

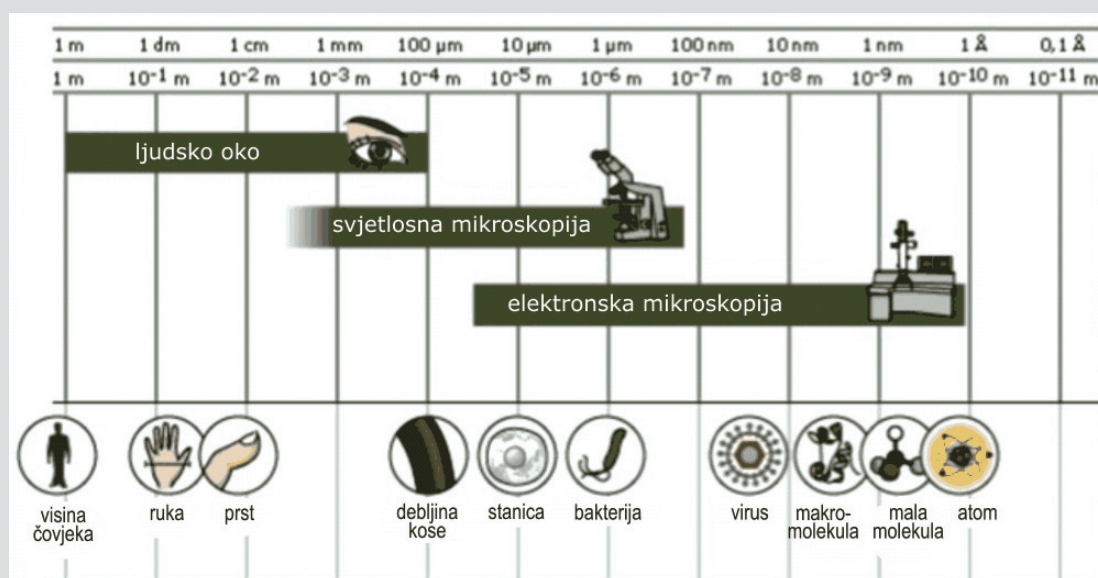
KAKO VIDIMO

nevidljivo?

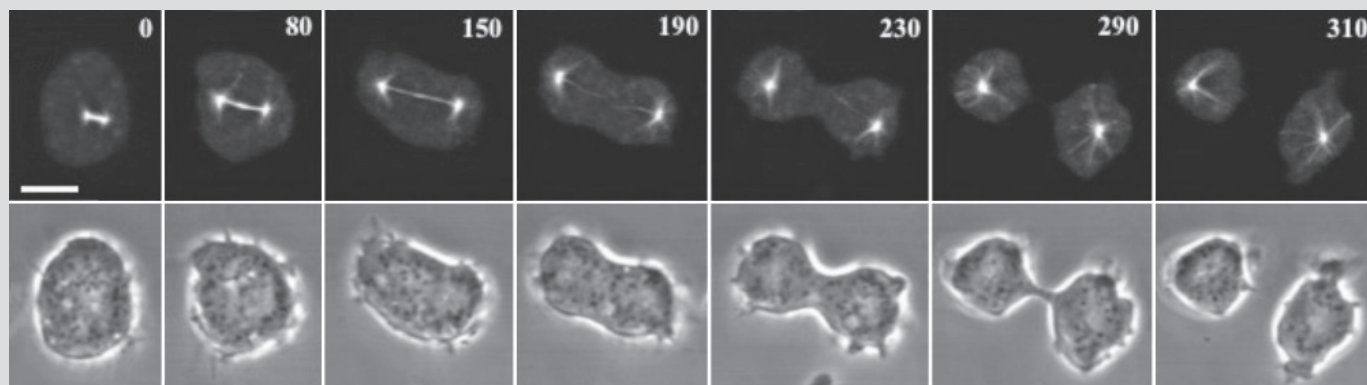
Igor WEBER, Zagreb

Najmanji detalji koje ljudsko oko može razaznati veliki su otprilike desetinku milimetra, što približno odgovara veličini ljudske jajne stanice. Razlog tome leži u optičkim svojstvima malene leće koja se nalazi u oku i izgrađena je od organskog materijala, pretežno od proteina kristalina. Većina stanica od kojih su izgrađeni višestanični organizmi znatno je manjih dimenzija i stoga su nevidljive prostom oku. Poznato je da stanice sadrže još manje dijelove, takozvane organele, koje se nadalje sastoje od makromolekula, a ove u konačnici od pojedinih atoma. Raspon veličina u kojem se nalaze spomenute strukture seže otprilike od desetinke milimetra do desetinke nanometra i time pokriva šest redova veličine (sl. 1). Dobar dojam o međusobnim odnosima veličina u ovom rasponu može se dobiti na mrežnoj stranici sveučilišta Utah: <http://learn.genetics.utah.edu/content/cells/scale/>

Kako i kada su ljudi spoznali postojanje oku nevidljivih osnovnih jedinica žive tvari? Zasluga za to pripada razvoju svjetlosnog mikroskopa u 17. stoljeću i pionirima njegove primjene u biologiji, engleskom znanstveniku Robertu Hookeu i nizozemskom prirodoslovcu Antonieuu van Leeuwenhoeku. Hooke je izradio prve detaljne prikaze građe složenog oka insekata i biljnog tkiva, a na temelju građe tkiva pluta uveo je i pojam stanice (engl. cell) kao osnovnog građevnog elementa biljnog tkiva, što je bio začetak teorije o staničnoj građi svih živih organizama. Nedugo nakon Hookea, zahvaljujući jedinstvenom umijeću izrade leća koje su mogle povećavati više od 250 puta, van Leeuwenhoek je ostvario niz epochalnih otkrića zbog kojih je ostao zapamćen kao »otac mikrobiologije«. Tako je ovaj prirodoslovac-hobist prvi vidio i opisao bakterije, praživotinje, jednostanične alge, stanice kvasca, spermatozoide, poprečno-prugastu strukturu mišićnih vlakana i tok krvi u kapilarama – da spomenemo samo najvažnija otkrića. Zanimljivo je da je Leeuwenhoekovo otkriće mikroorganizama u



Slika 1. Dimenzije struktura dostupnih promatranju pomoću ljudskog oka, svjetlosnih mikroskopa i elektronskih mikroskopa



Slika 2. Slike fluorescentno obilježenih mikrotubula tijekom stanične diobe dobivene pomoću konfokalne mikroskopije prikazane su u gornjem redu. Slike čitave stanice snimljene istodobno pomoću mikroskopije faznog kontrasta prikazane su u donjem redu. Vrijeme proteklo od početka diobe označeno je u sekundama, a oznaka mjerila, bijela horizontalna crtica, odgovara veličini od 10 mikrometara

početku primljeno s nevjericom i podsmjehom u najuglednijim znanstvenim krugovima onog vremena, što pokazuje koliko je postojanje živog svijeta nevidljivog golom oku bilo novo i neshvatljivo tadašnjim proučavateljima prirode.

Srž svakog svjetlosnog mikroskopa čini sustav leća koji omogućuje stvaranje slike u kojoj se mogu razaznati sitni, golom oku nevidljivi detalji u uzorku. Ključna karakteristika svjetlosnih mikroskopa, a i drugih optičkih instrumenata, je dimenzija najmanjih detalja u uzorku koji se pomoću mikroskopa mogu razlučiti, tzv. moć razlučivanja mikroskopa. Što je veličina detalja koji se još mogu razaznati manja, to je moć razlučivanja bolja. Moć razlučivanja ovisi, između ostalog, o valnoj duljini korištene svjetlosti i to je bolja što je valna duljina svjetlosti kraća. Uz optimalne uvjete, najmanje dimenzije detalja razlučivih pomoću standardnih istraživačkih svjetlosnih mikroskopa u praksi iznose oko 250 nanometara. Najnoviji razvoj specijalnih metoda, tzv. superiorno razlučujuće mikroskopije, spustio je ovu granicu još niže, tako da je pod određenim uvjetima moguće razlučiti detalje i desetak puta sitnije od spomenute klasične granice od 250 nm. Za otkriće i razvoj ovih metoda dodijeljena je 2015. godine Nobelova nagrada za kemiju (vidi u I. Weber, Od mikrografije do nanoskopije: 350 godina razvoja svjetlosne mikroskopije, *Priroda* 3, 42–45, 2014.).

Međutim, čak ni ove poboljšane metode svjetlosne mikroskopije nisu dovoljne da bi se proniknulo u strukturu virusa, makromolekulskih kompleksa poput ribosoma, te proteina. U tu svrhu, umjesto vidljivog svjetla trebamo koristiti elektromagnetsko zra-

čenje još manjih valnih duljina. Prema kvantnoj teoriji, elektroni koji se brzo kreću imaju svojstva elektromagnetskog vala s tipičnim valnim duljinama u području pikometara pa se ubrzani elektroni koriste za stvaranje slike uzorka u elektronskim mikroskopima. Ovi mikroskopi mogu razlučiti pojedinačne atome u kristalima, slično kao i metoda difrakcije rentgenskih zraka. Iako ove metode imaju znatno bolju moć razlučivanja od svjetlosne mikroskopije, njihova je primjena ograničena na umrtvljene uzorke. Kada se radi o proučavanju bioloških struktura u njihovom prirodnom stanju i okruženju žive stanice, svjetlosna mikroskopija još uvijek je nezaobilazna.

Dok su pioniri mikroskopije koristili Sunčevu svjetlost za osvjetljavanje promatranih uzoraka, a ono što su vidjeli crtali su rukom na papiru, suvremeni mikroskopi koriste složene sustave osvjetljavanja pomoću lasera i detektore osjetljivije od ljudskog oka. Osim toga, pojedine organele, pa i proteine i ostale makromolekule, moguće je označiti fluorescentnim bojama, što omogućuje proučavanje njihovog smještaja i kretanja unutar stanice (sl. 2.). Posebne metode svjetlosne mikroskopije omogućuju praćenje kretanja i diobe stanica tijekom embrionalnog razvoja, tako da je za neke jednostavne organizme poput valjkastih crvića, nematoda, poznato porijeklo svake pojedinačne stanice u odraslom organizmu, počevši od prve diobe oplodene jajne stanice. Važna pretpostavka za praćenje razvoja ovih jednostavnih životinja njihova je prozirnost, čime je omogućen neometan prolaz svjetlosti kroz više slojeva stanica. Razvojem novih metoda pripreme uzoraka kojima se uklanjaju sastojci koji ih čine neprozirnim, poput lipida, otvara se mogućnost korištenja svjetlosne mikroskopije za stvaranje kompleksnih mapa organa poput mozga malih sisavaca, koji se sastoji od desetaka milijuna stanica.

Možemo zaključiti da su razvoj metoda i primjena svjetlosne mikroskopije u punom zamahu i da ova stara, ali preporođena istraživačka metoda, više od 300 godina nakon Hookea i Leeuwenhoeka, i dalje snažno doprinosi najvažnijim otkrićima u biokemiji i molekularnoj biologiji.

TKO JE AUTOR OVOG ČLANKA?

Dr. sc. Igor Weber je znanstveni savjetnik u Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Objavio je više od 50 znanstvenih i stručnih publikacija iz područja stanične biologije i biofizike, s naglaskom na primjeni svjetlosne mikroskopije i analize mikroskopskih slika u biologiji. Naslovni profesor je na sveučilištima u Zagrebu i Splitu te predsjednik Hrvatskog mikroskopskog društva.