

# Mikroskopia konfokalna w naukach farmaceutycznych

## Confocal microscopy in pharmaceutical sciences

dr KATARZYNA WIKTORSKA  
Pracownia Mikroskopii Konfokalnej,  
Zakład Biologii Komórki,  
Narodowy Instytut Leków



### Streszczenie:

Mikroskopia konfokalna jest metodą badawczą od lat stosowaną z powodzeniem w naukach biologicznych i medycznych. Celem pracy jest przybliżenie zasad tej techniki oraz przegląd zastosowań jej w naukach farmaceutycznych

### Słowa kluczowe:

Mikroskop konfokalny, fluorescencja, mikrokapsułki, uwalnianie, biofilm,

### Summary:

Confocal microscopy is a well known method applied in biological and medicinal research for many years. The aim of the paper is to introduce this techniques as well as its application in pharmaceutical sciences.

### Key words:

Confocal microscopy, fluorescence, microcapsules, release, biofilm.

Zatwierdzono do publikacji: lipiec 2010 r.

## Mikroskopia konfokalna – zasada działania

Od dawien dawna mikroskop służył badaczom do odkrywania świata niewidzialnego gołym okiem. Przez lata urządzenie to ewoluowało tak, aby możliwa była obserwacja coraz mniejszych obiektów.

Mikroskop konfokalny jest kolejną modyfikacją, która otworzyła nowe możliwości przed badaczami z różnych dziedzin nauki. Mikroskop konfokalny w szczególności umożliwia otrzymywanie obrazów o większej rozdzielczości, jednoczesną rejestrację kilku barwników barwiących wybrane struktury wewnątrzkomórkowe oraz uzyskanie trójwymiarowego obrazu oglądanego preparatu bez konieczności jego krojenia i niszczenia. Jedynym warunkiem uzyskania obrazu w mikroskopie konfokalnym jest zastosowanie barwników fluorescencyjnych do znakowania poszu-

kiwanych struktur. W tym mikroskopie widoczne będą tylko te elementy preparatu, które zostały wybarwione. Oczywiście możliwe jest jednoczesne uzyskanie obrazu preparatu w świetle przejściowym (o ile preparat nie jest nieprzezroczysty) tak, by można było zlokalizować poszukiwane elementy w badanym preparacie.

Obraz w mikroskopie konfokalnym uzyskany jest poprzez skanowanie powierzchni preparatu wiązką lasera, która wzbudza fluorescencję barwnika. Zastosowany układ optyczny powoduje, że w danej chwili jest obserwowany tylko cienki „plasterek” oglądanego preparatu, na który w danym momencie nastawiono ostrość. Nie obserwuje się obiektów leżących powyżej ani poniżej tej wybranej warstwy. Powyższe cechy powodują, że obraz w mikroskopie posiada lepszy kontrast i rozdzielczość większą o ponad 30 proc. niż w standardowych mikroskopach świetlnych i fluorescencyjnych. Dodatkowo istnieje możliwość złożenia kolejnych leżących nad sobą warstw i uzyskanie trójwymiarowego obrazu preparatu bez konieczności jego niszczenia. Zaletą mikroskopu konfokalnego jest również możliwość obserwacji warstw leżących stosunkowo głęboko pod powierzchnią ze względu na lepszą penetrację lasera w głębsze warstwy preparatu. W specjalnie skonstruowanych mikroskopach możliwy jest nawet ogląd wybarwionych organów znajdujących się wewnątrz żywych zwierząt [1,2].

## Krótką historia mikroskopii konfokalnej

Mikroskop konfokalny znalazł największe zastosowanie w biologii i medycynie, jednak z czasem zaczęto wykorzystywać jego możliwości w innych dziedzinach, między innymi w farmacji. Idea mikroskopu konfokalnego pojawiła się już

w 1957 roku, jednak dopiero na początku lat osiemdziesiątych urządzenie to stało się komercyjnie dostępne. Początkowo mikroskop konfokalny znalazł zastosowanie głównie w biologii, w szczególności w obrazowaniu komórek zwierzęcych i ludzkich, ale również w badaniach nad tkanką roślinną. Jego zdolność do uzyskiwania obrazów z głębi preparatu wykorzystywano do detekcji zmian zachodzących w tkankach (np. skrawkach pooperacyjnych). Kolejne ulepszenia pozwoliły uzyskiwać obrazy nawet z wnętrza żyjących organizmów jak np. myszy.

W następnych latach zaczęto wykorzystywać mikroskop konfokalny w innych dziedzinach nauki. Pierwsze badania nad jego wykorzystaniem w badaniach farmaceutycznych nastąpiły na początku lat dziewięćdziesiątych. Mikroskop okazał się bardzo użyteczny w badaniach nad strukturą mikrokapsulek oraz strukturą biofilmu i wpływem środków bakteriobójczych na jego powstawanie. Ostatnia dekada przyniosła wiele nowych zastosowań mikroskopu konfokalnego w tych dziedzinach. Na przełomie 2006 i 2007 roku ukazała się obszerna praca przeglądowa podsumowująca zastosowania mikroskopu w farmacji. W tym samym czasie podręczniki omawiające technikę mikroskopii konfokalnej zostały wzbogacone o fragmenty poświęcone zastosowaniu mikroskopu w badaniach biofilmu [2,3].

## Zastosowanie mikroskopii konfokalnej w badaniach nad biofilmem

Biofilm jest zwartą, trójwymiarową strukturą złożoną z kilku – kilkudziesięciu warstw bakterii żyjących w matrycy wydzielanych pozakomórkowych substancji polimerycznych (polisacharydów). Co

ciekawe, komórki bakteryjne w biofilmie posiadają różne specjalizacje i pełnią różne funkcje umożliwiając funkcjonowanie całej strukturze. Biofilm bakteryjny rozwija się na powierzchniach pozostających w kontakcie z wodą. Mogą być to rury kanalizacyjne, przewody, w których utrzymywany jest ciągły przepływ wody np. w instalacjach przemysłowych. Biofilm może również rozwijać się na tkankach takich jak organy wewnętrzne. Obecność biofilmu potwierdzono również na zębach. W lecznictwie poważnym problemem jest rozwijanie się biofilmu na cewnikach, implantach, zastawkach lub niciach chirurgicznych [4].

Biofilm jest poważnym problemem, ponieważ ta skomplikowana struktura bakteryjna jest bardziej oporna na działanie standardowych terapii niż szczepy bakterii wchodzących w jego skład. Nawet zniszczenie wierzchniej warstwy nie gwarantuje, że środek przeciwbakteryjny (antybiotyk, środek dezynfekujący) dotarł do wnętrza biofilmu i zniszczył wszystkie chorobotwórcze drobnoustroje.

Dlatego w przypadku biofilmu ważne jest, aby móc ocenić stan warstw bakterii głębiej położonych. Ponieważ niemożliwe jest rozdzielanie biofilmu na warstwy bez jego zniszczenia a więc zakłócenia naturalnej struktury i stosunku ilości bakterii martwych do bakterii żywych, ocena skutków działania substancji antibakteryjnej w głębszych warstwach jest utrudniona. W tej sytuacji mikroskop konfokalny okazał się być niezastąpionym narzędziem ze względu na możliwość obrazowania głębszych warstw preparatu bez konieczności jego niszczenia.

Rozdzielczość mikroskopu konfokalnego (poniżej 200 nm) pozwala na rozróżnienie pojedynczych bakterii wchodzących w skład biofilmu (ich rozmiar waha się od 200 nm do kilkudziesięciu mikrometrów). Istotne jest również, że mikroskop umożliwia dotarcie do warstw położonych 100 mikrometrów poniżej powierzchni, co odpowiada kilku-kilkudziesięciu warstwom bakterii. Powyższe parametry umożliwiają obrazowanie struktury biofilmu, oczywiście po uprzednim wybarwieniu komórek bakteryjnych barwnikiem fluorescencyjnym [5]. W przypadku, gdy biofilm jest złożony z więcej niż jednego szczepu bakterii możliwe jest rozróżnienie ich za pomocą mikroskopu konfokalnego znakując każdy ze szczepów specyficznymi przeciwciałami. Następnie można określić ich względ-

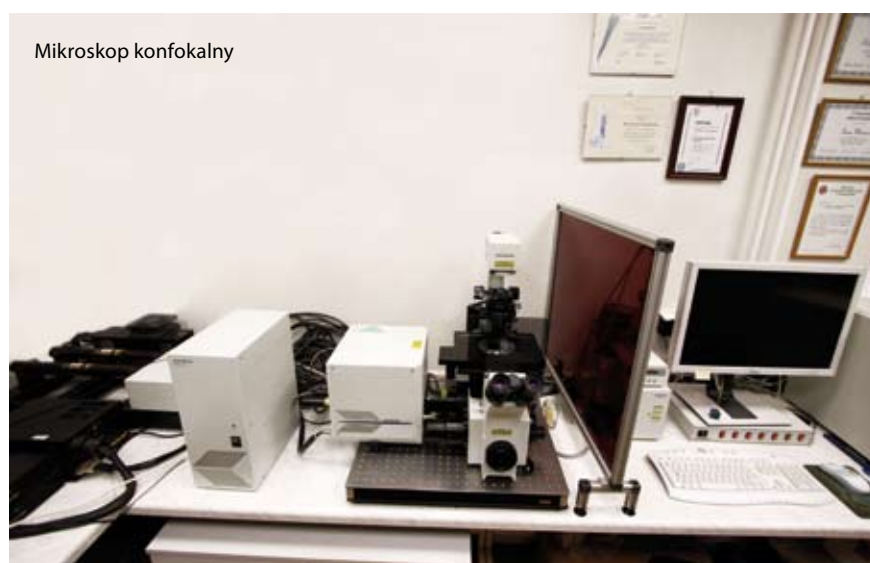
ne położenia w trójwymiarowej strukturze biofilmu.

Wykorzystując mikroskop konfokalny do badania skuteczności substancji przeciwbakteryjnych, konieczne jest zastosowanie dwóch barwników fluorescencyjnych wybiórczo znakujących bakterie żywe i martwe. Komórki martwe znakuje się barwiąc jądro komórkowe barwnikiem, który przenika przez błonę komórkową tylko martwych bakterii. Bakterie żywe można rozpoznawać na kilka sposobów. Pierwszym jest zastosowanie związków fluorescencyjnych barwiących jądro komórkowe, które przenikają tylko przez błonę komórkową żywych bakterii. Innym sposobem jest zastosowanie zwią-

wnętrzu może istnieć zupełnie inny stosunek bakterii żywych do martwych. Zastosowanie mikroskopu konfokalnego pozwala na dokładną ocenę i określenie stopnia działania badanej substancji.

## Mikroskop w badaniach jakości leków i substancji leczniczych

Zastosowanie mikroskopu konfokalnego w farmacji jest najczęstsze w przypadku badań jakości mikrokapsulek. Te małe okrągłe obiekty są stosowane jako system aplikacji leków stabilizujący i przedłużający ich działanie w organizmie. Mikroskop konfokalny z sukcesem stosowano w badaniach struktury mikrokapsułki, jakości



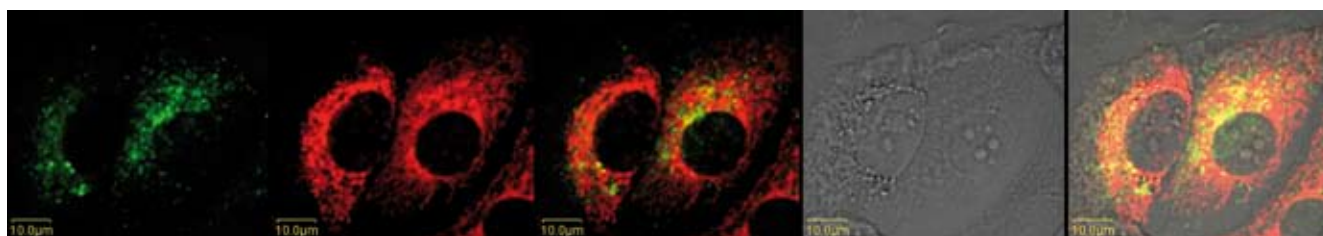
For. K. KALINSKI

ków, które są przekształcane przez enzymy żywych bakterii do fluorescencyjnych metabolitów. Ważne jest, aby barwniki wykorzystane do znakowania martwych bakterii posiadały fluorescencję innego koloru niż barwniki zastosowane do barwienia żywych bakterii. W ten sposób w mikroskopie uzyskać można obraz warstwy złożonej np. z czerwonych punktów odpowiadających martwym bakteriom i punktów zielonych będących żywymi bakteriami. Stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej, a więc ilości bakterii martwych do żywych określa skuteczność zastosowanego preparatu bakteriobójczego [6].

Należy pamiętać, że w przypadku biofilmu ocena tylko jego powierzchni może okazać się myląca w ocenie skuteczności preparatów bakteriobójczych czy bakteriostatyków. Biofilm jest trwałą strukturą, którą trudno zniszczyć, ponieważ warstwy głębiej położone są bardziej odporne na czynniki zewnętrzne. W jego

otoczki oraz w badaniach nad rozmieszczeniem substancji czynnej w mikrokapsułkach mniejszych niż 5 mikrometrów. Ocena mikroskopowa mikrokapsulek może dać odpowiedź na ważne pytanie, czy zastosowane składniki i sposób przygotowania mikrokapsułki prowadzą do wytworzenia produktu o żądanej jakości.

Ważnym aspektem dla poprawnego działania jest jakość otoczki mikrokapsułki. Otoczka wykonana między innymi z polimerów decyduje i umożliwia swobodne dyfundowanie substancji aktywnej do środowiska (organizmu). W procesie wytwarzania mikrokapsułki stosuje się różne technologie wytwarzania, a następnie nakładania otoczki. Niestety w produkcji końcowym mogą pojawić się defekty takie, jak nierówna grubość czy zamknięte wewnątrz pęcherzyki powietrza. Te wady można wykryć w mikroskopie konfokalnym. W tym celu stosuje się szklane mikrokuleczki, na które nanosi się badany materiał otoczki zmieszany z barwnikiem



Komórki MCF-7 wybarwione fluorescencyjnie: kolor zielony – lizosomy (organelle odpowiedzialne za trawienie wewnątrzkomórkowe), kolor czerwony – mitochondria (organelle odpowiedzialne za produkcję energii w komórce). Dołączono obraz uzyskany w świetle przejściowym, na którym widoczna jest lokalizacja wybarwionych organelli w komórce.

fluorescencyjnym w ten sam sposób jak stosowany w wytwarzaniu mikrokapsulek. To umożliwia rejestrację całej otoczki na różnych głębokościach mikrokapsułki. W efekcie końcowym uzyskuje się trójwymiarowy obraz samej otoczki. Na uzyskanym obrazie możliwe jest określenie i zmierzenie grubości otoczki w dowolnym miejscu. Pęcherzyki powietrza będą również widoczne jako puste plamy w obrazie otoczki. Możliwe jest również uzyskanie obrazu otoczki zbudowanej z dwóch substancji poprzez dodanie

trza. Powyższe defekty mogą oczywiście wpłynąć na jakość uwalniania leku [8].

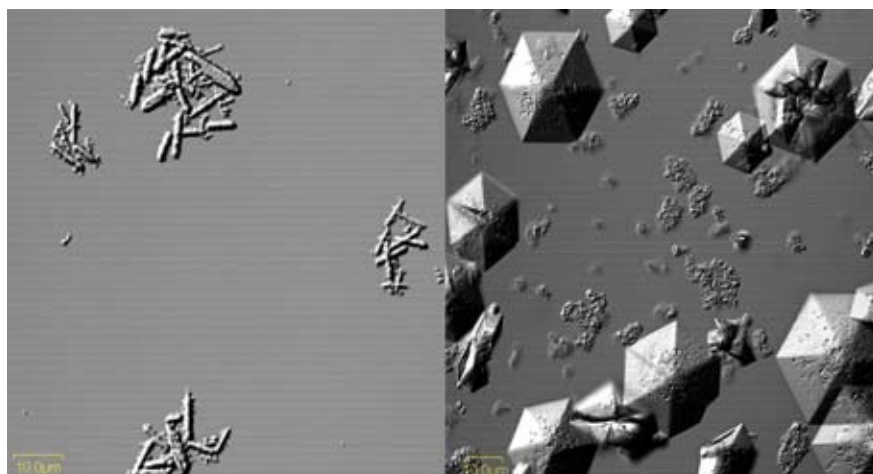
Równie ważnym przykładem zastosowania mikroskopu konfokalnego w badaniach jakości mikrokapsulek jest ocena rozkładu samej substancji czynnej. Niestety, jest to możliwe tylko wtedy, gdy substancja czynna posiada fluorescencję; na szczęście wiele substancji leczniczych spełnia ten warunek. Miedzy innymi ryboflawina, dipiridamol, są związkami, które z łatwością można obserwować w mikroskopie konfokalnym. W badaniach tych

cyjną należy zmieszać z materiałem otoczki. W niektórych przypadkach możliwa jest również ocena powierzchni tabletek wykorzystując zdolność mikroskopu do rejestrowania obrazów w świetle odbitym. W tym przypadku nie jest konieczne stosowanie barwników fluorescencyjnych. Na obrazie mikroskopowym ocenić można gładkość i jednorodność powierzchni, a w przypadku otoczki stopień i jakość pokrycia. Takie badania wykonuje się, aby ocenić jakość otrzymanego produktu, ale również w celu np. określenia jak zmienia się powierzchnia tabletki w trakcie uwalniania substancji czynnej, lub w badaniach stabilności tabletki. Możliwa jest obserwacja np. kryształków substancji czynnej lub pomocniczej, które wykrystalizowały na powierzchni tabletki po przechowywaniu leków w warunkach niewłaściwych lub w przypadku badań stabilności w warunkach przyspieszonego starzenia. Często kryształki te są niewidoczne gołym okiem [9].

Takie badania mają również zastosowanie w ocenie jakości substancji leczniczych, które występują w postaci kryształów. Dla tych substancji można ocenić stopień i jakość krystalizacji. Można również ocenić wygląd ścianek kryształów i występowanie defektów takich jak bruzdy czy pęknięcia. W przypadku, gdy kryształy są przezroczyste dla światła, możliwy jest ogląd preparatu w świetle przejściowym bez konieczności dodawania substancji fluorescencyjnych.

Dzięki zwiększonej rozdzielczości mikroskop może być przydatny w ocenie wyglądu małych kryształów czy cząstek w zawiesinie. Ponieważ obrazy w mikroskopie konfokalnym są rejestrowane cyfrowo, możliwy jest pomiar rozmiarów tych cząsteczek.

Bardzo ciekawym zastosowaniem mikroskopu konfokalnego jest ocena uwalniania substancji czynnej z mikrokapsulek lub filmów do podań przezskórnych. Oczywiście jest to wykonalne wyłącznie, gdy badana substancja czynna posiada fluorescencję. Mikroskop konfokalny umożliwia w czasie rzeczywistym rejestrację fluorescencji



Mikroskopowy obraz insuliny: (lewa) insulina ludzka izofanowa i rozpuszczalna, (prawa) insulina wieprzowa cynkowa krystaliczno-bezpostaciowa

różnych barwników do każdej z nich [7].

Określenie wewnętrznej struktury mikrokapsułki, czyli rozkładu substancji, z których wykonana jest macierz mikrokapsułki, pozwala również stwierdzić czy proces produkcyjny daje w efekcie produkt o określonej jakości. Tu podobnie jak w przypadku otoczki, składowe macierzy miesza się z barwnikami fluorescencyjnymi. W ten sposób można określić przestrzenny rozkład polimerów, z których zbudowana jest mikrokapsułka i określić, czy są one równomiernie wymieszane i nie tworzą agregatów. Badanie wewnętrznej struktury mikrokapsułki pozwala również wykryć, czy w procesie produkcyjnym we wnętrzu mikrokapsułki nie zamknięto pęcherzyków powie-

możliwa jest penetracja do wnętrza mikrokapsułki, czego efektem jest uzyskanie obrazów rozkładu substancji czynnej na różnych głębokościach mikrokapsułki. Takie badania umożliwiają również stwierdzenie, czy w każdej mikrokapsułce ilość substancji czynnej jest taka sama [3].

Mikroskopowe badania wnętrza mikrokapsulek mogą umożliwić ocenę struktury i jakości wypełnienia mikrokapsułki bez konieczności wykonywania bardziej skomplikowanych badań po zakończeniu całkowitego procesu produkcji leku.

Mikroskop konfokalny może dostarczyć również informacji o stanie powierzchni tabletek. W tym wypadku ponownie należy przygotować tabletkę z domieszką substancji fluorescencyjnej, lub w przypadku tabletki powlekannej, substancję fluorescen-



substancji czynnej. Zmniejszanie się natężenia fluorescencji świadczy o zmniejszaniu się stężenia badanej substancji czynnej wewnątrz nośnika (np. mikrokapsułki). Uwalnianie substancji czynnej z nośników takich jak filmy do podań przezskórnych obserwuje się jako stopniowy zanik fluorescencji z części filmu, aż do całkowitego zniknięcia sygnału fluorescencji. Takie badanie może być uzupełnieniem standardowego badania uwalniania substancji czynnej. Zaletą badania mikroskopowego jest możliwość określenia, czy cała substancja lecznicza została uwolniona i czy to uwalnianie odbywa się równomiernie z całej objętości nośnika [10].

Na koniec należy jeszcze wspomnieć o badaniach z pogranicza farmacji i biologii. Oczywiście wydaje się zastosowanie mikroskopu konfokalnego do oceny rozkładu substancji leczniczych w komórkach. Zaobserwowanie fluorescencji pochodzącej z wnętrza komórki potwierdza, że badana substancja wniknęła do komórki. Mikroskopia konfokalna dzięki zastosowaniu jednoczesnego barwienia organelli wewnątrzkomórkowych umożliwia określenie lokalizacji, a więc celów molekularnych badanych substancji leczniczych. Rejestrować można tempo wnikania, jak również szybkość wydalania substancji leczniczych z komórek. Takie badania mają niebagatelne znaczenie w poszukiwaniach i badaniach substancji pomocniczych wspomagających wnikanie leków, wobec których komórki wykazują oporność. Jest to istotne w przypadku leków przeciwnowotworowych jak również antybiotyków. Badania te znajdują również zastosowanie w ocenie sposobu podania leków, np. w przypadku jontoforezy, która może przyspieszyć wnikanie substancji leczniczych w głąb naskórka. W tym przypadku zastosowanie mikroskopu konfokalnego pozwoli ocenić, czy substancja jest obecna nawet w głębszych warstwach tkanki [3].

Poza przytoczonymi tu przykładami mikroskop konfokalny jest stosowany do badania m.in.: rozmiarów kropelek w emulsjach, rozkładu Ph i stężenia jonów w farmaceutykach. Tych zastosowań będzie coraz więcej, ponieważ w przypadku nauk farmaceutycznych mikroskop konfokalny został odkryty stosunkowo niedawno. Bez wątpienia urządzenie to poszerza możliwości badawcze i umożliwia rejestrowanie tego, co jeszcze niedawno nie było możliwe do zaobserwowania.

dr KATARZYNA WIKTORSKA  
wiktorska@il.waw.pl

#### Piśmiennictwo:

1. Dobrucki JW „Skaningowa, fluorescencyjna mikroskopia konfokalna” *Mikrobiologia Medycyna*, 1996, 1: 34-37
2. Handbook of confocal microscopy edited by James Pawlet, 3rd edition, Springer, New York 2006
3. Pygall SR, Whetstone J, Timmins P, Melia CD “Pharmaceutical applications of confocal laser scanning microscopy: The physical characterisation of pharmaceutical systems.” *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59: 1434-1452
4. Pitts B and Stewart P “Confocal Laser Microscopy on Biofilms: successes and limitations.” *Microscopy Today*, 2008, 18-22
5. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE “Optical sectioning of microbial biofilms.” *J Bacteriol*, 1991, 6558-6567
6. Dynes JJ, Lawrence JR, Korber DR, Swerhone GDW, Leppard GG, Hitchcock AP “Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents.” *Can. J. Microbiol*, 2009, 55: 163-178
7. Depypere F, Van Oostveldt, Pieters JG, Dewettinck K “Quantification of microparticle coating quality by confocal laser scanning microscopy (CLSM).” *Eur J Pharm Biopharm* 2009
8. Lamprecht A, Schäfer U, Lehr CM „Structural Analysis of Microparticles by Confocal Laser Scanning Microscopy” *AAPS PharmSciTech*, 2000, 1: article 17
9. Ruotsalainen M, Heinämäki J, Guo H, Laitinen N, Yliruusi J. “A novel technique for imaging film coating defects in the film-core interface and surface of coated tablets.” *Eur J Pharm Biopharm*, 2003, 56: 381-388
10. Guo HX, Heinämäki J, Yliruusi J. “Diffusion of a freely water-soluble drug in aqueous enteric-coated pellets.” *AAPS PharmSci*, 2002, 3: E16

## Choroby rzadkie

Poprawa diagnostyki chorób rzadkich, zapewnienie pacjentom dostępu do wysokospecjalistycznej opieki medycznej oraz pomocy społecznej – to główny cel VIII Wschodnioeuropejskiej Konferencji Chorób Rzadkich, zorganizowanej w Cedzynie koło Kielc przez Stowarzyszenie Chorych na Mukopolisacharydozę i Choroby Rzadkie. Zadania te powinny być realizowane poprzez narodowy program leczenia chorób rzadkich, który zgodnie z rekomendacjami Rady Unii Europejskiej powinien powstać w Polsce do 2013 r. – mówili uczestnicy.

Choroby rzadkie poważnie zagrażają życiu i zdrowiu pacjentów. Większość z nich to schorzenia genetyczne, rzadkie odmiany nowotworów oraz choroby autoimmunologiczne i mukopolisacharydoza. Schorzenia te często dotyczą dzieci, w wielu przypadkach prowadzą do trwałego upośledzenia fizycznego lub umysłowego, a w konsekwencji do śmierci. Niestety, problemem jest to, że nie zawsze lekarze pierwszego kontaktu potrafią chorobę rozpoznać. W Europie mają powstać sieci referencyjne, między którymi będzie dochodzić do wymiany wiedzy specjalistycznej na temat chorób, które mają często ciężki przebieg – lecz wiedza przy małej liczbie pacjentów na ich temat często niewystarczająca. Wymiana doświadczeń ma także wpływać na kształt terapii w krajach Europy Wschodniej, gdzie choroby rzadkie praktycznie nie są leczone. (as)

#### Zasady publikowania artykułów naukowych w „Gazecie Farmaceutycznej”

- Publikowane są artykuły z zakresu farmacji i medycyny
- Prace zgłaszane do druku winny zawierać: cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, wykaz piśmiennictwa
- Prace powinny być zaopatrzone w krótkie streszczenie i zbiór podstawowych słów kluczowych w języku polskim i angielskim
- Objętość pracy nie może przekraczać 20 tys. znaków, łącznie z tabelami, wykresami i piśmiennictwem
- Piśmiennictwo może zawierać co najwyżej 20 pozycji najistotniejszych dla publikowanej pracy, ułożonych wg kolejności cytowań z odpowiednio ponumerowanymi odsyłaczami, zgodnymi z zamieszczonymi w tekście
- Praca (tekst, tabele, rysunki, fotografie) powinna być przesłana w formie elektronicznej, opatrzona następującymi danymi: nazwisko i imię autora, stopień naukowy i stanowisko, miejsce pracy, nr telefonu, e-mail, adres do korespondencji. Ponadto powinna być załączona zgoda na opublikowanie pracy (w wersji elektronicznej i drukowanej) oraz deklaracja dotycząca oryginalności artykułu
- Nadesłane prace recenzowane są anonimowo przez niezależnych ekspertów
- Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzania srodktytułów, niezbędnych poprawek stylistycznych i ew. zmniejszania objętości lub niepublikowania nadesłanych materiałów
- © Gazeta Farmaceutyczna.