

MUNI
MED

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Mikroskopické techniky

MUDr. RNDr. Michal Řiháček, Ph.D.

Ústav laboratorní medicíny

Fakultní nemocnice Brno

Historie mikroskopu

1590 – otec a syn Jansenovi (Holandsko)

1665 – R. **Hooke**, složený mikroskop, L. Pasteur (kvasinky) / R. Koch (TBC, cholera)

1670 – A. van **Leeuwenhoek** (Holandsko)

1847 – C. **Zeiss**, 1. výrobce

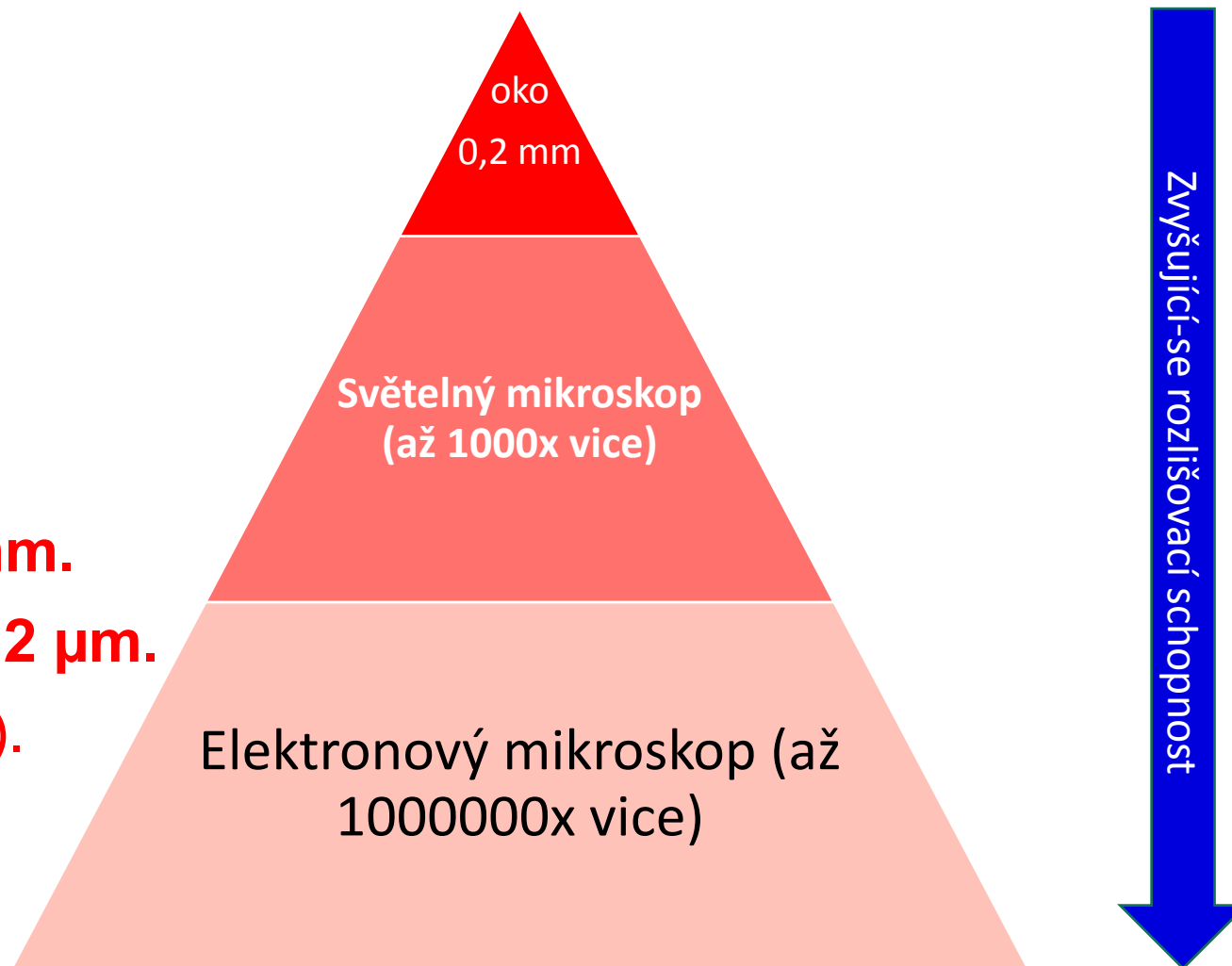
1873 – něm. fyzik **Abbe** (teorie opt. přístrojů), 1931 – něm. fyzik E. **Ruska**, elektr. mikroskop

Mikroskopie

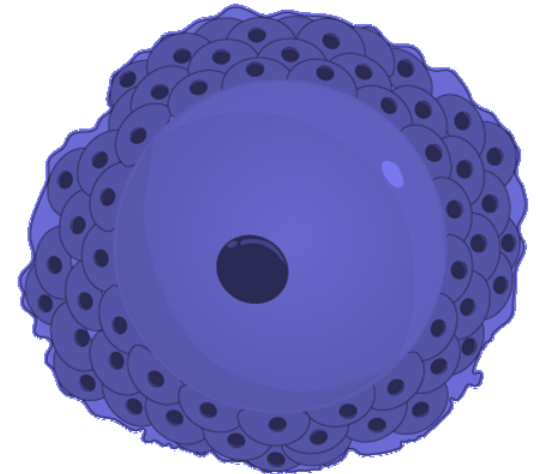
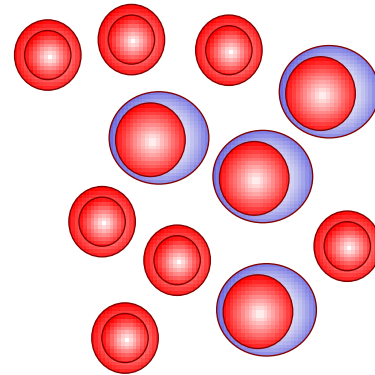
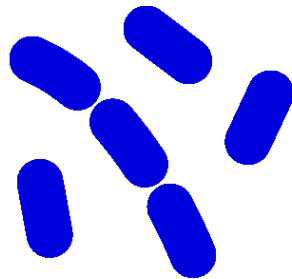
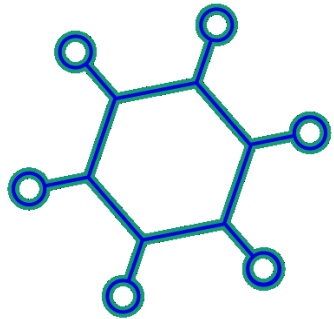
Rozlišovací schopnost oka je **0,2 mm**.

Světelná mikroskopie rozlišuje 0,2 μm .

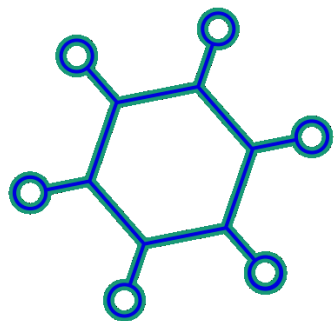
Elektronová mikroskopie (1-0,2 nm).



Jaký typ pozorovacího zařízení použít pro...?:

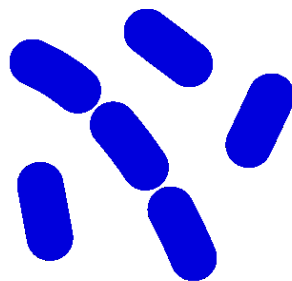


Jaký typ pozorovacího zařízení použít pro...?:



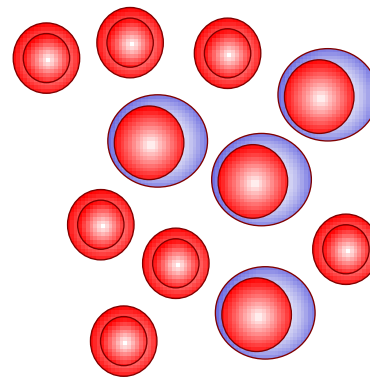
virus

(20-250 nm)



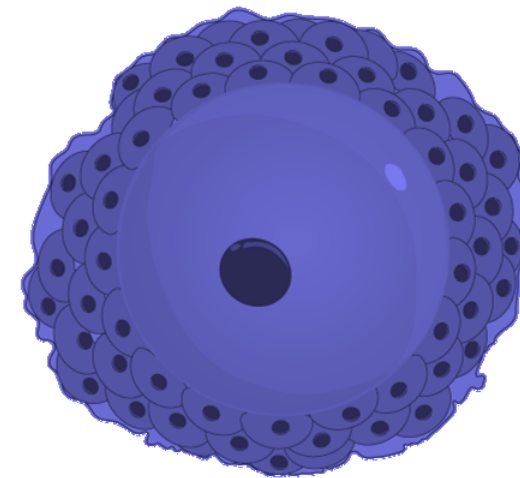
bakterie

(1-5 μm)



buňky

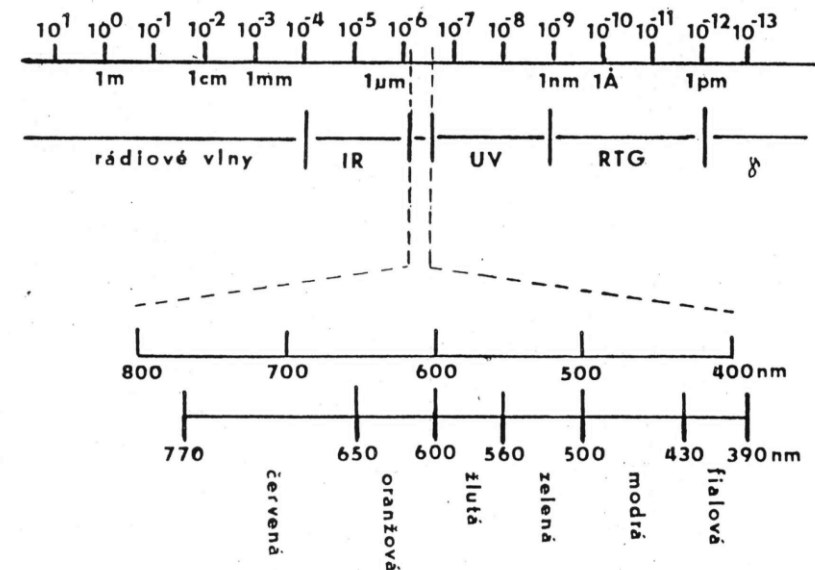
(7-20 μm)



sekundární oocyt

(100-250 μm)

Optika



Obr. 1:
Rozsahy vlnových délek různých elektromagnetických záření a barev světla

Světlo = úzká oblast elektromagnetického záření viditelná okem (vlnění, 300 tis.km/s)

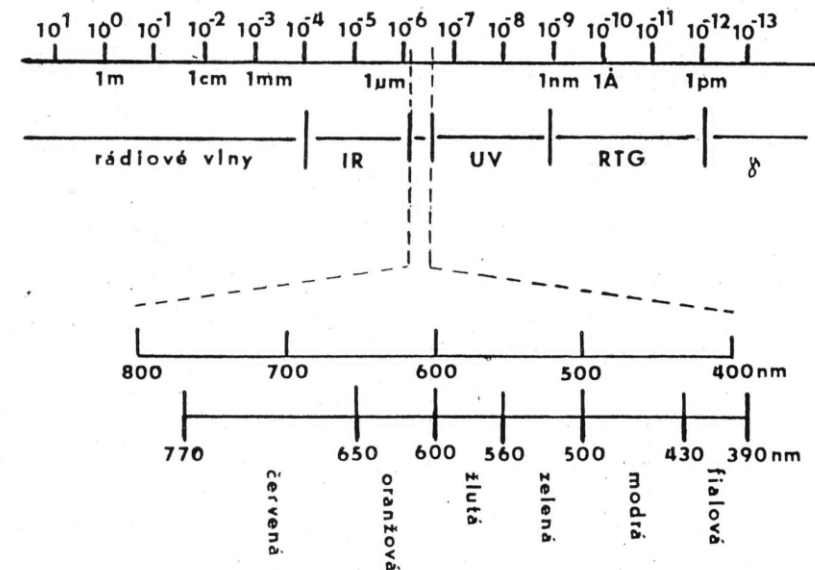
Vlnová délka (definuje různé druhy elektromagnetického vlnění/záření)

- 380-780 nm (bílé/polychromatické světlo)

- **barva**: 380nm fialová, 450nm modrá, 500nm zelená, 550nm žlutá, 600nm oranž., od 650nm červená

Vlny kratší - UV, RTG, γ

Vlny delší - IR, rádiové vlny



Obr. 1:
Rozsahy vlnových délek různých elektromagnetických záření a barev světla

Optika

Dle speciální teorie relativity je intenzita světla úměrná amplitudě vlnové délky světla.

Rozhraní 2 prostředí

Odraz: úhel dopadu=úhlu odrazu, ve stejné rovině

Lom: vychýlení ke kolmici dopadu (do prostředí hustšího od kolmice dopadu) (do prostředí řidšího) Index lomu N (opt. hustota vzduch 1,0 - voda 1,33 - sklo 1,46 – olej 1,5 – diamant 2,42



Optika

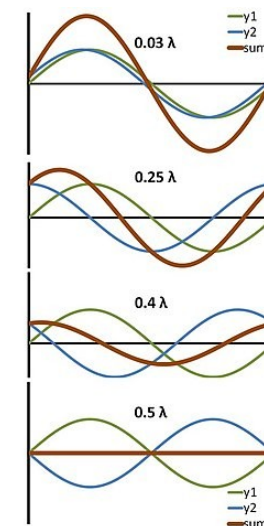
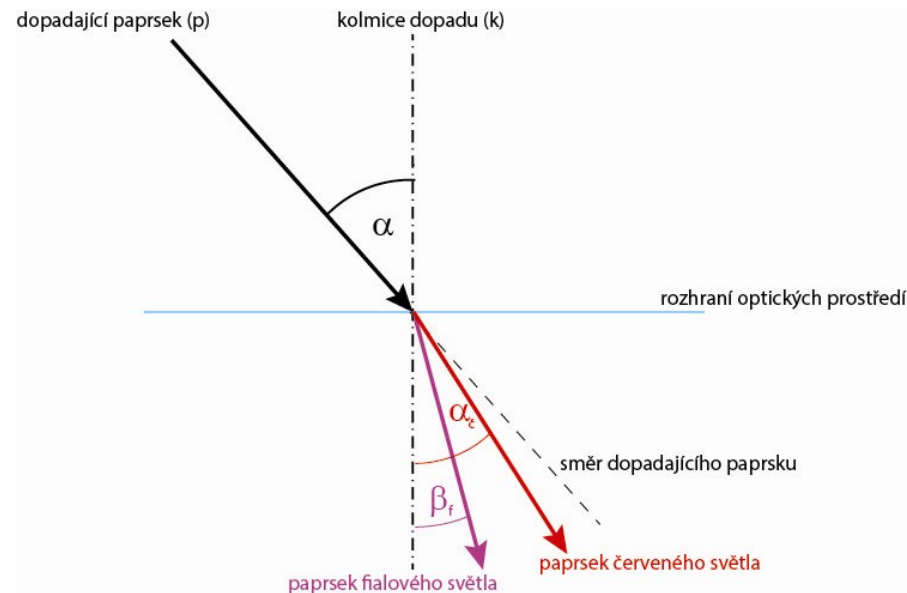
Disperze (rozklad) - závislost indexu lomu na vlnové délce.

Bílé světlo se hranolem rozloží dle vln. délky na jednotlivé barvy (duha).

Interference (skládání)

Rozdělení a následné spojení 2 světelných toků.

Dle synchronizace je fáze vlnění stejná n. posunutá a intenzita +vyšší nebo – nižší, ale „**vlny se nerozcházejí**“



Optika



Čočky

tvár: vypuklý/konvexní, spojky - svazek sbíhavý

vydutý/konkávní, rozptylky - sv. rozbíhavý

opt. střed O s osou, hl. rovina (kolmá na osu)

ohnisko F přední-obrazové, F' zadní-předmět.

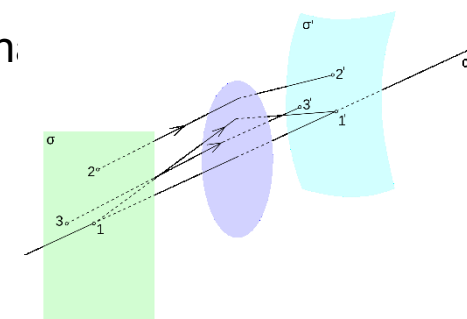
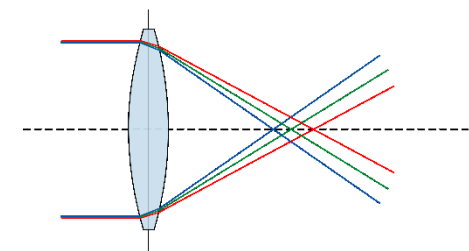
Vady optických soustav

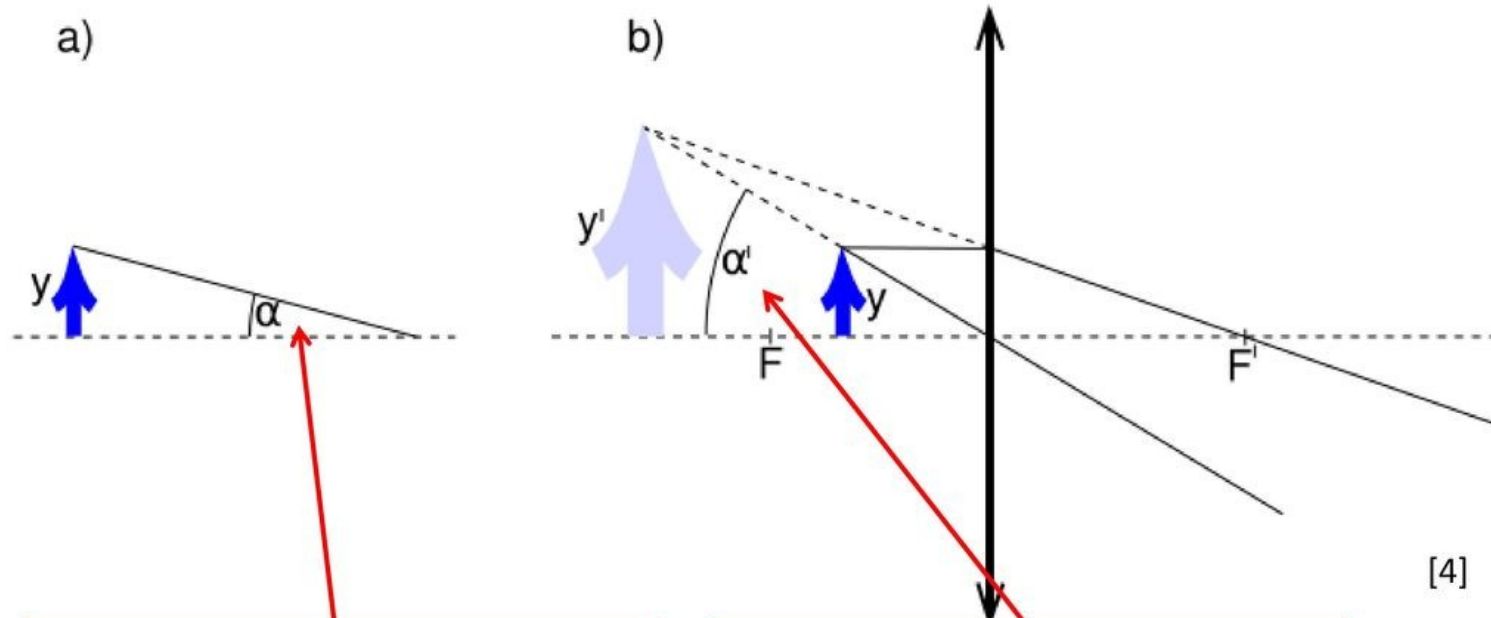
Chromatická (barevná) – různý lom dle vln. délk světla, vada polohy a velikosti

Sférická (kulová) – různý lom s křivostí č., body překrývající se kruhy, nezřetelné

Astigmatická – paprsky dopad. šikmo se neprotín. tvoří 2 linie

Vyklenutí – přímka z boku = oblouk, nelze dobře zaostřit





Zorný úhel při sledování
předmětu bez lupy

Zorný úhel při sledování
předmětu s lupou

[4]

Lupa

Čočky

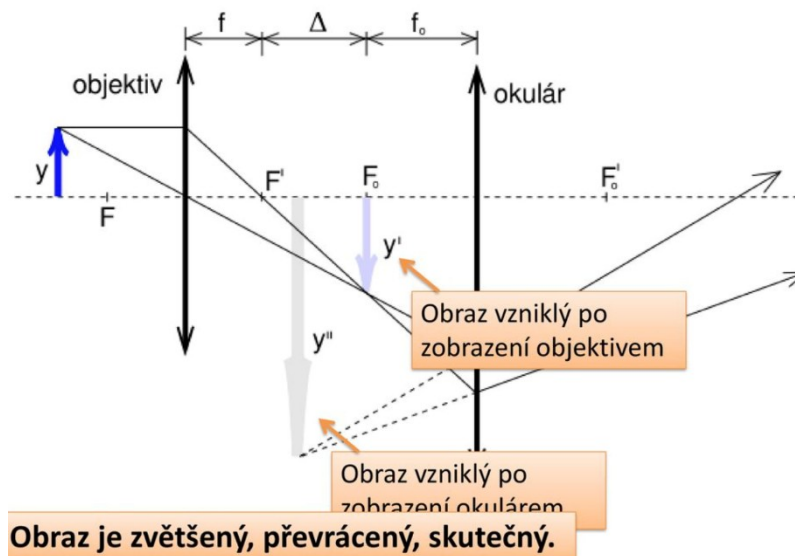
Nejjednodušší optické zařízení

1 nebo více čoček (nejčastěji 1 spojka = nejjednodušší)

Zvětšují zorný úhel

Obraz: neskutečný zvětšený a přímý

Zvětšení 5 – 12x (spec. až 30x)



Objektiv

Mikroskop

2 optické části (několik čoček) na společné ose

Objektiv – hlavní, tvoří obraz předmětu

skutečný zvětšený a převrácený

čelní čočka, pouzdro se závitem (revolver.měníč)

Okulár – lupa

zvětšuje obraz bez dalších detailů 5-25x

vhodně koriguje optické vady čoček objektivu

Okulár



Vlastnosti objektivů

Ohnisková vzdálenost: 1,5(silné) - 20mm(slabe)

Zvětšení = $250/\text{ohnisk.vzdál.}$ (max.150x)

Světelnost – určuje otvorový úhel(2krajní paprsky) a

Index lomu prostředí: sklíčko-vzduch n. lépe imerze (voda, olej)

Numerická apertura = vztah mezi otvor. úhlem a lomivostí, čím je vyšší, tím lepší rozliš. schopnost (0,9 vzduch, 1,5 olej)

Penetrační (hloubková) ostrost = zobrazení počtu rovinných vrstev preparátu, nutnost proostřování



Mikroskop – další části konstrukce

Osvětlení – žárovka, kondenzor (čočky k soustředění paprsků), clony (irisová), ev. zrcátko

Mechanické části **stativ, tubus** – spojuje objektiv (dole) a okulár, posun pomocí makro- a mikrometr. šroub, většinou binokulární (2 okuláry) s **oční korekcí**, **stolek s otvorem** a 2 pružinkami n. křížovým vodičem preparátu



Mikroskop – typy

Běžný – metoda světlého pole v procházejícím světle (rovnoběžně s osou), ideální pro barevné preparáty

Zástinový – metoda temného pole, paprsky šikmé, odrážejí se od preparátu (výrazně zvýší kontrast – vhodné pro čiré nativní preparáty)

Stereomikr.(preparační) – 2 mikroskopy s osami v ostrém úhlu, každý z jiné strany, hranoly obracejí obraz na přímý, plastický

Diskuzní n. srovnávací - pro 2 osoby



Další podkategorie mikroskopů

Fázový kontrast – na fázové destičce v obrazové rovině objektivu se ohybem paprsku vyvolá změna fáze

použití: zvýraznění detailů (obrysů) nativních preparátů

Polarizační – kombinace s polarimetrem, přidány 2 polarizační nikoly (polarizátor u světelného zdroje, analyzátor za objektivem), otočný stolek s preparátem, 2-lomné struktury střídavě září a zhasínají – použití: mineralogie (dříve polarimetr – anal. AMK)

Fluorescenční (luminiscenční) – látky po absorpci UV-záření vydávají barevné viditelné záření, přírodní n. po navázání fluorochromů – použití: imunocytochemie



Další podkategorie mikroskopů

Ultrafialový – vyšší rozliš. schopnost UV světla, optika křemenná, záznam foto

Infračervený – snadněji proniká silnými preparáty, záznam foto

Elektronový – místo světla(fotonů) je tok elektronů ve vakuu, místo optických jsou čočky elektromagnetické, magnet. pole působí jako lom- dráha elektronů po spirále, zvětšení až 1milion

TEM (transmisní)- elektrony přímo prostupují tenkým řezem (nm) a jsou detekovány (vnitřní struktury, atomy)

REM, SEM (rastr, scan)- povrch vzorku rastrován svazkem elektronů, detekce uvolněných sekundárních elektronů



Mikroskopické preparáty

Nativní – fyziologické médium přirozené (sérum, moč, likvor) n. umělé (fyziolog.roztok)

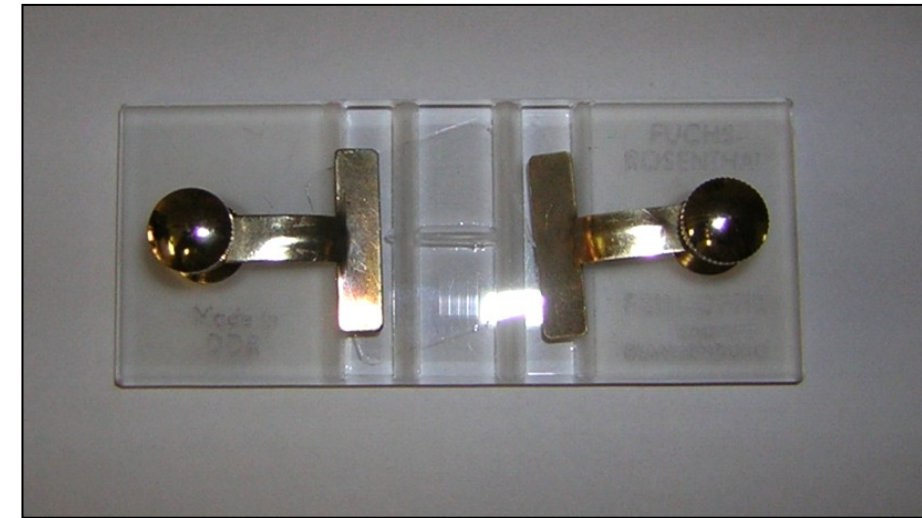
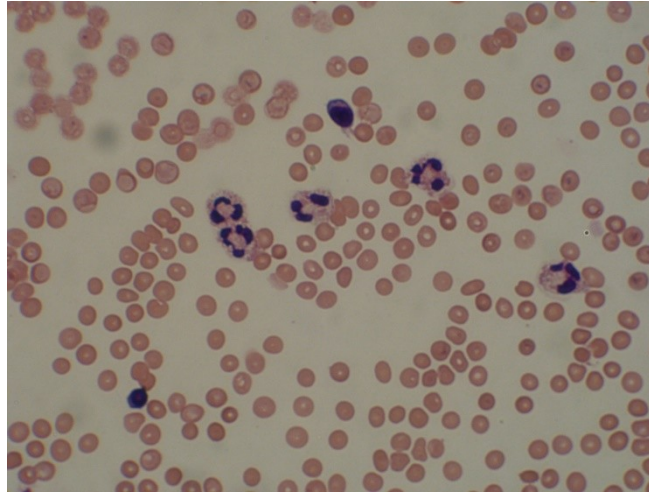
Vitální barvení – b. bazická (metyl.modř), kyselá (trypanová modř), ostatní (Sudan)

Trvalé preparáty

fixace: fyzikální (teplo), chemická (formol.páry, kys.octová, formalin, etanol)

zpracování: uzavírací média, nátěry, řezy

barvení (selektivní zvýraznění): dle Grama, May-Grünwalda a Giemsy, Pappenheima

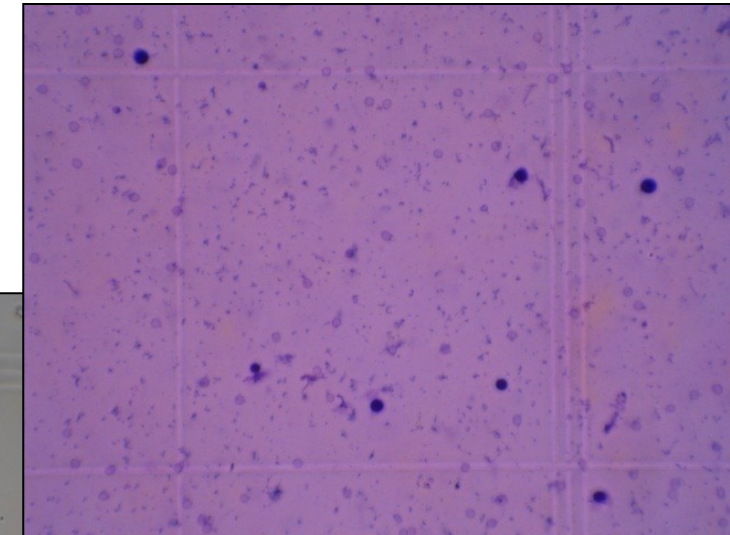
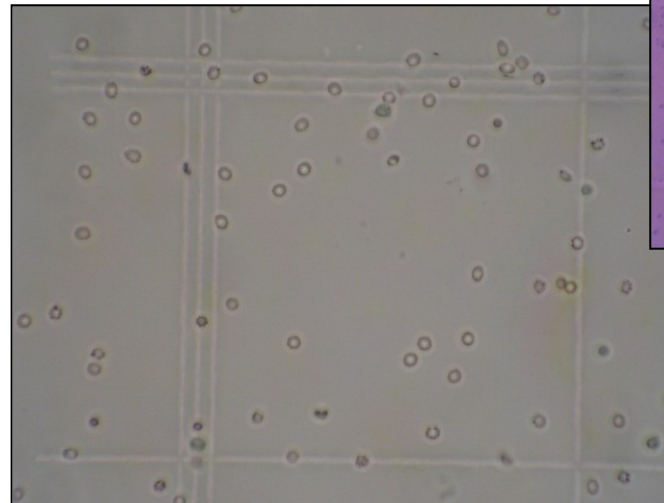


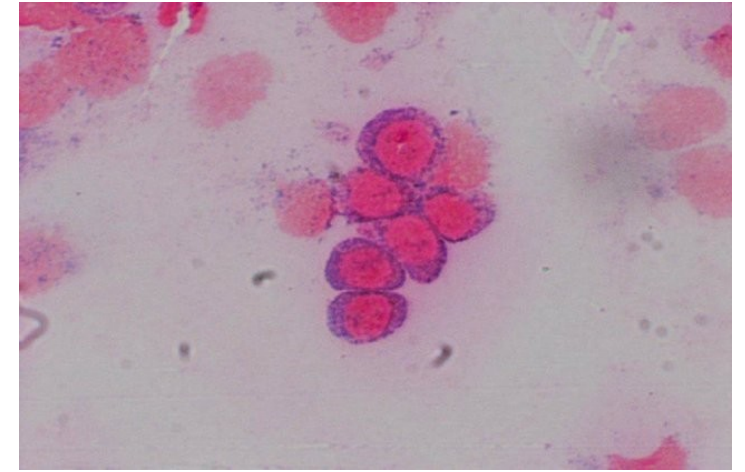
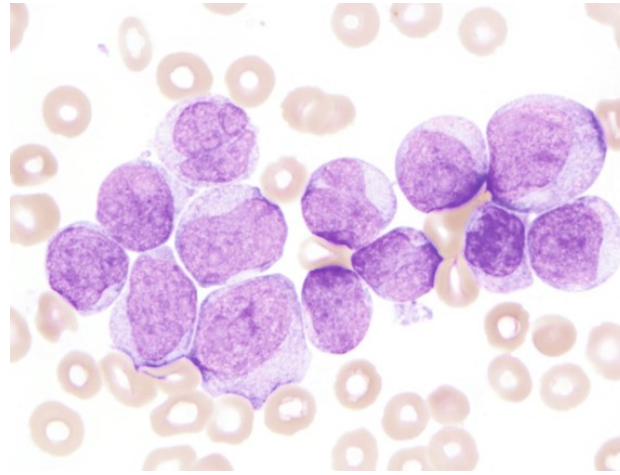
Vyšetření likvoru

Nativní – počet elementů

Vitální barvení – počet jaderných elementů

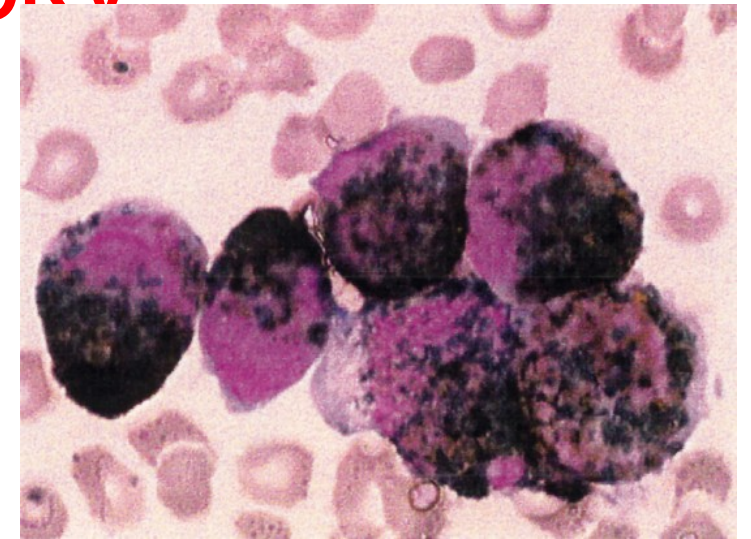
Trvalý preparát – dif. rozpočet jaderných buněk leukocytů





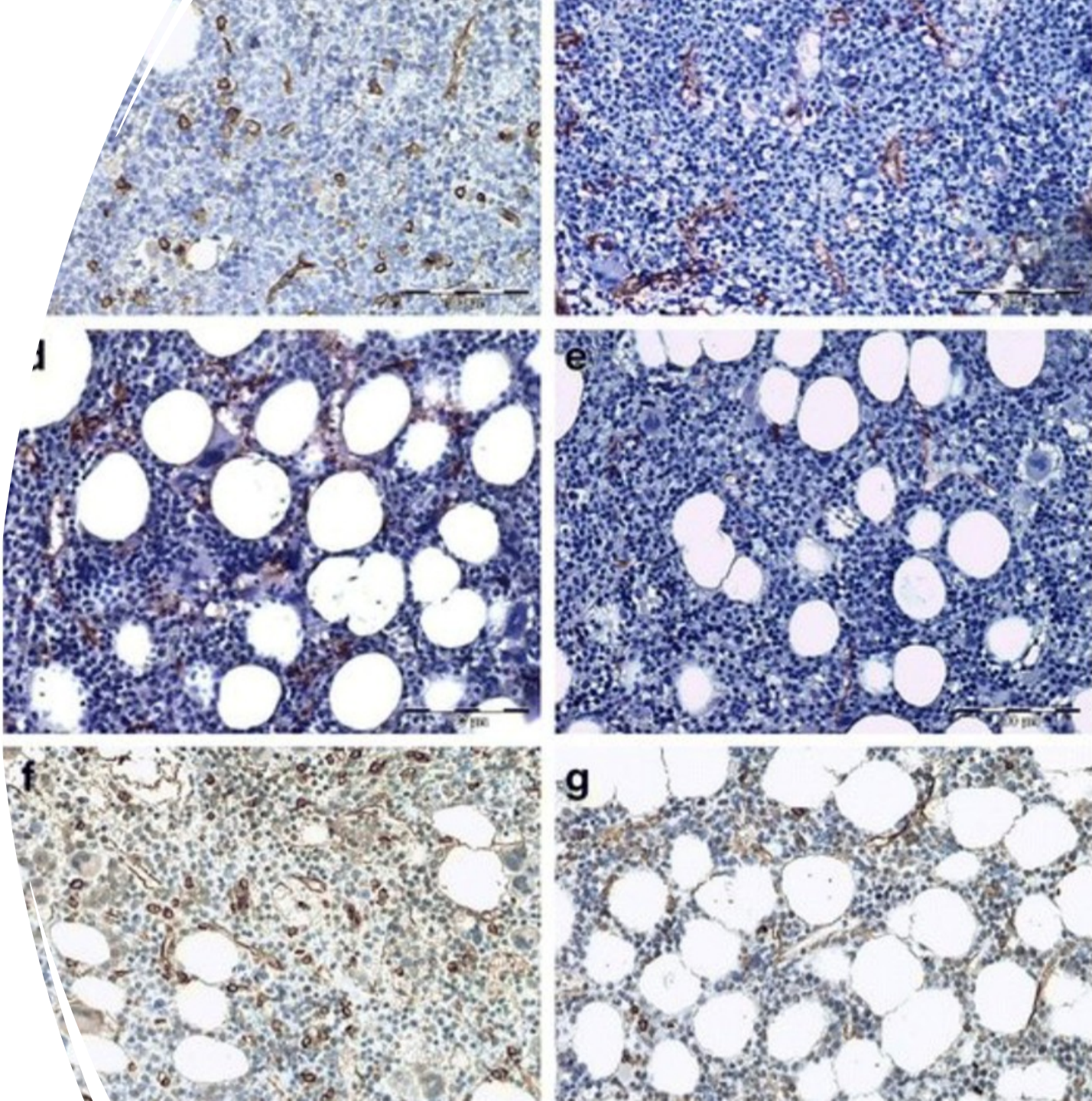
Vyšetření kostní dřeně cytologicky

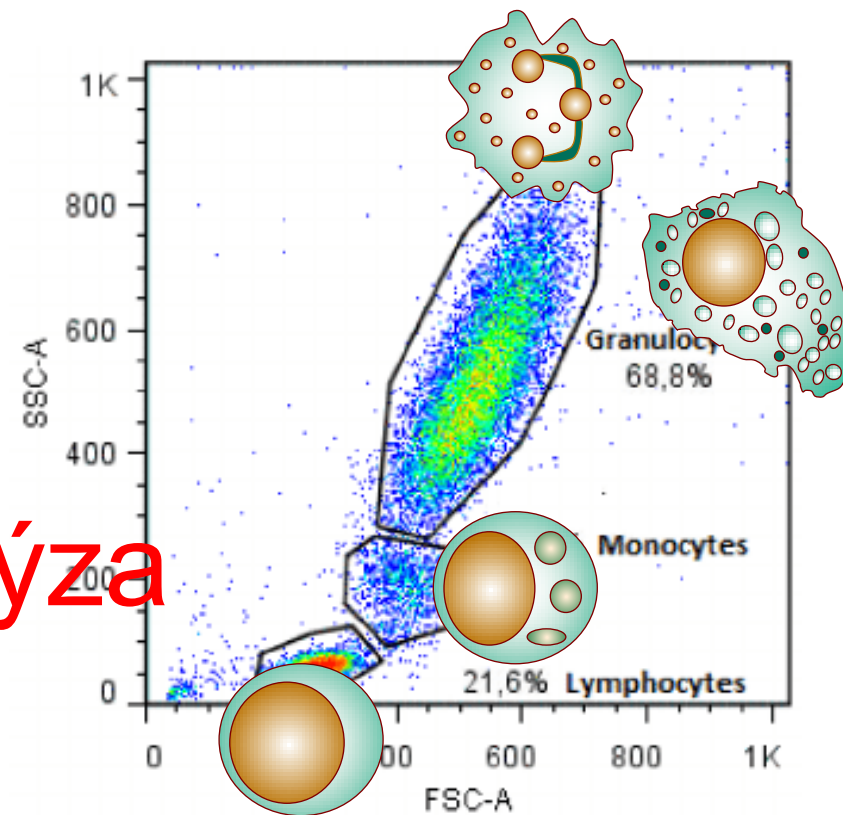
+ speciální cytochemická barvení
(např. PAS, POX) u akutní leukemie



Vyšetření kostní dřeně histologicky

+ imunohistochemie
(protilátky proti receptorům
značená fluorescenční
značkou/barvou)





Moderní buněčná optická analýza

Průtoková cytometrie – rozdělení
diferenciálního rozpočtu.

Zlatý standard rutinní hematologie
(vyšetření krevního obrazu).

Digitální mikroskopie...

