

Metoda: Transmisní elektronová mikroskopie

Klára Beránková, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Školitelé: Gabriela Suchá, Petr Ferczadi

Princip: Hlavním principem je zhotovení polotenkých tkáňových řezů, které jsou následně prohlíženy lékařem ve světelném mikroskopu a po jeho posudku se zhotoví ultratenké řezy. Abychom mohli nakrájet polotenské řezy, musíme nejdříve vytvořit tvrdé bločky procesem, který trvá tři dny. První den fixovaný materiál postfixujeme 1 % oxidem osmičelým a následně odvodňujeme vzestupnou řadou alkoholů, kdy zůstává přes noc v 96 % alkoholu. Druhý den dokončujeme odvodnění, vzorek prosytíme propylenoxidem a dále prosycujeme směsí propylenoxidu s připravenou směsí pryskyřic Durcupan ACM až do třetího dne. Následně se opět vzorek prosytí nově připravenou směsí Durcupan ACM a připravuje se na zalití do směsi epoxidových pryskyřic, které potom polymerují v termostatu přibližně 48 hodin. Kontrolou správně ukrojených polotenkých řezů by měla být jejich zelenkavá až růžová barva. Řezy se přenesou na podložní sklo, vysuší a obarví toluidinovou modří. Podle lékařem zhodnoceného polotenkého řezu se preparát skrojí a zhotoví se ultratenké řezy o síle 70 - 90 nm. Správně silně ukrojené ultratenké řezy mají stříbrnou až zlatavou barvu. Řezy se natahují na měděnou síťku, kterou dále kontrastujeme pomocí solí těžkých kovů uranyl acetátu a leadcitrátu. Tento proces kontrastování se musí chránit před světlem. Výsledné subcelulární struktury mají v elektronovém mikroskopu barvu šedi.

Uplatnění metody: Transmisní elektronová mikroskopie je uplatňována v histologii za účelem pozorování buněčných organel i mezibuněčných struktur. V klinické medicínské praxi se tato metoda nejvíce využívá při zpracování svalových biopsií a biopsií ledvin.

Úskalí metody: Základem musí být dobře odebraný vzorek s dostatečným množstvím materiálu, nevyschlý a dostatečně fixovaný. Měděná síťka musí být před použitím vždy vyčištěna pomocí ultrazvuku. Příprava preparátu pro vyšetření je časově náročná a samotná metoda je velmi drahá.

Přístrojové vybavení: Pro nakrájení ultratenkých řezů používáme ultramikrotom, ve kterém je uchycen skleněný nebo diamantový nůž. Výsledný řez je vyšetřován ve vakuu v elektronovém mikroskopu. Zobrazujícím prostředkem je zde svazek elektronů. K tomu potřebujeme vakuu, ve kterém emituje žhavená wolframová katoda elektrony a ty jsou následně urychlovány k anodě. Výsledný obraz je po dopadu na fluorescenční stínítko transformován v obraz viditelným okem.

Odběr a transport: V histologické laboratoři ve FN Plzeň Lochotín převážně vyšetřují transmisní elektronovou mikroskopií punkční vzorky vlastních ledvin. Svalové biopsie se zde vůbec neprovádí, pouze připravují pro finální zpracování a následně zasílají do konkrétních fakultních nemocnic, FN Motol a FN Brno, kde se svalovými biopsiemi zabývají. Vlastní ledvinový vzorek je ihned po odběru transportován v nefixovaném stavu do laboratoře. Odběr se provádí v lokální anestezii punkční jehlou, která je kontrolována ultrazvukem. Standardně by měl vzorek ve tvaru malého válečku obsahovat renální kůru. Takto odebraný punkční vzorek je dodán do laboratoře na gáze namočené ve fyziologickém roztoku uvnitř Petriho misky, kde je položen na ledu nebo chladicí gelové podložce, která

by měla zabránit autolýze. Punktát musí být stále vlhký, jelikož hrozí vyschnutí a zničení odebraného vzorku. Vzorek se dále prohlíží pod mikroskopem a podle posouzení se následně rozčlení žiletkou na tři části, tak aby v každé byla přítomna tkáň s glomerulem. Jedna část se následně fixuje ve 4 % paraformaldehydu pro elektronovou mikroskopii a zbylé dvě části jsou určeny k histologickému vyšetření a vyšetření přímé imunofluorescence.