

# Svetlosna mikroskopija. Priprema materijala za SM



Ksenija Veličković



Schleiden i Schwann  
(1838)

## ĆELIJSKA TEORIJA

1. Svi organizmi se sastoje od jedne ili više ćelija
2. Ćelija je osnovna jedinica strukture, funkcije i organizacije
3. Sve ćelije nastaju od već postojećih ćelija



Marcello Malpighi  
1660

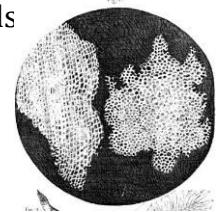


1665



Antonie van  
Leeuwenhoek  
1670

I could exceedingly plainly perceive it to be all perforated and porous, much like a Honey-comb... ...these pores, or cells

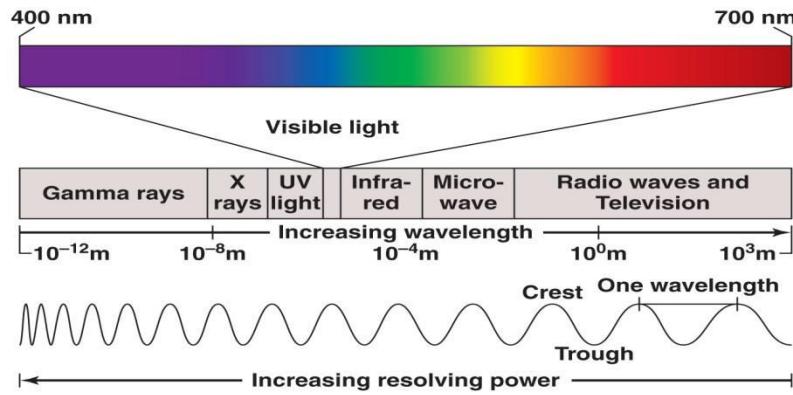


### Tema predavanja:

- Talasna priroda svetlosti – artefakti
- Princip uveličanja i rezolucija
- Delovi SM mikroskopa
- Tipovi SM mikroskopa
- Priprema tkiva za posmatranje na nivou SM



# Ljudsko oko

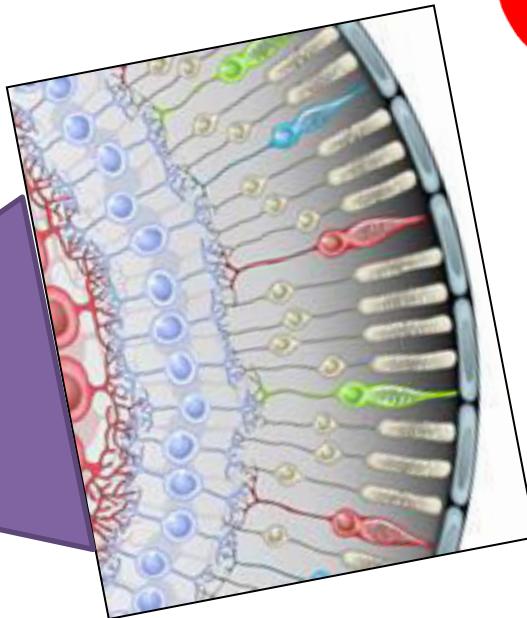
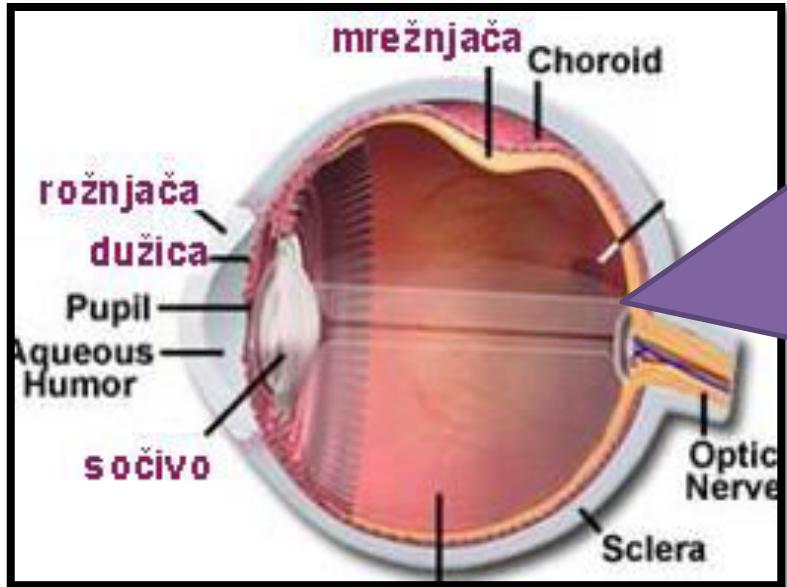
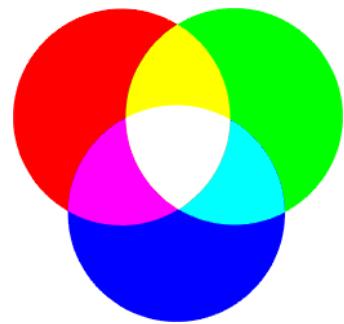


Ljudsko oko detektuje svetlost u vidljivom delu EM spektra

Takođe, ljudsko oko je u stanju da percepira razlike u osvetljenosti i intenzitetu

Color	/nm
Infrared	>1000
Red	700
Orange	620
Yellow	580
Green	530
Blue	470
Violet	420
Near ultraviolet	300
Far ultraviolet	<200

Dakle, da bismo videli neku sliku mora biti prezentovana čelu vida u bojama vidljivog dela spektra i/ili varirajućeg stepena intenziteta svetlosti



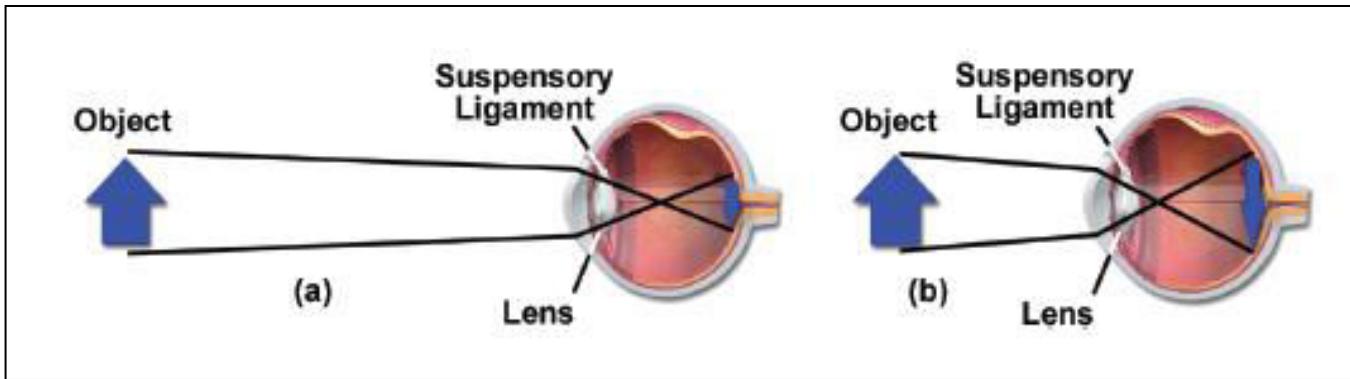
kupaste  
ćelije  
(čepići)

štapićaste  
ćelije  
(štapići)

Svetlosni zraci prolaze kroz sočivo, prelamaju se i fokusiraju na mrežnjaču (kao obrнутa slika) - žuta mrlja. Kada se pogled usmeri na neki predmet, očni mišići se pokrenu tako da zraci svetlosti koji dolaze sa tog predmeta padaju na centralni deo žute mrlje..

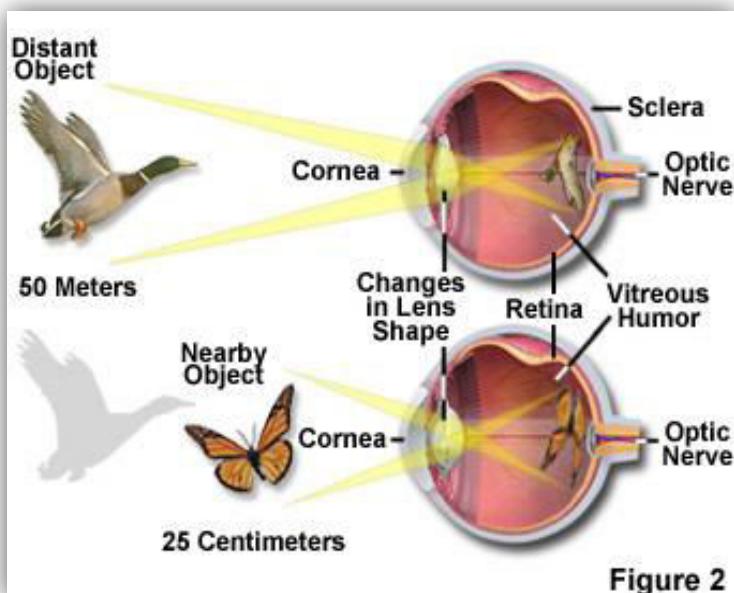
Čepići su zaduženi za razlikovanje boja (razlike u talasnoj dužini) i oštrinu vida. Ove ćelije poseduju pigmente osetljive na crvenu, zelenu i plavu svetlost. Štapići su zaduženi za razlike u kontrastu (razlike intenzitetu svetlosti)

# Akomodacija oka – fokusiranje slike



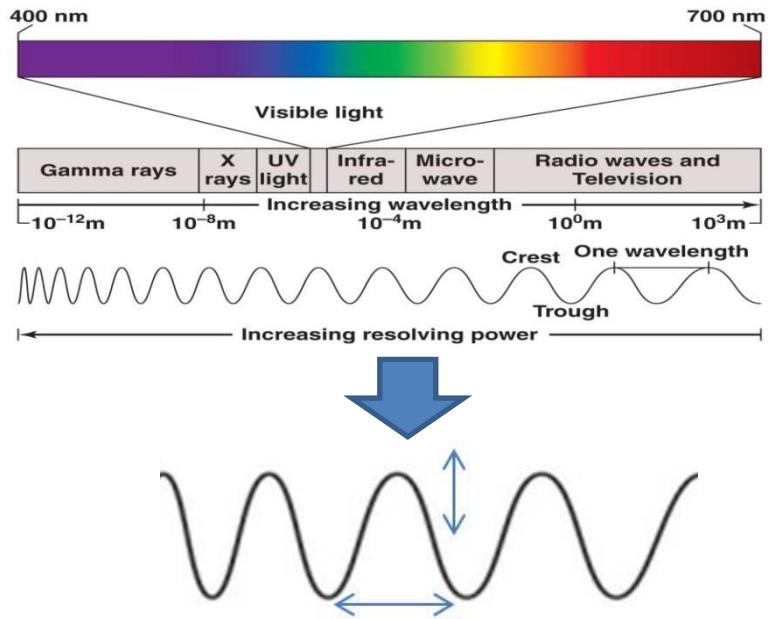
Sočiva manjeg dijametra (poravnato)

Sočiva većeg dijametra (ispupčeno)



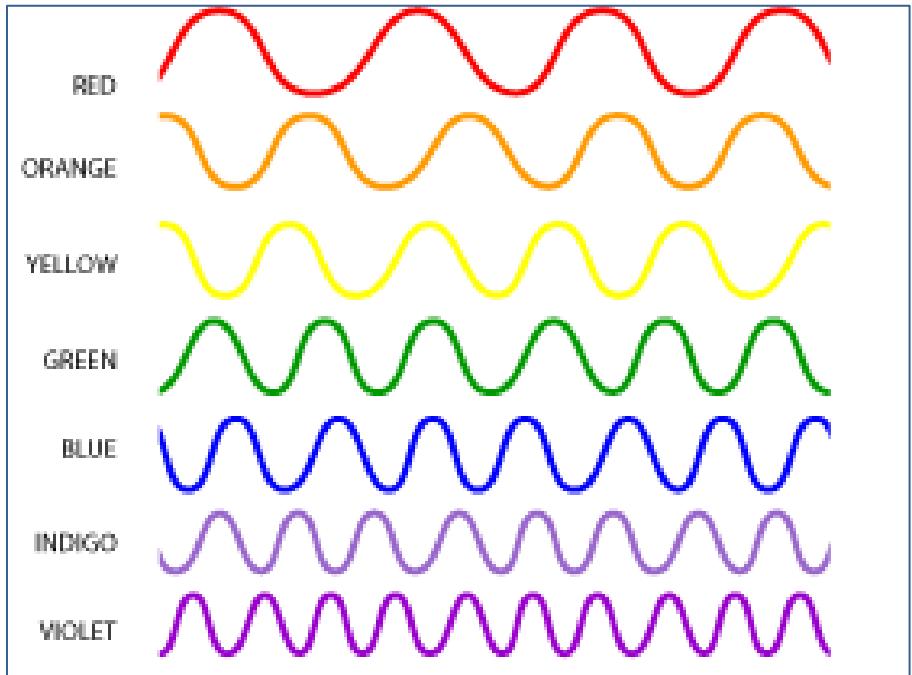
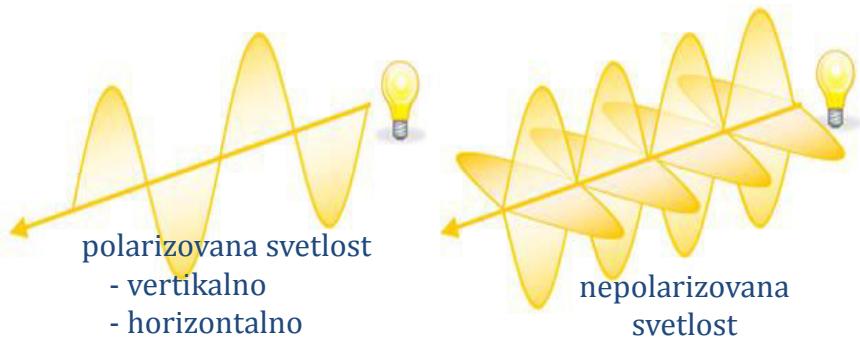
Zbog ograničene sposobnosti sočiva oka da menjaju oblik, objekti koji su jako blizu oku se ne mogu dovesti u fokus na retini. Konvencionalno, minimalna posmatračka distanca je 25cm. Objekti u ekstremnoj blizini oka ne mogu da imaju svoje slike u fokusu na mrežnjači i sve bliže od 10 centimetara stvara jako mali ugao gledanja, zbog čega su mnogi detalji neprepoznatljivi. Slična situacija se javlja kada pokušamo da posmatramo objekat na velikoj udaljenosti.

# Šta je svetlost?

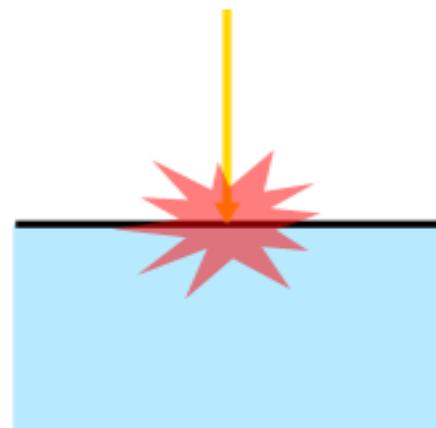


Elektromagnetični talas određene  
talasne dužine i amplitude  
Foton – nosioc EM energije

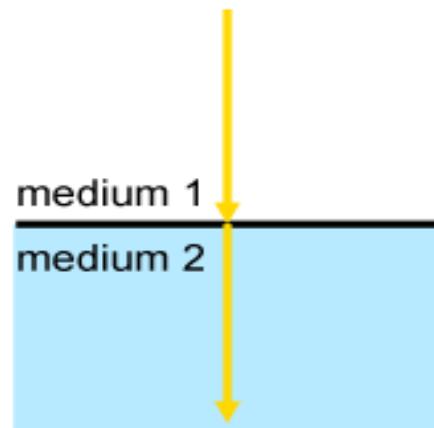
SVETLOST MANJE ENERGIJE IMA MANJU  
UČESTALOST I VEĆU TALASNU DUŽINU



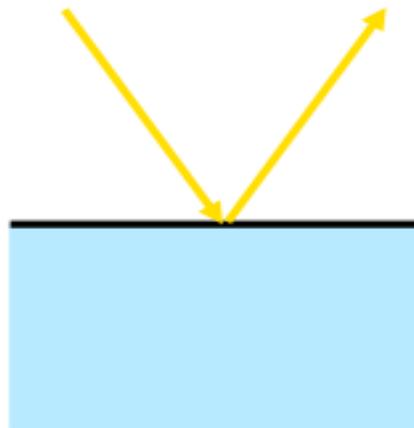
# Šta je to što nam omogućava da vidimo objekte koji sami po sebi nisu izvor svetlosti?



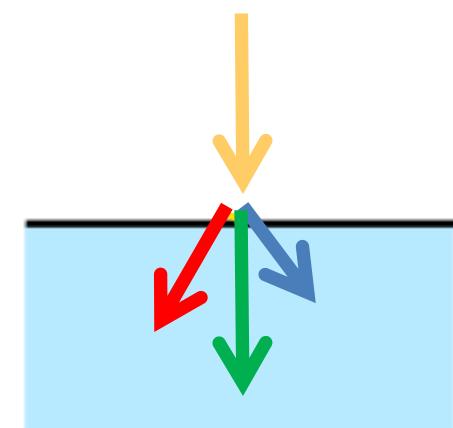
Apsorpcija



Transmisijska



Refleksija



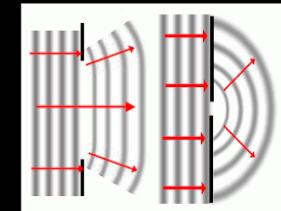
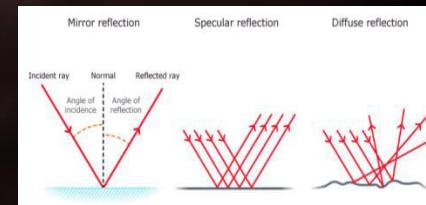
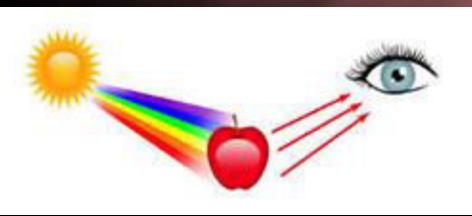
Difrakcija

- Prenos energije EM talasa na atome/molekule medijuma
- Molekuli koji prolazno i privremeno apsorbuju svetlost a potom reemituju svetlost veće talasne dužine: fosforecentni/fluorescentni
- Selektivna apsorpcija bele svetlosti dovodi do stvaranja boje

- Transmisijska može biti redukovana ili zaustavljena
- Snop svetla može biti savijen pri prolasku kroz transparentne objekte (REFRAKCIJA)
- Snop svetla može da se savija uniformno na ivicama nepropusnih objekata ili rasipa od strane malih struktura

- Svetlost se reflektuje – ukoliko je glatka površina (ogledalo) svetlost se reflektuje pod istim uglom pod kojim je ušla
- Ukoliko je površina neravna – u različitim pravcima

- Snop svetla može da se rasipa od strane malih struktura.
- Svetlosni talasi se šire oko ivice otvora; ukoliko je otvor veći - difrakcija je manja.

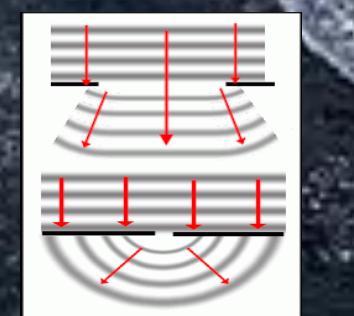


# Efekat optičke difrakcije

put svetla bez difrakcije

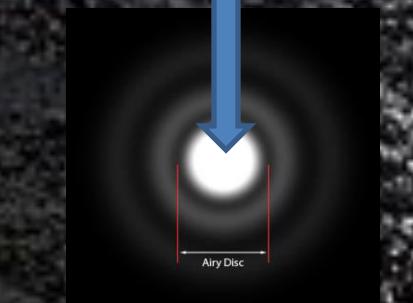
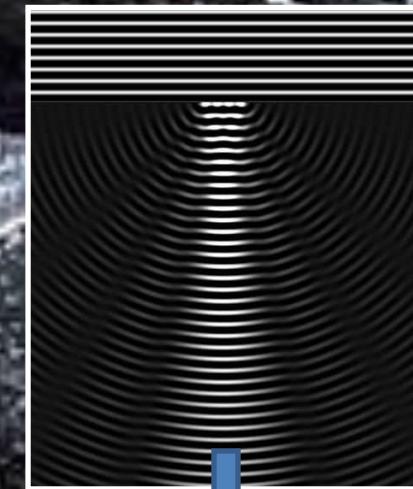


put svetla sa difrakcijom

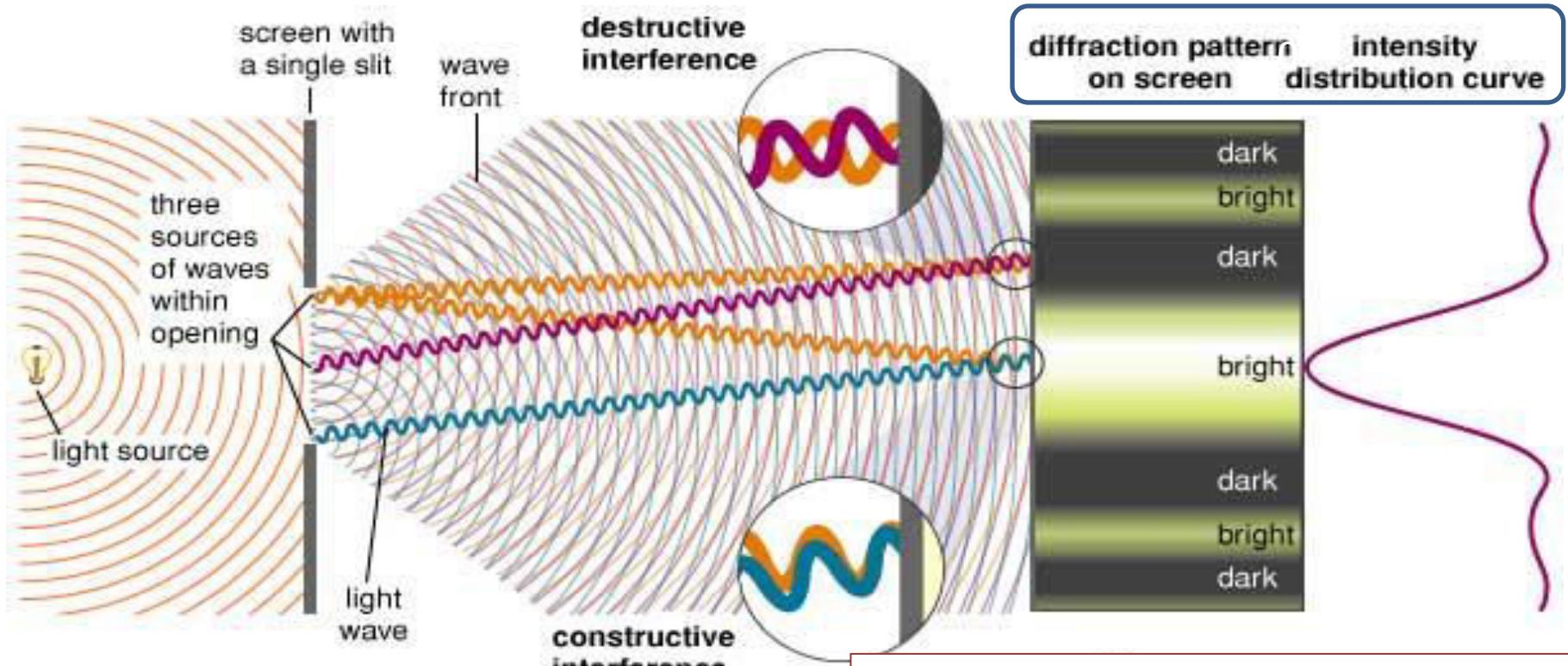


- „savijanje“ svetlosti pri nailasku na prepreku, posledica je talasne prirode svetla
- Difrakcija je najizraženija na otvorima i obrnuto je proporcionalna veličini otvora

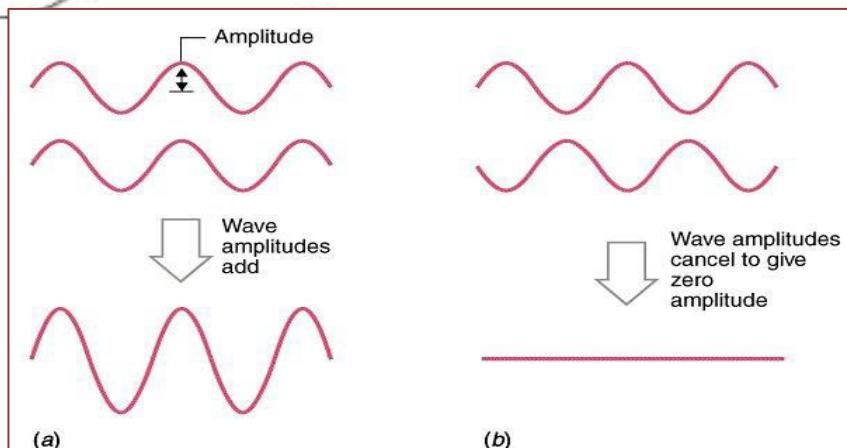
- „difrakcioni patern“
- Serijski tamnih i svetlih traka/prstenova
- Središte sadrži najveći deo svetlosne energije
- Širina tog centra zavisi od veličine aperture – manja apertura, širi centralni prsten (veća difrakcija)
- Centralni prsten – *Airy disc* - najmanja tačka koja može biti fokusirana na detektor – determinanta rezolucije



# Efekat optičke difrakcije – formiranje slike

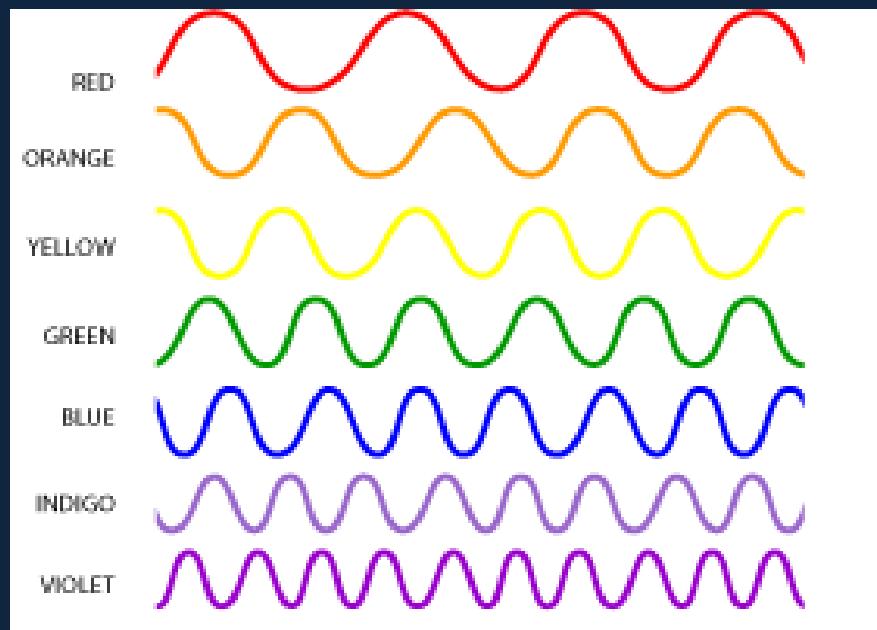
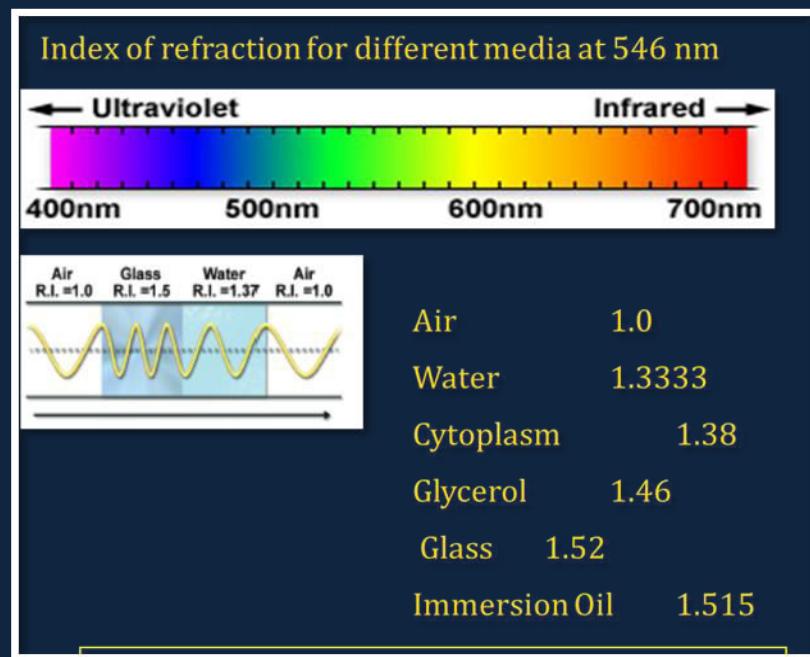
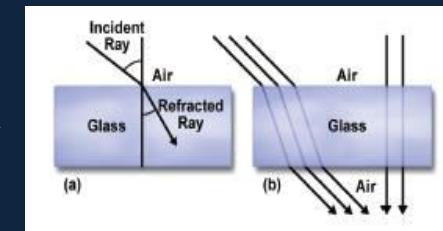


- Ukoliko su dva svetlosna zraka precizno u fazi, oni će dovesti do pojačanja jasnoće
- Ukoliko svetlosni zraci nisu u fazi, njihova interferencija će dovesti do međusobnog delimičnog ili potpunog poništavanja

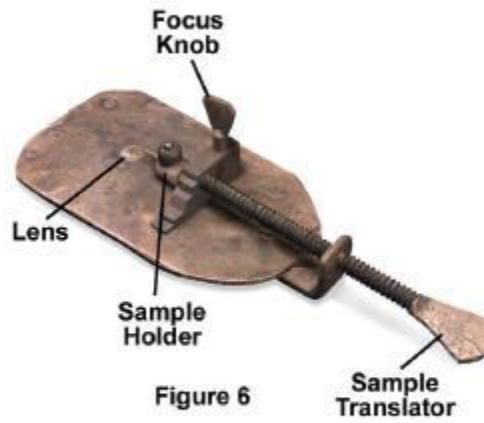
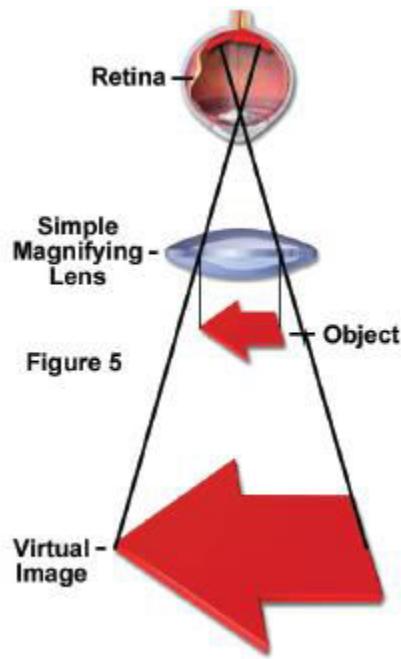


Svetlost putuje „pravom“ putanjom, ali putanja se može izmeniti iz više razloga.

- Prvo, priroda svetla - činjenica da se ono sastoji od talasa koji vibriraju u smeru putanje (broj vibracija po sekundi).  
Ljubičasta svetlost ima veću frekvenciju i kraću talasnu dužinu, crvena svetlost obrnuto.
- Nevidljivi za ljudsko oko, delovi spektra koji se koriste u mikroskopiji su UV i infra-red.
- Drugo, svetlost putuje različitom brzinom kroz različite medijume. Svetlosni zraci se savijaju tj. menjaju putanju kada prolaze kroz vazduh i ulaze u konveksna sočiva, kada napuštaju sočiva i ulaze u vazduh, kada prolaze iz vazduha u imerziono ulje....



# JEDNOSTAVNI SVETLOSNI MIKROSKOP

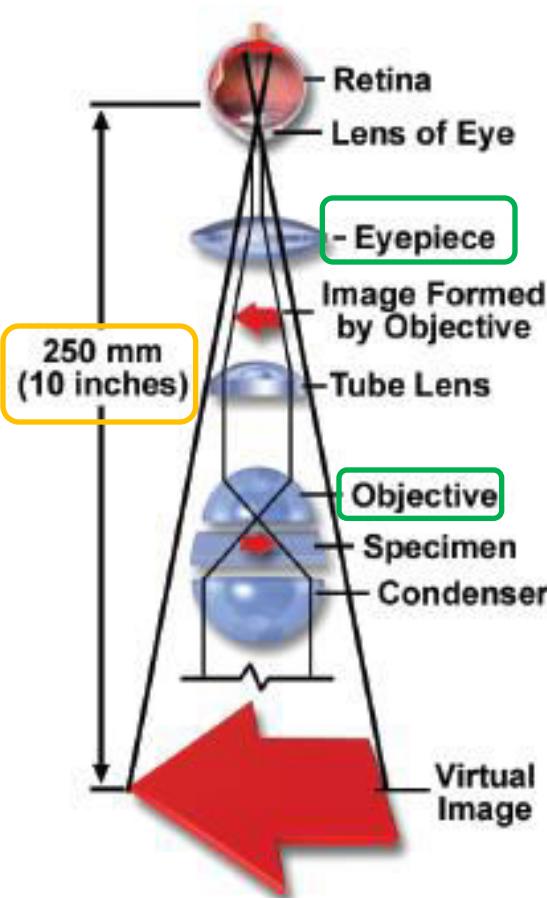


*Anton van Leeuwenhoek  
1632-1723.*

## Jedno, konveksno sočivo

- Povećava vizuelni ugao retine – omogućava fokusiranje i uvećavanje sitnih objekata
- “virtuelne slike” – mogu se detektovati samo okom, ne mogu se snimiti

# SLOŽENI SVETLOSNI (OPTIČKI) MIKROSKOP



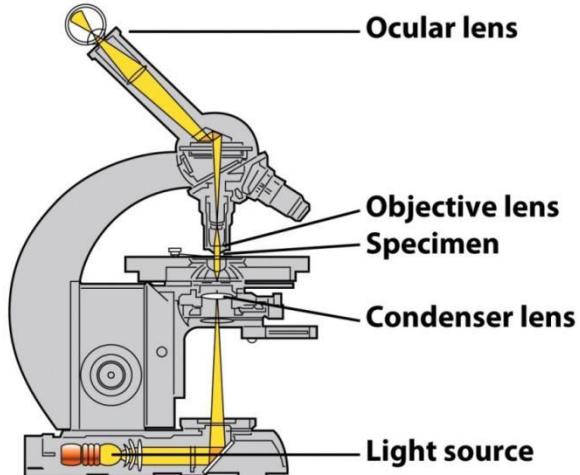
**2 (seta) sočiva:**  
- Sočivo OBJEKTIVA  
- Sočivo OKULARA

Dvostepeno uveličanje

**UVELIČANJE = Uveličanje objektiva X uveličanje okulara**



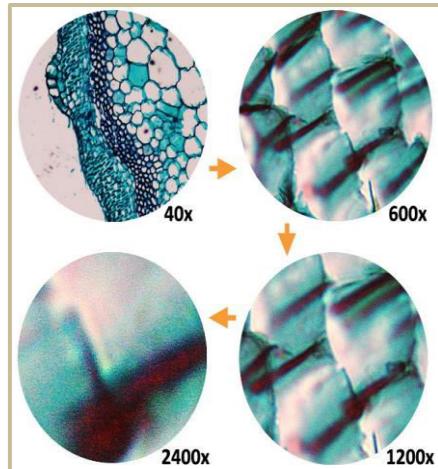
Janssen & Janssen, 1590.



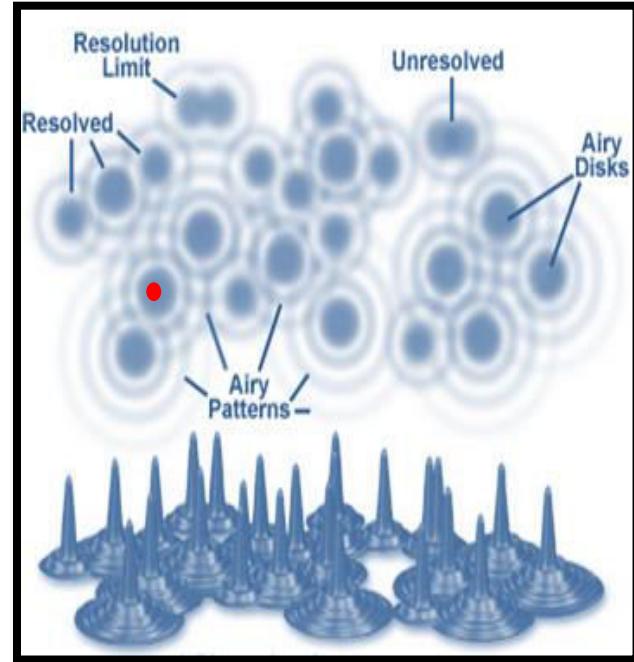
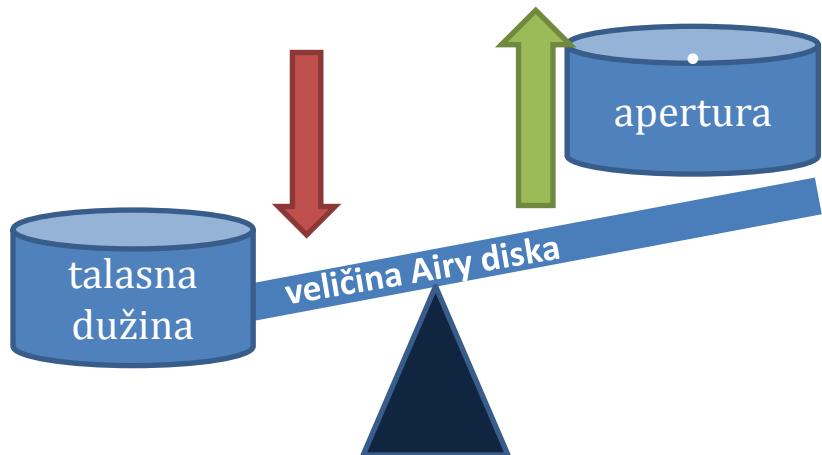
Objektiv formira realnu, uveličanu i invertovanu sliku koja može biti projektovana.  
Okulari su veoma blizu realne slike – previše blizu da bi formirali realnu sliku. Zraci koji stižu do oka formiraju uveličanu virtuelnu sliku (realne slike) koja je udaljena.  
Virtuelna slika nije invertovana u odnosu na realnu, pa je rezultat invertovana slika.

# POJAM REZOLUCIJE

MOGUĆNOST UOČAVANJA DVE TAČKE U VIDU ODVOJENIH ENITTETA



„empty magnification“

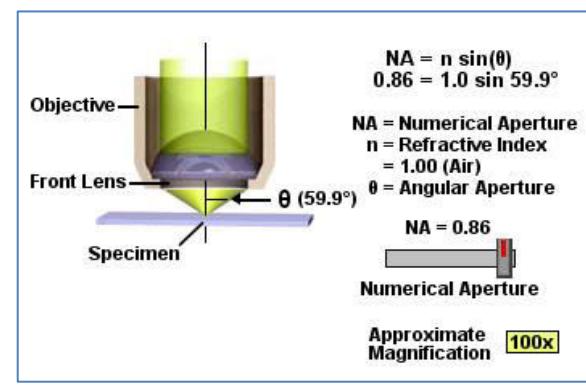
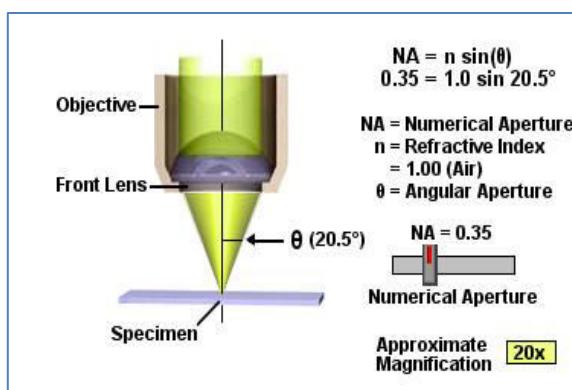
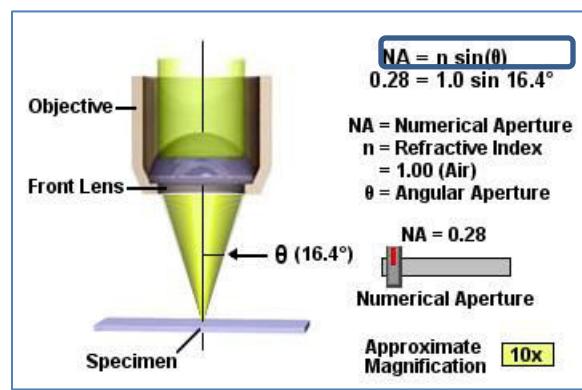


SVI OPTIČKI SISTEMI SLIKU TAČKE  
„PRETVARAJU“ U DISK OKRUŽEN  
SVETLIM I TAMNIM PRSTENOVIMA

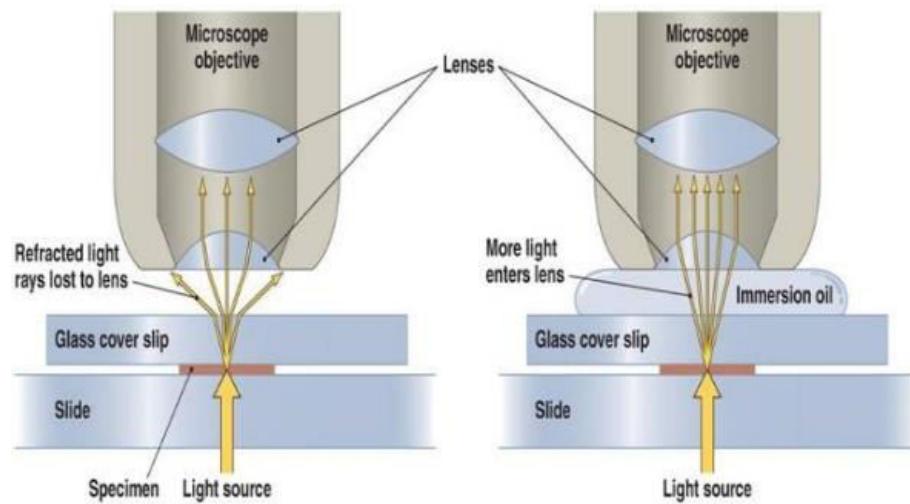
- **REZOLUCIJA (razdvojna moć) SM**
- Najmanje rastojanje između dve tačke na kojem se one vide razdvojeno.

Zavisi od:

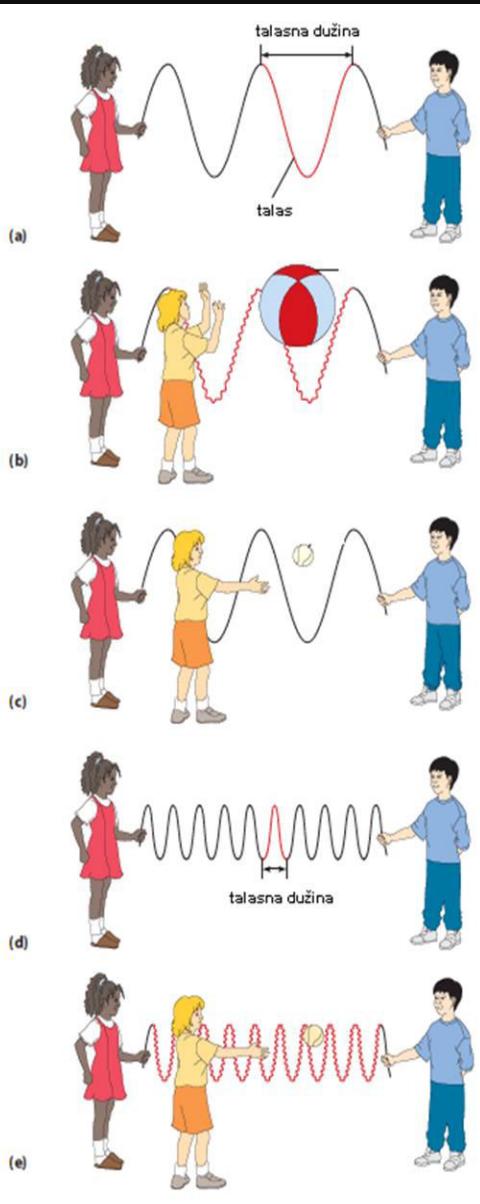
1. Talasne dužine svetlosti
2. Karakteristika sočiva (angularna apertura)
3. Karakteristika medijuma u kojem se nalazi uzorak – refraktivni indeks medijuma (vazduh, voda, imerziono ulje)



- **REZOLUCIJA (razdvojna moć) SM**
  - Najmanje rastojanje između dve tačke na kojem se one vide razdvojeno.
- Zavisi od:
1. Talasne dužine svetlosti
  2. Karakteristika sočiva (angularna apertura)
  3. Karakteristika medijuma u kojem se nalazi uzorak – refraktivni indeks medijuma (vazduh, voda, imerziona ulje)



Air	1.0
Water	1.3333
Cytoplasm	1.38
Glycerol	1.46
Glass	1.52
Immersion Oil	1.515



## • REZOLUCIJA (razdvojna moć) SM

- Najmanje rastojanje između dve tačke na kojem se one vide razdvojeno.

Zavisi od:

1. Talasne dužine svetlosti
2. Karakteristika sočiva (angularna apertura)
3. Karakteristika medijuma u kojem se nalazi uzorak – refraktivni indeks medijuma (vazduh, voda, imerziono ulje)

### Abbe-ov zakon



Pri najboljim uslovima - pri ljubičastoj svetlosti

$$\lambda = 0.4 \mu\text{m}$$

i numeričkoj aperturi od 1.4

Maksimalna rezolucija SM:

300nm – vazduh,

200nm - imerzija

**RAZDVOJNA MOĆ MIKROSKOPA** je najvećim delom definisana talasnom dužinom svetla; nikakvo usavršavanje sočiva ne može da prevaziđe ovo ograničenje

# SOČIVA - PRINCIP FORMIRANJA SLIKE

Varijacije u pogledu oblika i veličine

Površina sočiva najčešće je konkavna, konveksna ili ravna

Konvergirajuća (sabirna, pozitivna) sočiva; deblja u sredini – uveličavaju

Divergirajuća (rasipna, negativna) sočiva; tanja u sredini – umanjuju

Snop svetla – refrakcija – promena putanje – priroda sočiva

Slučaj – konvergencija u zajedničku tačku

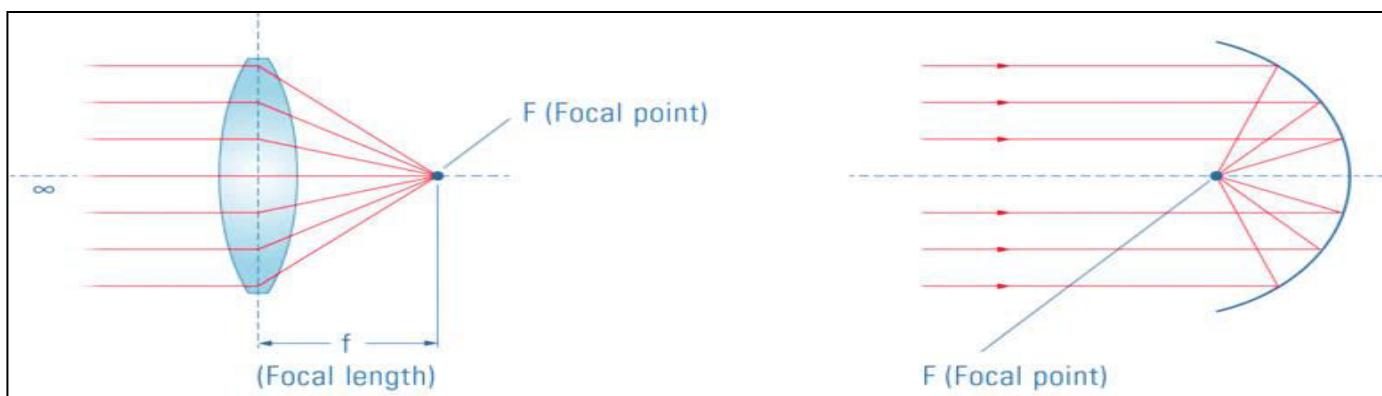
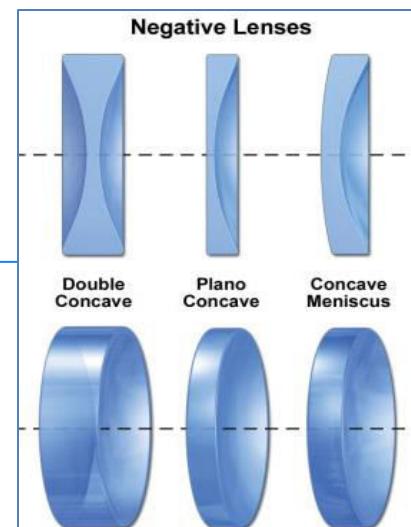
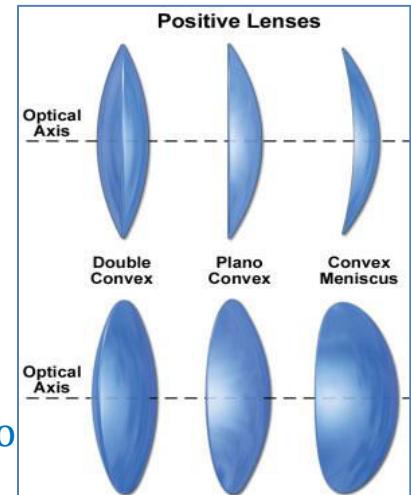
FOKALNA TAČKA – tačka u kojoj se zraci ukrštaju nakon prolaska kroz sočivo

FOKALNA DUŽINA - distanca od centra sočiva do fokalne tačke

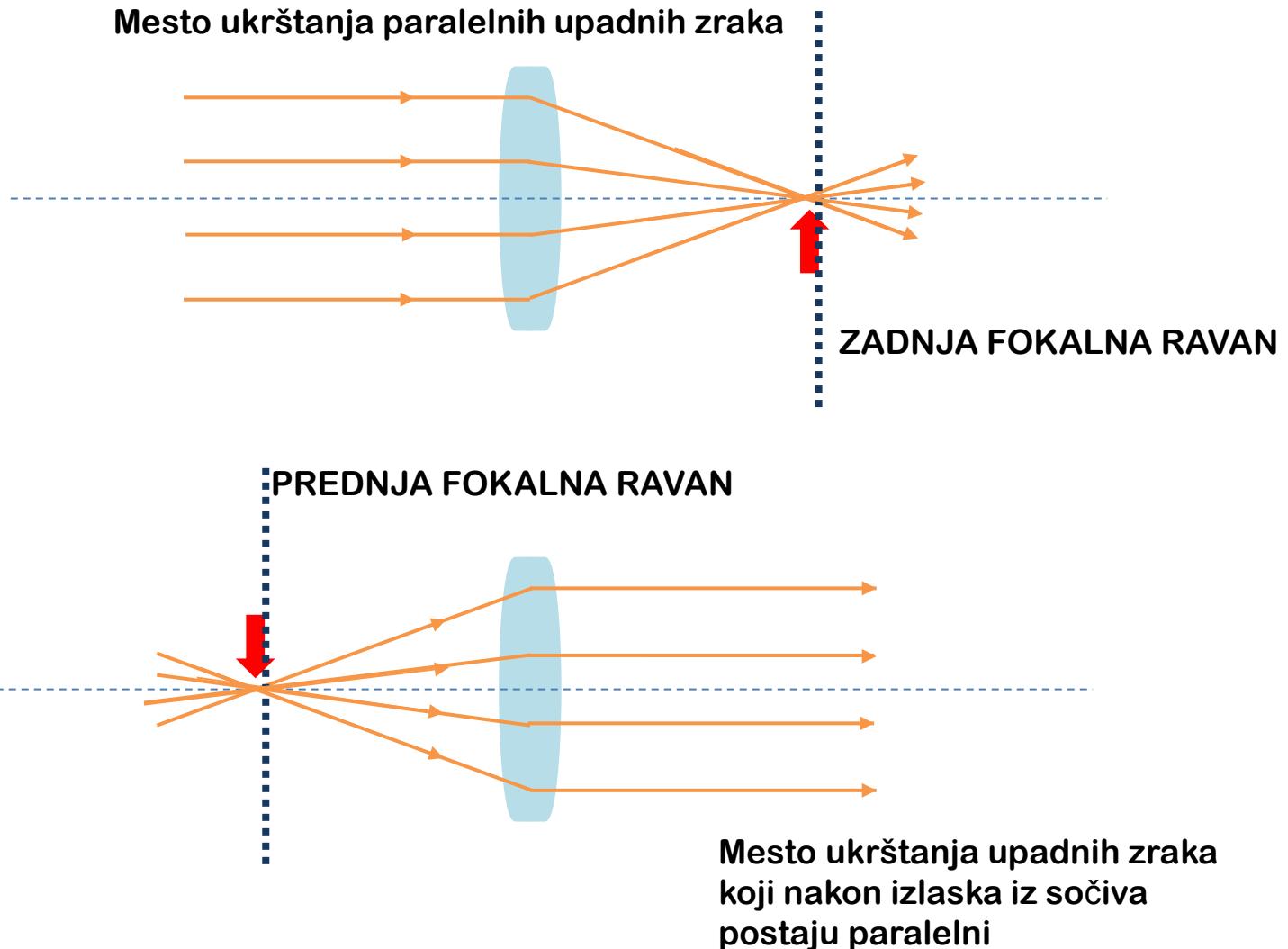
Fokalna dužina zavisi od tipa sočiva – zakrivljenost (kurvatura)

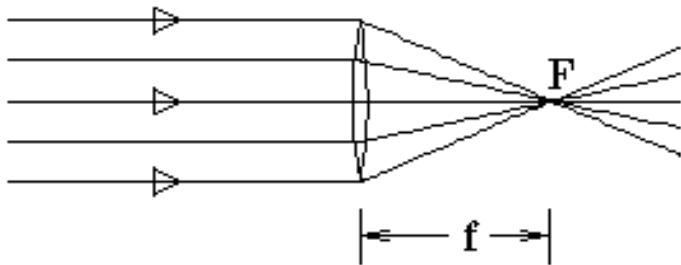
Svako sočivo ima dve fokalne tačke – jednu ispred i jednu iza

ŠTA DEFINIŠE DA LI ĆE VELIČINA SLIKE BITI MANJA ILI VEĆA OD OBJEKTA? – FOKALNA DUŽINA

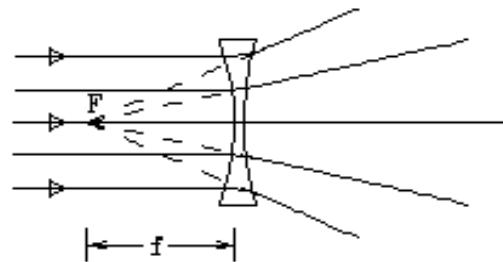


# Sočivo ima dve fokalne tačke





*Converging (positive) lens.*

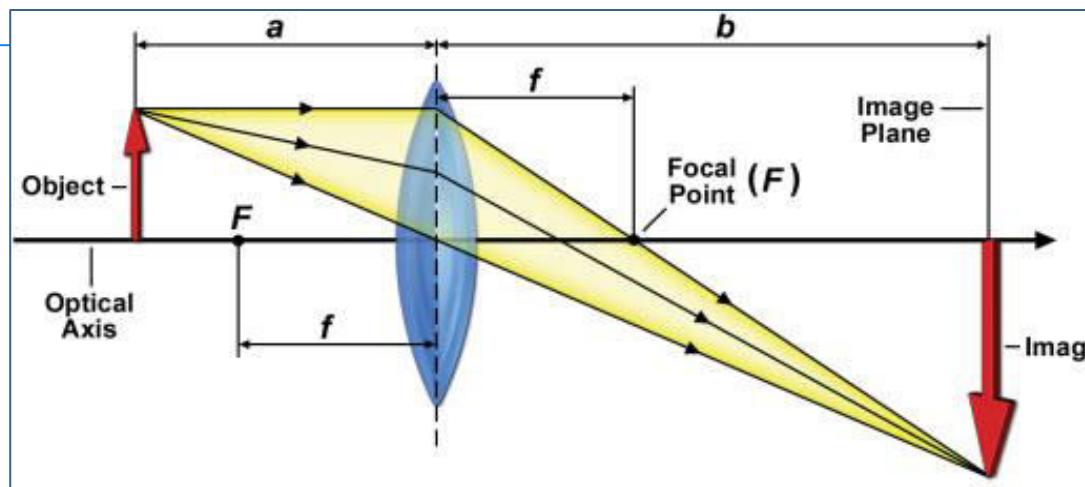


*Diverging (negative) Lens.*

Konvergirajuća sočiva imaju „pozitivnu“ fokalnu dužinu, dovode do uvećanja

Divergirajuća sočiva imaju „negativnu“ fokalnu dužinu, dovode do umanjenja

SAMO AKO JE UDALJENOST OBJEKTA OD SOČIVA VEĆA OD FOKALNE DUŽINE FORMIRAĆE SE REALNA SLIKA.

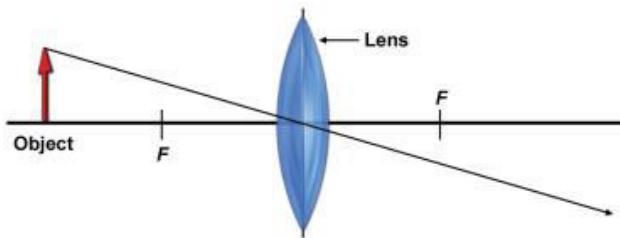


## Šta je to slika objekta?

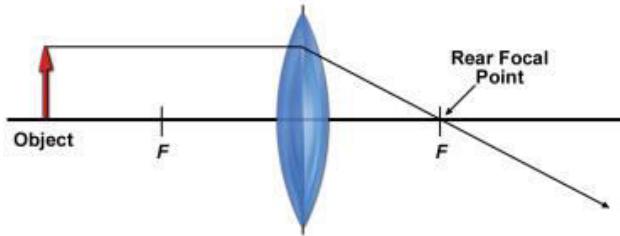
To je region u kojem se svetlosni zraci (ili njihove ekstenzije) koji potiču sa objekta ukrštaju (konvergiraju) usled refrakcije sočiva ili refleksije ogledala.

- Ukoliko se svetlosni zraci seku i fizički udružuju – **REALNA SLIKA**
- Ukoliko zraci divergiraju ali njihove imaginarnе ekstenzije konvergiraju – **VIRTUELNA SLIKA**. Ravan virtuelne slike ne može se detektovati drugačije sem okom (ne može se projektovati na filmu ili ekranu).

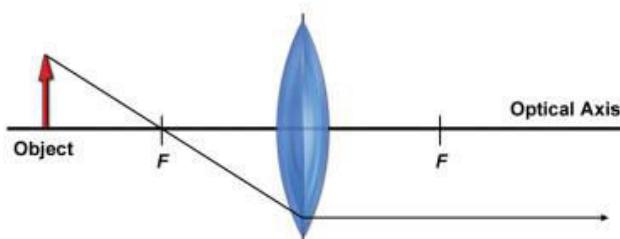
# 3 osnovna pravila u vezi prolaska svetlosnih zraka kroz sočivo:



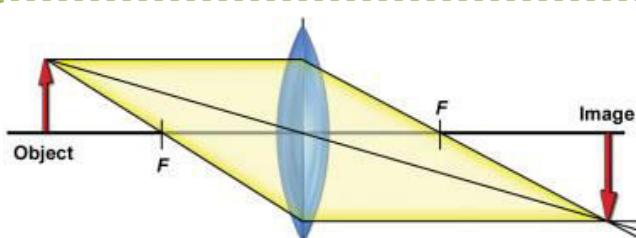
1. Upadni zrak koji (pod bilo kojim uglom) prođe kroz centar sočiva, ne menja smer kretanja.



2. Upadni zrak koji putuje paralelno sa optičkom osom, refraktuje se kroz sočivo i prolazi kroz zadnju fokalnu tačku.

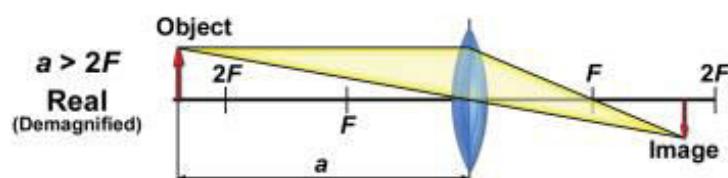
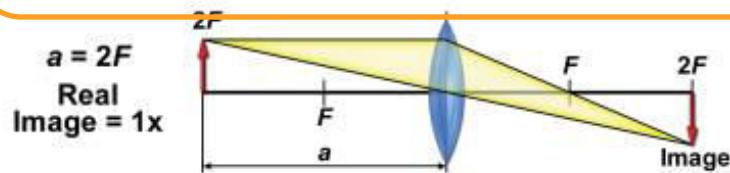
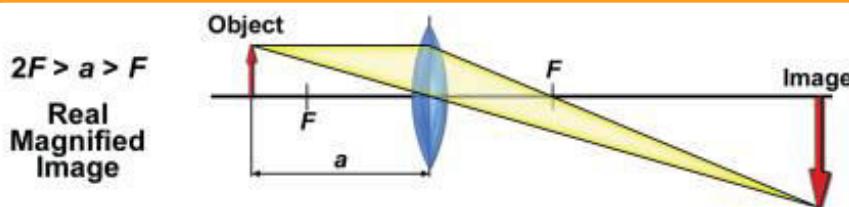
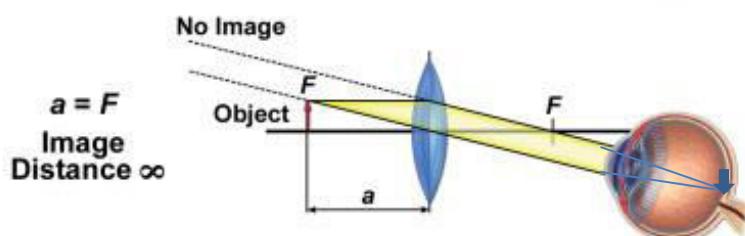
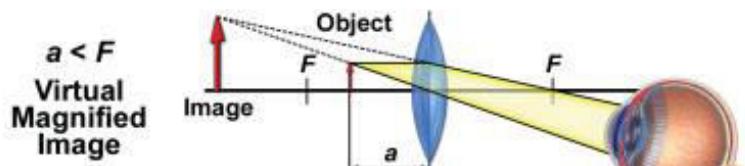


3. Upadni zrak koji prolazi kroz prednju fokalnu tačku refraktovaće se tako da izlazi paralelno sa optičkom osom.



Na mestu ukrštanja bilo koja dva od navedena tri tipa zraka, formiraće se slika – RAVAN SLIKE.

# U zavisnosti od položaja objekta u odnosu na fokalnu tačku sočiva:



5. Objekat na udaljenosti manjoj od jedne fokalne dužine:

- zraci divergiraju, nema realne slike
- virtuelna uvećana slika
- sočivo lupe i okulara

4. Objekat na udaljenosti od jedne fokalne dužine:

- zraci se pružaju paralelno
- nema slike
- sočivo objektiva kod *beskonačno-korigovanih optičkih sistema*

3. Objekat na udaljenosti većoj od jedne a manjoj od dve fokalne dužine:

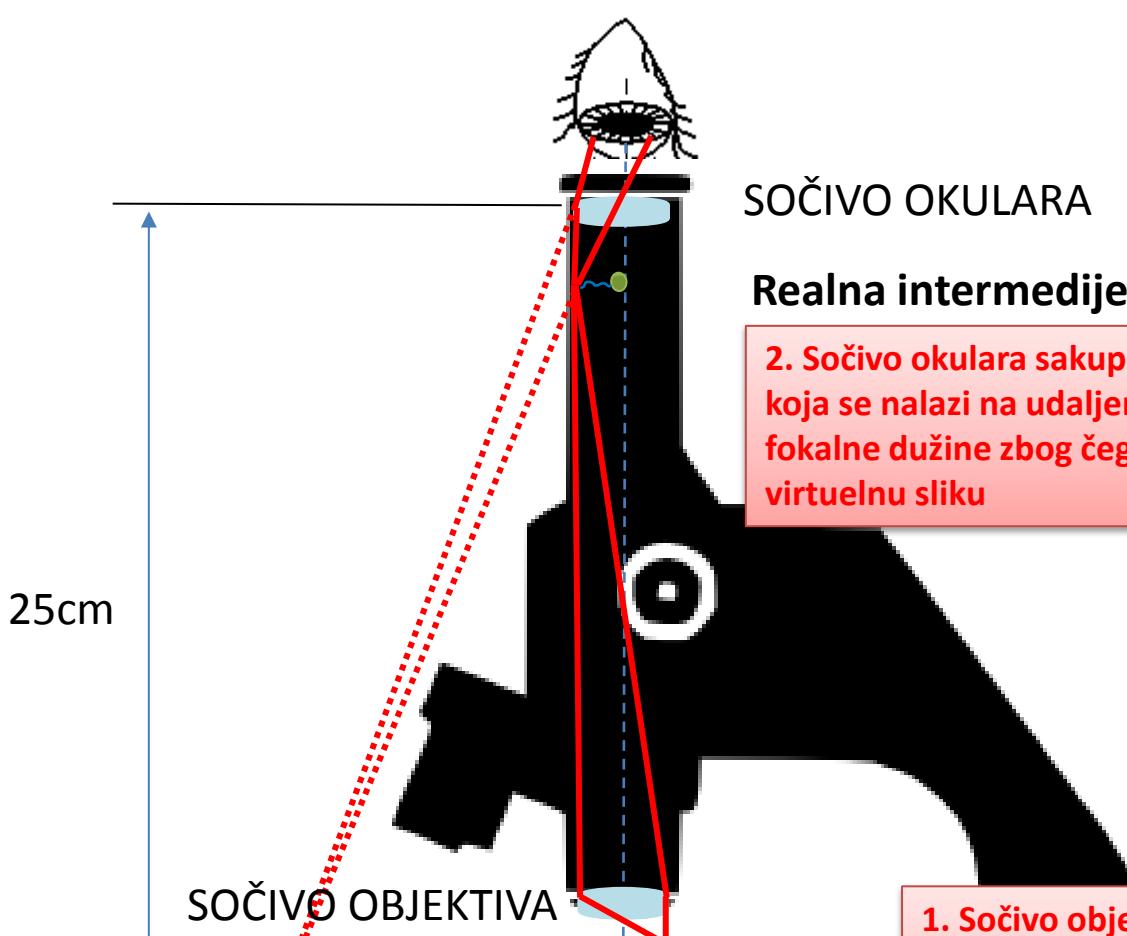
- realna uvećana, invertovana slika
- sočivo objektiva kod *konačno-korigovanih optičkih sistema*

2. Objekat na udaljenosti od dve fokalne dužine:

- realna slika u realnoj veličini
- fotografije 1:1

1. Objekat na udaljenosti većoj od dve fokalne dužine:

- realna umanjena slika
- fotografije



## SOČIVO OKULARA

### Realna intermedijerna (primarna) slika

2. Sočivo okulara sakuplja svetlost sa primarne slike koja se nalazi na udaljenosti manjoj od jedne fokalne dužine zbog čega ne daje realnu već virtuelnu sliku

## SOČIVO OBJEKTIVA

### Virtuelna slika

1. Sočivo objektiva sakuplja svetlost koja prolazi kroz uzorak koji je na rastojanju između 1 i 2 fokalne dužine od objektiva i zato formira realnu primarnu sliku ispred sočiva okulara



# Konvencionalni („konačni“) optički sistem vs. „beskonačni“ optički sistem

Fig. 1 Finite Optics

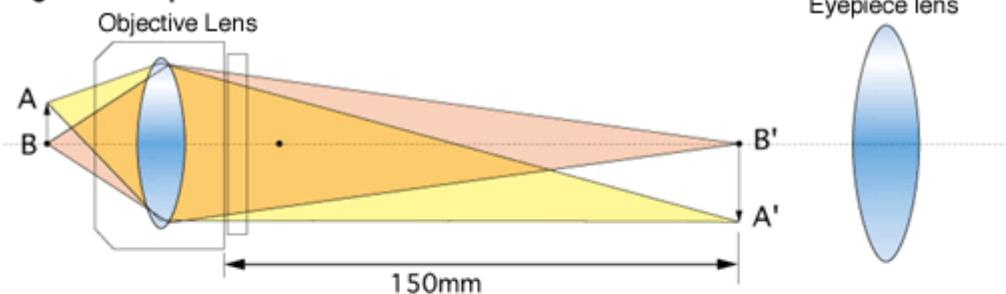
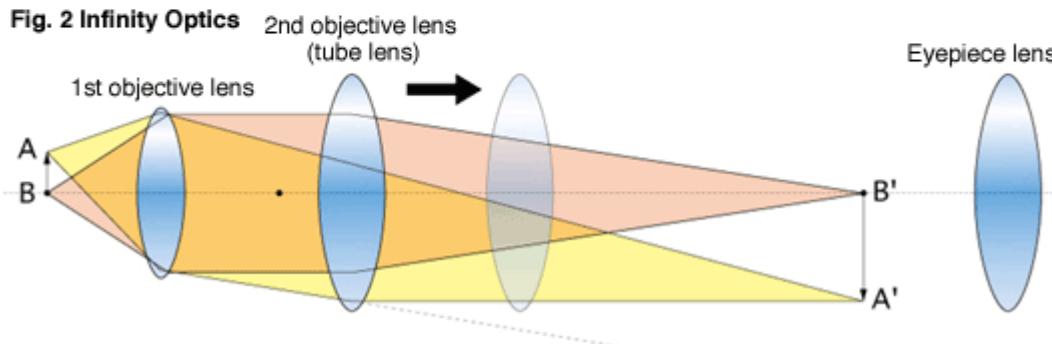


Fig. 2 Infinity Optics

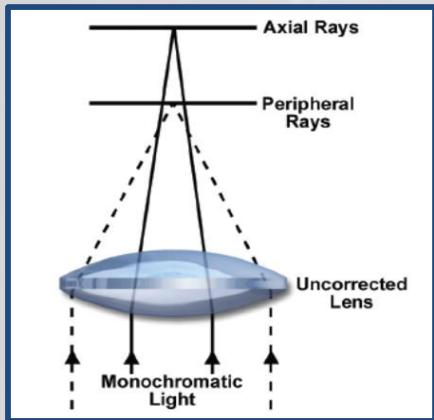


- Fiksna fokalna dužina – 150 mm
- Nedostaci:

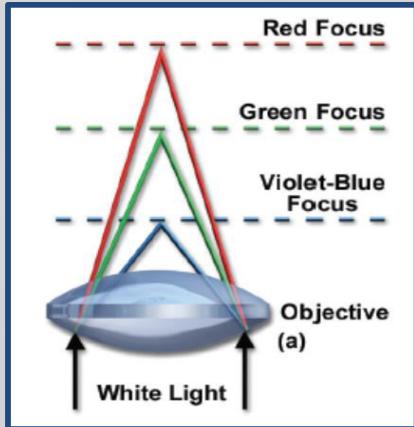


- 2 sočiva objektiva:
  - 1. sočivo – daje beskonačan paralelan snop (ne daje sliku)
  - 2. sočivo – sočivo tubusa – daje realnu intermedijarnu sliku
- Prednosti:
  - Mogućnost menjanja dužine tubusa što je važno kod dodavanja elemenata važnih za FM, PC, polarizacionu mikroskopiju... (lampe, polarajzeri...)

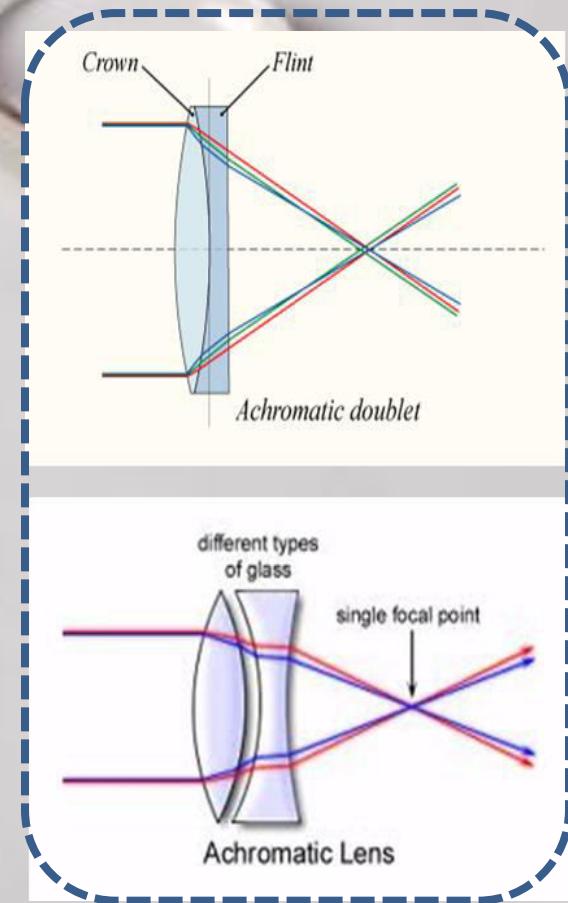
# sočiva - aberacije



sferične



homatske



aberacije

**Koristeći mikroskop, ne vidite posmatrani objekat već sliku objekta!!!**

**Kvalitetan mikroskop mora da obezbedi:**

- Dobru rezoluciju – razdvojnu moć
- Dobru kontrastnost
- Odgovarajuće uvećanje

# OSNOVNI DELOVI SVETLOSNOG MIKROSKOPA



MONOKULAR

BINOKULAR

TRINOKULAR

Okulari

**Bright-field** svetlosni mikroskopi daju sliku objekta na svetloj pozadini.

2-D prikaz.

Najčešće je potrebno prethodno obojiti uzorak koji se posmatra.

Revolver

Objektivi

Stočić

Kondenzor

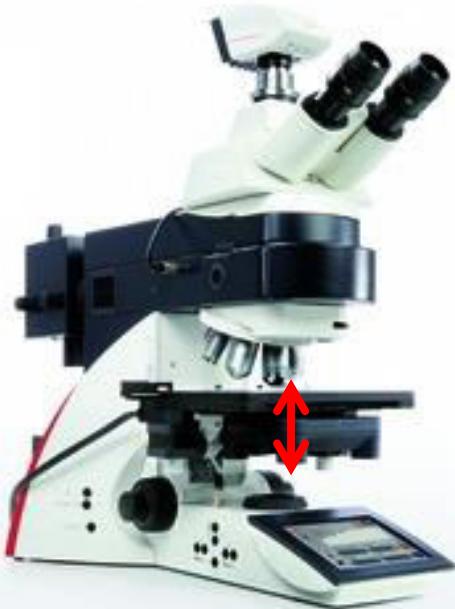
Potenciometar

Mikrometarski zavrtanj

Postolje mikroskopa (sa iluminatorom)

# Fokusiranje slike

– dovođenje primarne realne slike u odgovarajuću ravan



***Upright mikroskop***

- Fiksan revolver
- Pokretan stalak

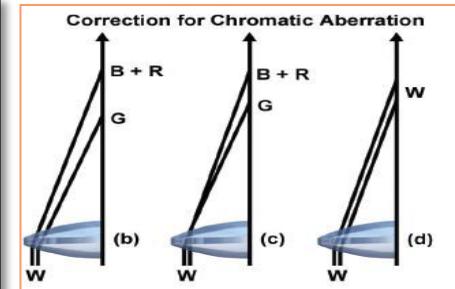
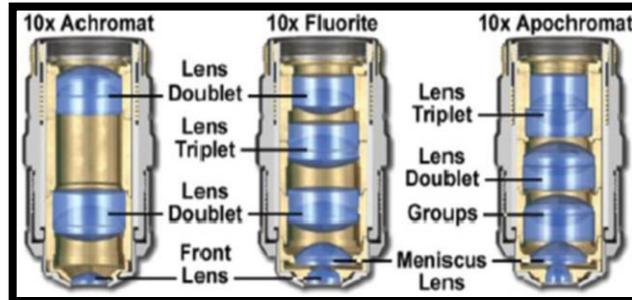


***Invertni mikroskop***

- Fiksan stalak
- Pokretan revolver

# OBJEKTIVI

Osnovna funkcija jeste prikupljanje svetlosti koja polazi sa uzorka i projekcija primarne, realne i invertne slike uzorka. Pored toga, služe za smeštanje delova koji su neophodni za rad specijalnih tipova SM kao što je fazno-kontrastni i darkfield SM



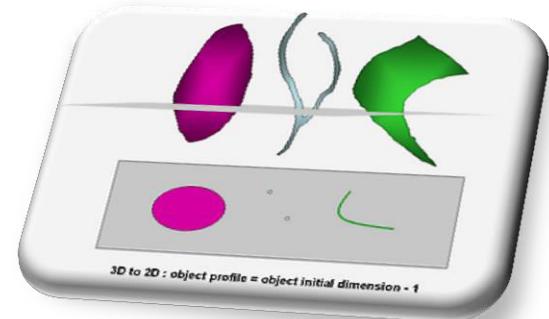
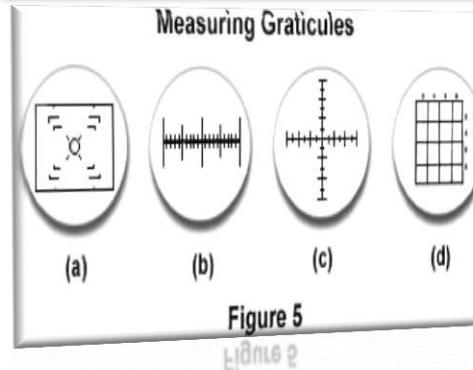
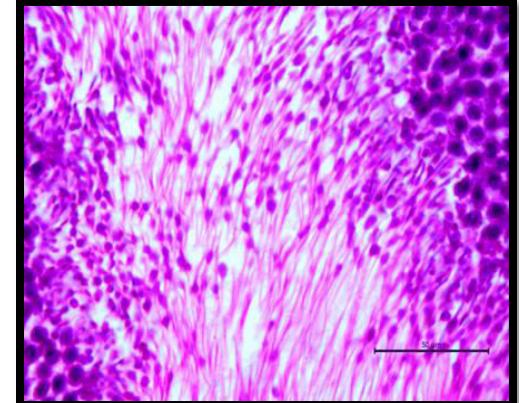
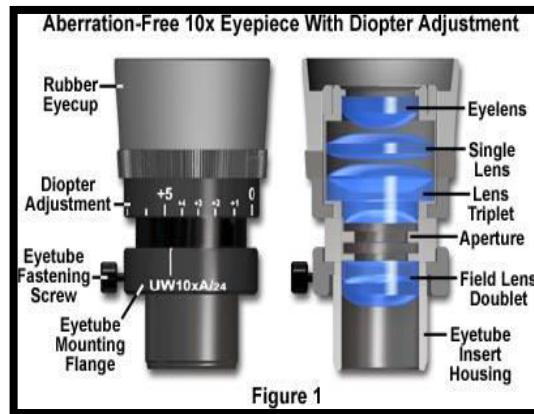
Objective Numerical Aperture versus Optical Correction

Magnification	Plan Achromat (NA)	Plan Fluorite (NA)	Plan Apochromat (NA)
0.5x	0.025	n/a	n/a
1x	0.04	n/a	n/a
2x	0.06	0.08	0.10
4x	0.10	0.13	0.20
10x	0.25	0.30	0.45
20x	0.40	0.50	0.75
40x	0.65	0.75	0.95
40x (oil)	n/a	1.30	1.40
63x	0.75	0.85	0.95
63x (oil)	n/a	1.30	1.40
100x (oil)	1.25	1.30	1.40



# OKULARI

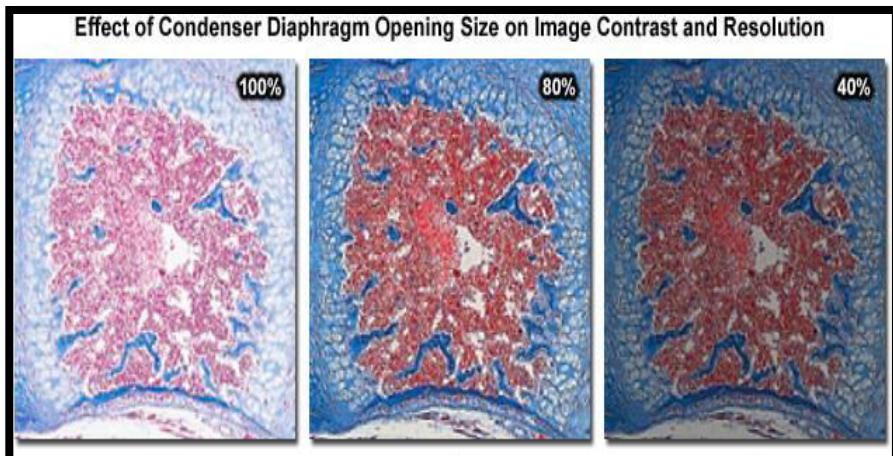
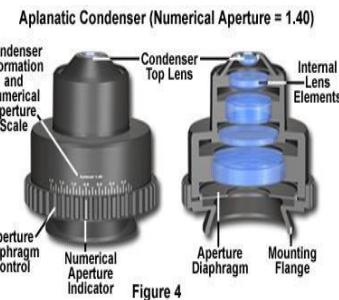
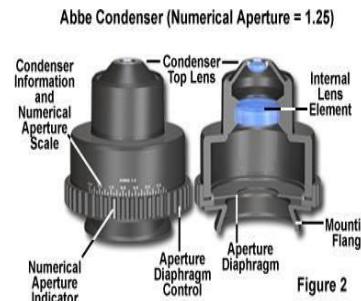
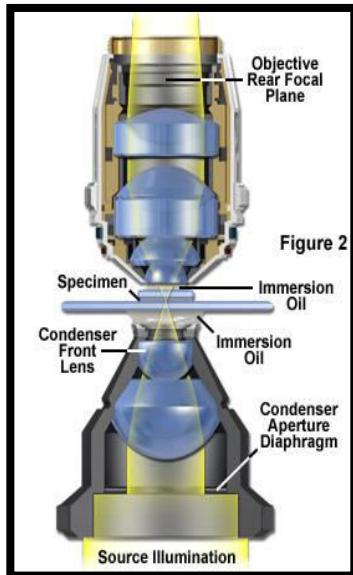
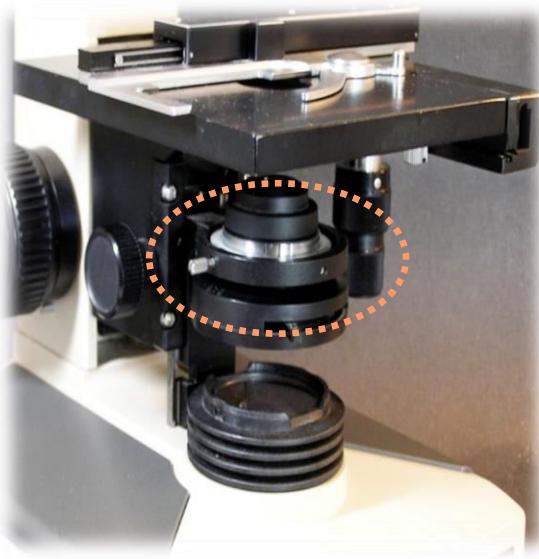
*Osnovna funkcija jeste uvećanje primarne slike koja je uvećana i fokusirana objektivima; smeštanje delova za merenje (mrežne skale)*



**PRAVILA:** uvek se koriste objektivi većeg uvećanja sa okularima manjeg uvećanja.  
Ukoliko želite finalno uvećanje 200x koriste se objektivi uvećanja 20x i okulari 10x; za  
uvećanje 400x koriste se objektivi uvećanja 40x i okulari 10x.

# KONDENZORI

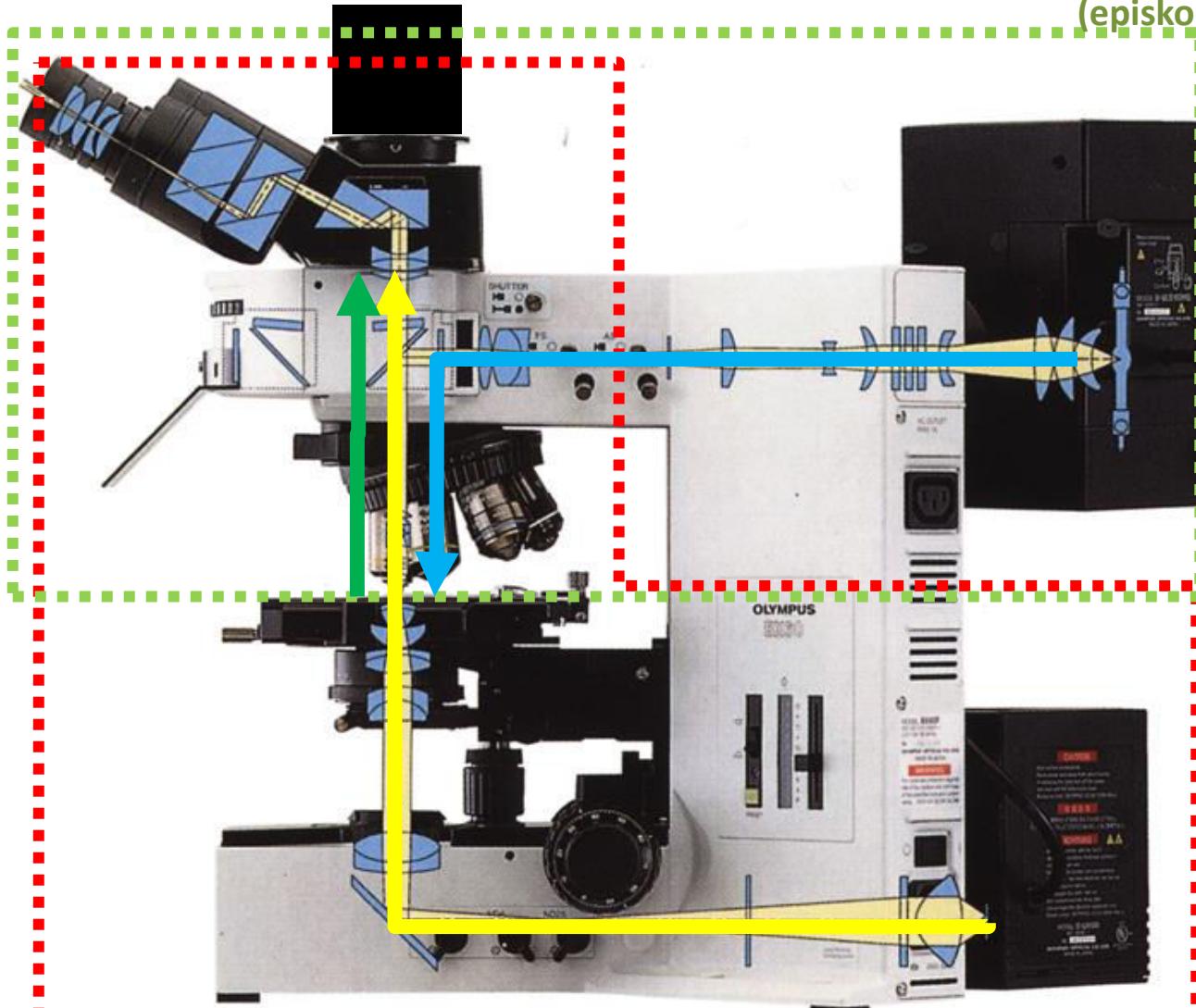
Osnovna funkcija - prikupljanje i koncentrisanje svetla koje polazi sa izvora na uzorak pre nego uđe u objektive; dodatak za FK, DIC,DF



Kondenser Type	Spherical Aberration	Chromatic Aberration
Abbe	-	-
Aplanatic	+	-
Achromatic	-	+
Aplanatic-Achromatic	+	+

# OSVETLJENJE MIKROSKOPA

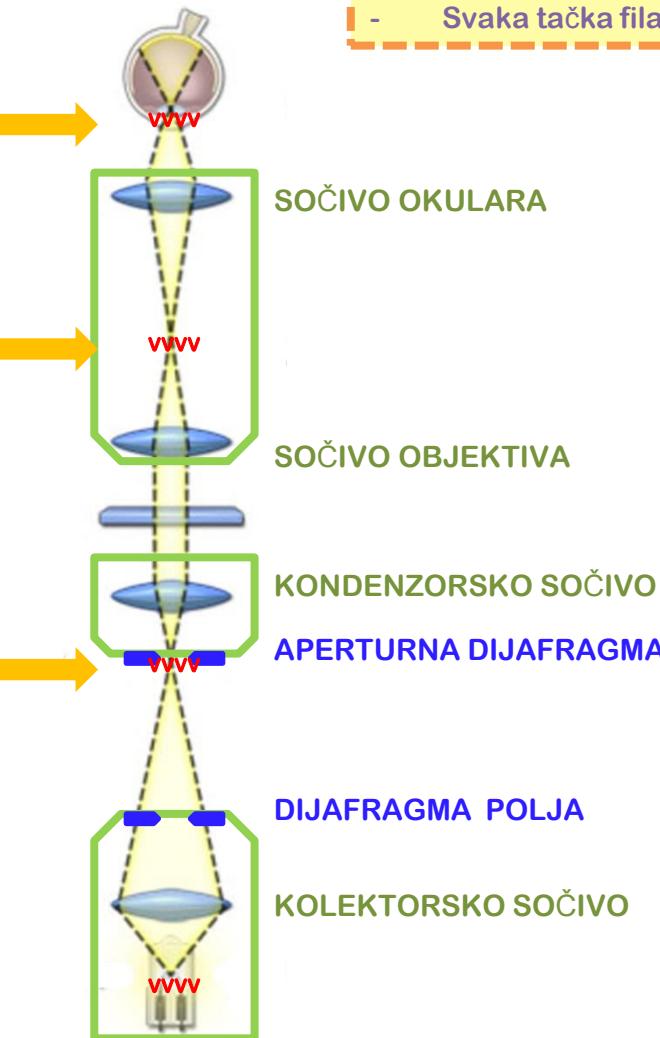
EPI-ILUMINACIJA  
(episkopska iluminacija)



TRANS-ILUMINACIJA  
(dijaskopska iluminacija)

OLYMPUS®

## ➤ Slika izvora svetlosti se projektuje u aperturu kondenzora – KÖHLER-OVA ILUMINACIJA



### UJEDNAČENA OSVETLJENOST UZORKA

- Svaka tačka objekta prima svetlost iz mnogih tačaka filimenta lampe
- Svaka tačka filimenta osvetjava više tačaka objekta



August Köhler  
1866.-1948.

1. Kolektorsko sočivo projektuje sliku izvora svetlosti u aperturnu dijafragmu kondenzora (prednja fokalna ravan kondenzorskog sočiva).
2. Kondenzorsko sočivo projektuje paralelne svetlosne zrake kroz posmatrani objekat.
3. Slika izvora svetlosti se projektuje u zadnju fokalnu ravan objektiva.

# Tipovi svetlosnog mikroskopa

## Mikroskop sa svetlim poljem (*brightfield*) – neobojen uzorak

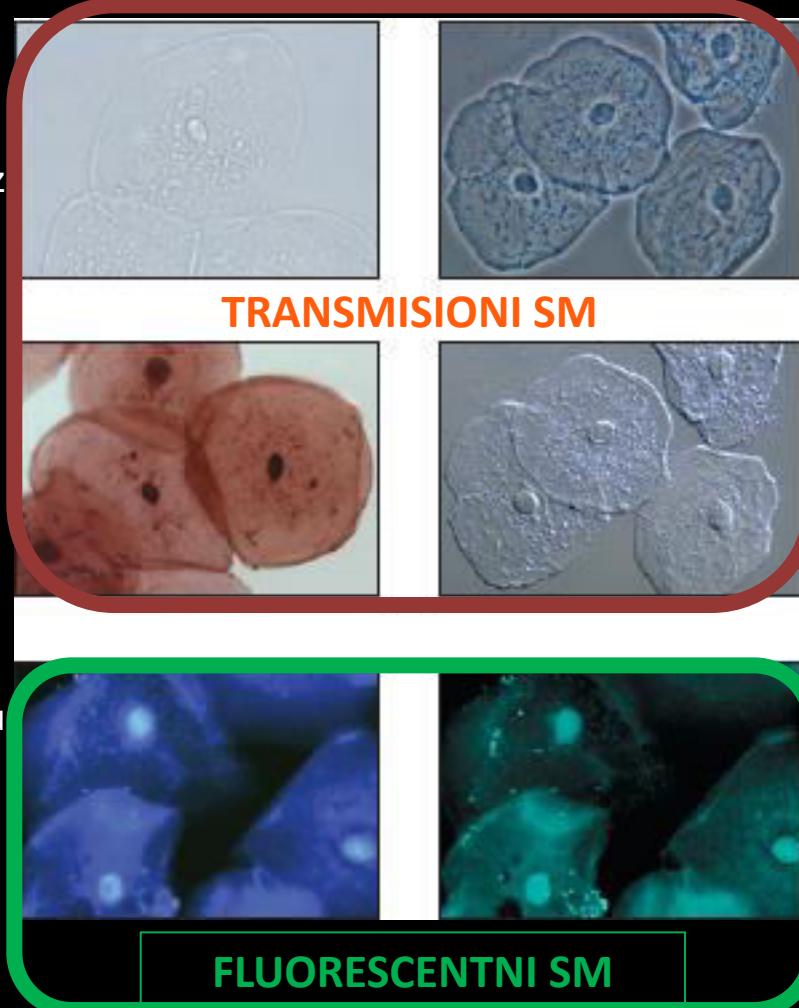
Svetlo prolazi direktno kroz uzorak.

## Mikroskop sa svetlim poljem (*brightfield*) – obojen uzorak

Bojenjem se pojačava kontrast

## Epifluorescentni mikroskop

Fluorescentne supstance u uzorku apsorbuju svetlost određene tal.dužine i emituju svetlost vidljive talasne dužine.



## Fazno-kontrastni mikroskop

Pojačava kontrast neobojenih ćelija putem izmena refraktivnog indeksa, važan u istraživanju živih, neobojenih ćelija

## Mikroskop sa diferencijalnim interferentnim kontrastom

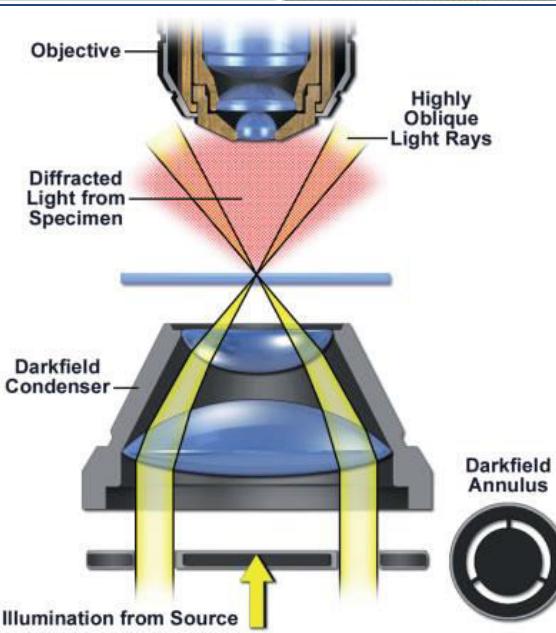
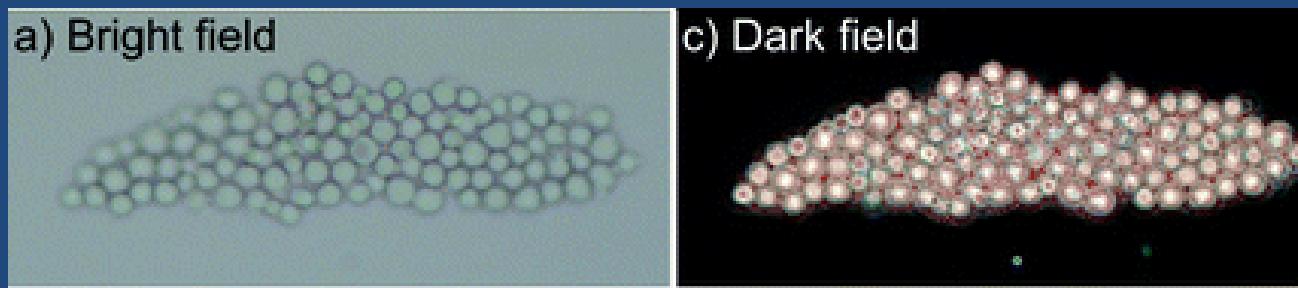
Takođe putem optičkih modifikacija pojačava razlike u refraktivnom indeksu.

## Konfokalni mikroskop

Ima mogućnost pravljenja „optičkih preseka“ uz pomoć lasera i specijalne optike – fokusira snop svetla na samo jednu ravan unutar uzorka



# MIKROSKOP SA TAMNIM POLJEM (*darkfield*)



Eliminiše se direktna,  
nedifraktovana svetlost  
već se sakuplja samo  
difraktovana svetlost koja  
potiče sa posmatranog  
objekta

## PRIMENA

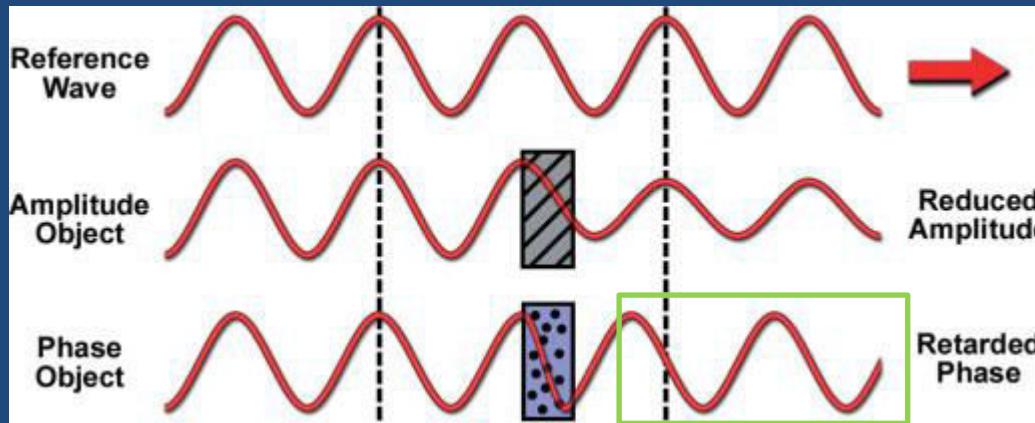
-sitni uzorci koji mogu da vrše difrakciju svetlosti:

- diatomejske alge
- bakterije i njihove flagele
- izolovane organele i polimeri (cilije, flagele, citoskelet)
- čestice zlata i srebra

# FAZNO-KONTRASTNI (PC) MIKROSKOP

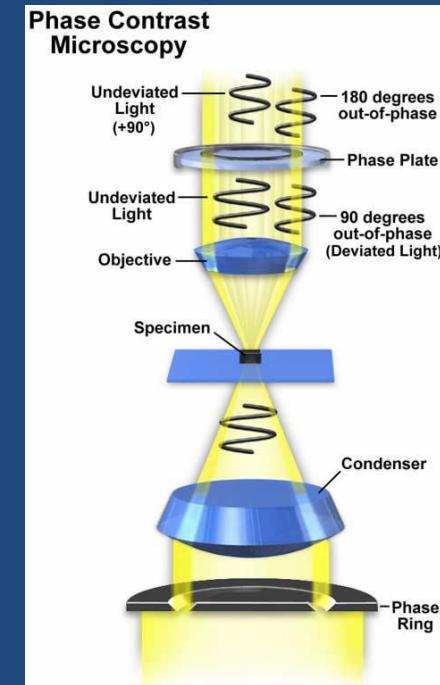
Obojeni uzorci

Transparentni  
uzorci



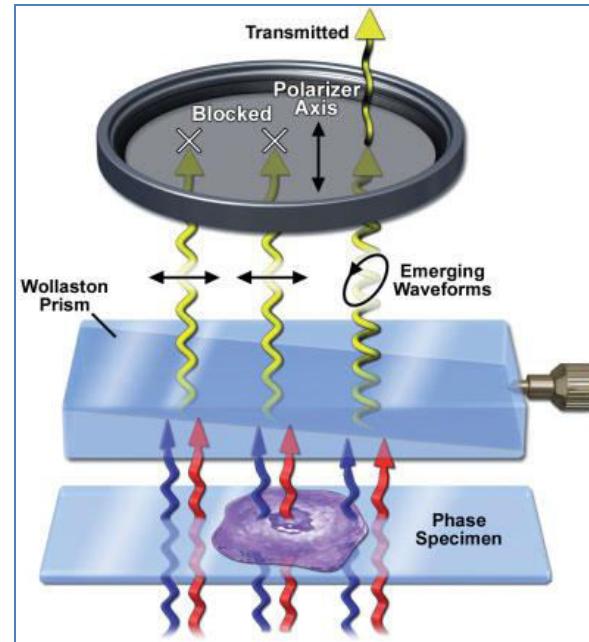
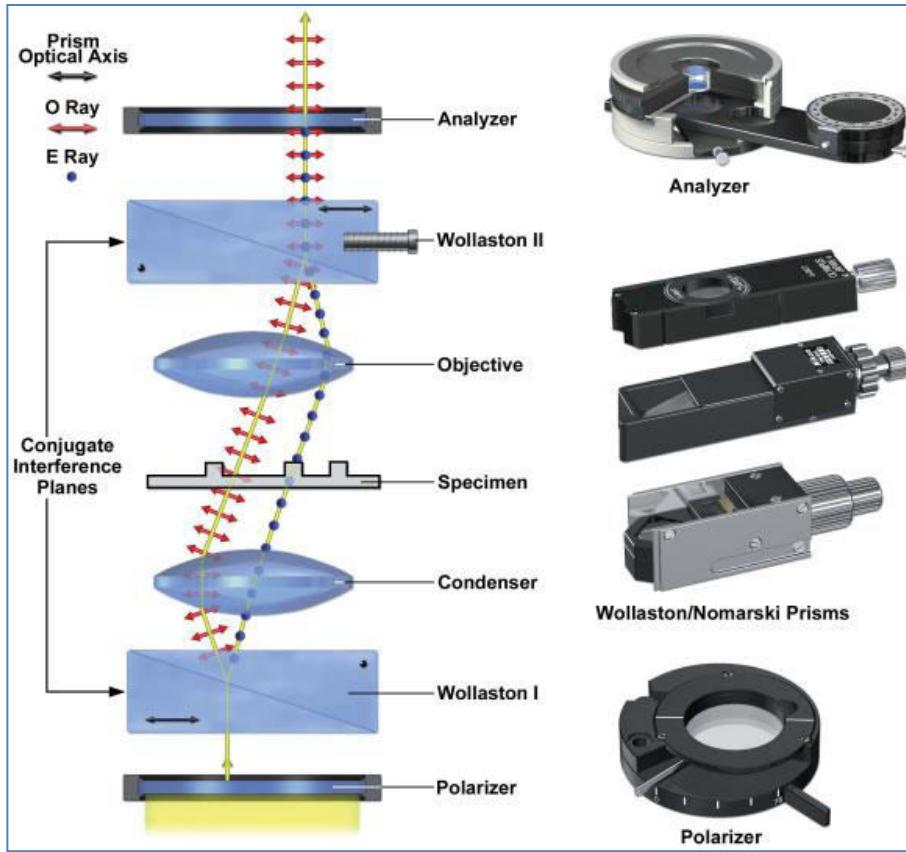
## FAZNI POMERAJ

PC mikroskop prevodi razliku u fazi difraktovanih talasa u razliku u amplitudi čime se pojačava kontrastnost.



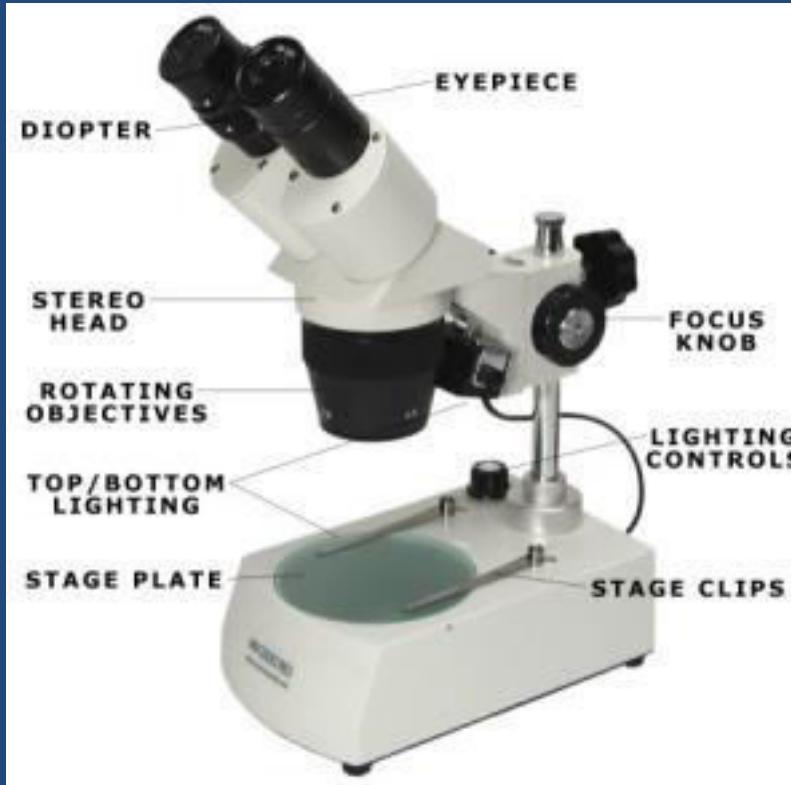
# NOMARSKI (DIC) MIKROSKOP

- Differential interference contrast microscope -

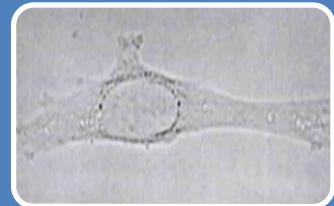


Danas se sva 4 prikaza ćelije mogu dobiti na istom mikroskopu prostim menjanjem optičkih elemenata. Jedna od velikih prednosti fazno-kontrasnog, DIC i mikroskopa sa tamnim poljem je što omogućavaju posmatranje pokreta u ćeliji prilikom procesa kao što su ćelijska deoba ili migracija.

# Stereo mikroskop (disekcionski mikroskop, binokular)



- Umesto transmitovane svetlosti koristi svetlost koja se reflektuje o površinu uzorka
- 2 optička puta – dva objektiva i dva okulara – 3D vizuelizacija
- Niža uveličanja



Mikroskop sa svetlim poljem



Fazno-kontrastni mikroskop

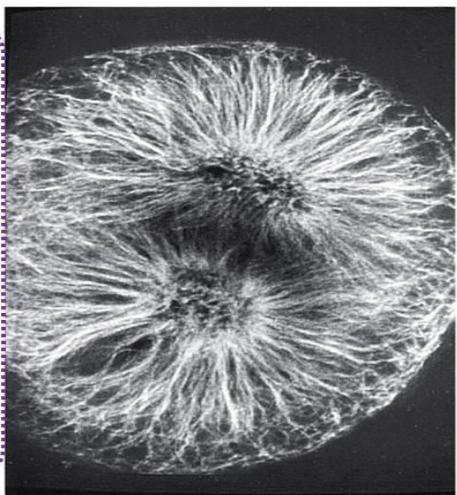
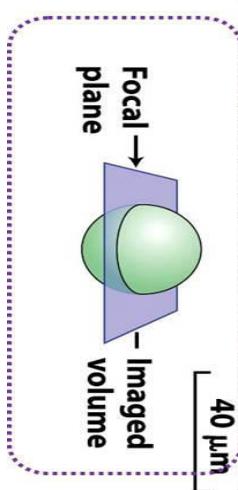
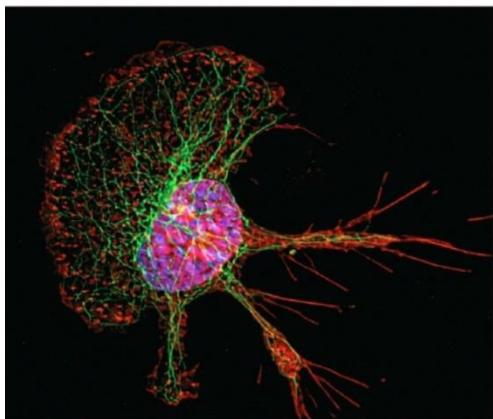
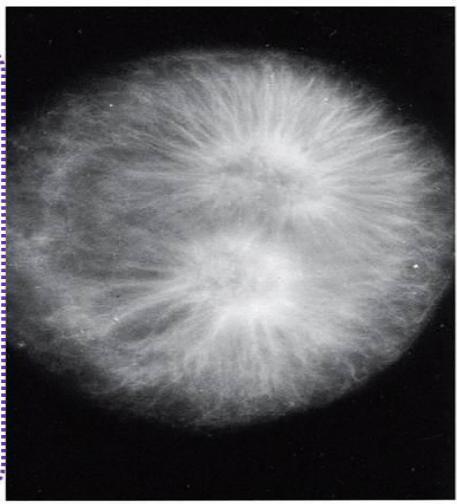
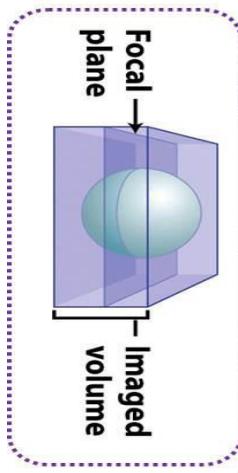
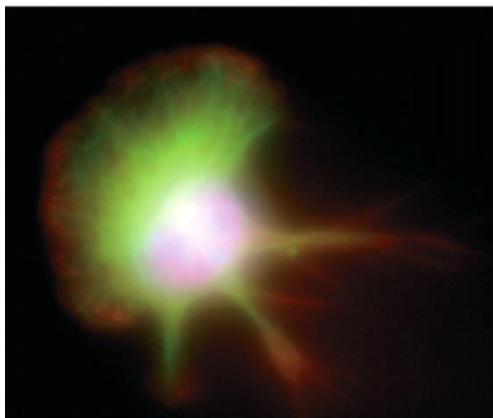


Mikroskop sa diferencijalnim interferentnim kontrastom (DIC)



Mikroskop sa tamnim poljem (darkfield)

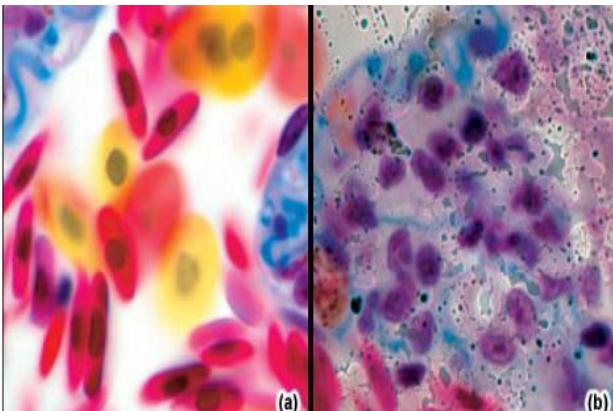
# FLUORESCENTNI SM



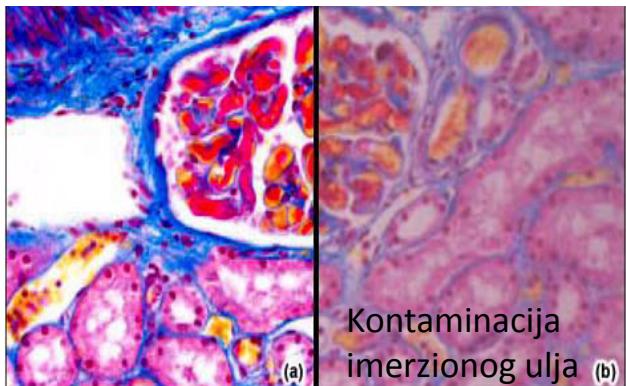
# ODRŽAVANJE MIKROSKOPA



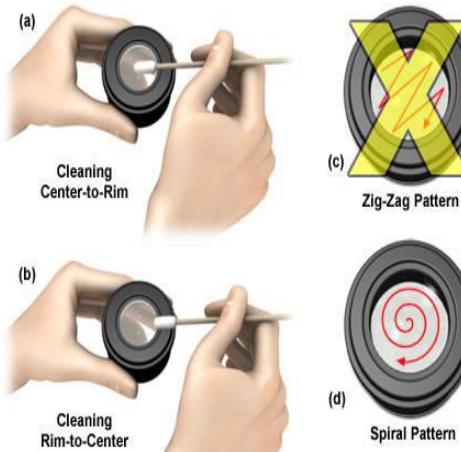
Figure 1



Efekat prljavštine na kvalitet slike



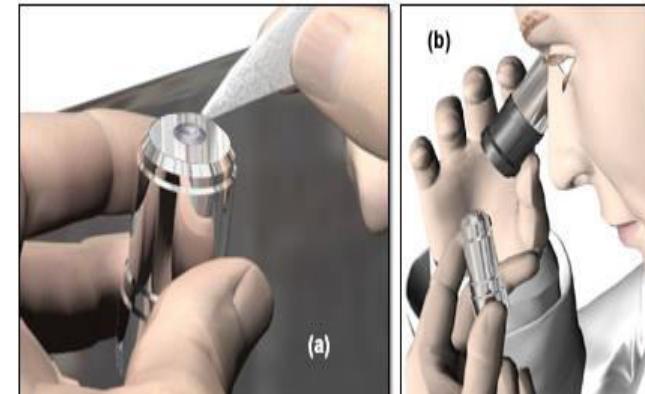
Kontaminacija imerzionog ulja



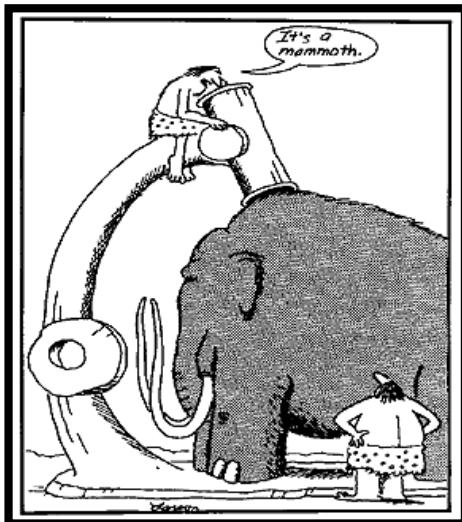
Commercial Products for Cleaning Microscope Optical Systems



Figure 4



# PRIPREMA TKIVA ZA SVETLOSNU MIKROSKOPIJU



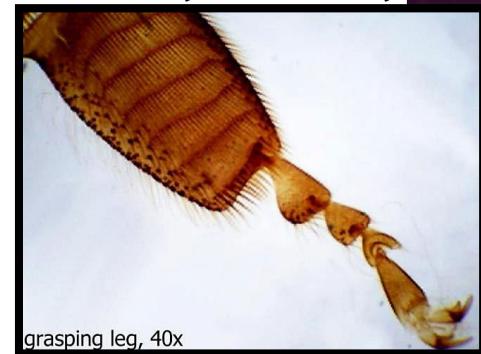
# MIKROSKOP

- Šta je dostupno?
- Šta želite da vidite?

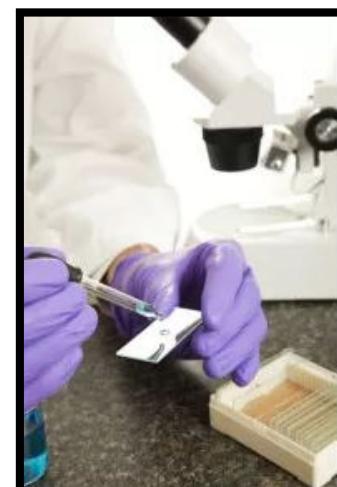
živi uzorci, površina uzorka, lokalizacija određenih molekula, ćelija u 3D.....

# VRSTE PREPARATA ZA SM (1)

- **Suvi preparati** - trajni
  - Najjednostavnija tehnika pripreme za mikroskopiranje
  - Dlake, perje, čestice polena, ekstremiteti i antene insekata, biljni materijal...



- **Vlažni preparati** – privremeni
  - Suspenzije uzorka u nekoj tečnosti (voda, slani rastvor, glicerin, imerziono ulje)
  - Akvatični uzorci, živi organizmi (protozoe...)



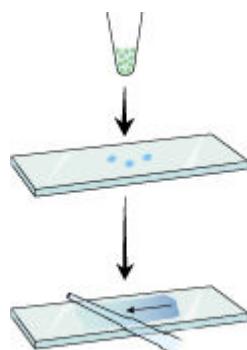
# VRSTE PREPARATA ZA SM (2)

- **Squash preparati**

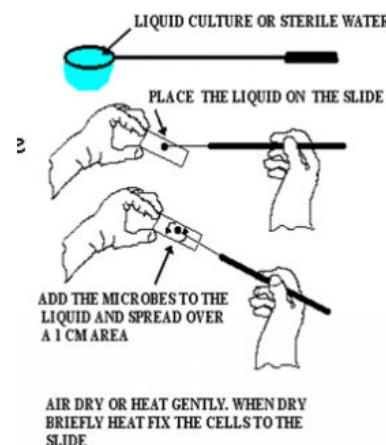
- Meki uzorci koji se gnječe pritiskanjem pokrovne pločice sa vlažnim preparatom, najčešće neki biljni uzorci (npr. meristemske ćelije korenских dlačica luka)

- **Razmazi**

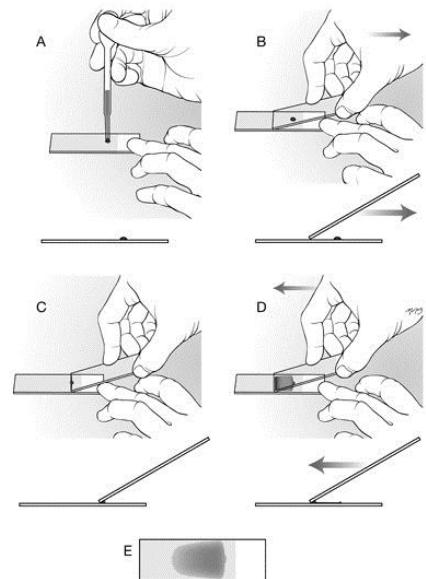
- Krv, telesne izlučevine, mikroorganizmi, ćelije



Razmaz ćelija

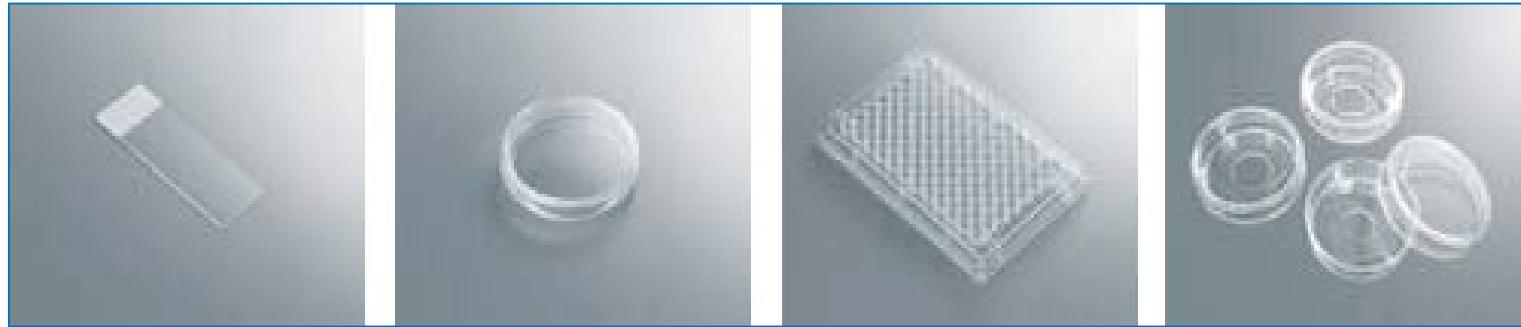


Razmaz bakterija



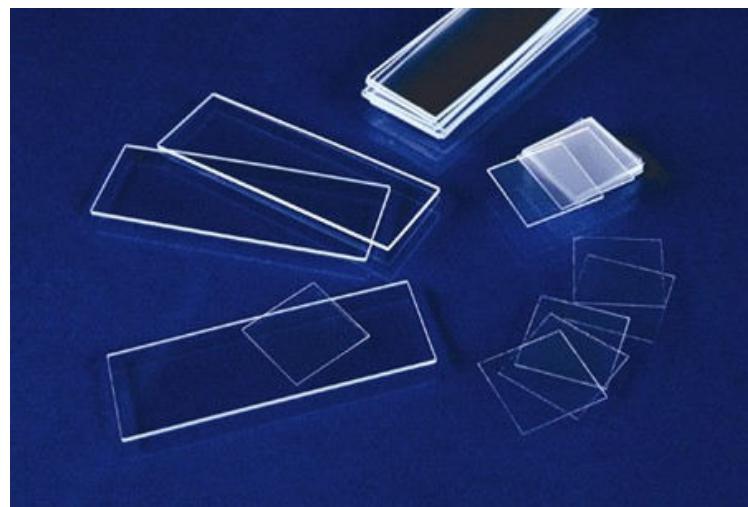
Krvni razmaz

- **Sečeni preparati** tkiva ili celih organizama
  - **HISTOLOŠKI PREPARATI**



### MIKROSKOPSKA PLOČICA

(predmetno stakalce)  
- Ravna (najčešće)  
- Sa udubljenjima



### POKROVNO STAKALCE

- Omogućava nepomičnost uzorka  
- Štiti uzorak od kretanja i kontaminacije  
- Štiti mikroskop od uzorka  
- Debljina: 0.13-0.17 mm

## Šta ćemo i kako videti na mikroskopu zavisi od:

## **Tipa mikroskopa Tipa uzorka Pripreme uzorka Bojenja tkiva**



## PRIPREMA TKIVA

### Parafinski uzorci

**UZORAK** - što svežiji  
**FIKSACIJA**- čuva (fiksira) strukturu organizaciju  
**DEHIDRATACIJA** – zamena vode u tkivu alkoholom  
**PROSVETLJAVANJE** - zamena alkohola ksilolom  
**KALUPLJENJE** - prožimanje medijumom za kalupljenje  
**SEĆENJE I BOJENJE**

### Smrznuti rezovi

Bolji su za očuvanje hemijske komponente (npr. enzimi)

### Drugo (npr . razmazi)



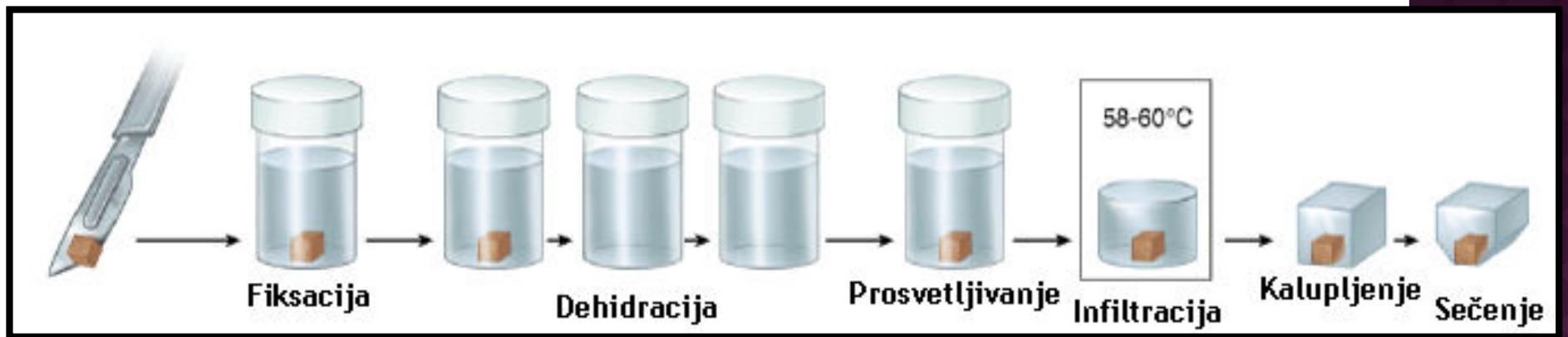
### Ciljevi preparacije:

- ✓ Održati uzorak u stanju koje je što približnije nativnom
- ✓ Očuvati što više karakteristika uzorka.
- ✓ Izbeći artefakte.

# PRIPREMA EKSPERIMENTA



# PRIPREMA TKIVA



## Hemijska fiksacija:

- *Formaldehid*
- *Paraformaldehid*
- *Metanol*
- *Buenov fiksativ...*

## Etanol ili aceton

- *Serijski rastvor rastuće koncentracije: 50%, 70%, 95%, 100%*

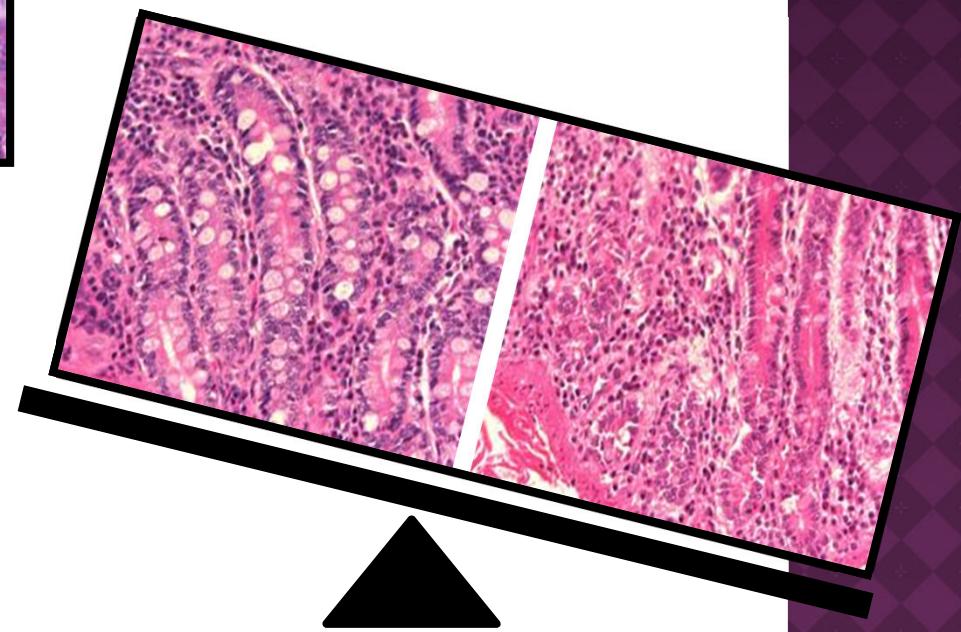
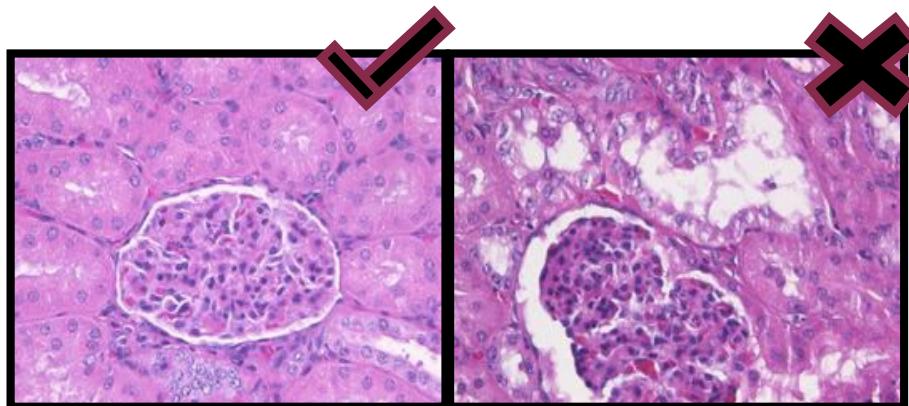
## Ksilol

## Parafin

## MIKROTOM

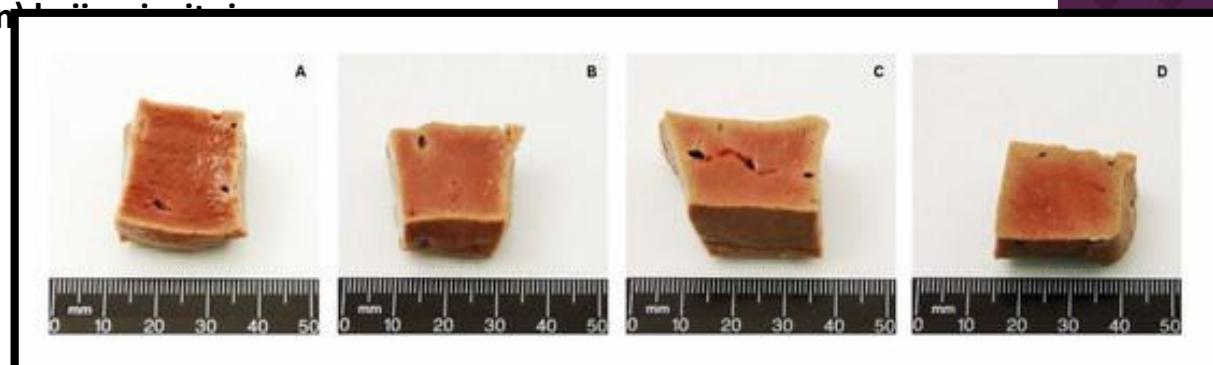
# FIKSACIJA TKIVA - FUNKCIJA

- održavanje odgovarajućeg odnosa između ćelija; ćelija i komponenata VĆM
- povećanje kontrasta između tkivnih konstituenata
- sprečavanje autolize



# FIKSACIJA TKIVA – FAKTORI KOJI UTIČU NA FIKSACIJU

- Komadić tkiva treba da bude mali (do 1 cm)
- Fiksaciju treba započeti odmah posle biopsije
- Fiksativa treba da bude 15-20 puta više nego tkiva
- Tkivo treba sa svih strana da bude okruženo fiksativom
- Brzina fiksacije se povećava na višim temperaturama, ali i autolitički procesi (preporučuje se polagana fiksacija na niskoj temperaturi)
- Tkivo ne treba fiksirati duže nego je potrebno
- Visoka koncentracija rastvora fiksativa dovodi do stvaranja kore na površini tkiva (nema prodora fiksativa u unutrašnjost)
- Strogo paziti da fiksativ bude optimalnog pH i osmolarnosti
- Tkivo se uzima tako da se ne povredi
- Važno je dobro poznavati tkivo (organ)



Fiksacija 10% nBF jetre (25 mm).

Na kraju svakog perioda kocka tkiva je presečena kako bi se uočio izgled tkiva. Posle 1h penetracija iznosi približno 0.8 mm, nakon 2h približno 1.2 mm nakon 4h i nakon 8h približno 2.2 mm. Zapaziti da je posle 8h fiksiranja ceo centralni deo tkiva ostao nefiksiran.

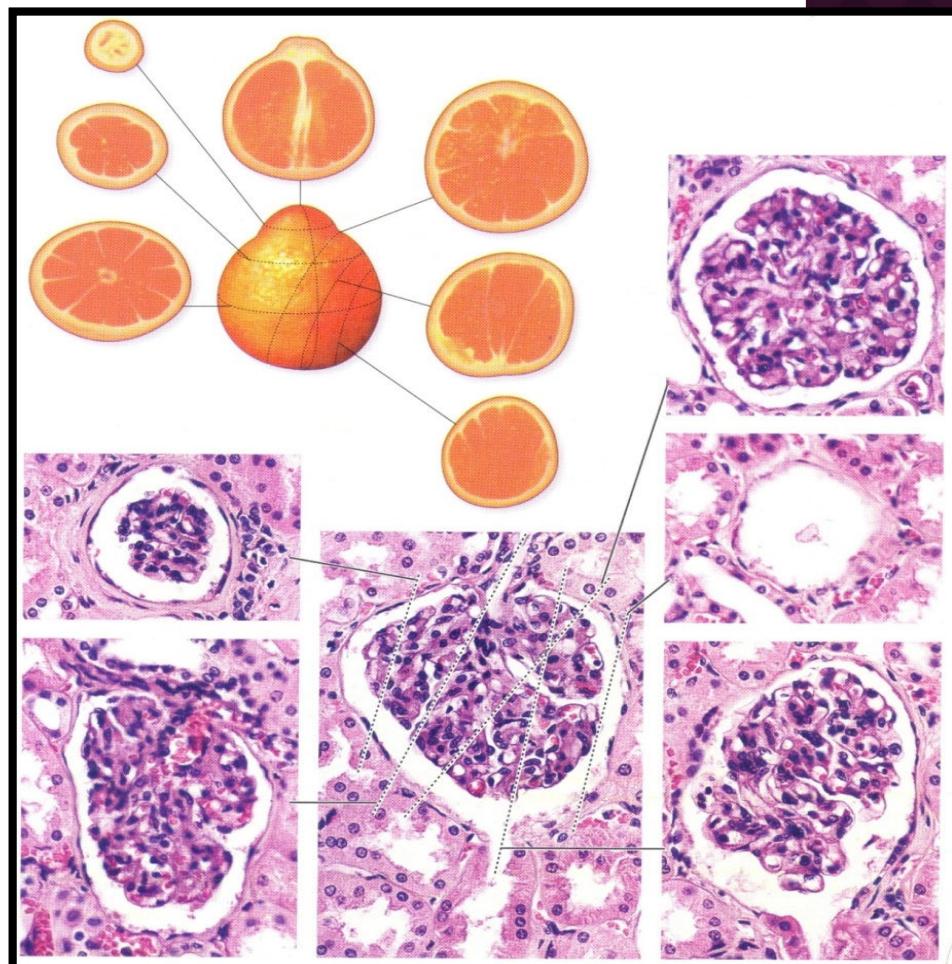
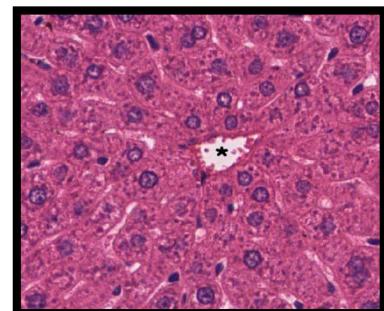
# Važnost orijentacije tkiva pri sečenju

Važna orijentacija tkiva (organa) u fiksativu (zbog sečenja uzoraka i kasnije analize )

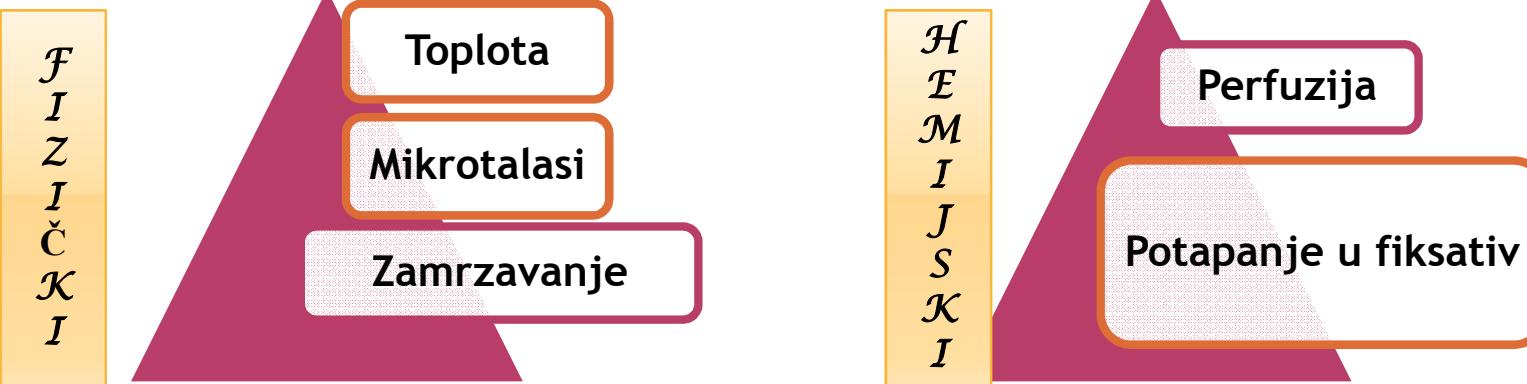
primeri:

za posmatranje uzdužnog preseka žlezdi želuca ceo zid želuca se iseče u trake i raširi na parčetu filter papira sa mukozom na gore i tako potapa u fiksativ;  
crevo se seče poprečno (predhodno se očisti od detritusa)

Da li svi organi  
moraju biti  
orientisani u  
fiksativu?



# FIKSACIJA TKIVA - METODI



## PODELA HEMIJSKIH FIKSATIVA



### Koagulativni, denaturišući fiksativi

proteinska struktura  
u vidu retikuluma  
ETANOL, METANOL,  
ACETON

### Nekoagulativni, nedenaturišići

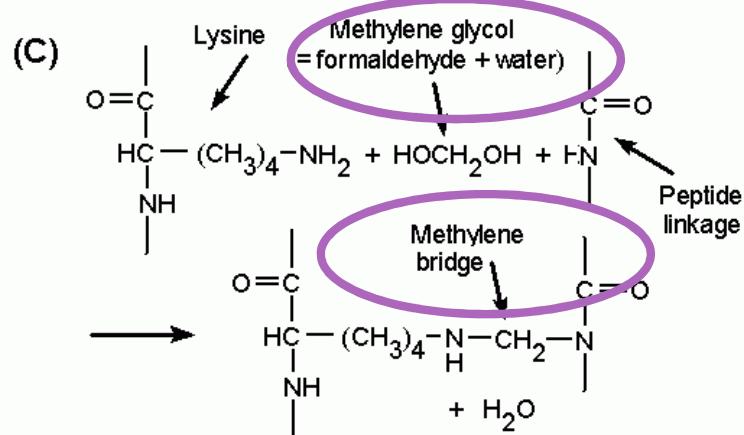
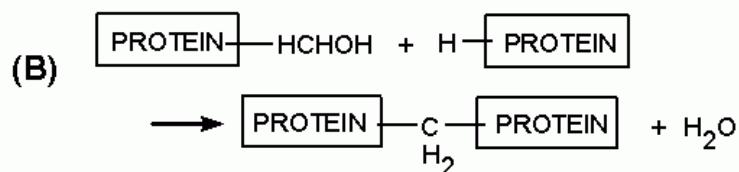
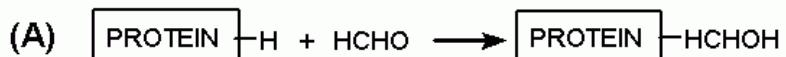
formiranje poprečnih  
veza; konverzija  
citoplazme u gel  
stanje  
**FORMALDEHID**

### složeni fiksativi

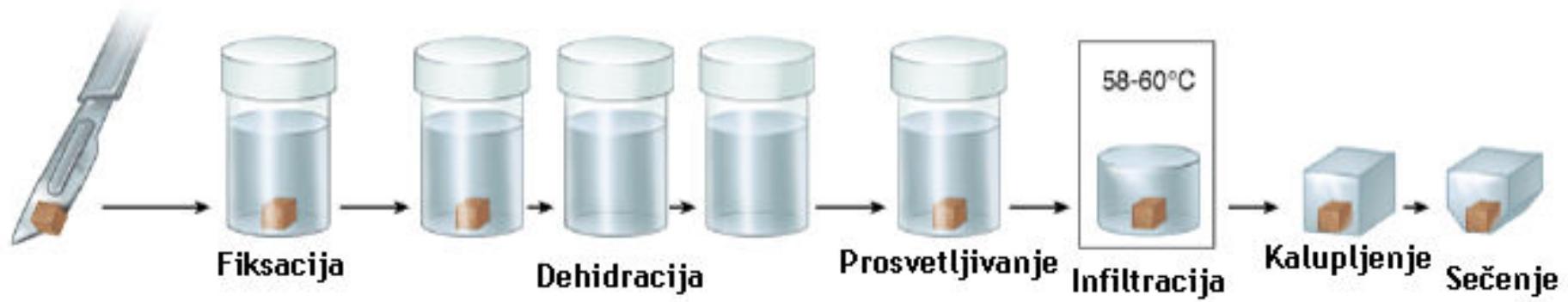
**Glikogen**  
(alkohol i  
formalin)

# FORMALDEHID

- Neutralni puferisani formalin
- Bezbojan plin CH<sub>2</sub>O
- Kupuje se kao 37% (40%) formalin i razređuje sa vodom (1:9) = 10% nF (4%)



# PRIPREMA TKIVA



## Hemijska fiksacija:

- Formaldehid
- Paraformaldehid
- Metanol
- Buenov fiksativ...

## Etanol ili acetон

- Serija rastvora rastuće koncentracije: 50%, 70%, 95%, 100%

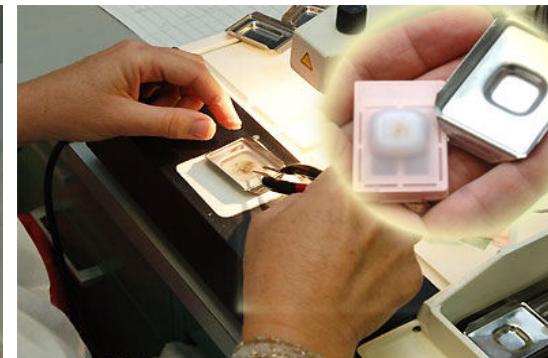
## Ksilol

## Parafin

## MIKROTOM

# KALUPLJENJE TKIVA

- Dovođenje tkiva u dovoljno čvrsto stanje kako bi moglo da se seče - kalupljenjem u parafin ili plastične smole.
  1. Nakon fiksacije tkivo se ispira vodom
  2. Uklanjanje vode iz tkiva (dehidracija) - kroz seriju alkohola rastuće koncentracije
  3. Prosvetljivanje tkiva - potapanjem u rastvarač za sredstvo za kalupljenje (ksilol)
  4. Impregnacija parafinom
  5. Kalupljenje u rastopljen parafin ( $58^{\circ}\text{C}$ ).

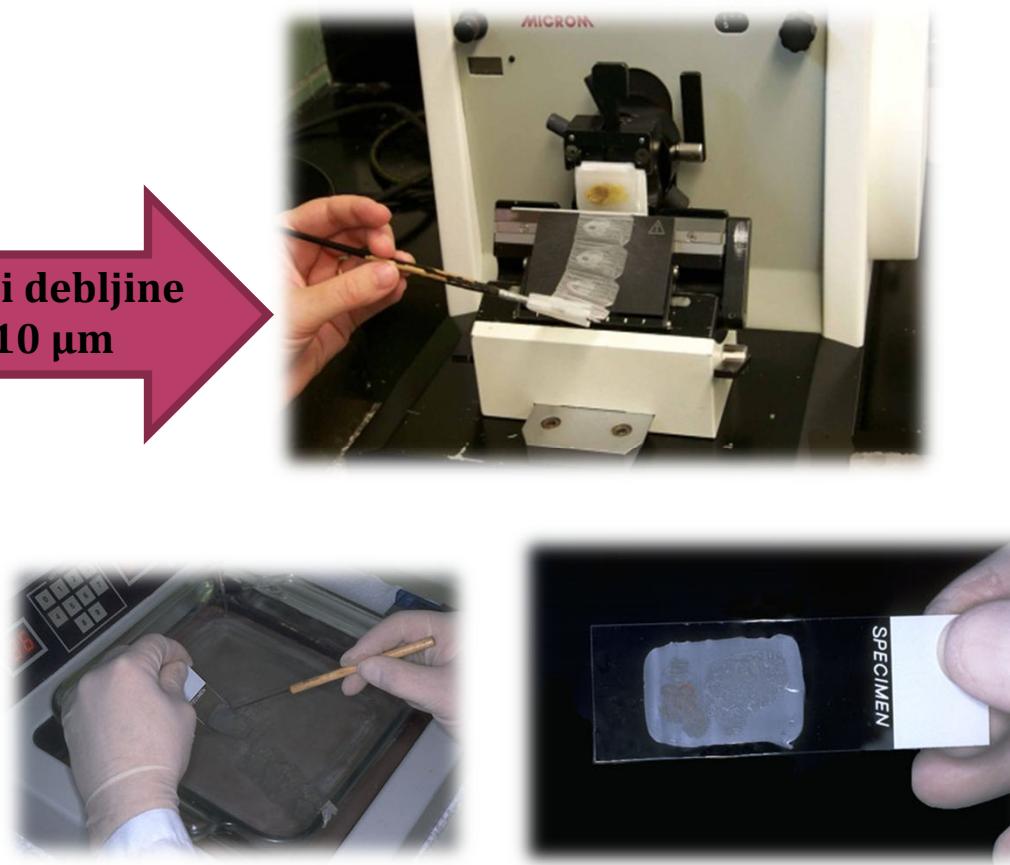


# SEČENJE TKIVA

- Mikrotom – za ukalupljene uzorke
- Kriotom (kriostat) – za zamrznute uzorke
- Vibratom - za svež, nezamrznut materijal (ukalupljen u agarozu)



Preseci debljine  
1-10  $\mu\text{m}$



# BOJENJE TKIVA I DRUGI METODI

