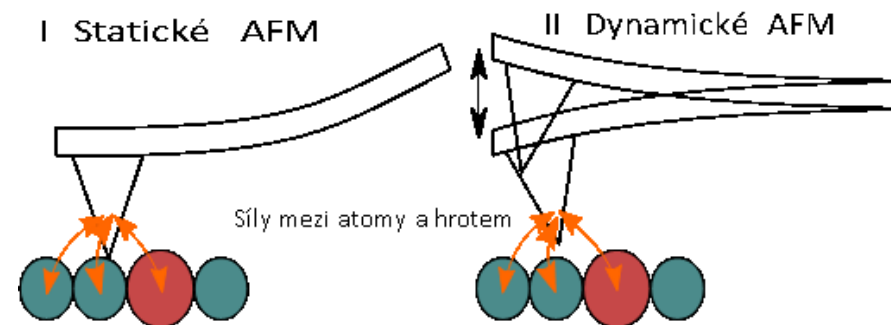


Přednášky z lékařské biofyziky

Mikroskopie



Obsah přednášky

Optická (světelná) mikroskopie

Fyzikální principy mikroskopie

Variety optických mikroskopů

Fázový kontrast

Fluorescenční mikroskop

Speciální optické mikroskopy

Laserový konfokální skenovací mikroskop

Superrozlišující mikroskopy

Elektronová mikroskopie

Transmisní elektronový mikroskop

Skenovací elektronový mikroskop

Mikroskopie skenující sondou

Skenovací tunelový mikroskop

ATM - Atomic force microscopy

Optická (světelná) mikroskopie - Úvod

Prostorové rozlišení lidského oka ze vzdálenosti 25 cm je přibližně 14 čar na mm (odpovídá rozlišení dvou bodů vzdálených 0,07 mm od sebe).

Lupa může toto rozlišení podstatně zvýšit (pro velké rozlišení potřebujeme velký průměr čočky a krátkou ohniskovou vzdálenost). Lupa však nemá dostatečně velké rozlišení pro studium mikrostruktury živé hmoty.

První jednoduché mikroskopy byly vyrobeny v Nizozemí již na konci 16. století. Anthony van Leeuwenhoek (1632-1723) zdokonalil jeho konstrukci a použil mikroskop pro mnoho biologických pozorování.

Sestrojení elektronového mikroskopu (ve 30. letech 20. století). Rozlišení se zlepšilo přibližně 1000x oproti dosavadním mikroskopům, takže bylo možno spatřit velké molekuly (řádově nm). Dnes můžeme pozorovat jednotlivé atomy.

V zásadě můžeme použít jakékoliv vlnění pro zobrazení mikroskopických objektů. Jedinou podmínkou je, aby vlnová délka byla kratší než rozměry pozorovaného objektu –

Difrakční bariéra.

První složené mikroskopy

Robert Hooke 1635-1703

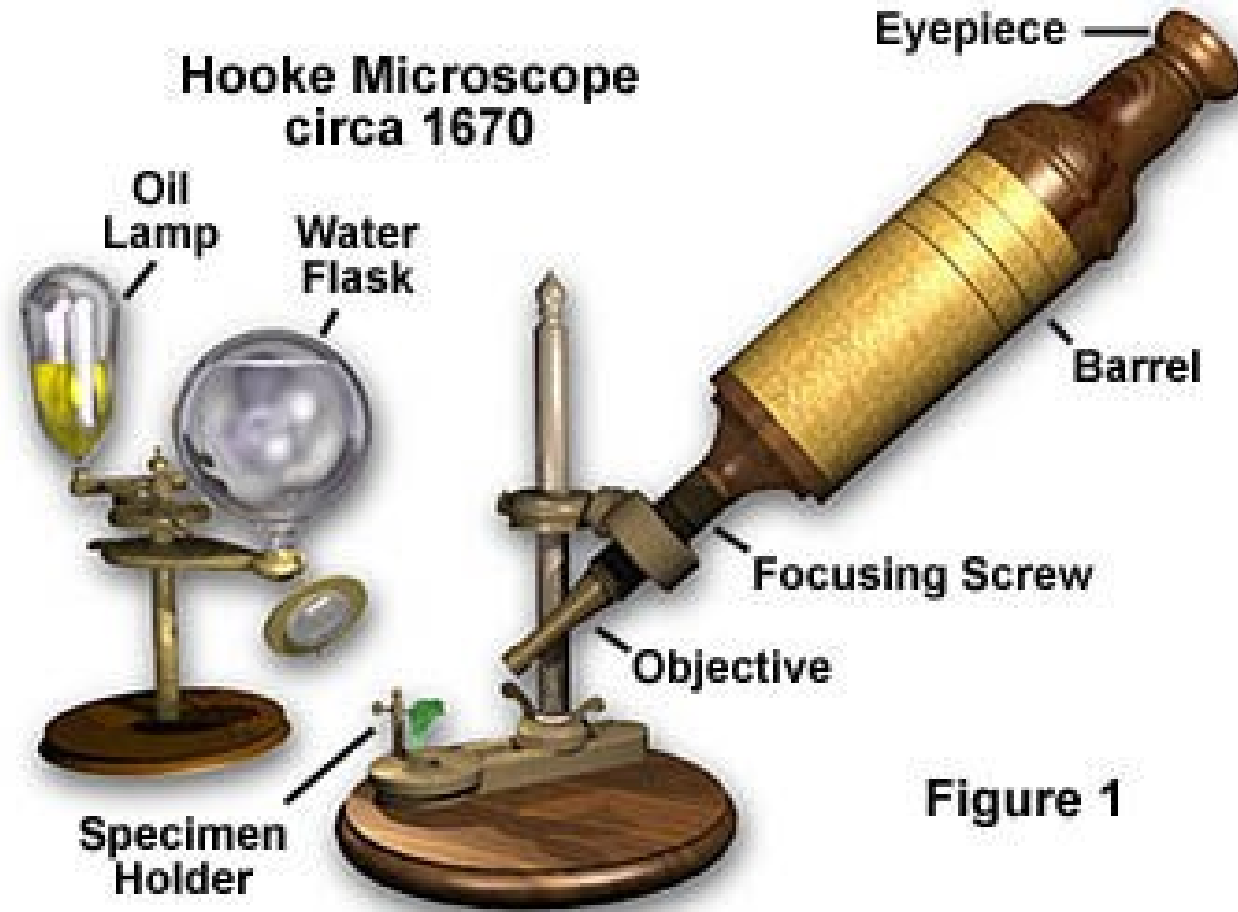


Figure 1

Schéma mikroskopu a vlastnosti jeho optického systému

Hlavní části: dvě soustavy spojných čoček - objektiv a okulár.

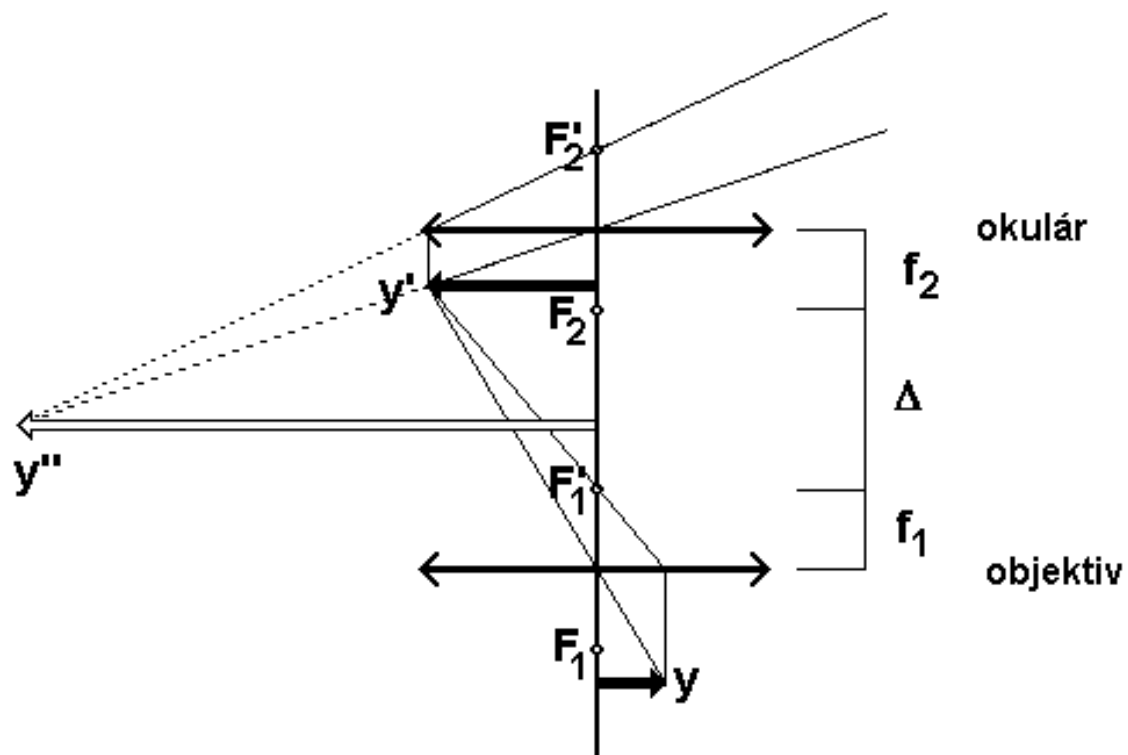
Z hlediska kvality obrazu je nejdůležitější částí mikroskopu **objektiv**, který vytváří skutečný, zvětšený a převrácený obraz. Pozorovaný objekt musí být umístěn mezi ohnisko a dvojnásobek ohniskové vzdálenosti objektivu (objektiv lze považovat za spojnou čočku s velmi krátkou ohniskovou vzdáleností – pro zajištění vysokého rozlišení).

Mechanická část spojující objektiv s okulárem se nazývá **tubus**. Obraz vytvořený objektivem (umístěný hned za předmětové ohnisko okuláru) je pozorován **okulárem** jako jednoduchou lupou. Výsledkem je velmi zvětšený, převrácený a neskutečný obraz.

Kondensor je optickým systémem soustřeďujícím světlo na pozorovaný objekt, zajišťuje jeho dokonalé osvětlení.

Fyzikální principy mikroskopie

Optické schéma a zvětšení mikroskopu



F – ohniska,

f – ohniskové vzdálenosti,

y - předmět,

y' – skutečný obraz předmětu tvořený objektivem,

y'' – neskutečný obraz viděný v okuláru,

Δ – optický interval mikroskopu.

$$M = M_{ob} \cdot M_{ok} = \frac{\Delta \cdot d}{f_{ok} \cdot f_{ob}}$$

d – konvenční zraková vzdálenost (0,25 m),

Δ – optický interval mikroskopu,

f_{ob} a f_{ok} jsou ohniskové vzdálenosti objektivu a okuláru.

Fyzikální principy mikroskopie

Objektivy mikroskopů

60x Plan Apochromat Objective



Fyzikální principy mikroskopie

Objektivy mikroskopů



Různé objektivy vybavené apochromatickou korekcí optických vad objektivu

<http://micro.magnet.fsu.edu/>



Plan-apochromatická korekce optické vady. Objektiv je určený pro mikroskopy využívající fotoaparát nebo kameru k získání záznamu.

Korekce optických vad - Achro a Achromat (achromatické), **FI, Fluar, Fluor, Neofluar, Fluotar** (fluoritové čočky, lepší odstranění kulové a barevné vady), **Apo** (apochromatické, nejvyšší stupeň korekce kulové a barevné vady), **Plan-** korekce zklenutí zorného pole (zaostření rovinného objektu v celém zorném poli mikroskopu)

Fyzikální principy mikroskopie

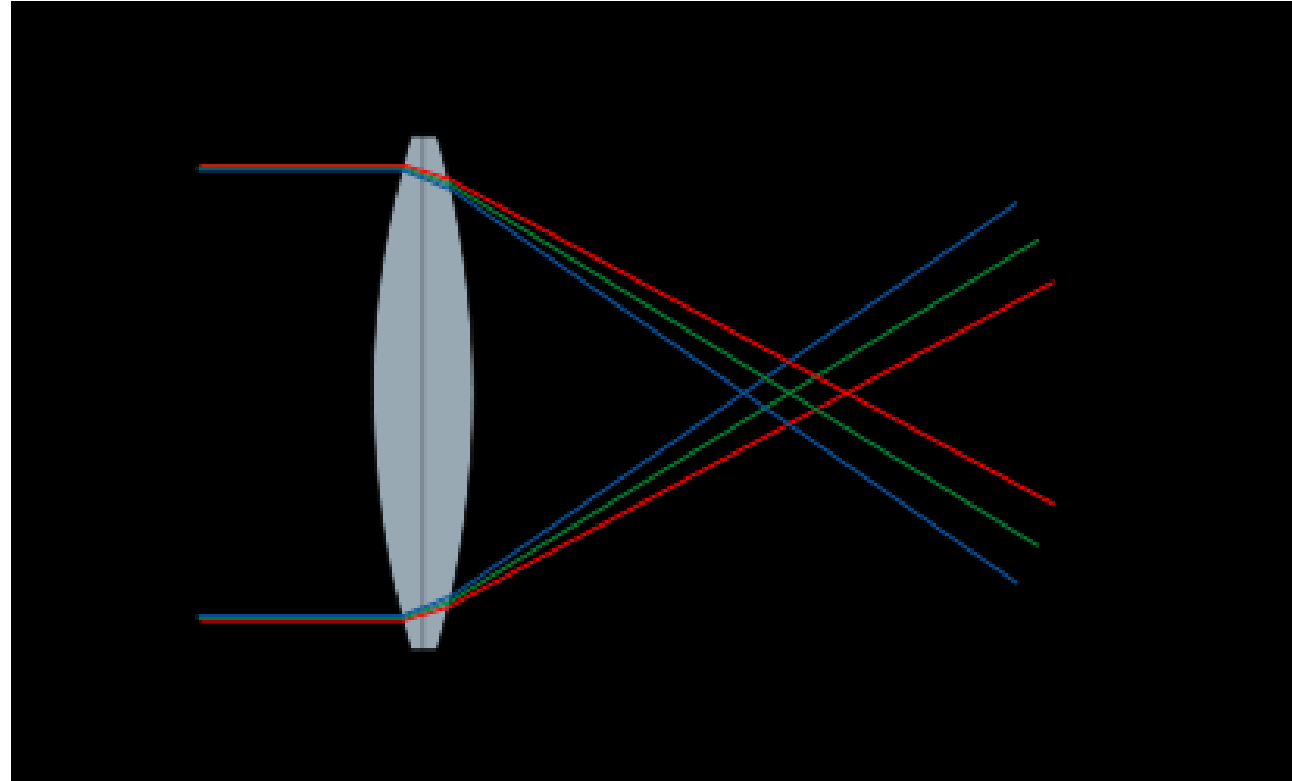
Sférické vady

Sférické zkreslení způsobí deformaci přímek buďto na soudek (uprostřed) nebo na polštářek (vpravo)

- <http://apfyz.upol.cz/ucebnice/down/optmikro.pdf>

Fyzikální principy mikroskopie

Barevné vady



Rozklad bílého světla na barevné spektrum, objektivy jsou korigovány na 2-3 barvy, nejčastěji žlutá, zelená a červená oblast.

Fyzikální principy mikroskopie

Specifikace objektivů - numerická apertura (*NA*)

Numerická apertura –určuje úhel, pod kterým může světlo vstupovat do objektivu (což určuje jas obrazu, čím je *NA* větší, tím je větší zorný úhel),

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

kde *n* je index lomu prostředí mezi objektivem a krycím sklíčkem a α je „zorný“ úhel.

Pro zvýšení *NA* se využívá imersní prostředí s vyšším indexem lomu *n* než má vzduch

$$n_{\text{vzduch}} = 1,003$$

$$n_{\text{voda}} = 1,333$$

$$n_{\text{glycerol}} = 1,473$$

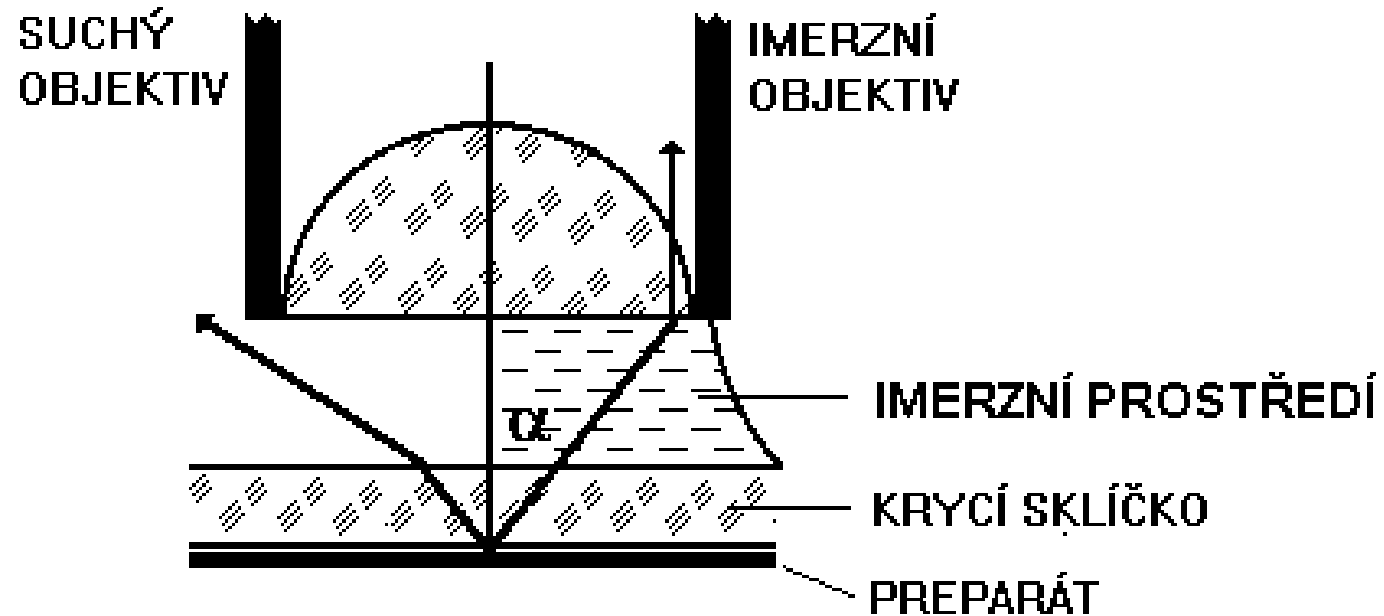
$$n_{\text{cedrový olej}} = 1,515$$

$$n_{\text{bromnaftalen}} = 1,658$$

$$n_{\text{metyleniodid}} = 1,740$$

NA maximální hodnota je kolem 1,5

Použití imerzního prostředí



Levý paprsek opouštějící sklíčko se láme na jeho rozhraní se vzduchem od kolmice a nemůže se podílet na tvorbě obrazu. Pravý paprsek prochází do imerzního prostředí (jež má index lomu podobný jako sklo mezi 1,5 - 1,9), nemění svůj směr a podílí se na tvorbě obrazu.

Fyzikální principy mikroskopie

Další specifikace objektivů

Tloušťka krycího sklíčka (standardně 0,17 mm). Některé objektivy mají **korekční kroužek** pro kompenzaci odchylek od tohoto standardu.

Pracovní vzdálenost – Vzdálenost mezi čelem čočky objektivu a krycím sklíčkem, je-li pozorovaný předmět v ohnisku. Zmenšuje se při rostoucím zvětšení. Novější objektivy mají na sobě údaj o pracovní vzdálenosti v mm.

Barevné kódy – Výrobci mikroskopů označují svoje objektivy barevnými kódy, aby se usnadnila identifikace zvětšení a požadavků na imersní prostředí.

Mez prostorové rozlišovací schopnosti mikroskopu

Mezní rozlišovací schopnost je úměrná numerické apertuře **NA** a nepřímo úměrná vlnové délce λ použitého světla (německý fyzik *Abbe*, 1840-1905).

V některých učebnicích je uváděn výraz pro rozlišovací schopnost:

$$\delta = \lambda/NA,$$

kde δ je vzdálenost dvou ještě rozlišitelných bodů ($NA = n \cdot \sin\alpha$, kde n je index lomu prostředí mezi objektivem a krycím sklíčkem a α je dříve zmiňovaný zorný úhel).

Prostorové rozlišení roste se zvětšením. Kombinací silných spojných čoček bychom mohli sestavit mikroskop s téměř libovolným zvětšením, avšak místo toho zjišťujeme, že za určitou hranicí (hranice „užitečného zvětšení“) se *rozlišení* již nezvětšuje (jde o „prázdné“ zvětšení).

Jestliže se zmenšuje apertura (otvor) kondenzoru, prostorové rozlišení se snižuje, avšak roste kontrast! Proto musíme při volbě apertury kondenzoru dbát o vyváženost prostorového rozlišení a kontrastu. Chceme-li jen snížit jas obrazu, je vhodnější ztlumit lampu než zmenšit apertura kondenzoru, protože takto nedojde ke zhoršení rozlišovací schopnosti.

Fyzikální principy mikroskopie

Hloubka ostrosti Z

Jde o tloušťku objektu podél osy z , která se současně nachází v ohnisku. Důležité u silnějších vzorků.

n je index lomu vzorku (resp. tekutiny obklopující mikroskopovaný objekt).

Varianty optické mikroskopie

Pozorování ve **světlém** nebo **tmavém poli**

Stereomikroskop (dva mikroskopy se samostatnými objektivy a okuláry, jejichž optické osy svírají úhel asi 15°) – stereoskopické vidění. V medicíně: **mikrochirurgie**. Obraz nesmí být převrácený. Operační pole je osvětleno optickými vlákny. Ohnisková vzdálenost objektivu se může plynule měnit - zoom – různé prostorové rozlišení.

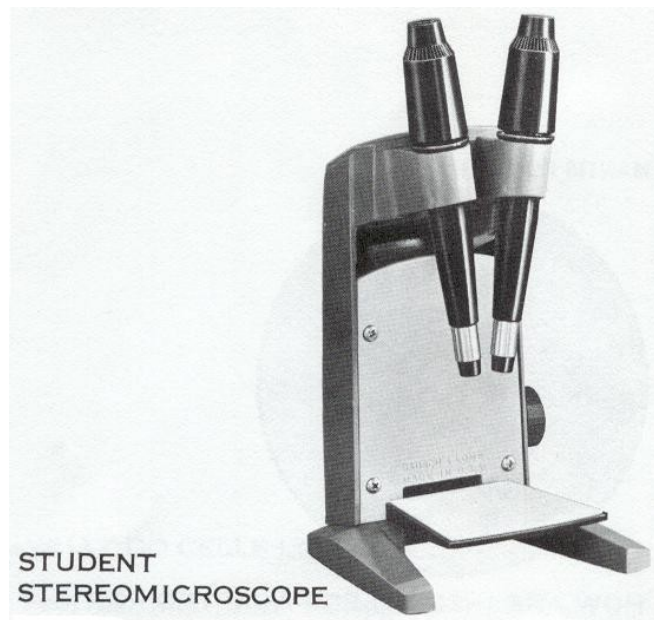
mikrofotografie nebo **mikrokinematografie (video)**.

Software pro zpracování obrazu: mění kontrast, jas, ostrost atd. Pokročilý software umožňuje kvantitativní analýzu obrazu, hledání typických tvarů atd.

Většina druhů mikroskopů může být sestavena z různých objektivů, okulárů, kondenzorů a dodatečně vybavena různými speciálními optickými prvky. Je k dispozici různé příslušenství, např. mikromanipulátory pro umísťování elektrod do buněk, separování organel atd.

Variety optických mikroskopů

Stereomikroskop



- The **OPMI® Vario/NC 33** surgical microscope

Varianty optických mikroskopů

Mikroskop s fázovým kontrastem

Tato technika vytváří kontrastní obrazy např. živých buněk, jejichž struktury mají podobný útlum (jsou rovnoměrně průsvitné a proto málo kontrastní v mikroskopu zobrazujícím rozdíly v amplitudě procházejícího světla), avšak lehce se liší svým indexem lomu (v důsledku čehož dochází k fázovým posunům – rozlišení tzv. **fázových objektů**).

Fázově kontrastní technika mění rozdíly ve fázi v rozdíly v amplitudě. Živé buňky mohou být zkoumány ve svém přirozeném stavu, tj. bez fixace a barvení.

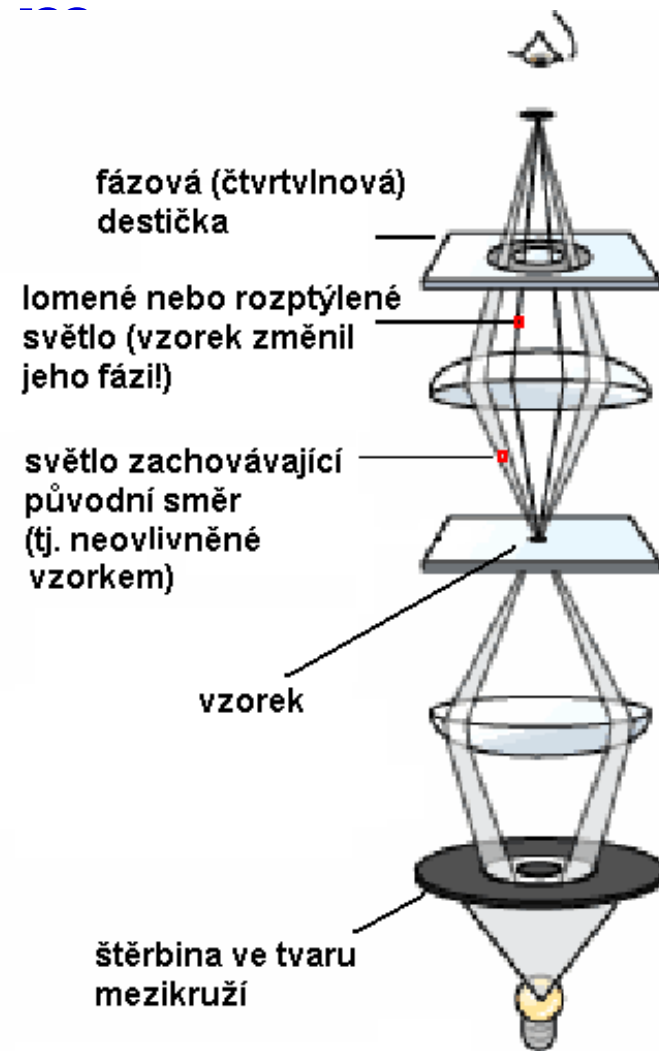
Varianty optických mikroskopů

Mikroskop s fázovým kontrastem

Do přední ohniskové roviny kondenzoru je přidána clona se štěrbinou ve tvaru mezikruží, kterou pak prochází světlo. Když světlo prochází vzorkem, paprsky jsou odchylovány z původního směru a současně různě zpoždovány průchodem různými tloušťkami materiálu objektu.

V obrazové ohniskové rovině objektivu se nachází **fázová destička**, opět ve tvaru mezikruží, jež posunuje fázi o $+\pi/2$ nebo $-\pi/2$, tj. o čtvrtinu vlnové délky. Tato destička propouští paprsky, které nezměnily svůj směr na fázových objektech. Ostatní paprsky destičku minou a jejich fáze se nezmění.

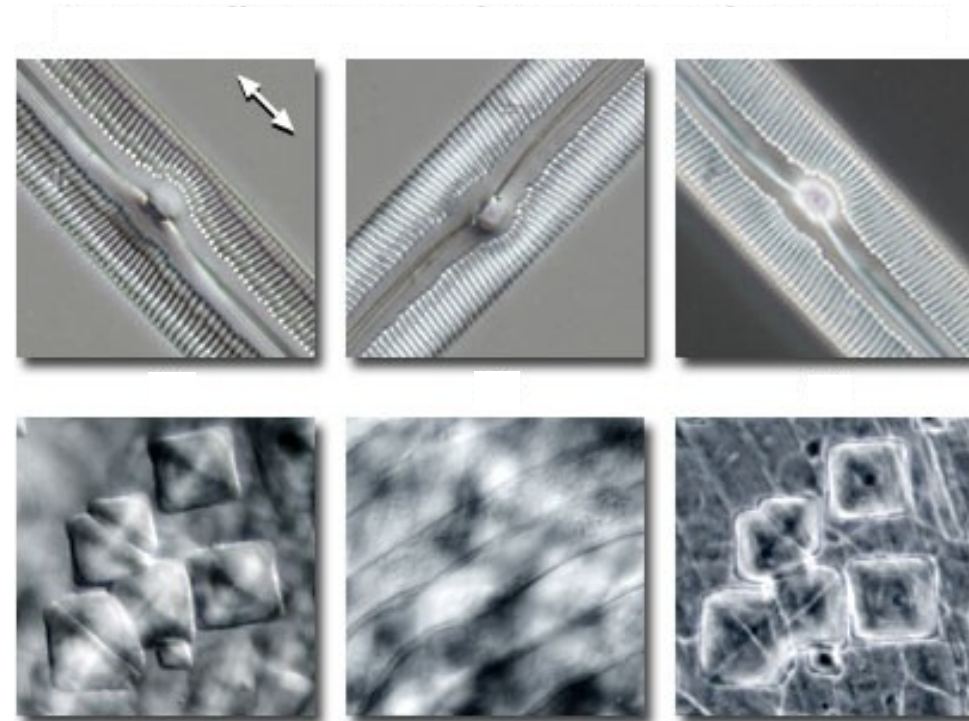
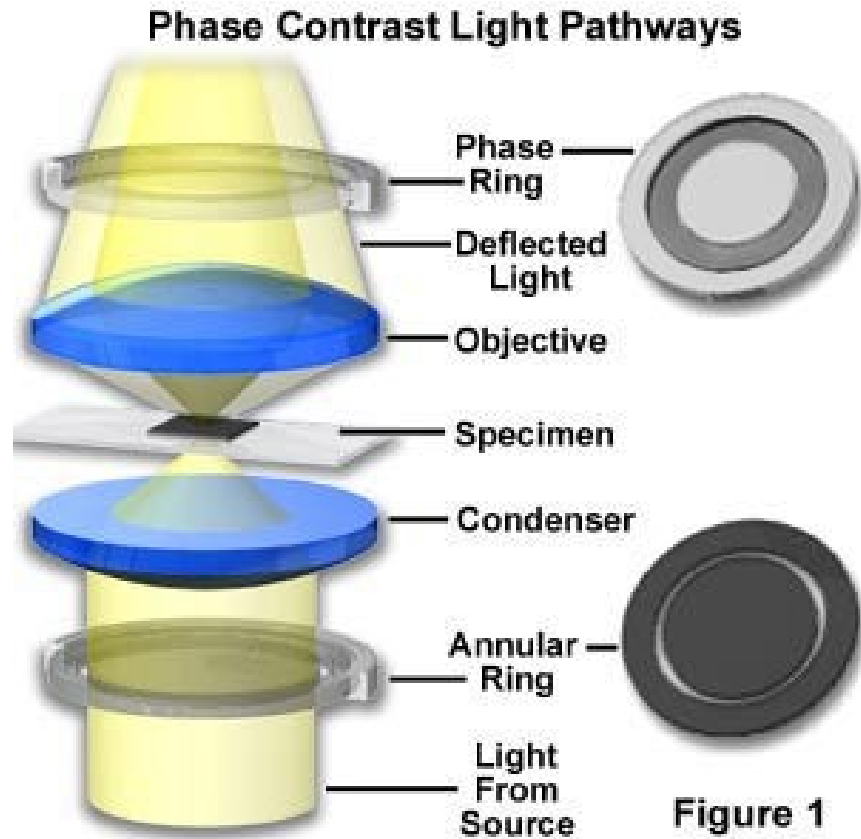
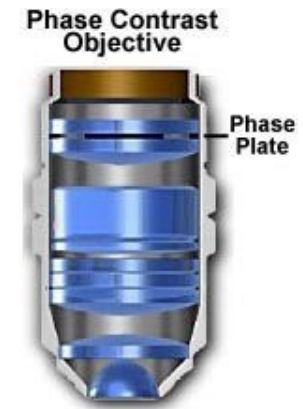
Obraz se vytváří interferencí fázově posunutých a neposunutých paprsků. Fázové objekty pak vypadají jako tmavé nebo světlé vůči svému okolí (pozitivní nebo negativní kontrast).



Podle
<http://www.nobel.se/physics/educational/microscopes/phase/>

Varianty optických mikroskopů

Mikroskop s fázovým kontrastem



<http://micro.magnet.fsu.edu/>

<http://micro.magnet.fsu.edu/>

Varianty optických mikroskopů

Mikroskop s fázovým kontrastem

Mnohé bezbarvé biologické objekty (obtížně pozorovatelné v běžném mikroskopu) jsou fázovými objekty. Barviva je mohou zviditelnit, jsou však často pro buňky jedovatá. Fázově kontrastní mikroskopy umožňují pozorovat takovéto objekty bez barvení.



Améba ve fázovém kontrastu, $Z = 250\times$
(www.durr.demon.co.uk/colour.html.)

Varianty optických mikroskopů

Fluorescenční mikroskop

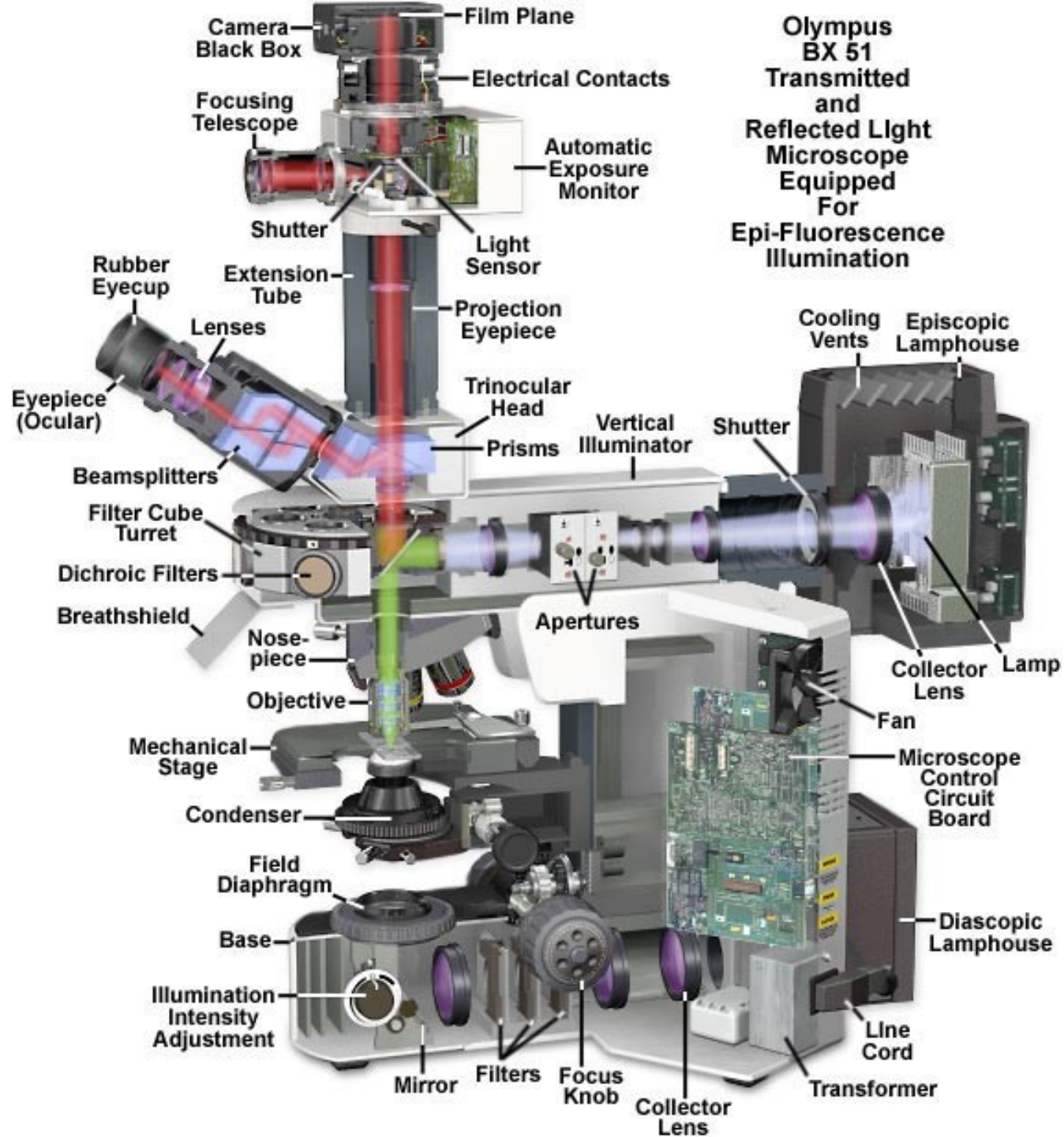
Fluorescenční mikroskopie je založena na schopnosti některých látek emitovat viditelné světlo po ozáření světlem o kratší vlnové délce (UV záření nebo fialové světlo).

Optika kondenzoru musí být přizpůsobena UV záření (křemenné, kazivcové sklo), které však může k preparátu přicházet též objektivem (horní osvětlení). Zbývající části mikroskopu jsou stejné jako u běžných mikroskopů. Nutná je ochrana očí před UV zářením (UV filtry).

Fluorescenci vykazuje např. tryptofan či jiné sloučeniny s aromatickým kruhem či heterocyklem. Ve většině případů se však ke vzorkům přidávají **fluorescenční barviva** specificky interagující s různými buněčnými strukturami. Často je barvivo (fluorochrom, fluorescenční sonda) vázáno na (monoklonální) **protilátku** specifickou pro některou bílkovinu. Tato imunofluorescenční metoda může selektivně zviditelnit např. cytoskelet, chromatin či různé membránové bílkoviny.

FM

Varianty optických mikroskopů

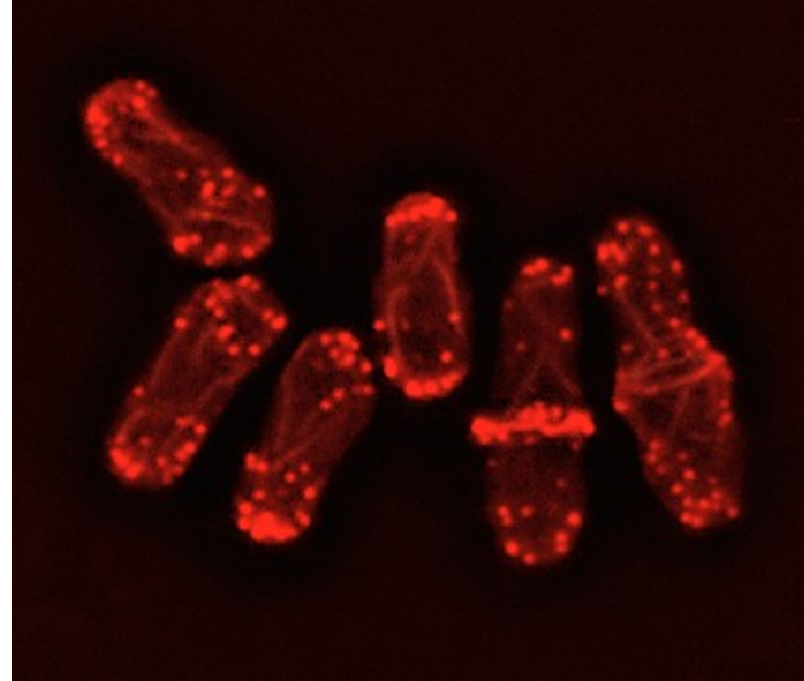


Varianty optických mikroskopů

Fluorescenční mikroskop



Viriony v infikované buňce -
<http://usa.hamamatsu.com/sys-biomedical/slc2400/slc-smpl.htm>



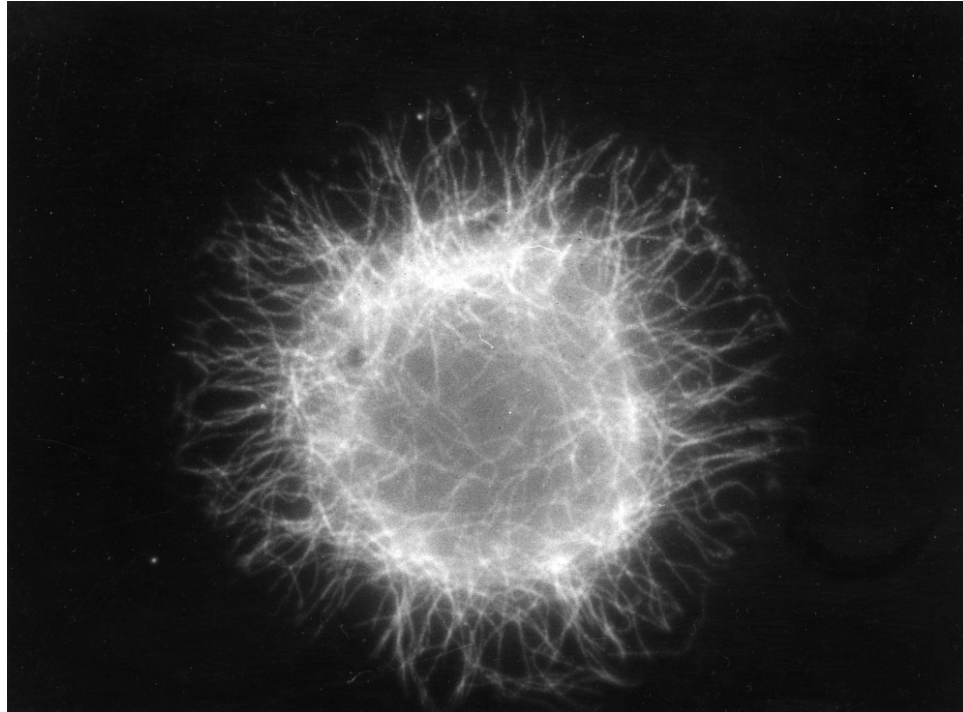
Aktinová vlákna kvasinek zviditelněná fluorescenční mikroskopií – barveno rhodaminem-phalloidinem

www.paulgyoung.com/.../fission_yeast_actin_cytoskeleton.htm.

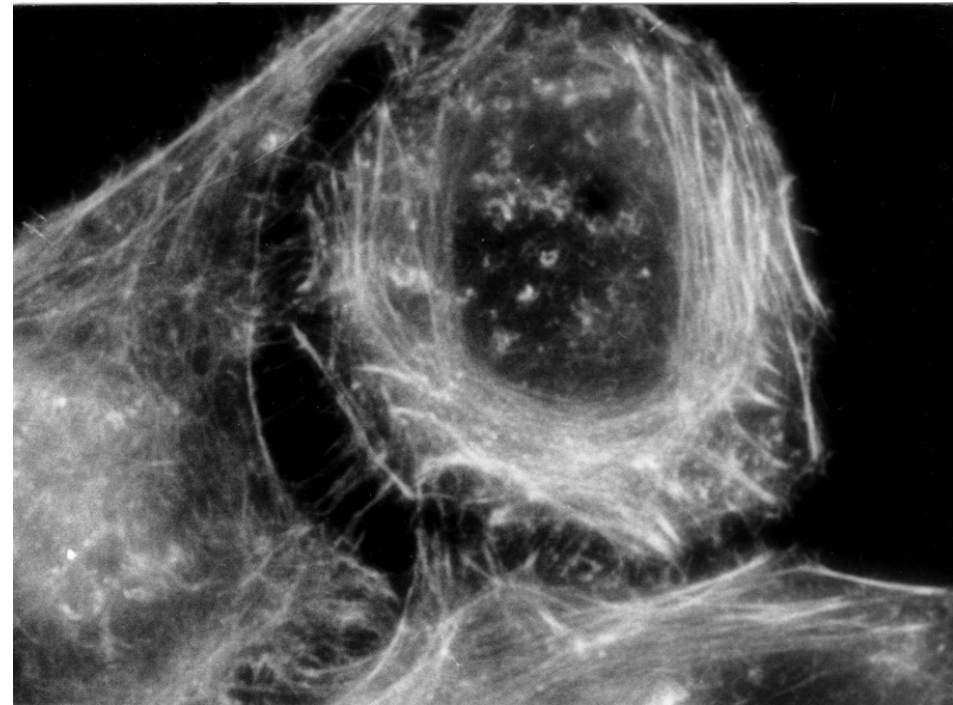
Variety optických mikroskopů

Fluorescenční mikroskop

Cytoskelet zviditelněný imunofluorescenční metodou



Mikrotubuly HeLa buněk



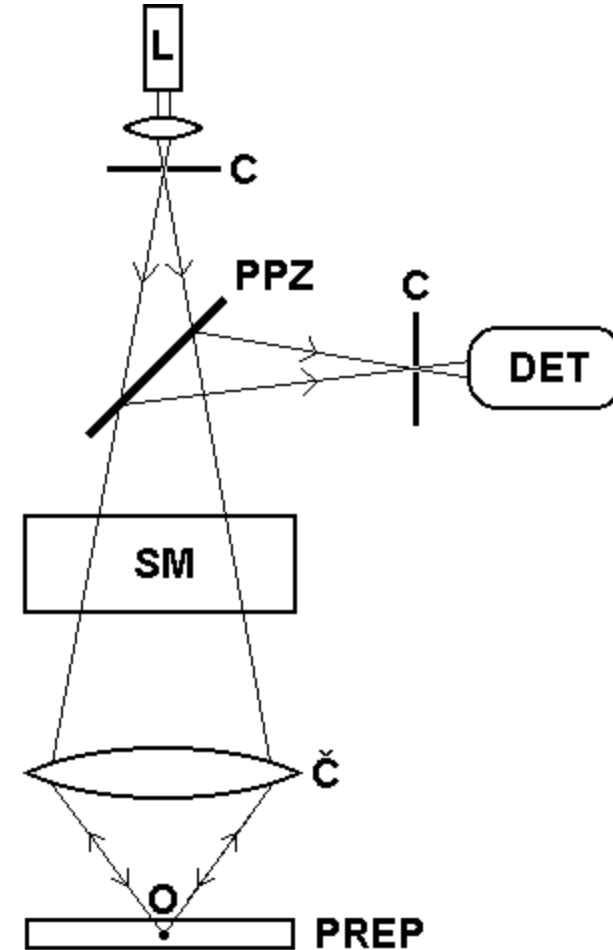
Mikrofilamenta HeLa buněk

Speciální optické mikroskopy

Konfokální laserový skenovací mikroskop

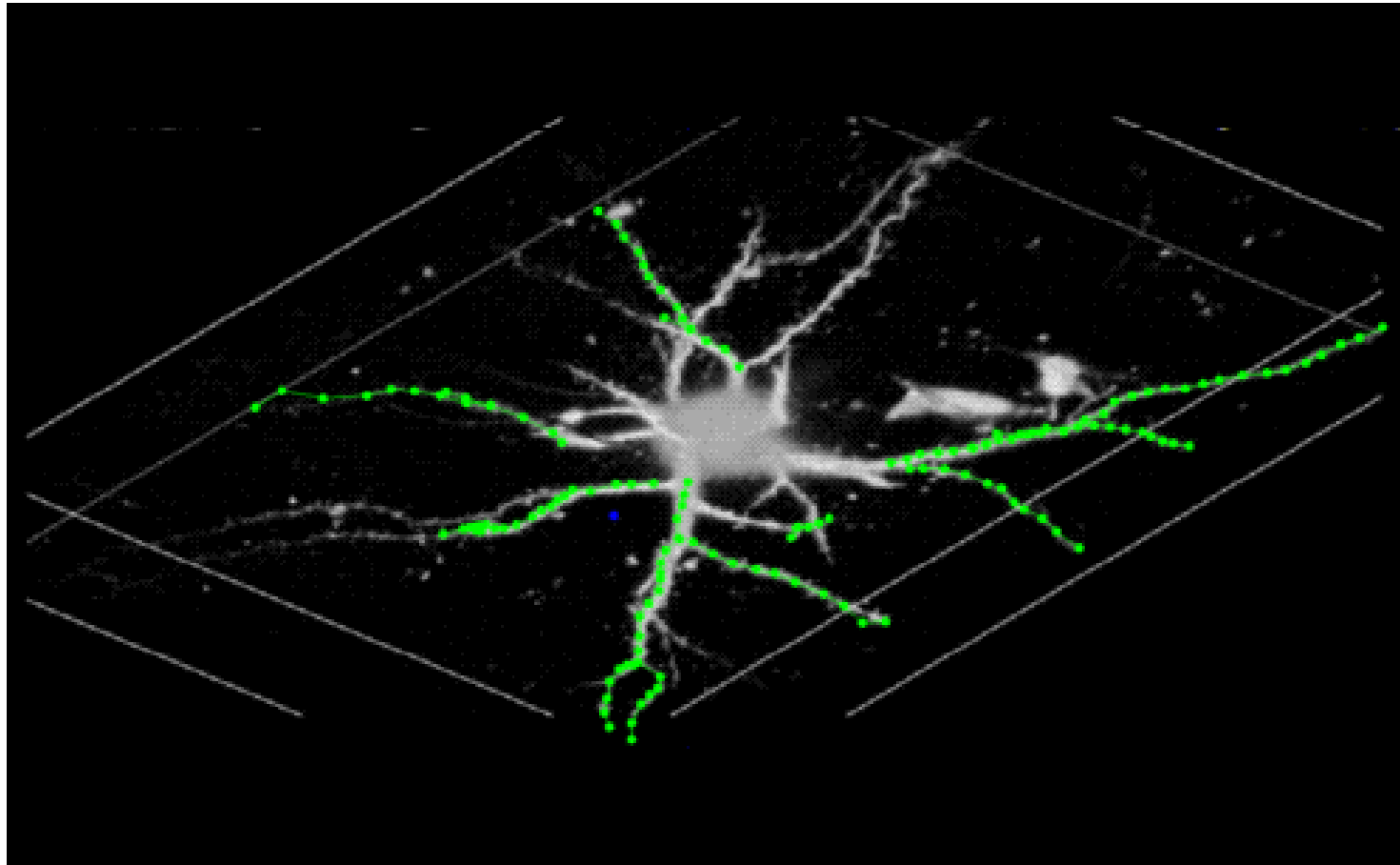
L - laser, C – clony s malými kruhovými otvory, PPZ – polopropustné zrcadlo, DET – detektor světla (fotonásobič), SM – skenovací mechanismus, Č – čočka objektivu (projektivu), O – bodový předmět, PREP – preparát (řez).

Pouze paprsky odražené od bodových struktur v ohnisku mohou projít přes clonu C před detektorem. Ostatní paprsky (rozptýlené) jsou zastaveny clonou. Tyto paprsky by u běžného mikroskopu zhoršovaly kvalitu obrazu, protože snižují kontrast. Pomocí tohoto mikroskopu můžeme zkoumat poměrně silné nativní řezy. Skenovací mechanismus je systém rotujících zrcadel, která mohou s ohniskem pohybovat v hustých rovnoběžných liniích.



Konfokální laserový skenovací mikroskop

V praxi se používá imunoznačení pro specifikaci pozorovaných struktur, zvýraznění chromozomů, membránových receptorů.



3D obraz neuronu, fluorescence - <http://www.cs.ubc.ca/nest/magic/neuron.html>

Konfokální laserový skenovací mikroskop

Live Cell Imaging- sledování růstu buněčných kultur v reálném čase v průtokové komůrce
Sledování přímých účinků chemických nebo fyzikálních faktorů na buněčné kultury.



Souběžné použití absorpčního spektrofotometru jako součásti konfokálního mikroskopu, náhrada běžného laseru za „bílý laser“, tj. laser s plynule laditelnými vlnovými délkami 470-670 nm, určený k spektrofotometrickým analýzám - např. určení koncentrace léčiva ve sledovaném vzorku během kultivace.

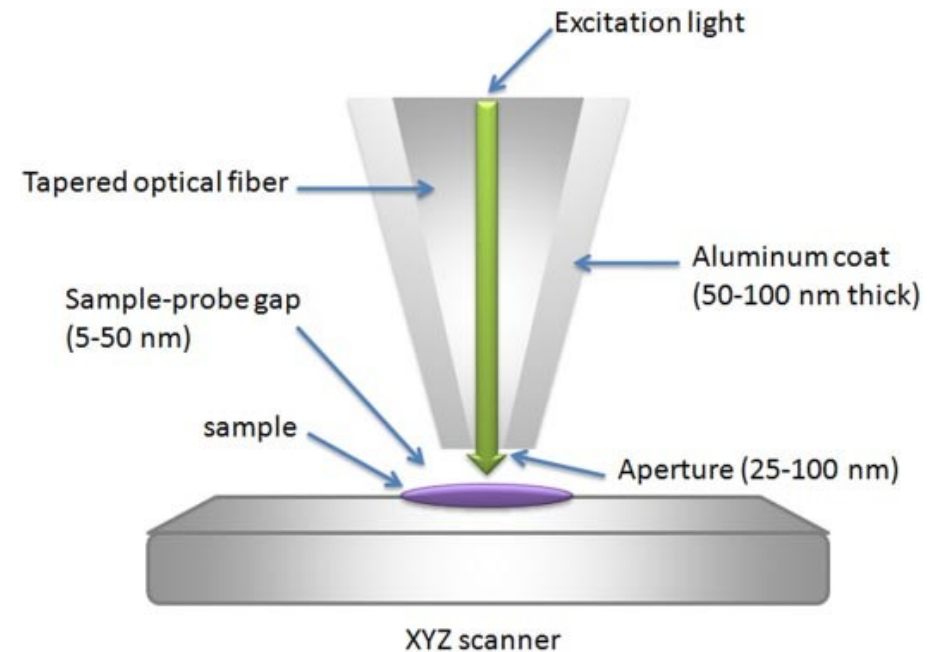
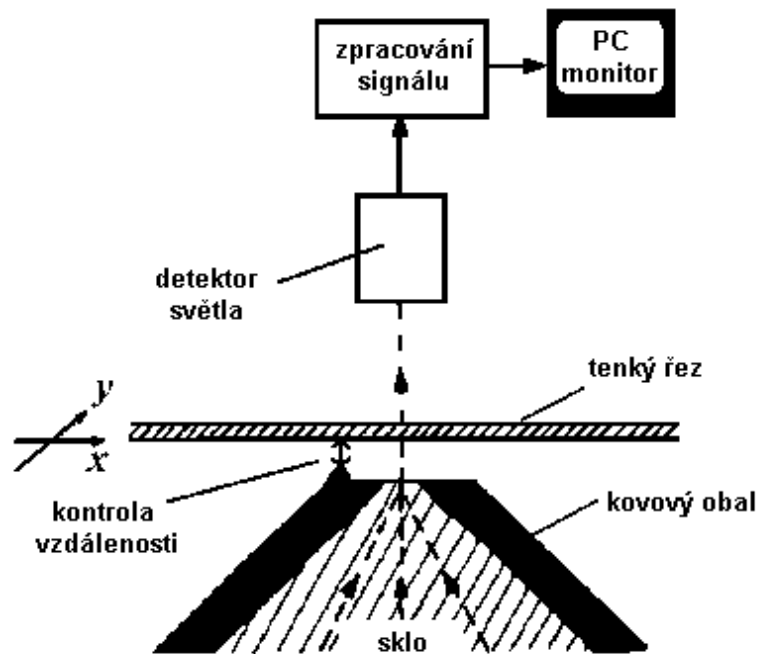
Superrozlišení – prolomení difrakční bariéry

Skenovací mikroskopie v blízkém optickém poli

(near field optical scanning microscopy - NFOSM)

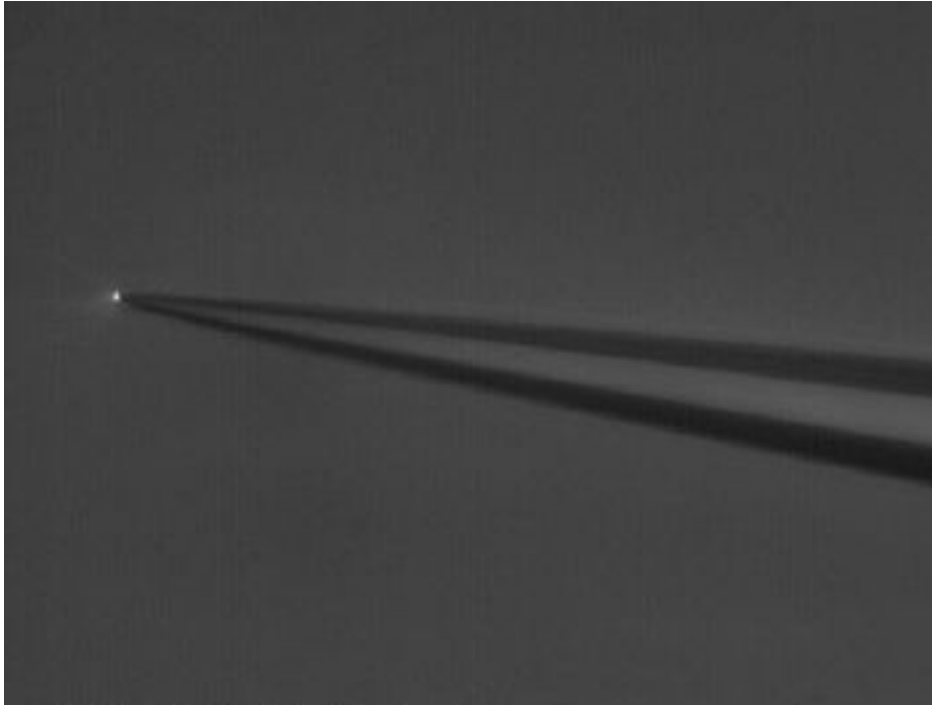
NFOSM = NSOM = SNOM

Schéma mikroskopu pro pozorování v blízkém optickém poli. Úzký svazek světla argonového laseru prochází velmi malým otvorem (\varnothing řádově desítky nm) v kovem pokrytém (hliník) skleněném hrotu. Tenký řez se pohybuje nad otvorem v konstantní vzdálenosti. Obrázek vlevo dle Rontó a Tarjána (1994). Využívány vlastnosti tzv. evanescentní světelné vlny.



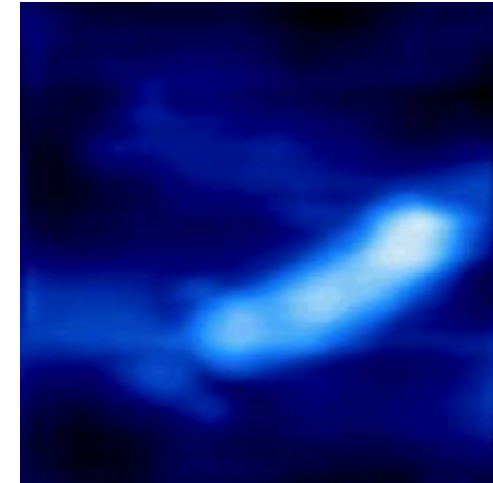
Superrozlišení – prolomení difrakční bariéry:

Skenovací mikroskopie v blízkém optickém poli



Světlo procházející osvětlovacím hrotem přístroje pro skenovací mikroskopii v blízkém optickém poli pozorované v normálním optickém mikroskopu

<http://physics.nist.gov/Divisions/Div844/facilities/nsom/nsom.html>

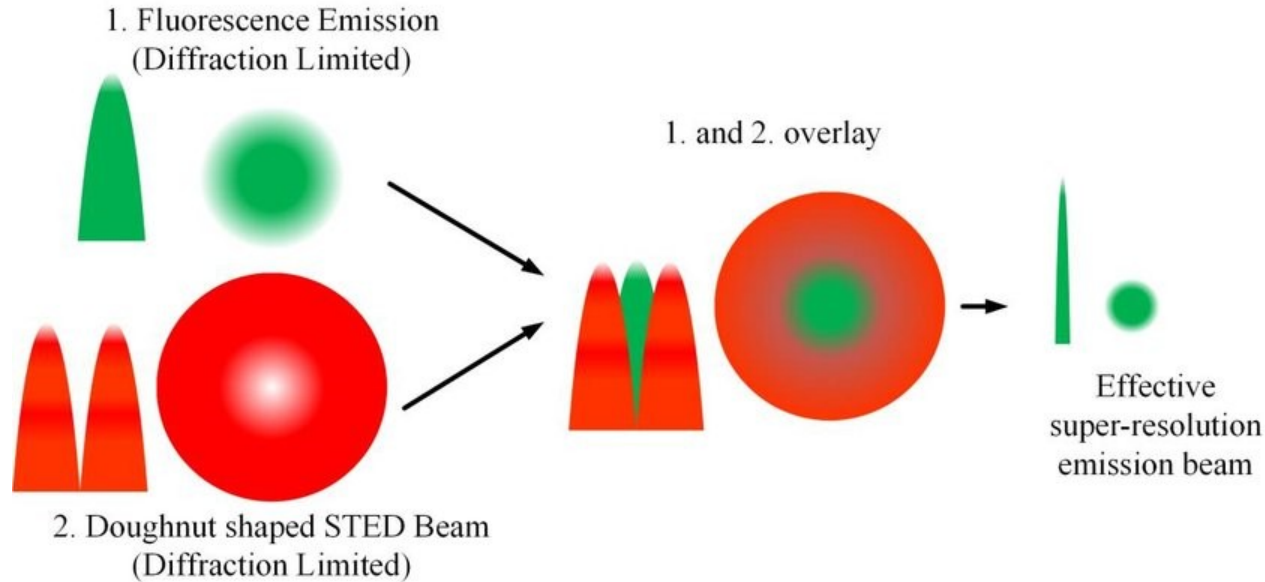


Plasmidová DNA (10 kb)

•http://www.snom.omicron.de/examples/twinsnom/x-tsnom_12.html

Superrozlišení – prolomení difrakční bariéry

Stimulated Emission Depletion – STED

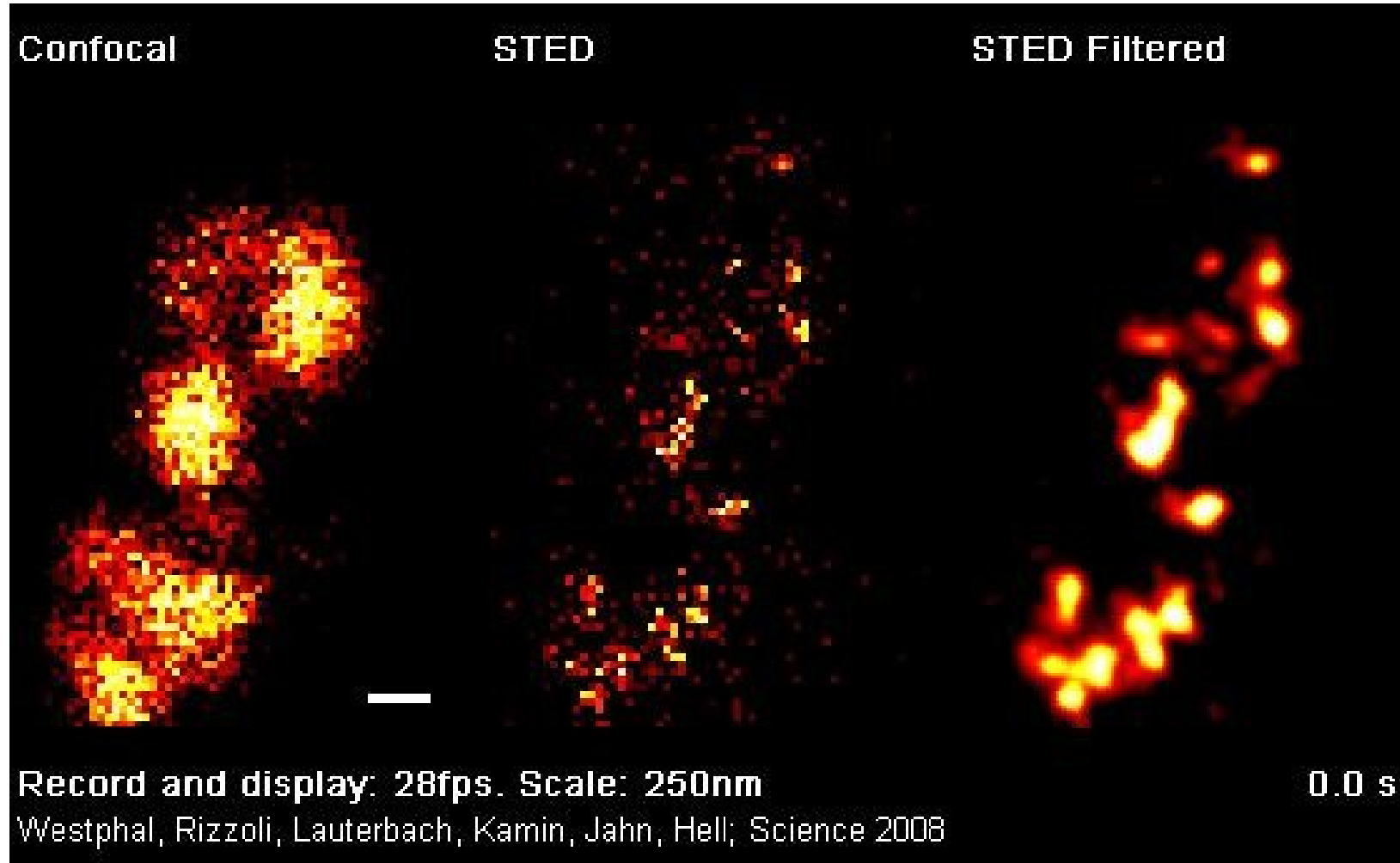


Analogie konfokálního mikroskopu, která využívá zhašení fluorescence ke zlepšení rozlišovací schopnosti – dochází k překonání tzv. difrakčního limitu.

Mikroskop založený na principu fluorescence v kombinaci s jejím potlačením. Klasický fluorescenční mikroskop je omezen difrakcí. Pokud ale pro vybuzení fluorescence použijeme laser, jehož svazek má tvar mezikruží - uvnitř zastíněný - a má nižší energii (delší vlnovou délku) než světlo, které by vyvolalo fluorescenci, dojde v místě kam svazek dopadá k potlačení fluorescence. Vnitřní oblast mezikruží na vzorku je vystavené laseru s vyšší energií (kratší vlnovou délkou), která fluorescenci vyvolá. Ta je zaznamenávána - skenovacím způsobem. Rozlišení takového mikroskopu je pak dané velikostí vnitřního otvoru "koblíhy" (z anglického "donut"), dnes kolem 50 nm i méně.

Superrozlišení – prolomení difrakční bariéry

Stimulated Emission Depletion – STED



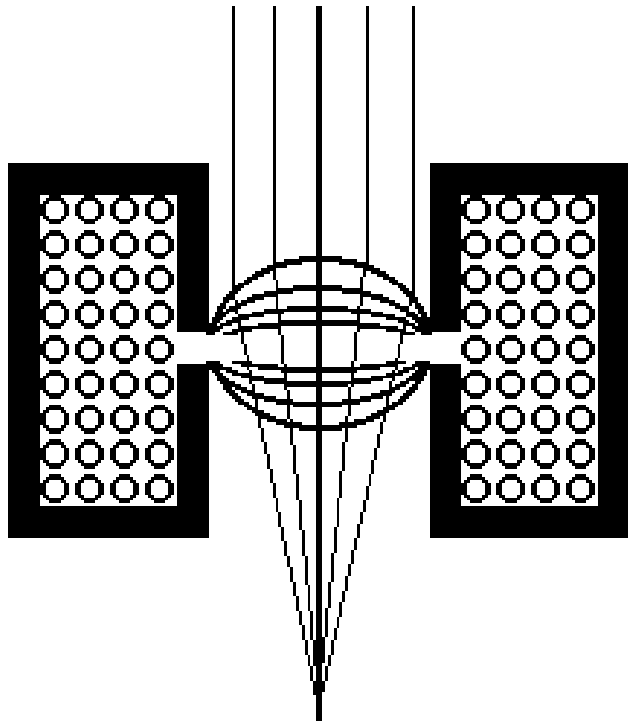
Synaptické vezikuly

Elektronová mikroskopie

„Klasické“ elektronové mikroskopy (EM) používají pro zobrazení svazky urychlených elektronů. Elektrony mají vlnovou délku tzv. **de Broglieových hmotnostních vln**. Připomeňme si následující vztahy:

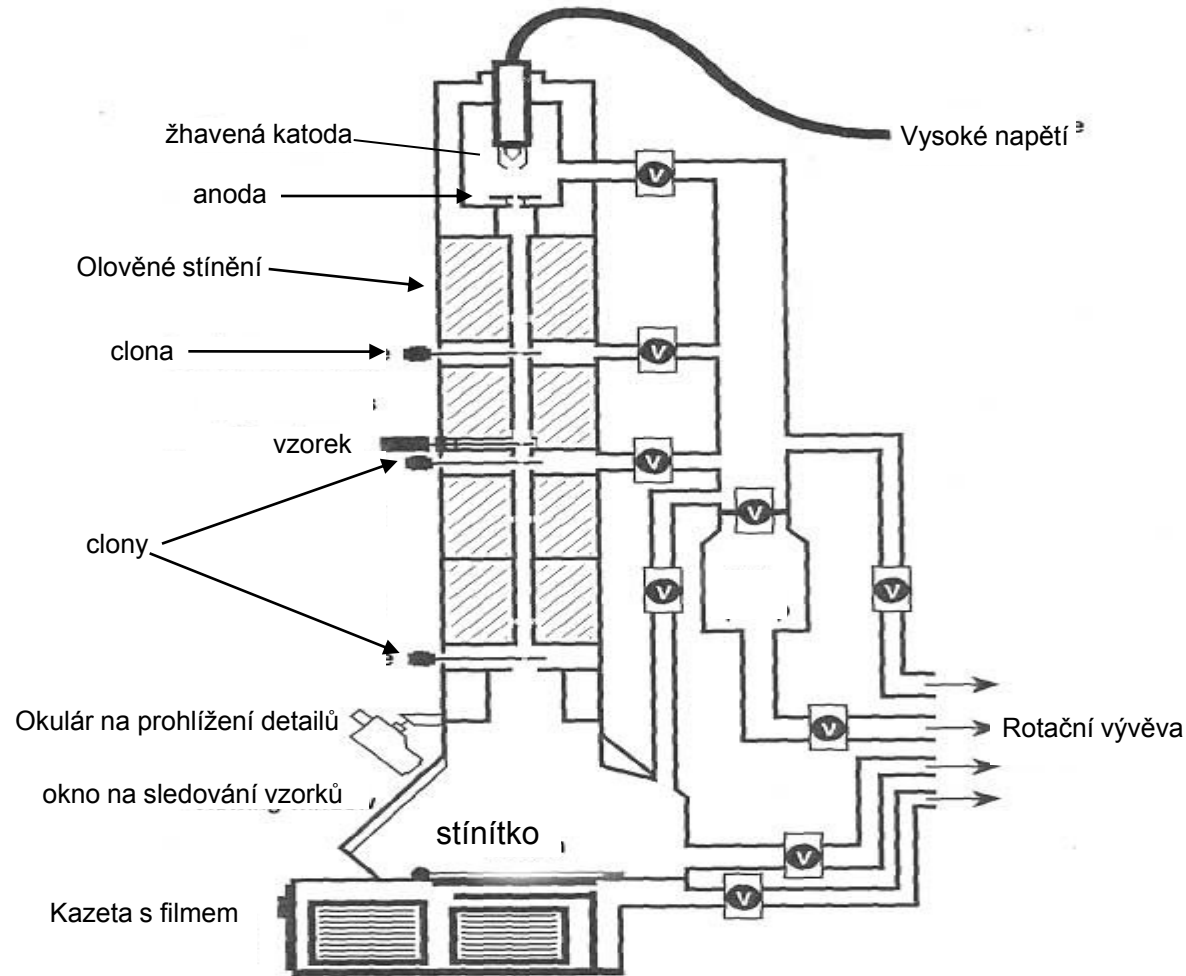
λ je vlnová délka, h Planckova konstanta, m relativistická hmotnost elektronu, v jeho rychlost, e – jeho elektrický náboj a U je urychlovací napětí. Je-li velikost pozorovaných objektů srovnatelná s λ , dochází k difrakci a vytvoření obrazu je znemožněno. Elektron s energií 1,5 eV má vlnovou délku 1 nm. Pomocí urychlených elektronů dosahujeme zhruba 10^5 -krát kratších λ . Viz $\delta = \lambda/n\sin\alpha$. Velké optické vady systému však způsobují, že numerická apertura je velmi malá - řádově 10^{-2} . Prostorové rozlišení EM je v praxi na úrovni několika desetin nm.

Elektronová mikroskopie



Magnetická čočka

Příčný řez cívkou, která je magneticky stíněna pancéřováním. Elektronový svazek je fokusován v místě, kde je pancéřování přerušeno. Magnetická čočka působí na elektrony jako spojka na světlo.



transmisní elektronový mikroskop (TEM)

www.mauricewilkinscentre.org/bioviz/

Transmisní elektronový mikroskop

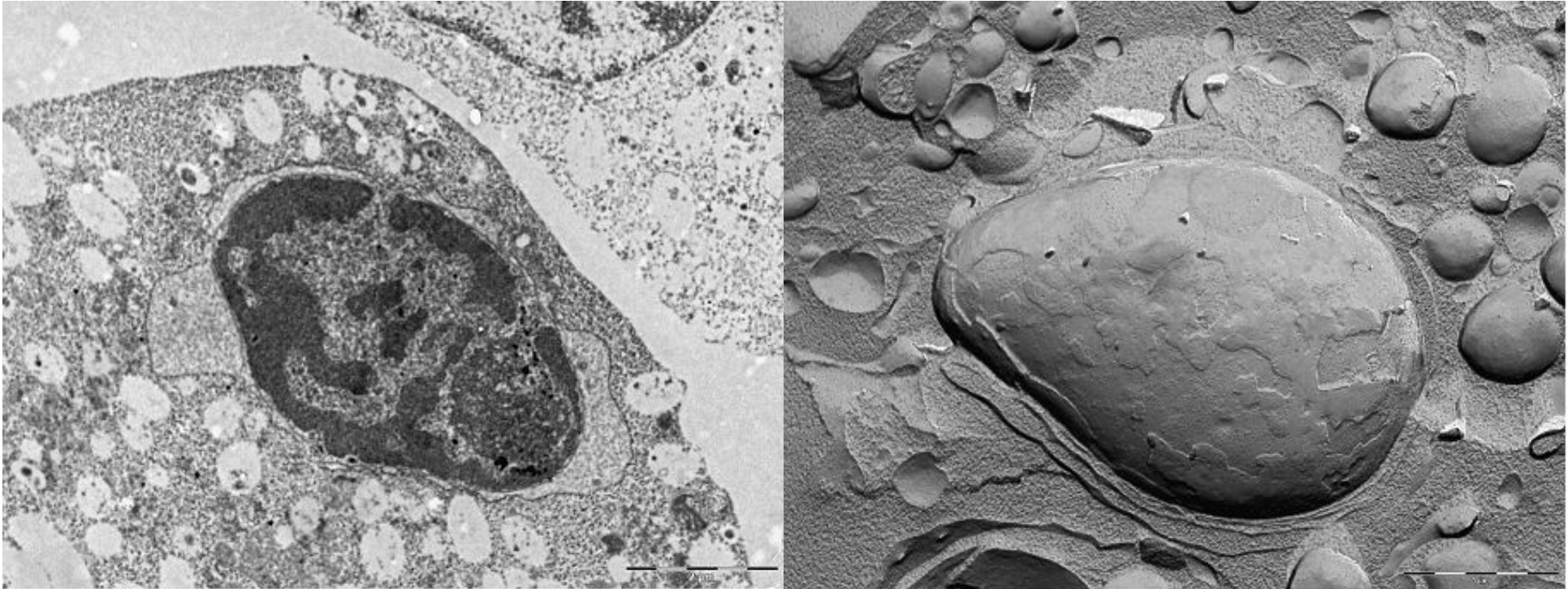


Brookhaven TEM

Zvětšení 50 000 000x, rozlišení 0,1 nm,
Lze provádět simultánně chemickou
analýzu vzorku pomocí rentgenové
spektrometrie (pouze některé prvky).

Transmisní elektronový mikroskop

Rozdíl mezi řezem a replikou



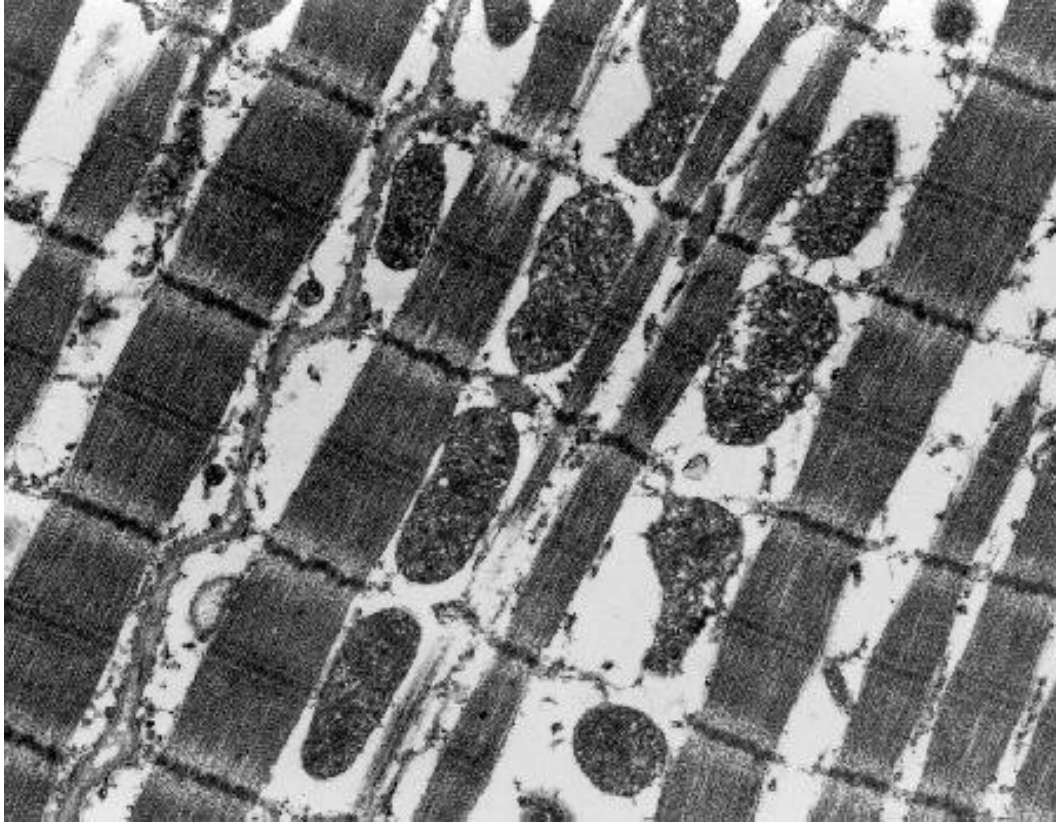
Buňky HL-60, fragment jádra, morfologické změny v průběhu apoptózy.

Levý snímek- ultratenký řez, kontrastování OsO_4 .

Pravý snímek- replika lomu, napařená vrstva Pt a C.

Snímky z TEM MORGAGNI 268 D (Philips), snímané na CCD kameru.

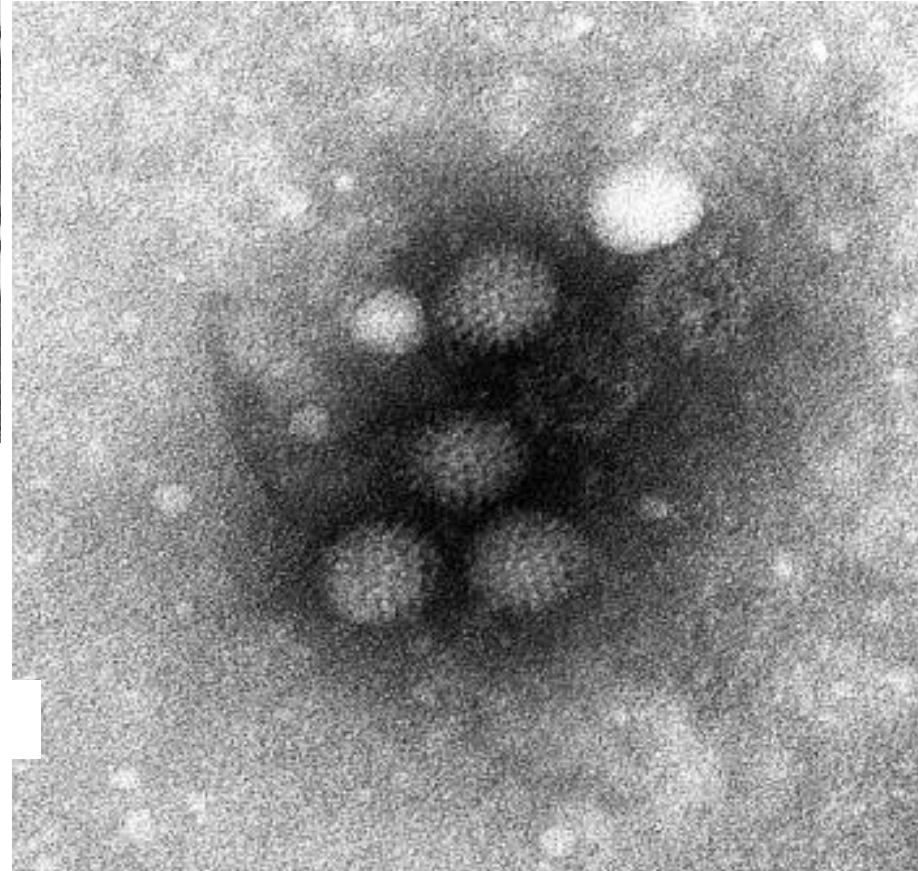
Transmisní elektronový mikroskop



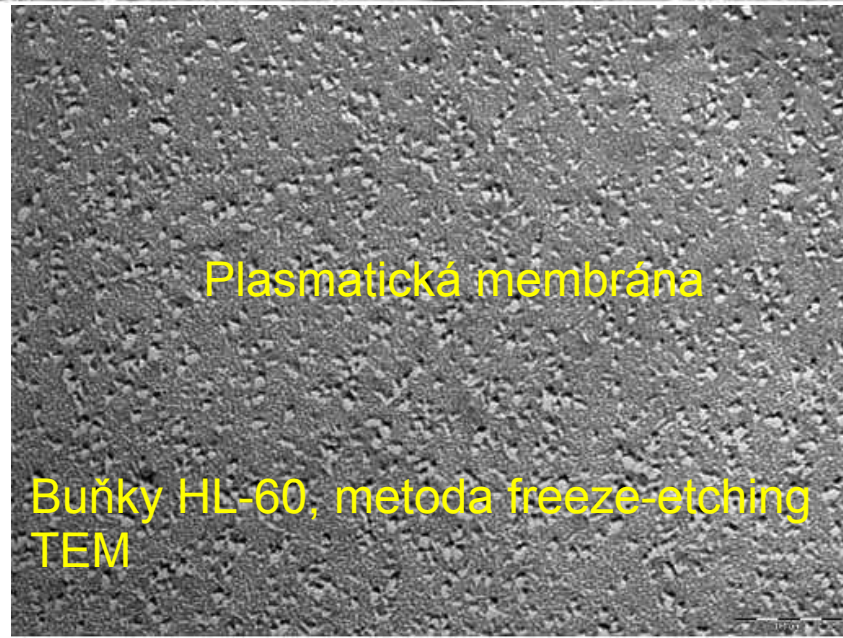
<http://www.ualberta.ca/~mingchen/tem.htm>

Buňky břišního svalu ↑

Coronavirus, negativní
barvení (ne covid-19!) →



Transmisní elektronový mikroskop



Skenovací elektronová mikroskopie



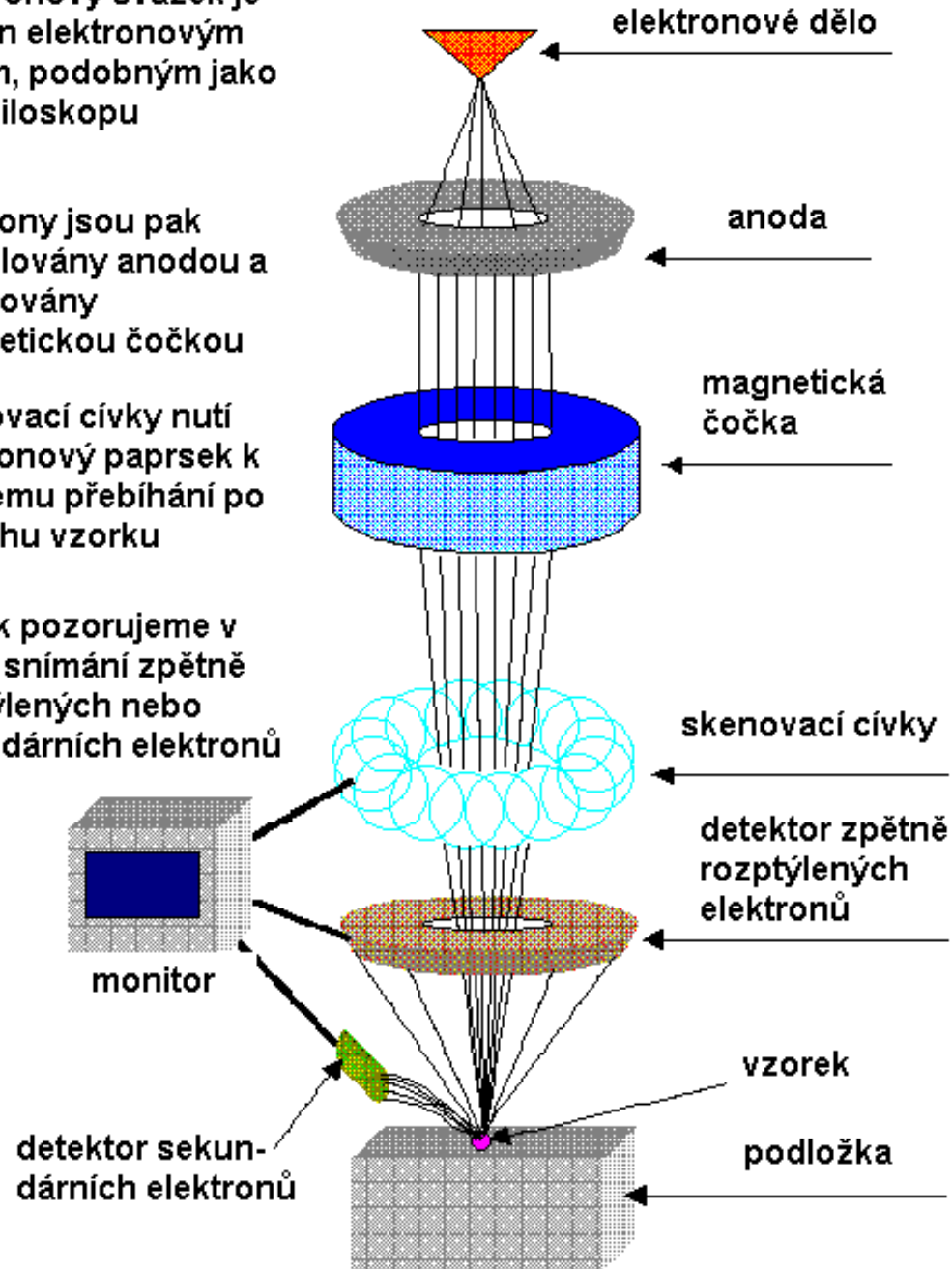
Skenovací elektronová mikroskopie - SEM

elektronový svazek je tvořen elektronovým dělem, podobným jako v osciloskopu

elektrony jsou pak urychlovány anodou a fokusovány magnetickou čočkou

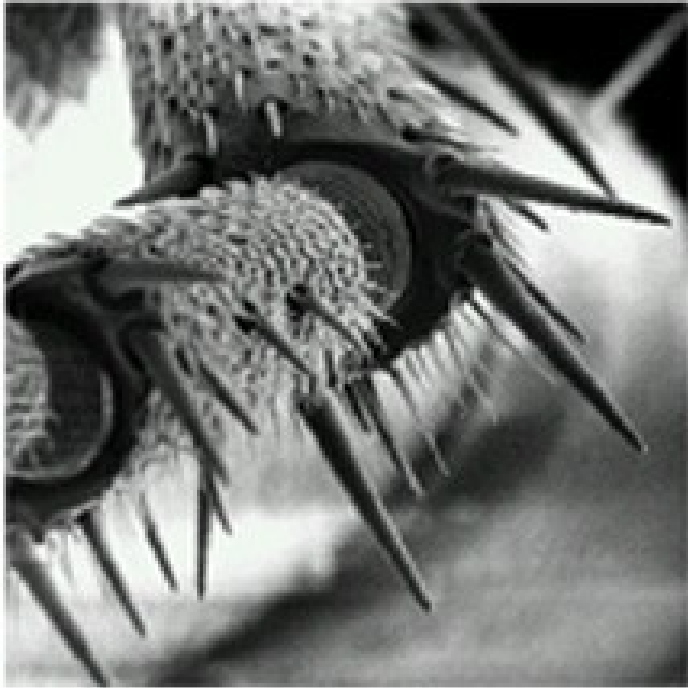
skenovací cívky nutí elektronový paprsek k rychlému přebíhání po povrchu vzorku

vzorek pozorujeme v módu snímání zpětně rozptýlených nebo sekundárních elektronů



Podobně jako u metody TEM, jsou i pro SEM vzorky připravovány velmi složitým způsobem – zde musí být pokryty tenkou kovovou vrstvou pro zajištění vodivosti povrchu.

Podle:
<http://www.rpi.edu/dept/materials/COU/RSES/NANO/shaw/BigSEM.gif>



Skenovací elektronová mikroskopie

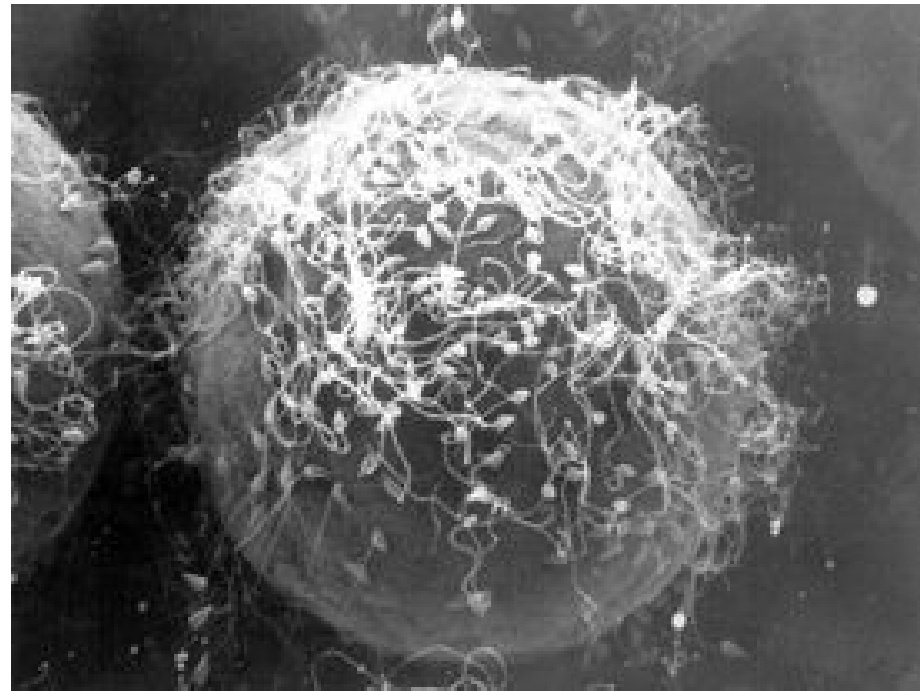
Detail nohy mravence v

SEM

<http://www.wtn.org/ss/story.phtml?storyId=33&type=EdOutreach>

Vajíčka ježovky obklopená
spermiemi, SEM 3000x
zvětšeno

<http://www.stanford.edu/dept/news/report/news/august9/sperm-89.html>

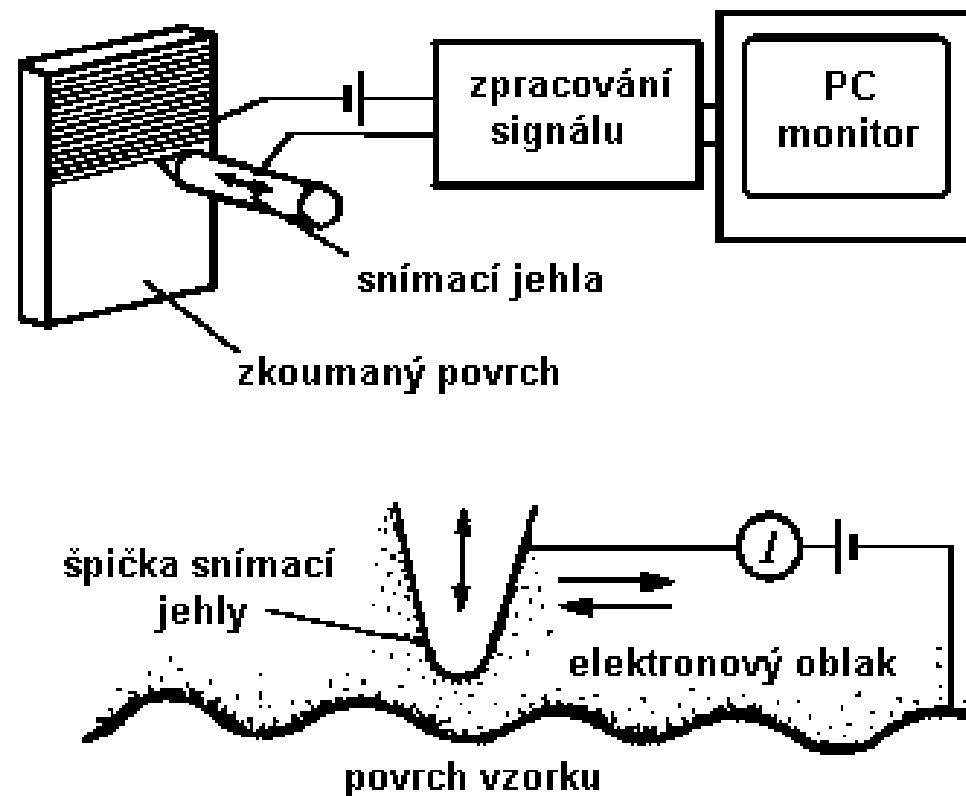


Mikroskopie skenující sondou

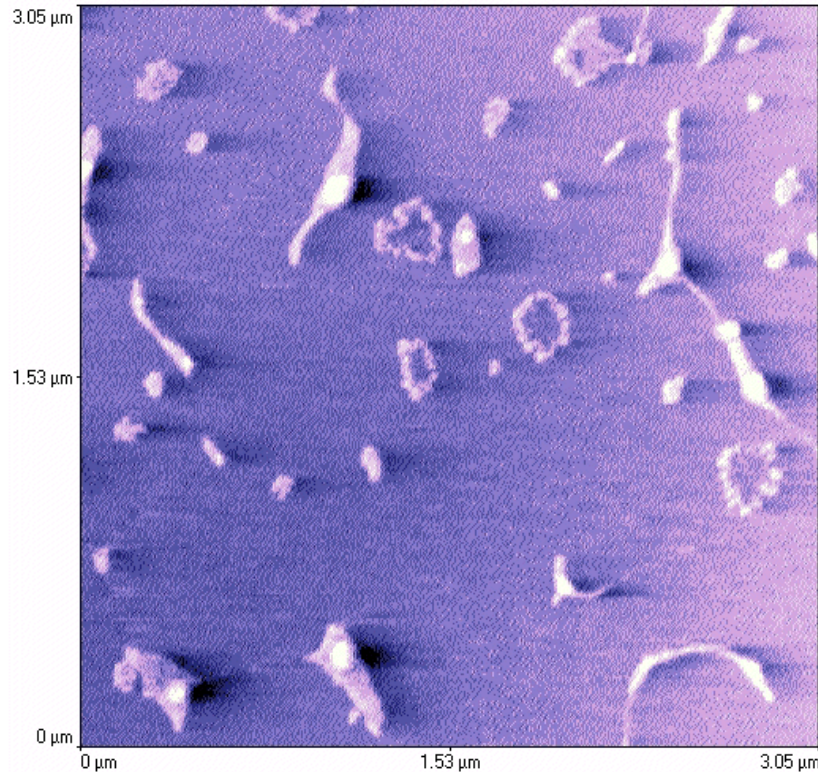
Skenovací tunelový mikroskop (STM)

Schéma skenovacího tunelového elektronového mikroskopu (STM). Dole detail kovové detekční jehly. Kladně nabitá jehla kopíruje povrch vzorku.

Podle Rontó a Tarjána (1994).

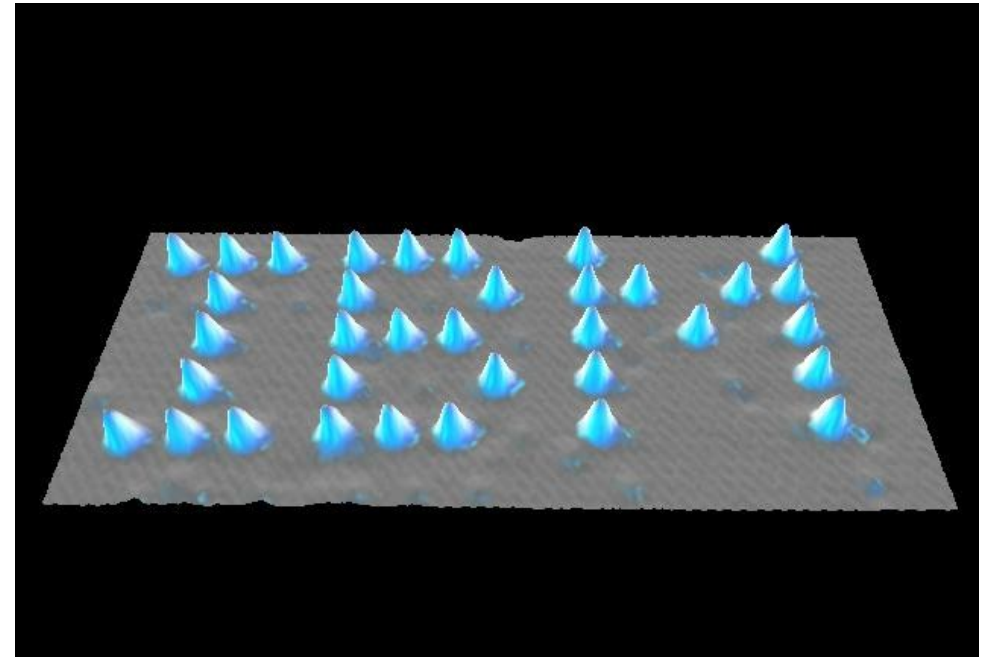


Skenovací tunelový mikroskop



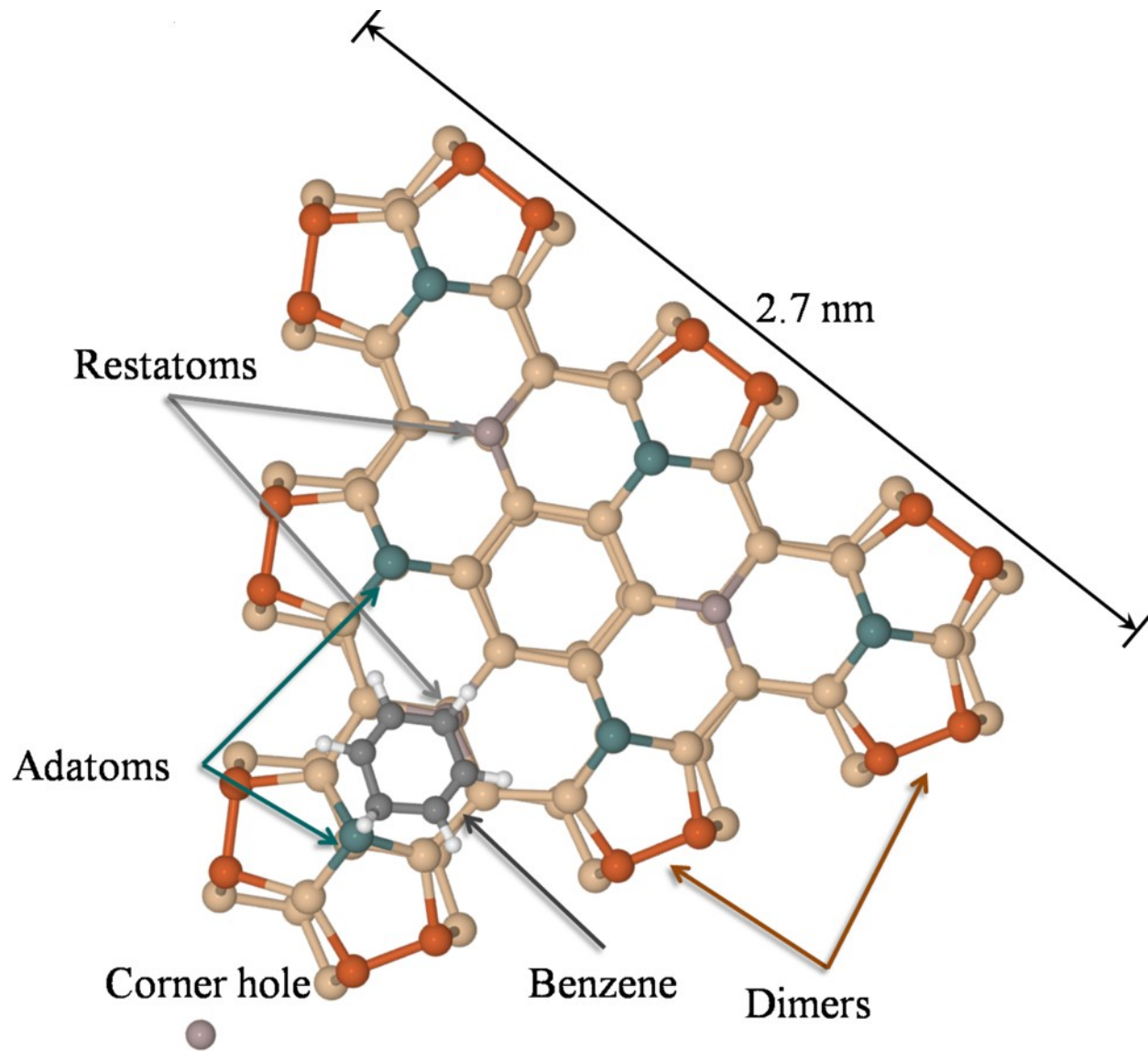
Rozštěpené a nenarušené kruhy
plazmidové DNA

•<http://www.sci.port.ac.uk/spm/overfig5.htm>



Nápis IBM vytvořený z atomů xenonu
na niklové podložce

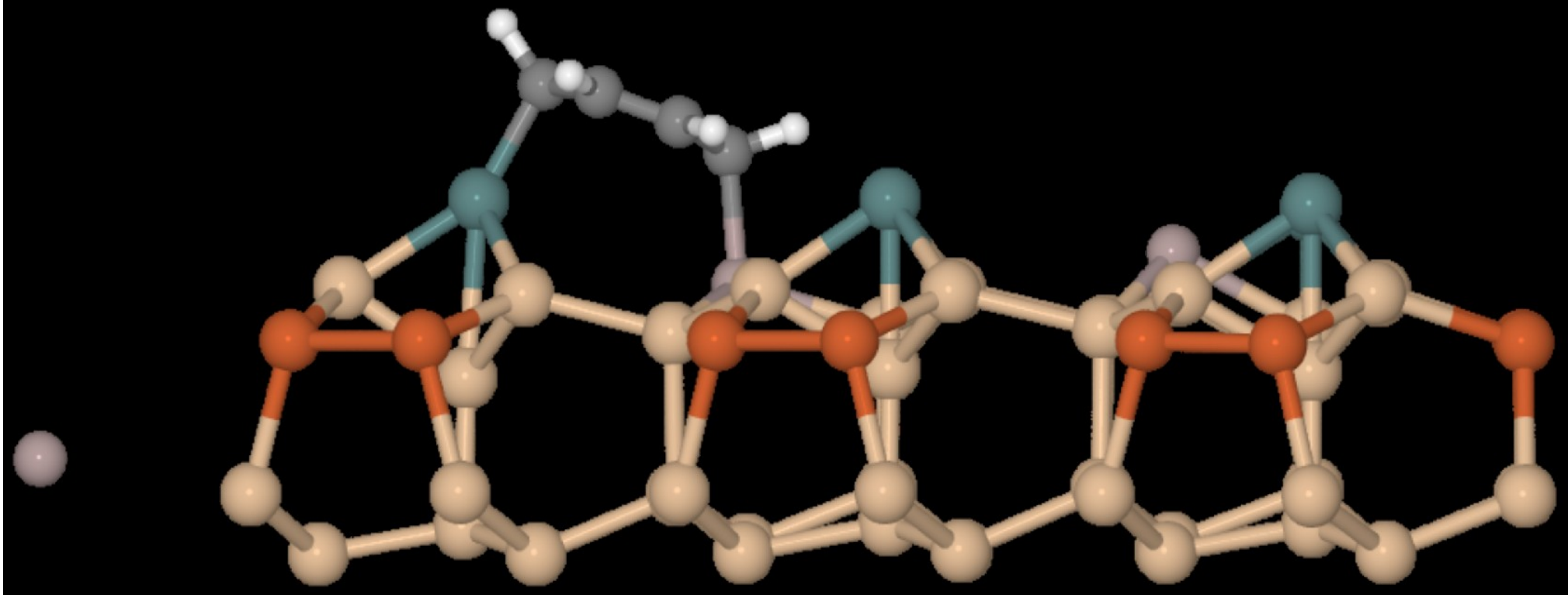
<http://www.almaden.ibm.com/vis/stm/images/stm10.jpg>



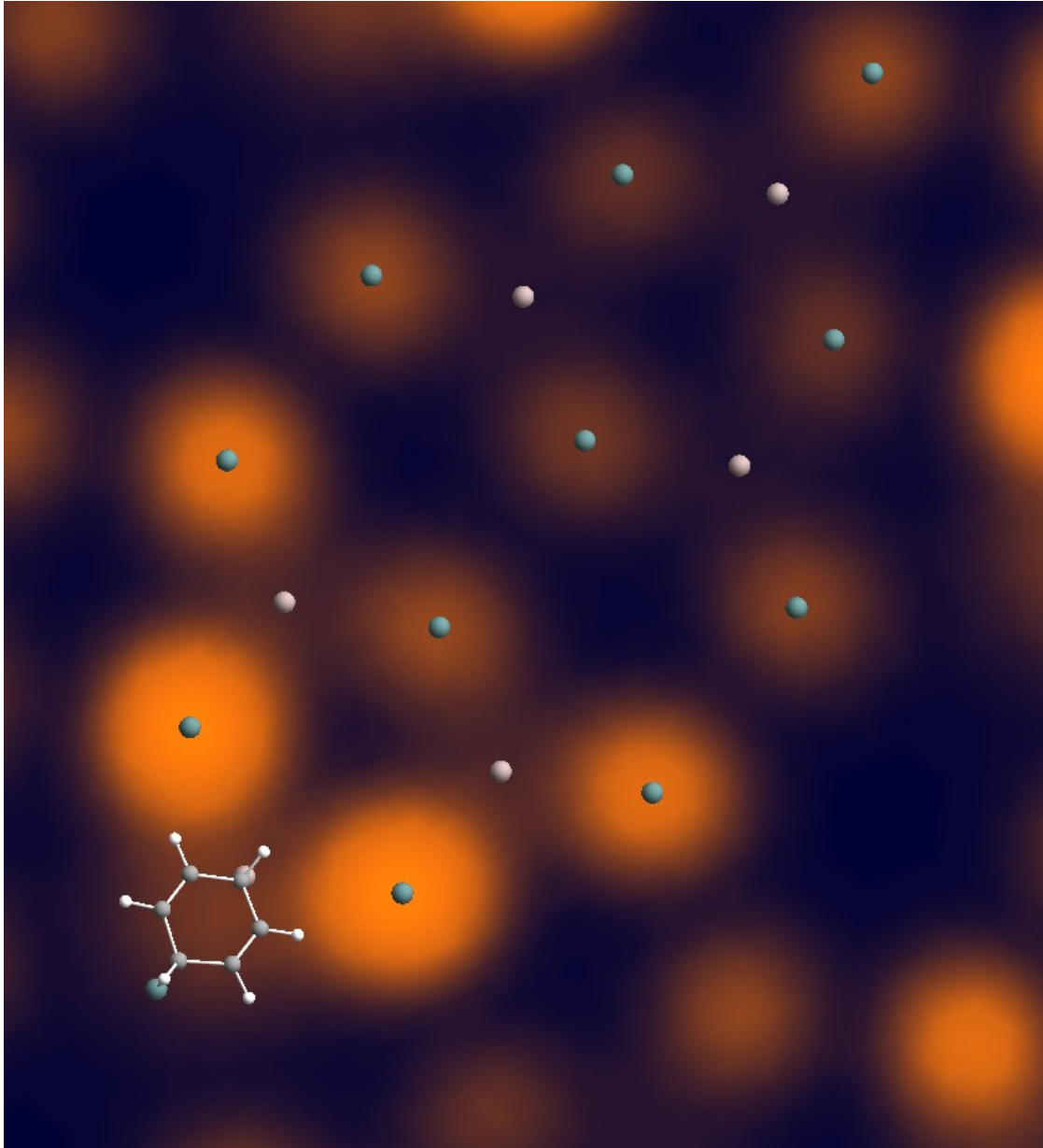
Top view

STM – Simulace povrchu křemíku s navázaným benzenem. Tato struktura bude následně porovnána se strukturou zjištěnou experimentálně.

Skenovací tunelový mikroskop



Moderní mikroskopy STM (a AFM) umožňují ověřování struktury složitých molekul či krystalů, což má zásadní význam pro vývoj počítačových komponent (paměti a procesory na úrovni nanotechnologií). Je zde vidět, že "adatoms" leží jakoby nad rovinnou plochou krystalu, "restatoms" jsou níže - dáno trojrozměrným tvarem krystalů. Interakce benzenu, vzhledem k jeho velikosti, s jedním ad- a jedním restatmem. Proto "neleží rovně" na povrchu. Jde o projev van der Waalsových sil.

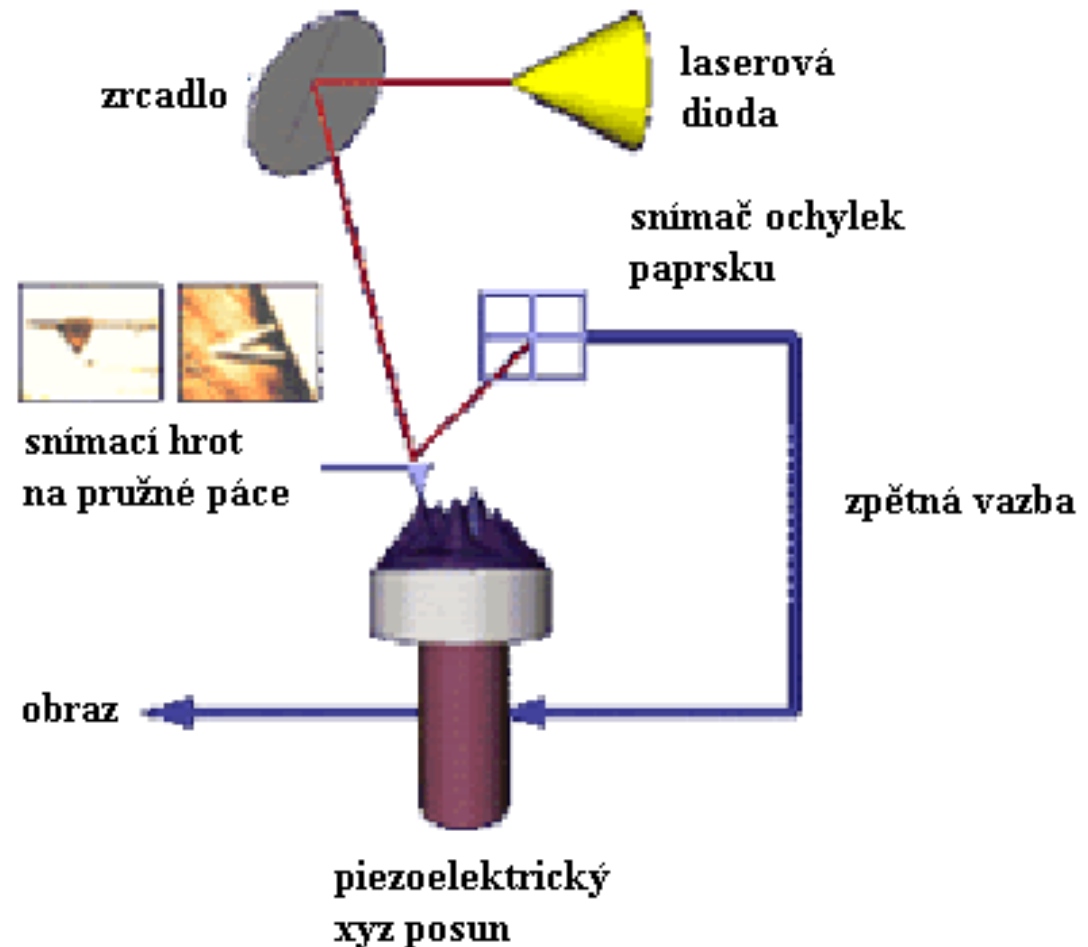


STM - Experimentální
data s naznačenou polohou
atomů křemíku a molekuly
benzenu

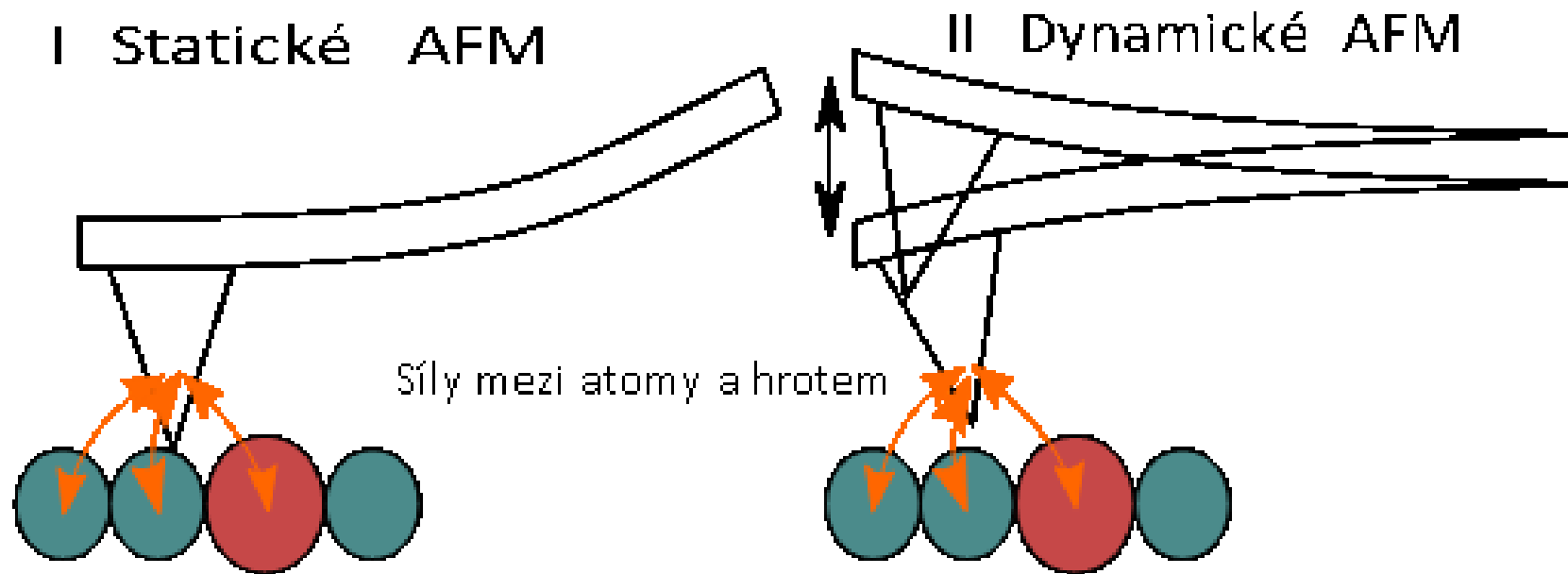
Mikroskopie atomárních sil (AFM)

AFM – Atomic force microscopy – hrot sleduje profil povrchu vzorku.

•<http://physchem.ox.ac.uk/~rgc/research/afm/afm1.htm>

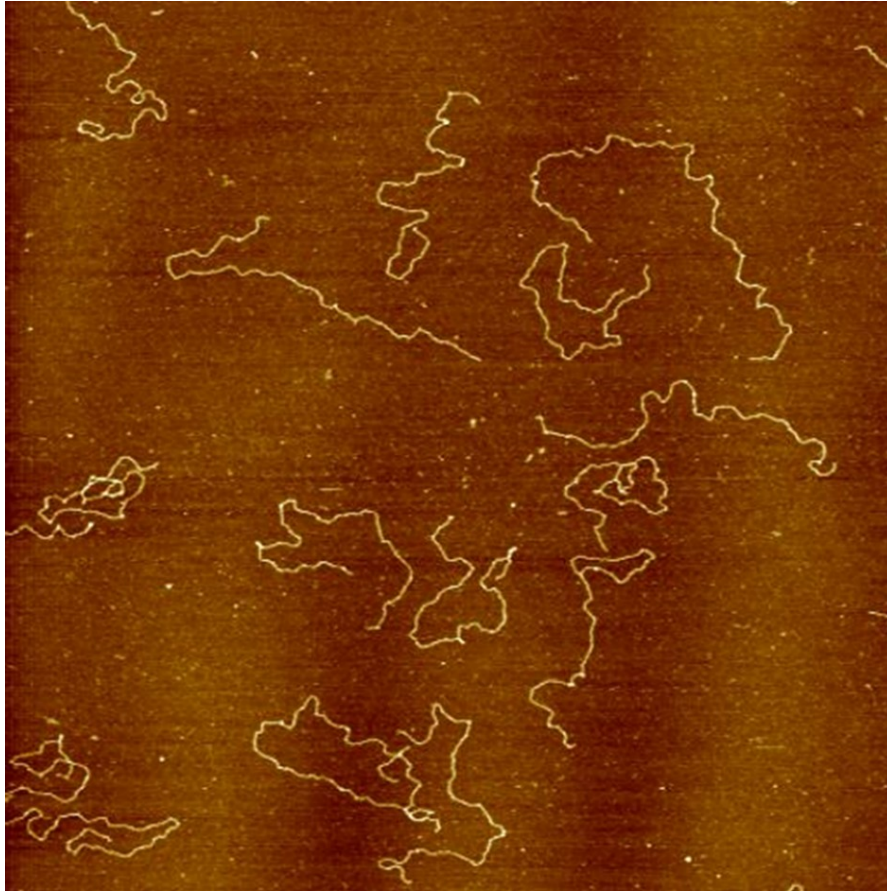


Mikroskopie atomárních sil



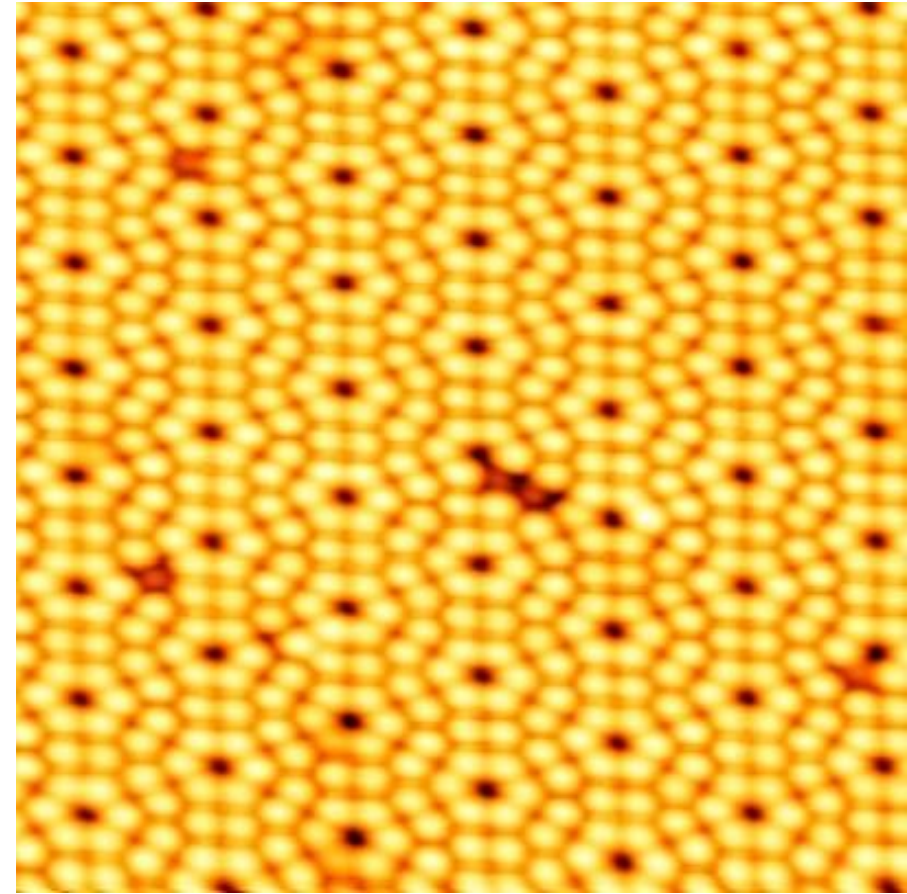
Dle O. Krejčího

Mikroskopie atomárních sil



DNA – linearizovaná plasmidová

•http://www.snom.omicron.de/examples/twinsnom/x-tsnom_12.html



Povrch křemíku – atomární rozlišení
včetně molekul benzenu

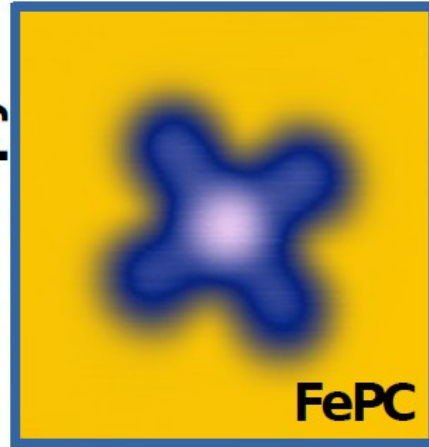
Dle O. Krejčího

Strukturní studie s využitím STM a AFM

4K Ultra-high-vacuum microscope Iron Phtalocyanine on Gold (111) surface

FePC metallic tip

Scanning Tunnelling
Microscopy

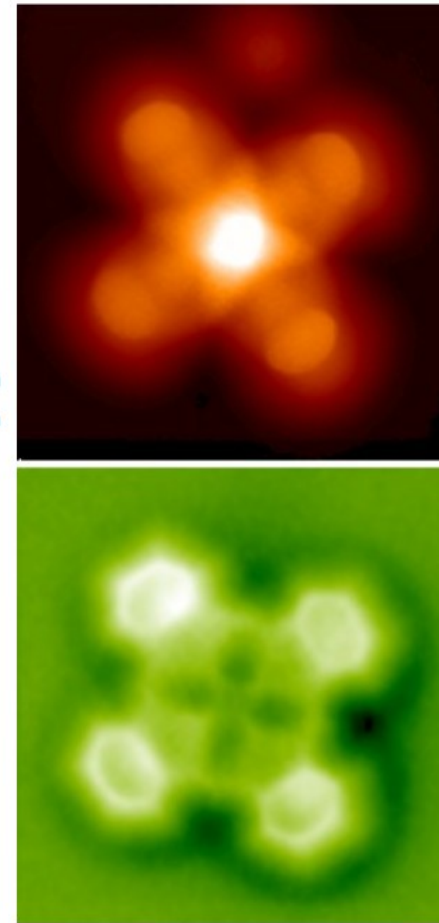


Possible,
but not-recorded

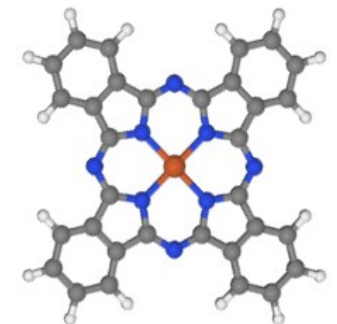
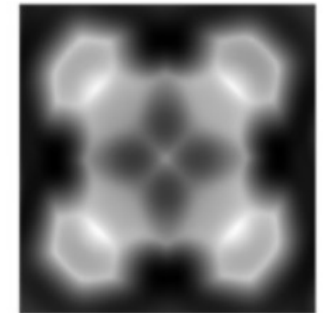
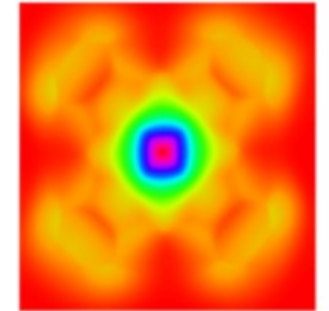
de la Torre et al. PRL 119,
166001 (2017)

FePC CO-tip (flexible)

frequency modulation
non-contact
Atomic Force Microscopy



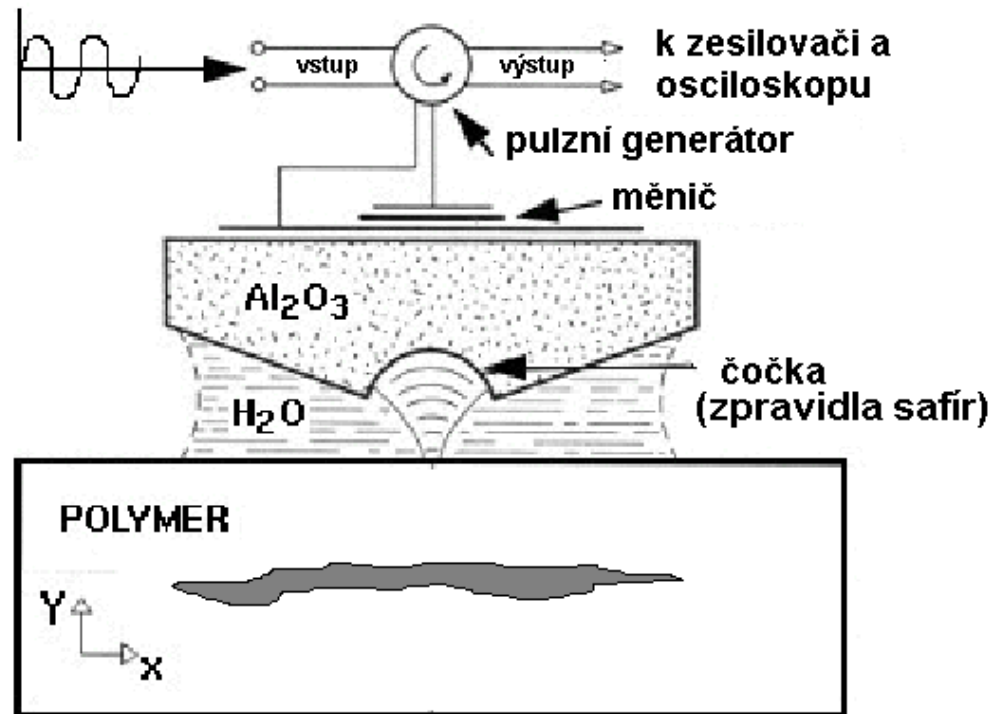
Theoretical
simulations
CO-tip



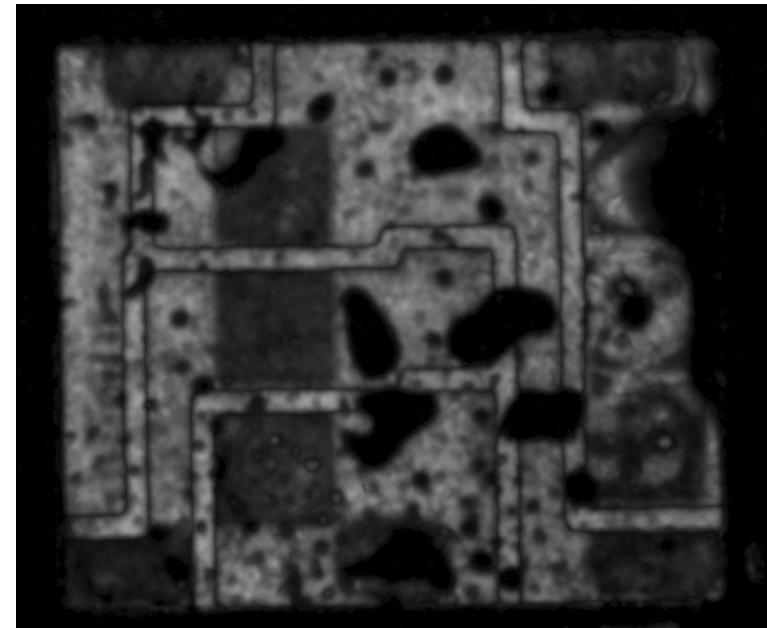
Mikroskopy založené na jiných fyzikálních principech

Akustická mikroskopie

Odrázová varianta



• podle: http://www.sv.vt.edu/comp_sim/sam/full.gif



Akustický sken čipu s vnitřním poškozením

<http://www.predictiveimage.fr/en/applications/78/analyse-de-defaillance-pont-de-diodes-defectueux-microscopie-acoustique/>

Autoři:

Vojtěch Mornstein

Daniel Vlček

Naděžda Vaškovicová

Poslední revize a ozvučení: duben 2021