

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Bakalářská práce
Mikroskopické metody
The microscopic methods

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D

Klára Osobová

Hradec Králové, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval(a) samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Poděkování

Děkuji paní Mgr. Monice Kuchařové, PhD. za odborné vedení bakalářské práce, za její pomoc, připomínky, poznámky a cenné rady při zpracovávání mé práce.

Obsah

1	Úvod	1
2	Světelný mikroskop	2
2.1	Stavba světelného mikroskopu	2
2.1.1	Optická část světelného mikroskopu	3
2.1.2	Světelná část světelného mikroskopu	3
2.2	Vlastnosti světelného mikroskopu	4
2.2.1	Rozlišovací schopnost a rozlišovací mez	5
2.2.2	Hloubka ostrosti	6
2.3	Optické vady čoček	6
2.3.1	Sférická vada	6
2.3.2	Chromatická (barevná) vada	7
3	Zobrazovací metody ve světelné mikroskopii	8
3.1	Mikroskopie ve světlém poli	8
3.2	Mikroskopie v temném poli	8
3.3	Mikroskopie fázového kontrastu	8
3.3.1	Využití mikroskopie fázového kontrastu	9
3.4	Fluorescenční mikroskopie	9
3.4.1	Využití fluorescenční mikroskopie	9
3.5	Polarizační mikroskopie	11
3.5.1	Využití polarizační mikroskopie	11
3.6	Ultrafialová mikroskopie	12
3.6.1	Využití ultrafialové mikroskopie	12
3.7	Konfokální mikroskopie	13
3.7.1	Laserový rastrovací (skenovací) konfokální mikroskop (LSCM)	13
3.7.2	Konfokální mikroskop s rotujícím diskem (SDCM)	14
3.7.3	Využití konfokální mikroskopie	14
4	Elektronový mikroskop	16
4.1	Transmisní elektronový mikroskop (TEM)	16
4.2	Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)	17
4.3	Elektronové zdroje	18
4.3.1	Wolframová katoda	18
4.3.2	Katody z hexaboritých krystalů	19
4.3.3	Studená autoemisní tryska	19
4.3.4	Tryska Schottkyho typu	19

4.4	Elektronové čočky	19
4.4.1	Sférická vada elektronové čočky	20
4.4.2	Chromatická vada elektronové čočky	20
4.4.3	Astigmatická vada elektronové čočky	20
4.5	Vakuum.....	20
4.6	Interakce elektronů se vzorkem	21
4.6.1	Elasticky rozptýlené elektrony	21
4.6.2	Neelasticky rozptýlené elektrony	22
4.6.3	Sekundární elektrony.....	22
4.6.4	Rentgenové záření	22
4.6.5	Augerovy elektrony.....	22
4.6.6	Katodoluminiscence	22
4.7	Úpravy preparátu	23
4.8	Využití elektronové mikroskopie.....	23
5	Mikroskopie atomárních sil	25
5.1	Části AFM	25
5.2	Dotykový režim	26
5.2.1	Dotykový mód s konstantní silou	26
5.2.2	Dotykový mód s konstantní výškou	26
5.3	Bezdotykový režim.....	26
5.4	Poklepový režim.....	27
5.5	Využití mikroskopie atomárních sil.....	27
5.6	Studování živých buněk	28
5.6.1	Dotykový režim a studování živých buněk.....	30
5.7	Srovnávací mikroskopie	30
6	Závěr	32
	Seznam obrázků	33
	Citovaná literatura	34

1 Úvod

Pomocí mikroskopu byli lidé schopni poprvé pozorovat buňku, bakterie a jiné mikroorganismy. S nástupem elektronového mikroskopu bylo poprvé možné pozorovat vir a detaily buněčných organel. Dnes jsou nedílnou součástí většiny klinických i výzkumných laboratoří. Díky mikroskopům je možné diagnostikovat nepřeberné množství nemocí. S jejich využitím můžeme pozorovat složité procesy v buňkách a studovat mechanismus chorobných procesů při patologických stavech. Existuje mnoho druhů mikroskopů, každý z nich používá k zobrazení vzorku jiný princip. Jednotlivé typy nám poskytnou různé informace o vzorku a každý druh mikroskopu je vhodný pro zkoumání odlišných vlastností preparátu.

V této rešeršní práci se zaměřím na světelný mikroskop, elektronový mikroskop a mikroskopii atomárních sil. Popíšu jednotlivé části mikroskopu a princip funkce jednotlivých mikroskopů i jejich typů a uvedu příklady jejich využití. Budu se věnovat jejich vlastnostem a zmíním se také o limitacích či vadách jednotlivých mikroskopů.

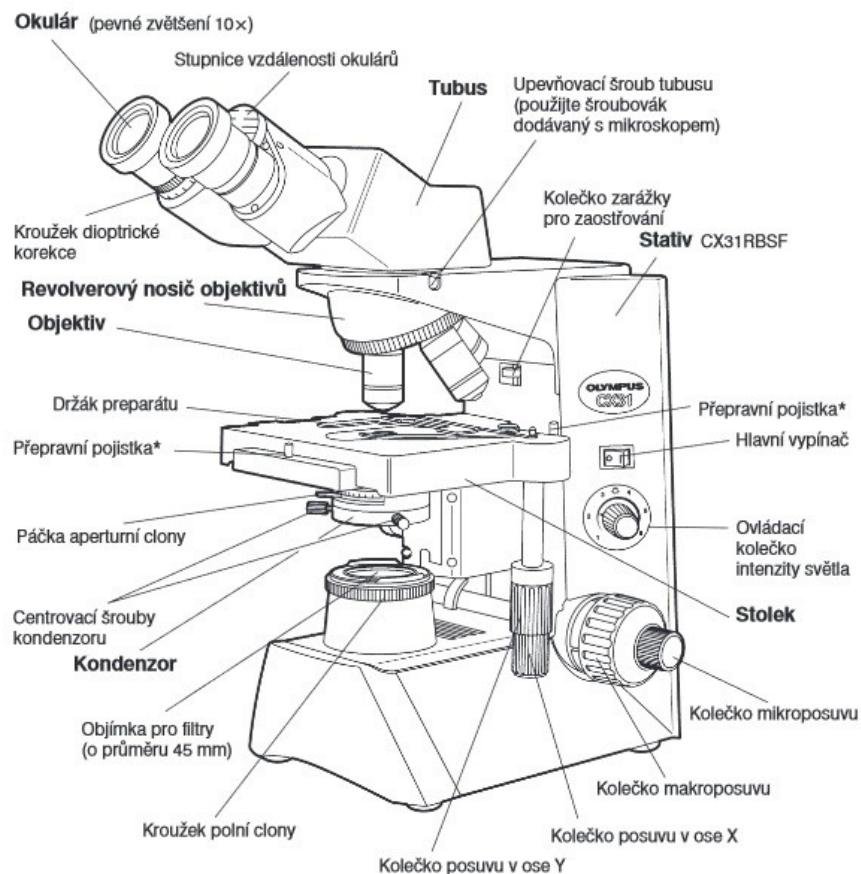
Světelný mikroskop využívá k zobrazení vzorku soustavu skleněných čoček a světlo. Světelné mikroskopy se dělí podle vlastností použitého světla nebo typu osvětlení. V této práci se zmíním o mikroskopii ve světlém i temném poli, mikroskopii fázového kontrastu, fluorescenční mikroskopii, polarizační mikroskopii, ultrafialové mikroskopii a konfokální mikroskopii. Elektronový mikroskop používá k zobrazení vzorku svazek elektronů a elektronové čočky. Oproti světelnému mikroskopu má větší zvětšení, ale neumožňuje pozorování nativních preparátů. Popsala jsem dva typy elektronového mikroskopu, a to transmisní elektronový mikroskop a rastrovací elektronový mikroskop, ty se od sebe liší maximálním možným zvětšením a mechanismem tvoření obrazu. Mikroskopie atomárních sil používá ke studování povrchu vzorku malý hrot upevněný na nosníku. Na hrot působí atomární síly, ty jsou odpuzivé a přitažlivé. Mikroskopie atomárních sil může povrch vzorku skenovat v dotykovém, bezdotykovém nebo v poklepovém režimu.

2 Světelný mikroskop

Světelný mikroskop je nejstarším a nejjednodušším typem mikroskopu. Zdravé lidské oko dokáže od sebe rozlišit dva body vzdálené 0,2 mm, pro pozorování menších struktur je zapotřebí využít mikroskop. Nejběžnějším typem mikroskopu je světelný mikroskop, ten využívá ke zvětšení pozorovaného objektu soustavu čoček a viditelné světlo. Pozorovaný objekt se nám jeví jako zvětšený, převrácený a zdánlivý. (1)

2.1 Stavba světelného mikroskopu

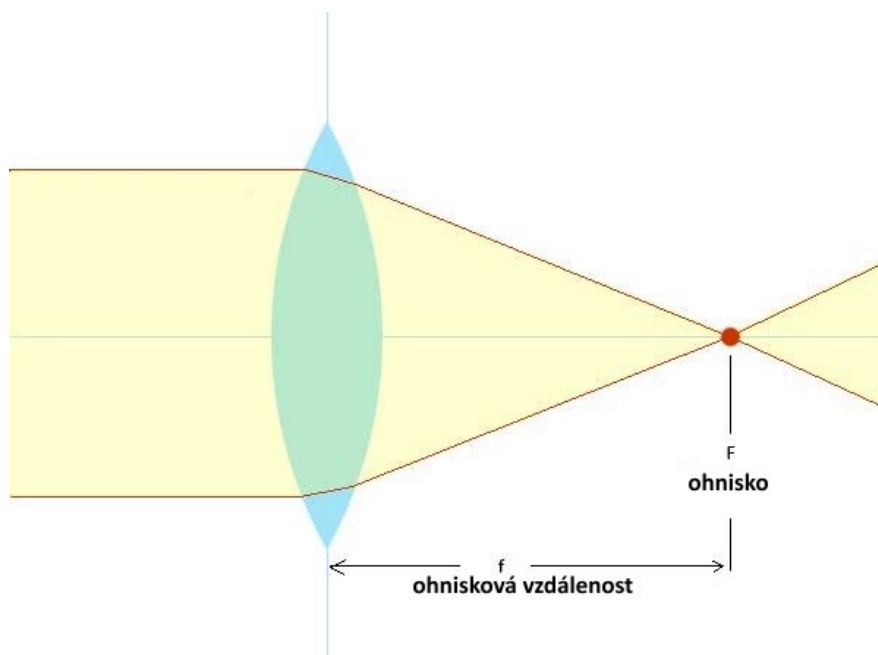
Světelný mikroskop se skládá z mechanické části, optické části a světelné části. Mechanickou část tvoří noha stativu, ta bývá těžká, masivní a zajišťuje světelnému mikroskopu stabilitu. Na samotný stativ je napojena optická a světelná část. Součástí stativu je stolek pro umístění pozorovaného preparátu. Uprostřed stolku je otvor, kterým prochází světlo, a to prosvěcuje preparát. Preparát lze po stolku v horizontální rovině posouvat pomocí posuvných šroubů. Stolek můžeme posouvat i ve vertikálním směru pomocí makro-šroubu a mikro-šroubu. Tímto pohybem můžeme zaostřit na různé struktury v preparátu. Tubus je trubicová část, která spojuje objektiv a okulár. Na konci tubusu se nachází revolverový měnič objektivů obvykle se třemi až čtyřmi objektivy o různém zvětšení. Na obr.1 je schéma světelného mikroskopu. (2; 3)



Obr. 1: Schéma světelného mikroskopu (4)

2.1.1 Optická část světelného mikroskopu

Optickou část tvoří objektiv, okulár a kondenzor. Objektiv je z hlediska optických vlastností nejdůležitější součástí světelného mikroskopu. Tvoří jej několik za sebou řazených čoček, ty dohromady fungují jako spojná čočka. Vzdálenost mezi čočkou a ohniskem se označuje jako ohnisková vzdálenost, ta se u objektivu pohybuje mezi 1,5 až 20 mm. Na obr. 2 je schéma ohniskové vzdálenosti. Zvětšení objektivu může být až 150, od zvětšení 90 se pro mikroskopii musí používat imerzní olej. (2; 3; 5)



Obr. 2: Ohnisková vzdálenost (6)

Preparát musí být umístěn do vzdálenosti větší, než je ohnisková vzdálenost objektivu (f_{ob}), ale menší, než je dvojnásobek této ohniskové vzdálenosti. Obraz vytvořený objektivem je zvětšený, převrácený a skutečný. (5)

Okulár je tvořen soustavou čoček. Pomocí okuláru pozorujeme vzniklý obraz z objektivu jako lupou. Takto vzniklý obraz je zvětšený, převrácený a neskutečný. Ohnisková vzdálenost okuláru se pohybuje od 10 do 50 mm. Zvětšení okuláru je 5 až 25. Okuláry dělíme do dvou hlavních skupin. Pozitivní okulár neboli Ramsdenův má ohniskovou rovinu a clonu zorného pole před okulárem. Ohnisková rovina a clona zorného pole u negativních okulárů (Huygensův okulár) se nachází mezi čočkami. (5)

Kondenzor se nachází za zdrojem světla a slouží k soustředění světelných paprsků na preparát. Kondenzor je tvořen spojnou čočkou, ta nemá vliv na výsledné zvětšení mikroskopu. (5)

2.1.2 Světelná část světelného mikroskopu

Světelná část je tvořena zdrojem světla, irisovou clonou, zrcátkem, případně filtry. Zdrojem světla jsou nejčastěji halogenové žárovky či LED lampy. Pomocí irisové clony lze regulovat šíři paprsků dopadajících na kondenzor. Zrcátko slouží ke směřování paprsku světla ze světelného zdroje do kondenzoru. Mikroskopy se zabudovaným zdrojem světla mají zrcátka vestavěná v podstavci. Rozlišujeme dva základní způsoby

osvětlení preparátu na osvětlení v procházejícím světle a osvětlení v dopadajícím světle. (3; 7)

Osvětlení v procházejícím světle se používá pro osvětlení průhledných a tenkých preparátů. Tento typ osvětlení je nejběžnější a používá se hojně v medicínských a biologických oborech. Zdroj světla se nachází pod stolem s preparátem, světelný paprsek ze zdroje světla prochází kondenzorem, ten soustřeďuje paprsky světla zespoda na preparát, paprsky prochází preparátem do objektivu a následně do okuláru. (8; 9)

Pro zobrazení neprůhledných a tlustých preparátů je vhodné osvětlení v dopadajícím světle. Světlo ze zdroje prochází kondenzorem a clonou a dopadá na polopropustné zrcadlo. Dále paprsky prochází objektivem a dopadají na povrch preparátu. Světlo odražené od preparátu znovu vstupuje do objektivu, prochází polopropustným zrcadlem a je směřováno do okuláru. Mikroskopy s osvětlením v dopadajícím světle se využívají ve strojírenském a elektrotechnickém průmyslu, vhodné jsou i pro studium nerostů. (10)

2.2 Vlastnosti světelného mikroskopu

Čočky použité v objektivu a okuláru mají určité zvětšení. Okulár má nejčastěji zvětšení 10. Mikroskopy mají nejčastěji 3-4 objektivy, každý objektiv má jiné zvětšení. Díky revolverové hlavici si můžeme vybrat, jaký objektiv použijeme. Celkové zvětšení mikroskopu lze vypočítat podle rovnice (1)

$$Z = Z_{ob} \cdot Z_{ok} \quad (1)$$

kde Z je celkové zvětšení, Z_{ob} je zvětšení objektivu a Z_{ok} je zvětšení použitého okuláru. (1; 2; 7)

Celkové zvětšení lze také vypočítat pomocí optického intervalu Δ , což je vzdálenost mezi ohniskem objektivu a ohniskem okuláru. K výpočtu je třeba znát i ohniskovou vzdálenost objektivu a ohniskovou vzdálenost okuláru. Vztah pro výpočet vyjadřuje rovnice (2).

$$Z = \frac{\Delta \cdot d}{f_{ok} \cdot f_{ob}} \quad (2)$$

kde Z je celkové zvětšení, Δ je optický interval, d je konvenční zraková vzdálenost oka, ta je u zdravého oka 250 mm, f_{ob} je ohnisková vzdálenost objektivu a f_{ok} je ohnisková vzdálenost okuláru. (1; 2; 7; 9)

Teoreticky bychom mohli mít světelný mikroskop s neomezeným zvětšením, kdybychom kombinovali okuláry a objektivy s velkým zvětšením. V praxi tomu tak není a maximální užitečné zvětšení světelného mikroskopu je 1500 až 2000. Při větším zvětšení dochází k tzv. prázdnému zvětšení, které nám už neumožní rozlišit další detaily pozorovaného objektu. Při použití prázdného zvětšení dochází k tvorbě artefaktů, které jsou způsobeny optickými vadami. Maximální zvětšení mikroskopu není jediným parametrem, který nám udává kvalitu obrazu. (1; 2; 7)

2.2.1 Rozlišovací schopnost a rozlišovací mez

Důležitým parametrem je rozlišovací schopnost mikroskopu. Rozlišovací schopnost nám udává míru rozlišení v obraze, respektive počet rozlišitelných bodů na jednotku délky. Obecně platí, že čím větší je rozlišovací schopnost přístroje, tím detailnější je pozorovaný obraz. Minimální vzdálenost dvou bodů, které jsme od sebe schopny odlišit se nazývá rozlišovací mez. (1) Následující rovnice (3) vyjadřuje vztah mezi rozlišovací schopností a rozlišovací mezí.

$$R = \frac{1}{d_{min}} \quad (3)$$

kde R je rozlišovací schopnost a d_{min} je rozlišovací mez. Německý fyzik Ernst Karl Abbe zformuloval následující vztah (4) pro výpočet rozlišovací meze mikroskopu

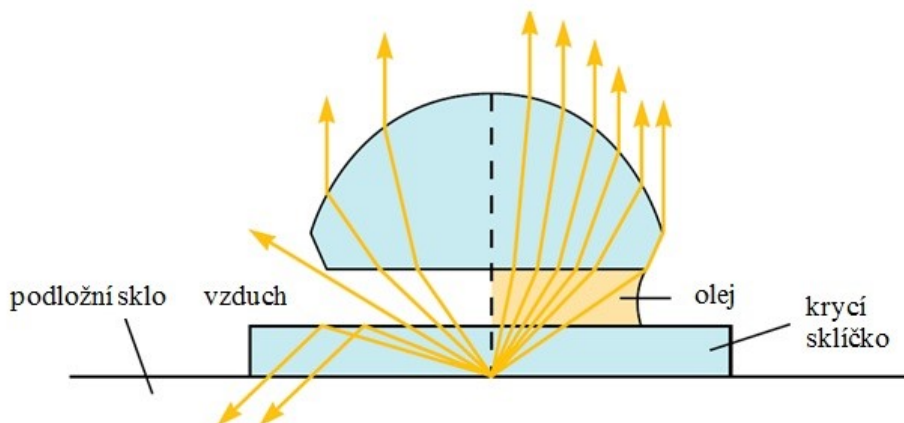
$$d_{min} = \frac{0,612 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha} \quad (4)$$

kde λ je vlnová délka použitého světla, d_{min} je rozlišovací mez, n je index lomu mezi objektivem a preparátem a α je úhel odklonu paprsků od optické osy, které vstupují do objektivu. Ernst Karl Abbe zavedl pojem numerická apertura, tento parametr je uveden na objektivu a jeho hodnota souvisí s rozlišovací mezí. Čím větší je numerická apertura, tím menší je rozlišovací mez a kvalitnější obraz. Vztah pro výpočet numerické apertury vyjadřuje rovnice (5).

$$NA = n \cdot \sin \alpha \quad (5)$$

kde NA je numerická apertura, n je index lomu mezi objektivem a preparátem a α je úhel odklonu paprsků od optické osy, které vstupují do objektivu. (1; 9)

Pokud bychom chtěli zmenšit d_{min} museli bychom zmenšit vlnovou délku použitého světla, což při použití světelného mikroskopu je omezené. Světla o kratší vlnové délce využívá ultrafialová mikroskopie. Nejčastějším způsobem pro zmenšení d_{min} je zvětšení indexu lomu pomocí imerzního oleje. Nejpoužívanější imerzní olej je cedrový olej, ten má index lomu 1,52. Index lomu cedrového oleje je přibližně stejný jako index lomu skla, proto téměř nedochází k lomu světla od kolmice. Bez použití imerze se mezi preparátem a objektivem nachází vzduch s indexem lomu 1, protože sklo má index lomu okolo 1,55 dochází k lomu světla směrem od kolmice, tím pádem do objektivu dopadá méně paprsků, které se na tvorbě obrazu podílí a vzniklý obraz má méně detailů. (7) Na obr.3 je schéma vlivu imerzního oleje na lom světelných paprsků.



Obr. 3: Imerzní olej a lom paprsků (4)

U světelného mikroskopu bez použití imerze může být d_{min} až $0,2 \mu\text{m}$. Toto omezení je dáno vlnovou délkou viditelného světla, která se pohybuje v rozmezí od 390 nm do 790 nm . Není možné rozlišit dva body, které jsou od sebe vzdálené méně, než je polovina vlnové délky použitého světla. (1)

2.2.2 Hloubka ostrosti

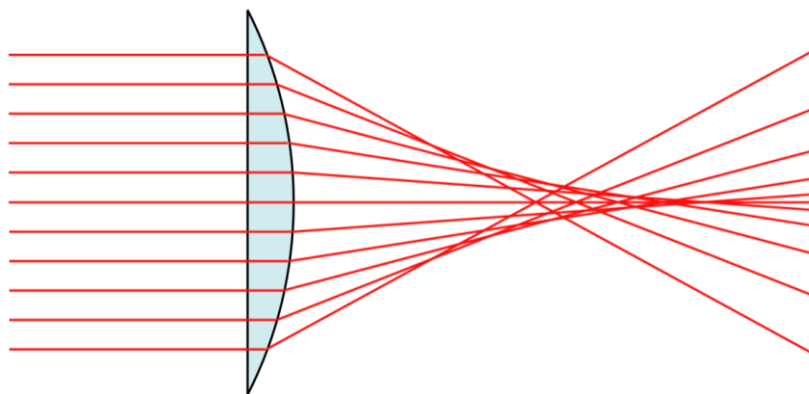
Hloubka ostrosti nám udává tloušťku vrstvy objektu, která je zaostřená. Část preparátu mimo tuto vrstvu je nezaostřená, rozmazaná, nebo ve výsledném obraze není vidět. S rostoucí NA se hloubka ostrosti zužuje. (3; 5)

2.3 Optické vady čoček

Optické vady se začínají vyskytovat se vzrůstajícím zvětšením. Nejvýznamnějšími vadami je sférická vada a chromatická vada. Aby nám tyto vady nekazily kvalitu obrazu, je potřeba provést jejich korekci. (9)

2.3.1 Sférická vada

Sférická vada neboli také otvorová či kulová, vzniká, když paprsky rovnoběžné s optickou osou dopadají na čočku, ale na druhé straně čočky se tyto paprsky nesetkají ve stejném bodě. Paprsky, které jsou více vzdálené od optické osy se protínají blíže k čočce, zatím co paprsky bližší k optické ose se protnou ve větší vzdálenosti od čočky. Průchod paprsků čočkou se sférickou vadou je znázorněn na obr.4.

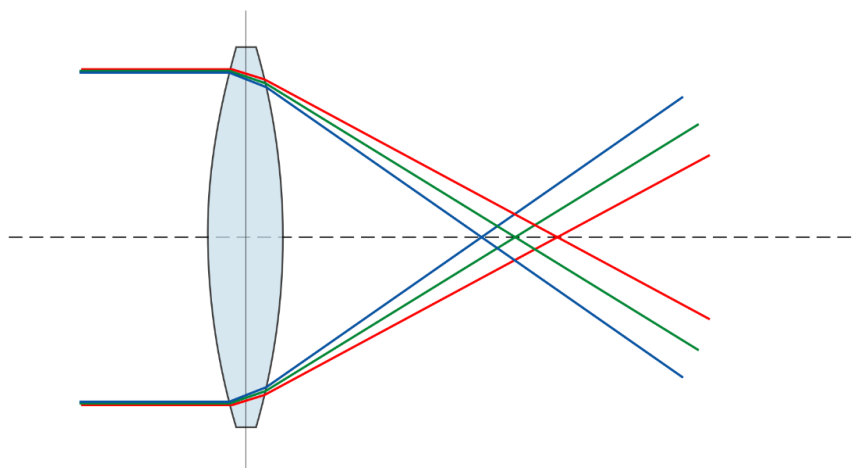


Obr. 4: Sférická vada (11)

Kvůli této vadě se pozorovaný bod na optické ose nejeví jako bod, ale jako rozmazaný kruh. U čoček s větší numerickou aperturou je sférická vada výraznější. Vadu lze korigovat kombinací vhodných spojek a rozptylek nebo použitím clony. (9)

2.3.2 Chromatická (barevná) vada

Vzniká při použití bílého světla, které se po průchodu čočkou rozloží. Index lomu je závislý na vlnové délce světla. Paprsky o různých vlnových délkách se lámou pod jiným úhlem a nesbíhají se v jednom ohnisku, ale vytváří více ohnisek na optické ose. Například fialové světlo, které má nejmenší vlnovou délku, se láme pod větším úhlem než červené světlo. Ohnisko fialového světla se nachází blízko čočky, naopak červené světlo má své ohnisko vzdálenější, jak je znázorněno na následujícím obr.5.



Obr. 5: Chromatická vada čočky (12)

Vlivem chromatické vady vzniká barevné lemování okolo přechodů mezi světlem a stínem. Chromatickou vadu lze korigovat pomocí achromátů nebo apochromátů. Achromáty jsou objektivy, které korigují chromatickou vadu pro modrou a červenou barvu. Apochromáty korigují chromatickou vadu pro tři barvy, a to modrou, červenou a zelenou. (3)

3 Zobrazovací metody ve světelné mikroskopii

Mikroskopem můžeme pozorovat nepřeberné množství preparátů s různou strukturou, konzistencí, světelnými vlastnostmi, tvary buněk a jejich pohyb. Pro tyto různorodé požadavky je možné využít různé metody světelné mikroskopie a typy světelných mikroskopů. (3; 5)

3.1 Mikroskopie ve světlém poli

Patří mezi nejjednodušší a nejzákladnější zobrazovací metodu. Při mikroskopii ve světlém poli prochází paprsky kondenzorem a procházejí preparátem a okolo něj. Použitý preparát musí být průsvitný a tenký. Při použití příliš tlustého preparátu není možné pozorovat detaily na jeho povrchu. Pozorovaný preparát je tmavší než pozadí. To je dáno tím, že se některé paprsky od preparátu odrazí nebo jsou pohlceny a neprojdou objektivem. Pozadí vzniklého obrazu je světlé, tvoří ho paprsky, které neprocházejí preparátem a vstupují přímo do objektivu. Mikroskopie ve světlém poli je nejpoužívanější mikroskopickou technikou. Využívá se k pozorování barvených nebo přirozeně pigmentovaných preparátů. (3; 5; 9)

3.2 Mikroskopie v temném poli

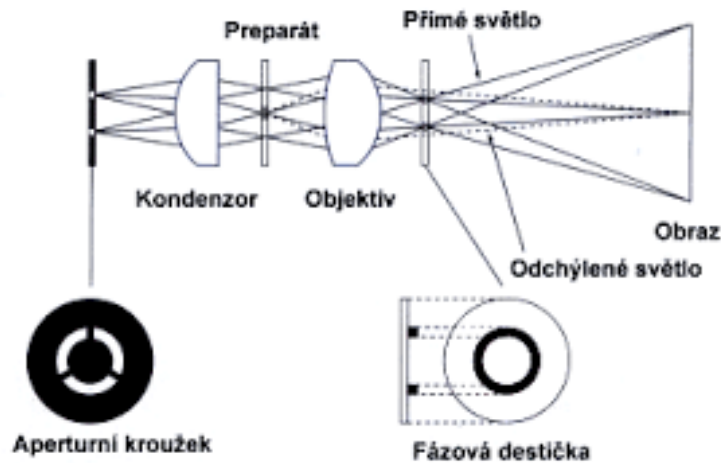
Při použití této metody se nám pozorovaný objekt jeví jako světlý na tmavém pozadí. Obraz vzniká tak, že paprsky, které by přímo vstupovaly z kondenzoru do objektivu jsou zablokovány pomocí clony a při zobrazování preparátu se neuplatňují. Pouze šikmé paprsky světla, které nejsou clonou zablokovány, osvětlují preparát ze stran. Tyto šikmé paprsky se o preparát lámou a odrážejí. Do objektivu tak vstupují jen paprsky, které se od preparátu odrazily nebo se lomily a podílí se tak na tvorbě obrazu. (5)

Mikroskopie v temném poli se využívá k pozorování nativních biologických vzorků. Touto metodou můžeme pozorovat neobarvené preparáty, které by při mikroskopii ve světlém poli splývaly se světlým pozadím. Můžeme tak pozorovat například pohyb nebo tvar bakterií, kvasinek nebo prvoků, které by barvení zahubilo. Proto se tato metoda využívá v bakteriologii a parazitologii. Metoda není vodná k pozorování vnitřních struktur buněk. (3)

3.3 Mikroskopie fázového kontrastu

Mikroskopie fázového kontrastu nám umožňuje zviditelnit struktury, které neabsorbují světlo, ale od svého okolí se liší svým indexem lomu, jsou tedy fázovými objekty. Pokud světlo projde fázovým objektem, dojde ke změně fáze světelné vlny, oproti světlu, které fázovým objektem neprošlo. (5; 9)

Lidské oko není schopno fázové posuny rozeznat. Proto se pro zviditelnění fázového posunu používají fázové destičky, ty mění fázi o $+\pi/2$ nebo $-\pi/2$. Destičky převedou pro nás neviditelný fázový posun na změnu amplitudy, takovou změnu naše oko dokáže zaznamenat jako změnu intenzity světla. Součástí fázového mikroskopu jsou tedy jak fázové destičky, tak aperturní kroužek, oba obsahují prstenčité clony, ty se seřadí tak, aby se v zorném poli překrývaly. Jejich uspořádání v mikroskopu je znázorněno na obr.6. Pro mikroskopii fázového kontrastu se používá monochromatické žlutozelené světlo, protože velikost fázového posunu je závislá na vlnové délce světla. (3)



Obr. 6: Schéma optiky u fázového kontrastu (13)

3.3.1 Využití mikroskopie fázového kontrastu

Tato metoda se využívá při pozorování struktur nativních preparátů. Nativní preparáty jsou nebarvené, nefixované a obsahují živé buňky. V buňkách tak můžeme pozorovat jádro, jadérko, dělení buňky nebo činnost vakuol. Své uplatnění nachází v histologii, kde se využívá k rozlišení jednotlivých struktur, které by se při barvení obarvily podobně. Také se využívá v mikrobiologii pro odlišení pohyblivých a nepohyblivých bakterií. (3; 14)

3.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie využívá schopnosti některých látek po ozáření ultrafialovým (UV) světlem emitovat světlo o delší vlnové délce, které je už viditelné. Pro fluorescenční mikroskopii je zapotřebí použít fluorescenční mikroskop, který pro ozáření preparátu používá UV světlo. Jako zdroj záření se nejčastěji používají xenonové nebo rtuťové výbojky. Okulár je kryt UV filtrem, ten pohltí veškeré zbylé UV světlo, aby nedošlo k poškození zraku pozorovatele. Veškerá optika musí být z křemenného skla, aby nedocházelo k pohlcení UV záření. (8; 9)

Přirozeně má schopnost fluorescence například aminokyselina tryptofan, hem, chlorofylem, vitamín A, kolagen nebo kofaktor NADH (nikotinamidadenindinukleotid). Častěji se ve fluorescenční mikroskopii využívá fluorescenční barvivo tzv. fluorofor s navázanou protilátkou, ta se naváže na příslušné struktury a zviditelní je. Fluorofory s protilátkou mají vysokou specifitu. (3; 5; 7)

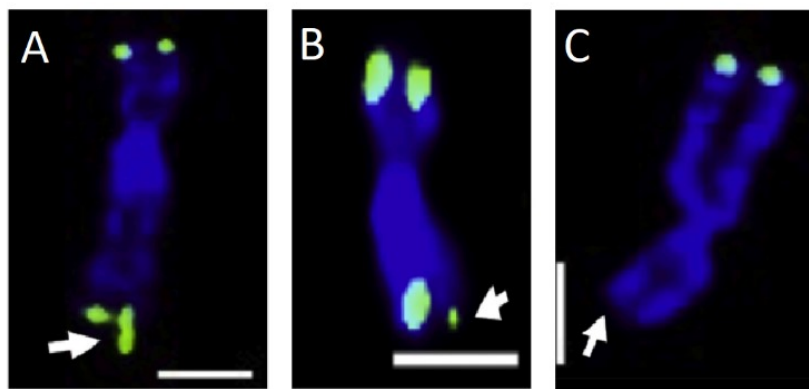
Po ozáření fluoroforu UV zářením dojde k absorpci části energie záření, emitované světlo má menší energii a tím pádem větší vlnovou délku, záření o větší vlnové délce vnímá lidské oko jako barevné. V okuláru vidíme barevné struktury na černém pozadí. Podle použitého fluoroforu může být emitované světlo různě barevné nejčastěji zelené, žluté, modré či červené. (3)

3.4.1 Využití fluorescenční mikroskopie

Tato metoda má významné využití při pozorování různých buněčných struktur, například jader, chromozomů, mikrotubulů, cytoskeletu, proteinů, buněčných stěn, organel, buněčných antigenů a receptorů. V jenom preparátu lze použít více typů

fluoroforů, které emitují světlo o různé vlnové délce, lze tak zvýraznit a barevně odlišit různé buněčné struktury. Můžeme pozorovat jak fixované buňky, tak buňky živé. Touto metodou lze rychle orientačně prokázat přítomnost patogenů v likvoru, sputu či moči. Široké využití má i v imunohistochemii, imunocytologii kde se používají protilátky značené fluoroforem, ty se naváží na požadovaný antigen a po ozáření ho zviditelní. Dále slouží ke studování lokalizace konkrétních proteinů a jejich interakce s ostatními strukturami v buňce. (3; 8)

Pomocí fluorescenčního mikroskopu se vyhodnocují vzorky, které jsou připravené metodou FISH (fluorescence in situ hybridization). Tato metoda využívá úsek DNA značený fluoroforem, který je komplementární k hledanému úseku DNA. Tým N. Adamové použil tuto metodu k označení telomer chromozomů v různě starých buňkách lidského fibroblastu během metafáze. U chromozomů byly pozorovány změny intenzity fluorescence telomer, například ztráta fluorescence jen jedné sesterské telomery nebo obou telomer, jejich zdvojení, zeslabení, zesílení nebo úplné vymizení. Na obr.7 můžeme vidět zdvojení telomery (A), zeslabení telomery (B) a vymizení fluorescence na jednom konci obou sesterských chromatid (C).

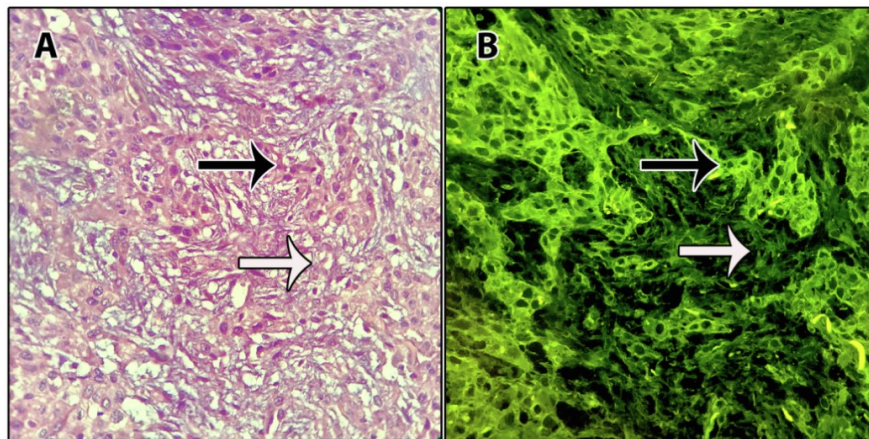


Obr. 7: Změny fluorescence telomer (15)

Tyto změny byly zaznamenány u všech buněk, u mladších buněk se ale vyskytovaly méně než u starších buněk. Nevýhodou této metody je, že nelze odlišit, jestli vymizení fluorescence je způsobeno nepřítomností telomery nebo změnou sekvence nukleotidů v telomeře, protože použité DNA značené fluoroforem se váže pouze na určitou sekvenci nukleotidů. (15)

Fluorescenční mikroskopie najde své uplatnění i v histopatologii. Histologické preparáty se běžně barví hematoxylin-eosinem a pozorují se pod světelným mikroskopem. Buňky spinocelulárního karcinomu dutiny ústní může být v některých případech složité odlišit od okolní pojivové tkáně. Tkáň karcinomu obarvená hematoxylin-eosinem byla týmem A. Rossiho pozorována fluorescenčním mikroskopem se zeleným excitačním filtrem, eosin totiž emituje světlo o vlnové délce 550 nm, což odpovídá zelené barvě. Bylo zjištěno, že se barvivo lépe uchytlí na místech, kde se nachází spinocelulární karcinom, tato místa jsou na snímku jasně zelená. Pojivová tkáň se obarví méně, proto je méně výrazná. Takto lze odlišit buňky pojivové tkáně od buněk spinocelulárního karcinomu. Na obr.8 můžeme vidět obarvenou tkáň zobrazenou pomocí světelného mikroskopu (A) a fluorescenčního

mikroskopu (B). Bílé šipky ukazují na pojivovou tkáň a černé šipky na tkáň spinocelulárního karcinomu. (16) Stejná metoda byla využita ke studování jater, sleziny, elastických vláken, zubů a jejich závěsného aparátu. (17)



Obr.8: Spinocelulární karcinom (16)

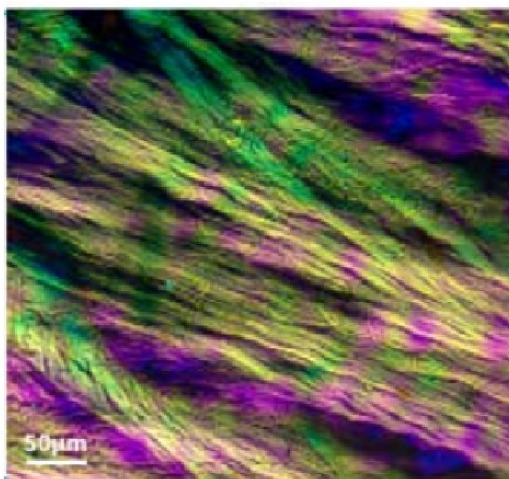
3.5 Polarizační mikroskopie

Polarizační mikroskopie kombinuje světelnou mikroskopii a polarimetrii. Stejně jako v polarimetrii tak i v polarizační mikroskopii se používá polarizované světlo, tedy světlo, které kmitá jen v jedné rovině. Světlo polarizované prvním polarizačním filtrem dopadá na preparát, pokud je preparát anizotropní dochází k dvojlomu. Paprsky vzniklé dvojlomem kmitají oproti původnímu světlu v jiné rovině a prochází druhým polarizačním filtrem, který propouští pouze světlo kmitající kolmo na první polarizační filtr. Polarizované světlo, které neprošlo preparátem je druhým polarizačním filtrem pohlceno. Druhým polarizačním filtrem prochází jen světlo, jehož rovina kmitání byla změněna interakcí s preparátem a je zaznamenáno detektorem. (3; 5; 7)

3.5.1 Využití polarizační mikroskopie

Polarizační mikroskopii lze využít ke studování anizotropních systémů, jako je například cytoplazma, krystaly, buněčná stěna, škrobové zrno, kolagenové vlákno, zuby nebo příčně pruhovaný sval. (3; 5; 7)

Pomocí polarizační mikroskopie lze pozorovat v synoviální tekutině urátové krystaly, ty se v ní ukládají v důsledku dny. Na základě odlišných polarizačních vlastností je možné odlišit urátové krystaly od krystalů kalciumpyrofosfátu, které způsobují pseudodnu. Polarizační mikroskopie slouží také k diagnostice amyloidózy a k průkazu oxidu křemičitého ve tkáni u silikózy. (18) Tým B. Yanga použil polarizační mikroskopie k zkoumání kolagenu papily zrakového nervu ovce. Kolagení vlákna se stejnou orientací jsou polarizačním mikroskopem zobrazena stejnou barvou. Zkoumal vzájemnou orientaci jednotlivých kolagenových vláken. Vlákna vzdálená od středu papily se sbíhají do svazků a mají stejnou orientaci. Na snímku 9 je znázorněna orientace vláken kolagenu papily zrakového nervu. Nervová tkáň téměř nemění polarizaci světla, proto je na snímku nevýrazná. (19)



Obr. 9: Orientace kolagenu (19)

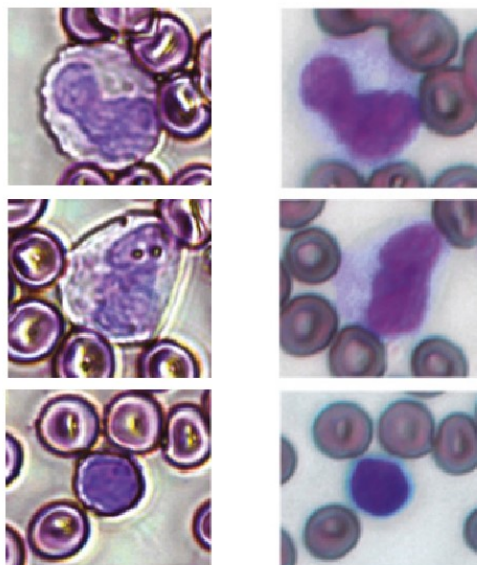
3.6 Ultrafialová mikroskopie

V ultrafialové mikroskopii se jako zdroj světla používá UV záření, veškerá optika musí být z křemenného skla, aby UV záření nebylo pohlcováno. Díky menší vlnové délce má UV mikroskopie lepší rozlišovací schopnost než světelná mikroskopie. Na UV záření ale není lidské oko citlivé, proto UV záření musí snímat kamera, ta převede UV záření na viditelné světlo. Pro zachycení obrazu lze také použít fotografický papír. (5)

3.6.1 Využití ultrafialové mikroskopie

Tým A. Ojaghiho použil ultrafialovou mikroskopii k zobrazení krevních elementů v nátěru periferní krve i kostní dřeně. Pro zobrazení krevních elementů v nátěru se rutinně preparáty barví Pappenheimovým barvením a pozorují se pod světelným mikroskopem. Barvení zabere zhruba 30 minut, pokud není provedeno správně, může preparát obsahovat různé artefakty, které znesnadní jeho hodnocení. Při hodnocení preparátu ultrafialovou mikroskopii se preparát nemusí barvit, stačí pouze zhotovit nátěr a ten nechat zaschnout. Ultrafialová mikroskopie k zobrazení postupně použije světlo o různých vlnových délkách. Světlo o vlnové délce 260 nm je nejvíce pohlcováno nukleovými kyselinami v jádře buňky, buněčné proteiny pohlcují nejvíce světlo o vlnové délce 280 nm, světlo o vlnové délce 300 nm není výrazně pohlcováno žádnou endogenní molekulou, slouží tedy k úpravě kontrastu. Snímky o těchto vlnových délkách vyhodnocuje počítač a na základě vlnové délky a absorpance přiřadí krevním elementům barvu, tento proces se označuje jako pseudobarvení. Barvy jsou volené tak, aby výsledný obraz co nejvíce připomínal Pappenheimovo barvení. Vzniklý obraz nám umožňuje rozlišit jednotlivé typy leukocytů a jejich vývojové řady. U erytrocytů můžeme hodnotit jejich vývojová stádia, morfologii a obsah hemoglobinu. Trombocyty jsou snadno odlišitelné od různých nečistot, které se v nátěru mohou vyskytovat. Krevní nátěr tedy není třeba barvit, což ušetří čas i reagenty, proto je tato metoda vhodná pro statimové vzorky. Buňky jsou ultrafialovému záření vystaveny jen krátce, a tak nedochází k jejich výraznému poškození. V levém sloupci obr.10 jsou krevní elementy zobrazeny pomocí UV mikroskopie a dobarveny pseudobarvením, v pravém

sloupci jsou krevní elementy, které byly obarveny Pappenheimovým barvením a pozorovány pod světelným mikroskopem. (20)



Obr. 10: Krevní elementy (20)

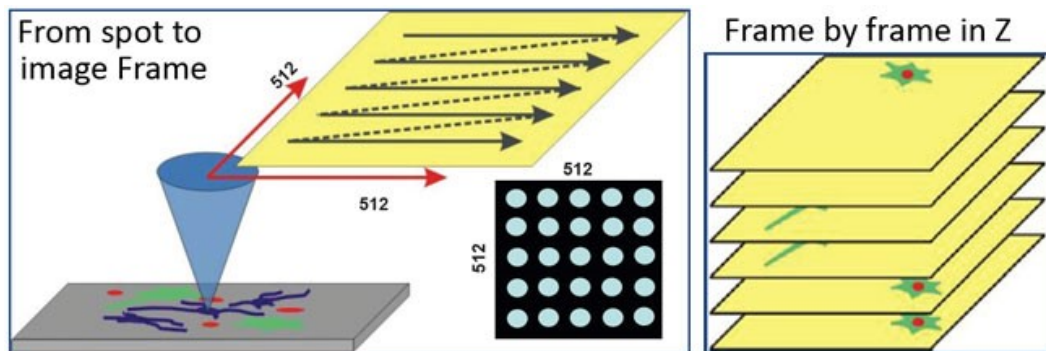
3.7 Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskop je druhem světelného mikroskopu, který se vyznačuje vyšším kontrastem a s rozlišením až 0,1 μm předčí ostatní světelné mikroskopy. Konfokální mikroskop zobrazuje pouze část vzorku, na kterou je zrovna zaostřen. Výsledný obraz tak není rozmazán částmi vzorku, které se nacházejí mimo rovinu zaostření. Jako zdroj fotonů je použit laser. Konfokální mikroskop se převážně využívá k pozorování preparátů obarvených fluoroforem. V klasické fluorescenční mikroskopii dochází k excitaci fluoroforů v celém vzorku a následné emisi světla. Fluorescence z míst, na která není klasický fluorescenční mikroskop zaostřen, vytváří ve výsledném obraze rušivé pozadí a tím snižuje i konečné rozlišení. Konfokální mikroskopie tomuto problému částečně předchází tím, že dochází k excitaci pouze určité části vzorku, na kterou je mikroskop zrovna zaostřen. Tím se omezí následná emise světla v místech mimo rovinu zaostření. Zároveň je světlo vznikající mimo rovinu zaostření pohlceno bodovou clonou. Existují dva typy konfokálních mikroskopů laserový rastrovací konfokální mikroskop a konfokální mikroskop s rotujícím diskem. (8; 21; 22)

3.7.1 Laserový rastrovací (skenovací) konfokální mikroskop (LSCM)

Anglicky se tento typ mikroskopu nazývá Laser Scanning Confocal Microscopy (LSCM). Preparát je postupně skenován laserem bod po bodu, dokud se neoskenuje celý. Při skenování každého bodu se do počítače dostává i informace o jeho poloze. Na základě těchto údajů počítač sestaví z mnoha naskenovaných bodů výsledný obraz. Preparát se může skenovat třemi způsoby. Buď se příčně posouvá vzorek před objektivem, nebo se pohybuje objektiv nad vzorkem, také můžeme preparát skenovat rozmítáním laserového paprsku. Mikroskop lze postupně zaostřit na více rovin pozorovaného vzorku, výsledkem jsou pak snímky, které připomínají řezy. Po poskládání těchto snímků na základě informací o jejich polohách získáme trojrozměrný

obraz pozorovaného objektu. Na obr.11 je znázorněn mechanismus skenování vzorku pomocí LSCM.



Obr. 11: Skenování LSCM (23)

Skenování probíhá tak, že laserový paprsek je soustředován na bodovou clonu, tento paprsek dále prochází skrz objektiv a dopadá na pozorovaný objekt. Průměr laserového paprsku dopadajícího na objekt je stejný jako rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu neboli difrakční mez. Paprsky, které se od objektu odrazí, rozptýlí nebo vznikají fluorescencí, prochází zpátky objektivem na druhou bodovou clonu. Clona umožní průchod pouze paprskům, které se nacházejí v rovině, na kterou je mikroskop právě zaostřen. Paprsky, které se nachází mimo tuto rovinu, jsou clonou pohlceny a nedochází tak k rozmazání výsledného obrazu těmito paprsky, jako tomu je u klasické fluorescenční mikroskopie. Paprsky, které prošly clonou, dopadají na fotonásobič, kde jsou zaznamenány a jejich signál je zesílen. Rychlost skenování LSCM je oproti konfokální mikroskopii s rotujícím diskem pomalejší, a proto není vhodný pro pozorování dynamických dějů například v živých buňkách. (8; 21; 22)

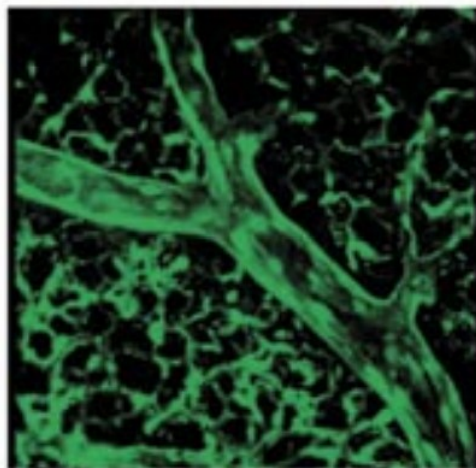
3.7.2 Konfokální mikroskop s rotujícím diskem (SDCM)

Anglicky se tento typ mikroskopu nazývá Spinning Disc Confocal Microscopy (SDCM). Tento typ konfokálního mikroskopu obsahuje tzv. Nipkowův disk, ve kterém se nachází stovky clonek. Disk se otáčí velkou rychlostí a tím umožňuje zobrazit více bodů vzorku najednou, což urychluje skenování. Clonky na disku jsou uspořádány tak, aby při otáčení disku došlo k oskenování celého vzorku. Záření dopadající na vzorek má menší intenzitu než u LSCM, tím se snižuje poškození vzorku způsobené fotobělením. Díky své rychlosti skenování je SDCM vhodný pro zobrazení dynamických procesů v živých buňkách. (8; 21; 22)

3.7.3 Využití konfokální mikroskopie

Většina moderních konfokálních mikroskopů nám umožňuje vytvořit trojrozměrný obraz buněk a jejich vnitřních struktur. Této vlastnosti bylo například využito při zkoumání organizace a struktury nervové tkáně. Těla neuronů, jejich dendrity a gliové buňky byly obarveny fluoroforem. Ze vzniklých snímků byl vytvořen trojrozměrný obraz, který zobrazoval uspořádání neuronů v prostoru, jejich vzájemné spojení pomocí synapsí, vztahy s gliovými buňkami a větvení dendritů a axonů. Pomocí této metody byl zobrazen celý myšičí mozek. V různých částech mozku se vyskytovaly neurony s odlišnou morfologií a různý počet gliových buněk. (24)

V trojrozměrném zobrazení lze pozorovat pomocí SDCM dynamické děje. Tento typ zobrazení byl využit pro pozorování cév v izolovaných a neporušených myších plicích, cévami plic protékala tekutina s fluoroforem, který se naváže na endotel cév. Pomocí konfokální mikroskopie je možné sledovat dynamiku proudění krve v plicích, rozvětvení cév a změny v průtoku krve za různých experimentálních podmínek. Na obr.12 jsou cévy plic zvýrazněné fluoroforem. (24)



Obr. 12: Cévy zvýrazněné fluoroforem (24)

4 Elektronový mikroskop

Elektronový mikroskop se využívá k pozorování objektů menších než 0,2 μm a jeho maximální rozlišení dosahuje až 0,1 nm. Pro zobrazení takto malých struktur se používají urychlené elektrony ve vakuu, ty mají výrazně menší vlnovou délku než viditelné světlo. Francouzský fyzik Louis de Broglie vyjádřil vlnovou délku elektronu pomocí následující rovnice (6),

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v} \quad (6)$$

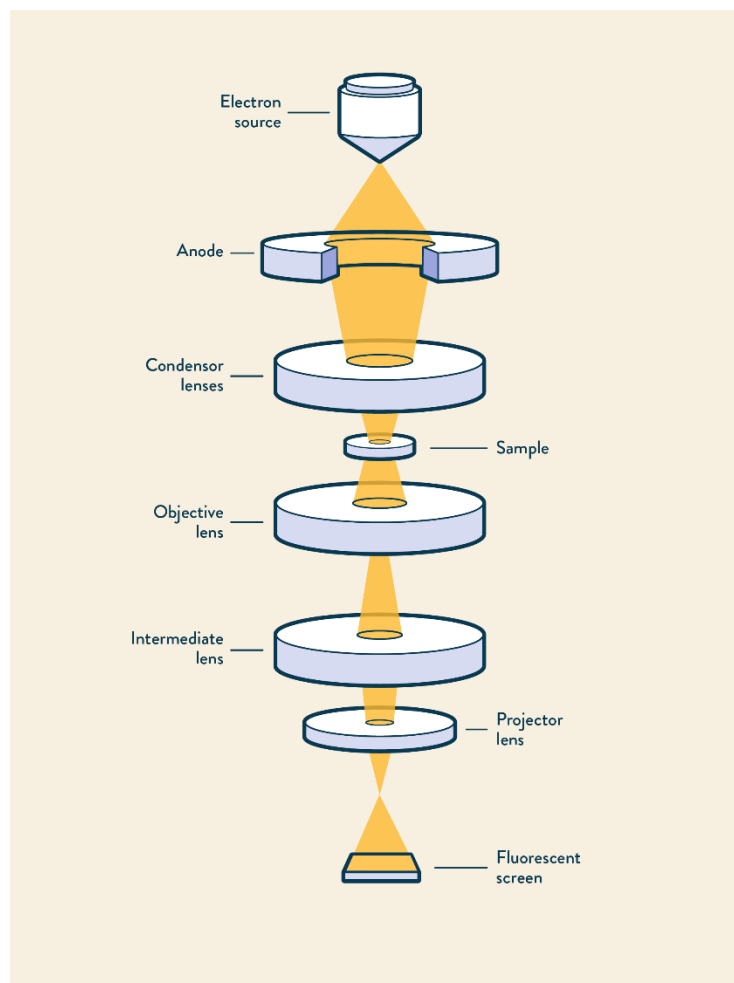
kde λ je vlnová délka elektronu, m je hmotnost elektronu, h je Planckova konstanta a v je rychlost elektronu.

Elektronový mikroskop se skládá z elektronového zdroje, ze kterého proudí svazek elektronů. Svazek elektronů je třeba urychlit pomocí anody, ta se nachází za elektronovým zdrojem. Následně je elektronový svazek upraven elektronovými čočkami, aby se sbíhal do jednoho bodu. (25; 26)

Skleněná optika, používaná ve světelné mikroskopii, je u elektronového mikroskopu nahrazena systémem elektromagnetických čoček. Elektrony jsou soustředěny na vzorek, se kterým interagují. Následně jsou elektrony detekovány pomocí detektorů, signály z detektoru vyhodnocuje počítač a sestrojí obraz. Veškeré vnitřní části elektronového mikroskopu, kterými procházejí elektrony, obsahují vakuum. Za přítomnosti vzduchu by elektrony interagovali s molekulami vzduchu místo se vzorkem. Vzorky pro elektronový mikroskop vyžadují obvykle složitější úpravu než vzorky pro světelný mikroskop. Elektronové mikroskopy dělíme na transmisní elektronové mikroskopy a rastrovací elektronové mikroskopy. (27)

4.1 Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

Transmisní elektronový mikroskop z anglického Transmission Electron Microscope nebo také prozařovací elektronový mikroskop slouží k přímému pozorování obrazu. Jeho rozlišovací mez se pohybuje v řádech 0,1 nm, vyznačuje se i velkou hloubkou ostrosti, prakticky je zaostřen celý vzorek. (9) K zobrazení objektu využívá svazek elektronů ve vakuu. Zdrojem svazku primárních elektronů je elektronový zdroj. Elektronový svazek je pomocí kondenzorové čočky soustředěn na pozorovaný preparát. Elektrony interagují se vzorkem a prochází jím. Prošlé elektrony dále putují k objektivové čočce, která upravuje jejich dráhu tak, aby většina elektronů dopadla na detektor, který je zaznamenává a vytváří obraz. Na obr.13 je schéma TEM, dnes se fluorescenční stínítka využívají jen zřídka, místo nich se pro tvorbu obrazu využívají CCD (Charge-coupled device) kamery nebo detektory. Vzorky pro TEM musí být nakrájeny na několik desítek nm tenké plátky, aby elektrony mohly vzorkem projít. (9; 25; 27; 28; 29)

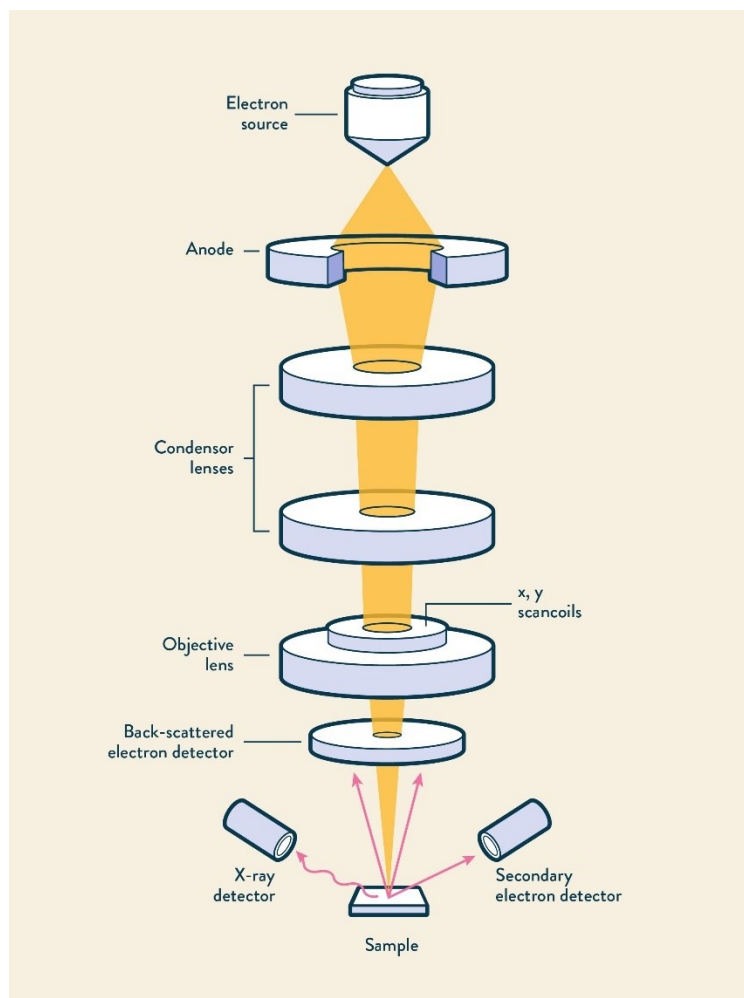


Obr. 13 : Schéma TEM (30)

4.2 Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)

Tento typ elektronového mikroskopu se také nazývá skenovací z anglického Scanning Electron Microscope (SEM). Obraz není pozorován přímo, jako tomu je u transmisního elektronového mikroskopu. Obraz se vytváří pomocí úzkého svazku elektronů o průměru 1-10 nm, ten se vypouští na objekt postupně po řádcích, dokud se takto neoskenuje celý vzorek. (7) Elektrony se při dopadu na vzorek buď rozptýlí, nebo ze vzorku vyrazí sekundární elektron. Oba typy těchto elektronů jsou zachyceny detektorem. Detektor se nenachází pod vzorkem, jako tomu bylo u TEM, ale je umístěn nad vzorkem. (28) Schéma SEM je zobrazeno na následujícím obrázku č.14.

Na základě energie detektorem zachycených elektronů se skládá obraz. Rastrovací mikroskop nám umožňuje vytvořit trojrozměrný obraz pozorovaného předmětu, ale rozlišení tohoto obrazu je o až dva řády menší než u transmisního mikroskopu. Protože elektrony nemusí projít vzorkem, aby byly zaznamenány detektorem, nemusí být vzorek nakrájen na ultratenké řezy. (7; 9; 27)



Obr. 14 Schéma SEM (30)

4.3 Elektronové zdroje

Úkolem elektronového zdroje je poskytnout stabilní paprsek elektronů s vysokým jasnem. Jas je určený proudem elektronů vztaženým na plochu zdroje a na prostorový úhel, pod kterým jsou elektrony vyzařovány. Čím je jas elektronového zdroje větší, tím má vzniklý obraz lepší rozlišení. Některé elektronové zdroje tvoří elektrony se širším energetickým rozptylem. Elektrony s různou energií je obtížnější zaostřit na konkrétní bod, což snižuje kvalitu obrazu. Elektronové zdroje rozlišujeme na tepelné a autoemisní. Mezi tepelné elektronové zdroje patří wolframová katoda a katody z hexaboritových krystalů, mezi které patří CeB_6 a LaB_6 . Mezi autoemisní pak řadíme studenou autoemisní trysku a trysku Schottkyho typu. Tepelné elektronové zdroje produkují elektrony, pouze pokud jsou zahřáty na vysokou teplotu. Studená autoemisní tryska produkuje elektrony za přítomnosti silného elektrického pole. Tryska Schottkyho typu je kombinací tepelného a autoemisního zdroje. (26; 28)

4.3.1 Wolframová katoda

Katoda je tvořena z tenkého wolframového vlákna ohnutého do tvaru písmene V. Tento typ katody nevyžaduje tak čisté vakuum a je nejlevnější. Katoda se musí před použitím rozžhavit na zhruba $2\ 500^\circ\text{C}$, to je jeden z důvodů, proč má wolframová katoda nejkratší životnost ze všech uvedených elektronových zdrojů. V porovnáním

s ostatními elektronovými zdroji, má wolframová elektroda nejnižší jas a nejširší rozptyl energie elektronů. (26)

4.3.2 Katody z hexaboritých krystalů

Katoda je tvořena zašpičatělým monokrystalem z LaB_6 nebo z CaB_6 . Tyto katody vyžadují pro svoji funkci menší teplotu než wolframová katoda. Katoda z LaB_6 vyžaduje pro svoji funkci teplotu okolo 1 600 °C, katodě z CaB_6 stačí pro svoji funkci teploty okolo 1 400 °C. Díky nižší provozní teplotě mají katody z hexaboritých krystalů 10x delší životnost než wolframová katoda. Další výhodou oproti wolframové katodě je jas, který je asi 10x větší, výsledný obraz má tak kvalitnější rozlišení. Katoda z hexaboritových krystalů vyžaduje čistější vakuum než wolframová katoda a je proto dražší. Krystal, který katody obsahují, musí být zahřívám postupně, při rychlém zahřátí by mohl prasknout. (26; 28)

4.3.3 Studená autoemisní tryska

Studená autoemisní elektroda je tvořena monokrystalem wolframu, který má tvar hrotu o průměru kolem 100 nm. Naproti wolframovému hrotu je umístěna elektroda s vysokým napětím. Kolem hrotu vzniká elektrické pole s vysokou intenzitou, které vytrhává elektrony z wolframového hrotu. Studená autoemisní tryska musí být umístěna v ultra vysokém vakuu, což z ní dělá nejdražší elektronový zdroj. Tryska je schopna vytvářet elektrony i za pokojové teploty a její životnost je několik let. Tato tryska se vyznačuje vysokým jasnem a rozptylem energie elektronů nižším než 1 eV. (25)

4.3.4 Tryska Schottkyho typu

Označuje se také jako termoautoemisní tryska. Na emisi elektronů se z části podílí elektrické pole a teplota. Wolframový hrot je pokrytý oxidem zirkoničitým, hrot musí být rozžhaven na teplotu 1 500 °C. Jas této trysky je menší než u studené autoemisní trysky, ale nepotřebuje ultra vysoké vakuum a vyznačuje se stabilním paprskem elektronů. (25)

4.4 Elektronové čočky

Úkolem elektronových čoček je soustředit svazek elektronů do co nejužšího paprsku. Elektronové čočky dělíme na elektrostatické a elektromagnetické. Elektrostatické čočky jsou složeny z několika elektrod, na které je vkládán různý potenciál. Nachází se za elektronovým zdrojem a slouží k formování elektronového svazku. (27)

Elektromagnetické čočky jsou uspořádané do soustavy čoček. U TEM je nejčastěji tvořena kondenzorovou čočkou a objektivovou čočkou. Kondenzorová čočka soustřeďuje svazek elektronů na vzorek. Objektivová čočka soustřeďuje elektrony prošlé vzorkem na detektor. U SEM se za vzorkem žádná čočka nenachází. (27)

Elektromagnetická čočka je tvořena cívkou, když cívkou prochází proud, vytváří nehomogenní magnetické pole. Magnetické pole ovlivňuje trajektorii elektronů. Cívka bývá obalena vrstvou měkkého železa, tím se zvýší její účinnost. Součástí elektromagnetické čočky bývá i clona, ta blokuje elektrony, které nejsou součástí elektronového svazku. (27)

Stejně jako skleněné čočky, tak i elektronové trpí různými vadami, mezi ty nejčastější vady patří sférická, chromatická nebo osový astigmatismus. (27)

4.4.1 Sférická vada elektronové čočky

Tato vada elektronové čočky vzniká stejně jako sférická vada u skleněné čočky. Elektrony, které prochází středem čočky, se sbíhají ve vzdálenějším bodě než elektrony, které dopadají na okraj čočky. Důsledkem této vady je, že zvětšení ve středu je jiné než na okrajích preparátu. Použitím clony, která bude okrajovým elektronům zabraňovat průchodu čočkou, lze sférickou vadu zmírnit. Sférickou vadu lze potlačit použitím hexapólové nebo oktupólové čočky. Ty se skládají z šesti nebo osmi cívek, které jsou uspořádány do kruhu, jehož středem prochází svazek elektronů. Sousední cívky mají vždy odlišný pól. Magnetické pole, které je cívkami tvořeno, lze upravovat tak, aby se sférická vada co nejvíce potlačila. (25; 27)

4.4.2 Chromatická vada elektronové čočky

Tato vada elektronové čočky má stejný princip, jako chromatická vada u skleněné čočky. Dráha elektronů o různé energii, respektive vlnové délce je odlišná. Elektrony o různé vlnové délce jsou elektronovou čočkou ohýbány pod jiným úhlem a nemohou tak být soustředěny do úzkého bodu. Chromatická vada způsobuje, že je pozorovaný bod zobrazen jako neostrý disk. Vlivy chromatické vady můžeme zmírnit snížením energetického rozptylu elektronů, snížením vlnové délky elektronů a stabilizací napětí na anodě. Pro snížení energetického rozptylu elektronů lze použít jako zdroje elektronů studenou autoemisní trysku nebo trysku Schottkyho typu, oba tyto elektronové zdroje produkují svazek elektronů s nízkým energetickým rozptylem. Vlnová délka elektronu se snižuje se zvyšující se rychlostí elektronu. Rychlost elektronu lze zvýšit tím, že zvýšíme napětí na anodě. Elektrony s příliš vysokou rychlostí mohou poškodit vzorek. Nestabilní urychlovací napětí na anodě způsobuje změny v rychlostech elektronů, což chromatickou vadu zhoršuje. (25; 27)

4.4.3 Astigmatická vada elektronové čočky

Astigmatismus je způsoben nesymetrií magnetického pole elektronové čočky. Elektronový svazek se nesbíhá do kruhového bodu, ale do oválu. Obraz je tak v jednom směru nezaostřený. Astigmatismus bývá způsoben nevodivými nečistotami, které se usazují v tubusu mikroskopu, na nečistotách se tvoří náboj, který svým elektrickým polem ovlivňuje dráhu elektronu. Vadu lze odstranit použitím stigmátoru, ten je nejčastěji tvořen magnetickým kvadrupólem, který se skládá ze čtyř cívek, protilehlé cívky mají stejný pól. Cívky tvoří magnetické pole tak, aby kompenzovali nesymetrii magnetického pole elektronové čočky. (27)

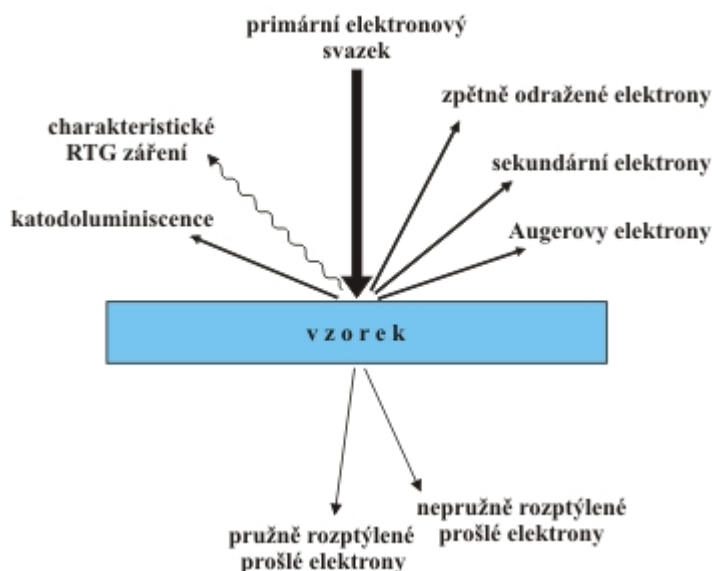
4.5 Vakuum

Vakuum vyplňuje celý vnitřní prostor mikroskopu od elektronového zdroje po detektor. Přítomnost vakua je nezbytná, v přítomnosti vzduchu by elektrony interagovaly s molekulami vzduchu, místo se vzorkem. (25) Také by mohlo dojít k znečištění vzorku. Vakuum také omezuje oxidaci elektronového zdroje a prodlužuje tak jeho životnost. Vakuum zajišťuje několik automatizovaných pump. Čistota vakua je často volena podle požadavků elektronového zdroje. Pro wolframovou katodu stačí vakuum o hodnotě 10^{-3} Pa, kdežto studená autoemisní tryska vyžaduje vakuum

10^{-5} Pa. Aby během každé výměny vzorku nedocházelo k zavzdušnění celého mikroskopu, je cela pro vzorek oddělena od ostatních částí pomocí vzduchotěsných přepážek. (27)

4.6 Interakce elektronů se vzorkem

Elektrony interagují se vzorkem mnoha způsoby, některé elektrony vzorkem projdou beze změny, jiné jsou vzorkem absorbovány, také může dojít k elastickému i neelastickému rozptylu elektronů. Různé interakce elektronů se vzorkem, nám dávají odlišné informace o povrchu vzorku, vnitřních strukturách, chemickém složení nebo o jeho krystalografickém uspořádání. Tyto elektrony je třeba i odlišně detekovat. U TEM jsou detekovány elektrony, které prošly vzorkem. Patří mezi ně hlavně elektrony, které vznikly elastickým i neelastickým rozptylem, také lze detekovat sekundární elektrony, nebo rentgenové záření, případně Augerovy elektrony. SEM detekuje elektrony odražené od vzorku, hlavně elektrony vzniklé elastickým rozptylem, důležité jsou také sekundární elektrony. (29; 30; 31; 32) Na obrázku 15 jsou zobrazeny typy interakcí elektronů se vzorkem.



Obr. 15: Interakce elektronů se vzorkem (29)

4.6.1 Elasticky rozptýlené elektrony

Elasticky rozptýlené elektrony vznikají po interakci primárního elektronu s jádrem atomu vzorku, přičemž se mění jejich směr, ale jejich energie zůstává téměř nezměněna. K elastickému rozptylu u jednoho elektronu může dojít vícekrát a elektron poté může opustit vzorek, pak se označuje jako elektron zpětně odražený. Množství zpětně odražených elektronů závisí na úhlu dopadu elektronů na vzorek a na protonovém čísle prvku. Čím větší je protonové číslo prvku, tím větší je počet zpětně odražených elektronů. Oblasti vzorku s těžšími prvky poskytují více signálu a jsou na obraze světlejší. U SEM jsou zpětně odražené elektrony detekovány a na základě jejich četnosti lze sestavit obraz s rozložením prvků ve vzorku. U TEM jsou elasticky rozptýlené elektrony, které prošly vzorkem zobrazovány v difrakčním módu. Pomocí tohoto módu lze od sebe odlišit amorfni a krystalické látky nebo odhalit defekty v krystalech. (28; 30)

4.6.2 Neelasticky rozptýlené elektrony

Neelasticky rozptýlené elektrony mají menší energii než primární elektrony. Vznikají, když primární elektron interaguje s elektronem atomu vzorku, přičemž primární elektron předává část své energie elektronu atomu vzorku a z primárního elektronu se stává neelasticky rozptýlený elektron. Elektron atomu vzorku, který získal energii od primárního elektronu, přechází do excitovaného stavu nebo se z atomu uvolní v závislosti na jeho energii. (32)

4.6.3 Sekundární elektrony

Sekundární elektrony vznikají po interakci primárního elektronu s elektronem atomu vzorku, kdy dojde k předání energie elektronu atomu vzorku, který se následovně uvolní z elektronového obalu atomu vzorku a vzniká z něj sekundární elektron. Ten má relativně malou energii a pouze sekundární elektrony, které vznikly v hloubce několika desítek nm se dostanou do detektoru. Sekundární elektrony jsou detekovány Everhart-Thornleyho detektorem. U SEM jsou sekundární elektrony detekovány pod určitým úhlem vůči povrchu vzorku, v konečném obraze nám tak vznikají světlá a tmavá místa, ta vytváří trojrozměrný efekt. Detektor sekundárních elektronů má vysoké rozlišení a dává nám informaci o povrchu preparátu, ale neposkytuje žádné informace o chemickém složení vzorku. (29; 31; 33)

4.6.4 Rentgenové záření

Na místo, ze kterého se uvolnil sekundární elektron, může přejít elektron z vyšší energetické hladiny. Ten svou přebytečnou energii vyzáří nejčastěji v podobě rentgenového záření, které je pro daný atom charakteristické. Pomocí rentgenového záření můžeme získat informace o prvcích ve vzorku. (27; 32)

Pro detekci rentgenového záření lze použít detektor EDS (energieově disperzní spektrometrie) nebo detektor WDS (vlnově disperzivní spektrometrie). Detektor EDS analyzuje celé vyzářené spektrum najednou, detekce je rychlá a trvá několik minut. Nevýhodou tohoto detektoru je menší citlivost, ta se pohybuje v řádech desetin procent hmotnostního obsahu daného prvku ve vzorku. Detektor WDS analyzuje zvolený prvek na základě charakteristické vlnové délky rentgenového záření. Detektor WDS má desetkrát větší citlivost než detektor EDS, ale analýza probíhá pomaleji. (29; 31)

4.6.5 Augerovy elektrony

Přebytečná energie elektronu atomu vzorku nemusí být vždy vyzářena v podobě rentgenového záření, ale může být předána elektronu na vyšší energetické hladině, tento elektron se následně uvolní z atomového obalu a vzniká z něj Augerův elektron. Augerovy elektrony jsou často vzorkem absorbovány. Pouze Augerovy elektrony, které vznikly na povrchu vzorku, nejsou absorbovány svým okolím a mohou být detekovány. Augerovy elektrony se častěji uvolňují z prvků o menším atomové hmotnosti. Energie Augerových elektronů je pro každý atom specifická a slouží tedy k identifikaci prvků na povrchu vzorku. (29; 31; 32; 33)

4.6.6 Katodoluminiscence

Ke katodoluminiscenci dochází podobným způsobem jako k uvolnění rentgenového záření, s tím rozdílem, že excitovaný elektron vyzáří svou přebytečnou

energii v podobě záření, jehož vlnová délka se pohybuje v oblasti od ultrafialového po infračervené záření. (29; 33)

4.7 Úpravy preparátu

Vzorky pro elektronovou mikroskopii musí být složitě upraveny. Biologické preparáty se musí fixovat, aby nedošlo k jejich degradaci. Biologické preparáty lze fixovat chemicky nebo fyzikálně. Důležité je, aby fixací nedošlo ke změně tvaru nebo poškození určitých struktur. Pro chemickou fixaci se často používá oxid osmičelý, oxid rutheničelý nebo aldehydy, z nich nejvýznamnější je formaldehyd. (34)

Fyzikální fixace se provádí mrazem. Při fixaci mrazem je nejdříve nutné omezit tvorbu krystalků ledu ve vzorku, vzniklé krystalky by poškodily buněčné membrány. Aby se předešlo tvorbě krystalů ledu při zmrazení, musí se voda ve vzorku nahradit kryoprotektivem. Kryoprotektiva dělíme na intracelulární a extracelulární. Intracelulární kryoprotektiva pronikají skrz buněčnou membránu do buněk a jejich kompartmentů, řadí se mezi ně ethylenglykol, glycerol nebo dimethylsulfoxid. Extracelulární kryoprotektivum přes buněčné membrány neprochází a nachází se pouze mimo buňky, pro tento účel se používá sacharóza nebo polyvinylpyrrolidon. Důležité je vzorek rychle zamrazit, to se nejčastěji provádí tekutým dusíkem, aby se omezila tvorba krystalů. Fixace mrazem je šetrnější než chemická fixace, protože nezpůsobuje denaturaci bílkovin a deformaci některých struktur. Nevýhodou této metody je její náročnost na technické vybavení a nákladné uchovávání zmrazených vzorků. (34)

Po chemické fixaci je nutné vzorky odvodnit, voda by se v přítomnosti vakua ihned odpařila a došlo by k poškození preparátu. Odvodňování se provádí nejčastěji ethanolem nebo acetonem, tato dehydratační činidla se poté vysuší. Preparát musí být vodivý, nevodivé preparáty se musí pokrýt vrstvičkou kovu. Preparáty se pokovují, aby se z jejich povrchu odvedly hromadící se elektrické náboje a přebytečné teplo, tím se docílí lepšího kontrastu a omezí se poškození vzorku. K pokovování se nejčastěji používá zlato, platina nebo chrom. (34)

U TEM je nutné vzorek nakrájet na řezy tenké několik desítek nm, aby se omezila absorpce elektronů preparátem. Aby bylo vzorek na tenké řezy možné nakrájet, musí se nejdříve zalít do pryskyřicového bločku. Zalitý vzorek se na ultramikrotomu nakrájí na maximálně 100 nm tlusté řezy. (9; 25; 34)

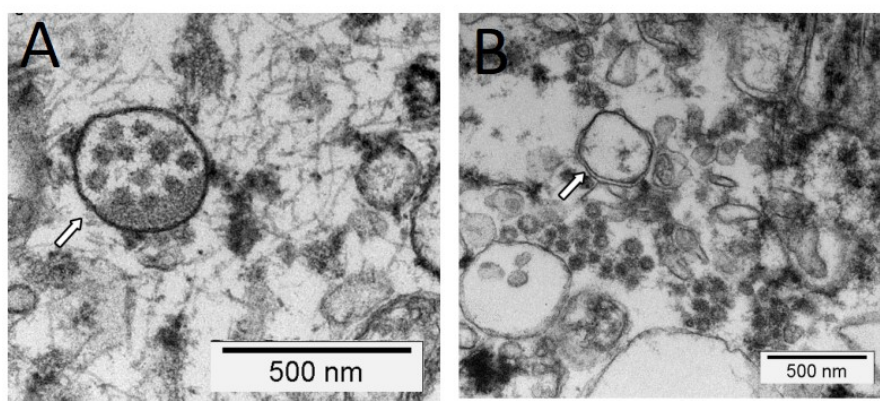
4.8 Využití elektronové mikroskopie

Díky vysokému zvětšení a rozlišení nachází elektronová mikroskopie své uplatnění především ve výzkumu. Slouží ke studování virů, bakterií, buněčných organel, fyziologických a patologických tkání. V klinické praxi se využívá oproti světelné mikroskopii jen zřídka. Lze ji využít pro diagnostiku některých malignit, kde se pozorují drobné změny v jádře či jadérku nebo v organelách, tyto změny je velmi obtížné či dokonce nemožné pozorovat pomocí světelného mikroskopu. Některé typy rakovinných buněk mají oproti zdravým buňkám zmnožené některé organely, například lysozomy. Málo diferencované karcinomy se vyznačují malým a nedovyvinutým Golgiho aparátem. Mitochondrie rakovinných buněk jsou oproti zdravým buňkám nafouklé a mají různé velikosti. (35)

Pomocí transmisní elektronové mikroskopie Akhouri A. Sinha zkoumal rozdíly mezi jádry buněk benigní hyperplazie prostaty, jádry invazivních buněk a jádry metastatických buněk rakoviny prostaty. Pro studium použil benigní i maligní biopsie prostaty, pacienti před biopsií nebyli léčeni. Benigní buňky prostaty mají stejnotvará jádra, která jsou jasně ohraničena jaderným obalem. Jádra metastatických buněk mají různé velikosti a jsou nepravidelného tvaru. Metastatické buňky rakoviny prostaty mají ztenčený jaderný obal, který v některých případech není téměř patrný. Dalším znakem metastatické buňky rakoviny prostaty je přítomnost hustých shluků jaderného chromatinu. U invazivních buněk rakoviny prostaty se v jádře nevyskytují husté shluky chromatinu, jejich jádro má nepravidelný tvar a mají více zřetelný jaderný obal než metastatické buňky. (36)

Elektronová mikroskopie také slouží k určení původce virového onemocnění v případech, kdy nelze vir kultivovat na buněčných kulturách ani prokázat imunologickou nebo molekulární metodou. Elektronovou mikroskopií lze určit čeleď viru na základě jeho morfologie, neslouží tedy k identifikaci konkrétního druhu viru. (37)

V roce 2020 publikoval tým H. Hopfera studii, ve které použil transmisní elektronovou mikroskopii k pozorování změn u buněk plicní tkáně, které byly napadeny koronavirem SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus). Studoval změny buněk vyvolané koronavirem na buněčných kulturách i na biopsiích covid pacientů. V kultivovaných buňkách i v buňkách z biopsie byly pozorovány stejné změny. V buňkách se nacházelo větší množství vezikul. Vezikuly se zdvojenou membránou byly přítomny ve větším množství u krátce nakažených buněk. Tyto vezikuly byly často ve shlucích. Nafouklé drsné endoplazmatické retikulum se vyskytuje uvnitř buněk, u kterých infekce probíhala už delší dobu. V pozdější fázi infekce lze uvnitř buněk pozorovat velké kruhové vezikuly připomínající vakuoly, které obsahují viriony. Bílá šipka na obr.16 ukazuje na vezikulu, uvnitř které se nacházejí viriony (A) a na vezikulu se zdvojenou membránou (B).



Obr. 16: Buňky napadené SARS-CoV-2 (38)

Všechny tyto změny byly pozorovány i u buněk napadených koronavirem MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus). (38)

5 Mikroskopie atomárních sil

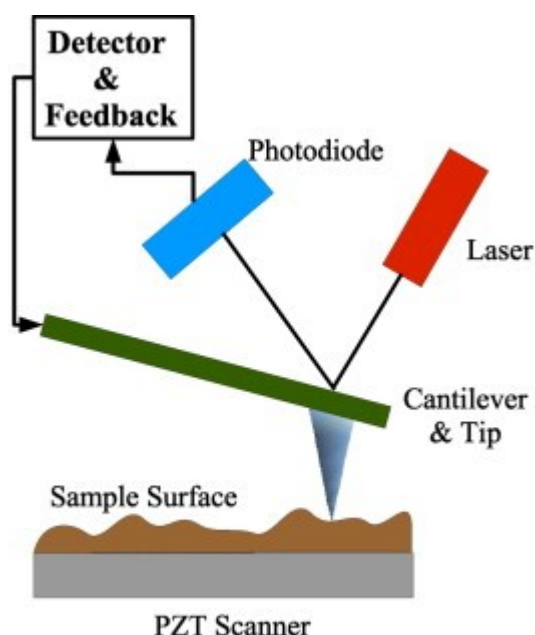
Anglicky se nazývá atomic force microscopy (AFM) a patří mezi rastrovací sondové mikroskopie (scanning probe microscopy— SPM). Pomocí mikroskopie atomárních sil můžeme pozorovat jak nevodivé, tak vodivé vzorky, a to v nanometrovém rozlišení. Vzorek můžeme studovat za přítomnosti vzduchu, vodního prostředí nebo vakua. Mikroskopie atomárních sil nevyužívá pro zobrazení obrazu záření ani proud elektronů, jako mikroskopie světelná nebo elektronová, ale používá hrot vyrobený z křemíku nebo z nitridu křemíku. (39) Nosník s hrotem se ohýbá podle rozložení atomárních sil na povrchu vzorku. Při přiblížení hrotu k povrchu vzorku působí na hrot odpudivé nebo přitažlivé síly a dojde k ohybu nosníku, na kterém je hrot připevněn. Ohyb nosníku je zaznamenáván citlivou laserovou diodou a fotodetektozem. Signál z fotodetektoru jde do počítače, kde se zpracovává a vytváří trojrozměrný obraz. Hrot se po povrchu preparátu pohybuje v řádcích a postupně skenuje povrch celého preparátu. Může se také pohybovat preparát, přičemž hrot zůstává na místě. Na hrot přiblížený k preparátu působí hlavně krátkodosahové elektrostatické odpudivé síly plynoucí z Pauliho principu a dlouhodosahové přitažlivé van der Waalsovy síly. Podle vzdálenosti hrotu od preparátu může být výsledná síla působící na hrot přitažlivá nebo odpudivá. Na hrot můžou také působit síly třecí, deformační, kapilární, vazebné nebo adhezní. Podle vzdálenosti hrotu od vzorku rozlišujeme dva režimy, dotkový režim a bezdotkový režim. Kombinací těchto režimů získáme poklepový režim. (37; 39; 40)

5.1 Části AFM

Hroty se vyrábí v různých tvarech a velikostech. Nejpoužívanějším typem hrotu je pyramidový hrot vyrobený z nitridu křemíku. Průměr špičky hrotu se pohybuje okolo 10 nm. Špička hrotu musí být ostrá, neopotřebovaná, jinak dochází ke tvorbě artefaktů a různých nerovností. Při použití ostrého hrotu se zvyšuje kvalita obrazu, ale může dojít k poškození měkkých struktur zejména membrány buněk. (41)

Nosník bývá 80 μm až 320 μm dlouhý a 0,3 μm až 2 μm tlustý. Jednotlivé nosníky bývají různě ohebné. Ohebnější nosníky se využívají pro pozorování měkkých struktur organického původu, aby nedošlo k deformaci povrchu pozorovaných struktur. Naopak nosníky pro studium pevných látek, jako jsou například krystaly, zuby nebo kosti nemusí být tolik flexibilní. (39)

Jednou z hlavních částí mikroskopu atomárních sil je skener, což je polohovací zařízení, které zajišťuje přesnou pozici hrotu nad povrchem pozorovaného předmětu. Na detektor dopadá světlo laseru, které se odrazilo od nosníku. Nejpoužívanějším typem je kvadrantní fotodetektor, ten je rozdělen na čtyři stejné části a detekuje zkruty nosníku i jeho posun ve vertikálním směru. Informaci o poloze nosníku zpracovává počítač. (41) Na obrázku č.17 jsou zobrazeny části AFM.



Obr. 17 Části AFM (42)

5.2 Dotykový režim

Dotykový režim je nejstarší režim pro mikroskopii atomárních sil. Při dotykovém režimu se hrot dotýká vzorku po celou dobu skenování. Na hrot zde nejvíce působí odpudivé síly vyplývající z Pauliho principu. V menší míře se uplatňují i přitažlivé van der Waalsovy síly a kapilární síly. Výsledná síla působící na hrot je odpudivá. Důležité je, aby tuhost nosníku byla menší, než je tuhost vzorku, jinak by došlo k poškození vzorku hrotem. Mezi výhody dotykového režimu patří jeho rychlost. U dotykového režimu rozeznáváme dva módy, a to dotykový režim s konstantní silou a dotykový režim s konstantní výškou. (43; 44)

5.2.1 Dotykový mód s konstantní silou

V tomto módu se udržuje konstantní ohnutí nosníku. Raménko, na kterém je nosník připojený, se pohybuje ve vertikálním směru tak, aby vyrovnalo sílu, která působí na nosník s hrotem a nedošlo tak k jeho ohnutí. Výhodou módu s konstantní silou je, že nedochází k ohnutí nosníku vlivem kapilárních sil, které často zkreslují výsledný signál. Nevýhodou tohoto módu je pak jeho rychlost. Dotykový mód s konstantní silou je používanější než dotykový mód s konstantní výškou. (43; 44)

5.2.2 Dotykový mód s konstantní výškou

V tomto módu se hrot pohybuje po povrchu v konstantní výšce. V různých místech vzorku na hrot působí různě velké síly a dochází tak k ohnutí nosníku, jehož pohyb je zaznamenáván citlivou laserovou diodou a fotodetektořem a výslední signál se dále zpracovává. Výhodou tohoto módu je jeho rychlost, nevýhodou je pak snížená přesnost měření. Dotykový mód s konstantní výškou je vhodný pro pozorování relativně plochých povrchů v reálném čase. (43; 44)

5.3 Bezdotykový režim

Při bezdotykovém režimu se hrot nedotýká vzorku, je od něj vzdálen 1-10 nm. Při této vzdálenosti na hrot odpudivé síly skoro nepůsobí. Nejvíce se při bezdotykovém

režimu uplatňují přitažlivé van der Waalsovy síly, ty jsou v porovnání s odpuzivými silami v dotykovém režimu slabé a dochází k šumu. Proto se při bezdotykovém režimu nosník rozkmitá s určitou amplitudou. (43; 44)

Nosníky jsou také tužší oproti dotykovému režimu, aby došlo k jeho menšímu vychýlení při kontaktu s případnou kapkou vody na povrchu vzorku. Protože mikroskopie často neprobíhá ve vakuu, může docházet ke kondenzaci vlhkosti na povrchu vzorku a vytvářejí se tak kapky vody. Výhodou bezdotykového režimu je, že nedochází k poškození vzorku hrotem a také nedochází ke kontaminaci hrotu vzorkem. Problémem bezdotykovému režimu dělá přítomnost kapky vody na povrchu vzorku, i při použití tuhého nosníku dochází ke zkreslení výsledného obrazu. (43; 44)

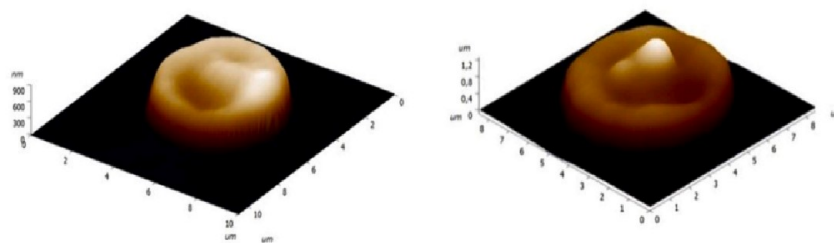
5.4 Pokleповý režim

Pokleповý režim vychází z kombinace dotykového a bezdotykového režimu. Nosník s hrotem kmitá s určitou amplitudou, hrot je tak v kontaktu se vzorkem jen po krátký čas. K posunutí hrotu dochází jen, když je nejvíce vzdálen od vzorku. Tak nedojde k poškození vzorku jako u dotykového režimu, nicméně ke kontaminaci dojít může. Tomuto režimu nedělá problém kapka na povrchu vzorku, kmitající nosník má dostatečnou sílu, aby pronikl kapkou, dostal se k povrchu vzorku a následně se z kapky i uvolnil. Nevýhodou pokleповého režimu je rychlejší opotřebování hrotu oproti předchozím režimům. (43; 44)

5.5 Využití mikroskopie atomárních sil

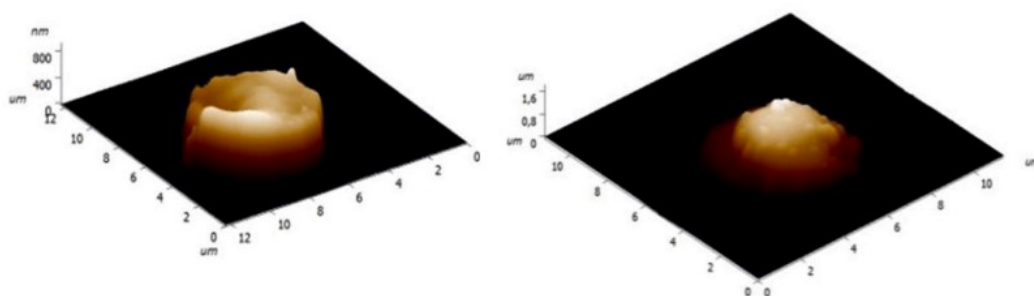
Hlavní výhodou AFM je možnost studovat živé buňky ve vodném prostředí, což u elektronové mikroskopie není možné, kvůli přítomnosti vakua musí být vzorek odvodněn. AFM má široké využití ve studiu živočišných i rostlinných buněk, bakterií, virů, membrán a membránových struktur organel. (40) Díky vysokému rozlišení a nízkým požadavkům na přípravu vzorku se AFM využívá pro studium biologických materiálů. Umožňuje také přesněji měřit velikosti pozorovaných struktur. Lze tak například měřit změnu velikosti a tvaru rakovinné buňky po vystavení chemoterapeutiku. AFM také umožňuje měřit pružnost membrány u patologických buněk, nebo u buněk, které byly vystaveny farmaku nebo toxické látce. (39; 45)

Tým vedený Demchenkovem studoval pomocí AFM změny pružnosti a tvaru buněčné membrány u erytrocytů, které byly vystaveny různým koncentracím chloridu kademnatého. Pro tento výzkum byly použity krysí erytrocyty, ty byly vystaveny chloridu kademnatému o koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$, 10 $\mu\text{g/l}$, 100 $\mu\text{g/l}$ a 1000 $\mu\text{g/l}$, pro porovnání byly použity erytrocyty, které chloridu kademnatému nebyly vystaveny. V závislosti na koncentraci chloridu kademnatého došlo ke změnám membrány. Tyto změny byly pozorovány pomocí AFM v pokleповém režimu. Erytrocyty, které byly vystavené koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$, měly oproti zdravým erytrocytům méně výrazné zúžení v jejich středu. Koncentrace 10 $\mu\text{g/l}$ způsobila tvorbu membránových výstupků ve středu erytrocytu. V levé části obrázku 18 je erytrocyt, který byl vystaven chloridu kademnatému o koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$, vpravo je erytrocyt, který byl vystaven koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$.



Obr. 18: Erythrocyty vystavené koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$ a 10 $\mu\text{g/l}$ (46)

Chlorid kademnatý o koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$ změnil tvar erythrocytu na cylindrický a způsobil charakteristické výrůstky na periferii. Při koncentraci 1000 $\mu\text{g/l}$ získal erythrocyt sférický tvar s četnými výrůstky na povrchu. V levé části obrázku 19 je erythrocyt, který byl vystaven chloridu kademnatému o koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$, v pravé části je erythrocyt, který byl vystaven koncentraci 1000 $\mu\text{g/l}$.



Obr. 19: Erythrocyty vystavené koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$ a 1000 $\mu\text{g/l}$ (46)

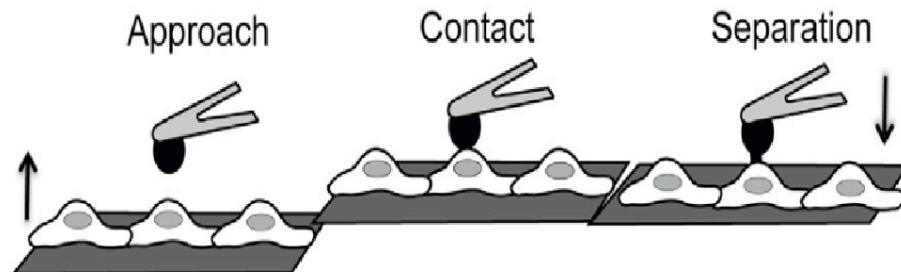
Pomocí světelného mikroskopu byly u každé skupiny spočítáno procento abnormálních buněk. U erythrocytů, které nebyly vystaveny chloridu kademnatému, mělo abnormální tvar 8 % z nich. U erythrocytů vystavených koncentraci 1 $\mu\text{g/l}$ to bylo 67 %, při koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$ 80 % erythrocytů mělo změněný tvar, při koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$ to bylo 95 % erythrocytů a při koncentraci 1000 $\mu\text{g/l}$ mělo 98 % erythrocytů změněný tvar. Pomocí AFM byly zaznamenány změny pružnosti membrány erythrocytů v závislosti na koncentraci chloridu kademnatého. Se zvyšující se koncentrací chloridu kademnatého klesala pružnost membrány. Tyto změny jsou způsobeny oxidačním stresem, který chlorid kademnatý způsobuje. Působením oxidačního stresu dochází k síťování proteinů a oxidaci lipidů. To vede ke změnám ve struktuře membrány a cytoskeletu a následně vede ke změně tvaru erythrocytu a ke změně pružnosti membrány. (46)

5.6 Studování živých buněk

Za použití skeneru přizpůsobeného pro kapalnou prostředí lze pomocí AFM studovat membrány živých buněk, jejich receptory, proteiny a povrchové molekuly. Umožňuje nám také v reálném čase pozorovat buněčné dělení, exocytózu,

endocytózu, exkreci, fúzi membrán a změny membránových receptorů. Velkou výhodou AFM, je tedy možnost studovat živé, nefixované, neupravené buňky ve fyziologickém prostředí při nanometrovém rozlišení. Díky tomu například nedojde k porušení některých struktur úpravou a fixací preparátu, jako tomu bylo u elektronové mikroskopie. Můžeme tak přímo pozorovat například změny na membráně buňky po vystavení některým farmakům nebo toxinům. (39)

Na špičku hrotu lze přes spojovací molekulu kovalentně navázat protilátku, ligand, substrát či celou nebo jen část buňky. Můžeme tak zkoumat interakci mezi studovanou molekulou na buňce a molekulou navázanou na hrot. Lze tak měřit například sílu, se kterou se váže ligand na receptor nebo protilátka na antigen. Po navázání ligandu na receptor se měří síla, která je potřebná k přerušení vazby mezi ligandem a receptorem. Například některé rakovinné buňky mohou mít určitý receptor změněný a výsledná síla mezi receptorem a ligandem, může být odlišná od zdravé buňky. (40; 47) Této metody využil tým vedený V. S. Rajanem, který zkoumal sílu adheze mezi buňkami rakoviny močového měchýře a buňkami endotelu. Zvýšená schopnost adheze rakovinných buněk na endotel přispívá k tvorbě metastáz. Na hrot byla navázána rakovinná buňka, ta má na svém povrchu molekuly CD43 (Cluster of Differentiation 43) a MUC1 (Mucin 1, cell surface associated), které se vyskytují ve zvýšeném množství na povrchu rakovinných buněk močového měchýře. Ligandem této molekuly je molekula CD54 (Cluster of Differentiation 54), která se vyskytuje na povrchu buněk endotelu. Na obr.20 je znázorněn průběh experimentu.



Obr. 20: Adheze rakovinných buněk k endotelu (48)

Síla adheze mezi rakovinnou buňkou močového měchýře a buňkou endotelu byla o 55 až 75 % větší, než mezi normální buňkou močového měchýře a buňkou endotelu. Po navázání protilátek na CD43 a MUC1 se jim znemožnila vazba na CD54, tím se adheze mezi rakovinnou buňkou močového měchýře a buňkou endotelu snížila o 44 až 49 %. Na adhezi se tedy výrazně podílí CD43 a MUC1, ale podílí se na ni i jiné adhezivní molekuly. (48)

Pokud na hrot navážeme substrát, můžeme tak prokázat přítomnost a enzymatickou aktivitu konkrétního enzymu. Když se substrát navázaný na hrot dostane do kontaktu s enzymem, dojde k odštěpení substrátu z hrotu, tím se hmotnost hrotu sníží a zvýší se frekvence kmitání nosníku. Podle množství odštěpeného substrátu a následného snížení hmotnosti nosníku lze určit enzymatickou aktivitu enzymu. Tuto metodu použil tým T. Kwona při určování enzymatické aktivity enzymu

matrixové metaloproteinázy na povrchu rakovinných buněk plic. Tento enzym je schopen degradovat extracelulární matrix a tím potencuje tvorbu metastáz. Pomocí AFM v pokleповém režimu, kdy je na hrotu navázán substrát, lze stanovit enzymatickou aktivitu enzymu. Podle množství odštěpeného substrátu a následného snížení hmotnosti nosníku bylo možné určit enzymatickou aktivitu enzymu, která korelovala se schopností rakovinných buněk tvořit metastázy a s rychlostí jejich tvorby. (45)

Pomocí AFM můžeme také měřit pružnost buněčné membrány a sledovat její změny po vystavení buňky určité farmakologické látce. Pružnost membrány se také mění v závislosti na buněčném cyklu. (47) Některé rakovinné buňky vykazují změny v pružnosti membrány oproti zdravým buňkám. Tým T. Kwona studoval i rozdíl v tuhosti mezi membránou benigních a metastazujících rakovinných buněk prsu. Zjistil že metastatické rakovinné buňky, získané z tělních tekutin onkologických pacientů, jsou v průměru o 70 % tužší než benigní buňky. U rakoviny prsu je tuhost buněk zapříčiněna změnou konformací F-aktinu v cytoskeletu. Na základě četnosti této změny v cytoskeletu lze určit, zda se jedná o buňku benigní, neinvazivní maligní nebo invazivní maligní. (45)

5.6.1 Dotykový režim a studování živých buněk

Dotykový režim se využívá hlavně pro studium tvrdých biologických materiálů jako jsou například kosti nebo zuby, u těchto materiálů totiž nehrozí jejich poškození. Dotykový režim lze využít i pro studování živých buněk, má ale určité nevýhody. Buněčná membrána je elastická a při kontaktu s hrotem dochází k jejímu prohnutí, může tak dojít k odchýlkám ve tvaru a velikosti buňky. Což naštěstí není překážkou pro studování membránových struktur a receptorů. Další překážkou při sledování živých buněk dotykovým režimem je schopnost buněčných proteinů navázat se na povrch hrotu a tím dochází ke snížení rozlišení, tvorbě artefaktů a může dojít i ke kontaminaci. Také může dojít k již zmíněnému poškození buněčné membrány a jejích struktur, při velkém poškození membrány může dojít i ke smrti buňky. (39)

5.7 Srovnávací mikroskopie

Srovnávací nebo také korelativní mikroskopie je metoda, při které se pro zobrazení téže oblasti vzorku používá více druhů mikroskopů nebo mikroskopických metod. Často se kombinují metody tak, abychom získali co nejvíce informací o vzorku. Získané informace ze snímků se mezi sebou srovnávají a vyhodnocují. Lze například kombinovat TEM s infračervenou nanospektroskopií (AFM-IR). AFM-IR kombinuje mikroskopii atomárních sil s infračervenou spektroskopií. Infračervená spektroskopie nám poskytne informace o chemickém složení, povaze chemických vazeb a uspořádání atomů v molekule vzorku. Kombinací snímků s TEM a AFM-IR získáme informace o tvaru, velikosti a povrchu vzorku. TEM má lepší rozlišení v ose x a y než AFM-IR, ta se zase vyznačuje lepším rozlišením v ose z. Tato korelativní mikroskopie byla využita k popisu struktury a proteinové stavby amyloidových fibril na téměř molekulové úrovni. Nevýhodou této korelativní mikroskopie jsou odlišné požadavky na přípravu vzorku pro TEM a pro AFM-IR. Vzorky pro TEM musí být odvodněny, pokoveny a nakrájeny na tenké řezy. Vzorek pro AFM-IR nemůže být pokoven, kov na povrchu by zkreslil výsledky z infračervené spektroskopie. Proto je nutné k zobrazení

vzorku použít nejdříve AFM-IR, následovně vzorek upravit pro TEM a poté ho pomocí TEM zobrazit. Během úpravy vzorku může dojít ke změně nebo poškození jeho struktury. (49)

6 Závěr

V první kapitole jsem popsala stavbu světelného mikroskopu. Vysvětlila jsem pojem ohnisková vzdálenost, hloubka ostrosti, celkové zvětšení, rozlišovací schopnost, rozlišovací mez a numerická apertura. Také jsem vysvětlila, proč je u světelného mikroskopu omezena maximální rozlišovací mez. Uvedla jsem typy světelných mikroskopů, jejich princip fungování a uvedla jsem příklady jejich využití.

V následující kapitole jsem se zabývala transmisním a rastrovacím elektronovým mikroskopem. Popsala jsem odlišnosti v jejich stavbě a v mechanismu pořizování snímku. Vzorky pro elektronový mikroskop se musí složitě upravovat, proto jsem nastínila některé metody jejich úpravy. Také jsem popsala, jak elektrony interagují se vzorkem a jaké informace nám o něm mohou poskytnout. V závěru kapitoly jsem uvedla možnosti využití elektronové mikroskopie.

Poslední kapitola byla věnována mikroskopii atomárních sil, která pro zobrazení vzorku používá kontaktní, bezkontaktní nebo poklepový režim. Mikroskopie atomárních sil umožňuje studovat vodivé i nevodivé vzorky, a to za přítomnosti vzduchu, vodního prostředí nebo vakua. Je tak možné pozorovat živé buňky za fyziologických i experimentálních podmínek. Jedná se o šetrnou metodu, vzorky není třeba složitě upravovat a tím se předejde tvorbě artefaktů během úprav. Mikroskopie atomárních sil nám umožňuje měřit pružnost buněčné membrány a velikost buněk i jejich struktur. Na špičku hrotu je možné navázat antigen, ligand, substrát či buňku. Takto upraveným hrotem lze zkoumat přítomnost určitého enzymu, je taky možné zkoumat sílu mezi navázaným ligandem a buněčným receptorem.

Seznam obrázků

Obr. 1: Schéma světelného mikroskopu (4)	2
Obr. 2: Ohnisková vzdálenost (6).....	3
Obr. 3: Imerzní olej a lom paprsků (4).....	6
Obr. 4: Sférická vada (11)	7
Obr. 5: Chromatická vada čočky (12).....	7
Obr. 6: Schéma optiky u fázového kontrastu (13)	9
Obr. 7: Změny fluorescence telomer (15).....	10
Obr.8: Spinocelulární karcinom (16).....	11
Obr. 9: Orientace kolagenu (19).....	12
Obr. 10: Krevní elementy (20).....	13
Obr. 11: Skenování LSCM (23)	14
Obr. 12: Cévy zvýrazněné fluoroforem (24)	15
Obr. 13 : Schéma TEM (30)	17
Obr. 14 Schéma SEM (30).....	18
Obr. 15: Interakce elektronů se vzorkem (29)	21
Obr. 16: Buňky napadené SARS-CoV-2 (38).....	24
Obr. 17 Části AFM (42)	26
Obr. 18: Erytrocyty vystavené koncentraci 1 µg/l a 10 µg/l (46).....	28
Obr. 19: Erytrocyty vystavené koncentraci 100 µg/l a 1000 µg/l (46).....	28
Obr. 20: Adheze rakovinných buněk k endotelu (48)	29

Citovaná literatura

1. NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA. *Medicínská biofyzika*. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1152-4.
2. KRPATA, František. *Aplikovaná optika 10*. Praha: České vysoké učení technické, 1997. ISBN 80-01-01595-5.
3. HEJTMÁNEK, Milan. *Úvod do světelné mikroskopie. 5*. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 2001. ISBN 80-255-0333-1.
4. *Úvod pro práci s mikroskopem. Skripta ke cvičení* [online]. [cit. 2021-10-12]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/index.html. [Online]
5. HÁLEK, Jan. *Biofyzika pro bakaláře*. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 1996. ISBN 80-7067-663-9.
6. *Rozdíly mezi objektivy. Milujeme fotografii* [online]. Praha, 2010 [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://www.milujemefotografii.cz/rozdily-mezi-objektivy-%E2%80%93-ocima-fotoaparatu>. [Online]
7. HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika. 1*. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902896-1-4.
8. Thorn K. *A quick guide to light microscopy in cell biology*. Mol Biol Cell. 2016;27(2):219-222. doi:10.1091/mbc.E15-02-0088. [Online]
9. HRAZDIRA, Ivo. *Biofyzika: Učebnice pro lékařské fakulty. 2*. Praha: AVICENUM, 1990. ISBN 80-201-0046-6.
10. *Reflected light microscopy*. Oberkochen. Zeiss. [cit. 2021-12-05]. Dostupné z: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/reflected.html>. [Online]
11. *Spherical aberration*. Wikipedia: the free encyclopedia. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2021-12-15]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Spherical_aberration. [Online]
12. *Chromatická aberace*. Wikipedia: the free encyclopedia. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2022-03-06]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatická_aberace. [Online]
13. *Mikroskopy*. GVP. [cit. 2021-11-09]. Dostupné z: http://www.gvp.cz/~vinkle/mafynet/geogebra/fyzika/optika/05_opticke_pristroje/mikroskop/Mikroskopy.pdf. [Online]
14. MEYER, Richard J. a Stacie A. BROWN. *Challenges of the unseen world: A LABORATORY COURSE IN MICROBIOLOGY*. Washington: ASM press, 2018. ISBN 9781555819927.
15. ADAM, Nancy, Tara L. BEATTIE a Karl RIABOWOL. *Fluorescence microscopy methods for examining telomeres during cell aging*. Ageing Research Reviews. 2021,

17.3.2021, 69(101320) [cit. 2022-04-17]. ISSN 1568-1637. Dostupné z: doi:10.1016/j.arr.2021.101320. [Online]

16. SARODE, Sachin C., Gargi S. SARODE a Namrata SENGUPTA. *Fluorescent microscopy based novel methodology for identification of indistinct tumor-stroma junction*. Oral oncology [online]. 2020, 22.2.2020, 104(104605) [cit. 2022-04-18]. ISSN 1368-8375. Dostupné z: doi:10.1016/j.oraloncology.2020.104605.

17. DE ROSSI, Andiara, Lenaldo B. ROCHA a Marcos A. ROSSI. *Application of fluorescence microscopy on hematoxylin and eosin-stained sections of healthy and diseased teeth and supporting structures*. Oral pathology and medicine [online]. 2007, 8.5.2007, 36(377). [cit. 2022-04-18]. ISSN 1600-0714. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00542.x.

18. SURAT, P. *Applications of Polarized Light Microscopy*. AZO Life Sciences [online]. Sydney, 1.2.2021 [cit. 2022-03-05]. Dostupné z: <https://www.azolifesciences.com/article/Applications-of-Polarized-Light-Microscopy.aspx>. [Online]

19. YANG, Bin, Po-Yi LEE a Yi HU. *Instant polarized light microscopy for imaging collagen microarchitecture and dynamics*. Journal of biophotonics [online]. 2020, 26.10.2020, 14(2) [cit. 2022-04-11]. ISSN 1864-0648. Dostupné z: doi:10.1002/jbio.202000326.

20. OJAGHI, A, G CARRAZANA, C CARUSO a A ABBAS. *Label-free hematology analysis using deep-ultraviolet microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A [online]. 2020, 19.6.2020, 26(117) [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.2001404117.

21. HIBBS, Alan R. *Confocal microscopy for biologist. 1*. New York: Springer, 2004. ISBN 978-1-4757-0983-4.

22. *Introduction to Spinning Disk Confocal Microscopy*. Zeiss [online]. [cit. 2021-12-05]. Dostupné z: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>.

23. *Confocal Microscopy. In: Microscopist* [online]. [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: <http://www.microscopist.co.uk/essential-techniques/confocal-microscopy/>. [Online]

24. CROIX, Claudette M., Stuart H. SHAND a Simon C. WATKINS. *Confocal microscopy: comparisons, applications, and problems*. BioTechniques [online]. 2018, 30.5.2018, 39(65) [cit. 2022-04-10]. ISSN 1940-9818. Dostupné z: doi:10.2144/000112089.

25. JÜRGEN, Thomas. *Analytical transmission electron microscopy: An introduction for operators. 2*. London: Springer, 2014. ISBN 978-94-017-8600-3.

26. ROSE, H. H. *Optics of high-performance electron microscopes. Science and Technology of Advanced Materials* [online]. 2008, 9(1), 31 [cit. 2021-12-05]. Dostupné z: doi:10.1088/0031-8949/9/1/014107.

27. *All you wanted to know about Electron Microscopy...: ...but didn't dare to ask!*. FEI Company, 2006. ISBN 90-9007755-3.

28. WILLIAMS, David B. *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. 2. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-76500-6.
29. *Skenovací elektronový mikroskop (SEM)*. MATCA [online]. MATCA, 2019 [cit. 2021-11-26]. Dostupné z: <https://matca.cz/technologie/analyticke-metody/sem/>.
30. GLEICHMANN, Nicole. *SEM vs TEM*. Technology Networks [online]. Gleichmann, 2020, 25.2.2020 [cit. 2022-01-06]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/sem-vs-tem-331262>.
31. *Transmisní elektronový mikroskop (TEM)*. MATCA [online]. MATCA, 2019 [cit. 2021-11-26]. Dostupné z: <https://matca.cz/technologie/analyticke-metody/tem/>.
32. KRUMEICH, Frank. *Properties of electrons, their interactions with matter and applications in electron microscopy*. Laboratory of Inorganic Chemistry, dostupné z: <https://www.microscopy.ethz.ch/downloads/Interactions.pdf>, 2011, 3.1.2022.
33. *Interakce elektronů se vzorkem*. Encyklopedie fyziky [online]. Jaroslav Reichl, 2006 [cit. 2022-01-08]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1678-interakce-elektronu-se-vzorkem>.
34. BOZZOLA, John J. a Lonnie D. RUSSELL. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. 2. Burlington: Jones and Bartlett Publishers, 1999. ISBN 978-0-7637-0192-5.
35. GHADIALLY, Ferozen N. *Diagnostic electron microscopy of tumours*. 2. London: Butterworth, 1985. ISBN 0-407-00299-5.
36. AKHOURI, Sinha A. *Identification of metastatic cell nucleus in human prostate cancer by electron microscopy*. Future Science OA [online]. 2020, 7.7. 2020, 6(9) [cit. 2022-04-02]. ISSN 2056-5623. Dostupné z: doi:10.2144/fsoa-2019-0141.
37. GOLDSMITH, Cynthia S. a Sara E. MILLER. *Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2009, 22(4), 552-563 [cit. 2022-02-16]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00027-09.
38. HOPFER, Helmut, Martin C. HERZIG a Rainer GOSERT. *Hunting coronavirus by transmission electron microscopy – a guide to SARS-CoV-2- associated ultrastructural pathology in COVID-19 tissues*. *Histopathology* [online]. 2020, 27.9.2020, 78(3), 358-370 . [cit. 2022-04-25.]Dostupné z: doi:10.1111/his.14264. [Online]
39. JENA, Bhaun P. a J.K. Heinrich HÖRBER. *Atomic Force Microscopy in Cell Biology*. 1. San Diego: Academic Press, 2002. ISBN 0-12-544171-1.
40. PAROT, Pierre a Yves F. DUFRENE. *Past, present and future of atomic force microscopy in life sciences and medicine*. *Journal of Molecular Recognition* [online]. John Wiley, 2007, 14.12.2007, (20), 14 [cit. 2021-12-26]. Dostupné z: doi:10.1002/jmr.857.
41. VOIGTLÄNDER, Bert. *Atomic force microscopy*. 2. Switzerland: Springer, 2019. ISBN 978-3-030-13653-6.

42. FERNANDO, Gayanath W. *Chapter 5 - Probing Layered Systems: A Brief Guide to Experimental Techniques*. 1570-002X [online]. 2008, 4, 111-130 [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-002X(07)00005-5. [Online]
43. HAUGSTAD, Greg. *Atomic Force Microscopy: Understanding Basic Modes and Advanced Applications*. 1. New Jersey: Wiley, 2012. ISBN 978-0-470-63882-8.
44. EATON, Peter a Paul WEST. *Atomic Force Microscopy*. 1. New York: Oxford University Press, 2010. ISBN 978-0-19-957045-4.
45. KWON, Taeyun a Sundaram GUNASEKARAN. *Atomic force microscopy-based cancer diagnosis by detecting cancer-specific biomolecules and cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA): Reviews on Cancer* [online]. Elsevier B.V, 2019, 2.4.2019, 1871(2), 367-378. [cit. 2021-12-26]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbcan.2019.03.002.
46. DEMCHENKOV, E.L., A.A. NAGDALIAN, R.O. BUDKEVICH a N.P. OBOTUROVA. *Usage of atomic force microscopy for detection of the damaging effect of CdCl₂ on red blood cells membrane*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2021, 15.1.2021, 208(111683). [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111683.
47. Deng, X., Xiong, F., Li, X. et al. *Application of atomic force microscopy in cancer research*. *J Nanobiotechnol* 16, 102 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0428-0>.
48. RAJAN, Vinoth S., Claude VERDIER a Claude. *Unraveling the Receptor-Ligand Interactions between Bladder Cancer Cells and the Endothelium Using AFM*. *Biophysical journal* [online]. 2017, 112(6), 1246-1257 [cit. 2022-04-12]. ISSN 0006-3495. Dostupné z: . 10.1016/j.bpj.2017.01.033.
49. *Correlative infrared nanospectroscopy and transmission electron microscopy to investigate nanometric amyloid fibrils: prospects and challenges*. PARTOUCHE D., MATHURIN, J., MALABIRADE, A., MARCO, S., SANDT, C., ARLUISON, V., DENISET-BESSEAU. *Journal of microscopy* [online]. 2019, 19.1.2019, 274(1) [cit. 2022-04-15]. ISSN 1365-2818. Dostupné z: doi:10.1111/jmi.12779.