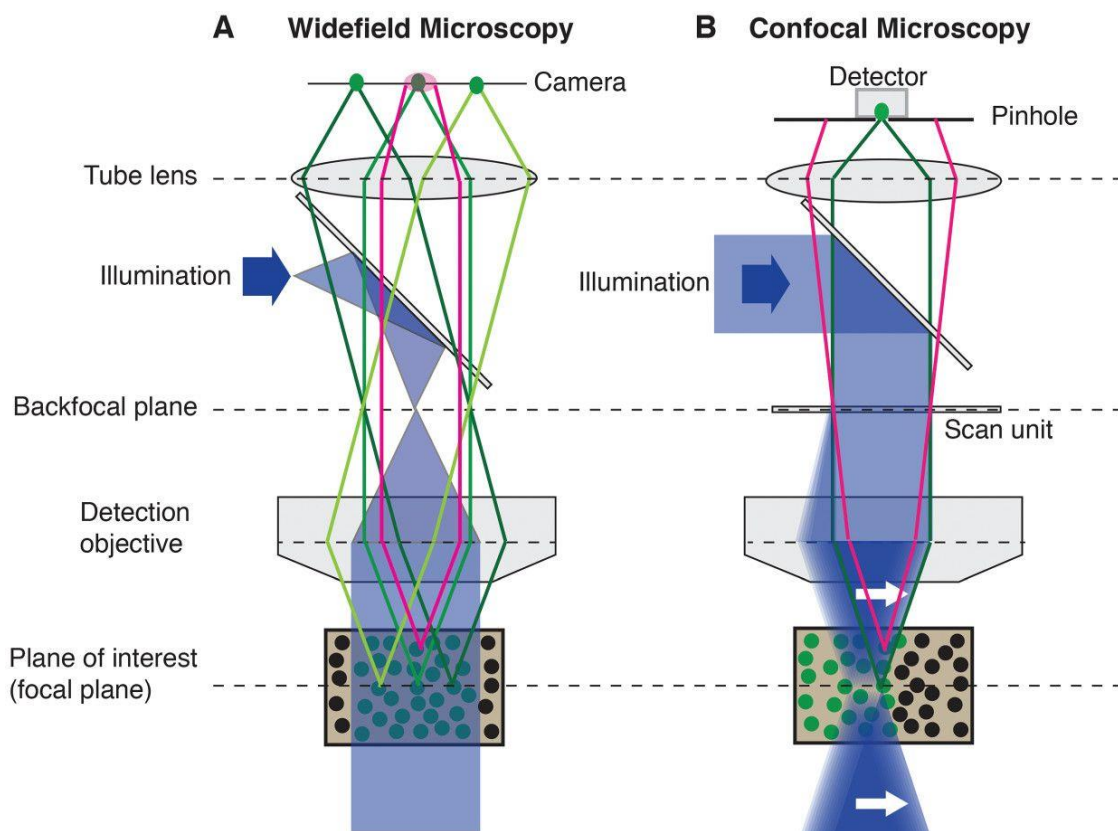


## Konfokální mikroskopie

Světelný mikroskop je zařízení, které se používá k pozorování předmětů menších, než je rozlišovací schopnost oka čili 0,2 mm. Rozlišení světelného mikroskopu je dáno vlnovou délkou světla a numerickou aperturou objektivu (0,2 mm až 0,2  $\mu\text{m}$ ). Mezi nejrozšířenější metody světelné mikroskopie patří metoda světlého pole, metoda temného pole, polarizační mikroskopie či fluorescenční mikroskopie. Všechny tyto metody fungují výborně pro tenké vzorky, kdy světlo vnikající do objektivu pochází pouze ze zaostřené roviny. U tlustších vzorků do objektivu vniká i světlo z rovin které nejsou zaostřené, čímž dochází k výraznému zkreslení. Tento problém řeší konfokální mikroskop. Samotný princip konfokálního mikroskopu je velmi jednoduchý a spočívá v zařazení malého otvoru „pinhole“ těsně před detektor. Díky zařazení pinhole dojde k odfiltrování světla z nezaostřených částí preparátu (Obr. 1). Ideu konfokálního mikroskopu patentoval Marvin Minský v roce 1957, ovšem tenkrát ještě nebyl dostatečně silný zdroj světla pro sestavení takového mikroskopu. To se povedlo až Mojmírovi Petrářovi a Milanu Hadravskému z LF UK v Plzni, kteří v roce 1966 patentovali konfokální mikroskop na principu Nipkowova kotouče, dnes označovaného jako rotující disk. V roce 1973 se David Egger a Robert Galambos z Univerzity v Yale rozhodli nahradit Nipkowův kotouč pohybujícím se zdrojem světla. Tento typ mikroskopu je dnes označován jako laserový rastrovací/skenovací konfokální mikroskop (LSCM).



Obr. 1. Princip konfokálního mikroskopu

Princip rotujícího disku spočívá v soustavě rychle rotujících destiček, na kterých je mnoho vzájemně oddělených clonek, přes které světlo dopadá na preparát. Tento systém umožňuje zobrazovat více bodů najednou, skenování preparátu je tedy mnohem rychlejší než u LSCM (Obr.2).

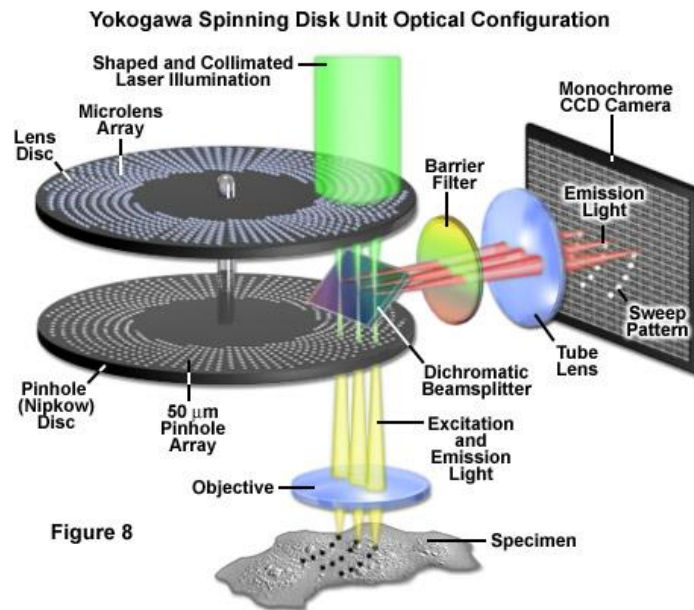
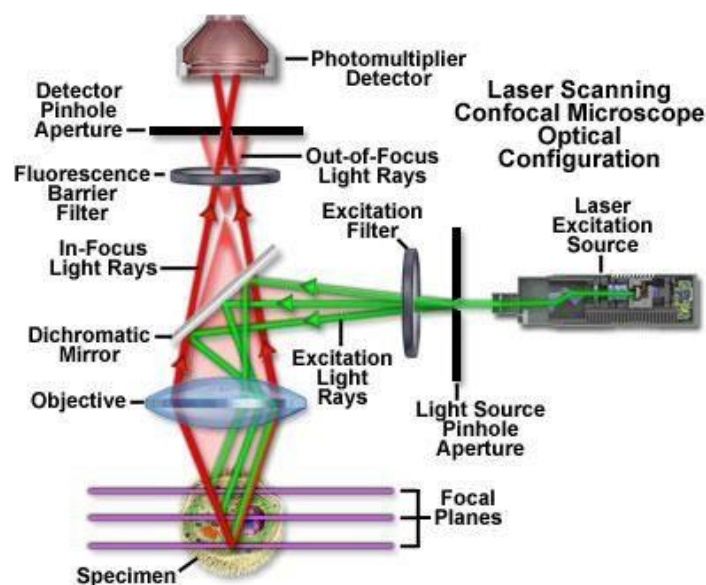


Figure 8

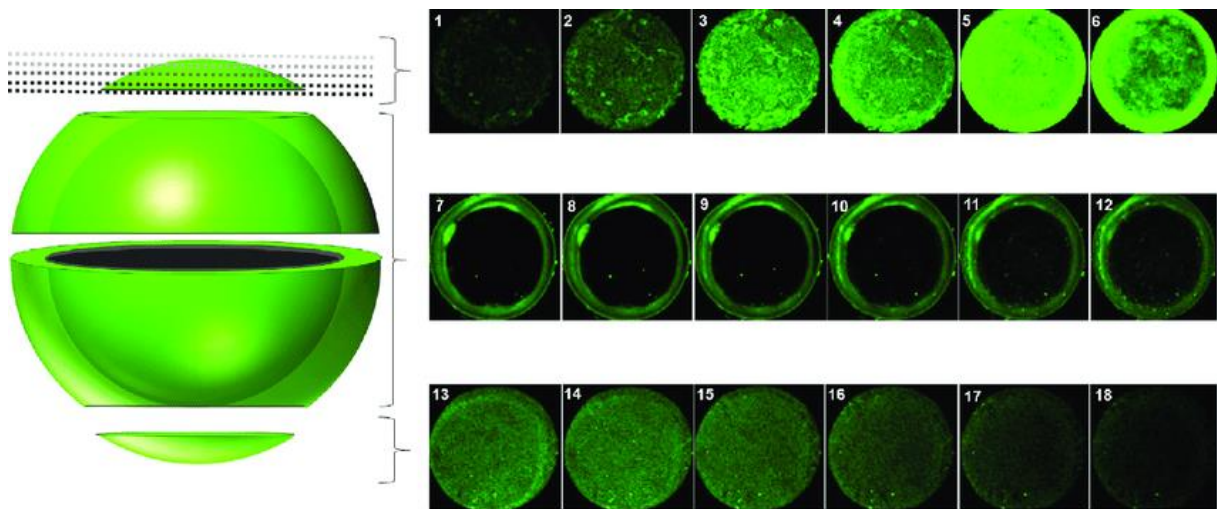
Obr. 2. Schéma rotujícího disku

LSCM využívá jako zdroj světla laserový paprsek, který je přes systém clonek a objektiv zaměřen na pozorovaný preparát, přičemž dochází k osvětlení pouze malého bodu. Preparát je postupně skenován bod po bodu, přičemž se pohybuje buď preparát a zdroj světla je statický, nebo je statický preparát a pohybuje se laserovým paprskem (Obr. 3).



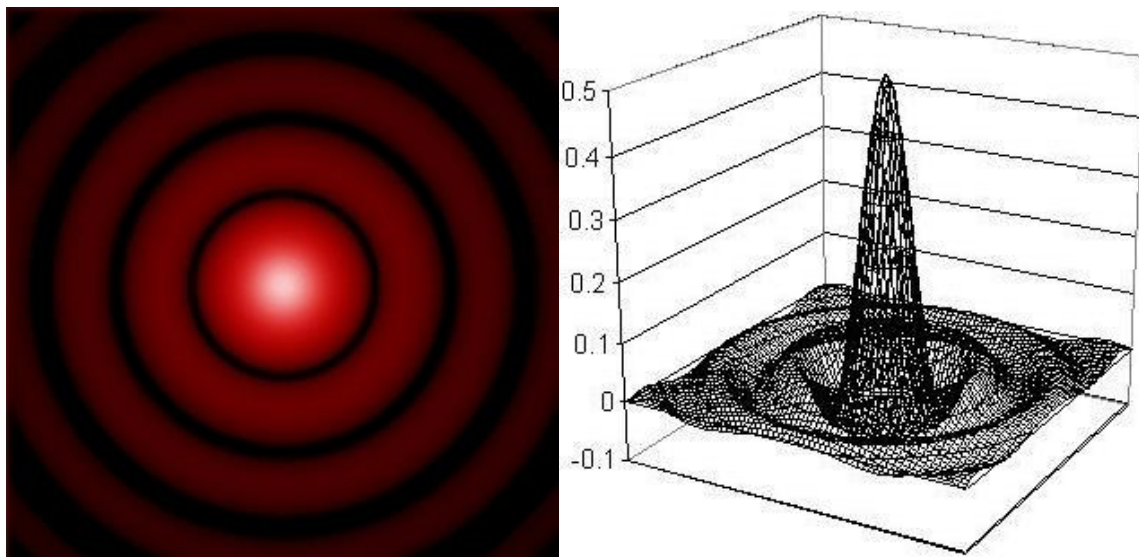
Obr. 3. Schéma skenovacího konfokálního mikroskopu

Díky digitálnímu záznamu obrazu a malé hloubce ostrosti je u konfokální mikroskopie běžnou praxí zaznamenávat takzvané Z-stacky. Jedná se o jednotlivé optické řezy preparátem, ze kterých je následně sestaven 2,5D obraz (Obr. 4).

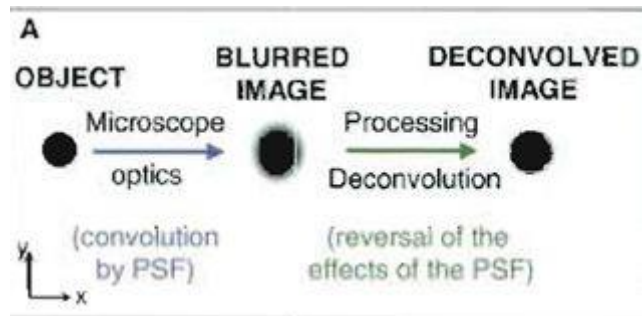


Obr. 4. Z-stack

Při zobrazování bodu dochází k deformaci obrazu, čemuž se říká konvoluce (obr.5). Míru deformace popisuje rozptylová funkce (point spread function), která závisí na parametrech komponent, kterými prochází signál, na indexech lomu a také na použité metodě mikroskopie. Od toho je odvozen pojem dekonvoluce, čili proces, při kterém se pomocí řady matematických algoritmů snažíme co možná nejpřesněji reprodukovat obraz reálného objektu (Obr. 6).



Obr. 5. Struktura do které se vykreslí signál z jednoho bodu vzorku



Obr. 6. Konvoluce a dekonvoluce

V rámci úlohy se seznámte s ovládáním stolního konfokálního mikroskopu Andor BC43, prozkoumejte možnosti pořizování snímků ve fluorescenčním i konfokálním režimu, tvorbu Z-stacku a srovnajte snímky s a bez dekonvoluce. Ve druhé části úlohy prozkoumejte možnosti postprocessingu pořízených snímků pomocí software Imaris.