

Univerza v Ljubljani
Medicinska fakulteta



Inštitut za biologijo celice

Aleksandar Janev in Daša Zupančič

**OSNOVE SVETLOBNE IN ELEKTRONSKE
MIKROSKOPIJE TER OBLIKE IN ULTRASTRUKTURA
EVKARIONTSKIH CELIC**

Študijsko gradivo

2023

Naslov: Osnove svetlobne in elektronske mikroskopije ter oblike in ultrastruktura evkariontskih celic
Avtorja: Aleksandar Janev in Daša Zupančič
Izdaja: 1. izdaja
Izdajatelj in založnik: Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za Biologijo celice, Univerza v Ljubljani
Leto izdaje: 2023
Format: PDF
Spletni mesti: <http://www.ffa.uni-lj.si/knjiznica/e-knjige/>
<https://www.mf.uni-lj.si/ibc/drugi-studijski-programi/laboratorijska-biomedicina-ffa>

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID 165046531
ISBN 978-961-267-248-5 (PDF)

Način dostopa (URL): <http://www.ffa.uni-lj.si/knjiznica/e-knjige/>

Način dostopa (URL): <https://www.mf.uni-lj.si/ibc/drugi-studijski-programi/laboratorijska-biomedicina-ffa>

Kazalo vsebine

1.1 VAJA: UVOD V MIKROSKOPIRANJE IN KLASIČNI SVETLOBNI MIKROSKOP	
1.1.1 KLASIČNI SVETLOBNI MIKROSKOP	5
1.1.2 DELO S KLASIČNIM SVETLOBNIM MIKROSKOPOM	9
1.2 VAJA: OBLIKE EVKARIONTSKIH CELIC IN VRSTE SVETLOBNIH MIKROSKOPOV.....	11
1.2.1 OBLIKE EVKARIONTSKIH CELIC	11
1.2.2 DRUGE VRSTE SVETLOBNIH MIKROSKOPOV	13
1.2.2.1 Stereoskopski mikroskop ali lupa	13
1.2.2.2 Faznokontrastni mikroskop	13
1.2.2.3 Invertni mikroskop.....	14
1.2.2.4 Fluorescenčni mikroskop.....	15
1.2.2.5 Konfokalni mikroskop	16
1.3 VAJA: ELEKTRONSKI MIKROSKOPI	17
1.3.1 PRESEVNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP	17
1.3.2 VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP	19
2.1 VAJA: CITOLOŠKE, HISTOLOŠKE IN ELEKTRONSKOMIKROSKOPSKE METODE	21
2.1.1 PRIPRAVA PREPARATOV ZA SVETLOBNO MIKROSKOPIJO.....	21
2.1.1.1 Sveži mikroskopski preparati.....	21
2.1.1.2 Trajni histološki preparati iz parafinskih rezin.....	21
2.1.1.3 Trajni histološki preparati iz zamrznjenih rezin	23
2.1.2 PRIPRAVA PREPARATOV ZA ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO	25
2.1.2.1 Priprava preparatov za presewni elektronski mikroskop.....	25
2.1.2.2 Priprava preparatov za vrstični elektronski mikroskop	28
2.2 VAJA: HISTOKEMIJSKE METODE	30
2.2.1 REAKCIJA PAS.....	31
2.2.2 ALCIANSKO MODRILO	31
2.2.3 IMUNOOZNAČEVANJE.....	31
2.2.3.1 Metoda ABC (avidin-biotin-peroksidaza)	33
2.2.3.2 Imunofluorescenca	35
2.2.4 ENCIMSKA HISTOKEMIJA.....	37
2.2.5 FLUORESCENČNA IN SITU HIBRIDIZACIJA (FISH)	38
2.3 VAJA: BIOLOŠKE MEMBRANE IN CELIČNI ORGANELI	40
2.3.1 BIOLOŠKE MEMBRANE	40
2.3.2 CELIČNI ORGANELI.....	41
2.3.2.1 Jedro	41
2.3.2.2 Endoplazemski retikulum	42
2.3.2.3 Golgijev aparat	43
2.3.2.4 Lizosomi	44
2.3.2.5 Mitohondriji.....	44
2.3.2.6 Peroxisomi.....	45

PREDGOVOR

Študijsko gradivo **Osnove svetlobne in elektronske mikroskopije ter oblike in ultrastruktura evkariontskih celic, 2023** je namenjeno študentom Laboratorijske biomedicine, Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani, ki opravljajo del vaj pri predmetu Biologija celice z genetiko na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Prvi del (poglavja 1.1 do 2.3) predstavlja osnovno gradivo, ki omogoča študentu pripravo na vaje. Sheme so pripravljene s spletnim orodjem BioRender. Vse slike in mikrofotografije so last Inštituta za biologijo celice Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Drugi del (navodila za vaje), vsebuje navodila in naloge, ki jih mora študent na vajah opraviti. Ta del si mora vsak študent natisniti in prinesiti na vaje. Pravilno izpolnjene, pregledane in podpisane naloge so dokazilo o aktivnem sodelovanju na vajah. Znanje potrebno za pozitivno opravljanje kolokvija bodo študentje pridobili na vajah.

ZAHVALA

Najlepša hvala vsem sodelavcem Inštituta za biologijo celice za dolgoletno uspešno sodelovanje, na osnovi katerega je nastalo pričujoče študijsko gradivo. Posebej se zahvaljujeva recenzentu prof. dr. Petru Veraniču, predstojniku Inštituta za biologijo celice za neprecenljive popravke, predloge in komentarje.

1.1 VAJA: UVOD V MIKROSKOPIRANJE IN KLASIČNI SVETLOBNI MIKROSKOP

Uporaba mikroskopov nam omogoča pridobivanje novih spoznanj na področju celične biologije ter hkrati izboljšuje diagnostične postopke. S pomočjo različnih vrst mikroskopov raziskujemo objekte, ki so premajhni, da bi jih videli s prostim očesom. Mikroskope lahko glede na način nastanka slike razdelimo na dve osnovni vrsti in sicer **svetlobne** in **elektronske mikroskope**.

Med osnovne vrste svetlobnih mikroskopov, ki omogočajo opazovanje tkiv in celic, sodijo klasični svetlobni mikroskop, stereoskopski mikroskop (lupa), invertni mikroskop, faznokontrastni mikroskop, fluorescenčni mikroskop in konfokalni mikroskop. Elektronske mikroskope tradicionalno delimo na presevne (TEM, angl. transmission electron microscope) in vrstične (SEM, angl. scanning electron microscope) elektronske mikroskope.

1.1.1 KLASIČNI SVETLOBNI MIKROSKOP

Najpogostejša vrsta svetlobnega mikroskopa je klasični svetlobni mikroskop, ki se največkrat uporablja za preučevanje obarvanih histoloških rezin. Sestavljen je iz mehanskih delov (na sliki 1 označeni **vijolično**) in optičnih delov (na sliki 1 označeni **modro**).

Mehanski deli zagotavljajo stabilnost in natančen položaj optičnih delov ter omogočajo upravljanje z mikroskopom. Med mehanske dele sodijo:

- **podstavek** – nosilni podstavek mikroskopa, ki zagotavlja stabilno podporo. V njem je običajno nameščeno svetilo.
- **makrometrski vijak** – omogoča grobo ostrenje preparata pri objektivih z majhno (4×) in srednjo povečavo (10×).
- **mikrometrski vijak** – omogoča fino ostrenje preparata pri objektivih z veliko povečavo (40×) in še posebno pri imerzijskem objektivu (100×).
- **vijak za nastavitev višine kondenzorja** – omogoča namestitev leč kondenzorja v pravilno višino optične osi in posledično optimalno osvetlitev preparata (Köhlerjeva osvetlitev).
- **objektno mizico** – del mikroskopa, na katerega je preparat vstavljen.
- **vijak za premikanje preparata** – omogoča premikanje preparata po objektni mizici.
- **revolver** – nosilec z nameščenimi objektivimi, ki ga lahko rotiramo in tako vstavimo v optično os želeni objektiv.
- **glava** – zgornji del mikroskopa, ki povezuje okularje z objektivimi.
- **tubus** – cevasta struktura v kateri sta nameščena okularja.
- **stativ** – del mikroskopa, ki zagotavlja stabilnost mikroskopa ter povezuje podstavek s tubusi.
- **obroč za nastavitev dioptrije** na okularju – omogoča nastavitev dioptrije za vsako oko posebej.

Optični deli mikroskopa so tisti deli, ki so odgovorni za nastanek slike preparata, ki ga opazujemo. Med optične dele sodijo:

- **svetilo oz. žarnica** – svetlobni vir, nameščen v podstavku. V večini sodobnih svetlobnih mikroskopov se uporabljajo halogenske žarnice ali LED svetila.
- **kolektor z zaslonko** – sistem leč, nameščen nad svetilom, ki zbira svetlobne žarke iz svetila in jih usmeri v gorišče kondenzorja. Kolektorjeva zaslonka omogoča uravnavanje širine snopa svetlobe, ki pade v kondenzor.
- **kondenzor z zaslonko** – sistem leč pod objektno mizico, ki zbira svetlobne žarke iz kolektorja in jih usmeri v ravnino preparata. Kondenzorjeva zaslonka omogoča uravnavanje kontrastnosti preparata.
- **objektiv** – sistem leč nad objektno mizico, kateri zbira svetlobne žarke, ki prehajajo skozi preparat. Ustvari povečano sliko preparata in prispeva k ločljivosti mikroskopa.
- **okular** – sistem leč na koncu tubusa, ki zbira žarke iz objektiv. Sliko preparata še dodatno poveča, vendar ne prispeva k ločljivosti.



Slika 1: Klasični svetlobni mikroskop z glavnimi mehanskimi (vijolična) in optičnimi (modra) sestavnimi deli.

Povečava in ločljivost sta glavni lastnosti mikroskopa, ki zagotavljata ustrezno velikost in kakovost slike opazovanega preparata.

Povečava nam pove, kolikokrat je slika, ki jo da mikroskop, večja od slike, ki jo vidimo s prostimi očmi. Omogoča nam opazovanje manjših struktur, vendar ne prispeva k pridobivanju novih informacij.

Skupna povečava svetlobnega mikroskopa je določena z zmnožkom povečav objektiv (na primer 4×, 10×, 40×, 100×) in okularja (običajno 10×).

Ločljivost predstavlja najmanjšo razdaljo med dvema točkama, pri kateri ju še vidimo kot dve ločeni točki. Meja **ločljivosti mikroskopa (d)** je odvisna od **valovne dolžine svetlobe (λ)** in **numerične aperture (NA)** objektiv. Slednja je parameter, ki označuje količino svetlobnih žarkov, ki jih lahko objektiv zajame. Objektiv z večjo NA zbere več svetlobnih žarkov in imajo zato večjo ločljivost (slika 2). Numerična apertura je odvisna od **sinusa kota α** (slika 3), pod katerim pade svetloba v objektiv, in od **lomnega količnika (n)** snovi med preparatom in čelno lečo objektiv.

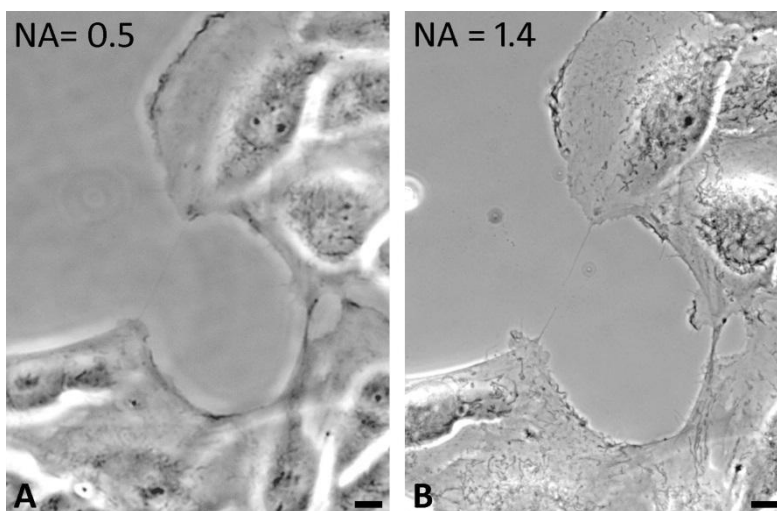
Ločljivost mikroskopa izračunamo po enačbi:

$$d = \frac{0,61 \times \lambda}{NA_{objektiva}}$$

(λ) srednja valovna dolžina vidne svetlobe = 550 nm

Numerično aperturo izračunamo po enačbi:

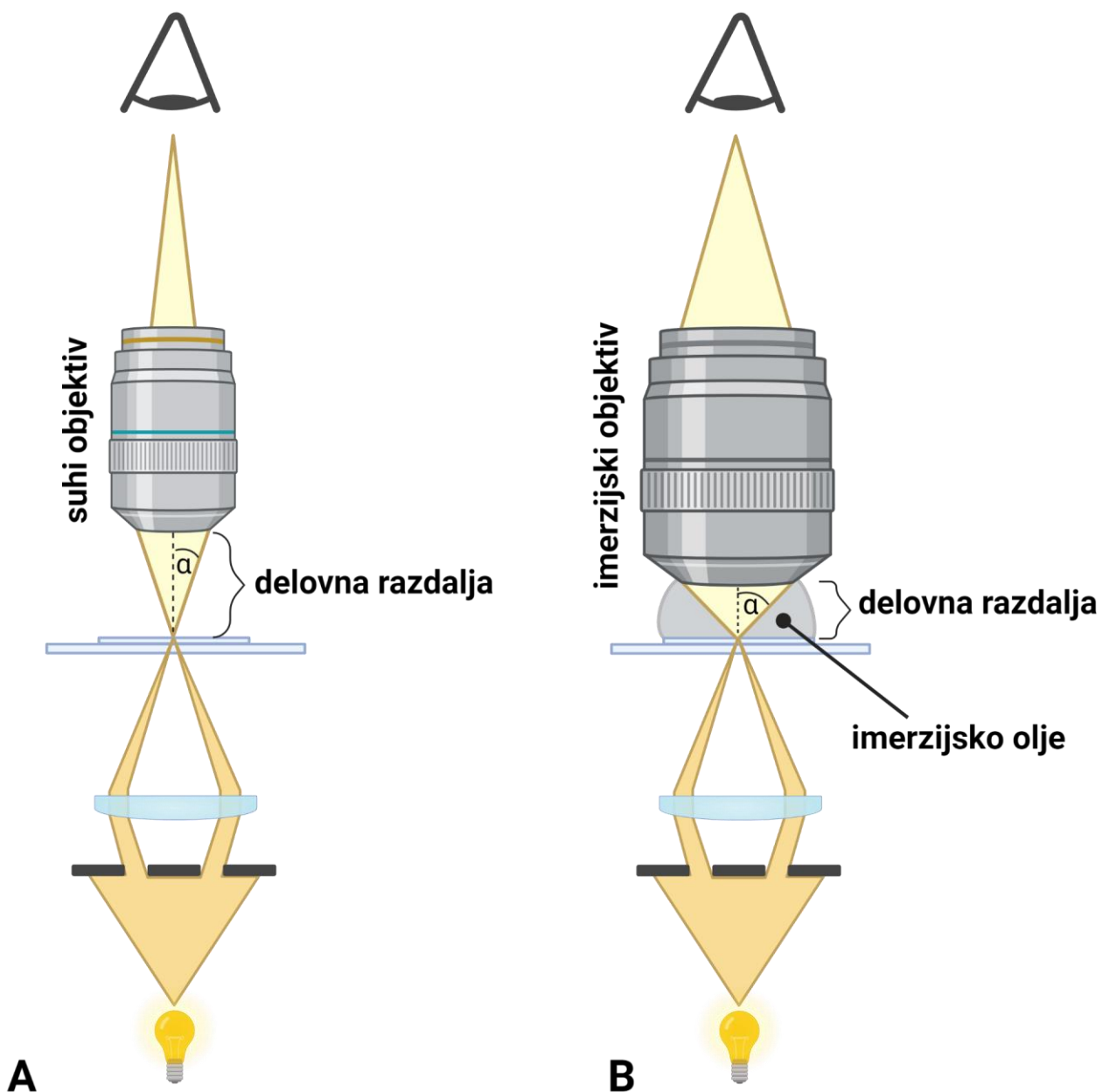
$$NA = n \times \sin \alpha$$



Slika 2: Urotelijske rakave celice, ki rastejo v kulturi, posnete z (A) objektivom z manjšo numerično aperturo ($NA = 0.5$) in z (B) objektivom z večjo numerično aperturo ($NA = 1.4$). Merilo: 5 μm .

Snov med preparatom in lečo objektiv je lahko zrak ($n = 1$) in tak objektiv imenujemo **suhi objektiv** (slika 3A), ali pa imerzijsko olje ($n = 1,5$) in tak objektiv imenujemo **imerzijski objektiv** (slika 3B). Lomni količnik stekla (leča, objektno stekelce in krovnik) je 1,5. Za ločljivost objektiv velja naslednje:

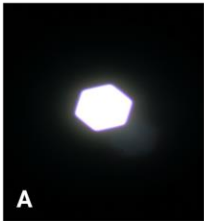
- pri suhih objektivih se žarki pri prehodu iz zraka v steklo in iz stekla v zrak lomijo in torej spremenijo svojo smer, zaradi česar jih manj pade v objektiv. Zato sta NA in d suhih objektivov slabši kot pri imerzijskih objektivih;
- če zmanjšamo delovno razdaljo (razdalja med objektivom in preparatom) se poveča kot α in zato se poveča NA, razdalja d se zmanjša, kar pomeni, da je ločljivost objektiv boljša.



Slika 3: Suhi objektiv (A), pri katerem je sredstvo med čelno lečo objektiva in krovnikom zrak, ima daljšo delovno razdaljo in manjši kot α . Imerzijski objektiv (B), pri katerem je med čelno lečo objektiva in krovnikom imerzijsko olje, ima krajšo delovno razdaljo in večji kot α .

1.1.2 DELO S KLASIČNIM SVETLOBNIM MIKROSKOPOM

Osnovni koraki dela s klasičnim svetlobnim mikroskopom in imerzijskim objektivom so predstavljeni na sliki 4.

I. Osnovni koraki dela s klasičnim svetlobnim mikroskopom	II. Osnovni koraki dela z imerzijskim objektivom
1. Prižgemo svetilo. 2. Odpremo zaslonko kolektorja in zaslonko kondenzorja. 3. V optično os vstavimo objektiv z majhno povečavo (objektiv 4x, povečava mikroskopa 40x). 4. Na objektno mizico vpneemo preparat s krovnikom obrnjenim navzgor. 5. Tkivno rezino premaknemo v snop svetlobe. 6. Jakost svetlobe naravnamo s potenciometrom. 7. Izostrimo sliko preparata (objekta) z makrometrskim vijakom. 8. Na okularjih naravnamo medzenično razdaljo in dioptrijo vsakega očesa (izostrimo kazalce in okularno merilce). 9. Pregledamo celoten preparat. 10. Del preparata, ki nas zanima, premaknemo na sredino vidnega polja. 11. Revolver zasukamo tako, da je v optični osi objektiv s srednjo povečavo (10x). 12. Naravnamo Köhlerjevo osvetlitev: i. zaslonko kolektorja zapremo ii. s pomočjo vijaka za premik kondenzorja izostrimo sliko roba zaslonke kolektorja (Slika A) iii. zaslonko kolektorja odpiramo dokler ni osvetljeno celo vidno polje. 13. Ustrezen kontrast slike dosežemo z zapiranjem in odpiranjem zaslonke kondenzorja. 14. Sliko izostrimo z makrometrskim in mikrometrskim vijakom. 15. Revolver zasukamo tako, da je v optični osi objektiv z veliko povečavo (40x). 16. Sliko izostrimo le z mikrometrskim vijakom.  A	1. Z mikrometrskim vijakom izostrimo sliko preparata pri objektivu z veliko povečavo (40x, povečava mikroskopa 400x). 2. Del preparata, ki nas zanima, premaknemo na sredino vidnega polja. 3. Revolver zasukamo tako, da je optična os mikroskopa na sredini med objektivom s 40x povečavo in imerzijskim objektivom (100x). 4. Kapljico imerzijskega olja kapnemo na točko, kjer je preparat osvetljen (Slika B). 5. Revolver previdno zasukamo, tako da v olje potopimo čelno lečo imerzijskega objektivna. 6. Sliko izostrimo le z mikrometrskim vijakom. 7. Po končnem mikroskopiranju očistimo čelno lečo objektivna in preparata s 70 % etanolom.  B

Slika 4: Osnovni koraki dela s klasičnim svetlobnim mikroskopom in imerzijskim objektivom.

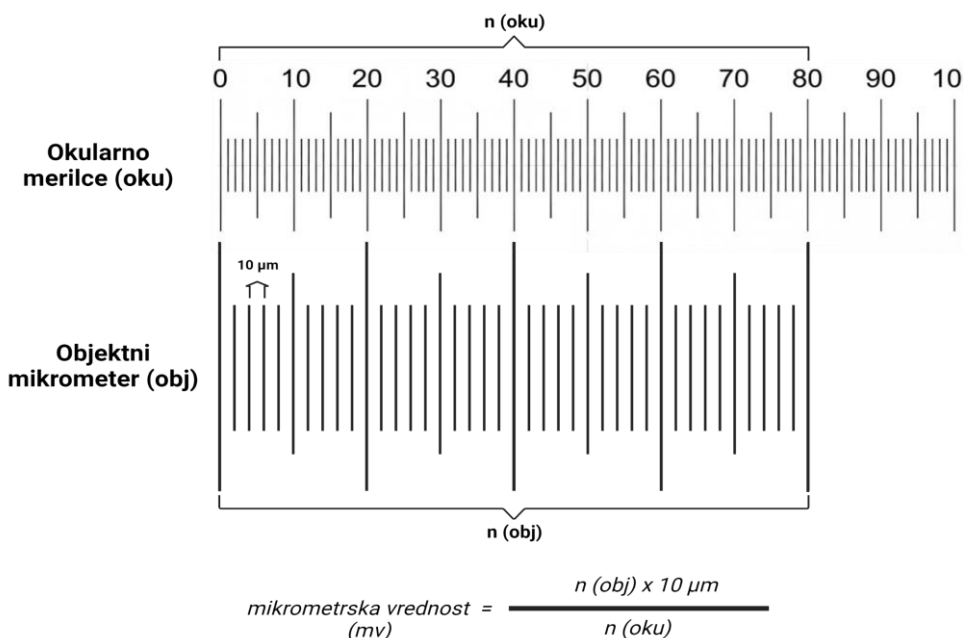
Strukture v preparatu lahko izmerimo s pomočjo steklene ploščice z vgraviranim merilcem, ki je nameščena v okularju in jo imenujemo **okularno merilce**. Okularno merilce je razdeljeno na 100 enot in ga je potrebno umeriti za vsak objektiv posebej, saj je razdalja med dvema enotama neznana. V ta namen uporabimo **objektni mikrometer**, ki je razdeljen na 100 enakih delov, kjer vsak razdelek meri 10 μm (slika 5).



Slika 5: Mikrografija objektnega mikrometra pri objektivih s povečavami 4×, 10× in 40×.

Osnovni koraki **umerjanja okularnega merilca** so naslednji:

- Na objektno mizico vpnemo objektni mikrometer.
- Merilce objektnega mikrometra premaknemo v sredino vidnega polja.
- Izostrimo sliko merilca.
- S pomočjo vrtenja okularja poravnamo skalo okularnega merilca z objektnim mikrometrom
- Primerjamo število razdelkov objektnega mikrometra (n_{obj}), ki se ujemajo s številom razdelkov okularnega merilca (n_{oku}) (slika 6).
- Mikrometrsko vrednost (mv) izračunamo po enačbi: $mv = \frac{n(obj) \times 10 \mu m}{n(oku)}$
- Korake ponovimo za vsak objektiv posebej.
- Objektni mikrometer zamenjamo s preparatom ter želene strukture izmerimo z okularnim merilcem. Okularno merilce poravnamo s strukturo in preštejemo število razdelkov ter to število pomnožimo z mikrometrsko vrednostjo objektiva s katerim opazujemo preparat. Tako dobimo velikost strukture v μm .



Slika 6: Umerjanje okularnega merilca z objektnim mikrometrom.

1.2 VAJA: OBLIKE EVKARIONTSKIH CELIC IN VRSTE SVETLOBNIH MIKROSKOPOV

1.2.1 OBLIKE EVKARIONTSKIH CELIC

Evkariontske celice se razlikujejo po velikosti in sicer segajo od nekaj mikrometrov do več milimetrov. V povprečju so velike od **10 do 100 μm** . Pri človeku so največje živčne celice (nevroni), katerih akson je lahko dolg tudi do 1 m, najmanjše pa so brezjedrne krvne celice trombociti, ki so veliki 2 do 3 μm .

Naloge osnovnih celičnih sestavnih delov so prikazane v tabeli 1.

Tabela 1: Osnovne celične strukture in njihove glavne naloge.

STRUKTURA	NALOGA
<u>Plazmalema</u> (plazemska membrana)	Lipidni dvosloj, ki deluje kot fizična pregrada, saj ločuje notranjost celice od zunanjega okolja. Ohranja celično obliko, sodeluje pri aktivnem in pasivnem transportu snovi ter omogoča komunikacijo z zunanjim okoljem.
<u>Jedro</u>	Celični organel, kjer se nahaja dedni material celice (vse molekule DNA, razen mitohondrijskih).
<u>Citoplazma</u> (citosol, citoskelet, membranski predelki)	Prostor med plazmalemo in jedrom. Glavne funkcije citoplazme so ohranjanje oblike in strukture celice, zaščita, shranjevanje makromolekul ter sodelovanje pri transportu in metabolizmu molekul.
<i>citosol</i>	Gelu podobna znotrajcelična raztopina, ki obdaja membranske predelke ter omogoča premikanje molekul in interakcijo med različnimi celičnimi komponentami.
<i>citoskelet</i>	Mrežje strukturnih proteinov, ki omogoča celici vzdrževanje oblike, gibljivost in znotrajcelične Transporte. Sodelujejo tudi pri delitvi celice.
<i>membranski predelki (vezikli, organeli)</i>	Z membrano obdane strukture s točno določeno vsebino in funkcijo.

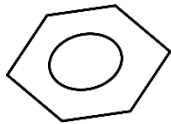
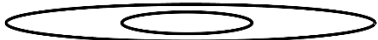
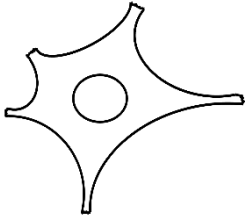
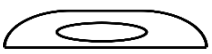
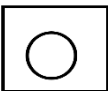
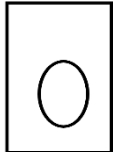
Večcelični organizmi so sestavljeni iz več celic, ki delujejo skupaj kot ena funkcionalna enota. Te celice so organizirane v različna tkiva, ki opravljajo v organizmu specifične funkcije. V človeškem telesu obstajajo štiri glavne vrste tkiv, ki tvorijo različne organe in organske sisteme:

- **Krovno tkivo** ali **epitelij** ločuje zunanost organizma od njegove notranjosti (na primer epitelij kože) ter prekriva notranje površine votlih organov (na primer črevesni epitelij, epitelij sečnega mehurja, želodčni epitelij).
- **Vezivno tkivo** igra ključno vlogo pri ohranjanju strukturne celovitosti telesa ter zagotavljanju podpore drugim tkivom in organom. V človeškem telesu je več vrst vezivnega tkiva in sicer: rahlo vezivno tkivo, čvrsto vezivno tkivo, maščobno tkivo, kostno tkivo, hrustančno tkivo ter po nekaterih nomenklaturah tudi kri in hematopoetsko tkivo.

- **Mišično tkivo**, ki je odgovorno za gibanje in krčenje. V človeškem telesu razlikujemo gladkomišično in prečnoproasto mišično tkivo.
- **Živčno tkivo**, ki vključuje centralni in periferni živčni sistem ter senzorne organe za dotik, vid, vonj, okus in sluh. Sestavljajo ga nevroni in nevroglija celice. Odgovorno je za prenos električnih signalov ter usklajevanje in nadzorovanje različnih fizioloških procesov.

Celice, ki sestavljajo različna tkiva, imajo določeno obliko (tabela 2), ki je odvisna od več različnih dejavnikov, kot so stopnja diferenciacije, specifična naloga, pritisk sosednjih celic, citoskelet in medceličnina.

Tabela 2: Osnovne celične oblike.

OBLIKA CELICE	PRIMERI CELIC
<u>Kroglasta</u>	Jajčne celice (oociti) Krvne celice kot na primer eritrociti, levkociti v krvi (v tkivu dobijo ameboidno obliko), trombociti
<u>Izodiametrična</u> 	Maščobne celice (adipociti) Jetrne celice (hepatociti)
<u>Vretenasta</u> 	Gladkomišične in prečnoproaste mišične celice
<u>Asimetrična</u> 	Živčne celice (nevroni) Kostne celice (osteociti)
<u>Ploščata</u> 	Epitelijske celice krvnih žil (endotelijske celice)
<u>Kubična</u> 	Epitelijske celice različnih žlez kot na primer mlečne žleze in ščitnice
<u>Visokoprizmatska</u> 	Črevesne absorpcijske epitelijske celice (enterociti), epitelijske celice materničnega vratu, želodca in žolčnika

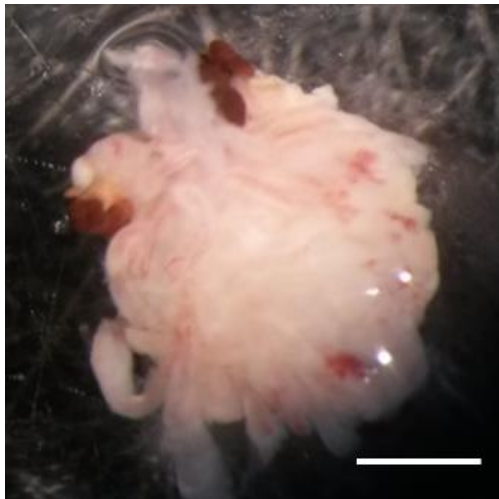
1.2.2 DRUGE VRSTE SVETLOBNIH MIKROSKOPOV

Poleg klasične oblike svetlobnega mikroskopa je ta lahko prirejen in nadgrajen za različne namene. Spodaj so našteje in na kratko opisane največkrat uporabljene vrste svetlobnih mikroskopov.

1.2.2.1 Stereoskopski mikroskop ali lupa

Stereoskopski mikroskop, znan tudi kot **stereomikroskop** ali **lupa**, je posebna vrsta mikroskopa, ki omogoča stereoskopski pogled na vzorce. Ta vrsta mikroskopa omogoča opazovanje vzorca v tridimenzionalni perspektivi, kar daje občutek globine in omogoča boljše razumevanje strukture in razmerij znotraj vzorca. Zaradi velike delovne razdalje je zelo uporaben pri delu s tridimenzionalnimi objekti, na primer pri raziskovanju majhnih organizmov v celoti ali pa s koščki tkiva med poskusom (slika 7) ali za natančne operativne posege, na primer na živčevju.

Medtem ko pri klasičnem svetlobnem mikroskopu uporabljamo en objektiv in opazujemo vzorec z ene točke, stereoskopski mikroskop uporablja dva ločena objektivna in okularja, kar daje globinski vtis in omogoča binokularni pogled. Poleg tega vsebujejo stereomikroskopi dodatne vgrajene prizme, ki so nameščene med objektivom in okularjem. Le te sliko obrnejo in tako omogočajo normalno orientacijo v delovnem prostoru.



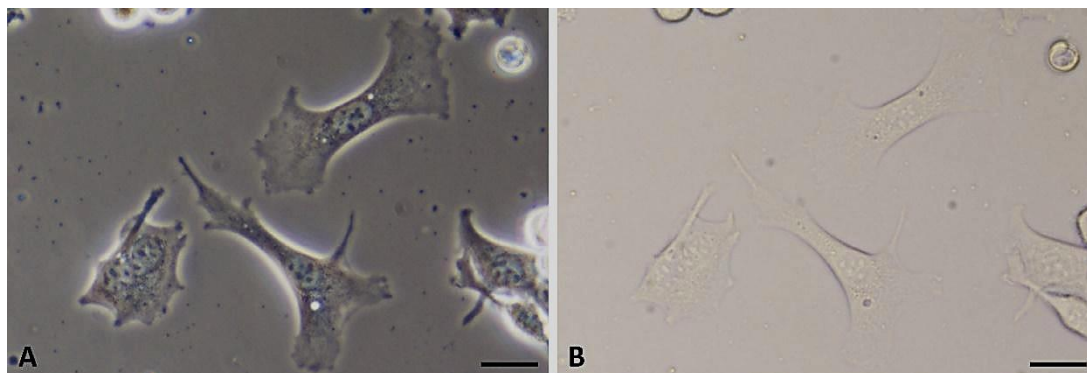
Slika 7: Mikrografija posneta s stereoskopskim mikroskopom. Svež vzorec humanega urotelijskega papiloma odvzetega med biopsijo. Merilo: 2 mm.

1.2.2.2 Faznokontrastni mikroskop

Faznokontrastni mikroskop se uporablja v mikroskopiji za izboljšanje kontrasta prosojnih ali neobarvanih vzorcev. Posebej je koristen pri opazovanju bioloških vzorcev, kot so žive celice, ki so zaradi visoke vsebnosti vode prosojne in zato slabo vidne s klasičnim svetlobnim mikroskopom. Princip delovanja faznokontrastnega mikroskopi temelji na dejstvu, da pride med prehajanjem svetlobnega valovanja skozi citoplazmo celic do zamika v fazi valovanja med direktnimi in uklonskimi žarki. Uklonski žarki se na debelini citoplazme 5 μm zakasni za direktnimi žarki za $\frac{1}{4}$ valovne dolžine, kar je človeškim očem nevidno. Faznokontrastni mikroskop ta fazni zamik še dodatno poveča za $\frac{1}{4}$ valovne dolžine. Po interferenci direktnih in uklonskih žarkov se razlika v fazi valovanja pretvori

v razliko v intenziteti svetlobe, kar povzroči, da neobarvane strukture vidimo bolj kontrastne (sliki 2 in 8).

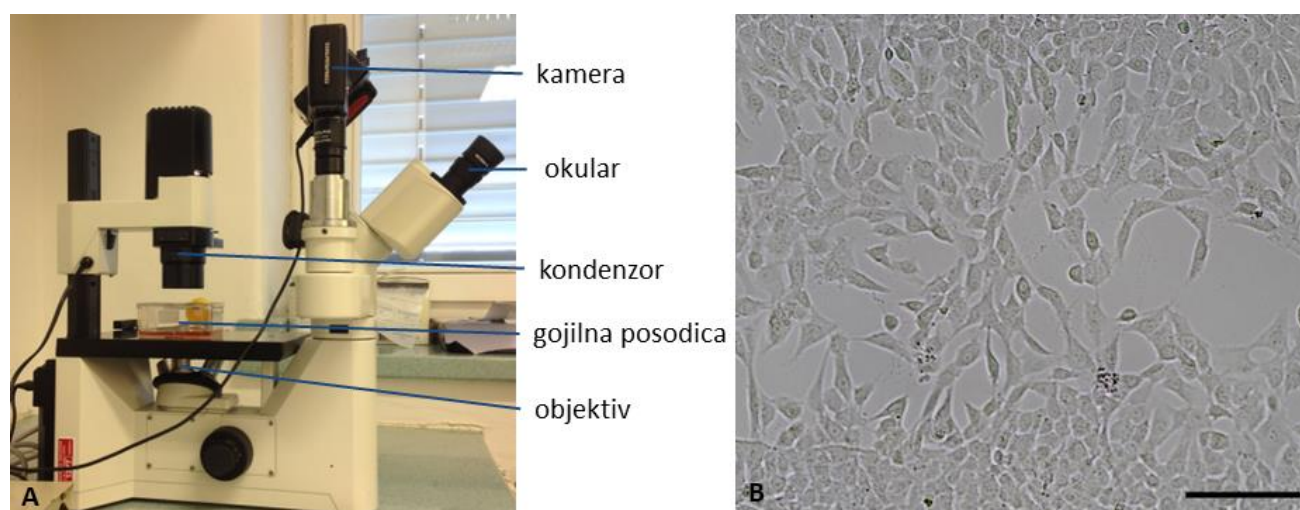
Faznokontrastni mikroskop ima za povečevanje faznega zamika dva dodatna sestavna dela: **kolobarjasto kondenzorjevo zaslonko**, ki prepušča le kolobar svetlobe, in **stekleno fazno ploščico**, ki ima izbrušen kolobarjast utor enakih dimenzij.



Slika 8: Mikrografija neobarvanih evkariontskih celic posneta (A) s faznokontrastnim mikroskopom in (B) s klasičnim svetlobnim mikroskopom. Merilo: 50 μm .

1.2.2.3 Invertni mikroskop

Invertni mikroskop je vrsta mikroskopa, pri kateri je revolver z objektivami nameščen pod objektno mizico, svetlobni vir, kolektor ter kondenzor pa so nameščeni nad njo (slika 9). Taka zasnova omogoča opazovanje živih celic *in vitro*, ki rastejo po dnu gojilne posode, saj višina posodice tako ne ovira izostrovanja slike in ne omejuje delovne razdalje objektiva. Princip delovanja invertnega mikroskopa temelji na istih osnovnih načelih kot pri klasičnem svetlobnem mikroskopu. Invertni mikroskop je lahko zasnovan tako, da podpira fluorescenčno in faznokontrastno mikroskopijo z vključevanjem različnih optičnih delov in pripomočkov, kar raziskovalcem omogoča prilagodljivost pri preučevanju različnih bioloških vzorcev.

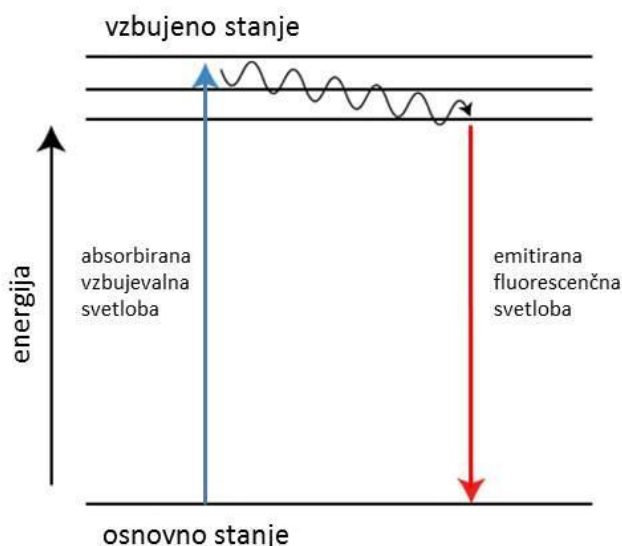


Slika 9: A) Invertni mikroskop z gojilno posodo na objektni mizici in nameščeno kamero. B) Mikrografija neobarvanih evkariontskih celic posneta z invertnim faznokontrastnim mikroskopom. Merilo: 50 μm .

1.2.2.4 Fluorescenčni mikroskop

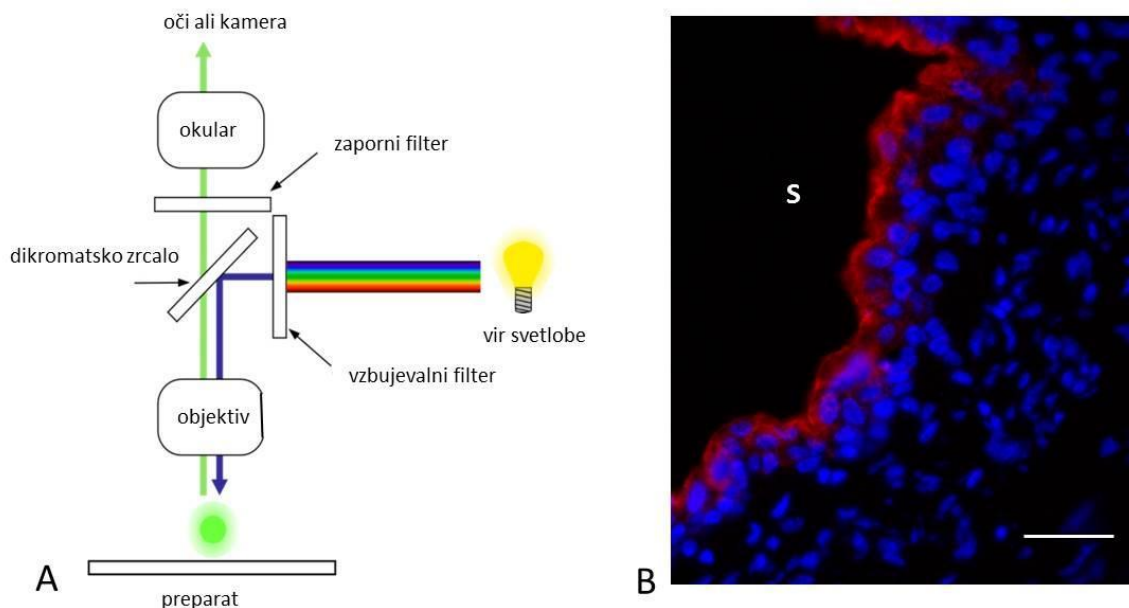
Fluorescenčni mikroskop temelji na uporabi **fluorescenčnih barvil** ali **fluorokromov**. Gre za molekule, ki imajo sposobnost absorpiranja svetlobe pri krajši valovni dolžini (vzbujevalne svetlobe) in oddajanja svetlobe pri daljši valovni dolžini (emitirana svetloba). Delovanje fluorokromov temelji na procesu prenosa energije med elektronskimi stanji molekule (slika 10). Ko je fluorokrom v osnovnem stanju, so njegovi elektroni v nizkoenergijskih stanjih. Ko fluorokrom absorbira vzbujevalno svetlobo pri ustrezni valovni dolžini, se nekateri elektroni prenesejo na višje energijske nivoje. Vzburjeni elektroni v fluorokromu so nestabilni in se hitro vrnejo v osnovna stanja, pri čemer sprostijo presežno energijo v obliki fotonov emitirane svetlobe. Ta proces se imenuje fluorescenca. Svetloba, ki jo emitira fluorokrom, ima daljšo valovno dolžino od vzbujevalne svetlobe, saj se del energije med prehodom med elektronskimi stanji pretvori v toploto.

Fluorokrome lahko vežemo na specifične molekule (npr. protitelesa, sonde DNA in RNA) in tako preučujemo celične strukture, proteine, molekularne interakcije ter različne biološke procese.



Slika 10: Energetsko stanje atoma fluorokroma med absorpcijo vzbujevalne svetlobe in emisijo fluorescenčne svetlobe.

Fluorescenčni mikroskop ima za svoje delovanje prirejeno zgradbo (slika 11A). Vir svetlobe je običajno ksenonova ali živosrebrova žarnica ali pa LED svetilo, ki oddaja svetlobo v vidnem in ultravijoličnem delu spektra. Za žarnico je nameščen **fitrski blok**, ki je sestavljen iz treh delov. Prvi del je **vzbujevalni filter**, ki selektivno prepušča le svetlobo določene valovne dolžine, ki v preparatu vzbudi fluorescenco (vzbujevalna svetloba; na sliki modra). Drugi del filtrskega bloka je **dikromatsko zrcalo**, ki nato usmeri vzbujevalno svetlobo v objektiv, ta pa zbere žarke v ravnino preparata. Emitirana svetloba (fluorescenčna svetloba; na sliki zelena), ki jo najprej zajame objektiv, potuje skozi dikromatsko zrcalo ter nato skozi tretji del filtrskega bloka, ki ga imenujemo **zaporni filter**. Zaporni filter blokira vzbujevalno svetlobo in prepušča le tisti del spektra fluorescenčne svetlobe, ki ga emitirajo fluorokromi.



Slika 11: A) Shematski prikaz glavnih sestavnih delov in poti svetlobnih žarkov skozi fluorescenčni mikroskop. B) Urotelij sečnega mehurja posnet s fluorescenčnim mikroskopom (modro so označena jedra celic, rdeče so označeni proteini uroplakini, ki so značilni za površinske urotelijske celice, S – svetlina sečnega mehurja). Merilo: 100 µm.

1.2.2.5 Konfokalni mikroskop

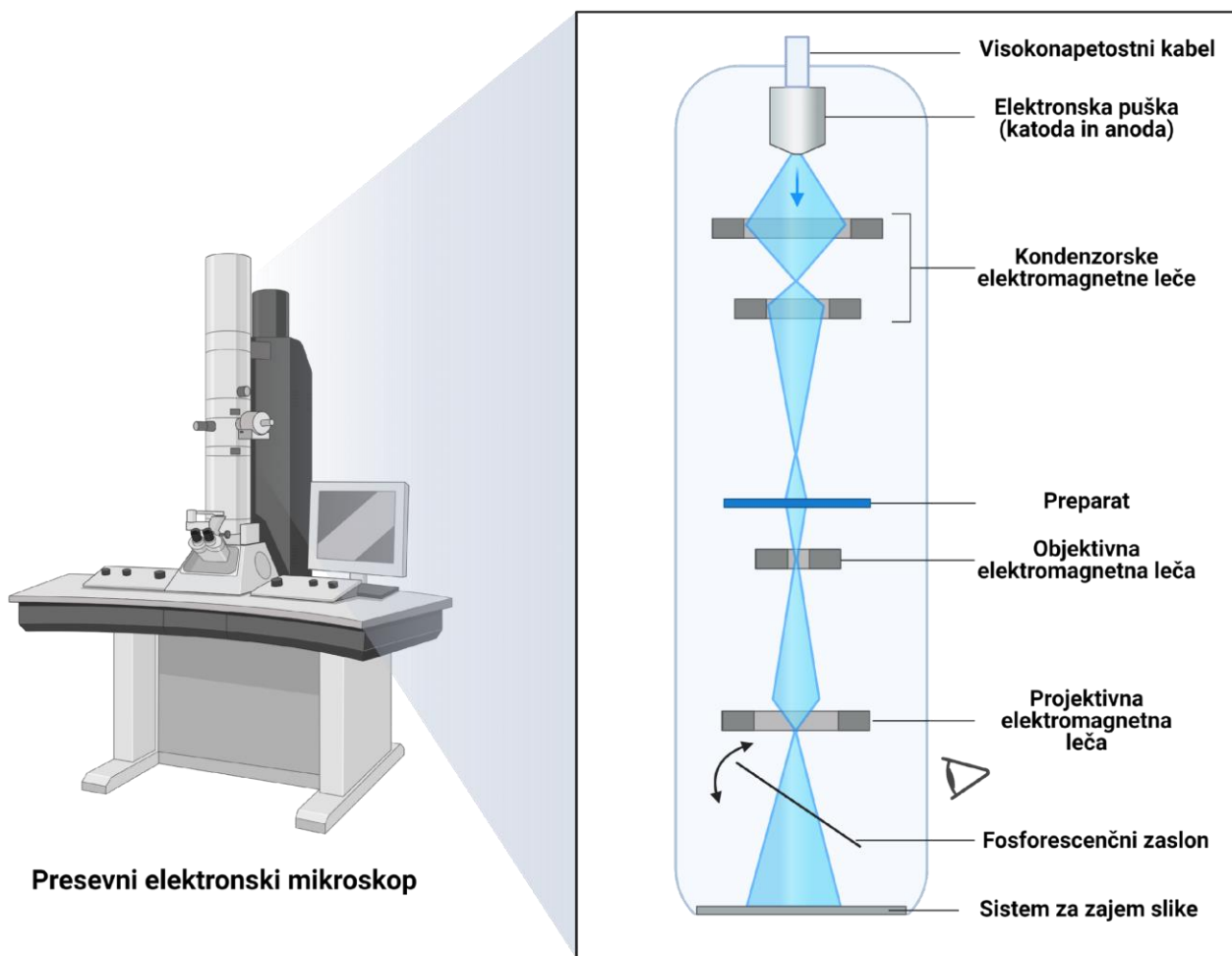
Konfokalni mikroskop je nadgradnja fluorescenčnega mikroskopa, ki se uporablja za pridobivanje tridimenzionalnih slik vzorca z visoko ločljivostjo. Konfokalni mikroskop deluje tako, da točkasti žarek vzbujevalne svetlobe po vrsticah osvetljuje preparat (ga skenira) ter v njem vzbuja fluorescenco. Vzbujevalna svetloba je laserski žarek z določeno valovno dolžino in majhnim premerom. Med vzorcem in detektorjem fluorescenčne svetlobe je postavljena **zaslonka z majhno odprtino** (angl. pinhole), ki omejuje prehajanje fluorescenčne (emitirane) svetlobe na točko, ki izhaja iz ene fokusne ravnine vzorca. Sistem v konfokalnem mikroskopu omogoča premikanje žarkov tako, da laserska svetloba osvetli točko za točko v preparatu. Detektor zazna fluorescenčno svetlobo, ki prehaja skozi zaslonko z majhno odprtino ter informacije iz posameznih točk računalniško pretvori v sliko. Konfokalni mikroskop omogoča **optično rezanje** (zajemanje slik po globini preparata) in možnost **tridimenzionalne rekonstrukcije vzorcev**, debelih tudi več 100 µm.

1.3 VAJA: ELEKTRONSKI MIKROSKOPI

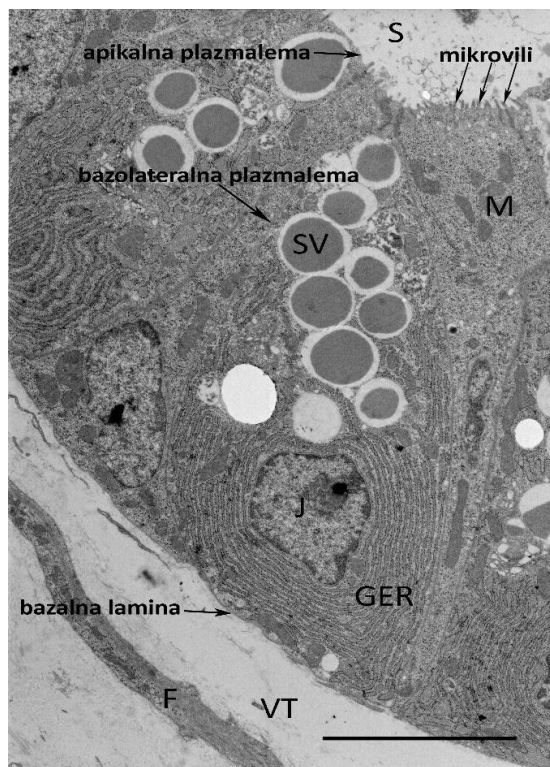
V elektronski mikroskopiji se namesto svetlobnega valovanja ($\lambda \approx 550 \text{ nm}$) uporablja **valovanje pospešenih elektronov**, ki imajo zelo kratko valovno dolžino ($\lambda \approx 0,005 \text{ nm}$), kar omogoča veliko večje povečave (do 1.000.000 $\times$) in boljšo ločljivost (do 0,3 nm). Dve osnovni vrsti elektronskih mikroskopov sta presevni in vrstični elektronski mikroskop, ki se razlikujeta v načinu tvorjenja slike. Za delovanje elektronskih mikroskopov je potreben **visok vakum**, saj bi v prisotnosti zraka prišlo do sipanja elektronov.

1.3.1 PRESEVNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP

Presevni elektronski mikroskop (TEM) se uporablja se preučevanje celične ultrastrukture (slika 12) z izjemno visoko ločljivostjo (0,3 nm – 1 nm). Glavni sestavni deli presevnega elektronskega mikroskopa so elektronska puška, sistem elektromagnetnih leč (kondenzorska, objektivna in projekтивna leča), fosforescenčni zaslon, sistem za zajem slike (čip digitalne kamere) (slika 12). Princip nastanka slike v presevnem elektronskem mikroskopu temelji na interakciji med elektronskim snopom in preparatom. Elektronska puška je vir valovanja pospešenih elektronov in je sestavljena iz kovinskega filameta (katode) ter anode. Visoka napetost (60-200 kV) med katodo in anodo pospešuje elektronski snop proti preparatu. Kondenzorske elektromagnetne leče zberejo snop elektronov in ga usmerijo v ravnino preparata, ki leži pod kondenzorjem. Nekateri elektroni, ki presevajo preparat, potujejo skozenj neovirano, medtem ko se drugi sipajo na atomih težkih kovin, ki jih predhodno vnesemo v preparat in tako povečamo kontrast. Za preparatom je nameščena objektivna elektromagnetna leča, ki s fokusiranjem elektronskega snopa presevnih elektronov oblikuje začetno povečano sliko. Projekтивna elektromagnetna leča se nahaja pod objektivno lečo ter dodatno poveča in projicira elektronski snop na fosforescenčni zaslon ali na sistem za zajem slike. Elektroni, ki potujejo skozi preparat neovirano, padejo na fosforescenčni zaslon in iz njega izbijajo fotone valovnih dolžin, kar vidimo kot svetlejše dele preparata. Po drugi strani pa elektroni, ki se sipajo, ne padejo na zaslon oziroma jih pade manj, kar vidimo kot bolj ali manj temne dele (slika 13). V kolikor želimo del preparata slikati, dvignemo fosforescenčni zaslon in elektroni osvetlijo čip digitalne kamere in tako nastane na računalniškem monitorju slika, ki jo imenujemo mikrografija.



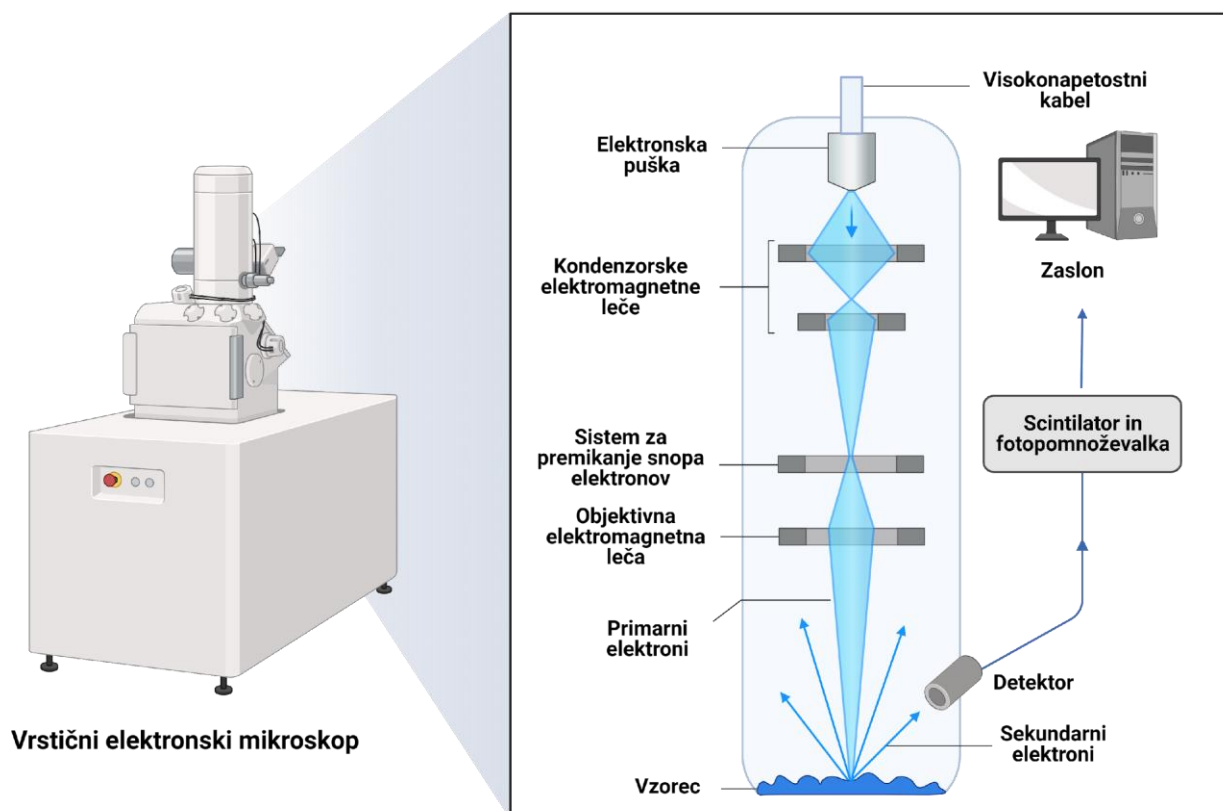
Slika 12: Shematski prikaz zgradbe presevnega elektronskega mikroskopa.



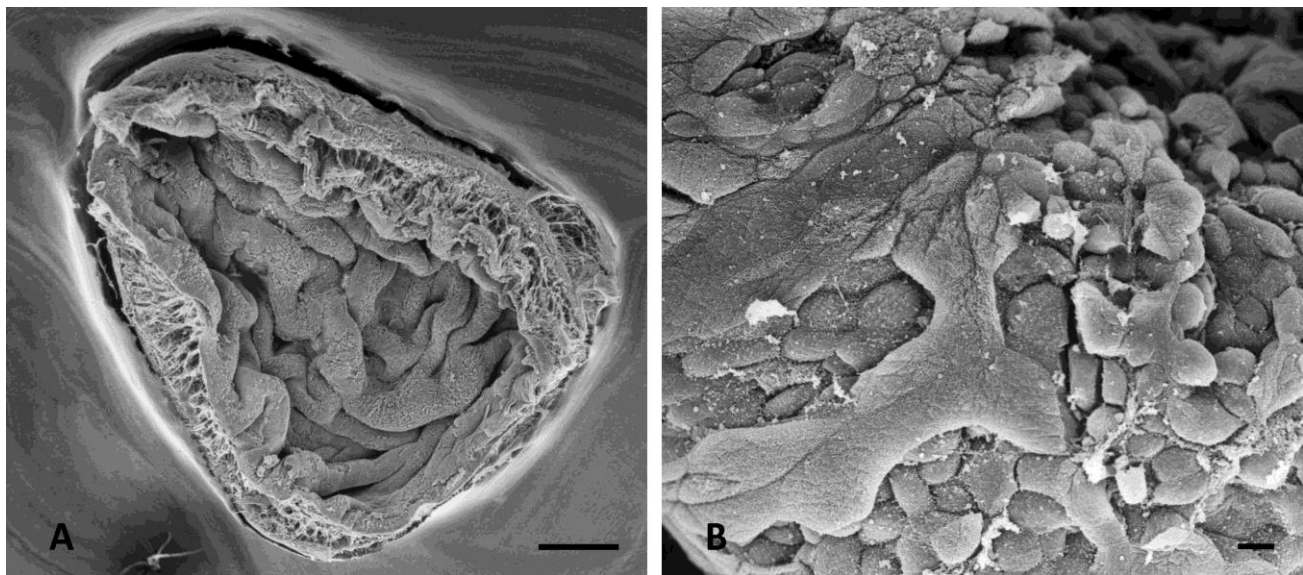
Slika 13: Mikrografija ultrastrukture črevesnega epitelijskega tkiva, posneta s presevnim elektronskim mikroskopom. S – svetlina, M – mitohondrij, SV – sekrecijski vezikel, J – jedro, GER – granularni ali zrnati endoplazemski retikulum, VT – vezivno tkivo, F – fibroblast. Merilo: 5 μ m.

1.3.2 VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP

Vrstični elektronski mikroskop (SEM) omogoča preučevanje površine preparata. Glavni sestavni deli vrstičnega elektronskega mikroskopa so elektronska puška, sistem elektromagnetnih leč, sistem za premikanje snopa elektronov, detektor sekundarnih elektronov, scintilator in fotopomnoževalka. (slika 14). Princip tvorjenja slike temelji na interakcijah med snopom elektronov in površino preparata. Tako kot pri presevnem mikroskopu je tudi v vrstičnem mikroskopu vir valovanja elektronov elektronska puška. Primarni elektroni, ki nastajajo v elektronski puški potujejo proti preparatu, ki je umeščen na dnu cevi mikroskopa. Za elektronsko puško je vstavljen sistem elektromagnetnih leč (kondenzorske in objektivne), ki oblikuje in usmerja snop primarnih elektronov. S pomočjo posebnega sistema za premikanje, primarni elektroni z veliko hitrostjo točkovno otipavajo (skenirajo) površino preparata, pri čemer izbijajo sekundarne elektrone iz atomov vzorca. V neposredni bližini preparata je nameščen detektor, ki zbira sekundarne elektrone, medtem ko scintilator in fotopomnoževalka pretvorita signal sekundarnih elektronov v električni signal, ki ga vidimo na zaslonu. Temnejša področja na površini preparata so tista, s katerih se med skeniranjem s snopom primarnih elektronov izbije manj sekundarnih elektronov (ki nato zadenejo detektor), medtem ko so svetlejša področja tista, s katerih se izbije veliko sekundarnih elektronov. Sliko površine (topografije, reliefa) preparata lahko fotografiramo in dobimo mikrografijo (slika 15).



Slika 14: Shematski prikaz zgradbe vrstičnega elektronskega mikroskopa.



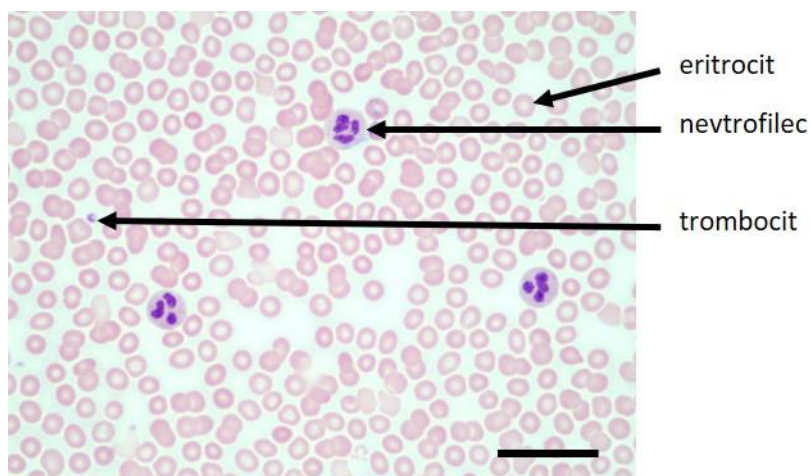
Slika 15: Mikrografija površine epitelija sečnega mehurja (urotelija), posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom. A) Košček stene sečnega mehurja. B) Urotelijske celice, ki z apikalno plazmalemo mejijo na svetlino sečnega mehurja. Merilo: A) 500 μm ; B) 10 μm .

2.1 VAJA: CITOLOŠKE, HISTOLOŠKE IN ELEKTRONSKOMIKROSKOPSKE METODE

2.1.1 PRIPRAVA PREPARATOV ZA SVETLOBNO MIKROSKOPIJO

2.1.1.1 Sveži mikroskopski preparati

Sveži mikroskopski preparati omogočajo preučevanje živih mikroorganizmov, rastlinskih in živalskih celic ter drugih majhnih organizmov brez potrebe po obsežni pripravi. Pripravimo jih iz živih celic v kulturi ali jih pridobimo iz večceličnega organizma (krvne celice, spermiji in celice ustne sluznice) in jih razporedimo v dovolj tanki plasti, tako da jih svetloba lahko preseva. Ker vsebujejo celice do 80 % vode, ki je prosojna, so pod klasičnim svetlobnim mikroskopom slabo kontrastne. Da izboljšamo kontrastnost celic, jih opazujemo s **faznokontrastnim mikroskopom** ali pa jih barvamo z **vitalnimi barvili**, ki prodrejo skozi plazmalemo celic. Za barvanje na zraku posušenih (fizikalna fiksacija s sušenjem) razmazov krvnih celic ali celic različnih sluznic (grlo, maternični vrat) se rutinsko uporablja barvilo MGG (May-Grunwald-Giemsa) (slika 16).



Slika 16: Razmaz krvnih celic (eritrociti, nevtrofilci in trombociti) pobarvan z barvilom MGG (May-Grunwald-Giemsa). Merilo: 50 μm .

2.1.1.2 Trajni histološki preparati iz parafinskih rezin

Trajni histološki preparati omogočajo podrobno preučevanje tkivnih in celičnih struktur, razumevanje patoloških sprememb v tkivih in celicah ter napredno raziskovanje na področju biomedicine in biologije. Gre za visoko kontrastne, obstojne mikroskopske preparate z ustrezno debelino (3 do 7 μm). Večina trajnih histoloških preparatov je pripravljenih iz **parafinskih rezin** kemijsko fiksiranega tkiva oziroma celic. Postopek priprave trajnih histoloških preparatov iz parafinskih rezin vključuje več ključnih korakov: **fiksacija**, **dehidracija**, **vkapljanje**, **rezanje**, **barvanje** in **pokrivanje**.

Fiksacija je začetni korak postopka, s katerim ohranimo strukturo odvzetega tkiva in celic ter njihovo kemično sestavo. Pri pripravi parafinskih rezin se uporablja **kemijska fiksacija**. Pri kemijski fiksaciji za fiksacijo tkiva ali celic uporabimo določene kemijske snovi, ki fiksirajo predvsem proteine. Na ta način preprečijo avtolizo celic, saj so fiksirani encimi neaktivni. Zelo pogosto uporabljeni kemijski fiksativi so **aldehidi**. Najbolj pogosto uporabljen je formaldehid, ki omogoči nastanek novih vezi

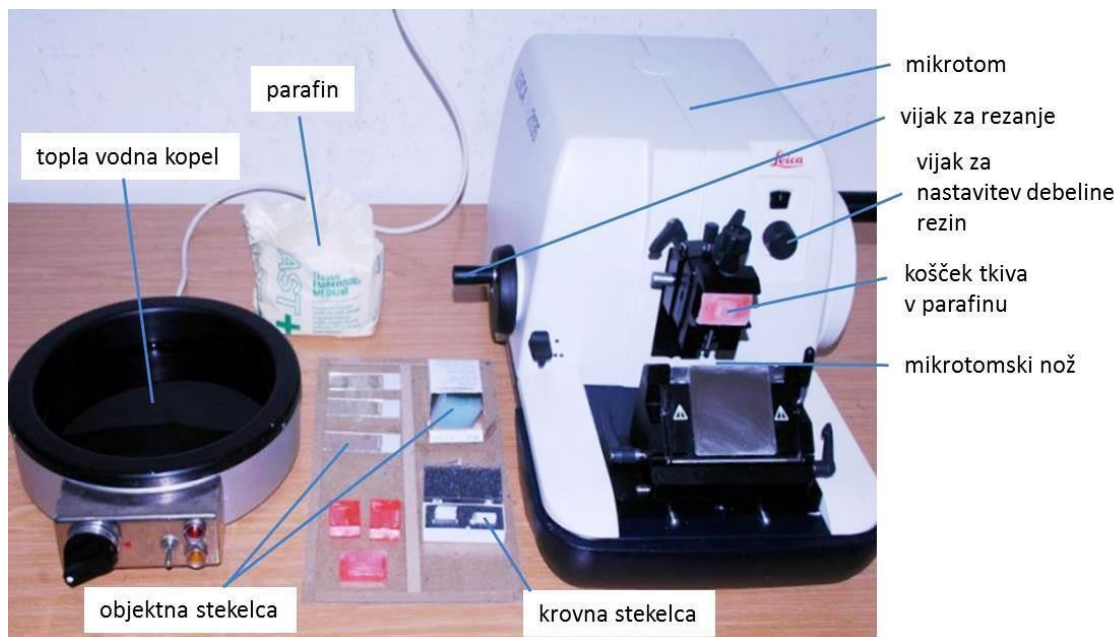
znotraj ene proteinske molekule ali med sosednjimi proteinskimi molekulami ter tako zamreži in inaktivira proteinske molekule. Med kemijske fiksative sodijo tudi alkoholi (na primer metanol in etanol, ki povzročita denaturacijo proteinov), **organske kisline** (na primer očetna in pikrinska kislina, ki povzročita denaturacijo proteinov) ter **oksidanti** (na primer osmijev tetroksid, ki oksidira dvojne vezi nenasičenih maščobnih kislin in tako stabilizira membrane). Po fiksaciji, ki običajno traja 24 ur pri 4 °C, sledi izpiranje fiksativa in **postopna dehidracija** vzorca v etanolih naraščajočih koncentracij. Odstranitev vode je ključnega pomena, saj se kot vklopno sredstvo uporablja parafin, ki je hidrofoben in se ne meša z vodo. Ker se s hidrofobnim parafinom bolje kot etanol meša organsko topilo **ksilol**, prenesemo vzorec iz 100% etanola v ksilol, ter na ta način zagotovimo boljšo prepajitev tkiva s tekočim parafinom.

Rezanje živalskih tkiv in celic, ki so *in vivo* bolj ali manj mehke, je možno le, če jih vklopimo v trdno snov, kot je parafin. **Vklapljanje v parafin** zagotavlja trdoto tkiva med procesom rezanja parafinskih rezin. Iz ksilola prenesemo vzorec v **tekoči parafin** (tališče parafina je pri 56 °C) v termostat pri 60 °C ter ga pustimo, da se prepoji s parafinom. Kalup z vzorcem in tekočim parafinom ohladimo pri sobni temperaturi pri čemer nastane **trd parafinski blok**, ki služi kot oporno sredstvo za **rezanje parafinskih rezin**.

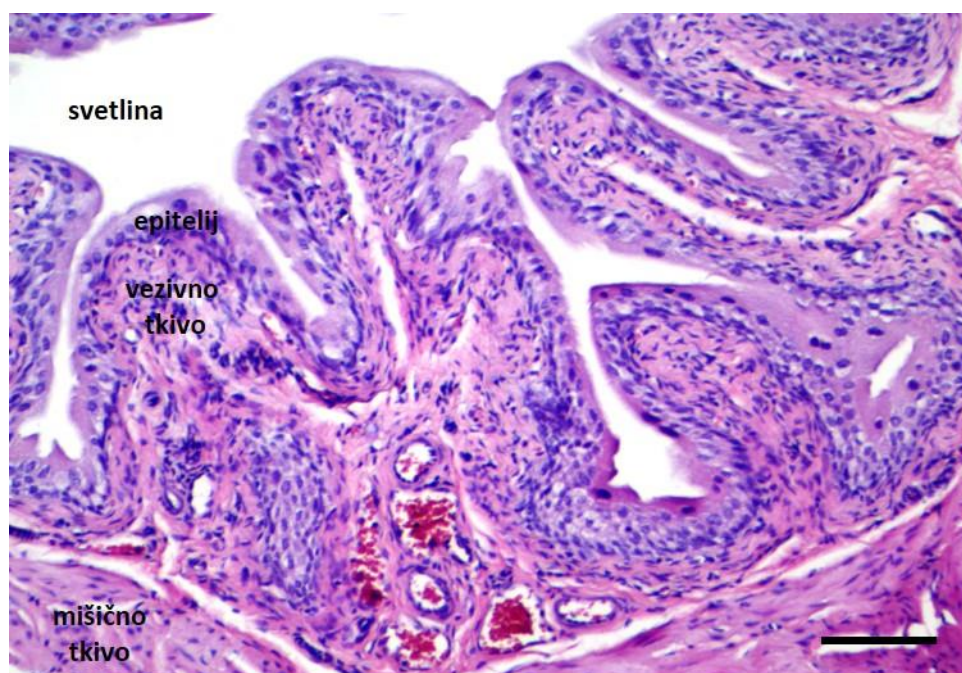
Parafinske rezine režemo z **mikrotomom** (slika 17). Kovinski nož v mikrotomu omogoča rezanje parafinskih rezin debeline 3-7 µm. Tako tanke rezine so nujne, da lahko svetloba v mikroskopu preseva skozi. Odrezane parafinske rezine so nagubane, zato jih prenesemo na površino tople vodne kopeli, kjer se raztegnejo. Nato jih poberemo na objektna stekelca in posušimo na zraku.

Večina živalskih tkiv je brezbarvnih. Za kontrastiranje celic in medceličnine uporabljamo različna barvila, ki imajo afiniteto do določenih molekul in se selektivno vežejo na celične in tkivne sestavine. Ker je večina barvil topnih v vodi (hidrofilnih), je potrebno pred barvanjem **odstraniti hidrofoben parafin**. Najprej parafinske rezine na objektnih stekelcih potopimo v ksilol (deparafiniranje), ki raztopi parafin. Nato rezine **postopno hidriramo** z etanoli padajočih koncentracij do vode. **Barvanje s hematoksilinom in eozinom (HE)** je ena izmed najpogostejših tehnik klasičnega histološkega barvanja parafinskih rezin. Hematoksilin je kationsko barvilo, ki obarva jedra celic modro, medtem ko je eozin anionsko barvilo, ki obarva citoplazmo rožnato (slika 18). Po barvanju izperemo barvilo, tako da ostanejo obarvane le strukture na katere se je barvilo vezalo. Poleg barvanja s HE lahko parafinske rezine uporabimo tudi za različna druga barvanja ali za histokemijske metode.

V vodi obarvane rezine niso trajno obstojne, zato jih **ponovno dehidriramo** v etanolih naraščajočih koncentracij. Rezine nato **zaližemo** s kapljico naravne drevesne **smole** (na primer Kanadski balzam) ali umetno smolo (na primer DPX) ter **pokrijemo** s krovnim stekelcem (krovníkom). Ko se smola posuši in strdi, trajni histološki preparat opremimo z ustreznim napisom in opazujemo s klasičnim svetlobnim mikroskopom. Tak preparat je obstojen več desetletij.



Slika 17: Mikrotom za rezanje parafinskih rezin in topla vodna kopel na kateri se parafinske rezine zgladijo, preden jih poberemo na objektna stekelca.



Slika 18: Klasično histološko barvanje s hematoksilinom in eozinom. Parafinska rezina stene mišjega sečnega mehurja. Merilo: 50 µm.

2.1.1.3 Trajni histološki preparati iz zamrznjenih rezin

Trajni histološki preparati se lahko pripravijo tudi iz **zamrznjenih rezin**, pri katerih tkivo ali celice fiksiramo s fizikalno fiksacijo z zamrzovanjem. Zamrznjene rezine se uporablja takrat, kadar je potrebno tkivo hitro pregledati (na primer med operacijo) ali kadar bi kemijska fiksacija, dehidracija in vroč parafin poškodovali sestavine celic in tkiv, ki nas zanimajo. Postopek priprave trajnih histoloških preparatov iz zamrznjenih rezin vključuje nekaj glavnih korakov: **fiksacija, rezanje, barvanje in pokrivanje**.

Fizikalna fiksacija z zamrzovanjem je začetni korak pri pripravi zamrznjenih rezin. Običajno poteka v tekočem dušiku ($-190\text{ }^{\circ}\text{C}$) ali tekočem heliju ($-269\text{ }^{\circ}\text{C}$), pri čemer pride do hitrega zamrzovanja. Običajno pred fizikalno fiksacijo koščke svežega tkiva ali celice prepojimo s krioprotektivnim sredstvom (na primer OCT), ki je hidrofilno in prepreči nastajanje kristalov vode, ki bi poškodovali strukturo tkiv in celic.

Ker rezanje zamrznjenih rezin poteka neposredno iz trdnega zamrznjenega tkiva, dehidracija in vklapljanje vzorca v trdno snov nista potrebna. Zamrznjene rezine (kriostatske rezine) režemo s **kriomikrotomom**, ki se nahaja v aparaturi imenovani kriostat (slika 19). Kriomikrotomski kovinski nož se nahaja v ohlajeni komori (približno $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) ter omogoča rezanje zamrznjenih rezin debeline $3\text{--}7\text{ }\mu\text{m}$. Odrezane zamrznjene rezine nato pobereмо z objektnim stekelcem, ogretim na sobno temperaturo, in jih posušimo na zraku.

Posušene hidrofilne zamrznjene rezine na objektnem stekelcu **barvamo** z različnimi histološkimi barvili (na primer s HE) ali jih uporabimo za različne histokemijske metode. Tako kot parafinske rezine, zamrznjene rezine v vodi niso trajno obstojne, zato jih po barvanju dehidriramo, vklopimo v naravno ali umetno smolo in **pokrijemo** s krovnim stekelcem. Tako trajno pripravljene preparate opazujemo s klasičnim svetlobnim mikroskopom.



Slika 19: Kriostat, v katerem je v hladni komori kriomikrotom, je naprava za rezanje zamrznjenih rezin.

Natančni postopki priprave trajnega histološkega preparata iz parafinskih in zamrznjenih rezin so navedeni v navodilih za vaje (str. 52).

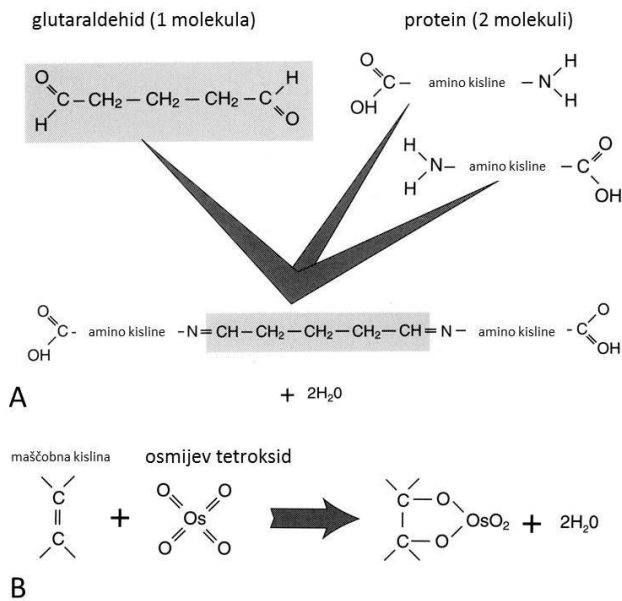
2.1.2 PRIPRAVA PREPARATOV ZA ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO

Pri elektronski mikroskopiji, kjer so povečave večje in ločljivosti boljše, je potrebna **veliko večja natančnost pri pripravi preparata** kot za svetlobno mikroskopijo. V nasprotnem primeru so artefakti (napake, ki nastanejo na preparatu zaradi postopka priprave) preveliki. Izbira najbolj optimalnega postopka priprave preparata je odvisna od vrste tkiva in celic in od tega, katere informacije o preparatu želimo dobiti (ultrastruktura – TEM; površina – SEM).

2.1.2.1 Priprava preparatov za presevni elektronski mikroskop

Za preučevanje ultrastrukture s presevnim elektronskim mikroskopom morajo biti biološki vzorci **dobro fiksirani** (da je ultrastruktura celic dobro ohranjena in da jih elektronski žarek ne uniči), **suhi** (da nanje ne vpliva vakuum), **tanki** (da bodo elektroni presevali skozi ultratanko rezino) in **kontrastni** (elektroni se sipajo na atomih v visokim atomskem številu oziroma na atomih težkih kovin).

Glavni koraki pri pripravi ultratankih rezin debeline 40 – 80 nm za presevno elektronsko mikroskopijo so: **fiksacija, dehidracija, vklapljanje, rezanje in kontrastiranje**. Priprava se začne s primarno **kemijsko fiksacijo** koščkov tkiva, ki morajo biti dovolj majhni ($1-2\text{ mm}^3$), da fiksativ hitro prodre v notranjost tkiva, ali celic **z mešanico formaldehida in glutaraldehida** (slika 20A). Primarni fiksaciji, ki običajno traja 2 do 3 ure in poteka pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sledi izpiranje z kakodilatnim pufrom in **sekundarna fiksacija (postfiksacija) z osmijevim tetroksidom (OsO_4)**. Osmij se veže na nenasičene maščobne kisline (slika 20B) s čimer fiksira lipidne molekule – predvsem membrane. Ker je osmij atom težke kovine se na njem elektroni sipajo in membrane so zato kontrastne (temno sive). Postfiksaciji sledi izpiranje OsO_4 in dehidracija v naraščajočih koncentracijah etanola ter nato **prepajanje s hidrofobno umetno smolo (na primer Epon-om)**. Po postopni polimerizaciji Epon-a pri višjih temperaturah (v termostatu pri $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $80\text{ }^{\circ}\text{C}$) postane Epon in v njem vklopljen košček tkiva ali celice izredno trd. Sledi **rezanje poltankih rezin** (debeline $1\text{ }\mu\text{m}$) z ultramikrotomom in steklenim nožem (slika 21A). Poltanke rezine barvamo s toluidinskim modrilom (slika 22 in 23A) kar nam omogoča pregledovanje le teh s klasičnim svetlobnim mikroskopom in orientacijo v preparatu. Ko izberemo del preparata, ki nas zanima, iz tega dela preparata pripravimo piramido za rezanje ultratankih rezin (slika 23B). Nato sledi **rezanje ultratankih rezin** (debeline 40 - 80 nm) z ultramikrotomom in diamantnim nožem (slika 21B). Ultratanke rezine poberemo iz kadičke z vodo na kovinske mrežice. Na koncu sledi **kontrastiranje** z vnosom atomov težkih kovin (mešanica uranilacetata in svinčevega citrata) ter opazovanje preparata s presevnim elektronskim mikroskopom (slika 23C).

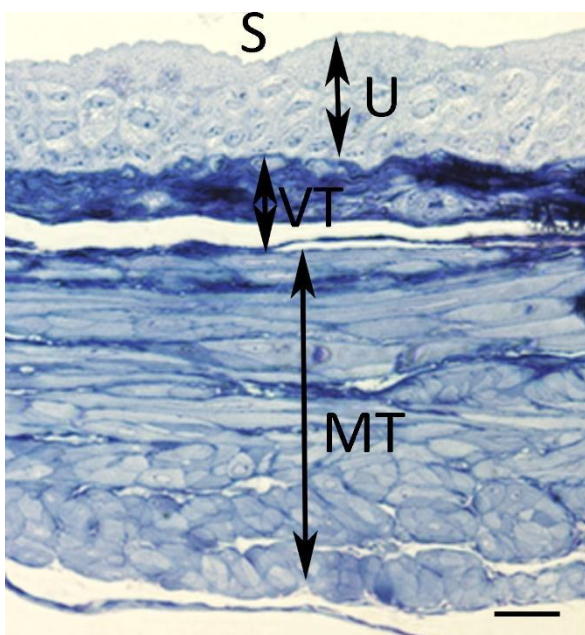


Slika 20: A) Glutaraldehyd zamreži proteinske molekule tako, da poveže dve molekuli med seboj. B) Osmijev tetroksid se veže na dvojne vezi nenasičenih maščobnih kislin, ki sestavljajo membrane.



košček tkiva
v Eponskem bloku
diamantni
nož
kadička

Slika 21: A) Ultramikrotom je naprava za rezanje poltankih in ultratankih rezin. B) Diamantni nož in Eponski blok s koščkom tkiva sta vpeta v ultramikrotom.

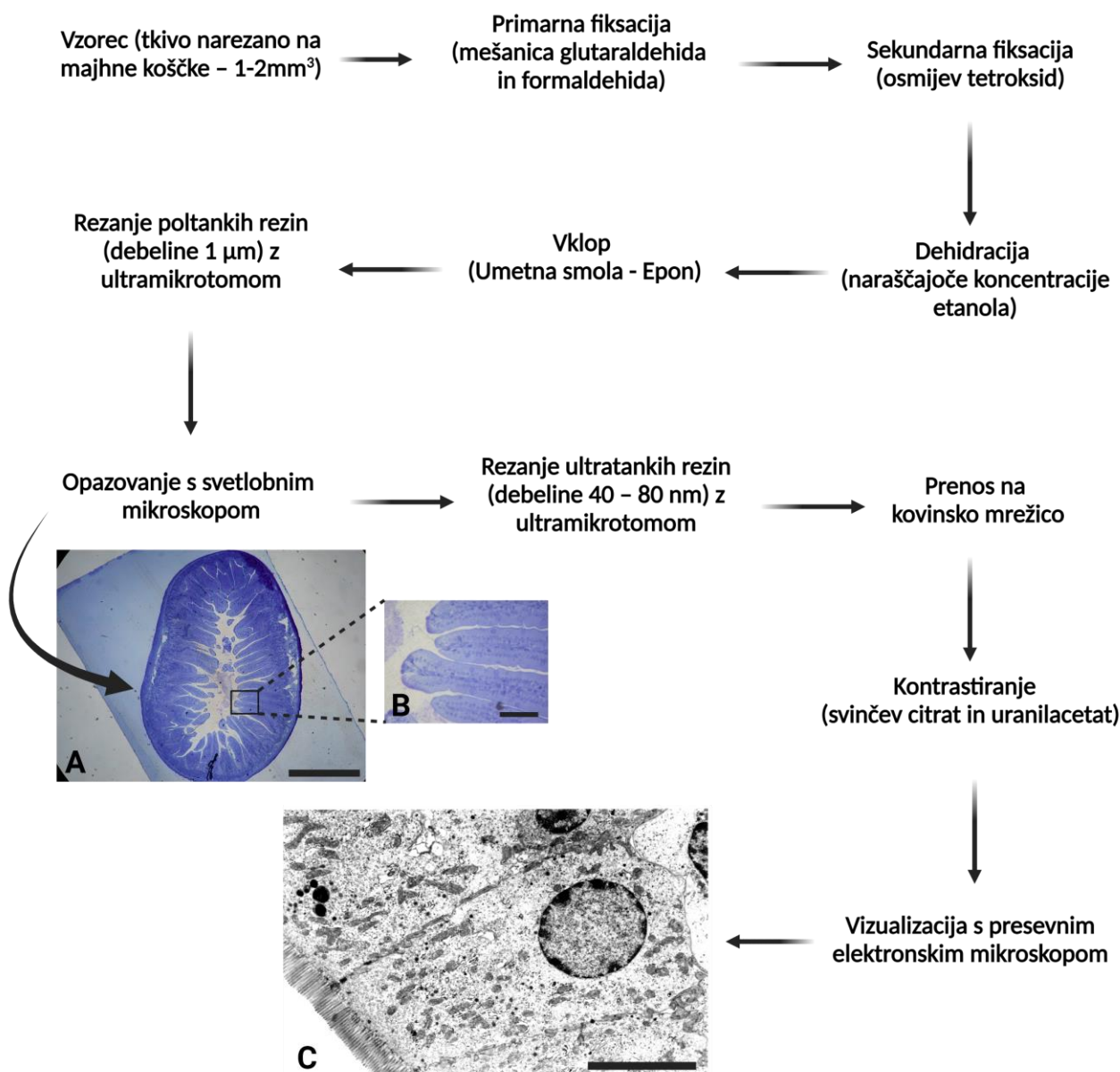


Slika 22: Poltanka eponska rezina pobarvana s toluidinskim modrilom. Prečni prerez stene sečnega mehurja (S – svetlina sečnega mehurja, U – urotelij – epitelij sečnega mehurja, VT – vezivno tkivo, MT – mišično tkivo). Merilo: 20 µm.

V presevni elektronski mikroskopiji se lahko namesto prepajanja z umetno smolo uporablja izredno hitro zamrzovanje in priprava **krioultratankih rezin**, ki jih režemo v krioultramikrotomu v zamrznjenem stanju. Priprava krioultratankih rezin je izjemno zahtevna.

Povzetek glavnih korakov priprave preparatov za presevno elektronsko mikroskopijo je predstavljen na sliki 23.

Glavni koraki priprave preparatov za presevno elektronsko mikroskopijo



Slika 23: Shematski prikaz glavnih korakov priprave preparatov za presevno elektronsko mikroskopijo. A) Poltanka eponska rezina tankega črevesja pobarvana s toluidinskim modrilom. B) Področje iz katerega bo narejena piramida za rezanje ultratankih rezin. C) Mikrografija epitelijske celice.

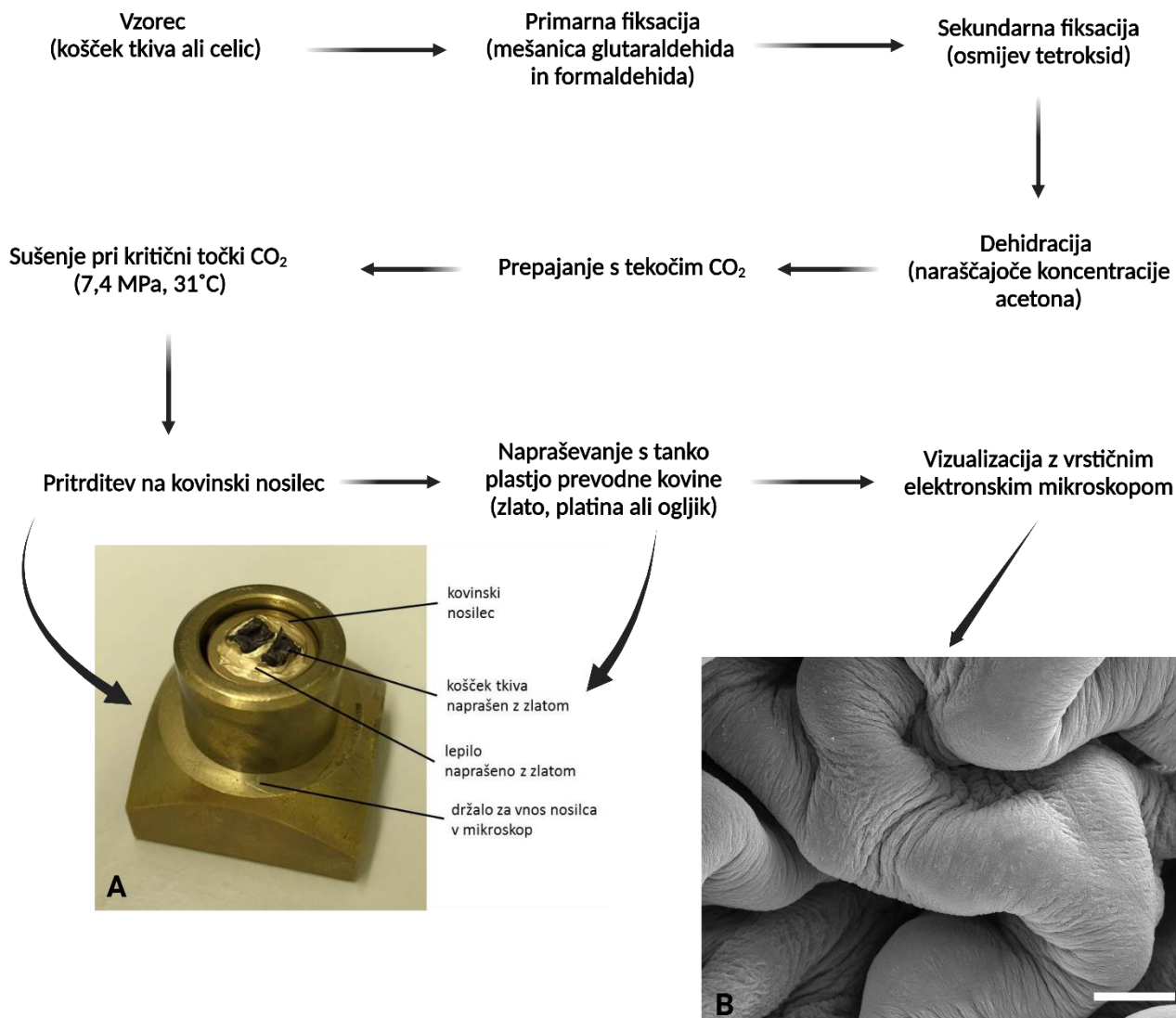
tankega črevesja posneta s presevnim elektronskih mikroskopom. Merilo A) 500 μm ; B) 50 μm C) 10 μm .

2.1.2.2 Priprava preparatov za vrstični elektronski mikroskop

Za preučevanje površine preparatov z vrstičnim elektronskim mikroskopom morajo biti biološki vzorci **dobro fiksirani** (da je površina dobro ohranjena in da jih elektronski žarek ne uniči), **suhi** (da nanje ne vpliva vakuum) in **prevodni** (da ne pride do kopičenja elektronov in posledično do pojava artefaktov). Pri vrstični elektronski mikroskopiji **debelina preparata ni pomembna**, košček tkiva mora biti le dovolj majhen, da ga lahko nalepimo na nosilec in vnesemo v mikroskop.

Postopek priprave preparatov vključuje več ključnih korakov: **fiksacija, dehidracija, sušenje, pritrditev vzorca na nosilec in napraševanje**. Tako kot pri pripravi preparatov za presevno elektronsko mikroskopijo se začne priprava za vrstični elektronski mikroskop s **primarno kemijsko fiksacijo** majhnih koščkov tkiva ($1 - 5 \text{ mm}^3$) ali celic z mešanico formaldehida in glutaraldehida. Po spiranju primarnega fiksativa sledi **postfiksacija z osmijevim tetroksidom (OsO_4)** ter postopna dehidracija v naraščajočih koncentracij acetona. Nato sledi sušenje preparata, pri katerem je pomembno, da preprečimo poškodbe površin, ki bi lahko nastale pri izparevanju vode. Zato vzorec prepojimo s tekočim CO_2 in ga posušimo pri kritični točki (angl. critical point) CO_2 , kjer izgine meja med tekočino in plinom ter ni površinske napetosti. Tako posušen vzorec pritrdimo na kovinski nosilec in ga v napravi za napraševanje enakomerno prekrijemo s tanko plastjo zlata, platine ali ogljika (slika 24). Na ta način zagotovimo prevodnost za elektrone in dodatno povečamo signal. Kontrastiranje vzorcev za SEM ni potrebno, saj je nastanek slike odvisen od oblike površine (topografije, reliefa) preparata.

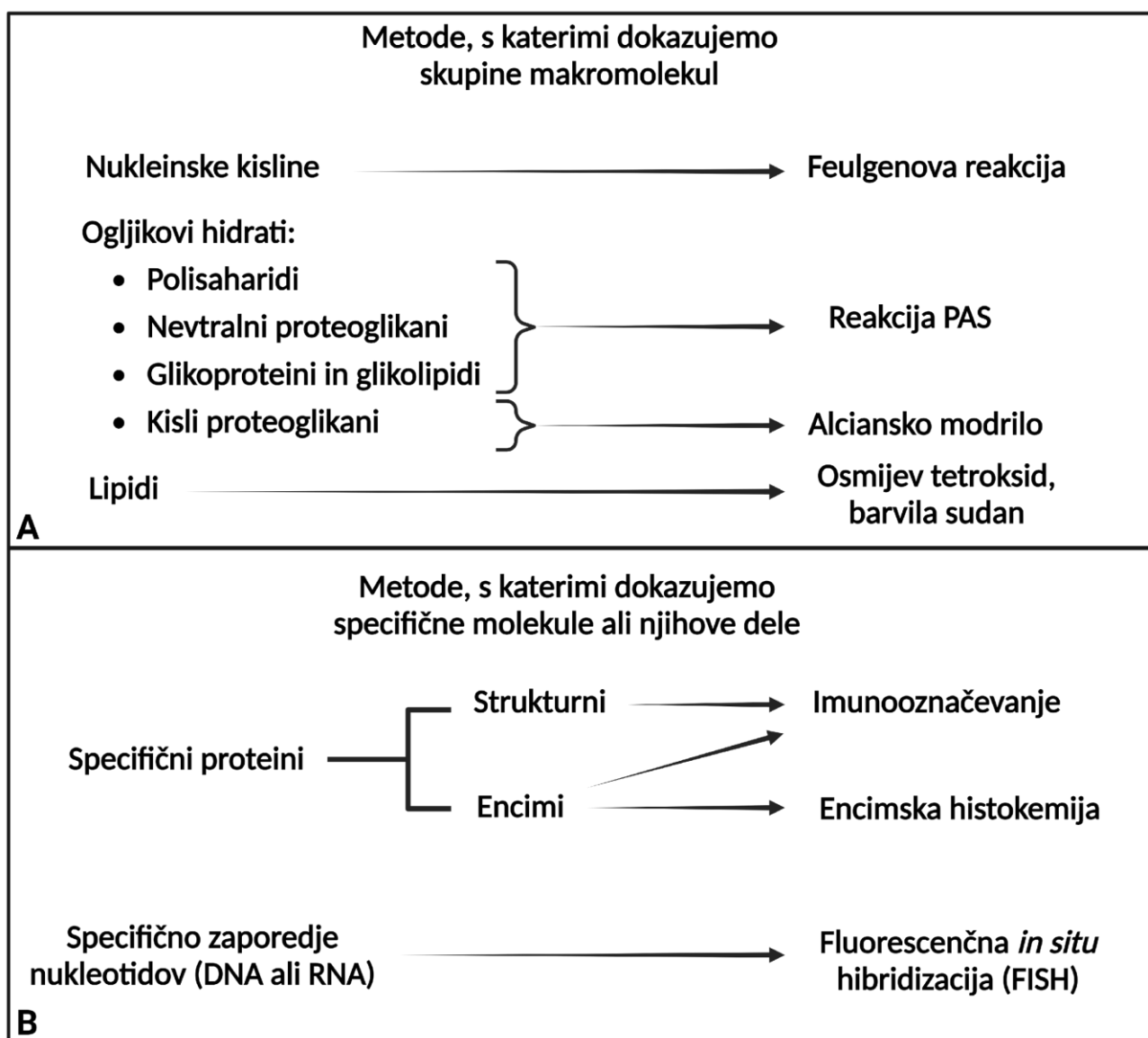
Shematski prikaz priprave preparatov za vrstično elektronsko mikroskopijo



Slika 24: A) Posušen in z zlatom naprašen košček tkiva je prilepljen na kovinski nosilec, ki je vpet v držalo za vnos v vrstični elektronski mikroskop. B) Mikrografija stene sečnega mehurja posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Merilo: 50 μm .

2.2 VAJA: HISTOKEMIJSKE METODE

Histokemijske metode so ključnega pomena tako v raziskovanju kot tudi v diagnostiki, saj se uporabljajo za **ugotavljanje prisotnosti in lokacije** določenih **specifičnih kemijskih sestavin** (na primer ogljikovih hidratov, proteinov, lipidov, nukleinskih kislin) v celicah in v medceličnini. Histokemijske metode vključujejo uporabo **reagentov**, ki selektivno reagirajo s ciljnim kemijskimi sestavinami, ki jih želimo preučiti. Te molekule so lahko prosto prisotne v notranjosti ali zunanosti celic, ali pa nastanejo po specifični kemijski reakciji (na primer po hidrolizi DNA). **Končni reakcijski produkt**, ki je rezultat histokemijske reakcije, mora biti **stabilen, netopen in obarvan** (pri svetlobni mikroskopiji) ali **elektronsko gost** (pri presevani elektronski mikroskopiji) ter ne sme spreminjati svojega položaja v celici. S histokemijskimi metodami lahko dokazujemo bodisi skupine makromolekul (slika 25A), bodisi specifične molekule ali njihove dele (slika 25B).



Slika 25: Histokemijske metode, s katerimi dokazujemo makromolekule (A) oziroma specifične molekule ali njihove dele (B).

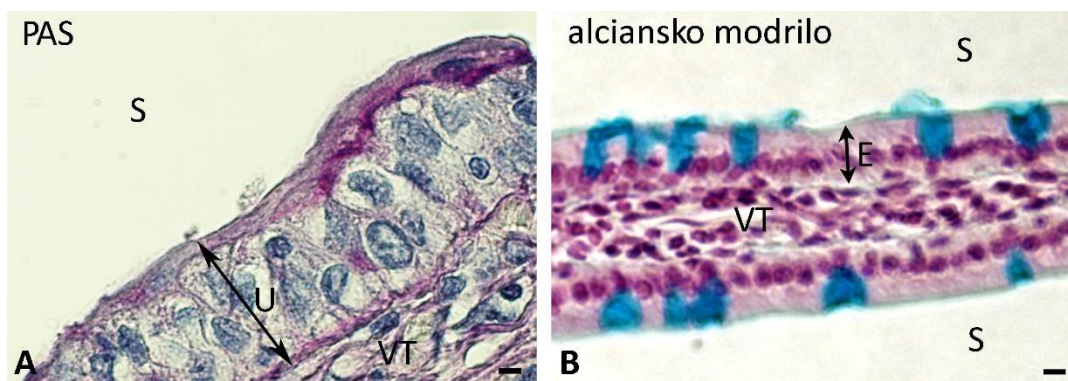
V nadaljevanju bomo podrobneje opisali le nekatere izmed naštetih histokemijskih metod, ki se pogosto uporabljajo tako v znanstveno raziskovalnem delu kot tudi v diagnostiki.

2.2.1 REAKCIJA PAS

Reakcija PAS (angl. Periodic Acid Schiff) je histokemijska metoda za dokazovanje enostavnih polisaharidov (glikogen, škrob, celuloza) in nevtralnih proteoglikanov. Naredimo jo na parafinskih rezinah v dveh stopnjah. V prvi stopnji inkubiramo rezino v raztopini **perjodove kisline**, kar povzroči oksidativno cepitev vezi med ogljikovima atomoma v molekuli sladkorja ali aminosladkorja ter nastanek prostih aldehydskih skupin. V drugi stopnji izperemo perjodovo kislino ter na rezino dodamo **Schiffov reagent**, ki je brezbarven in reagira s prostimi aldehydnimi skupinami. Rezultat je nastanek rdeče-vijoličnega reakcijskega produkta na mestih v preparatu, kjer se nahajajo nevtralni proteoglikani in enostavni polisaharidi (slika 26A).

2.2.2 ALCIANSKO MODRILLO

Barvanje z **alcianskim modrilom** (kationsko barvilo) je histokemijska metoda, ki se uporablja za dokazovanje prisotnosti kislih proteoglikanov. To so molekule s številnimi negativno nabitimi skupinami (na primer hialuronsko kislino in keratan sulfatom), na katere se veže pozitivno nabito alciansko modrilo. Izvedemo jo tako, da parafinsko rezino inkubiramo v raztopini alcianskega modrila, pri čemer nastane intenzivno moder reakcijski produkt, na mestih v preparatu, ki vsebujejo kisle proteoglikane (Slika 26B).



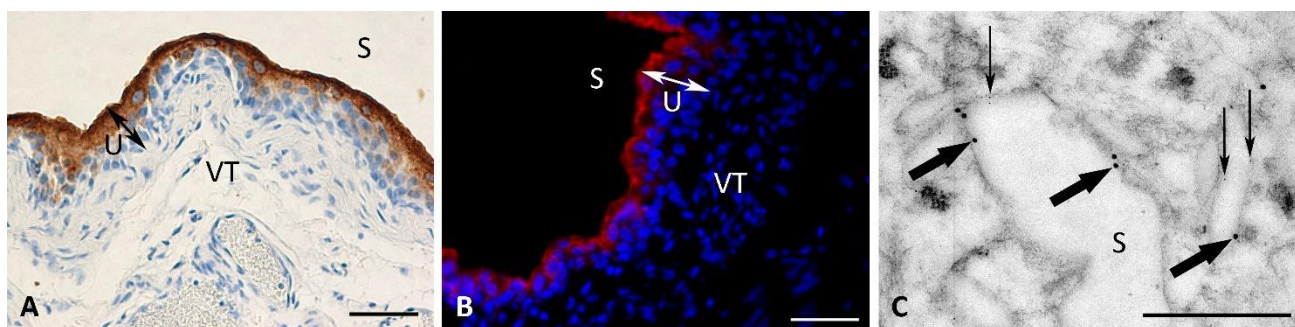
Slika 26: Dokazovanje ogljikovih hidratov z (A) reakcijo PAS (rdeče-vijolično) v uroteliju sečnega mehurja in z (B) alcianskim modrilom (modro) v črevesnem epiteliju. S – svetlina sečnega mehurja oz. črevesa, U – urotelij, VT – vezivno tkivo, E – črevesni epitelij. Merilo: 10 µm.

2.2.3 IMUNOOZNAČEVANJE

Imunooznačevanje vključuje različne histokemijske metode (imunofluorescenca, imunohistokemija, imunocitokemija) s katerimi dokazujemo prisotnost in lokacijo proteinov v celicah in v zunajceličnem prostoru. Temelji na uporabi **protiteles** oziroma molekul, ki so sposobne prepoznati in se specifično vezati na dele proteina (epitope) v preparatu, ki delujejo kot antigeni za protitelesa. Za izvedbo metode imunooznačevanja uporabljamo **monoklonska in poliklonska protitelesa**, ki se razlikujejo v načinu pridobivanja. Poliklonska protitelesa nastanejo po imunizaciji laboratorijskih živali (na primer kuncev)

z antigenom (na primer človeškim kolagenom) kar aktivira številne klonse limfocitov B, ki začnejo proizvajati različna protitelesa, usmerjena proti različnim epitopom na antigenu. Monoklonska protitelesa pridobivamo v celičnih kulturah s pomočjo enega klona celic hibridoma (celica, ki je nastala z zlitjem normalnega limfocita B in rakave mielomske celice). Za razliko od poliklonskih protiteles so monoklonska protitelesa specifična za en sam epitop nekega antigena.

Imunooznačevanje lahko izvedemo na parafinskih (slika 27A), zamrznjenih (slika 27B) ali ultratankih rezinah (slika 27C) z direktno ali indirektno metodo. Pri izvedbi **direktne metode** rezine inkubiramo v raztopini označenih protiteles, specifičnih za preučevani antigen. Nastane kompleks protitelo-antigen, ki ga lahko vizualiziramo z mikroskopom. Kljub enostavni in hitri izvedbi se v današnjem času ta pristop redko uporablja zaradi nizke občutljivosti v primerjavi z indirektno metodo. Pri izvedbi **indirektne metode** uporabljamo dve vrsti protiteles: **primarna in sekundarna protitelesa**. V prvi stopnji inkubiramo rezine v raztopini neoznačenih primarnih protiteles (lahko so monoklonska ali poliklonska), ki specifično prepoznajo preučevani antigen. Po spiranju primarnih protiteles, rezine inkubiramo v raztopini sekundarnih poliklonskih protiteles, ki so označena in izdelano proti primernim protitelesom ter se zato vežejo na neoznačena primarna protitelesa. Ta metoda ima visoko občutljivost, saj več sekundarnih protiteles lahko prepozna eno molekulo primarnega protitelesa in tako dobimo več molekul označevalca na mestu, kamor se je vezalo eno primarno protitelo. Zato je signal na mesta v preparatu z iskanimi antigeni močnejši.



Slika 27: Imunooznačevanje uroplakinov, ki so proteini, specifični za površinske celice urotelija sečnega mehurja. A) Rjava obarvanje v površinskih urotelijskih celicah, kjer so prisotni uroplakini (imunohistokemija). B) Rdeča fluorescenca v površinskih urotelijskih celicah, kjer so prisotni uroplakini (imunofluorescenca). C) S 5 nm koloidnim zlatom (tanke puščice) so označeni uroplakini III in s 25 nm koloidnim zlatom (debele puščice) so označeni uroplakini Ia v apikalni plazmalemi površinskih urotelijskih celic in v membrani vezikla površinske urotelijske celice (imunoelektronska mikroskopija). S – svetlina sečnega mehurja, U – urotelij, VT – vezivno tkivo. Merilo: A, B) 50 µm; C) 500 nm.

Protitelesa, ki jih uporabljamo pri izvedbi imunooznačevanja omogočajo vizualizacijo tarčnih antigenov s pomočjo različnih označevalcev. Izbira označevalca je odvisna od **vrste vzorca**, **strukture proteina**, ki nas zanima, **mesta**, kjer se ta protein nahaja, in **načina vizualizacije** ter **vrste mikroskopa**, ki ga bomo uporabili. Najpogosteje uporabljeni označevalci protiteles so navedeni v tabeli 3.

Tabela 3: Označevalci protiteles in načini vizualizacije, s pomočjo katerih jih lahko opazujemo.

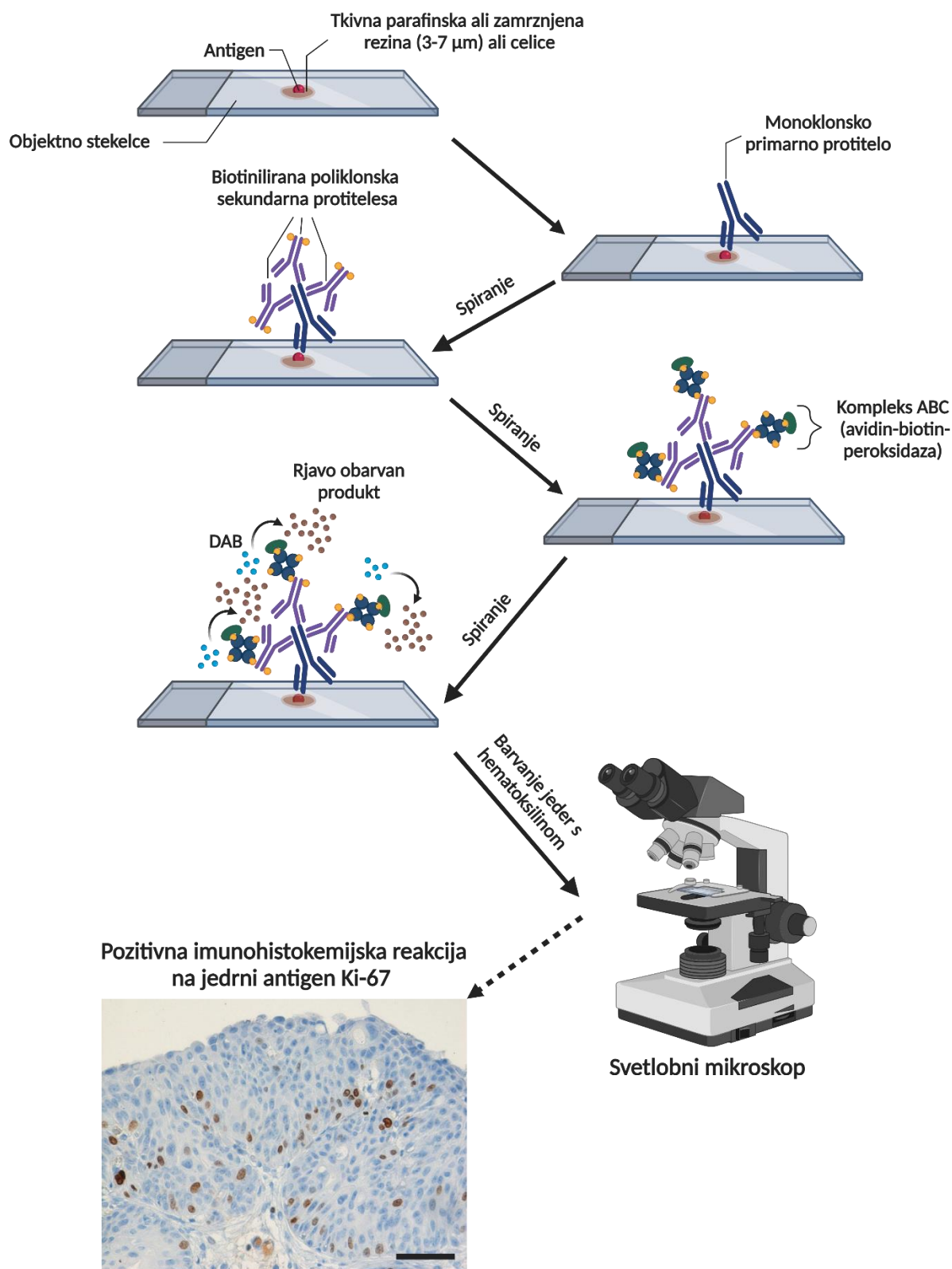
Označevalec	Metoda vizualizacije	Mikroskop
Biotin	Imunohistokemija - metoda ABC (avidin – biotin -peroksidaza)	Klasični svetlobni mikroskop
Fluorescenčna barvila (na primer FITC)	Imunofluorescenca	Fluorescenčni mikroskop
Encim (na primer peroksidaza)	Encimska histokemija	Klasični svetlobni mikroskop
Koloidno zlato	Imunoelektronska mikroskopija	Elektronski mikroskop

Imunohistokemija in **imunofluorescenca** sta najpogostejše uporabljani metodi imunooznačevanja, ki omogočata preučevanje prisotnosti in lokacije tarčnih proteinov. Obe metodi vključujeta uporabo protiteles za prepoznavanje antigenov v vzorcu, vendar se razlikujeta v vrsti označevalcev in vrsti signala ter načinu detekcije.

2.2.3.1 Metoda ABC (avidin-biotin-peroksidaza)

Metoda ABC (angl. avidin-biotin complex) je tehnika imunohistokemije, ki temelji na močni vezavni afiniteti med avidinom in biotinom. Naredimo jo na parafinskih ali zamrznjenih rezinah ali na celičnih kulturah. Na začetku reakcije vzorce inkubiramo z neoznačenimi primarnimi protitelesi, ki specifično prepoznajo tarčno molekulo. Po izpiranju dodamo raztopino z biotinom označenih sekundarnih protiteles, ki se vežejo na primarna protitelesa. V naslednjem koraku dodamo avidin z vezano peroksidazo, pri čemer na mestu tarčnega antigena nastane kompleks biotin-avidin-peroksidaza. Barvno reakcijo razvijemo tako, da dodamo substrat diaminobenzidin (DAB), pri čemer pride do njegove oksidacije in nastanka rjavo obarvanega produkta. Nato podobno kot pri klasičnem histološkem barvanju jedra celic obarvamo s hematoksilinom, rezine vklopimo v smolo ter pokrijemo s krovnikom in preparate opazujemo s klasičnim svetlobnim mikroskopom. Na sliki 28 so predstavljeni glavni koraki imunohistokemijske reakcije.

IMUNOHISTOKEMIJA

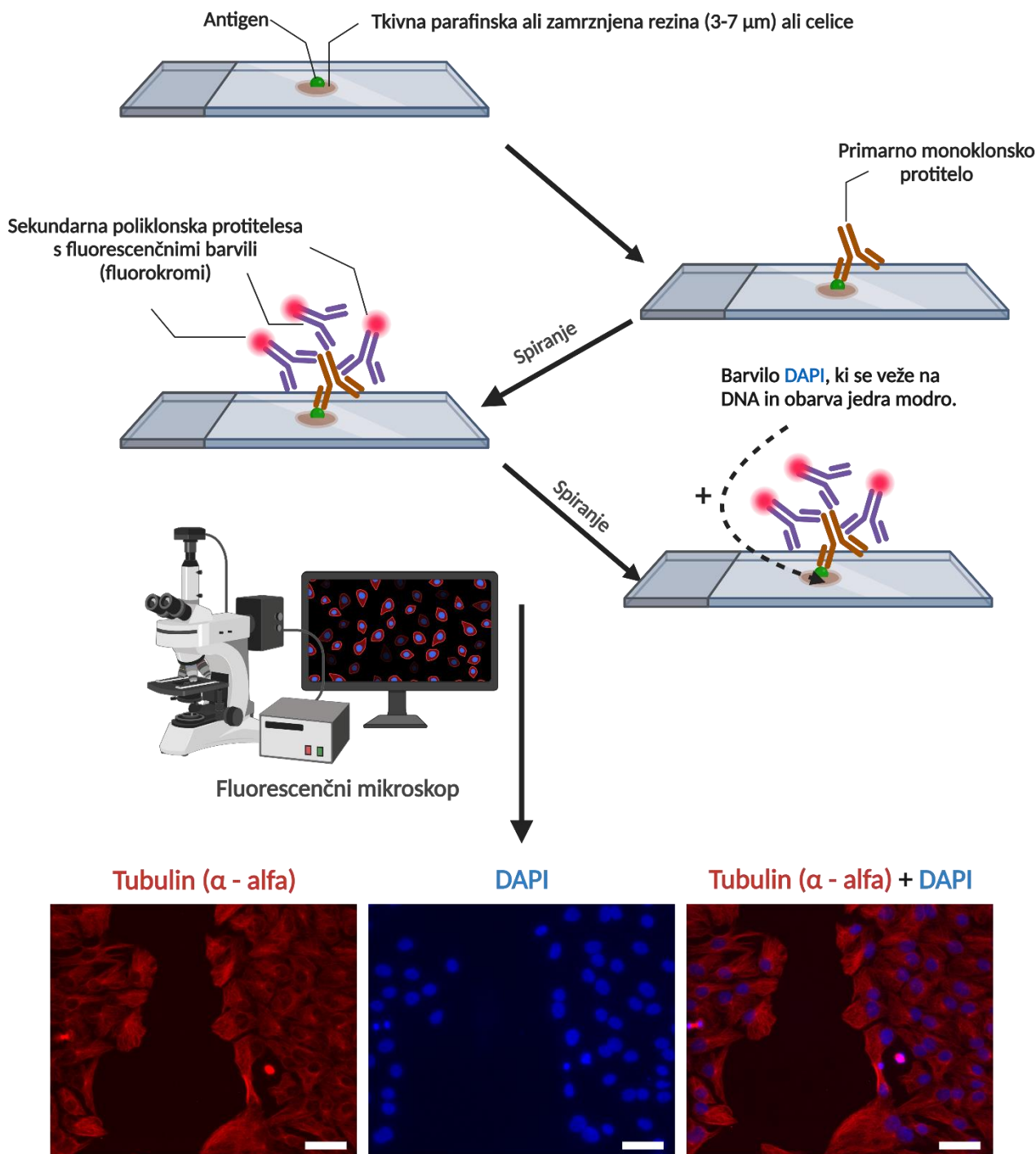


Slika 28: Shematski prikaz glavnih korakov imunohistokemijske reakcije (metoda ABC). Merilo: 50 μm .

2.2.3.2 Imunofluorescenca

Imunofluorescenca je tehnika imunooznačevanja, ki temelji na interakciji med specifičnimi protitelesi, ki so označena s fluorescenčnimi barvili (fluorokromi), in preučevanimi antigeni v vzorcu. Naredimo jo na parafinskih ali zamrznjenih rezinah ali na celičnih kulturah. Na začetku reakcije vzorce inkubiramo v raztopini neoznačenih primarnih protiteles, ki se specifično vežejo na preučevani protein. Po spiranju nevezanih primarnih protiteles vzorce inkubiramo v raztopini sekundarnih poliklonskih protiteles označenimi s fluorescenčnimi barvili (na primer rdeče barvilo TRITC, zeleno barvilo FITC). Na koncu reakcije dodamo barvilo DAPI, ki se veže na molekule DNA in zato jedra v fluorescenčnem mikroskopu fluorescirajo modro. Da bi čim dlje časa ohranili fluorescenco, ki jo fluorokromi oddajajo, vzorce zalijemo s posebnim hidrofilnim vklopnim sredstvom, ki zavira bledenje (na primer Vectashield), ter pokrijemo s krovnikom. Nato preparate opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom. Na sliki 29 so predstavljeni glavni koraki imunofluorescence.

IMUNOFLUORESCENCA

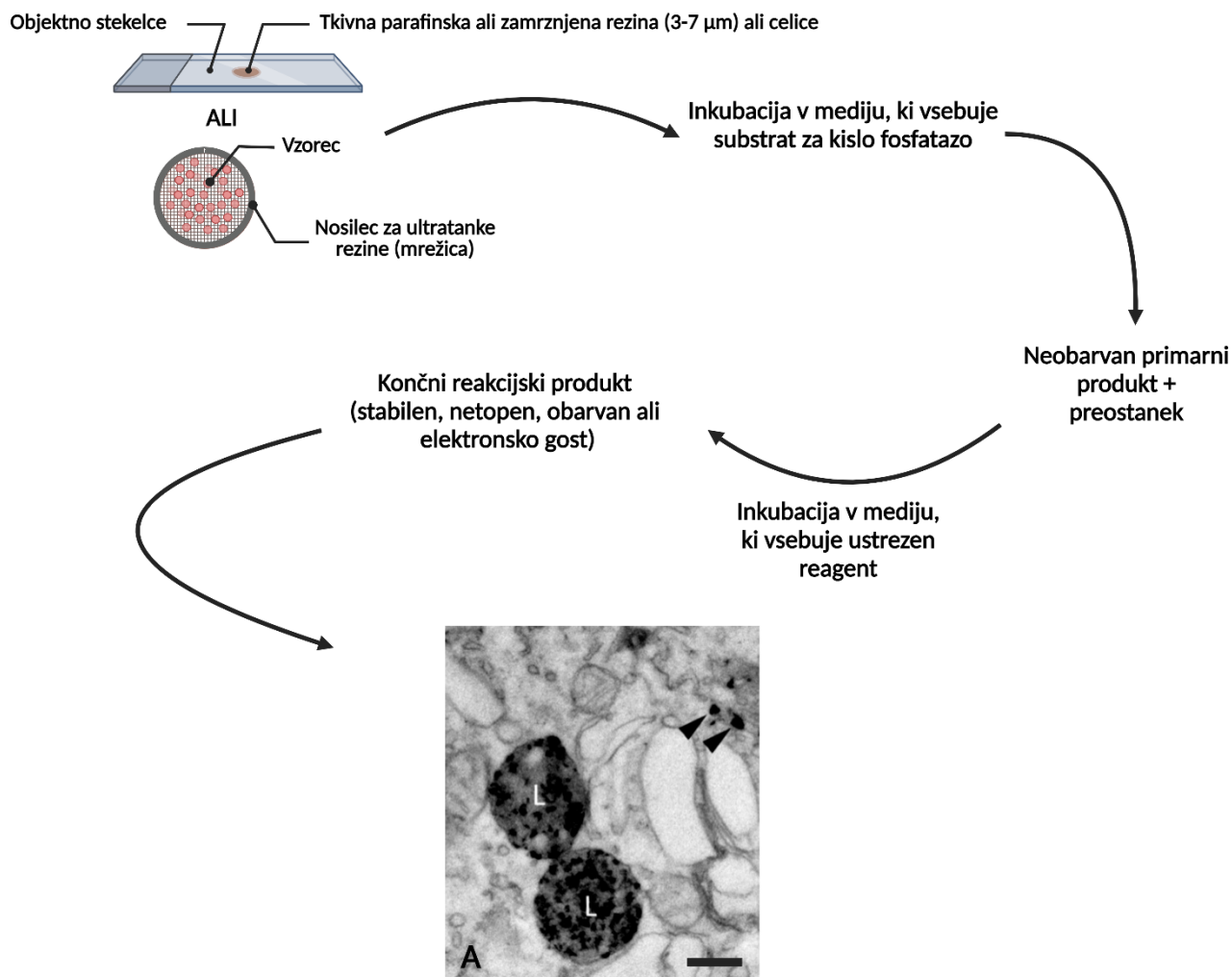


Slika 29: Shematski prikaz glavnih korakov imunooznačevanje s fluorescenčnimi barvili (imunofluorescenca). Merila 50 μm .

2.2.4 ENCIMSKA HISTOKEMIJA

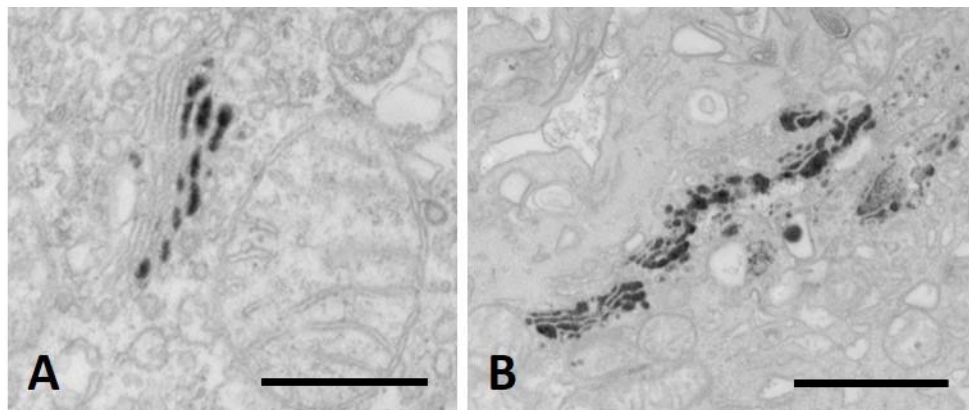
Encimska histokemija je histokemijska metoda za dokazovanje prisotnosti in aktivnosti encima, ki nas zanima. Temelji na uporabi **specifičnega substrata**, ki reagira s tarčnim encimom. Izvedemo jo lahko na parafinskih, zamrznjenih ali ultratankih rezinah ali na celičnih kulturah, vendar moramo pri pripravi paziti, da ostane iskani encim aktiven. Prvi korak je inkubacija vzorcev s specifičnim substratom. Preučevani encim v vzorcu razgradi substrat pri čemer nastane neobarvan primarni reakcijski produkt in preostanek. Nato sledi inkubacija s specifičnim reagentom, ki je izbran tako, da reagira s primarnim reakcijskim produktom. Pri tej reakciji nastane **stabilen, netopen, končni reakcijski produkt**, ki mora biti **obarvan** v primeru svetlobne mikroskopije ali **elektronsko gost** v primeru presevne elektronske mikroskopije (slika 30). Za lažjo orientacijo v preparatu obarvamo jedra (svetlobna mikroskopija) oziroma preparate kontrastiramo (presevna elektronska mikroskopija).

ENCIMSKA HISTOKEMIJA (Dokazovanje aktivnosti kisle fosfataze)



Slika 30: Shematski prikaz encimske histokemije za dokazovanje aktivnosti kisle fosfataze. A) Lizosomi (L) in transportni vezikli iz trans-Golgijevega mrežja (glavi puščic) označeni z encimsko histokemijsko reakcijo na kisko fosfatazo. Merilo: 250 nm.

Encimska histokemija je dokaj enostavna, hitra in poceni metoda, ki se uporablja v raziskovalnem delu in v diagnostiki. Z encimsko histokemijo lahko dokazujemo aktivnost in prisotnost specifičnih encimov, ki so značilni za določen organel. Te encime imenujemo markerski encimi in so lahko pomembni pri diagnozi, spremljanju napredovanja bolezni ali oceni učinkovitosti zdravljenja. Encimsko histokemijo lahko uporabljamo za dokazovanje markerskih encimov **mitohondrijev** (npr. sukcinat dehidrogenaza, citokrom oksidaza), **peroksisomov** (npr. katalaza, peroksidaza, slika 38), **lizosomov** (npr. kislota fosfataza, slika 30A) in **delov Golgijevega aparata** (npr. za trans Golgijeve cisterne encim tiamino pirofosfataza, slika 31A, za medialne Golgijeve cisterne encim nikotinamid adenin dinukleotidfosfataza, slika 31B, za trans Golgijevo mrežje encim kislota fosfataza).



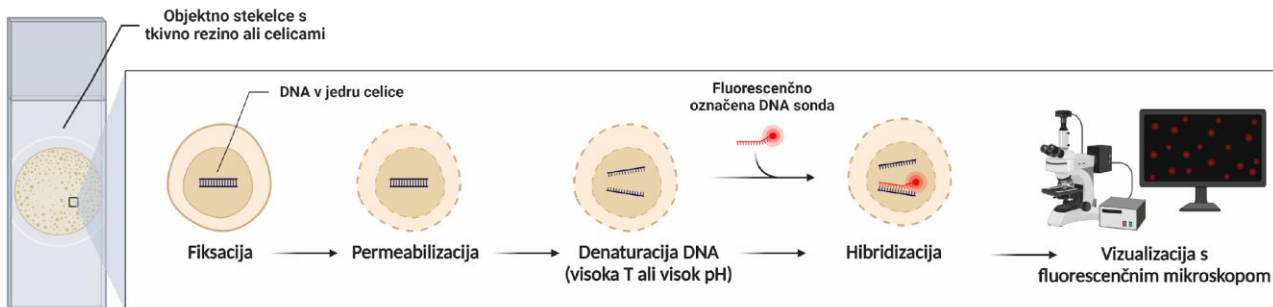
Slika 31: Golgijev aparat označen z encimsko histokemijo. A) Aktiven encim tiamino pirofosfataza (TPP-aza) v trans Golgijevih cisternah označen z elektronsko gostim končnim reakcijskim produktom. B) Aktiven encim nikotinamid adenin dinukleotidfosfataza (NADP-aza) v medialnih Golgijevih cisternah označen z elektronsko gostim končnim reakcijskim produktom. Merilo: 500 nm.

2.2.5 FLUORESCENČNA IN SITU HIBRIDIZACIJA (FISH)

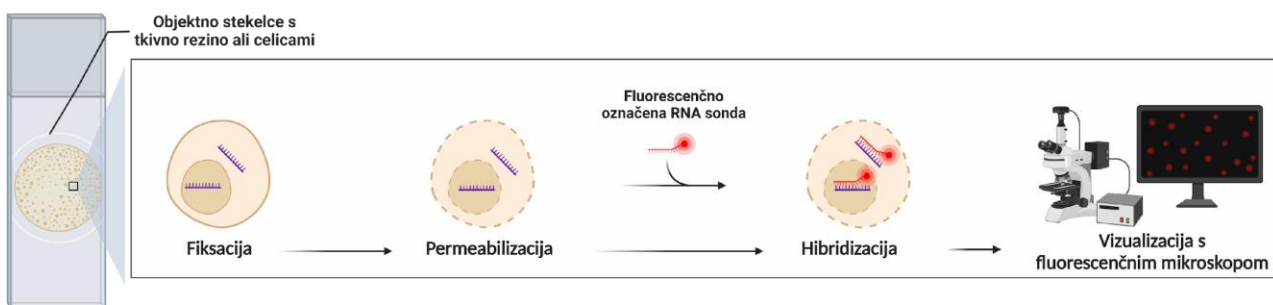
Fluorescenčna in situ hibridizacija (FISH) je histokemijska metoda, ki omogoča dokazovanje **specifičnih zaporedij nukleinskih kislin (DNA in RNA)**. Temelji na interakciji med znanimi nukleotidnimi zaporedji, ki nas zanimajo v preučevanih vzorcih, in komplementarnim zaporedjem nukleotidom, ki sestavlja **fluorescenčno označeno sondo**. Naredimo jo na parafinskih ali zamrznjenih rezinah ali na celičnih kulturah. Na začetku postopka vzorce fiksiramo in celice permeabiliziramo. V primeru dokazovanja specifičnih zaporedij DNA, vzorce inkubiramo pri visoki temperaturi ali visokem pH, kar povzroči prekinitev vodikovih vezi in razpad dvojne vijačnice DNA na dve verigi (denaturacija). V kolikor nas zanimajo zaporedja mRNA denaturacija ni potrebna, saj je molekula mRNA enoverižna. Sledi inkubacija vzorcev z raztopino fluorescenčno označenih sond DNA ali RNA. Sonde so polinukleotidne verige z znanim zaporedjem, ki so komplementarne nukleotidnemu zaporedju, ki ga preučujemo. Če so v celicah prisotna iskana nukleotidna zaporedja, pride do **hibridizacije** med fluorescenčno označeno sondo in celičnimi nukleinskimi kislinami, kar lahko vizualiziramo s fluorescenčnim mikroskopom. Na sliki 32 je predstavljen shematski prikaz protokola za dokazovanje specifičnih zaporedij DNA in RNA.

FLUORESCENČNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA (FISH)

A) Protokol za dokazovanje specifičnih zaporedij DNA (npr. gena, mutacije, virusnega genoma)



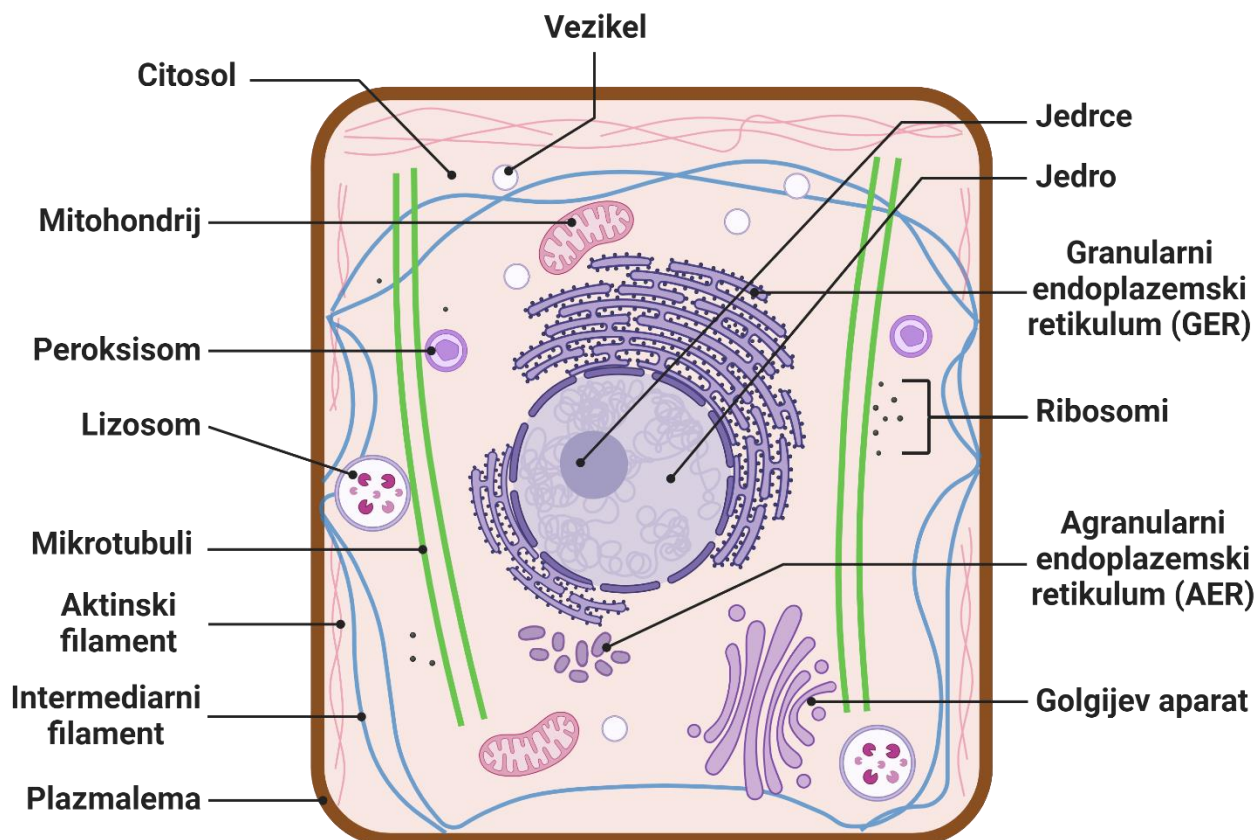
B) Protokol za dokazovanje specifičnih zaporedij mRNA (ugotavljanje aktivnosti genov)



Slika 32: Shematski prikaz poteka fluorescenčne in situ hibridizacije (FISH) za dokazovanje specifičnih zaporedij nukleinskih kislin.

2.3 VAJA: BIOLOŠKE MEMBRANE IN CELIČNI ORGANELI

Celice so osnovne strukturne in funkcionalne enote vseh živih organizmov. Vse evkariontske celice so obdane s plazmalemo ter vsebujejo številne z membrano obdane predelke. Na sliki 33 je predstavljena osnovna struktura evkariontske celice.



Slika 33: Shematski prikaz osnovne zgradbe evkariontske celice.

2.3.1 BIOLOŠKE MEMBRANE

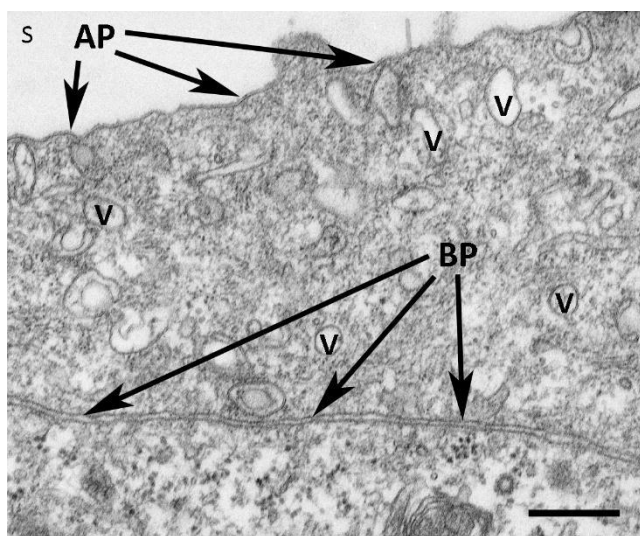
Biološke membrane so pomembne strukture celic, ki tvorijo mejo med zunanostjo in notranostjo celic (**plazmalema**) in ločujejo celične organele in predelke (**endomembranski sistem**) od citosola. Sestavljene so iz membranskih lipidov, proteinov in ogljikovih hidratov. **Membranski lipidi (predvsem fosfolipidi, glikolipidi in holesterol)** predstavljajo približno polovico mase vseh celičnih membran in so organizirani v lipidni dvosloj. Lipidni dvosloj tvori osnovno zaščitno pregrado, ki ločuje notranost celice od okolice. V lipidni dvosloj so vgrajeni membranski proteini, ki sodelujejo pri nadzorovanem transportu molekul in ionov skozi membrano v in iz celice ter v celičnem signaliziranju. Ogljikovi hidrati so prisotni v bioloških membranah, vendar so razmeroma redki in so vezani na lipide (glikolipidi) ali proteine (glikoproteini). Prispevajo predvsem k celični komunikaciji, zaščiti celic in interakcijam celic med seboj in z zunajceličnim okoljem.

Plazmalema, znana tudi kot plazemska membrana (angl. plasma membrane), predstavlja mejo med zunanostjo in notranostjo celic pri vseh živih organizmih. Gre za tanko (5-10 nm) in selektivno prepustno strukturo. Plazmalema je bistvena za preživetje in normalno delovanje celic, saj **omogoča**

nadzorovano prehajanje snovi v in iz celice. Poleg tega omogoča celici **komunikacijo** z okolico in z drugimi celicami ter **prenašanje signalov** iz zunajceličnega prostora v citoplazmo.

V **epitelijskih celicah** ločimo dve funkcionalno različni domeni plazmaleme: apikalna in bazolateralna plazmalema. **Apikalna plazmalema** je del plazmaleme, ki meji na zunanost organizma ali na svetline organov znotraj organizma (slika 34). **Bazolateralna plazmalema** je del plazmaleme, ki je v stiku s sosednjimi celicami (slika 34) in/ali s tanko mrežno strukturo molekul medceličnine imenovano bazalna lamina.

Biološke membrane in molekule iz katerih so zgrajene lahko proučujemo s klasičnim svetlobnim mikroskopom (na primer barvanje z osmijevim tetroksidom), fluorescenčnim in konfokalnim mikroskopom (na primer z imunofluorescenco) ali s presevnim in vrstičnim elektronskim mikroskopom.



Slika 34: Vezikli (V) v citoplazmi epitelijske celice. Apikalna plazmalema (AP) meji na svetlino organa. Bazolateralna plazmalema (BP) meji na sosednjo epitelijsko celico. S – svetlina. Merilo: 200 nm.

2.3.2 CELIČNI ORGANELI

Organeli so specializirane strukture znotraj celic, ki opravljajo specifične naloge. Razdelimo jih v dve skupini:

- **Z membrano obdani organeli:** jedro, endoplazemski retikulum, Golgijev aparat, mitohondriji, peroksisomi, lizosomi, endosomi, transportni vezikli, sekrejski vezikli itd.
- **Organeli brez membrane:** ribosomi, proteasomi, inflammasomi itd.

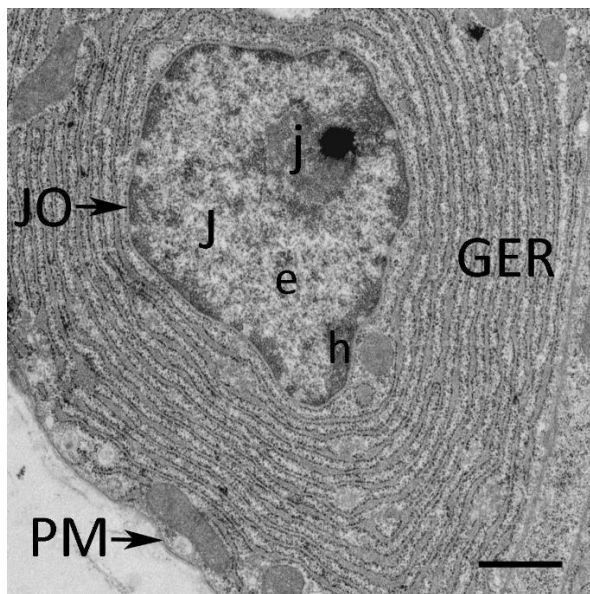
2.3.2.1 Jedro

Jedro je največji celični organel, ki vsebuje dedni genetski material v obliki kromatina (dolge linearne molekule DNA navite okoli histonskih in nehistonskih proteinov). V jedru potekajo številni ključni celični procesi, in sicer **podvajanje DNA** (replikacija), **prepisovanje DNA v informacijsko RNA** (mRNA, transkripcija), **sinteza ribosomske RNA (rRNA)** in **nastajanje ribosomskih podenot** ter **posttranskripcijske modifikacije mRNA**.

Jedrna ovojnica ločuje jedro od citoplazme. Sestavljena je iz **notranje** in **zunanje jedrne membrane, medmembranskega prostora** in **jedrnih por**. Na zunanjo jedrno membrano so pritrjeni ribosomi in na nekaterih mestih se ta nadaljuje v membrano zrnatega endoplazemskega retikuluma. Pod notranjo jedrno membrano leži mreža intermediarnih filamentov laminov imenovana **jedrna lamina**. Ta zagotavlja mehansko oporo jedru in nanjo se pripenja kromatin. **Jedrne pore** so veliki proteinski kompleksi s premerom 50-80 nm, kjer se notranja in zunanja jedrna membrana stikata. Skozi jedrne pore poteka transport snovi med citosolom in jedrom v obe smeri.

Kromatin je lahko v obliki **heterokromatina** in **evkromatina**. Heterokromatin je bolj kondenziran in zgoščen kromatin na obrobju jedra pod jedrno lamino, kjer ne poteka prepisovanje DNA v mRNA. Evkromatin je manj zgoščena oblika kromatina, kjer poteka prepisovanje genov (slika 35). **Jedrca (nukleoli)** so mesta, kjer se prepisujejo molekule rRNA ter poteka sinteza ribosomskih podenot.

Barvanje s hematoksilinom omogoča vizualizacijo jeder s klasičnim svetlobnim mikroskopom. Poleg tega lahko opazujemo genetski material celice, ki je v mitotični obliki spiraliziranih kromosomov. S fluorescenčnim mikroskopom lahko preučujemo tudi jedra obarvana z barvilom DAPI ali pa preučujemo specifična zaporedja nukleotidov z metodo FISH ter posamezne jedrne proteine z imunooznačevanjem. Zaradi specifične ultrastrukture jedra lahko prepoznamo in opazujemo tudi s presevnim elektronskim mikroskopom.



Slika 35: Jedro (J) je obdano z jedrno ovojnico (JO) in vsebuje evkromatin (e), heterokromatin (h) in jedrce (j). PM – plazmalema; GER – granularni endoplazemski retikulum. Merilo: 1 µm.

2.3.2.2 Endoplazemski retikulum

Endoplazemski retikulum je organel z razvejano strukturo iz medsebojno povezanih membranskih cevok in cistern. Strukturno in funkcionalno ločimo dve vrsti endoplazemskega retikuluma: **granularni (zrnati) endoplazemski retikulum (GER)** in **agranularni (gladki) endoplazemski retikulum (AER)**.

GER je zgrajen iz ploščatih cistern, ki imajo na citosolni strani vezane ribosome, zaradi česar je njegov videz zrnat (slika 35). Na ribosomih poteka sinteza rezidenčnih proteinov endoplazemskega

retikuluma ter proteinov za Golgijev aparat, peroksisome, lizosome, in plazmalemo. V GER poteka tudi sinteza sekrecijskih proteinov, ki se izločajo iz celice. Za razliko od GER, na površini AER ni vezanih ribosomov. V njem poteka sinteza maščobnih kislin, fosfolipidov in steroidnih hormonov ter razstrupljanje.

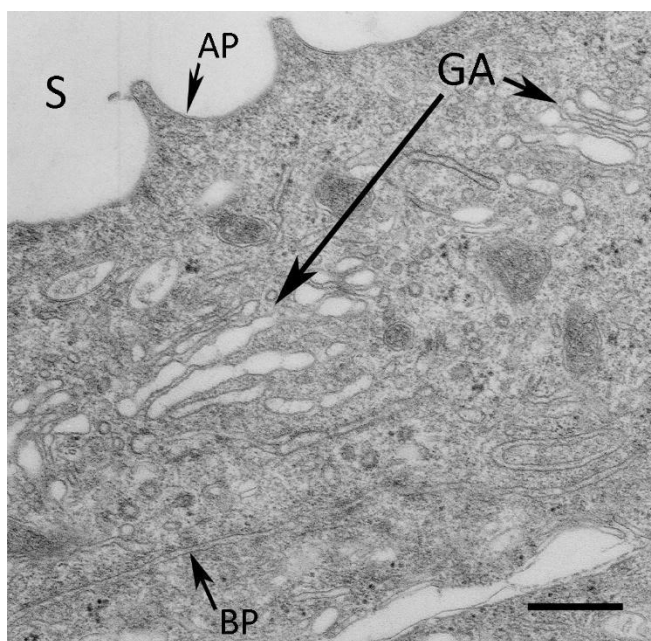
Endoplazemski retikulum lahko proučujemo s presevnim elektronskim mikroskopom (zaradi specifične ultrastrukture) in s histokemijskimi metodami, kot sta na primer imunooznačevanje in encimska histokemija.

2.3.2.3 Golgijev aparat

Golgijev aparat (GA) je strukturno in funkcionalno polariziran organel sestavljen iz petih predelkov: **cis Golgijevo mrežje**, **cis**, **medialna** in **trans cisterna (Golgijeva skladovnica)** in **trans Golgijevo mrežje** (slika 36).

Proteini po sintezi v endoplazemskem retikulumu vstopajo v cis Golgijevo mrežje s pomočjo vezikularnega transporta. V Golgijevi skladovnici poteka njihova dokončna **glikozilacija** in **fosforilacija** ter **sinteza glikolipidov** in **proteoglikanov**. Te reakcije katalizirajo različni encimi, ki so specifični za določeno cisterno. V trans Golgijevem mrežju poteka razporejanje končnih produktov in nastanek transportnih veziklov, ki jih prenašajo do mesta delovanja.

Golgijev aparat ima značilno ultrastukturo, ki jo lahko prepoznamo s presevnim elektronskim mikroskopom. Poleg tega ga lahko proučujemo tudi s fluorescenčnim mikroskopom po izpeljanem postopku imunooznačevanja rezidenčnih proteinov. S svetlobno in presevno elektronsko mikroskopijo lahko vizualiziramo tudi posamezne predelke z encimsko histokemijo za dokazovanje aktivnosti specifičnih encimov, ki so značilni za posamezen predelek (na primer NADP-aza – medialna cisterna, TPP-aza – trans cisterna, kislja fosfataza – trans Golgijevo mrežje).



Slika 36: Golgijev aparat (GA) je sestavljen iz skladovnic Golgijevih cistern in Golgijevega mrežja. BP – bazolateralna plazmalema; AP – apikalna plazmalema. Merilo: 200 nm.

2.3.2.4 Lizosomi

Lizosomi so z enojno membrano obdani organeli, ki so ključni za **razgradnjo** in **recikliranje** različnih molekul ter **odstranjevanje** odpadnih snovi. Z lizosomalnimi encimi se v različnih kompartmentih (na primer avtofagolizosomih) razgrajujejo odvečne in poškodovane celici lastne sestavine (v procesu imenovanem avtofagija). Sodelujejo tudi pri razgradnji sestavin, ki v celico vstopajo iz zunajceličnega okolja v procesu endocitoze. Vsebujejo več kot **40 vrst encimov**, ki so del skupine **kislih hidrolaz** in delujejo le v kislem okolju (pH 4,5-5). Transportni proteini v membrani lizosoma transportirajo končne presnovne produkte (maščobne kisline, nukleotidi, sladkorji in aminokisline) nazaj v citosol, kjer se lahko ponovno uporabijo ali pa jih celica izloči v zunajcelični prostor.

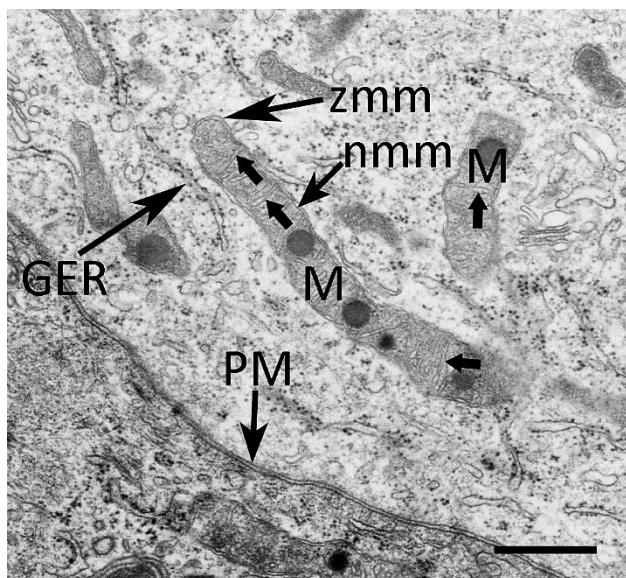
Lizosomi so majhni organeli, ki se razlikujejo po obliki, velikosti in sestavi, zaradi česar jih težko prepoznamo. S svetlobnim in presevnim elektronskim mikroskopom jih prepoznamo z imunooznačevanjem in z dokazovanjem prisotnosti in aktivnosti lizosomskih encimov (na primer kisle fosfataze) z encimsko histokemijo (slika 30 A).

2.3.2.5 Mitohondriji

Mitohondriji so celični organeli v katerih poteka **proces celičnega dihanja**, pri čemer nastane energija v obliki molekule adenzin trifosfat (**ATP**). Sestavljeni so iz dvojne membrane, in sicer iz **zunanje** in **notranje mitohondrijske membrane** (slika 37). Med membranama je **medmembranski prostor**, medtem ko notranji prostor, ki ga omejuje notranja mitohondrijska membrana, imenujemo **mitohondrijski matriks**.

Notranja mitohondrijska membrana je mesto v mitohondrijih, kjer nastaja ATP. Je močno nagubana v strukture, imenovane kriste (slika 37). Vsebuje encime dihalne verige, ki sodelujejo pri prenosu elektronov iz energijsko bogatih molekul (kot so NADH in FADH₂) na molekularni kisik. Med tem prenosom elektronov se sprošča energija, ki se uporablja za ustvarjanje elektrokemičnega gradienta. Notranja membrana vsebuje tudi proteinski kompleks sintaze ATP, ki izkorišča energijo elektrokemičnega gradienta v mitohondrijski membrani za pretvorbo ADP v ATP. V mitohondrijskem matriksu poteka Krebsov ali citratni cikel. Matriks mitohondrija vsebuje tudi mitohondrijsko DNA, ki v človeških celicah kodira zapise za 13 mitohondrijskih proteinov. Večina mitohondrijskih proteinov je zapisanih v jedrni DNA in se sintetizirajo v prostih ribosomih v citosolu ter posttranslacijsko prenesejo v mitohondrije.

Mitohondriji imajo značilno ultrastrukturo in jih zato lahko preučujemo s presevnim elektronskim mikroskopom. S svetlobnim in presevnim elektronskim mikroskopom jih lahko tudi prepoznamo z imunooznačevanjem rezidenčnih proteinov ali z reakcijo za dokazovanje aktivnosti specifičnih mitohondrijskih encimov (na primer citokrom oksidaza in sukcinska dehidrogenaza).



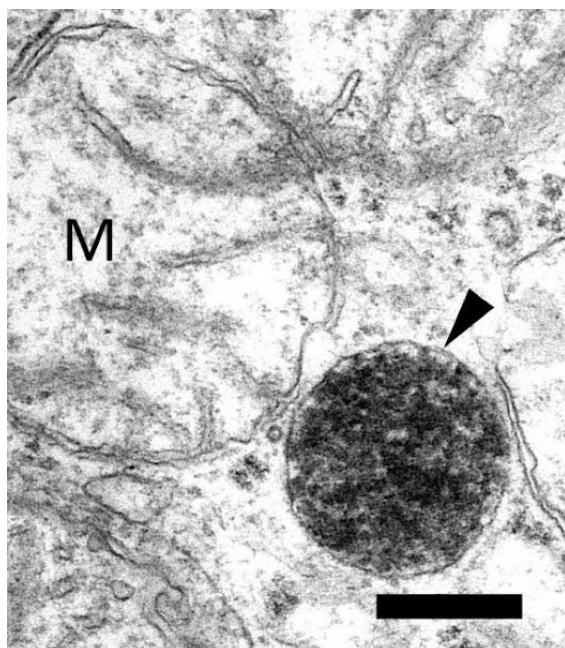
Slika 37: Mitochondriji (M) z zunanjo mitohondrijsko membrano (zmm), notranjo mitohondrijsko membrano (nmm) in kristami (debele puščice). PM – plazmalema; GER – granularni endoplazemski retikulum. Merilo: 300 nm.

2.3.2.6 Peroxisomi

Peroxisomi so majhni organeli, ki so obdani z enojno membrano (slika 38). Vključeni so v **razgradnji dolgoverižnih maščobnih kislin** (β -oksidacija) do acetil CoA, pri čemer kot stranski produkt nastaja vodikov peroksid (H_2O_2). Ta je v velikih količinah strupen za celico, zato peroksisomi vsebujejo encime, imenovane katalaze, ki ga razgradijo v vodo in kisik in tako zagotavljajo ustrezno zaščito. Peroxisomi sodelujejo tudi pri razstrupljanju strupenih snovi, kot so alkoholi in formaldehid.

Sinteza večine peroksisomskih proteinov poteka v prostih ribosomih v citoplazmi. Le nekaj membranskih proteinov peroksisomov izvira iz membran endoplazemskega retikuluma, od koder se z vezikularnim transportom transportirajo do peroksisomov.

Zaradi neznačilne morfologije in ultrastrukture peroksisome prepoznamo s svetlobnim in presevnim elektronskim mikroskopom le z imunooznačevanjem ali z dokazovanjem prisotnosti in aktivnosti peroksisomskih proteinov (na primer katalaze) z encimsko histokemijo.



Slika 38: Peroksisom (glava puščice) označen z encimsko histokemijsko reakcijo na katalazo. M – mitohondrij. Merilo: 500 nm.

NAVODILA ZA VAJE

1.1 VAJA: UVOD V MIKROSKOPIRANJE IN KLASIČNI SVETLOBNI MIKROSKOP

NAVODILA:

1. Priprava mikroskopa za mikroskopiranje:
 - a) spoznavanje in uporaba delov mikroskopa,
 - b) uravnavanje Köehlerjeve osvetlitve.
2. Mikroskopiranje histološkega preparata:
 - a) mikroskopiranje pri majhni ($4\times$), srednji ($10\times$) in veliki ($40\times$) povečavi objektiva.
3. Uporaba imerzijskega objektiva ($100\times$)
4. Umerjanje okularnega merilca s pomočjo objektnega mikrometra:
 - mikrometerska vrednost (mv) pri objektivu $4\times = 25\ \mu\text{m}$
 - mikrometerska vrednost (mv) pri objektivu $10\times = 10\ \mu\text{m}$
 - mikrometerska vrednost (mv) pri objektivu $40\times = 2,5\ \mu\text{m}$
 - mikrometerska vrednost (mv) pri objektivu $100\times = 1\ \mu\text{m}$

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Izračunajte maksimalno ločljivost svetlobnega mikroskopa. Maksimalna numerična apertura je 1.4; srednja valovna dolžina vidne svetlobe je 550 nm.
2. Izračunajte ločljivost svojega mikroskopa pri vseh štirih objektivih in rezultate vpišite v tabelo.

Objektiv	NA	Ločljivost
$4\times$		
$10\times$		
$40\times$		
$100\times$		

Pregledal: _____

1.2 VAJA: OBLIKE EVKARIONTSKIH CELIC IN VRSTE MIKROSKOPOV

NAVODILA:

1. Celice visokoprizmatske oblike – črevesne absorpcijske epitelijske celice ali enterociti:

a) mikroskopiranje in risanje preparata.

Na risbi je potrebno označiti: svetlino, apikalno plazmalemo, bazolateralno plazmalemo, citoplazmo, jedro, bazalno lamino.

2. Celice vretenaste oblike – gladkomišične celice:

a) mikroskopiranje in risanje preparata.

Na risbi je potrebno označiti: plazmalemo, citoplazmo, jedro.

3. Celice asimetrične oblike – živčne celice ali nevroni:

a) mikroskopiranje in risanje preparata.

Na risbi je potrebno označiti: plazmalemo, citoplazmo, jedro, telo živčne celice, začetne dele citoplazemskih izrastkov.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Narišite, označite in izmerite celice visokoprizmatske, vretenaste in asimetrične oblike. Risbo opremiti z naslovom in merilcem.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

Ime in priimek: _____

Datum: _____

2. Na sliki visokoprizmatskega epitelija stene tankega črevesja ustrezno poimenujte označene strukture.



Pregledal: _____

1.3 VAJA: ELEKTRONSKI MIKROSKOP

NAVODILA:

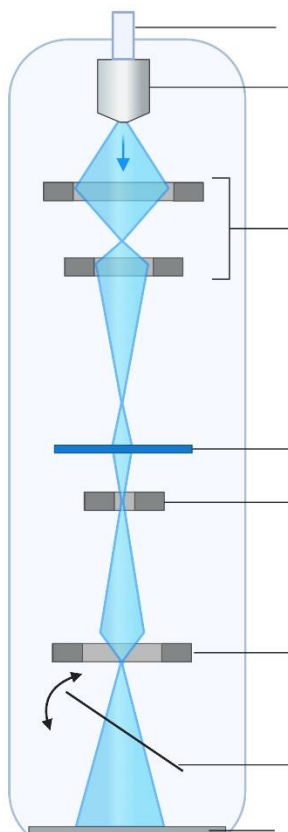
1. Presevni in vrstični elektronski mikroskop - demonstracija.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Kolikšna je ločljivost svetlobnega in elektronskega mikroskopa?
2. Na shematski prikaz elektronskega mikroskopa dopišite ustrezne označene dele mikroskopa ter ugotovite za katero vrsto elektronskega mikroskopa gre.



Pregledal: _____

2.1 VAJA: CITOLOŠKE, HISTOLOŠKE IN ELEKTRONSKOMIKROSKOPSKE METODE

NAVODILA:

1. Izdelava trajnega histološkega preparata iz parafinskih rezin:

- kemijska fiksacija s 4% formaldehidom (2 uri),
- rezanje tkiva na koščke ustrezne velikosti,
- izpiranje fiksativa s fosfatnim pufrom (pH = 7.6),
- dehidracija koščkov tkiva z etanoli naraščajočih koncentracij (70%, 90%, 100%),
- zamenjava 100% etanola s ksilolom,
- prepajitev tkiva s tekočim parafinom (65°C),
- vlivanje tekočega parafina v kalup in vklapljanje koščka tkiva,
- strjevanje parafina na sobni temperaturi,
- rezanje parafinskih rezin z mikrotomom,
- pobiranje rezin na objektnike,
- raztapljanje parafina v ksilolu (deparafiniranje),
- zamenjava ksilola s 100% etanolom,
- hidracija rezin z etanoli padajočih koncentracij (90 %, 70 %, 50 %) in vodo,
- barvanje jeder s hematoksilinom (1 minuto),
- izpiranje barvila z vodo,
- barvanje citoplazme z eozinom (1 min.),
- izpiranje barvila z destilirano vodo,
- dehidracija rezin z etanoli naraščajočih koncentracij (70%, 90%, 100%),
- zamenjava 100% etanola s ksilolom,
- vklapljanje v kanadski balzam,
- pokrivanje s krovnikom,
- mikroskopiranje.

2. Izdelava trajnega histološkega preparata iz zamrznjenih rezin:

- odvzem tkiva iz organizma,
- rezanje na koščke ustreznih velikosti,
- prepajanje s krioprotektivnim sredstvom (1 minuto),
- zamrzovanje koščka tkiva v tekočem dušiku,
- rezanje zamrznjenih rezin v kriostatu,
- pobiranje rezin na objektnike,
- barvanje jeder s hematoksilinom (1 minuto),
- izpiranje barvila z vodo,
- barvanje citoplazme z eozinom (1 min.),
- izpiranje barvila z destilirano vodo,
- (tak preparat se lahko opazuje pod mikroskopom, a ni trajen)
- dehidracija rezin z etanoli naraščajočih koncentracij (70%, 90%, 100%),
- zamenjava 100% etanola s ksilolom,
- vklapljanje v kanadski balzam,
- pokrivanje s krovnikom,
- mikroskopiranje.

3. Poltanke rezine – barvanje s toluidinskim modrilom:

- kemijska fiksacija z mešanico 4% formaldehida in 2% glutaraldehida (2 uri),
- rezanje tkiva na koščke ustrezne velikosti,
- izpiranje fiksativa s kakodilatnim pufrom,
- postfiksacija z osmijevim tetroksidom (1 ura),
- izpiranje v destilirani vodi,
- dehidracija tkiva z etanoli naraščajočih koncentracij (30%, 50%, 70%, 90%, 100%),
- zamenjava 100% etanola s propilen oksidom,
- prepojitev koščka tkiva mešanico propilenoksida in Epona,
- prepojitev koščka tkiva z Eponom,
- polimerizacija Epona v termostatu (5 dni),
- rezanje poltankih rezin z ultramikrotomom,
- segrevanje objektnika s poltanko rezino nad gorilnikom,
- dodajanje kapljice toluidinskega modrila na rezino,
- barvanje (1 – 2 min.),
- izpiranje barvila z vodo,
- sušenje objektnega stekelca nad gorilnikom,
- mikroskopiranje nepokritega preparata.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Izpolnite tabeli:

	PARAFINSKE REZINE	ZAMRZNJENE REZINE
Način fiksacije		
Vklopno sredstvo za rezanje		
Naprava za rezanje		
Debelina preparata		
Obstojnost preparata		
Namen uporabe		

Ime in priimek: _____

Datum: _____

	Klasični svetlobni mikroskop	Presevni elektronski mikroskop (TEM)	Vrstični elektronski mikroskop (SEM)
Način fiksacije			
Debelina preparata			
Način kontrastiranja			

2. Shematsko prikažite glavne faze priprave trajnega histološkega preparata iz parafinskih rezin ter pri vsaki fazi napišite, zakaj je potrebna.

Pregledal: _____

2.2 VAJA: HISTOKEMIJSKE METODE

NAVODILA:

1. **Reakcija PAS – nevtralni proteoglikani na površini želodčnega epitelija:**

a) mikroskopiranje in risanje preparata.

Na risbi je potrebno označiti: plazmalemo, citoplazmo, jedro, bazalno lamino, nevtralne proteoglikane označene z reakcijo PAS.

2. **Alciansko modrilo – kisli proteoglikani v hrustančnem tkivu:**

a) mikroskopiranje in risanje preparata.

Na risbi je potrebno označiti: plazmalemo, citoplazmo, jedro, lakuno, hondrocit, kisle proteoglikane označene z alcianskim modrilom, medceličnino hrustanca.

3. **Alciansko modrilo – kisli proteoglikani v sekrecijskih celicah tankega črevesa:**

a) mikroskopiranje preparata.

4. **Imunohistokemija intermediarnih filamentov citokeratinov v epiteliju grla človeka:**

a) mikroskopiranje preparata.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Narišite in označite hrustančno tkivo, v katerem so kisli proteoglikani označeni z alcianskim modrilom. Risbo opremite z naslovom in merilcem.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

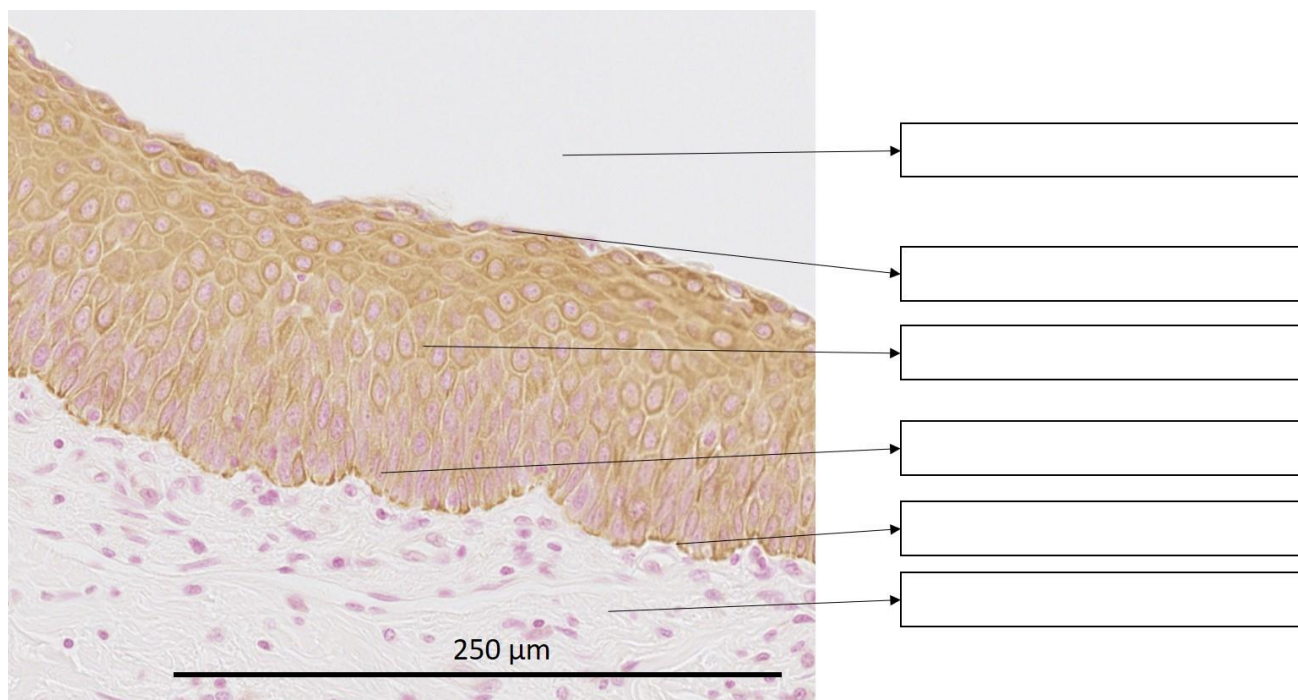
2. Narišite in označite želodčni epitelij, v katerem so nevtralni proteoglikani označeni z reakcijo PAS. Risbo opremite z naslovom in merilcem.

Pregledal: _____

Ime in priimek: _____

Datum: _____

3. Na sliki epitelija grla, kjer so imunohistokemijsko označeni citokeratini, ustrezno poimenujte označene strukture.



Pregledal: _____

2.3 VAJA: CELIČNI ORGANELI

NAVODILA:

1. Mitohondriji v jetrnih celicah:

a) Mikroskopiranje preparata.

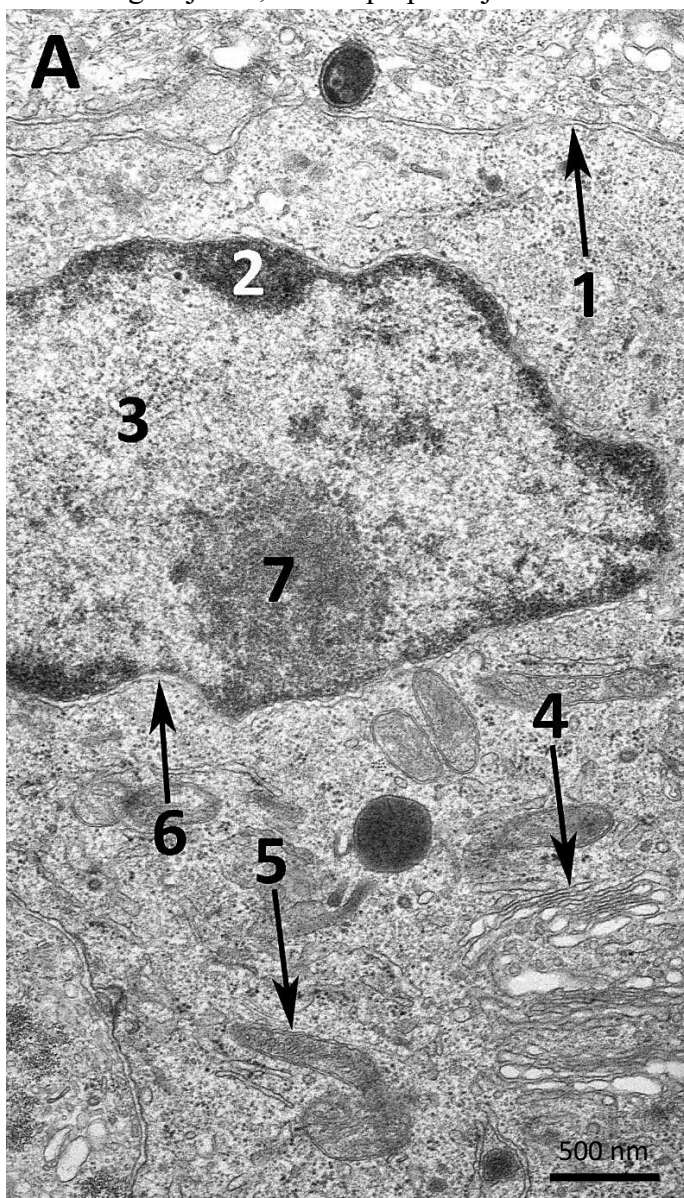
2. Mikrografije ultrastrukture celic: Atlas mikrografij.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

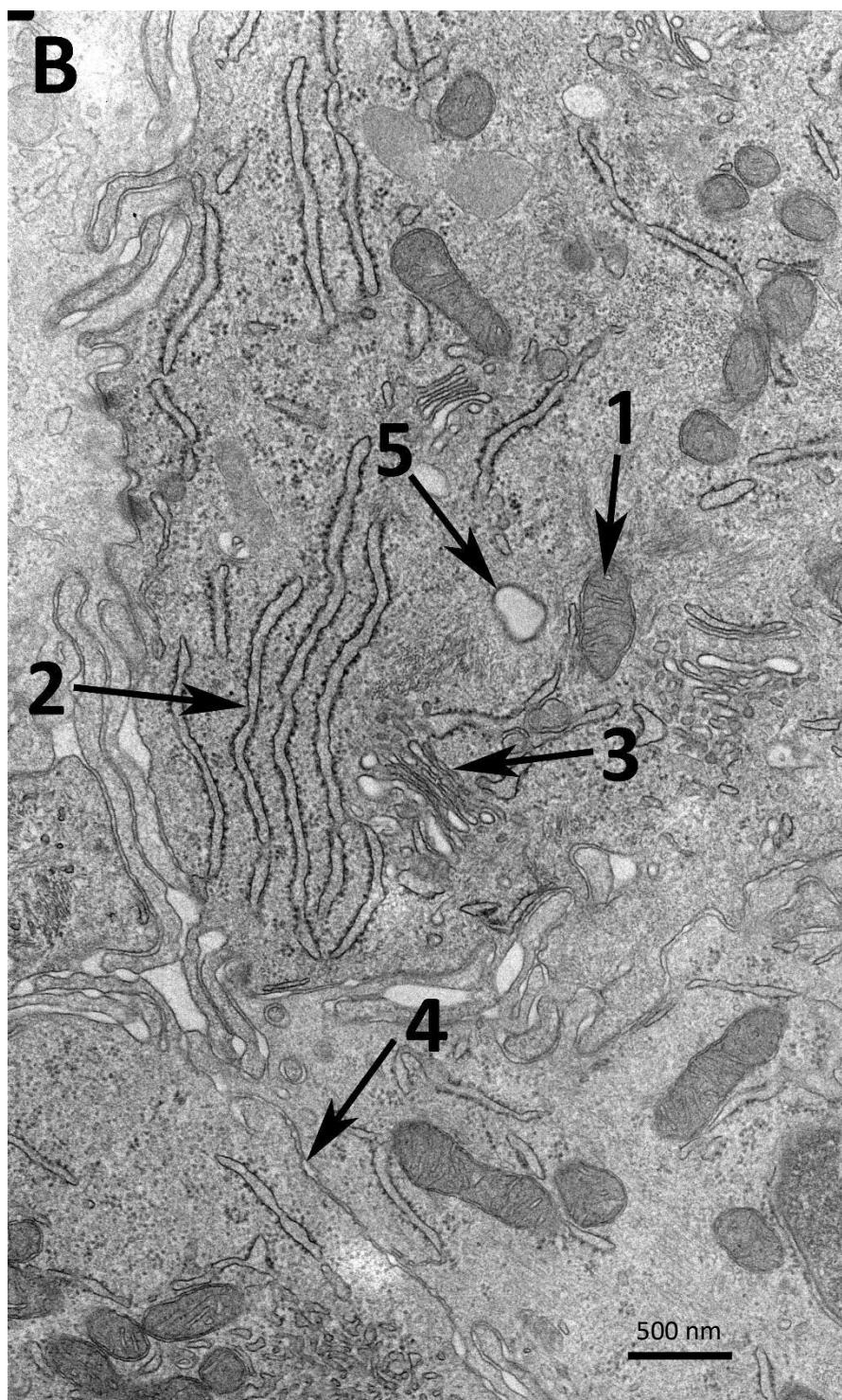
NALOGE:

1. Na mikrografijah A, B in C prepoznajte označene strukture in jih poimenujte.



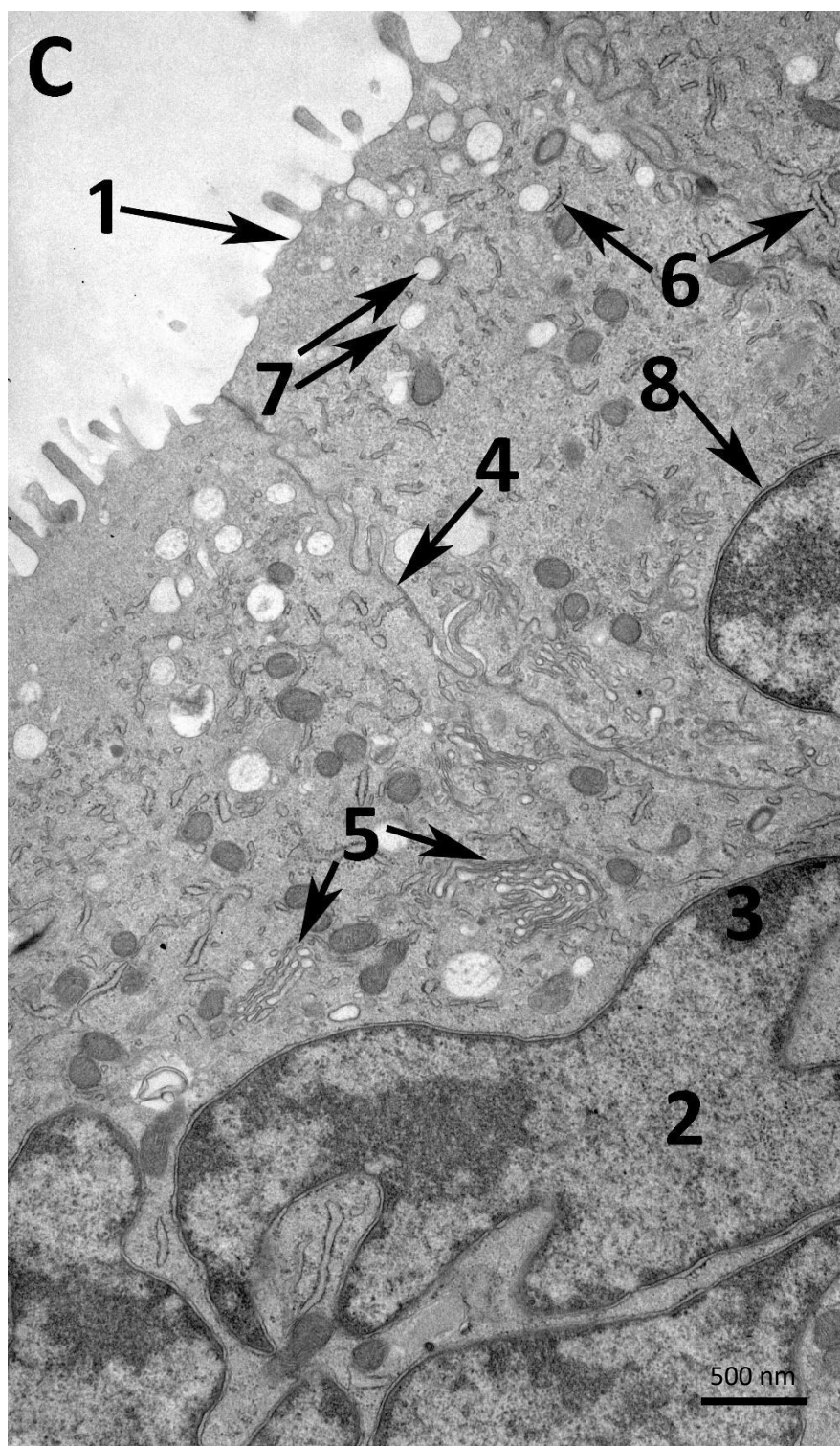
Ime in priimek: _____

Datum: _____



Ime in priimek: _____

Datum: _____



Pregledal: _____

LITERATURA:

Jezernik Kristijan, Veranič Peter, Sterle Maksimilijan; Celična biologija. DZS, 2015.

Erman Andreja, Hudoklin Samo, Kreft Erdani Mateja, Resnik Nataša, Romih Rok, Zupančič Daša; Celična biologija Atlas mikrofotografij. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, 2013.

Kreft Erdani Mateja, Erman Andreja, Hudoklin Samo, Nataša Resnik, Romih Rok, Daša Zupančič; Celična biologija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, 2015.

Alberts Bruce, Heald Rebecca, Johnson Alexander, Morgan David, Raff Martin, Roberts Keith, Walter Peter; Molecular Biology of The Cell, Seventh Edition, W. W. Norton & Company, 2022.

Kierszenbaum L. Abraham; Histology and Cell Biology, Mosby, 2002.

Ross H. Michael, Reith J. Edward, Romrell J. Lynn; Histology, A Text and Atlas, Second Edition, Williams & Wilkins, 1989.

Bancroft D. John, Gamble Marilyn; Theory and practice of histological techniques, Fifth Edition, Churchill Livingstone, 2002.