

Vážení čtenáři, uplynuly dva roky od zahájení nové rubriky v Živě, možná bychom mohli říci od vzniku nového modulu. Publikovali jsme didaktické články, různou měrou zaměřené na nové poznatky v biologii, které lze využít např. při výuce biologie na středních školách. Nejde však o texty pouze pro učitele a studenty, ale o články seznamující s nejnovějšími objevy, často zásadního ráženi, které mají ambici přepisovat učebnice biologie (a nejen ji). Snažíme se představit tyto převratné novinky a srozumitelně je začleňovat do současných poznatků, a to pokud možno v uceleném přehledu. Rubrika se jmenuje K výuce, a články s těmito tématy najdete i na webových stránkách Živy v části Pro pedagogu a studenty.

Pro ročník 2016 jsme vybrali jako hlavní téma fylogenetiku a taxonomický systém organismů, a této problematice se věnovala série článků jako např. Proměny vyšší systematiky eukaryot, Zajímavé změny v chápání fylogeneze a systému živočichů, Skrytá rozmanitost pod vodní hladinou: evoluce druhově nejbohatší skupiny obratlovců, Evoluce sinic a řas v moderním pojetí, Poznámky k evoluci čtyřnožců ad.

Tématem roku 2017 byly nové metody v biologii a lze jmenovat např. články Hmotnostní spektrometrie, Principy sekvenování DNA, Sekvenování jednotlivých buněk, Nástup genové terapie nebo Dobrodružství mikroskopie. Problematika je vždy představena jedním nebo několika články zaměřenými na nové poznatky pro daný obor nebo fenomén. V kulérové příloze pak uvádíme podrobněji zpracovaný text, který tyto poznatky začleňuje do našich znalostí.

Zároveň se snažíme poskytnout další doplňující informace, které se do tištěného časopisu z prostorových důvodů nevejdou, a i obsahově se lépe hodí ke zveřejnění na webu Živy. Kromě obrazové dokumentace nebo videí jde hlavně o pracovní listy a návody využitelné k výuce, ale i na různých seminářích, v kroužcích a při dalších aktivitách. Při jejich tvorbě vycházíme jak z již existujících materiálů (publikace, úkoly biologických olympiád, diplomové práce studentů didaktiky biologie apod.), tak z ochoty našich autorů připravit úlohy zcela nové. Tyto úlohy lze dále rozšiřovat, upravovat k lepšímu a širšímu využití. I tímto způsobem bychom vám chtěli přiblížit zajímavosti světa přírody.

Dva ročníky s novou rubrikou – je to hodně nebo málo pro bilancování? Žijeme v rychlém světě, ale pro dvouměsíčník jsou dvě léta vhodnou dobou pro zhodnocení. O správné volbě při zavedení didaktických článků nás utvrzuje řada reakcí zejména středoškolských učitelů. V letošním roce také redakční rada a redakce Živy udělily kolektivu autorů, kteří se v r. 2016 podíleli na tvorbě pedagogického seriálu, Zvláštní ocenění časopisu Živa za popularizaci biologie. Budeme proto pokračovat i v následujících letech a doufáme, že se tato rubrika stane pevnou součástí Živy.

Dále chceme upravovat i naše webové stránky, aby se staly co nejpřívětivějším zdrojem aktuálních a hlavně přesných informací. Spolu s organizátory Biologické olympiády bychom třeba chtěli představit další zajímavé náměty, nebo s kolegy z různých přírodovědecky zaměřených pracovišť vytvořit soubor pracovních listů a návodů včetně krátkých instruktážních videí využitelných např. v rámci poznávacích výletů nebo terénních výprav.

Chtěli bychom proto požádat i vás, čtenáře, abyste nečekali, co v Živě nového najdete, ale zaslali do redakce své náměty K výuce. Děkujeme a těšíme se na bližší spolupráci.

**Za redakční radu a redakci Živy  
Jan Votýpka**

Jana Bulantová, Tomáš Macháček

K výuce

## Kapesní průvodce světem mikroskopů

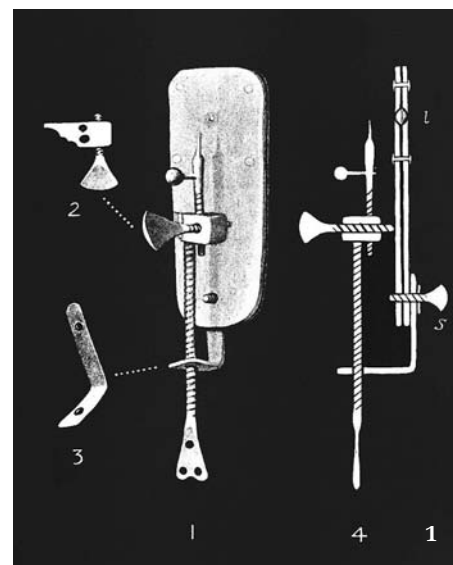
Mikroskop je v očích většiny lidí jen prostý nástroj, s nímž se v lepším případě setkali ve škole při hodinách přírodopisu. Navzdory tomu, že jim bylo umožněno vyzkoušet si takový mikroskop na vlastní oči a ruce, ne každému se nakonec podařilo do mikrosvěta pohlédnout a zažít tu fascinaci objekty a strukturami, které jinak zůstávají lidskému zraku skryté. Někdy byl na vině nepovedený preparát, jindy ušpiněná čočka objektivu nebo jen nezkušenost pozorovatele s tím, jak má vlastně do mikroskopu nahlížet. V tomto článku se pokusíme podat stručný přehled základních typů zobrazení v mikroskopech a u těch, které jsou dostupné pro většinu vzdělávacích institucí základního a středního školství. Nabídneme také praktický návod pro jednoduchá, ale často velmi efektivní „kouzla“ umožňující pozorovateli získat obraz té nejvyšší kvality s často nezapadající hodnotou v podobě estetického dojmu.

### Mikroskopy, jak je znáte

Nejobyčejnější mikroskop lze v dnešní době najít nejen na školách v kabinetech přírodopisu nebo biologie, ale i v obchodech s hračkami. Kvalita optiky se obvykle dramaticky liší, což se odráží zejména v ceně takového přístroje. Princip zobrazení ale bývá totožný. V dolní části se nachází zdroj světla, jež prochází preparátem na stolku a dál přes objektivy o různém

zvětšení do okulárů a našich očí. Propracovanější a dražší modely cestu světla od zdroje upravují pomocí přidavné polní clony nad zdrojem světla a kondenzoru, sestávajícího z kondenzorové clony, která je nezastupitelná při úpravě kontrastu, a pomocí přidavných čoček ovlivňujících tok světla.

Základním předpokladem pro správné zobrazení v mikroskopu je čistota optické



1 Leeuwenhoekův mikroskop se skládá z čočky zasazené do otvoru v těle mikroskopu. Preparát je upevněn v držáku, který je součástí systému závitových tyčinek umožňujících stranový posun preparátu, ale i zaostřování jeho přibližování nebo oddalování. Foto: Wikimedia Commons, v souladu s podmínkami použití

dráhy. Zanesení okulárů prachem lze předejít důsledným zakrýváním mikroskopů v době, kdy se s nimi nepracuje, další běžné nečistoty, jako třeba barevné stopy od řasenek, můžeme odstranit jemným navlhčeným hadříkem. Pokud to konstrukce mikroskopu umožňuje, je pak před použitím vhodné individuálně optimalizovat vzájemné pozice okulárů podle vzdálenosti očí, případně korigovat anomálie



2

2 Jedno z možných konstrukčních řešení profesionálního stínítka s držákem pro vyvolání efektu temného pole u základních školních mikroskopů.

Plochá destička s neprůhledným středovým terčíkem je vložena do držáku a společně jsou obě součásti zacvaknuty zespoju do kondenzoru. Efekt se dostaví po otevření kondenzorové clony a správném vertikálním nastavení kondenzoru.

3 Mince umístěná na zdroji světla k dosažení efektu temného pole. Používá se obvykle u mikroskopů, jejichž kondenzor neumožňuje upevnění stínítka. Vertikálním posunem kondenzoru (pokud je možný) a volbou správného průměru mince však lze u většiny mikroskopů docílit podobného, i když často ne tak efektivního optického jevu jako v případě komerčně dodávaných clon.

4 Schéma vybavení mikroskopu pro pozorování objektů v reliéfním kontrastu: nahoře modulátor s různou propustností pro světlo (0 %, 15 % a 100 %) umístěný v objektivu (většinou s označením RC), dole nástavec s asymetrickou šterbinou umístěný v kondenzoru. Z archivu autorů

jednoho oka úpravou ostrosti pomocí korekčního okuláru.

Objektivy, které nezkušený začátečník často nechtěně ponoří do tekutiny kolem pozorovaného objektu na sklíčku, je potřeba také pravidelně kontrolovat a čistit, zvláště pak ty s malou pracovní vzdáleností (nejčastěji jde o 40× objektiv). Nejlépe se tato činnost provádí tak, že čistění objektiv opatrně vyšroubujeme a vatovým tamponem navlhčeným vodou provedeme první fázi čistění spodní čočky od nečistot rozpustných ve vodě. Ostatní nečistoty (často jde o imerzní olej, který se nedopatřením dostal z imerzního 100× objektivu i na čočku 40× objektivu) nebo stopy mastnoty z rukou je vhodné odstranit vatovou tyčinkou omočenou ve směsi etanolu a éteru v poměru 1 : 1. Samotné pohyby tyčinky po čočce objektivu by měly být minimalizovány, účinnost čistění je pak možné na závěr zkontrolovat prostým pohledem skrz objektiv proti světlu.

### Tytěž mikroskopy, jak je možná neznáte (Köhlerovo osvětlení)

Když německý přírodovědec August Köhler (1866–1948), mimo jiné řadu let působící jako středoškolský učitel, zkoumal v rámci své doktorské práce taxonomii přílipek (Patellidae), trápily ho technické limity tehdejších mikroskopů. Hlavní překážkou pro pořízení dobrých mikrofotografií bylo



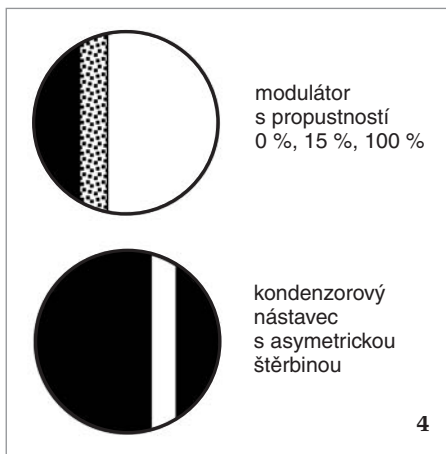
3

nedostatečné a nerovnoměrné nasvícení pozorovaných objektů, které nabízely plynové lampy používané na konci 19. stol. Köhler proto vymyslel jednoduchý postup pro nastavení osvětlení mikroskopu, aby mohl být maximálně využit jeho potenciál. V takřka nezměněné podobě funguje i u dnešních mikroskopů.

Prakticky jde o umístění kondenzoru a objektivu do správné vzájemné pozice (jejich společné ohnisko je v rovině preparátu), vystředění všech optických členů do optické osy mikroskopu a odpovídající pootočení polní a kondenzorové clony. Správná kombinace těchto parametrů zajistí kvalitní osvětlení preparátu a optimální kombinaci jeho ostrosti, jasů a kontrastu. Navíc využijeme největší možnou rozlišovací schopnost daného mikroskopu a předejdeme promítání nežádoucích objektů (např. vlákna žárovky nebo prachových nečistot) do výsledného obrazu. Popis snadného nastavení Köhlerova osvětlení na běžném školním mikroskopu uvádíme u obr. 1 na str. 297 tohoto čísla Živý.

### Elegantní triky „za pár korun“ (zástin)

Zástin (neboli pozorování v temném poli) je jednou z nejjednodušších a nejlevnějších metod, kterou lze i v podmínkách středoškolského praktika zvýšit kontrast nebarevných objektů. Velmi efektivně však v temném poli vypadá i široká škála drobných barevných nebo přirozeně zabarvených preparátů (obr. 2b a 7 na str. 297). Hlavním rozdílem oproti běžné světelné mikroskopii je umístění kruhového stínítka mezi zdroj světla a kondenzor. Tak odfiltrujeme střední proud paprsků normálně procházející přímo do objektivu. Zbytek paprsků jdoucích vně stínítka objektivu mívá, takže se zorné pole jeví jako tmavé. Teprve po vložení preparátu může dojít na hranách pozorovaného objektu k rozptyl-



4

lení paprsků vnějšího prstence, přičemž některé z nich se do objektivu dostanou a vytvoří obraz.

K zástinění světelného kužele pod kondenzorem můžeme využít speciální nástavce dodávané výrobcem mikroskopů (obr. 2), stejně dobře ale poslouží i mince položená na zdroj světla (obr. 3). Pozor, při delším mikroskopování se může ohřát! Velikost stínítka je nutné volit podle použitého objektivu: pro objektiv zvětšující 4× je optimální průměr stínítka 8–14 mm, při zvětšení 10× se doporučuje průměr 16–18 mm. U mikroskopů s polní a kondenzorovou clonou lze míru zatemnění upravit jejich uzavřením nebo naopak otevřením, kvalita efektu temného pole se výrazně mění i při vertikálním pohybu kondenzoru. I když je metoda zástiny levná a na provedení jednoduchá, má jednu nevýhodu. Jelikož se pro tvorbu obrazu využívá jen okrajový prstenec generovaného světla, musí mít jeho zdroj dostatečně velký výkon.

### „Vyšší dívčí“ (fázový kontrast)

Další metodou běžně používanou pro zvýšení kontrastu při pozorování průhledných objektů je fázový kontrast. Jeho typickým obrazovým výstupem je objekt s kontrastními konturami a výrazným světlým halo efektem umístěný na tmavším pozadí (viz obr. 2c na str. 297). Ve srovnání se zástiněm jde o techniku poněkud nákladnější. Neobejdeme se při ní totiž bez kondenzorového fázového nástavce a objektivu vybaveného fázovým prstencem. Pro každý takový objektiv (obvykle značený zkratkou Ph) je zároveň potřeba zvolit jinou velikost clony, jinak se efekt posunu fáze nedostaví. I když jde o metodu, která není na školních mikroskopech v praxi k vidění často (především kvůli pořizovací ceně vybavení), uvádíme ji zde pro široké využití v biologii. Za její objev byla v r. 1953 udělena Nobelova cena a vysvětlení tohoto principu lze využít v hodinách fyziky jako příklad praktické aplikace skládání (interference) vlnění.

Výhody fázového kontrastu nejlépe vyniknou při pozorování nebarevných průhledných objektů (např. nebarevných kultur živočišných buněk či jednobuněčných eukaryot), lišících se od okolního prostředí indexem lomu. U světelného paprsku, který takovým objektem projde, se změny jeho fáze vůči paprskům, jež objekt minou. Tento drobný posun fáze ale není pro naše oko viditelný. Úkolem mikroskopu vybaveného pro pozorování s fázovým kontrastem je proto změnu „zviditelnit“.

K tvorbě obrazu a „zviditelnění“ změny fáze dochází způsobem, který využívá základní poznatky o skládání světelných vln. Paprsky se změněnou fází (prošlé objektem) putují do objektivu a nejsou již nijak modulovány. Naopak paprsky přímé (ty, které objekt minuly a nemají dosud změněnou fázi) jsou pomocí fázového prstence objektivu posunuty o čtvrtinu své vlnové délky. Vzniká dostatečně velký rozdíl na to, aby se po složení obou typů paprsků rozdíly promítly do okem viditelné proměny intenzity světla. Řečeno fyzikálními termíny, jde o výsledek konstruktivní/destruktivní interference, kdy součtem paprsků se stejnou/opáčnou fází získáme vyšší/nížší intenzitu výsledného světla.

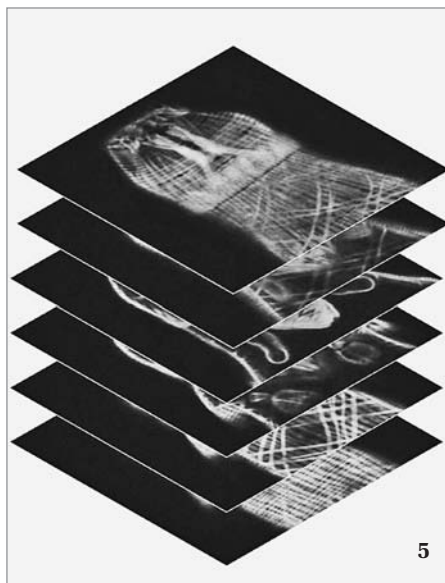


## Extra třída (Hoffmannův a Nomarského interferenční kontrast, fluorescence, konfokální mikroskop)

Fázový kontrast však není jediná možnost, jak dosáhnout kontrastu u průsvitných nebarevných objektů. Jiná řešení však už nelze využívat na běžných typech základních mikroskopů. Pokud ovšem máme kvalitní badatelský laboratorní mikroskop pořizovaný nejčastěji k demonstračním nebo dokumentačním účelům, výrobce k němu většinou dokáže nabídnout i příslušné nástavce pro pokročilé typy kontrastů.

V případě Nomarského neboli diferenčního interferenčního kontrastu (jako zkratka se obvykle používá DIC nebo NIC) je potřeba do dráhy světla vložit hned několik nástavců: polarizátor selektivně propouštějící pouze světlo s rovnoběžně kmitajícími vlnami a tzv. Wollastonův hranol, rozdělující světelný tok na dva, které jsou na sebe kolmé a jen nepatrně od sebe vzdálené. Obě vlnění následně procházejí preparátem trochu jiným místem, a tedy je každé z nich i jinak pohlcováno nebo lámáno. Po průchodu preparátem se oba mírně posunutá světelná toky složí na dalším Wollastonově hranolu do jediného, čímž může dojít k interakci v podobě interference (skládání či vzájemné rušení světelných vln, např. Živa 2017, 2: 77–81). Ta se pak po průchodu analyzátozem projeví na výsledném obrazu jako zdánlivou plasticitou. Vzhledem k množství světla odfiltrovaného při této technice hned v počátcích jeho cesty k preparátu, je pro bezvadný obraz potřeba zvýšit intenzitu světla a využívat pro každý z používaných objektivů optimalizovaný filtr, zabudovaný zpravidla v otáčecím nástavci pod preparátovým stolcem. Největší nevýhodou metody představuje skutečnost, že ji nelze aplikovat na objekty uzavřené v Petriho miskách.

Takových případů, kdy v diagnostice nebo ve vědě potřebujeme pozorovat kultivované buňky na Petriho miskách či v plochých kultivačních nádobách, však existuje celá řada, a tak byla vynalezena metoda reliéfního neboli Hoffmannova modulačního kontrastu (označeno zkratkou RC). Vyžaduje speciální objektivy s modulátorem, který propouští na většině plochy 100 % procházejícího světla, na malém pásu plochy pouze 15 % světla a na okrajové části nepropouští světlo vůbec. Efektu reliéfu pak dosáhneme ve spojení s kondenzorovým nástavcem, v němž je clona s asymetricky umístěnou šterbinou (obr. 4). Šterbina propouští světlo vycházející ze zdroje a dopadající na preparát z boku pod změněným úhlem. Láme se na něm, a podle toho, jestli paprsky následně projdou modulátorem objektivu zakrytou, částečně, nebo zcela propustnou částí, ho pak uvidíme v různé intenzitě na výsledném obrazu, který vytváří podobně plastický (reliéfní) efekt jako v případě DIC. Protože se tato metoda využívá zejména pro pozorování objektů v kultivačních nádobách a nikoli na sklíčkách, bývá součástí mikroskopů s horizontálně převrácenou konstrukcí, tzv. invertovaných. Zdroj světla se u nich nachází v horní části, směrem dolů následuje kondenzor a preparátový stolek. Objektivy jsou pod ním a pozorují obsah kultivačních nádob z spodní strany.



5 Obrovský přínos konfokálních mikroskopů spočívá v jejich schopnosti snímat signál pouze z jediné roviny ostrosti bez rušivých vlivů rozostřených sousedních rovin. Složením nasnímaných rovin z různých úrovní osy z pak získáme prostorový model objektu. V tomto případě jím byla přední část těla larvy motolice *Trichobilharzia regenti* – cercárie s fluorescenčně označenou svalovinou. Video složené z řezů na obr. najdete na webové stránce Živy.

Kde nejsme schopni rozlišit přítomnost konkrétní molekuly podle její struktury nebo barvy v běžném světelném mikroskopu, lze využít pomoc v podobě fluoroforů – značek, které poté vizualizujeme ve fluorescenčních mikroskopech s výkonnými zdroji světla a speciálními filtry. Značení může být založeno na několika principech. Jednak jde o přímé značení, jako v případě DNA v jádrech a molekuly DAPI (4',6'-diamidin-2-fenylindol), jež má vysokou afinitu k oblastem bohatým na báze adenin a thymin. Druhé základní značení je tzv. protilátkové, využívající silné vazby dvou partnerů – antigenu a protilátky, na kterou lze navázat např. svítící fluorofor (více o protilátkovém značení např. v Živě 2017, 4: CV–CVIII). Existují ale také objekty, které ve fluorescenčním mikroskopu výrazně svítí i bez přidaného fluoroforu (chitin kutikuly členovců či chlorofyl rostlin; obr. 6 na str. 297).

Zviditelnění světelného signálu ve speciálním fluorescenčním mikroskopu se pak děje následujícím způsobem. Z výkonného zdroje bílého světla (většinou rtuťové výbojky) je odfiltrováno pouze tzv. excitační záření, jež v preparátu aktivuje (excituje) konkrétní fluorofor. Ten posléze vyzáří energii v podobě emitovaného záření, které má nižší energii a vyšší vlnovou délku než záření excitační. Směs excitačního a emitovaného záření je filtrována přes fluorescenční kostku, jejíž součástí tvoří soustava filtrů a dichroické zrcátko. Obojí má za úkol vpustit do okuláru pouze emitované světlo vycházející z preparátu v místech, kde se nachází označená struktura. V případě, že potřebujeme v jednom vzorku označit více struktur, máme možnost provést vícenásobné značení

několika fluorofory. Jedinou podmínkou je, že spektra fluoroforů (excitační ani emisní) se nesmějí překrývat. Oblíbenou barevnou kombinací při studiu např. buněčných kultur nebo vnitřních struktur drobných bezobratlých je červená excitovaná zeleným zářením, zelená excitovaná modrým světlem a modrá, kterou lze pozorovat pod ultrafialovým světlem. Takto kombinované značení není možné z důvodu konstrukce mikroskopu i filtrů sledovat najednou. Pozorované místo se proto vyfotografuje zvlášť pro každý barevný kanál a všechny se poté složí do jednoho vícebarevného obrazu.

Zatímco v případě Nomarského a Hoffmannova kontrastu a fluorescence se nacházíme v kategorii kvalitních badatelských či pokročilých laboratorních mikroskopů, které se na specializovaných středních školách občas přece jen vyskytují, případně si je lze zapůjčit např. z přírodovědeckých fakult některých univerzit, za mikroskopem s přídomkem konfokální (viz Živa 2006, 6: 245–248 a 2007, 1: 3–5) už bychom museli vyrazit do výzkumných laboratoří. Jde o přístroj umožňující snímat fluorescenčně značený vzorek bod po bodu v jediné rovině ostrosti, a to aniž by do ní pronikaly rušivé signály z neostřích rovin nad a pod ní. To je umožněno dvojicí šterbin, z nichž jedna omezuje průchod světla pouze na tenký paprsek před vzorkem a druhá filtruje světlo před vstupem do detektoru a zařízení převádějícího signál z preparátu na obrazovku počítače. Z výše řečeného vyplývá, že z původního světla projde až k detektoru jen velmi malá část. Z tohoto důvodu jako zdroj světla u konfokálních mikroskopů slouží výkonná laser. Jedinečnost konfokálních mikroskopů však spočívá hlavně v možnosti snímat ne jedinou rovinu ostrosti, ale po řízeném posunu a přestřžení v ose z i roviny další (odtud konfokální – tedy pracující s větším počtem rovin ostrosti). Díky tomu je pak možné složením ve speciálním programu získat trojrozměrný (3D) obraz fluorescenčního signálu v celém pozorovaném objektu, což se hodí např. při studiu svaloviny drobných bezobratlých (obr. 5) nebo uspořádání organel uvnitř jednobuněčných organismů.

## Za hranicí světla (elektronové mikroskopy)

U opravdu malých objektů už jsou naše oči (lidské oko má rozlišovací schopnost asi 200  $\mu\text{m}$ ) i technické možnosti optiky limitovány vlnovou délkou použitého světelného záření (tzv. Abbeho difrakčním limitem o hodnotě 0,2  $\mu\text{m}$ ). Kde nemůžeme využít světlo, mohou ale posloužit mnohem menší částice – elektrony. Rozlišovací schopnost se tak rázem o další dva řády zvýší. Elektronové mikroskopy jsou nákladné přístroje, vyžadující pro svůj provoz často vlastní samostatnou místnost a přídatná zařízení v podobě speciálních pump k čerpání nezbytného vakua v tubusu mikroskopu, nebo vodního oběhu k jeho chlazení.

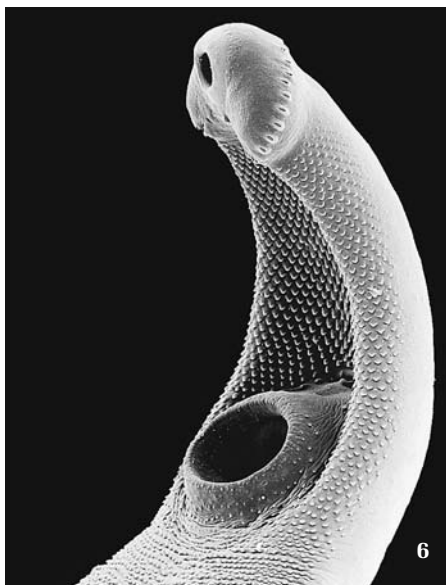
Ve vědecké praxi se setkáváme se dvěma základními typy mikroskopů. Skenovací elektronový mikroskop (zkráceně SEM) skenuje tenkým proudem elektronů povrch objektů a poskytuje tak jedinečné

černobílé snímky s vysokou hloubkou ostrosti (obr. 3 na str. 297; nebo volný cyklus článků v Živě 2009, 3 a 6; 2010, 3; 2011, 3; 2012, 3 a 5; 2017, 1). Výborně tak pomáhá při zkoumání mikrostruktur na různých typech povrchů. Objekt, který chceme v SEM pozorovat, však již vyžaduje o něco náročnější přípravu – musí být vždy zcela odvodněn a pokryt dokonale vodivou, rovnoměrně tenkou vrstvičkou kovu, obvykle zlata nebo platiny. Metoda je vhodná pro dokumentaci členitých objektů s množstvím povrchové ornamentace (obr. 6).

Pokud topografické znázornění povrchu nedokáže poskytnout dostatek informací, je zapotřebí proniknout do vnitřní ultrastruktury zkoumaných objektů prostřednictvím transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Příprava vzorků pro tento účel sestává z fixace a následné stabilizace membrán pomocí postfixace (nejčastěji sloučeninami osmia), odvodnění, převedení do pryskyřice a polymerace pryskyřicového bločku ve speciální formě. Vzniklý bloček je velmi tvrdý, ultratenké řezy silně jen několik desítek nanometrů proto musíme krájet na diamantových nožích. Vzniklé plátky objektů zalitých v pryskyřici jsou následně splavovány do vodní lázně, z níž je nabírají kulaté sítky o průměru jen asi 3 mm. Na jednu sítku, která se po kontrastování vkládá do mikroskopu, se vejde 3–5 řezů, a každý si tak může udělat představu o složitosti manipulace s takto drobnými vzorky. Výsledkem pozorování v TEM je opět černobílý obraz, tentokrát však vnitřních struktur prokrajovaného objektu. Tmavě se v něm jeví elektronodenzní části řezů, kterými elektrony generované v mikroskopu a usměrňované magnetickými čočkami neprocházejí, naopak světlejší (elektronlucentní) se ukazují části řezů s vlastnostmi umožňujícími průchod elektronů a jejich detekci na stínítku nebo snímání citlivou kamerou (obr. 4 na str. 297). Tato technika je ideální pro sledování vnitřních organel, membrán, bičků či aktinových vláken jednotlivých buněk i drobných vícebuněčných organismů.

### Za hranicí fyzikálních zákonů (superrezoluce)

V posledních letech se v laboratořích výzkumníků objevují přístroje umožňující aplikovat na vzorky metody zvané super-



rezoluční. Fyzikální hranice světla a Abbeho difrakční limit jsou zde obcházeny zcela jiným způsobem než u elektronových mikroskopů. Obvykle jde o soubor složitých matematických algoritmů aplikovaných podle fyzikálních zákonitostí na data nasnímaná ve speciálním režimu mikroskopu, případně i se speciálními fluorofovy, které blikají a zhasínají, nebo mění barvu. Superrezoluce v mikroskopii vlastně zahrnuje několik různých metod, které se skrývají např. pod zkratkami SIM (Structured Illumination Microscopy), PALM (PhotoActivation Localization Microscopy) nebo STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy). Tyto přístroje je možné žákům představit při návštěvách specializovaných pracovišť např. v rámci vědeckých festivalů nebo dní otevřených dveří. S ohledem na složitost uvedených metod a určení tohoto článku, věnovaného učitelům biologie pro aplikaci ve výuce, odkazujeme vážně zájemce o podrobnější informace na internetové zdroje uvedené na webové stránce Živy. Obecně lze říci, že tyto metody bývají velmi náročné na optimalizaci postupů pro přípravu i pozorování vzorků. Nezastupitelné místo však tyto pokročilé techniky nacházejí především v buněčné biologii. Nezanedbatelným bonusem je zejména možnost využití superrezolučních metod na živých buňkách, u kterých se pak dají přímo sle-

6 Pro zobrazení rozložení tegumentálních trnů na povrchu těla motolic je ideální využití skenovací elektronový mikroskop (SEM). Na snímku zástupce čeledi Echinostomatidae s množstvím trnů na břišní straně a s jednoduchým věncem trnů v „límci“ kolem ústní přísavky. SEM. Snímky J. Bulantové, pokud není uvedeno jinak

7 Přístroj uprostřed samostatné místnosti obložené měděnými pláty je zobrazovač magnetických částic (Magnetic Particle Imager, MPI) přizpůsobený rozměry pro využití u laboratorních zvířat (nejčastěji hlodavců). Umožňuje přímou detekci speciálních paramagnetických nanočástic SPIO (Super Paramagnetic Iron Oxide) v oscilujícím magnetickém poli. Po nitrožilním podání SPIO částic do krevního oběhu experimentálního zvířete dokáže přístroj rychle a s vysokou přesností detekovat pohyb těchto nanočástic v těle, což je využíváno především při angiografických studiích nebo během sledování distribuce konkrétních značených buněk či molekul po těle živého organismu bez radiační zátěže rentgenovým zářením nebo aplikací problematických typů kontrastních látek (blíže v článku na str. 294–296 tohoto čísla Živy). Spolu s dalšími unikátními přístroji je MPI umístěno na pracovišti Centra pokročilého preklinického zobrazování (CAPI) při 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze (capi.fl1.cuni.cz). Příklady možných výstupů získaných na zobrazovacích přístrojích z CAPI lze shlédnout na webových stránkách Živy. Foto P. Herman, 1. LF UK

dovat dynamické děje, jako jsou buněčný transport, přestavba mikrotubulů nebo metabolické dráhy.

### Závěrem

Mikroskopy jsou široce využívány v mnoha odvětvích. Se základními typy se setkáváme nejčastěji ve školách. Ty pokročilejší, s kvalitní optikou, výstupem z kamery do počítače a nadstavbovými zařízeními (různé typy kontrastů, fluorescence) nacházíme nejčastěji v lékařských diagnostických zařízeních nebo ve vědeckých ústavech biologických, ale i technických oborů. Elektronové mikroskopy, stejně jako konfokální nebo dokonce superrezoluční pak bývají často doménou institucí, které tato zařízení sdružují pod dostupná servisní pracoviště. Nabízejí kromě využití přístroje také zkušeného pracovníka, který je schopen často složitý operační systém pokročilého mikroskopu ovládat a získat z jeho výstupu maximum. I zde se tak potvrzuje pravidlo, platné napříč celým spektrem mikroskopů od nejjednodušších po nejsložitější: Získání kvalitního výsledku často nemusí být nutně otázkou možností a kvality přístroje, ale hlavně člověka, který s daným mikroskopem pracuje a dokáže/nedokáže jeho potenciál naplno využít.

Pracovní listy a další materiály k výuce jsou k dispozici na webové stránce Živy.

