

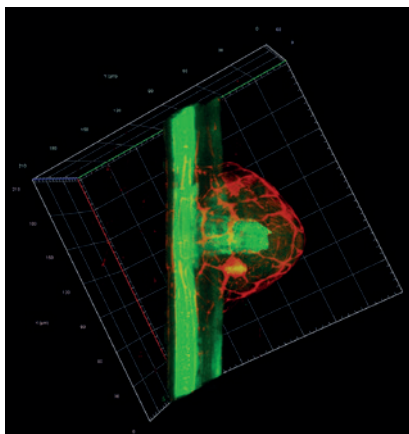
Řežeme buňky a tkáně bez skalpelu

Milan Ešner, Barbora Radochová

Živé organismy jsou trojrozměrné (3D) objekty, a pro jejich studium je tedy nutné mít možnost je v trojrozměrném stavu pozorovat. Pro pozorování jejich 3D struktury se dříve musely vyrábět tzv. sériové řezy. To znamenalo vzorek umístit do speciálního média, a pak jej fyzicky nakrájet mikrotomem (speciální přístroj s kovovým nožem). Bylo důležité žádný řez neztratit a mít je srovnané hezky za sebou. Kamerou nasnímané obrázky jednotlivých řezů bylo možno v počítači zpětně poskládat dohromady a získat tak představu o původním 3D uspořádání preparátu. Nové mikroskopické metody nám tuto práci významně usnadnily – místo fyzického řezání nyní můžeme buňky řezat jen opticky a lze to dokonce provádět i u živých organismů.

Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskop má proti mikroskopu klasickému obrovskou výhodu a to, že dokáže vytvářet optické řezy. Srdcem konfokálního mikroskopu je tzv. konfokální štěrbinová, která odstraňuje světlo pocházející mimo rovinu ostrosti pozorovaného preparátu. Tím získáme obrázky s vysokým kontrastem i u silnějších preparátů, kde by klasický mikroskop narazil. Laserový paprsek, který se používá jako zdroj světla, dokáže preparát doslova prořezat, aniž by ho tím nějak poškodil. Preparát k tomu musí být

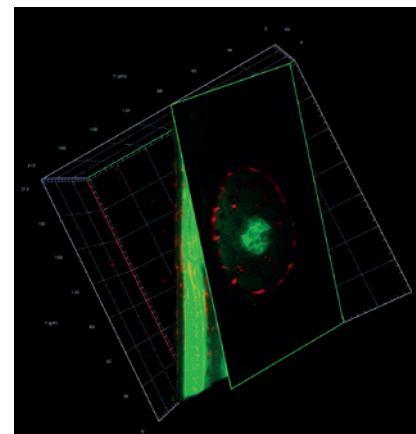


Obr. 1 - Na obrázcích můžeme vidět pučící kořínek huseničky rolního (*Arabidopsis thaliana*). Červeně je fluorescenčním proteinem mCherry označena buněčná stěna, zeleně je dalším fluorescenčním proteinem mTurquoise označen cévní svazek, který rozvádí živiny po celém rostlině. Výsledný 3D obraz je poskládan z několika samostatných obrázků – optických řezů preparátem.

vhodně fluorescenčně označen, například speciálními barvami, protilátkami, nebo přímo fluorescenčními proteiny (viz obrázek 1).

Optická projekční tomografie

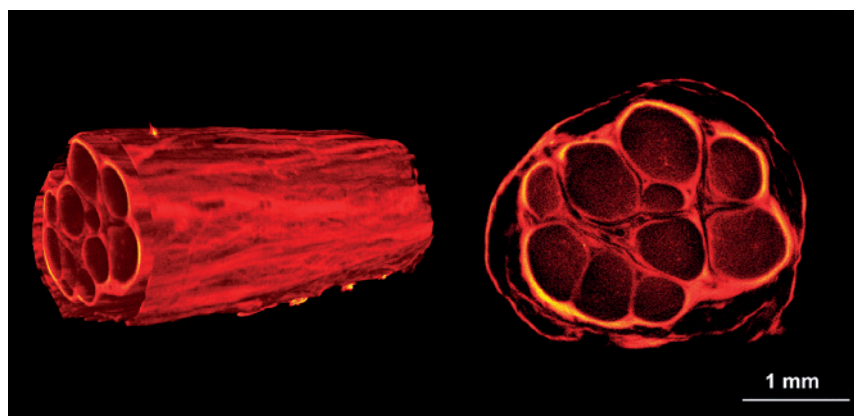
Pokud chceme pozorovat trojrozměrnou stavbu větších vzorků (1–10 mm) a stačí nám menší detaily, můžeme využít výhod optické projekční tomografie. V názvu metody je již skryt její princip – vzorky se



osvětlují světlem z viditelné části spektra (vlnová délka 400–700 nm) a kamerou se snímají projekce vzorku, který se otáčí kolem své svislé osy. Na rozdíl od konfokální mikroskopie, při které přímo získáváme optické řezy vzorkem, je zde třeba optické řezy vypočítat z projekcí pomocí speciálního algoritmu. Získáme tak například představu o uspořádání nervových svazků v periferním nervu (viz obrázek 2).

Obrázky:

Markéta Šámalová, Barbora Radochová



Obr. 2 - 3D vizualizace a optický řez loketním nervem (*n. ulnaris*) člověka. Vzorek byl odvodněn a zprůhledněn směsí benzylalkoholu s benzylbenzoátem. Vzorek nebyl barven, jde o přirozeně emitovanou fluorescenci – tzv. autofluorescenci.

