

MIKROSKOPIE DNES

Mimořádná příloha pro předplatitele časopisu Vesmír 2004/3

Kam směřuje elektronová mikroskopie?
Konfokální a dvoufotonová mikroskopie
Mikroskop s dvojitým řádkováním
Padesát let elektronové mikroskopie v Brně
Současná elektronová mikroskopie v biologii

Svět kolem sebe si uvědomujeme svými smysly, a snad nejbohatším naším smyslem je zrak. Pozorované předměty nebo děje však potřebujeme často fotograficky zobrazit buď za účelem dokumentace, nebo i z pohybu dojmových.

Jiří Fiala, Jan Schlemmer, Základy praktické makrofotografie a mikrofotografie, Orbis, Praha 1956

Nad mikroskopy se setkávají všechny hlavní přírodovědecké obory: fyzika a matematika (teorie a konstrukce přístrojů), chemie (sklářské technologie, příprava a barvení preparátů) a biologie, která bývá dodavatelkou zkoumaných objektů a dokáže pomáhat i při jejich vizualizaci (imunocytochemie). Snad právě díky těmto setkáním jsou pohledy do mikrosvěta tak lákavé a těžko je lze na stránkách Vesmíru něčím nahradit. Nermalou roli hraje i vlastní krása zkoumaného.

Společné úsilí redakce Vesmíru a Československé mikroskopické společnosti, stejně jako vstřícnost a nasazení autorského kolektivu daly vzniknout této mimořádné příloze březnového Vesmíru roku 2004, která v kostce přináší mnohé podstatné z mikroskopie. Materiálu se sešlo mnoho, proto část otiskujeme v březnovém Vesmíru na stranách 146–153.

Stanislav Vaněk

Obsah

Kam směřuje elektronová mikroskopie?	
Rekapitulace a výhledy ■ Luděk Frank	2
Konfokální a dvoufotonová mikroskopie ■ Lucie Kubínová	4
Mikroskop s dvojítm řádkováním. Jeho zrození před čtyřiceti lety ■ Mojmír Petrů	6
Padesát let elektronové mikroskopie a elektronového mikroskopu v Brně ■ Armin Delong	7
Současná elektronová mikroskopie v biologii ■ Jana Nebesářová, Pavel Hozák	9

Březnový Vesmír 2004 dále přináší:

Jaromír Plášek: *Proměny světelné mikroskopie ve 20. století. Od lupy k mikroskopům s počítačem* [s. 146]
Mikroskopie /Data a souvislosti/ [s. 150]

Na obálce přílohy: Trichomy chřastavce (*Knautia*), Nomarského diferenciální interferenční kontrast, zvětšení 85×. Snímek pořídil na mikroskopu Olympus © Josef Reischig.

Kam směřuje elektronová mikroskopie?

Rekapitulace a výhledy

Odpovídat by samozřejmě znamenalo vstoupit na pole science fiction. Pokusme se však vyjmenovat hlavní přístrojové trendy v elektronové mikroskopii a naznačit jejich pravděpodobné další směřování. Elektronová mikroskopie má již po desetiletí v české vědě a průmyslu zvláštní postavení. V málokterém oboru jsme trvale na tak dobré úrovni a máme takovou mezinárodní prestiž ve všech polohách – od fyzikální teorie přes metodologický a přístrojový výzkum až po vlastní výrobu. A co je hlavní, z Brna se i nadále expedují mikroskopy do celého světa.

Kromě univerzálních rastrovacích a přímo zobrazujících mikroskopů a jejich hybridních kombinací můžeme mezi přístroje elektronové mikroskopie zařadit i testery integrovaných obvodů, mikroskopy s elektronovým svazkem, například elektronové litografie, svářečky a mikroobráběcí stroje, obvykle doplněné zobrazovacím režimem, a konečně netradiční konstrukce s permanentními magnety, miniaturizované elektronové optické tubusy mnohasvazkových systémů a další novinky posledních let.

Moderní **prozařovací (transmisní) elektronové mikroskopy (TEM)** překonaly magickou hranici **rozlišení jednoho angströmu** (0,1 nm) a zobrazují jednotlivé atomy nebo alespoň detaily o rozměrech a vzájemných vzdálenostech atomů. Obvykle ovšem jde o periodicky se opakující maxima intenzity v interferenčním poli procházejících a rozptýlených elektronových vln po výstupu z tenké vrstvy vzorku a průchodu zobrazující částí mikroskopu. Schopnost přenést vysoké prostorové frekvence na úrovni vzdálenosti atomů již postačuje pro počítačové zpracování obrazu, jež skutečné polohy atomů ukáže. Úkolem je „obrátit“ proces rozptylu elektronů a zobrazení za přítomnosti fázových efektů.¹

Pokročilý systém zpracování obrazu již tvoří nedílnou součást mikroskopu a na jeho další vývoj se asi soustředí pokrok v oblasti TEM. Do programů pro simulaci elektronového rozptylu totiž mohou být zahrnuty kmity krystalové mřížky, povrchové amorfní nebo rekonstruované vrstvy, náklon atomových sloupců ad. Toto zpracování obrazových dat je ve své podstatě dvojrozměrné a tím se omezuje na krystalická uspořádání. O krok dále je **TEM tomografie** (viz příspěvek P. Hozáka a J. Ne-

besářové), která třetí rozměr postihuje, avšak prozatím pouze s rozlišením v jednotkách nanometrů. Dalším možným „rozměrem“ pořizovaných dat je energie elektronů. Energiíovou analýzu pod rovinou konečného obrazu již nahradily filtry uvnitř projekčního systému, tvořené sestavou disperzních a množstvím korekčních prvků. Dnes již lze udržet subangstrómové rozlišení i v obraze filtrovaném na 0,1 až 0,2 eV.

Simulace obrazu známé atomové struktury v TEM je zvládnuta a budoucím úkolem je simulovat obraz libovolné struktury včetně zahrnutí rušivých jevů a redukovat Stobbsův faktor vyjadřující rozdíl mezi kontrasty sejmutých a simulovaných obrazů. Tento faktor má reálný podklad (např. v nepružném rozptylu), ale současně je fantomem připomínajícím nedostatečné pochopení přírody. „Konečný cíl“ – identifikaci každého atomu s jeho atomovým číslem a přesnou polohou v preparátu o tloušťce stovek atomových rovin – si již umíme představit a ve zjednodušených případech se k němu přibližujeme.

Horkým tématem je **korekce optických vad**.² Po desetiletí víme, že optické vady „normálních“ rotačně symetrických elektromagnetických čoček nelze korigovat žádnou jejich kombinací. Vzdáme-li se však některých z předpokladů (časové neproměnnosti polí, zanedbatelnosti vlivu prostorového náboje nebo spojitosti potenciálu a jeho první derivace), máme šanci obrátit znaménko koeficientu vady a kombinací se standardním prvkem vadu kompenzovat.³ Obvykle je opouštěna rotační symetrie a nastupují multipólová elektrická i magnetická pole generující vady obou znamének. Mnohé návrhy multipólových korektorů již byly na laboratorní úrovni realizovány a ověřeny. První komerční korektor pro STEM umožnil dosáhnout rozlišení kolem 0,1 nm, byť byl napájen 43 nezávislými zdroji. Pokrok směřuje k systémům korigujícím otvo-

RNDr. Luděk Frank, DrSc., (*1946) vystudoval fyziku pevných látek na brněnské univerzitě. V Ústavu přístrojové techniky Akademie věd ČR se zabývá elektronovou mikroskopií a spektroskopií, především po metodologické stránce, a fyzikou povrchů. Od roku 2001 je ředitelem ústavu.

rovou i chromatickou („barevnou“) vadu a k čistě elektrostatickým, snadněji a přesněji realizovatelným systémům.⁴ Korektory vad asi záhy dosáhnou ustálené podoby a bez zásahu obsluhy budou korigovat obě hlavní vady. Rozlišení TEM a STEM posunou pod 0,1 nm, což je úroveň, jejíž další snižování se dnes nezdá být účelné.

Českým příspěvkem je **nízkonapěťový TEM** s miniaturizovaným elektronově optickým tubusem na bázi permanentních magnetů a elektrostatických prvků, který vytváří obraz na stínítku pozorovaném optickým mikroskopem. Elektrony o energii pouhých několika keV projdou jen velmi tenkými preparáty, avšak přenášejí vysoký obrazový kontrast. Pronikne-li tento přístroj ve větší míře na trh, bude to znamenat nejen úspěch české vědy a průmyslu, ale i výrazné obohacení experimentálních

metod, zejména o pozorování málo kontrastních preparátů v původním stavu.

Trendem v konstrukci přístrojů **SEM** jsou nízké energie elektronů, přinášející snížené nabíjení preparátu, zvýšený signál a menší rozptyl ve vzorku. Korektory by měly redukovat fatální pokles rozlišení se snižující se energií. Za „normálních“ okolností se rovnováha mezi otvorem, chromatickou a difrakční vadou s klesající energií posouvá⁵ – jestliže se energie sníží o čtyři řády, rozlišení poklesne o tři (velikostní) řády. Korektor by však mohl i v konvenčním přístroji umožnit rozlišení pod 1 nm při 1 keV. Po bližší této hranice překvapivě končí snahy snižování energií elektronů, ačkoliv přístroje s velmi pomalými elektrony poskytují nanejvýš atraktivní výsledky.

Mikroskop s pomalými elektrony (Low Energy Electron Microscope, LEEM) byl navržen již na počátku šedesátých let 20. století, ale solidní realizace se dočkal až v polovině let osmdesátých. Šlo o typ **emisního mikroskopu** přímo zobrazujícího celý emitující povrch preparátu podobně jako TEM. „Moderní“ je **fotoemisní mikroskop** s excitací úzkým svazkem rentgenového záření ze synchrotronu. V LEEM na vzorek dopadá rovinná koherentní vlna elektronů o energii pouhých jednotek až desítek eV, která se z velké části odráží. Poněvadž vlnová délka těchto elektronů je blízká meziatomovým vzdálenostem, dochází k interferenci mezi vlnami rozptýlenými jednotlivými atomy (elektronové difrakci) a výběrem vhodného paprsku lze zviditelnit lokální krystalickou strukturu vzorku a jejím prostřednictvím množství fyzikálních jevů probíhajících na čistém povrchu.

Rozsáhlý projekt LEEM probíhal s českou účastí, která byla zásadní při vývoji rastrovací verze přístroje. I ve standardním SEM lze elektrony zpomalit brzdícím polem těsně nad povrchem vzorku v „katodové čočce“ a signální elektrony, sekundární i zpětně odražené, pak urychlit opačným směrem. Silné elektrické pole (o jednotkách kV/mm) potlačí pokles rozlišení se snižující se energií, takže upravený přístroj má všechny výhody nízkých energií, a navíc zobrazuje kontrasty v SEM jinak nedostupné.⁶ Pod energií cca 50 eV se střední volná dráha elektronů ve vzorku opět prodlužuje, elektrony pronikají hlouběji a klesá citlivost experimentu k vakuovým podmínkám, samozřejmě nikoliv u jevů, jež nastávají jen na atomově čistých površích. Technika brzdění primárních elektronů v blízkosti vzorku se zřejmě záhy objeví v komerčních přístrojích a rozšíří arzenál pro studium povrchů.

Pokrok ve výpočetní technice umožnil počítat prostorově rozložené elektromagnetických polí, trajektorie elektronů, zobrazovací vady a profily elektronových svazků. Výsledkem byla optimalizace elektronově optických prvků a systémů

a návrhy jejich nových typů. Žhavou záležitostí jsou detekční systémy navrhované podle počítačové simulace drah signálních elektronů ve složitě trojrozměrně tvarovaných elektromagnetických polích.⁷ Mladšího data jsou také procedury dálkové obsluhy přístrojů pomocí počítačové sítě, které dnes dovedou přimout základní pokyny týkající se režimu přístroje a sejmout obraz a v budoucnosti jistě pokročí k rychlé obousměrné komunikaci obsluhy s přístrojem.

V rastrovacích mikroskopech se setkáváme s jedním nebo více jednokanálovými detektory produkujícími po jedné hodnotě signálu pro každý obrazový bod. Pro budoucnost zůstává rozšíření na dvourozměrné mnohakanálové detektory, které umožní v bodě obrazu sejmout úhlové rozdělení emise a zachytit tak nejen všechny difrakční jevy, ale i záznam nekoherentního signálu povýšit na vyšší informační úroveň. Fantazií zatím zůstává dvourozměrná mnohakanálová polovodičová detekční struktura, v níž bude každý kanál vybaven integrovanou elektronikou se schopností rozpoznat energii dopadajícího elektronu podle počtu vygenerovaných párů elektron-díra, podobně jako je tomu u energiově disperzivních detektorů rentgenového záření. Při pořizování těchto „pětirozměrných“ experimentálních dat by šlo o snímání velmi slabých signálů, a proto by se musely čítat jednotlivé elektrony.

Během sedmdesáti let vývoje elektronové mikroskopie nastaly chvíle, kdy mnozí měli pocit, že všechno již bylo objeveno a není kam pokračovat. Jedním z těchto momentů byl vznik *sondové mikroskopie* (rastrovací tunelové mikroskopie, mikroskopie atomárních sil a dalších variant využití ostrého hrotu pohybujícího se v nejtěsnější blízkosti preparátu, viz např. Vesmír 77, 381, 1998/7). Tato očekávání se však nepotvrdila. Zkoumat hmotu pomocí elektronů, které tvoří jeden z jejích základních stavebních kamenů, je totiž přirozené a normální, a proto má elektronová mikroskopie před sebou nezpochybněnou budoucnost. ■

Významnější články Vesmíru, které se mikroskopii věnovaly v posledních letech:

- Josef Chalupský: Svět pod mikroskopem. Vzpomínka na profesora Jiřího Fialu (Vesmír 71, 695, 1992/12)
- Josef Reischig: Konfokální fluorescenční mikroskopie (Vesmír 74, 482, 1995/9)
- Jaromír Plášek: Konfokální mikroskop (Vesmír 74, 508, 1995/9)
- Jaromír Plášek, Josef Reischig: Kontrast v optické mikroskopii (Vesmír 74, 638, 1995/11)
- Mojmir Petráň, Milan Hadravský, Alan Boyde, Jiří Beneš: Optické mikroskopy s velmi vysokým rozlišením (Vesmír 76, 616, 1997/11)
- Pavel Janda, Jan Weber: Mikroskopie rastrovací sondou (Vesmír 77, 381, 1998/7)
- Jaromír Plášek: Prostorové zobrazení preparátů (Vesmír 79, 137, 2000/3)
- Eduarda Dráberová: Cytoskelet – dynamická síť (Vesmír 79, 438, 2000/8)

1) Invertovat zobrazovací proces znamená z konečného obrazu rekonstruovat vlnu vystupující z preparátu. K tomu potřebujeme fokusační sérii (řadu snímků sejmutých s malými rozdíly v zaostření), kterou zpracujeme algoritmem využívajícím závislosti mezi funkcí přenosu kontrastu a zaostřením objektivu. Kromě intenzitní informace, tvořící zpracovávané snímky, tak získáme také informaci fázovou. Alternativou je mimoosová holografie, pro níž musí být do tubusu zařazen elektrostatický dvojhrot. Ten přeloží aberacemi zkreslenou obrazovou vlnu přes nerozptýlenou referenční vlnu a vyvolá mezi nimi interferenci. Fázová informace je pak přístupnější, ale přesto je stále výhodnější snímat fokusační série hologramů. Střední pás hologramu poskytne informace, které jsou ekvivalentní datům z konvenční fokusační série (směs signálů pružné a nepružné rozptýlených elektronů), zatímco z postranních pásů rekonstruujeme kontrast pružného rozptylu. Samotný proces nelineárního dynamického rozptylu elektronů ve vzorku lze přibližně popsat, a tedy i invertovat použitím teorie „kanálování“ mezi sloupci atomů orientovanými ve směru elektronové vlny. K výsledku lze dospět několika iteracemi, v nichž se střídá přibližný výpočet struktury preparátu z obrazových dat se simulací obrazu odhadnuté struktury.

2) Úsilí se vyplácí tam, kde jsou optické vady pro rozlišení obrazu rozhodující. TEM zobrazuje vlnu vystupující ze vzorku a věrně ji zobrazí jen při vyloučení vad. U rastrovacích systémů se informace lokalizuje podle nominálních výchylek primárního paprsku a rozptylu elektronů ve vzorku je součástí přenosové funkce. V rastrovacím prozařovacím mikroskopu (STEM) vzniká v tenkém vzorku jen nepatrný rozptyl a přístroj se tedy ke korekci hodí. V běžném rastrovacím mikroskopu (SEM) je tomu naopak a pokusů o korigování se objevuje méně.

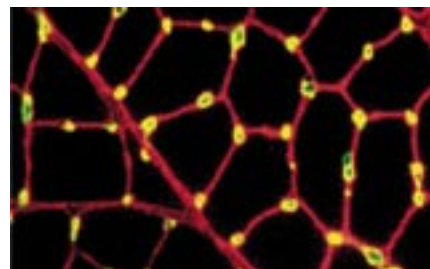
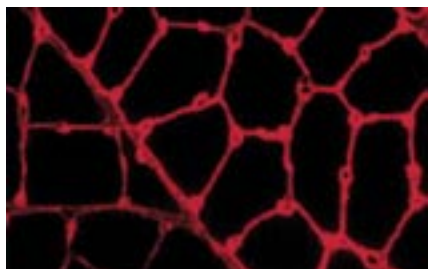
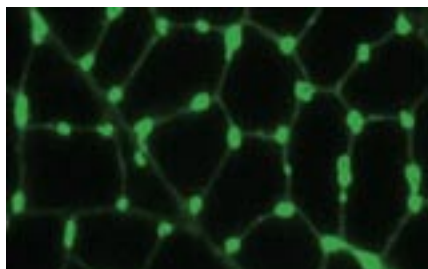
3) Nejnověji se usílí zaměřilo na časově proměnné pole. Do krátkých pulzů přerušovaný tok elektronů prochází průletovým prostorem, na jehož konci se postupně zesiluje pole urychlující stále pomalejší přicházející částice. Výsledkem je konstantní energie vstupu elektronů do čočky určující rozlišení obrazu.

4) Zvláštní odnoží jsou monochromátory svazku zužující jeho energiový rozptyl pod 0,1 eV.

5) V důsledku prodlužování vlnové délky elektronů a růstu relativní velikosti energiového rozptylu ve svazku.

6) Jde například o difrakční kontrast zobrazující povrchovou krystalickou strukturu, elektronický kontrast úměrný lokální hustotě elektronových stavů, interferenční kontrast zviditelňující povrchové atomové stupně, popř. proužky stejné tloušťky na velmi tenkých povrchových vrstvách.

7) V prostoru nad preparátem, mezi pólovými nástavci objektivu a nad nimi, se umísťují elektrody, jejichž tvar a předpětí zajišťují cílený transport částic k detektoru nad objektivem stranou optické osy. Lze přitom do jisté míry vybírat energiový interval detekovaných elektronů a ovládat i podíl sekundárních a zpětně odražených elektronů v konečném obraze. Na sběru signálu se projevují i úhel emise. Zatím je výsledkem těchto snah široký rejstřík detekčních uspořádání, poskytujících z těchto preparátů navzájem výrazně odlišné obrazy.



LUCIE KUBÍNOVÁ

Konfokální a dvoufotonová mikroskopie



1. Dvojnásobné barvení kosterního svalu krysy. Zeleň jsou obarveny stěny krevních vlásečnic (vlevo), červeně stěny svalových vláken (uprostřed). Na překrytí obou obrazů přes sebe (vpravo) je možné pozorovat vzájemnou polohu „žlutých“ krevních vlásečnic a „červených“ stěn svalových vláken. Snímky © Lucie Kubínová a Vita Čebašek

2. Povrchová trojrozměrná rekonstrukce terminálních klků lidské placenty, obsahujících červeně vyznačené krevní vlásečnice. Snímek © Jiří Janáček, Marie Jirkovská, Petr Karen a Lucie Kubínová.

Když se řekne *mikroskop*, většině lidí se vybaví mikroskop *optický*, s nímž se setkali ve škole při pozorování trepky nebo buněk cibulové slupky. První optický mikroskop byl sestaven v holandských dílnách někdy v letech 1590–1609, v souvislosti s tím bývají uváděna jména Hans Jansen a jeho syn Zacharias, a dále Hans Lippershey. Během následujících staletí byl však stále zdokonalován.

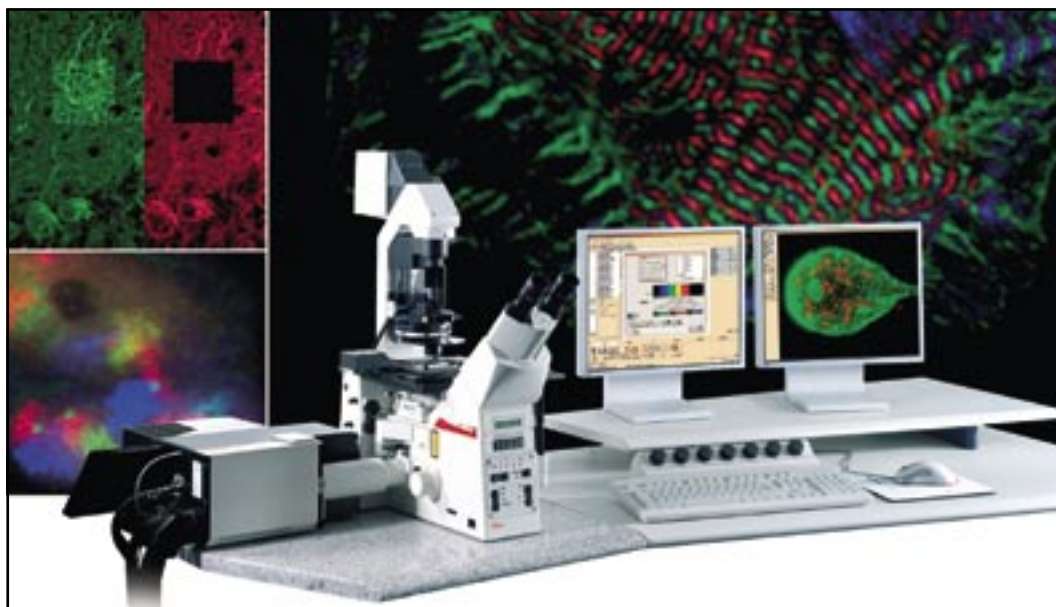
Mezi novější metody optické mikroskopie patří *konfokální*¹ *mikroskopie*, která výrazným způsobem rozšířila možnosti pozorování zejména biologických

objektů. Její princip patentoval americký vědec Marvin Minsky r. 1957, avšak jeho vynález našel širší uplatnění až o třicet let později. Do historie konfokální mikroskopie se zapsali také Mojmir Petráň a Milan Hadravský z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, kteří r. 1965 zkonstruovali nový typ konfokálního mikroskopu – *mikroskop s dvojitým řádkováním* (tandemový skenovací mikroskop) a r. 1968 jej patentovali.

Při pozorování v konfokálním mikroskopu je studovaný vzorek osvětlen bodovým zdrojem světla, nejčastěji la-

serovým paprskem. Speciální *konfokální clonka* skryje zobrazení oblastí nad a pod rovinou zaostření, a tím odstraní příčinu „rozmazání“ obrazu při pohledu na tlustší vzorky v klasickém optickém mikroskopu (obr. 3). V současné době je nejpoužívanějším přístrojem tohoto ty-

1) Připomeňme, že jako konfokální se označuje to, co je sdružené s ohniskem (*konjugovaný + fokální = konfokální*). V tomto případě je s ohniskem čočky objektivu (tj. s místem zaostření ve vzorku) sdružená jak optická soustava, která osvětluje, tak i ta, která zobrazuje. Jinými slovy je do téhož „bodů“ zaostřen paprsek osvětlovací i paprsek zprostředkující pozorování.



Leica
MICROSYSTEMS

Leica TCS
konfokální
mikroskopy
nejvyšší kvality

MIKRO, spol. s r.o.
Dolnokrčská 54
Praha 4, Krč
Tel.: 241 441 547
E-mail: leica@leica-mikro.cz
www.leica-mikro.cz

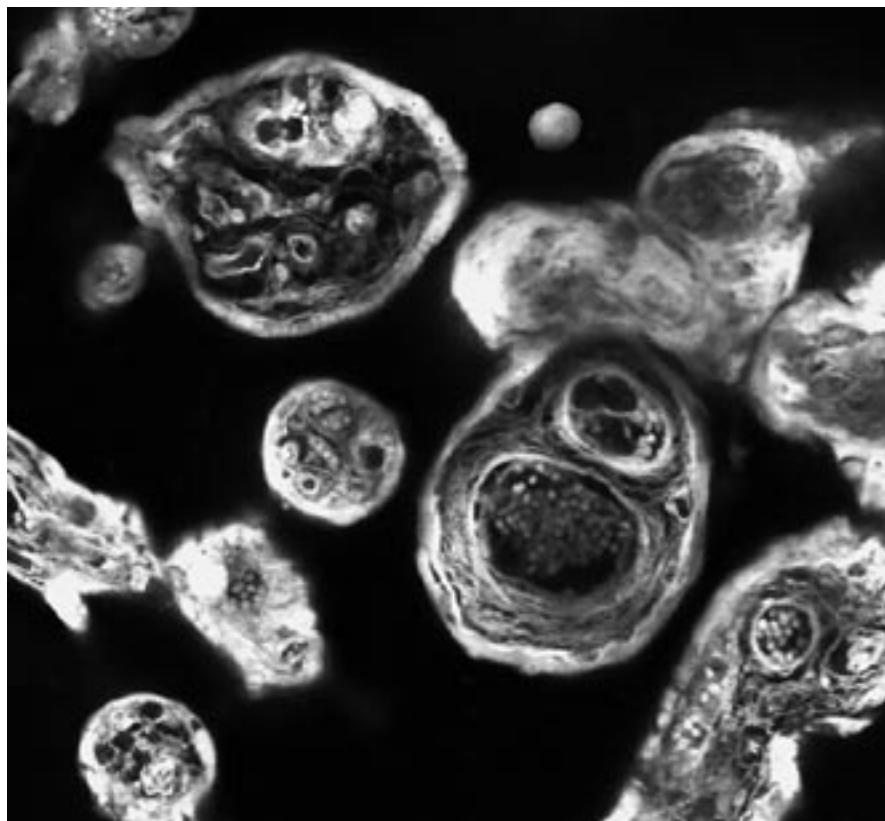
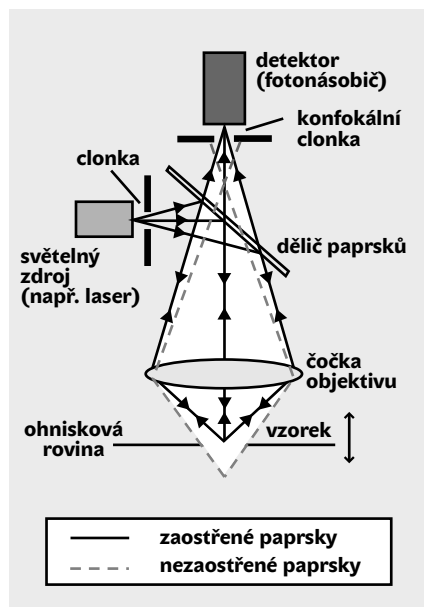
pu *laserový rastrovací konfokální mikroskop*, v němž je obraz roviny zaostření získán rastrováním zorného pole rozmitáním laserového paprsku. Tento mikroskop byl uveden na trh v osmdesátých letech 20. století.

Mezi hlavní přednosti konfokální mikroskopie ve srovnání s klasickou optickou mikroskopií je možnost vést tenké optické řezy i tlustším vzorkem, a dokonce zaznamenávat série digitalizovaných řezů vzorkem. Tyto sériové řezy jsou navíc přesně slícovány, a tak představují vhodná vstupní data pro studium trojrozměrné struktury objektů.

Dvoufotonový mikroskop je nový typ optického mikroskopu. Poprvé jej r. 1990 představili američtí vědci v čele s Watem W. Webbem z Cornellovy univerzity v Ithace. Podobně jako „klasický“ konfokální mikroskop umožňuje zobrazovat tenké optické řezy tlustším vzorkem, jeho princip je však odlišný. Místo jednofotonové excitace využívá speciální laser k excitaci dvěma fotony, které jsou absorbovány téměř současně, s šířkou pulzu řádově pouhých 100 femtosekund. Pravděpodobnost dvoufotonové excitace je úměrná druhé mocnině intenzity excitačního pole. Je nejvyšší v rovině zaostření, a proto k získání obrazů optických řezů vzorkem nepotřebujeme konfokální clonku. Mezi výhody dvoufotonové mikroskopie ve srovnání s mikroskopií konfokální patří například větší hloubka proostření (až do 400 μm), a to i u vzorků, jejichž povrchové vrstvy silně fluoreskují, dále pak zvýšený podíl signálu vůči šumu, tedy i kontrastnější zobrazení, zejména v hlubších vrstvách vzorku (obr. 4).

Konfokální a dvoufotonová mikroskopie má široké využití v mnoha biologických oborech, např. v buněčné a molekulární biologii a ve fyziologii.

3. Schéma laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu



4. Optický řez lidskou placentou v hloubce 60 μm nasnímaný mikroskopem Leica TCS SP2 AOBs s využitím dvoufotonové excitace, kterou bylo docíleno ostřejšího a kontrastnějšího obrazu. Snímky © Lucie Kubínová a Marie Jirkovská.

Umožňuje zobrazit tenké optické řezy buňkami či tkáněmi a určit vzájemnou polohu jejich různých komponent s využitím vícenásobného barvení (obr. 1). Při fyziologických studiích bývají často využívány časové série, zaznamenávající časové změny např. v koncentraci různých iontů v daných oblastech studovaného vzorku. Digitální obrazy sérií optických řezů představují data vhodná pro kvantitativní měření i pro počítačové trojrozměrné rekonstrukce poměr-

ně velkých oblastí vzorku, aniž je nutné řešit problém lícování následných fyzických sériových řezů (obr. 2).

V České republice byl první laserový konfokální mikroskop instalován r. 1993 v oddělení biomatematicky Fyziologického ústavu Akademie věd ČR, kde byl rovněž o deset let později uveden do provozu první dvoufotonový mikroskop. ■

RNDr. Lucie Kubínová, CSc., (*1959) vystudovala Matematicko-fyzikální fakultu Univerzity Karlovy v Praze. Ve Fyziologickém ústavu AV ČR se zabývá stereologií a konfokální mikroskopií se zaměřením na jejich aplikace v biologickém výzkumu. (kubinova@biomed.cas.cz)



Československá mikroskopická společnost je nezisková organizace vědeckých, vědecko-pedagogických, vědecko-technických a odborných pracovníků v oblastech mikroskopie elektronové, světelné a dalších typů. Podílí se na dalším rozvoji a zvyšování úrovně mikroskopických oborů, na koncepční a prognostické činnosti, na propagaci a realizaci výsledků vědecko-výzkumné činnosti.

ČSMS spolupracuje s obdobnými zahraničními společnostmi, je kolektivním členem Mezinárodní federace mikroskopických společností (IFSM)

a Evropské mikroskopické společnosti (EMS). Pořádá vědecké a pracovní konference, přednášky, diskuse, kurzy, zájezdy apod. Dosud nejvýznamnější pořádanou akcí byl evropský kongres elektronové mikroskopie EUREM 2000, konaný v Brně. V současnosti patří mezi nejdůležitější pravidelné aktivity týdenní mikroskopické kurzy, organizované ve spolupráci s výrobci špičkové mikroskopické techniky.

Československá mikroskopická společnost

předseda: doc. RNDr. Pavel Hožák, DrSc.
místopředseda: prof. Fedor Čiampor, DrSc.
Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 - Krč
http://www.microscopy.cz,
tel.: 241 062 219, fax: 241 062 289,
e-mail: csms@biomed.cas.cz

Mikroskop s dvojitým řádkováním

Jeho zrození před čtyřiceti lety

Jak už to bývá, vynález mikroskopu s dvojitým řádkováním¹ byl vlastně dílem náhody, přestože k němu směřoval celý můj odborný vývoj již od mládí. Asi v roce 1962 byl Jan Bureš na velké cestě po obou Amerikách a na Yaleově univerzitě se ho Robert Galambos ptal, zda by nevěděl o někom, kdo by mu pomohl s mikroskopováním v mozku živých zvířat. Bureš mu doporučil mne a já jsem Galambosovi napsal, že přijedu rád a jistě mu budu umět pomoci. Když jsem dorazil a pustil se do díla, mohl jsem výsledek vyjádřit Haškovými slovy: „...mnozí se těšili na je-lita, leč nedostalo se na ně ni špejlí.“

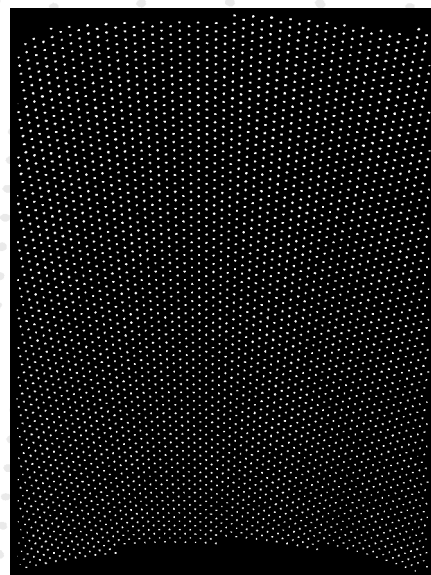
Při osvětlení shora (skrz optiku mikroskopu) byl „suchými“ objektivy vidět jen lesk odrazů od vlhkého povrchu a vodní imerzí jen všeobecné růžovo, připomínající pohled z dálky na dámské prádlo. Nepomohly ani chytrosti z literatury o použití polarizovaného či jednobarevného světla. Zkoušel jsem zvláštní objektivy, např. Leitzovy Ultropaky, kde se osvětluje velmi šikmými paprsky a k zobrazení se využívají pouze paprsky odražené blízko k optické ose. Pomohlo to jen málo, ale všiml jsem si, že kontrast obrazu, tj. viditelnost vůbec nějakých podrobností v struktuře objektu, záleží na velikosti, či vlastně na „malosti“ pole. Čím bylo osvětlené pole menší, tím více podrobností se v něm dalo rozeznat, jenže se nepoznalo, k čemu ty podrobnosti patří. Cesta tudy vedla i nevedla.

Kdybych se snažil pomoci si řádkováním a ono maličké osvětlené políčko rychle přemísťoval po celém zorném poli, které je vidět v okuláru, sotva by to pomohlo, protože nějaké rozptýlené světlo je okolo osvětleného políčka neustále, zatímco obraz nějakého bodu se tvoří jen nepatrný čas, tím kratší, čím menší světelnou skvrnou objekt osvětlujeme.

Kdyby prořádkování obrazu malou světelnou stopou trvalo jednu sekundu a tato stopa byla tisícinou celého pole, obraz jednoho místečka by se tisícinu sekundy vylepšoval a 999 tisícín sekundy zase kazil. Čekal jsem, až mě osví-tí Duch svatý a poradí mi jak se zbavit toho, co se děje po většinu času, a jak zachovat jen to důležité, co trvá tak krátce. Ten se však dlouho k ničemu neměl, až konečně mě napadlo: Když na tom, co se děje okolo, nezáleží, tak „okolo“ přikryjeme a bude to. Ale čím? Vzpomněl jsem si na Nipkowův kotouč (1884) z počátků televize, a tak se mi za horké srpnové noci 1964 zjevila idea našeho mikroskopu v podstatě již hotová. Se šéfem jsem vyjednal, že začnu doma – za těch pár dní, co zbývaly do mého odjezdu, bych už stejně nic neudělal – a on mi pošle vše, co u nás nelze sehnat. Až budu připraven, přijedu znova. Tak se také stalo.

Doma to však tak rychle nešlo, musel jsem učit, zvolili mě proděkanem a dali mi na starost vědeckou práci ústavů, klinik, profesorů, asistentů, ba i studentů. Za spolupracovníka na mikroskopu jsem si vybral nejmladšího asistenta MUDr. Milana Hadravského, jenž se nesmírně osvědčil. Patří do rodu „kovol-kařů“ – kromě medicíny se vyznal nejen ve fyzice, matematice a deskriptivní geometrii, ale také v řemeslné práci s kovem i sklem a v konstrukci přístrojů. Pomohlo mi i mnoho přátel, k jejichž vyjmenování tu chybí místo.

Když „to“ bylo zhruba vymyšleno, muselo se vyzkoušet, zda vše bude fungovat a zda stojí za to zabývat se tím důkladně a vytrvale. Bylo štěstí, že jsem si ukousl jen tolik, kolik jsem byl schopen strávit. Především to byla volba řádkování Nipkowovým kotoučem, která mi umožnila zachovat formu mikroskopu osvědčenou staletími a při zkouškách použít jeho hotové díly. Začali jsme rozmýšlením geometrie. Bylo třeba použít běžné součástky mikroskopů, a tedy i jejich míry. Když se máme dívat na mozkovou kůru, musí ležet osvětlení i zobrazení na téže straně pozorovaného objektu. Proto potřebujeme dva mikroskopy se společným objektivem, který bude do objektu „svítit“ pohybující se světelnou skvrnou. Zároveň bude světlem, jež se od objektu odrazilo, zobrazovat jeho osvětlenou část opět do obrazového pole. Z obrazového



1. Vzor děr v Nipkowově kotouči. Skutečná šířka pásma děr je asi 20 mm. Obrázek vznikl jako kontaktní fotografická kopie měděné fólie kotouče na fotografickou desku a následným zvětšením této kopie. Díry jsou ve skutečnosti trochu menší, než je jejich zobrazení. Nyní již díry děláme jinak, jsou všude stejně velké a stejně husté.

pole musíme pro pozorování okem propustit jen to světlo, které vytváří obraz pouze této skvrny, této malé části předmětové roviny, tj. světlo, které se odrazilo právě jen od objektů ležících tam, kam se světelná skvrna ostře zobrazila. Zároveň musíme potlačit valnou většinu světla rozptýleného, zbloudilého. Mělo by to jít, neboť předem víme, kde bude osvětlující ostrá stopa, a protože známe geometrii našeho zobrazování, víme také, kde bude obraz této stopy. Tam můžeme dát stínítko s dírkou, kterou projde pouze to světlo, jež do obrazu patří. Vše ostatní zadrží plech okolo.

Zároveň jsem studoval teorii optického obrazu a podle ní mělo být (za týchž okolností) rozlišení ve vymyšleném mikroskopu zhruba jedenapůlkrát lepší než v klasickém. Odtud jsem odvodil, že pro využití teoreticky možného rozlišení v praxi by měl mít Nipkowův kotouč průměr šest metrů a otočit se desetkrát za sekundu, což byl samozřejmě nesmysl. Protože většina škodlivého rozptýle-

Prof. MUDr. Mojmir Petráň, CSc., (*1923) vystudoval Lékařskou fakultu UK v Praze. Ve Fyziologickém ústavu ČSAV se věnoval elektrofyziologii, později vedl katedru biofyziky na Lékařské fakultě UK v Plzni. Roku 1964 vynalezl a spolu s M. Hadravským patentoval konfokální mikroskop. Je čestným členem Royal Microscopical Society v Oxfordu. S J. Burešem a J. Zacharem napsal knihu „Electrophysiological Methods in Biological Research“ (1957), která vyšla v angličtině (trojí vydání), ruštině, čínštině a japonštině.

1) Anglicky Tandem Scanning Microscope (TSM), o jeho vlastnostech viz Vesmír 76, 616, 1997/11.

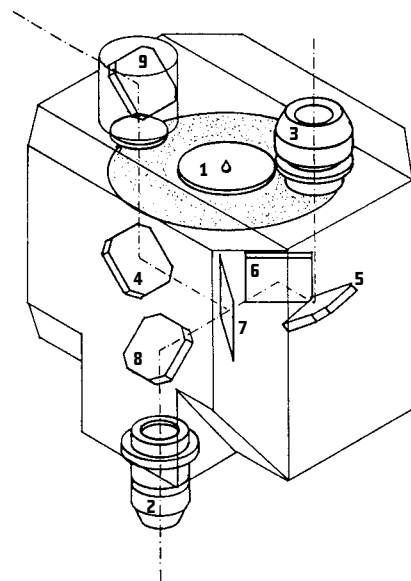
ného světla přichází do nejbližších míst obrazového bodu, stačí zaclonit úplně jen jeho poměrně blízké okolí (ve vzdálenějším okolí obrazového bodu už stejně žádné škodlivé světlo není) a hned blízko umístit další dírkou. Ty se nerozmístí jen na jednu dvojici spirál (kde se dírkou v jedné spirále osvětlí bod na objektu a světlo zde odražené projde dírkou ležící na druhé spirále), nýbrž na mnoho takových dvojic, třeba sto. Tím se stokrát zmenší obvod i průměr kotouče. V zorném poli nebude jeden bod obrazu, nýbrž 100 × 100 bodů, to znamená, že budeme mít desetitisíckrát jasnější obraz a (snad) bude stačit, když budeme svítit žárovkou. Bohužel to ale nevyšlo.

Potíže nám působilo poloodrazné zrcadlo. Tlusté by vnášelo astigmatismus, tenké by zdvojovalo obraz, kdyby bylo úhlopříčnou rovinou v krychli (řešení v praxi nejobvyklejší), odráželo by se světlo i na plochách krychle kolmých k optické ose a podstatně by snižovalo kontrast. Kdybychom chtěli kontrast udržet, museli bychom zavést polarizaci, zkřížené polarizátory a čtvrtvlnovou destičku pod objektivem (jako u polarizačního mineralogického mikroskopu) a jas obrazu by klesl na méně než desetinu původního. Pro začátek jsme se rozhodli nesvítit žárovkou, nýbrž sluncem. Kde jsme ho ale měli v listopadu 1965 sehnat? Za podpory fyziků a astronomů jsme se i s mikroskopem vydali na týden do hvězdárny na Lomnickém štítě. Mikroskop tam obstál znamenitě a od té doby s ním nejen pracujeme, nýbrž jej stále zdokonalujeme. Občas se i něco vyrobí a prodá, občas ho vyrobí i někdo v cizině (patenty dávno prošly).

Mikroskopu velmi uškodilo, že mi (podobně jako mnoha jiným) naši milí

držitelé moci asi na čtrnáct let zakázali publikační činnost. Ve světě to vzbudilo dojem, že mlčíme, protože naše cesta je slepá, a tak hledali jiní a našli jiné cesty. Neosvětlují žárovkou a tisíce svítících bodů, ale jediným bodem, který svítí mnohem intenzivněji – laserem. Obraz se pak musí skládat mnohem pomaleji, za pomoci počítače. Výhody našeho řešení byly: rychlost, celé viditelné spektrum a blízké oblasti infračerveného a ultrafialového světla, prostorové zobrazení (vlastně tedy čtyřrozměrné), snadná možnost rychlé mikromanipulace, podstatný rozdíl v ceně investice, a hlavně v nákladech na provoz a šetrnost v pozorování živých objektů (jejich slabší ozařování). Domnívám se, že zmíněné výhody našemu přístroji dovolí, aby se vrátil na trh (např. i do oční medicíny), jakmile se trochu zlevní poslední generace elektronických zesilovačů obrazu a některý výrobce mikroskopů si to uvědomí.

Rád bych upozornit mládež, která touží vydat se na tvrdou cestu objevů, že objevy nejde naplánovat. Nepodařilo se to ani nám, ač jsme museli stále pracovat pod tlakem mocipánů. Něco objevit se podaří pouze tam, kde jste odborníkem. Povede se to tím spíše, čím méně jiných odborníků pracuje ve vašem specializovaném oboru a čím lépe budete rozumět souvislostem svého oboru s obory jinými, jednak příbuznými, jednak podobnými třeba používaným aparátům. Nesnažte se naskočit do jedoucího expresu, stihnete leda tak poslední vagon. Když na něco slibného přijdete, nebuďte líní učit se pomocné obory, metodiku, bez níž se nehnete z místa, a učte se i obyčejně pracovat rukama, abyste metodiku uvedli v život.



2. Schéma mikroskopu s dvojitým řádkováním. Čerchované – optické osy; 1 – Nipkowův kotouč; 2 – objektiv; 3 – okulár; 4, 5, 6, 8, 9 – skleněná zrcadla zrcadla jsou zabazena jako desky (8 a 9 jsou zbytná); 7 – slídové „neomezeně tenké“ zrcadlo.

Celé své dobrodružství jsem v tomto vyprávění nemohl vylíčit, ale uvedu aspoň příklad: Kvůli děliči paprsků se stěny kolmými k ose jsme museli zavést polarizaci a obětovat víc než 90 % světla. Přitom existovala i jiná cesta – šikmé polopropustné zrcadlo „neomezeně“ tenké, ale přesto dokonale rovinné a pevné. Kvůli tomu, abych je vyrobil, jsem se naučil štípat slídu na tenké listy (0,005 mm) a napínat je do roviny, tmelit na prsteny, pokrývat je poloodraznými vrstvami (ty se dnes z České republiky exportují i pro úplně jiné účely). ■

ARMIN DELONG

Padesát let elektronové mikroskopie a elektronového mikroskopu v Brně

Elektronový mikroskop v několika svých modifikacích je stále přístrojem, který je nenahraditelný pro poznávání struktury až do úrovně atomového rozlišení u živých i neživých přírodních. Toto tvrzení neplatí zcela obecně, ale počet objektů, jichž se týká, stále roste spolu s rozlišovací schopností, která je na rozdíl od světelného mikroskopu velmi vzdálena hodnotám blízcím se vlnové délce pohyblivého světla. Laboratoří, které usilují o další zdokonalení elektronového mikroskopu, není mnoho. I když se zdá, že nejlepší léta elektronové mik-

roskopie již minula, mnoho se ještě dá udělat. Nepůjde o žádné převratné projekty, nicméně pokrok je představitelný v přístrojové oblasti, v preparačních metodách, mohl by přinést další nové poznatky o atomové struktuře řady objektů, a to zejména pomocí korekce optických vad elektronových čoček.

Brněnská pracoviště v oblasti výzkumu, konstrukce a výroby elektronových mikroskopů mají za sebou padesát let zkušeností. Ty umožnily vyrobit více než 3000 elektronových mikroskopů v dřívější Tesle Brno, která po převratných

změnách našeho průmyslu počátkem devadesátých let 20. století sice ukončila svoji činnost, zároveň však vznikly aktivity, které vedly k tomu, že elektronová mikroskopie ani elektronové mikroskopy z Brna nezmizely. V současné době jsou naopak významnější než kdykoliv

Prof. Ing. Armin Delong, DrSc., (*1925) vystudoval Vysokou školu technickou v Brně, obor slaboproudého inženýrství. Nyní se věnuje výzkumu a vývoji nízkovoltového elektronového mikroskopu určeného pro biologické aplikace.

dříve – např. roční produkce elektronových mikroskopů nyní přesahuje výrobu v nejlepších letech Tesly Brno.

Neuškodí ohlédnout se k začátkům, zejména když můžeme některé poznatky použít pro aktivnější účast na světovém technickém pokroku. To je naším prioritním úkolem, nemá-li se naše společnost, jež byla v minulosti uznávaným nositelem technického pokroku, definitivně ocitnout za našimi sousedy, které jsme v této oblasti vždy převyšovali.

Naše aktivity při vývoji elektronového mikroskopu vznikly někdy r. 1948 v Ústavu teoretické a experimentální elektrotechniky na Vysoké škole technické v Brně. Jeho vedoucí profesor Aleš Bláha začal poměrně brzy po válce budovat ústav tak, aby při vlastní vědecké a výzkumné činnosti připravoval pro tvůrčí práci i studenty. Taková orientace nebyla běžná, dalo by se říci, že byla neobvyklá. Rozsah těchto aktivit byl omezený a nemohl stačit pro všechny studenty, jichž se po válce přihlásilo ke studiu velké množství, protože vysoké školy byly po dobu okupace uzavřeny. Profesor Bláha si studenty pro výzkumnou práci vybíral podle studijních výsledků. Přijal jsem s velkou radostí jeho nabídku zúčastnit se prací na vysokonapětovém oscilografu, které později přешly na vývoj elektronového mikroskopu. Postavit elektronový mikroskop nebyl v té době jednoduchý úkol. Často jsme domů odcházeli až hluboko v noci. Naš pracovní tým se skládal ze tří studentů (V. Drahoše, L. Zobače a mě) a jednoho technika konstruktéra (J. Speciálního). K dispozici jsme měli poměrně dobře vybavené ústavní dílny. Stavba elektronového mikroskopu byla zároveň naší diplomovou prací. Na radu pana profesora jsme nejdříve postavili jednoduš-

ší experimentální elektronově optický systém skládající se z elektronové trysky, dvou elektronových magnetických čoček a komory s luminiscenčním stínítkem pro pozorování obrazu. Funkce tohoto experimentálního zařízení byla velmi uspokojivá a přinesla nám řadu poznatků použitelných při další práci. Postavit skutečný elektronový mikroskop nám usnadňovala existence elektronového mikroskopu firmy RCA na Lékařské fakultě v Brně u profesora F. Herčíka. Mikroskop sloužil výzkumu bakteriofágů a měli jsme k němu kdykoliv přístup. Dodnes vidím před očima žlutozelené stínítko s obrázkem bakterií *Escherichia coli* lyzovaných bakteriofágy, který nás přiměl ještě zvýšit pracovní úsilí k dosažení tak lákavého cíle.

Během přípravných prací jsme došli k příjemnému závěru, že vše potřebné pro stavbu mikroskopu půjde opatřit z tuzemských zdrojů. Naše země byla v meziválečném období státem s rozvinutým průmyslem, což se projevilo tím, že jsme řadu potřebných materiálů, součástek i funkčních bloků našli v sortimentu našich výrobců. Šlo především o vakuové vývěvy, elektronické součástky, hutní materiály a řadu dalších. Koncem r. 1949 byl elektronový mikroskop úspěšně uveden do chodu. Tato potěšující skutečnost zároveň inspirovala záměr vyrobit sérii dvaceti elektronových mikroskopů ve vědeckých dílnách, které profesor Bláha založil jako detašované pracoviště Tesly Pardubice. Série byla realizována za neuvěřitelné dva roky.

Slibně se rozvíjející aktivity však byly přerušeny přeměnou Vysoké školy technické ve Vojenskou technickou akademii. Profesor Bláha odešel do Bratislavy, kde se mu už nepodařilo brněnský experiment zopakovat, naše malá skupina zůstala na VTA. Bylo však jasné, že náš nevojenský program vydrží v jejích zdech jen do doby, kdy bude vyčerpán jeho propagační potenciál.

Museli jsme najít jinou bezpečnější možnost pokračovat v slibně započaté práci. Ta se našla v Mikrobiologickém ústavu nově založené ČSAV. Akademik P. Málek nám nabídl možnost zřídit v Brně Laboratoř elektronové optiky spadající pod tento ústav. Když se nám podařilo z VTA odejít, mohli jsme dokončit vývoj stolního elektronového mikroskopu a najít pro něj výrobce v Tesle Brno, kde se pak výroba elektronových mikroskopů usídlila na desítky let.

Zabralo by mnoho místa zabývat se všemi výsledky, jichž bylo dosaženo jak v později zřízeném Ústavu přístrojové techniky ČSAV, kam jsme počátkem šedesátých let přešli, tak v Tesle Brno, která postupně disponovala zkušeným týmem odborníků, schopným vyvíjet nové mikroskopy.

Druhý kritický okamžik nastal při změnách v naší společnosti počátkem devadesátých let. Tesla ztratila dosa-



Snímek z roku 1960, na němž jsou všichni čtyři autoři prvního elektronového mikroskopu, zleva L. Zobač, V. Drahoš, J. Speciální, A. Delong.

vadní méně náročné trhy a pro vstup do soutěže s předními světovými výrobci nenašla dostatek sil ani možností. Nezanedbatelný potenciál odborníků v oblasti elektronové mikroskopie však umožnil nový start. Vznikly tři firmy, které v současné době úspěšně vstoupily na světový trh elektronových mikroskopů. Ústav přístrojové techniky také pokračuje v dřívějších činnostech a připravuje odborníky pro potřeby dalšího rozvoje elektronové mikroskopie v Brně.

Interakce elektronů s pevnou látkou je velmi výrazná a pomocí ní lze získat nejvíce informací na atomární úrovni při stejném radiačním zatížení jako např. s rentgenovým zářením, které však vykazuje radiační poškození několiksetkrát vyšší. Již to je dobrý důvod pro zdokonalování elektronového mikroskopu. Pro realizaci moderního kompaktního elektronového mikroskopu s korigovanými aberacemi je v současné době cesta otevřena. Velké koncerny ztratily zájem využívat propagační charakter výrobků s vysokou mírou uplatnění nejmodernějších technologií. Pro univerzitní výzkumy a menší firmy se proto otvírá možnost tuto úlohu převzít. Projekty tohoto zaměření mají všechny atributy, pro něž je rozumné investovat prostředky lidské i materiální: jasnost stanovených cílů, jejich aplikace ve společenské praxi a návratnost vložených prostředků. Možnost realizace pro řadu odborníků je dalším významným důvodem, který usnadňuje rozhodnutí, kam s prostředky na vědu a výzkum. ■

Nejvíce originálních mikrofotografií bylo ve Vesmíru publikováno r. 1997 v seriálu *Mikroskvětem s Josefem Reischigem a firmou Olympus*:
Michal Anděl: Vesmír 76, 122, 1997/3
Fatima Cvrčková: Vesmír 76, 362, 1997/7
redakce: Vesmír 76, 182, 1997/4; 76, 242, 1997/5; 76, 319, 1997/6; 76, 422, 1997/8; 76, 482, 1997/9; 76, 542, 1997/10; 76, 602, 1997/11; 76, 662, 1997/12
Stanislav Vaněk: Vesmír 76, 62, 1997/2

První experimentální aparatura z konce čtyřicátých let 20. století, která předcházela prvnímu skutečnému mikroskopu.
Snímky © Armin Delong



Současná elektronová mikroskopie v biologii

Transmisní i skenovací elektronový mikroskop (dále TEM a SEM) byly od svého počátku využívány pro výzkum biologických objektů, přestože biologické vzorky nejsou pro pozorování v elektronových mikroskopech nejvhodnější. Mají vysoký obsah vody, který je neslučitelný s vakuem vnitřních prostorů mikroskopů, a v jejich hmotě převažují lehké atomy, což vede k nedostatečné interakci a rozptýlu energetických primárních elektronů. Proto se musí biologické preparáty zbavovat vody a do jejich struktury se musí přidávat atomy těžkých kovů. Tato příprava vzorků je často příčinou výrazných změn. Současný rozvoj biologické elektronové mikroskopie se zaměřuje na hledání možností jak pozorovat biologické preparáty co nejblíže jejich nativnímu stavu.

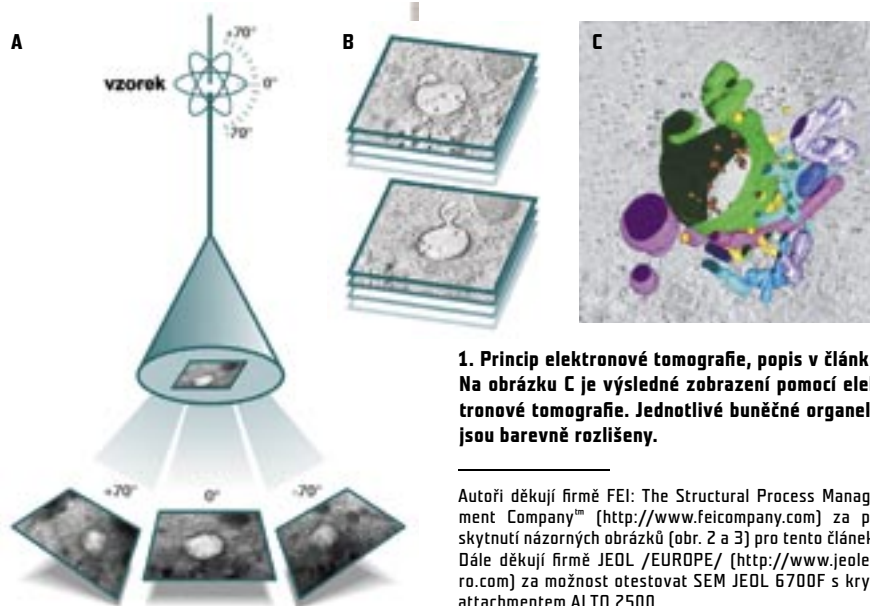
Transmisní elektronová mikroskopie

Řada novinek se objevilo v transmisní elektronové mikroskopii. Zmíníme se jen o dvou z nich.

- Elektronová mikroskopie odjakživa snila o prostorovém zobrazení pozorovaných objektů, ať už šlo o buňky, molekuly či technické materiály. Skenovací

elektronová mikroskopie umožňuje náhled pouze na povrch struktur, klasická prozařovací elektronová mikroskopie umí pracovat jen s tenkými řezy, jejichž příprava je obtížná a skládání výsledného obrazu nepřesné. Nedávno se však objevily komerčně dostupné přístroje,

jež zvládají prostorový pohled dovnitř zkoumaných útvarů. Využívají tomografii – metodu založenou na sběru obrazu při otáčení preparátem a následné počítačové rekonstrukci. Během necelé desítky let vyzrála elektronová tomografie do uživatelsky přátelské metody, kterou



1. Princip elektronové tomografie, popis v článku. Na obrázku C je výsledné zobrazení pomocí elektronové tomografie. Jednotlivé buněčné orgány jsou barevně rozlišeny.

Autoři děkují firmě FEI: The Structural Process Management Company™ (<http://www.feicompany.com>) za poskytnutí názorných obrázků (obr. 2 a 3) pro tento článek. Dále děkují firmě JEOL /EUROPE/ (<http://www.jeoleuro.com>) za možnost otestovat SEM JEOL 6700F s kryostatem ALTO 2500.

Pozvánka do mikrosvěta s přístroji značky ARSENAL

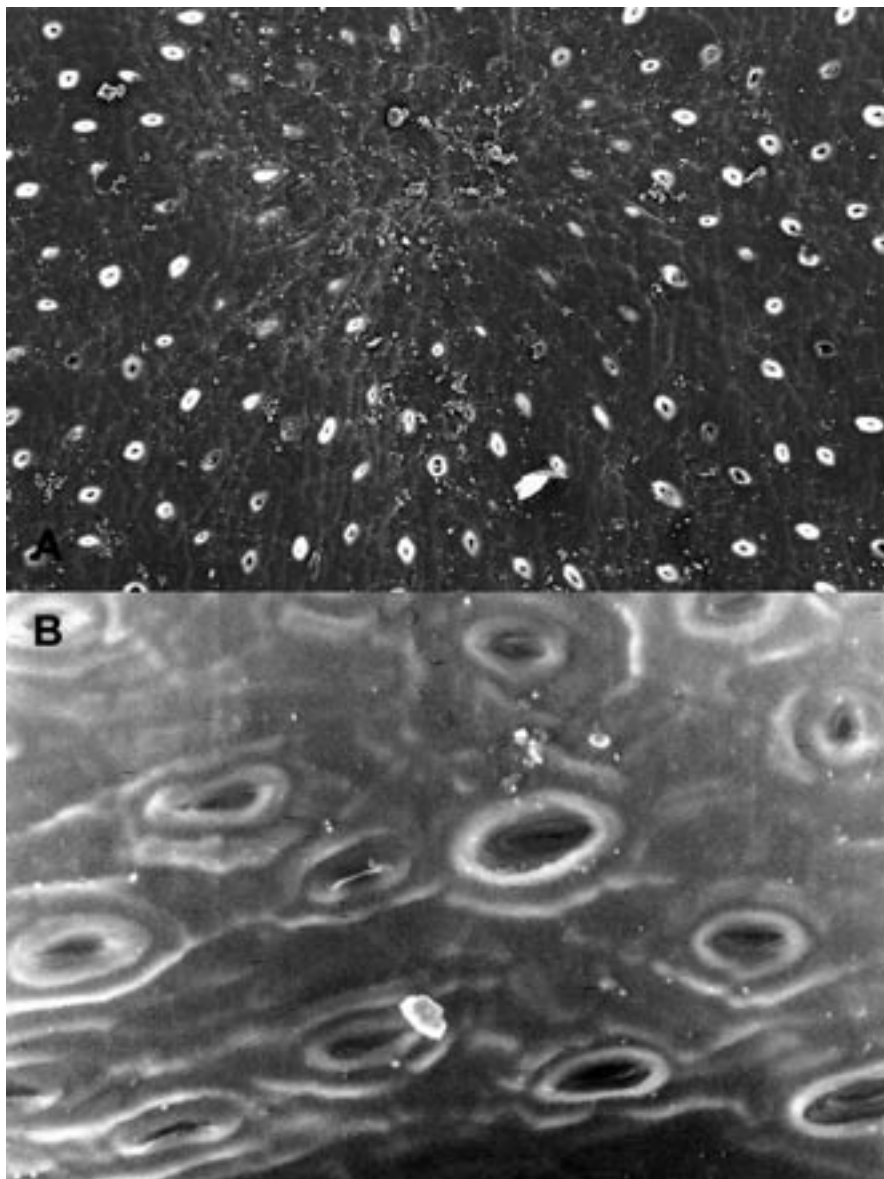


žákovské a studentské mikroskopy
laboratorní mikroskopy
stereoskopické mikroskopy
osvětlení z optických vláken – studené světlo
metalografické a polarizační mikroskopy
fotomikroskopy a videomikroskopy
software pro digitalizaci a zpracování obrazu
CCD kamery a videomonitory
zpětné projekory
stolní lupy s osvětlením
pomůcky pro mikroskopii
bezplatný návrh optimální sestavy
u vybraných přístrojů záruka 3 roky

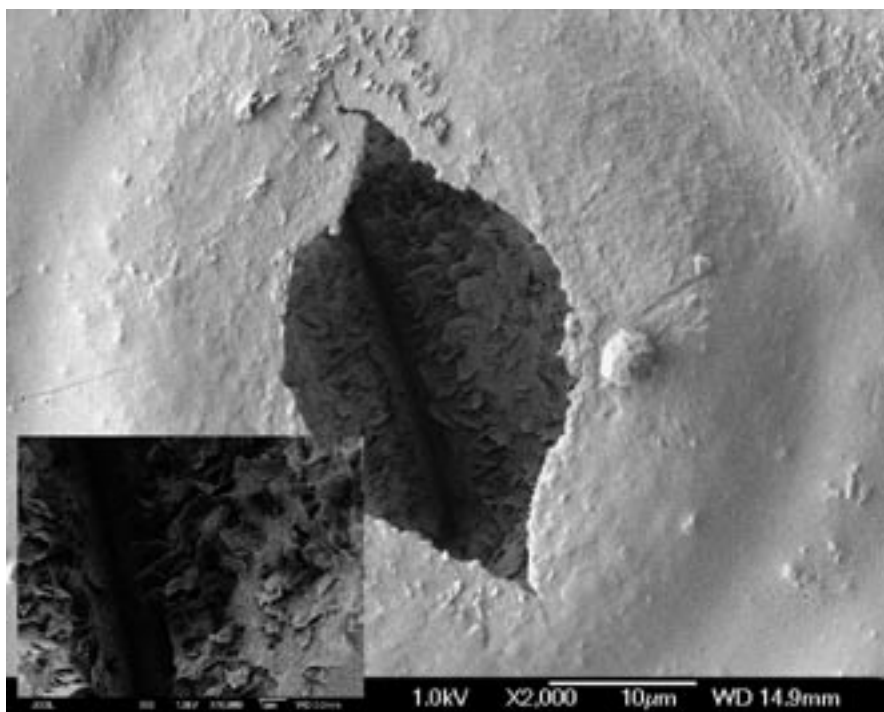


ARSENAL, s. r. o., vzorková prodejna: Na Strži 59, 140 00, Praha 4
tel.: 261 222 561, 602 340 150, fax: 261 222 561
e-mail: mikroskop@arsenal.cz, internetová adresa: www.arsenal.cz





Dole: 3. Průduchová dutina blahovičnickového listu. Snímek zmraženého preparátu, který je pokryt tenkou vrstvou slitiny platiny a paladia, urychlovací napětí 1 kV, skenovací elektronový mikroskop s autoemisní tryskou, © Jana Nebesářová.



2. Nahoře „nepatříčně svítící“ svěrací průduchové buňky z povrchu blahovičnickového listu při prohlížení ve vysokovakuovém skenovacím elektronovém mikroskopu. Dole totéž, ale s nevysušeným a nepokoveným povrchem v environmentálním skenovacím elektronovém mikroskopu, © Jana Nebesářová.

může používat každý zkušenější mikroskopik. Dá se očekávat, že v nejbližších letech bude naprosto nezbytným nástrojem výzkumu v biologii, medicíně, materiálových i technických vědách.

Jak elektronová tomografie pracuje? Systém sestává z prozařovacího elektronového mikroskopu s dostatečným urychlovacím napětím,¹ aby mohly být použity tlustší preparáty než v klasické mikroskopii, a z výkonného počítače. V mikroskopu je vestavěn nesmírně přesný držák preparátu, který se dokáže otáčet bez významných otřesů a posuvů po malých krocích od -70° do $+70^\circ$. Celý proces (otáčení držáku, kontrola parametrů zobrazení při každém kroku, snímání jednotlivých obrázků) je plně automatizován. Typická sada postupně pořízených tomografických snímků obsahuje asi 140 záběrů získaných digitální kamerou za 20 minut (obr. 1A). Počítačové zpracování začíná přesným „naso-
sováním“ jednotlivých obrázků nad sebe pomocí složitých matematických (plně automatizovaných) postupů (obr. 1B). Poté práci přebírá software, jenž vytvoří přesnou prostorovou rekonstrukci struktur, které nás zajímají (obr. 1C). Tímto způsobem lze rekonstruovat například buněčné orgány. Program nám standardně umožňuje rekonstrukci otáčet, provádět řezy nebo vytvořit animovaný film, aby ještě názorněji vynikly tvary a interakce s dalšími útvary.

● Dalším velkým příslibem pro budoucnost studia materiálů tvořených lehkými prvky, kam patří i biologické objekty, se zdá být nízkonapěťový elektronový mikroskop, jehož autorem je Armin Delong. Jde o nový unikátní přístroj, který vznikl kombinací optického a elektronového mikroskopu. Tento malý stolní mikroskop poskytuje zvětšení až dvěstěcísákrát při rozlišovací schopnosti v TEM modu 1,5 nm.²

K velmi příjemným vlastnostem mikroskopu (kromě výrazně nižší pořizovací ceny) patří i schopnost pracovat při nízkém urychlovacím napětí 5 kV. Důsledkem této skutečnosti je vysoký kontrast výsledného obrazu (obr. 4), umožňující vynechat v přípravě preparátů kontrastující procedury. Nevýhodou je, že takto urychlené primární elektrony mají nízkou penetrační schopnost. Proto se musí připravovat vzorky v podobě ultratenkých řezů s tloušťkou okolo 20 nm. K řešení tohoto problému může přispět oscilující diamantový nůž, který se již chystá pro trh.

Nejméně polovinu úspěchu představují v elektronové mikroskopii biologických objektů dobře připravené pre-

paráty. V posledních letech nastupují kryometody, které fixují vzorek ve zlomku vteřiny a bez význačných změn vůči nativnímu stavu. Stále častěji se využívají pro imunolokalizaci buněčných složek (metoda Tokuyasu), protože lépe zachovávají schopnost tkáně vázat antigeny a zároveň zlepšují přístup protilátek k vazebným místům. Své místo si při přípravě preparátů klasickou chemickou cestou našel mikrovlnný ohřev, který zvyšuje kvalitu a zároveň zkracuje časy potřebné pro jednotlivé kroky.

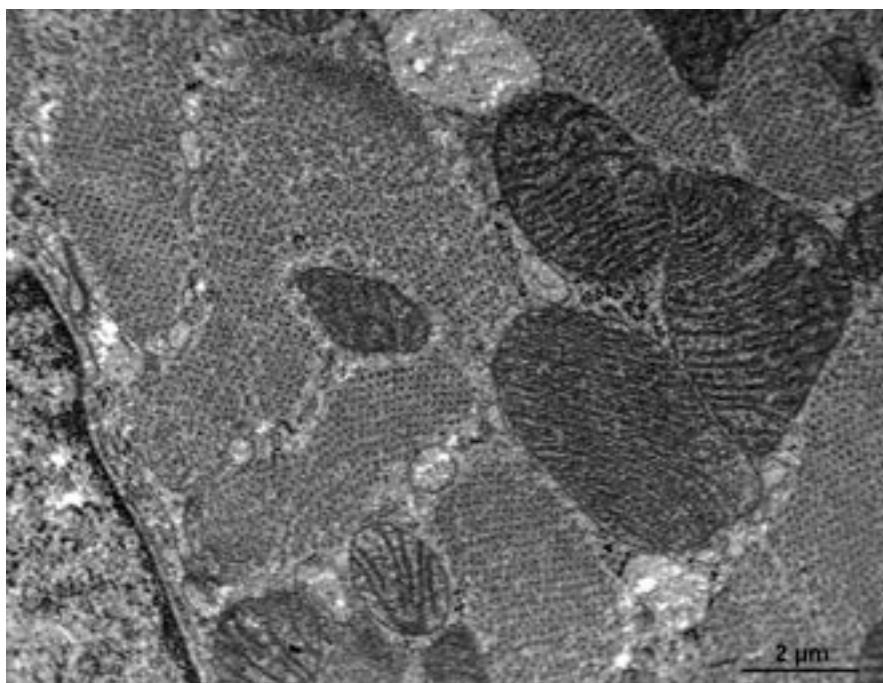
Skenovací elektronová mikroskopie

Na názorném příkladu se podívejme, co snahy o přiblížení se nativnímu stavu při pozorování biologických vzorků přinesly ve skenovací elektronové mikroskopii. Svěrací průduchové buňky z povrchu blahovičnickového listu na sebe upozornily „nepatřičným“ chováním při prohlížení ve vysokovakuovém SEM. Průduchy na pokoveném povrchu listu výrazně „svítily“ (obr. 2A) a vyvolaly tak náš zájem zjistit, co je příčinou zvýšené emise sekundárních elektronů – jestli jde o hranový jev, nebo o vlastnosti epikutikulárních vosků, které v silné vrstvě chrání list před vysycháním.

Povrch blahovičnickového listu jsme si prohlédli pomocí environmentálního skenovacího elektronového mikroskopu. Tento mikroskop má vnitřní prostor tubusu rozdělený (ve směru od elektronového děla k preparátové komoře) do kaskády komor, v nichž stoupá tlak. Poměry v preparátové komoře proto dovolují prohlížet vzorek obsahující vodu. Cestu sekundárních elektronů k detektoru navíc zprostředkovává ionizace zbytkových molekul plynu, která také

1) Obvykle 200 kV.

2) Blížíší popis mikroskopu včetně prvních výsledků je možná nalézt na <http://www.dicoms.com/micro/mwin.htm>.



eliminuje náboje na povrchu preparátu, a vzorek není třeba pokrývat vodivou kovovou vrstvou. Ani tento mikroskop nám ale neumožnil odhalit tajemství průduchových svěracích buněk (obr. 2B). Stále se okolo nich projevoval silný svítící efekt, ba co víc, jeho intenzita ovlivňovalo nastavení technických parametrů (tlak v preparátové komoře, rychlost přeběhu paprsku či předpětí sběrné elektrody na ionizačním detektoru).

Důkladně prozkoumat dutinu před průduchy a určit příčinu nabíjení svěracích buněk se nám podařilo až pomocí SEM s autoemisní tryskou. Tento typ mikroskopu dosahuje vysokého rozlišení i při nízkém urychlovacím napětí, protože je zmenšen průměr primárního svazku elektronů – za ideálních podmínek může být menší než 1 nm. Navíc byl mikroskop vybaven speciálním kryo-

4. Ultrastruktura srdeční tkáně myši zaznamenaná nízkonapětovým elektronovým mikroskopem LV EM 5 a důkaz fungující mezinárodní spolupráce. Vzorek byl připraven v Laboratoři elektronové mikroskopie PaÚ AV ČR v Českých Budějovicích, 20 nm řezu z něj připravil Helmuth Gnägi pomocí oscilujícího nože ve firmě Diatome ve Švýcarsku a snímky zaznamenal Petr Štěpán z firmy Delong Instruments v Brně.

nástavcem, který umožnil pokovit a pozorovat zmražený preparát. Získané snímky (obr. 3) objasnil, že předprůduchovou dutinu jemně vystylají krystaly epikutikulárních vosků, na jejichž hranách vznikalo příliš mnoho detekovaného signálu.

Jak je vidět i z tohoto stručného přehledu, elektronová mikroskopie ještě zdaleka nevyčerpala všechny své možnosti a stále přináší nové poznatky o biologickém mikrosvětě a jeho zákonitostech. ■

Ing. Jana Nebesářová, CSc., (*1958) vystudovala VŠCHT v Praze, kde se také v rámci interní aspirantury začala zabývat elektronovou mikroanalýzou skel. V současné době se v Parazitologickém ústavu AV ČR a na Biologické fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích zabývá hledáním nových postupů přípravy biologických objektů pro elektronové mikroskopy. nebe@paru.cas.cz, <http://www.paru.cas.cz/lem/index.htm>

Doc. RNDr. Pavel Hozák, DrSc., (*1958) vystudoval biologii na Moskevské státní univerzitě, poté působil v Ústavu experimentální medicíny ČSAV, na Oxfordské univerzitě a na Lékařské fakultě UK. Hlavní oblastí jeho zájmu je organizace genomu a buněčného jádra a vývoj nových mikroskopických metod. Publikoval na 50 původních prací ve významných vědeckých časopisech včetně Science a Cell. V současnosti vede oddělení v Ústavu experimentální medicíny AV ČR, přednáší na PŘF UK a je předsedou Československé mikroskopické společnosti. hozak@biomed.cas.cz; <http://nucleus.biomed.cas.cz>

Mikroskopie dnes

mimořádná příloha pro předplatitele časopisu Vesmír 83, březen 2004, ISBN 80-85977-59-1

Samostatně neprodejné

Redakční závěrka: 23. 2. 2004

Vychází: 11. 3. 2004

Vydává: Vesmír, s.r.o., Na Florenci 3, 111 21 Praha 1

tel.: 222 828 393-5, fax: 222 828 396

e-mail: redakce@vesmir.cz

www: <http://www.vesmir.cz>

Redakce:

Mgr. Ivan Boháček, Mgr. Pavel Hošek, Mgr. Pavla Loucká, Zora Šimečková, RNDr. Stanislav Vaněk

Odborný poradce: doc. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

Odpovědný redaktor: RNDr. Stanislav Vaněk

Grafická úprava: Mgr. Pavel Hošek

Distribuce: Marie Voráčková, tel. 222 828 394

Sazba: Vesmír, s.r.o.

Litografie: Lithera, s. r. o., Husinecká 8, 130 00 Praha 3

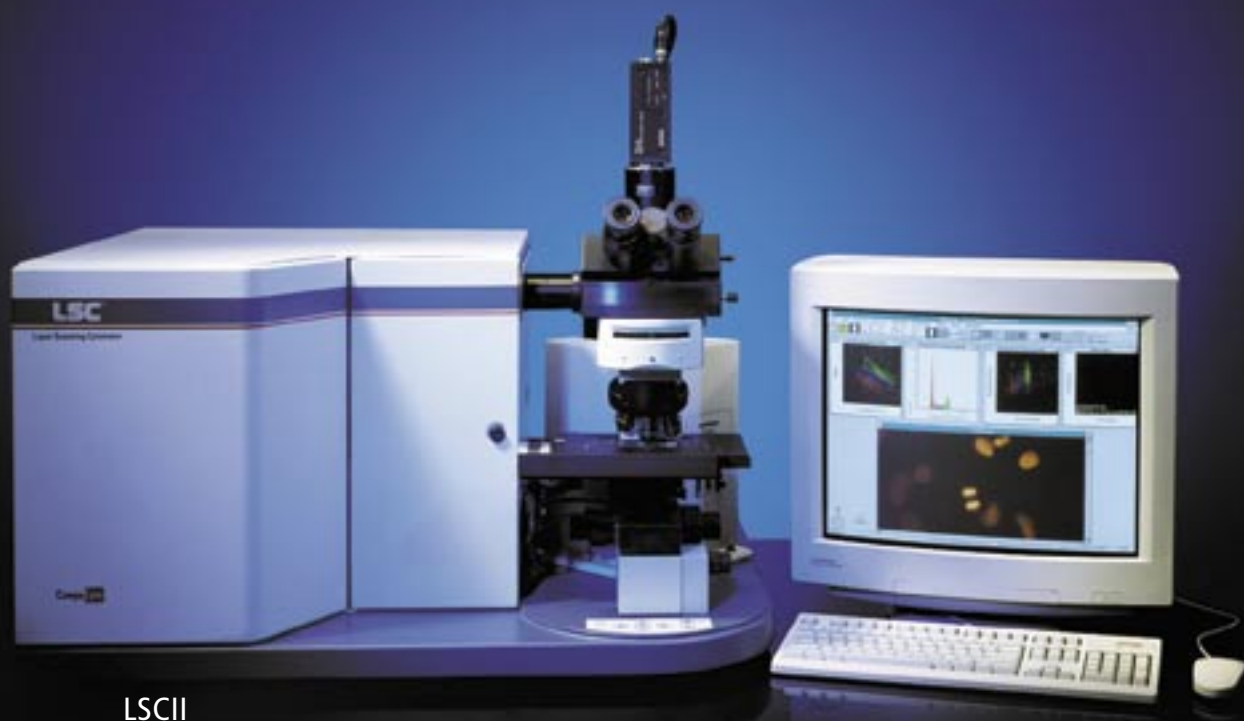
Tisk: Serifa, s. r. o., Jinonická 80, 158 00 Praha 5

© Vesmír, s. r. o., 2004

Žádná část této publikace nesmí být kopírována a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování v jakékoli formě či jakýmkoli způsobem bez písemného souhlasu vlastníka autorských práv. Vydavatel nenese odpovědnost za údaje a názory autorů jednotlivých článků ani inzerce.



Laser Scanning Cytometer



LSCII



iCYTE

CompuCyte

System, který slučuje výhody automatické fluorescenční mikroskopie, průtokové cytometrie a analýzy obrazu.

OLYMPUS C&S spol. s r.o.

ČR: Evropská 176, 160 41 Praha 6, tel.: +420 221 985 227, fax: +420 221 985 579
SK: Trnavská 84, 821 02 Bratislava, tel.: +421 2 44 45 79 33-34, fax: +421 2 44 45 79 35
e-mail: mikroskopy@olympus.cz, www.olympus.cz