

SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE

- využívá k zobrazení objektů viditelné světlo
- má rozlišovací schopnost asi 0,25 μm .

Pozorování obrazu ve viditelném světle je omezeno schopnostmi našeho zraku a vlnovou délkou světla = největší zvětšení ve světelném mikroskopu je cca 1000x, další zvětšení je „prázdné“, tj. nepřináší zlepšení rozlišovací schopnosti.

Světelný mikroskop se skládá:

- a) z **mechanické části** = stativ mikroskopu, tubus s revolverovým měničem objektivů a držák osvětlovací soustavy
- b) z **optiky** = objektivy a okuláry
- c) z **osvětlovacího zařízení** = zdroj světla + kondenzor

Zdrojem světla je zpravidla ve stativu zabudovaná klasická nebo halogenová žárovka. V některých speciálních případech jsou mikroskopy vybaveny rtuťovou výbojkou (fluorescenční mikroskop), emitující široké spektrum světla o velké intenzitě, kde pomocí filtrů lze získat světlo o žádoucí vlnové délce.

Lze připojit kameru - digitální obraz - možnost **počítačové analýzy obrazu** (využití hl. výzkumně; možné užití v diagnostice: měření velikostí, vzdálenosti od okrajů apod.).

Typy pozorování:

- a) **diaskopické** - pozorování v procházejícím světle
- b) **episkopické** - pozorování v odraženém světle (fluorescenční mikroskopie; neprůhledné objekty)

Kvalitu a cenu mikroskopu určuje optika.

OBJEKTIV:

- složen z řady čoček z různých druhů skla, které se vyznačují vysokým indexem lomu a širokou spektrální propustností. Výsledkem má být nezkraslený, jasný a ostrý obraz pozorovaného objektu.

Typy objektivů podle korekce chromatických aberací a rovinatosti obrazu (sférické aberace):

- **ACHROMÁTŮ** - korekce chromatických aberací pro dvě barvy spektra: modrou a červenou (které se pak lámou do společného ohniska)
- **FLUORITY** (také SEMI-APOCHROMÁTŮ) - mají korekci pro dvě až tři barvy spektra. Oproti achromátům mají vyšší numerickou aperturu (lepší rozlišovací schopnost) a lépe zobrazují barvy objektu
- **PLAN-FLUORITY** - fluority s korekcí do roviny
- **APOCHROMÁTŮ** - nejdokonalejší korekce + nejvyšší numerická apertura = nejlepší rozlišovací schopnost a chromatická korekce pro 3 barvy spektra – červenou, zelenou a modrou, rozšířenou až do tmavě modré
- **PLAN-APOCHROMÁTŮ** - apochromátů s korekcí na rovinatost obrazu; v současné době nejvýkonnější objektivy.

Typy objektivů dle druhů média mezi objektivem a preparátem (v důsledku snahy o sjednocení indexu lomu):

- **SUCHÉ OBJEKTIVY**
- **IMERZNÍ OBJEKTIVY** - užívají vodní či olejovou imerzi

SPECIÁLNÍ TYPY MIKROSKOPŮ:

MIKROSKOP S FÁZOVÝM KONTRASTEM

- využívá zpomalení a odchytky světelných paprsků při průchodu skrz struktury s různou lomivostí (tj. fázový kontrast) x fázové rozdíly oko nepozná
- fázový objektiv převádí fázový posun v amplitudový rozdíl = vnímáme jako rozdíl v intenzitě světla

APLIKACE v diagnostické patologii:

- **studium neobarvených preparátů nebo živých buněk a tkání (tkáňové kultury)**

POLARIZAČNÍ MIKROSKOPIE

- využívá lineárně polarizovaného světla, které kmitá v jedné rovině
- polarizace je uskutečněna filtry (polarizátorem a analyzátorem)
- jsou-li roviny těchto filtrů k sobě kolmé (filtry jsou zkřížené), je zorné pole mikroskopu temné
- jednolomné látky (voda, cytoplasma, buněčné jádro aj.) zůstávají při zkřížených filtrech tmavé = nejsou tedy zobrazeny
- dvojlomné látky (krystaly aj.) mění rovinu kmitu procházejícího světla, a proto jsou při zkřížených filtrech zobrazeny světle na temném pozadí.

APLIKACE v diagnostické patologii:

- **detekce cizorodých látek ve tkáni (např. krystaly SiO₂ u silikózy)**
- **diagnostika amyloidózy (zelený dichroismus v polarizovaném světle)**

FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

Princip: ultrafialové paprsky se při dopadu na některé látky mění v záření s delší vlnovou délkou; což lze pozorovat jako zelenou, žlutou, červenou nebo modrou fluorescenci.

APLIKACE v diagnostické patologii:

1. FISH

2. Imunofluorescence (protilátky značené fluorochromem - FITC, GFP, Cy3...)

- **nefropatologie** - diagnostika glomerulopatií - patologická depozita Ig, komplementu atd.
- **myopatologie** - diagnostika svalových dystrofií - analýza sarkolemálních proteinů svalového vlákna

3. detekce autofluorescence (např. lipopigmenty)

KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP

= laserový skenovací konfokální mikroskop (LSCM)

Princip:

- mikroskopický obraz objektu vytváří počítač na základě intenzity fluorescence měřené bod po bodu, které postupně ozařuje zaostřený laserový paprsek, přičemž fluorescence z míst nad a pod ozařeným bodem je clonou potlačena
 - = poskytuje obraz zaostřené roviny bez rozmazaného pozadí okolních rovin
 - = postupně vzniká série zaostřených optických řezů vzorkem - lze vytvořit trojrozměrné obrazy, kterými lze i otáčet a pozorovat objekt z různých pohledů.

APLIKACE: výzkum

ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

dva základní typy elektronových mikroskopů:

- **Prozařovací (transmisní) elektronový mikroskop - TEM**
- **Rastrovací (řádovací) elektronový mikroskop - SEM**

V diagnostické patologii se využívá TEM.

TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP

Rozdíly mezi světelným a elektronovým mikroskopem:

- k vytvoření obrazu u prvního slouží viditelné světlo, u druhého *paprsek elektronů emitovaný z rozžhaveného wolframového vlákna*
- čočky světelného mikroskopu jsou ze skla, kdežto "čočky" elektronového mikroskopu jsou ve skutečnosti *elektromagnetická pole*
- zatímco světlo se šíří vzduchem, pro nerušený průstup elektronů je zapotřebí vytvořit v tubusu elektronového mikroskopu *vakuum*
- zatímco obraz ze světelného mikroskopu lze pozorovat po výstupu paprsků z okuláru přímo okem, obraz v elektronovém mikroskopu *se pozoruje nepřímo*, projekcí na fluorescenční stínítko nebo jako digitalizovaný obraz (kamera)
- podložním sklům odpovídají v elektronové mikroskopii *kovové sítě* (z mědi), průchod elektronů sítíkou je možný pouze skrz volné otvory

- rozlišovací schopnost až 0,25 nm (využitelná jen v technických aplikacích, při vyšetřování biologických objektů: cca 5 nm)
- zvětšení: až 800 000 x (v diagnostické patologii stačí 2 000 až 50 000 x).

Příprava vzorků pro vyšetření v TEM

- *Odběr materiálu* - velikost bločku by v případě odběru pro elektronovou mikroskopii neměla přesáhnout 1 mm³
- *Fixace materiálu* - nejčastěji aldehydy (glutaraldehyd a formaldehyd) či oxid osmičelý. Měli by být fixace dokonalá, musí fixační tekutina prosytit tkáň dříve, než je poškozena hypoxií = fixaci je třeba zahájit v co nejkratší době po odběru
- *Zalévání materiálu* - musí se zalít do dostatečně tvrdých a přitom krájitelných hmot či materiálů = např. plastické hmoty typu epoxidů
- *Krájení ultratenkých řezů* - řezy tenčí než 100 nm (= ultramikrotomy)
- *Kontrastování („barvení“) ultratenkých řezů* - sloučeniny některých těžkých kovů (uran, olovo, wolfram atd.) = „elektronová barviva“.

APLIKACE v diagnostické patologii:

- **nefropatologie** - diagnostika glomerulopatií a tubulopatií
- **diagnostika myopatií** (zejm. kongenitální + metabolické myopatie)
- **diagnostika periferních neuropatií** (demyelinizace, detekce deposit paraproteinů, amyloidu; diabetická neuropatie)
- **(onkopatologie)**

ENZYMOVÁ HISTOCHEMIE

Histochemie = hraniční obor mezi histologií a biochemií - zjišťování charakteru a distribuce chemických látek „in situ“, tzn. v buňkách a tkáních histologických řezů

- *Princip enzymové histochemie: **enzym převede substrát na barevný produkt***
= lokalizaci a aktivitu enzymu zjišťujeme nepřímo, tj. na základě výsledku jeho činnosti (katalytická histochemie)
- v současnosti lze in situ prokázat asi 150 enzymů
- enzymu je třeba při jeho průkazu nabídnout vhodný substrát, optimální pH a optimální reakční teplotu
- příprava vzorků pro histochemické vyšetření vyžaduje zachovat enzym v co možná nezměněné aktivitě na místech, kde je in vivo - používají se zmražené řezy (svalová biopsie = **mražení v izopentanu** vymraženém v tekutém dusíku)

APLIKACE v diagnostické patologii:

1. SVALOVÉ BIOPSIE - diagnostika myopatií

2. PATOLOGIE GIT (Hirschsprungova choroba a hypoganglionózy)

AD 1: Typy enzymů prokazovaných ve svalové biopsii

ENZYM	LOKALIZACE	APLIKACE
Fiber Type Enzymes		
<ul style="list-style-type: none"> • Myofibrilární ATPáza 	sarkomera - reakce při různém pH umožňují rozlišení vláken I. a II. typu	- onemocnění selektivně postihující jen některý subtyp svalového vlákna (např. <i>steroidní myopatie</i>) - početní distribuce subtypů svalových vláken (např. početní predominance vláken I. typu je typická pro všechny <i>kongenitální myopatie</i>)
Oxidativní enzymy		
<ul style="list-style-type: none"> • SDH = sukcinát dehydrogenáza • COX = cytochrom c oxidáza • NADH-tetrazolium reduktáza 	- mitochondrie (SDH, COX) - mitochondrie + sarkoplazmatické retikulum (NADH-TR)	- diagnostika <i>mitochondriálních myopatií a kongenitálních myopatií</i> (např. central core disease)
Hydrolytické enzymy		
<ul style="list-style-type: none"> • ACP = kyselá fosfatáza 	lysozomy	- diagnostika <i>lysozomálního střádání</i> (např. m. Pompe) - <i>makrofágy</i> v rámci zánětlivých myopatií
Glykolytické enzymy		
<ul style="list-style-type: none"> • fosforyláza (McArdle's GSD V) • fosfofruktokináza (GSG VII) 	cytoplazma	- diagnostika <i>glykogenóz</i>

AD 2: Diagnostika aganglionóz a hypoganglionóz

- **NADH-tetrazolium reduktáza**
- **Acetylcholinesteráza**

= **detekce gangliových buněk** v myenterických plexech pro jejich kvantifikaci
- provádí se i peroperačně!