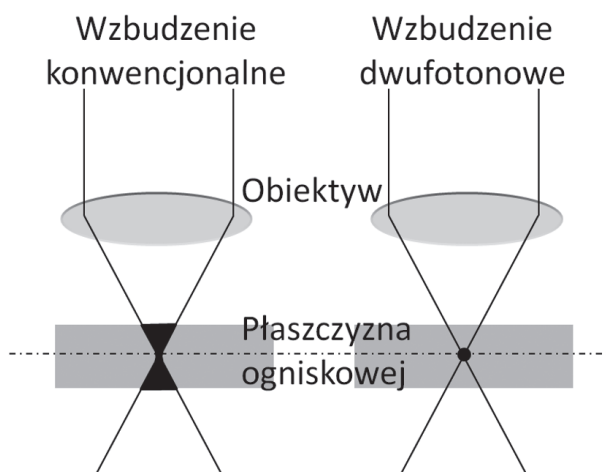
wencjonalnej mikroskopii konfokalnej, gdzie wiązka lasera wzbudza fluorochromy na całej grubości preparatu, a dopiero przysłona

konfokalna przepuszcza do detektora światło pochodzące z pojedynczej płaszczyzny fokalnej obiektywu. Tak więc większość emitowanej przez preparat fluorescencji nie jest wykorzystywana do tworzenia obrazu, a w efekcie wielokrotnie wzbudzone cząsteczki barwników fluorescencyjnych szybciej ulegają wyświeceniu lub uszkodzeniu. W dwufotonowej mikroskopii natomiast wzbudzenie fluorochromów jest ograniczone jedynie do jednej płaszczyzny preparatu o maksymalnej ostrości i tylko stamtąd następuje emisja fluorescencji. Znosi to potrzebę używania przysłony konfokalnej do uzyskiwania przekrojów optycznych badanej próbki, zmniejsza ilość wzbudzeń poszczególnych cząsteczek fluorochromów, co zapobiega ich szybkiemu wyświecaniu.

Dwufotonowa mikroskopia jest oparta na nietypowej metodzie wzbudzania fluorochromów, której teoretyczne podstawy opisała Maria Goeppert-Mayer w swojej pracy doktorskiej w 1931 r. Metoda ta zakłada wzbudzenie cząsteczki nie przy pomocy jednego fotonu światła o właściwej energii, ale za pomocą dwóch fotonów o dwa razy słabszej energii każdy. Aby osiągnąć próg energii wzbudzenia takie dwa fotony muszą dotrzeć do cząsteczki fluorochromu w odstępie mniejszym niż 10^{-16} sekundy, ich energia kumuluje się w cząsteczce i końcowy efekt wzbudzenia oraz późniejsza emisja fluorescencji jest podobna jak przy konwencjonalnej, jednofotonowej ekscytacji (DIASPRO i

współaut. 2006). Prawdopodobieństwo dwufotonowego wzbudzenia cząsteczki w normalnych warunkach jest bardzo małe. Ocenia się, że cząsteczka rodaminy, która w jasnym świetle słonecznym jest wzbudzana pojedynczym fotonem co sekundę, spontanicznie zaabsorbuje w takich warunkach dwa fotony jednocześnie raz na 10 milionów lat! (DENK i SVOBODA 1997). Ponieważ prawdopodobieństwo absorpcji jest proporcjonalne do kwadratu chwilowego natężenia światła, aby wywołać efekt dwufotonowego wzbudzenia w mikroskopii konfokalnej stosowane są piko- lub femtosekundowe lasery generujące krótkie impulsy światła (od 10^{-12} do 10^{-14} sekundy) o bardzo dużej intensywności (DENK i współaut. 2006). Przykładowo, chwilowa moc pojedynczego pulsu lasera MaiTai firmy Spectra Physics może sięgać 180 kW, jednak z uwagi na bardzo krótki czas trwania impulsu światła (10^{-13} s) w stosunku do przerw pomiędzy kolejnymi impulsami (10^{-8} s), średnia moc takiego lasera wynosi „tylko” 2,5 W (http://www.newport.com/Mai-Tai-One-Box-Tunable-Ultrafast-Lasers/368124/1033/info.aspx#tab_Specifications). Dodatkowo, dostateczne zagęszczenie fotonów wokół cząsteczki, dla dwufotonowego wzbudzenia, otrzymuje się dopiero po skupieniu takiego światła laserowego przez obiektyw mikroskopowy o wysokiej aperturze numerycznej. To akurat jest okolicznością sprzyjającą obrazowaniu, ponieważ właśnie dzięki temu wzbudzone są fluorochromy jedynie w najostrzejszej płaszczyźnie fokalnej obiektywu (Ryc. 6). Czytelnika zainteresowanego fenomenem dwufotonowego wzbudzenia odsyłam również do artykułu Bohdana Paterczyka w tym numerze KOSMOSU.

Poza ochroną fluorochromów przed wyświeceniem, główną zaletą mikroskopii dwufotonowej jest możliwość badania grubszych preparatów, np. skrawków tkankowych, niż jest to możliwe w przypadku wykorzystania jednofotonowego wzbudzenia. Spowodowane jest to kilkoma czynnikami. Po pierwsze, światło długofalowe, używane przy dwufotonowym wzbudzeniu, ulega mniejszemu rozproszeniu podczas przechodzenia przez badany materiał (Wzór 2). Według wzoru Rayleigha rozpraszanie (I) jest odwrotnie proporcjonalne do wartości długości fali światła (λ) podniesionej do czwartej potęgi. Przykładowo światło o długości fali 1000 nm cechuje 16 razy mniejsze rozpraszanie, niż światło o długości fali 500 nm, niosące dwa razy większą energię (So i KIM 1998).



Ryc. 6. Porównanie pomiędzy wzbudzeniem konwencjonalnym (jednofotonowym) a dwufotonowym. Schemat przedstawia skupianie promieni światła na preparacie przez soczewkę obiektywu. Na czarno zaznaczono obszar, w którym są wzbudzane fluorochromy.

$$I \propto \frac{1}{\lambda^4} \quad (\text{Wzór 2})$$

Po drugie, w mikroskopii dwufotonowej występuje brak absorpcji światła wzbudzającego poza płaszczyzną ostrości preparatu, przez co większa ilość fotonów światła dociera do płaszczyzny ogniskowej obiektywu, gdzie jest użyta do wzbudzenia właściwych cząsteczek. Trzeci powód, to brak konieczności używania przysłony konfokalnej do eliminacji światła spoza płaszczyzny fokalnej obiektywu. Dzięki temu w mikroskopii dwufotonowej można użyć zewnętrznych detektorów fluorescencji podłączonych bezpośrednio do statywu mikroskopu, a światło pochodzące z preparatu nie zmniejsza swojej intensywności wracając do rejestratora przez kolejne elementy optyczne w mikroskopowym skanerze. Zwiększa to jakość obrazu otrzymywanego ze światła fluorescencji pochodzącego z głębszych warstw preparatu. Za sprawą powyższych cech mikroskopy dwufotonowe mogą wzbudzać fluorochromy i tworzyć obrazy przekrojów optycznych nawet na głębokości powyżej 400 μm w zależności od prze-

rzystości próbki, a więc ponad 5 razy głębiej niż konwencjonalne mikroskopy konfokalne (DIASPRO i SHEPPARD 2002).

Mówiąc o wadach mikroskopii dwufotonowej należy wspomnieć przede wszystkim o konieczności użycia w niej drogich i skomplikowanych laserów piko- lub femtosekundowych, z wodnym chłodzeniem, umieszczonych, ze względów kalibracyjnych, na tej samej ławie optycznej co statyw mikroskopu (DENK i współaut. 2006). Również nie wszystkie preparaty biologiczne nadają się do obrazowania w mikroskopii dwufotonowej. Jeśli próbka jest wyznakowana barwnikiem wzbudzającym światłem podczerwonym lub posiada autofluorescencję w tym zakresie, może się okazać, że niektóre cząsteczki w preparacie będą wzbudzane już pojedynczym fotonem światła z lasera używanego do wzbudzenia dwufotonowego. Biorąc pod uwagę moc impulsu światła takiego lasera, szybko dochodzi wtedy do wyświecenia danego barwnika czy nawet zniszczenia próbki pod wpływem wytworzonej przy ciągłych wzbudzeniach energii cieplnej (Korczyński, niepublikowane).

PODSUMOWANIE – ZALETY I WADY SKANUJĄCEGO LASEROWEGO MIKROSKOPU KONFOKALNEGO

Podsumowując rozdział o skanujących laserowych mikroskopach konfokalnych należałoby podkreślić korzyści, które te urządzenia wnoszą do obrazowania struktur biologicznych, jak również wspomnieć o wadach, które mogą mieć takie systemy. Mikroskopia konfokalna, jako rodzaj mikroskopii fluorescencyjnej, posiada wszystkie zalety jakie daje wykorzystanie barwien fluorescencyjnych w badaniach próbek biologicznych. Barwienia te cechuje wysoka specyficzność oraz dają wysoki kontrast powstających zdjęć. Mogą być one używane również w żywych próbkach. Ponadto sama mikroskopia konfokalna pozwala na obrazowanie w dużo wyższej rozdzielczości przestrzennej niż konwencjonalna szerokopolowa mikroskopia fluorescencyjna. Z jednej strony, jest to spowodowane przez możliwość tworzenia przekrojów optycznych, których grubość może być poniżej 1 μm . Pozwala to na ostre zobrazowanie każdego poziomu preparatu, poprawia rozdzielczość serii obrazów w osi Z, co w konsekwencji umożliwia tworzenie trójwymiarowych rekonstrukcji badanej próbki. Z drugiej strony, skanowanie punk-

towe preparatu polepsza kontrast i rozdzielczość obrazowania w płaszczyźnie XY (CLAXTON i współaut. 2005). Ta ostatnia może schodzić poniżej 35 nm, co nie jest osiągalne przy użyciu innych mikroskopów świetlnych (VICIDOMINI i współaut. 2013). W ten sposób mikroskopy konfokalne wypełniają lukę w zdolności rozdzielczej pomiędzy mikroskopią optyczną a elektronową. Kolejną zaletą skanujących laserowych mikroskopów konfokalnych jest możliwość stosowania dodatkowego, płynnego powiększenia elektronicznego bez konieczności zmiany obiektywu. Powiększenia takie są możliwe dzięki zastosowaniu skanowania wiązką laserową, która może się skupiać na większym lub mniejszym obszarze widocznym w obiektywie, i pozwalają na wykorzystanie maksymalnej możliwej rozdzielczości optyki mikroskopu (CLAXTON i współaut. 2005). Następnie, w mikroskopii konfokalnej można używać szeregu technik fluorescencyjnych, które dzięki analizie parametrów fluorescencji cząstek w próbce, pośrednio pozwalają określić właściwości fizykochemiczne środowiska, w którym fluorochrom się znajduje oraz zbadać procesy,

które tam zachodzą. Wystarczy wymienić w tym miejscu technikę FRET (ang. Förster/fluorescence resonance energy transfer) do badania interakcji pomiędzy fluorescencyjnymi molekułami, techniki FRAP, FLIP i fotoaktywację do badań m.in. wielkości frakcji mobilnych cząsteczek w próbce oraz kierunków ich przestrzennej migracji, czy też techniki FCS (ang. fluorescence correlation spectroscopy) i FCCS (ang. fluorescence cross-correlation spectroscopy), za pomocą których można uzyskać informacje na temat stężenia i dyfuzji ruchomych cząstek w badanej cieczy oraz ich interakcji między sobą. Wspomniany we wstępie pomiar czasu życia fluorescencji w mikroskopie konfokalnym (technika FLIM) pozwala określić, poza interakcjami między cząsteczkami, również stężenie poszczególnych jonów w próbce, koncentrację tlenu cząsteczkowego czy też poziom pH (KORCZYŃSKI i WŁODARCZYK 2009). Czytelnika zainteresowanego tą problematyką odsyłam do bardzo dobrej pracy przeglądowej PAWLEY (2006), jak również do pozostałych artykułów dotyczących badań z użyciem mikroskopii konfokalnej w tym numerze KOSMOSU.

Należy także zwrócić uwagę na wady wynikające z zastosowania mikroskopu konfokalnego, w porównaniu z konwencjonalnym mikroskopem fluorescencyjnym (SEMWOGERE i WEEKS 2008). Pierwszą z nich będzie dłuższy czas zbierania obrazu w skanującym laserowym mikroskopie konfokalnym. Skanowanie preparatu punkt po punkcie, linia po linii, a następnie warstwa po warstwie uniemożliwia natychmiastowe zobaczenie całego badanego obiektu, co można zrobić przy uży-

ciu szerokopółkowych mikroskopów fluorescencyjnych. Jednak coraz szybsze skanery w mikroskopach konfokalnych, w połączeniu z coraz czulszymi detektorami i lepszymi fluorochromami o dużej intensywności świecenia, pozwalają zminimalizować tę wadę. Po drugie, koszty zakupu skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego i jego utrzymanie mogą być nawet o rząd wielkości wyższe od wydatków, które przeznacza się na konwencjonalne mikroskopy fluorescencyjne. Cena jest więc poważnym czynnikiem ograniczającym użycie systemów konfokalnych w małych laboratoriach. Ten problem można rozwiązać dzięki nawiązywaniu współpracy przez mniejsze jednostki badawcze lub za pomocą programów badawczych umożliwiających wspólne używanie jednego, wielozadaniowego mikroskopu konfokalnego.

Rosnące zapotrzebowanie na systemy konfokalne wskazuje, że opisane wady tej mikroskopii nie przysłaniają jej niewątpliwych zalet. W przyszłości mikroskopia konfokalna powinna ewoluować w 3 kierunkach. Z jednej strony takie systemy będą oferować coraz lepszą rozdzielczość konfokalną w trzech wymiarach. Z drugiej, cały proces skanowania trójwymiarowego preparatu będzie coraz krótszy, umożliwiając badanie i rekonstrukcję dynamicznych procesów biologicznych. Trzecim elementem, który jest ciągle udoskonalany w mikroskopach konfokalnych, są coraz czulsze detektory wykrywające sygnał nawet z pojedynczych cząsteczek fluorochromów, przy niskim stężeniu barwnika, bądź przy użyciu małej intensywności światła lasera, bezpiecznej dla żywych komórek.

NOWY WYMIAR MIKROSKOPII – SKANUJĄCY LASEROWY MIKROSKOP KONFOKALNY

Streszczenie

Skanujące laserowe mikroskopy konfokalne są nieocenionym narzędziem dla szerokiego zakresu badań w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych. Mikroskopia konfokalna umożliwia tworzenie cienkich przekrojów optycznych preparatów, żywych lub utrwalonych, co pozwala na dokładniejszą obserwację struktury badanej próbki oraz tworzenie trójwymiarowych (3D) rekonstrukcji obrazu. Funkcja ta jest możliwa dzięki zastosowaniu przysłony konfokalnej, która przepuszcza do detektora jedynie światło pochodzące z płaszczyzny ogniskowej obiektywu, a więc z warstwy, w której powstaje obraz o najlepszych parametrach optycznych. Nowoczesne systemy konfokalne używają laserów, będących punktowymi źródłami światła, do

wzbudzania barwników fluorescencyjnych obecnych w preparacie, oraz punktowych detektorów do analizy wyemitowanej fluorescencji. Ciągłe polepszanie budowy mikroskopów konfokalnych pozwala osiągać: coraz lepszą rozdzielczość tworzonych obrazów (rozdzielczość poniżej 35 nm w osi XY), coraz większą czułość w detekcji światła (wykrywanie nawet pojedynczych fotonów) oraz coraz szybsze tworzenie obrazów badanych próbek (skanowanie z prędkością do kilkudziesięciu przekrojów optycznych na sekundę). Dzięki tym udoskonaleniom skanujące laserowe mikroskopy konfokalne zyskały olbrzymią popularność w środowisku badaczy.

NEW DIMENSION IN MICROSCOPY – LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPE

Summary

Laser scanning confocal microscope is an invaluable tool for a wide range of research in the field of biological and medical sciences. Confocal microscopy allows to create a thin, optical cross-sections of live or fixed specimens. This characteristic allows for a more precise observation of the structure on the examined sample as well as creation of three-dimensional (3D) image reconstruction. This is possible thanks to the confocal aperture (the pinhole), which passes to the detector only light which comes from the focal plane, so from the layer which has the best optical performance. Modern confocal

systems use lasers, which are point-light sources, to excite fluorescent dyes present in the specimen, and point detectors for analysis of the emitted fluorescence. Continuous improvement of confocal microscopes allows to achieve: better resolution of generated images (resolution below 35 nm in the XY axis), greater sensitivity of light detectors (even detection of single photons) and increasingly rapid visualization of samples (scanning speed up to tens images per second). With these enhancements, laser scanning confocal microscopy has gained tremendous popularity in the research community.

LITERATURA

- ART J., 2006. *Photon detectors for confocal microscopy*. [W:] *Handbook of biological confocal microscopy*. PAWLEY J. B. (red.). Springer Science+Business Media, Nowy Jork, 251–264.
- BRAKENHOFF G. J., BLOM P., BAREND S. P., 1979. *Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses*. J. Microsc. 117, 219–232.
- CLAXTON N. S., FELLERS T. J., DAVIDSON M. W., 2005. *Laser scanning confocal microscopy*. <http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf>.
- DENK W., PISTON D. W., WEBB W. W., 2006. *Multi-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy*. [W:] *Handbook of biological confocal microscopy*. PAWLEY J. B. (red.). Springer Science+Business Media, Nowy Jork, 535–549.
- DENK W., SVOBODA K., 1997. *Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick*. Neuron, 18, 351–357.
- DIASPRO A., SHEPPARD C., 2002. *Two-photon microscopy: basic principles and architectures*. [W:] *Confocal and two-photon microscopy foundations, applications and advances*. DIASPRO A. (red.). Wiley-Liss, Inc. Nowy Jork, 39–73.
- DIASPRO A., BIANCHINI P., VICIDOMINI G., FARETTA M., RAMOINO P., USAI C., 2006. *Multi-photon excitation microscopy*. Biomed Eng Online 5, 36–49.
- DIASPRO A., FARETTA M., SAPUPPO P., 2008. *Confocal microscopy*. Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim.
- HOLIK M., KRAUS V., GRANJA C., JAKUBEK J., GEORGIEV V., HROMADKA M., SKALA J., KUBIK M., 2011. *Influence of electromagnetic interference on the analog part of hybrid Pixel detectors*. J Instrum. 6, C12028; doi:10.1088/1748-0221/6/12/C12028.
- KORCZYŃSKI J., WŁODARCZYK J., 2009. *Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) in biological and medical research*. Postepy Biochem. 55, 434–440.
- LEUNG B. O., CHOU K. C., 2011. *Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology*. Appl. Spectrosc. 65, 967–980.
- MINSKY M., 1988. *Memoir on inventing the confocal microscope*. Scanning 10, 128–138.
- MIRZOYAN R., LAATIAOUI M., TESHIMA M., 2006. *Very high quantum efficiency PMTs with bialkali photo-cathode*. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. 567, 230–232.
- MORIOKA T., MORI K., SARUWATARI M., 1993. *More than 100-wavelength-channel picosecond optical pulse generation from single laser source using supercontinuum in optical fibers*. Electron. Lett. 29, 862–864.
- PAWLEY J. B., 2006. *Handbook of biological confocal microscopy*. Springer Science+Business Media, Nowy Jork.
- RIETDORF J., STELZER E. H. K., 2006. *Special optical elements*. [W:] *Handbook of biological confocal microscopy*. PAWLEY J. B. (red.). Springer Science+Business Media, Nowy Jork, 43–58.
- SEMWOGERERE D., WEEKS E., 2008. *Confocal microscopy*. [W:] *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. WNEK G. E., BOWLIN G. L. (red.). Informa Healthcare Inc., Nowy Jork, 705–715.
- SHIMOMURA O., JOHNSON F., SAIGA Y., 1962. *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea*. J. Cell Comp. Physiol. 59, 223–239.
- SO P. T. C., KIM H., 1998. *Two-photon deep tissue ex vivo imaging of mouse dermal and subcutaneous structures*. Opt. Express 3, 339–350.
- STERN G. A., COLE D. C., 2009. *High quantum efficiency, back-illuminated, crystallographically etched, silicon-on-sapphire avalanche photodiode with very wide dynamic range, for manufacturable high resolution imaging arrays*. [W:] *Sensors, cameras, and systems for industrial/scientific applications X*. Bodegom E., Nguyen V. (red.). SPIE-IS&T, San Jose.
- SUYAMA M., LARES M., 2008. *Photomultipliers: Hybrid detector combines PMT and semiconductor-diode technologies*. Laser Focus World 44.
- VICIDOMINI G., SCHÖNLE A., TA H., HAN K. Y., MONERON G., EGGELING C., HELL S. W., 2013. *STED nanoscopy with time-gated detection: theoretical and experimental aspects*. PLoS One 8, e54421; doi: 10.1371/journal.pone.0054421.
- ZIĘTEK B., 2008. *Lasery*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń.