SBORNÍK

I. (obnoveného) Výročního shromáždění

Československé společnosti pro elektronovou mikroskopii

uspořádaného ve spolupráci s Laboratoří elektronové mikroskopie Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích

dne 10. července 1998

OBSAH SBORNÍKU

Belej K., Fuseková E., Ochodnická E., Bošelová Ľ. Ranvierov zárez – metodický problém	14
Benada O., Venclíková Z Elektrondenzní inkluze v patologicky zbarvené lidské gingivě (dásni) – EDX mikroanalýza	15
<i>Bošelová Ľ., Belej K., Ochodnická E., Fuseková E.</i> Cytoplazmatické štruktúry Schwannovej bunky po ischemickom poškodení	16
Bruňanská M., Gustafsson M.K.S., Fagerholm HP. Senzorické zakončenia cestóda Proteocephalus Exiguus (Proteocephalidea)	17
S. Čech Ultrastrukturní topochemie glykogenu v rohovkovém epitelu některých savců	18
Delong A., Hladil K., Kolařík V. Úvaha o nízkovoltovém prozařovacím elektronovém mikroskopu LVTEM-5	19
Fuseková E., Belej K., Ochodnická E., Bošelová Ľ. Elektrónovomikroskopické pozorovanie včasných zmien na myelinizovaných nervových vláknach po stlačení periférneho nervu	20
Hutař O. Application of noncharging microscopy in semiconductor fabrication	21
Konrádová V., Uhlík J., Vajner L., Zocová J. Ultrastruktura epitelu trachey králíků po inhalaci preparátu Placebo inhaler	22
<i>Maretta M., Marettová E.</i> Changes in the developing spermatozoa after long-term treatment with lead acetate in the rabbit	23
Marettová E., Maretta M. Stavba lamina propria semenníkov králika po chronickom pôsobení olova	24
Ochodnická E., Ochodnický M., Belej K., Fuseková E., Bošelová Ľ. Výskyt elektrónovodenzných granúl pri experimentálnej diabetickej neuropatii	25
<i>Philimonenko A.A., Janáček J., Krekule I., Hozák P.</i> A novel stereological evaluation of colocalization patterns using double immunogold labelling: a study on DNA replication	27
<i>Philimonenko V.V., Špátová M., Hozák P.</i> Uncovering the skeletal structures of cell nuclei: the use of resinless sections	28
Stankovič J., Šamajová E., Kraus I. Využitie elektrónovej mikroskopie pri aplikácii rozmerov acikulárnych minerálov na ich genézu a potenciálne environmentálne riziko	29

Stankovič J., Krištín J. Charakteristika zlata na zrudneniach v Západnych Karpatoch sledovaná elektrónovou mikrosondou	30
Uhlík J., Konrádová V., Vajner L., Zocová J. Srovnání účinku cholinergní stimulace na sekreční elementy trachey a terminálních bronchiolů	31
Weyda F., Nebesářová J. Methods of biological specimen preparation for SEM	32
Zadražil M., Frank L., Müllerová I. Rastrovací elektronová mikroskopie nevodivých vzorků	33
<i>Žižka Z., Weiser J., Jizba J.</i> Porovnání ultrastrukturních změn buněk komára Culex sitiens po působení dvou vysoce purifikovaných makrotetrolidů	34

PROGRAM SHROMÁŽDĚNÍ

09,00	Zahájení
09,15	Přednáška
10,15	Přestávka
10,30	Valné shromáždění Československé společnosti pro elektronovou mikroskopii
11,30	Odborné příspěvky
	P. Hozák:
	Nová metoda zjišťování kolokalizace antigenů při detekci pomocí
	koloidního zlata: příklad replikace DNA
	<u>J. Nebesářová</u> , M. Maňurová:
	Kryometody v přípravě biologických objektů pro transmisní
	elektronovou mikroskopii
	M. Zadražil, <u>L. Frank,</u> I. Müllerová:
	Rastrovací elektronová mikroskopie nevodivých vzorků
12,30	Diskuse u posterů
13,00	Oběd
14,00	Diskuse u posterů
14,30	Prezentace firem
	Delong Instruments, V. Kolařík
	Foto-World s.r.o., J. Votýpka
	JEOL (Europe) S.A., Z. Vlček
	Philips Česká republika, s.r.o., A. Zemek
15.00	

15,30 Závěrečná diskuse, zakončení

RANVIEROV ZÁREZ - METODICKÝ PROBLÉM

Belej K., Fuseková E., Ochodnická E., Bošelová Ľ.

Ústav histológie a embryológie, JLF UK Malá Hora 4, 036 01 Martin

Pri štúdiu ultraštruktúry periférneho nervu sme venovali zvláštnu pozornosť oblasti nódia a paranódia myelinizovaných periférnych nervových vlákien. Oblasť nódia je z funkčného hľadiska dôležitá pre vedenie vzruchu. Je miestom, kde dochádza k polarizácii a depolarizácii membrány axónu, ktorá je v tejto oblasti obnažená - nie je krytá myelínovou pošvou. Zasahujú sem mikroklky Schwannovej bunky a prekrýva ju súvislá bazálna membrána. Sledovali sme morfologické zmeny nódia myelinizovaného periférneho nervového vlákna za fyziologických podmienok na natiahnutej a povolenej končatine. Zamerali sme sa na zmeny axónu v tejto oblasti.

Nervus ischiadicus sme excidovali a rýchlo ponorili do veľkej kvapky 3% Glutaraldehydu pufrovaného fosfátovým pufrom na pH 7,2 - 7,3. Vo fixačnom roztoku sme nerv rozdelili ostrou žiletkou na 1 mm segmenty, aby sa tkanivo rýchlo a kvalitne prefixovalo. Spracovali sme ho metodikami pre elektrónovomikroskopické pozorovanie. Experimentálny materiál pri delení v kvapke fixačného roztoku obsahoval na ultraštrukturálnej úrovni množstvo artefaktov.

Zistili sme, že tento postup fixácie materiálu, ktorý sa v praxi bežne používa, nie je vhodný pre spracovanie periférneho nervu. Preto sme nervus ischiadicus morčaťa u 12 experimentálnych zvierat fixovali *in situ* v záreze medzi svalmi stehna na uvoľnenej končatine tak, že sme na obnažený nerv naliali fixačný roztok. Po 10 min. fixácie *in situ* sme vyexcidovali nerv a ponorili do kvapky fixačného roztoku, kde sme ho porcovali na 1 mm dlhé segmenty. Ďaľšie spracovanie bolo zhodné s vyššie uvedeným spôsobom.

Podľa našich zistení pri elektrónovomikroskopických pozorovaniach povoleného a natiahnutého nervus ischiadicus morčaťa môžeme konštatovať, že nódium myelinizovaného periférneho nervového vlákna a nervové vlákno celé sú konštruované veľmi dômyselne. Pevnejšie časti /kryté myelínovou pošvou/ sú prerušované pružnými útvarmi /nódium/, ktoré dovoľujú mechanické pohyby v dôsledku kontrakcie okolitých svalov, zohýbania kĺbov a naťahovania končatín. Tento fakt môže sčasti vysvetliť aj modeláciu nódií v CNS, kde nie je vytvorené súdkovité rozšírenie axónu v oblasti Ranvierovho zárezu, lebo axóny CNS nepodliehajú dĺžkovým zmenám.

- Bunge, R.P., Glial Cells and the Central Myelin sheath. Physiol. Rev., <u>48</u>/1968/ 197 - 251
- [2] Landon, D.N., The Peripheral Nerve. London New York, Chapman and Hall /1976/836
- [3] Mugnaini, E., Fine Structure of Myelin Sheaths. Weinheim New York, Verlag chemie /1978/3 - 31

ELEKTRONDENSNÍ INKLUZE V PATOLOGICKY ZBARVENÉ LIDSKÉ GINGIVĚ (DÁSNI) - EDX MIKROANALÝZA

Oldřich Benada¹, Zora Venclíková²

¹Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 - Krč, ²Výzkumný ústav stomatologický MZ ČR, Vinohradská 48, 120 00 Praha, e-mail: benada@biomed.cas.cz

Patologicky, šedě, zbarvená gingiva a sliznice se vyskytuje u některých pacientů, kterým bylo nutné z protetických důvodů zhotovit kořenové nástavby a korunky ze stomatologických slitin, obvykle používaných v České republice. Charakteristickým znakem, nacházeným při elektronmikroskopickém vyšetřování biopsií šedě zbarvené gingivy, je přítomnost elektrondensních inkluzí v preparátech.

V této studii jsme se zaměřili na tyto otázky, které je možné odpovědět pomocí EDX mikroanalýzy:

- Jaký je nejvhodnější způsob preparace mikrobiopsií lidské gingivy pro účely EDX mikroanalýzy a korelace jejích výsledků s histologickými nálezy?

- Existuje závislost mezi kompozicí stomatologických slitin a výskytem elektrondensních inkluzí?

Mikrobiopsie odebrané se souhlasem pacientů byly fixovány dvě a půl hodiny 2,5 % glutaraldehydem. Polovina vzorků byla dále zpracována klasickým způsobem pro transmisní elektronovou mikroskopii. U druhé poloviny byla vynechána postfixace OsO4. Odvodněné vzorky byly zality do Eponu 812. Ultratenké řezy byly nabírány na klasické měděné síťky a na plastikové síťky pokryté formvarovým filmem. Síťky byly dále přímo použity pro analýzy a nebo ještě kontrastovány podle [1].

TEM analýzou byl v subepiteliálním vazivu zjištěn výskyt elektrondensních partikulí lokalizovaných, jak ojediněle, tak i ve skupinách. Elektrondensní partikule byly zjištěny ve fibroblastech i v extracelulární matrix. EDX mikroanalýza byla provedena ve STEM modu elektronového mikroskopu Philips CM12/STEM. Tento způsob byl vybrán, jelikož umožňuje zároveň zaznamenat digitálně obraz analyzovaného preparátu a to i z nekontrastovaných preparátů fixovaných pouze glutaraldehydem. V elektrondensních partikulích byly zjištěny následující prvky: **Ag**, **Zn**, **Ti**, **Fe**, **Cr**, **Cu**, **Ca**, **S**, **Se**, **Si** a **Mg**. Inkluze obsahující stříbro vždy obsahovaly i síru a vykazovaly charakteristický oválný tvar. Tento typ inkluzí bylo možné detekovat na všech typech preparátů tj. postfixovaných

OsO4 i nepostfixovaných, kontrastovaných i nekontrastovaných a dokonce i na řezech připevněných na klasických měděných síťkách. Protetické slitiny použité u pacientů obsahovaly pouze tyto kovy: **Ag**, **Au**, **Cu**, **Pt**, **Zn**, **Sn** a **Cd**. Z výše uvedeného je patrné, že některé inkluze byly tvořeny i prvky, které se v protetických slitinách nevyskytují. Tyto předběžné výsledky ukazují, že se na výskytu elektrondensních partikulí v gingivě mohou podílet kromě koroze stomatologických slitin i jiné mechanizmy.

Tato práce byla podporována grantem č. 4084-3 interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví České republiky.

[1] E. S. Reynolds, J.Cell. Biol. 17 (1963), 208-212

CYTOPLAZMATICKÉ ŠTRUKTÚRY SCHWANNOVEJ BUNKY PO

ISCHEMICKOM POŠKODENÍ

Bošelová Ľ., Belej K., Ochodnická E., Fuseková E.

Ústav histológie a embryológie, JLF UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin

Ischemické lézie v periférnom nerve experimentálnych zvierat z morfologického hľadiska sú v literatúre uvádzané s mnohými rozdielnymi závermi [1,2,4,5]. Je to spôsobené väčšou rezistenciou nervu na ischémiu a tým obtiažnosťou vyvolať totálnu ischémiu v experimente. Autori [3,6] uvádzajú, že z jednotlivých súčastí myelinizovaných nervových vlákien sú na ischémiu najcitlivejšie Schwannove bunky. V našej práci sme sledovali ischemické zmeny v cytoplazmatických komponentoch v n. ischiadicus morčaťa.

Ischémiu sme vyvolali podväzom aorta abdominalis. Zvieratá prežívali 1, 2, 4 a 8 dní. N. ischiadicus sme odoberali tesne nad jeho rozvetvením. Nervy pokusných aj kontrolných zvierat sme spracovali bežnou metódou pre elektrónovú mikroskopiu.

Zistili sme, že ischémia zapríčinila ubúdanie až úplné vymiznutie GER, vznik vakuol, ktoré pochádzali z alterovaných organel. Plazmalema Schwannových buniek neobsahovala pinocytotické vezikuly. Jadrová membrána bola zvlnená, alebo tvorila záhyby. Alterácie boli najmarkantnejšie na štvrtý deň po ligatúre, kedy množstvo rôzne veľkých vakuol a denzných teliesok tvorili podstatnú časť cytoplazmy Schwannovej bunky. Alterované organely boli aj vo vnútornom cytoplazmatickom kanáli, v laterálnych slučkách a Schmidtových - Lantermannových štrbinách, ktoré boli dilatované. Na 8. deň sme pozorovali viac buniek, ktorých cytoplazma obsahovala GER a mitochondrie bez dilatácií s dobre znázornenou vnútornou štruktúrou.

Naše výsledky ukázali, že Schwannove bunky sú na ischémiu citlivejšie ako axóny. Stupeň poškodenia bol rôzny, zahrňoval dezintegráciu ribozómov a vznik vakuol, v závislosti na dĺžke ischémie. Zistili sme, že vznik vakuol v cytoplazme je proces reverzibilný, ktorý je prejavom využitia vlastných proteínov cytoplazmy pri redukcii proteosyntézy. Degeneratívne zmeny v Schvannových bunkách sú po predĺženom prežívaní vystriedané kompenzačnými procesmi, čo sa prejavilo na 8. nami sledovaný deň.

- [1] Davis, J.N., In : Fahn, es /Ed./: Advances in neurology 26 /1979/ 350
- [2] Hess,K. /et al/ J.Neurol.Sci. 44:1 /1979/ 19 43
- [3] Ide,C. /et al/ Progress in Neurobiol.34 /1990/ 1 38
- [4] Korthals, J.K., Wisniewski, N.H., J.Neurol.Sci. 24 /1975/65 76
- [5] Parry, G.J., Brown, M.J., Ann. Neurol. 11 /1982/147 154
- [6] Weller, R.O., Cervós Navarro, J. /eds/ : Pathology of Peripheral nerves /1977/ 255

SENZORICKÉ ZAKONČENIA CESTÓDA *PROTEOCEPHALUS EXIGUUS* (PROTEOCEPHALIDEA)

Magda Bruňanská, Margaretha K. S. Gustafsson, Hans - Peter Fagerholm

Parazitologický ústav SAV, Protifašistických bojovníkov 5, 040 00 Košice, Slovenská republika, E – mail: brunan@saske.sk

Senzorické zakončenia v tegumente cestódov reprezentujú s veľkou pravdepodobnosťou receptory [1]. Ich ultraštruktúra bola študovaná doteraz len u zástupcov veľkých skupín cestódov ako sú napr. Pseudophyllidea [2], Cyclophyllidea [3], Caryophyllidea [4] alebo Tetraphyllidea [5]. Menej známym radom sú Proteocephalidea, zahrňujúce parazitov lososovitých a pstruhovitých rýb.

Dospelé červy *P. exiguus* boli získané z čreva pstruha dúhového, *Onchorhynchus mykiss.* Cestódy, rozdelené na 14 častí, boli po opláchnutí fyziologickým roztokom fixované v 3.5% gluteraldehyde v 0.1 M kakodylátovom pufri počas 3 hod. Potom boli spracované bežnou metodikou používanou pre prípravu vzoriek pre elektrónovú mikroskopiu.

Senzorické zakončenia vyskytujúce sa v tegumente *P. exiguus* sú dvojaké: s cíliou, alebo bez cílie. Ciliárne receptory sú lokalizované predovšetkým na laterálnych stranách skolexu. Majú cibuľovitý alebo oválny tvar. Obsahujú mitochondrie, mnoho elektrón-svetlých vezikúl, príležitostne mikrotubuly. Cílium rôznej dĺžky (od 0.4 do 1.4 μ m) je centrálne situované v bazálnom teliesku, ktoré je obklopené dvomi elektróndenznými "goliermi". Cílium obsahuje mikrotubuly. Ciliárne receptory opísané v tomto príspevku sú podobné ciliárnym receptorom, ktoré sú známe u iných plathelmintov. Rôzni autori predpokladajú, že ciliárne receptory slúžia u rôznych druhov cestódov buď ako mechano- alebo chemoreceptory [6]. Je pravdepodobné, že senzorické zakončenia s dlhšími cíliami slúžia ako mechanoreceptory, kým zakončenia s kratšími cíliami môžu reagovať aj na chemické podnety.

V tegumente *P. exiguus* sa nachádzajú aj nervové zakončenia, ktoré neobsahujú cílium. Sú úplne ponorené do tegumentu, majú kyjovitý tvar a sú lokalizované prevažne v blízkosti laterálnych prísaviek. Receptory sú prichytené k tegumentu cirkulárnymi dezmozómami, ktoré sú napojené na elektróndenzný "golier". Niektoré z týchto receptorov obsahujú "koreň", ktorého ultraštruktúra bola opísaná i dokumentovaná [7]. Všetky receptory tohoto typu majú veľké mitochondrie, poukazujúce na vysokú metabolickú činnosť. Tieto senzorické zakončenia by mohli monitorovať stupeň kontrakcie skolexu počas procesu jeho prichytenia k črevu hostiteľa a tým by mohli mať mechanorecepčnú alebo propriorecepčnú funkciu.

- [1] Smyth J. D., The physiology of cestodes (1969).
- [2] Andersen K., Z. Parasitenkd. 46 (1975), 253.
- [3] Fairweather I. et al., Parasitology 86 (1983), 89.
- [4] Richards K. S. et al., J. Parasitol. <u>68</u> (1982), 416.
- [5] Gabrion C. et al., Ann. Parasitol. Hum. Comp. 54 (1979), 573.
- [6] Czubaj A. et al., Int. J. Parasitol. 11 (1996), 1217.
- [7] Bruňanská M. et al., Int. J. Parasitol. 28 (1998), 667.

ULTRASTRUKTURNÍ TOPOCHEMIE GLYKOGENU V ROHOVKOVÉM EPITELU NĚKTERÝCH SAVCŮ

Svatopluk Čech

Ústav histologie a embryologie, Lékařská fakulta MU, Joštova 10, CZ - 662 43 Brno. E-mail: scech@med.muni.cz

Rohovka savců (včetně předního epitelu) využívá jako základní energetický substrát glukózu. Tu v převážné míře získává difúzí z komorového moku, asi 10 % pochází ze slz a z cév sklerokorneální oblasti. Korneální epitel kromě volné glukózy nadto obsahuje zásobu glykogenu, ze kterého může být glukóza kdykoliv uvolněna podle okamžitých metabolických potřeb. Zatímco o světelně mikroskopickém, resp. histochemickém, výskytu a rozložení polysacharidu v předním epitelu u různých druhů savců je shromážděno sdostatek údajů, stále dosud chybějí podrobná data o jeho molekulární organizaci a submikroskopické distribuci [1]. Jejich doplnění s využitím elektronově mikroskopické histochemie je věnována předložená práce.

Ultrastrukturní vizualizace glykogenu byla provedena elektronově mikroskopickou modifikací PAS reakce známé ze světelné mikroskopie, kterou vypracoval a do praxe zavedl Thiéry [2]. Je založena na sukcedánní aplikaci jodisté kyseliny (PA), thiosemikarbazidu (TSC) a proteinátu stříbra (SP). Přednostmi PA-TSC-SP postupu jsou vysoká elektronová denzita glykogenových částic, dokonalá reprodukovatelnost výsledků a vysoká specifičnost, kterou lze testovat celou řadou způsobů; v práci bylo použito vynechání jodisté kyseliny stejně jako thiosemikarbazidu nebo proteinátu stříbra a blokády aldehydových funkčních skupin dimedonem (*Merck*), popř. NaHSO₃. Studovány byly rohovky myši (Mus musculus var. alba) a prasete (Sus domesticus). Vyšetřované vzorky pocházely z centrální oblasti orgánu.

Aplikace PA-TSC-SP postupu ukázala, že pool glykogenu v korneálním epitelu obou studovaných druhů se lišil jak distribucí, tak i formou molekulárního uspořádání. Zatímco epitelové buňky prasete obsahovaly v cytoplazmě téměř výlučně jen monopartikulární glykogen, tj. b - granula, v buňkách myších rohovek polysacharid naproti tomu vytvářel nápadné ložiskovité formace. Tato ložiska sestávala většinou z volně seskupených, asi 30 nm velkých, partikulí, nevykazujících na rozdíl od a - granul (rozet) nikdy žádnou zjevnou substrukturu. Shluky glykogenových zrn v cytoplazmě až na výjimky zaujímaly nepravidelné až bizarní tvary a 3 i vícekrát přesahovaly svojí velikostí obvyklá a - granula či rozety. Vyhodnocení topografických vztahů glykogenových agregací k ji-ným buněčným strukturám potvrdilo, že byly v cytoplazmě rozmístěny zcela náhodně. Asi u 1/10 bazálních a intermediárních buněk korneálního epitelu myší byla depozita polysacharidu zjištěna dokonce i uvnitř buněčných jader.

V povrchových buňkách epitelu obou druhů byla b - granula, popř. ložiska glykogenu zastoupena vždy řídčeji nebo dokonce i chyběla.

Zda distribuce a molekulární organizace glykogenu v korneálním epitelu nějakým způsobem souvisí s jeho metabolickou mobilizací, bude předmětem další studie.

[1] S. Čech, Histochem. J. <u>30</u> (1998), in press.

[2] J - P. Thiéry, J. Microscopie <u>6</u> (1967), 987 - 1018.

ÚVAHA O NÍZKOVOLTOVÉM PROZAŘOVACÍM ELEKTRONOVÉM MIKROSKOPU LVTEM - 5

Armin Delong, Karel Hladil, Vladimír Kolařík

Delong Instruments, Bulharská 48, 612 00 Brno, Česká republika, tel: 05-41 21 06 91, fax: 05-41 21 79 76, e-mail: di@sky.cz

Přesto, že idea vytvoření nízkovoltového elektronového prozařovacího mikroskopu je stará již 40 let, jde v našem případě o první realizaci vhodnou pro praktické využití. Proč trvala tato vývojová etapa tak dlouho? Bezpochyby proto, že v tomto případě byla úspěšná realizace fyzikálního principu mimo technické a technologické možnosti minulosti. Pokusme se demonstrovat toto tvrzení na několika případech.

Aby měl elektronový mikroskop, pracující pouze s 5 kV urychlovacího napětí, odpovídající proporce rozměrové, bylo třeba od počátku uvažovat o miniaturizaci celé soustavy.

K dosažení vlastností srovnatelných s mikroskopy standardními bylo třeba docílit špičkových parametrů jednotlivých komponent. Pokusme se pouze vyjmenovat obory, kterých se vývoj týkal:

- 1/ ultravysokovakuové čerpací systémy miniaturních rozměrů
- 2/ vysoce koherentní zdroje elektronů typu Schottky
- 3/ zvládnutí výpočetní techniky elektronově optických prvků s permanentními magnety
- 4/ pokrok v oblasti velmi silných permanentních magnetů
- 5/ vývoj v oboru scintilačních materiálů pro převod elektronového obrazu na optický
- 6/ využití v současné době nejkvalitnějších prvků z oboru světelné mikroskopie
- 7/ orientace na nejnovější systémy snímání a zpracování obrazu
- 8/ mikromechanické zpracování většiny elektronově optických komponent
- 9/ zajištění rozšiřitelnosti systému, ať již o módy rastrovací nebo o systémy korekce optických vad.

Další překážkou stojící v cestě k uživateli je psychologická bariéra. LVTEM-5 je kombinací mikroskopu elektronového a klasického optického. Kdo bude blíže svým odborným zaměřením této raritě? Ten kdo rutině připravuje preparáty pro prozařovací elektronový mikroskop nebo ten, kdo již není spokojen s výsledky dosažitelnými metodami světelné optiky? Navíc preparace vzorků bude dosti nestandardní a oblast využití bude rovněž limitována nízkou energií elektronů. Přesto očekáváme, že mnoho biologů, organochemiků, virologů a dalších se po postupném seznámení s přístrojem shodnou na tom, že přináší novou kvalitu a zaplňuje dosud neobsazené pole působnosti.

Vysoký kontrast nebarvených biologických struktur přes polymerní krystaly až k nestínovaným replikám povrchů dovoluje pozorovat objekty podstatně méně modifikované preparací než tomu bylo dosud. Navíc nízká energetická zátěž dopadajících elektronů způsobuje minimální degradaci struktur během vlastního pozorování.

Doufáme, že éra nízkovoltových přístrojů byla započata a očekáváme reakce uživatelů, abychom mohli zohlednit připomínky a přání nám dosud neznámé.

ELEKTRÓNOVOMIKROSKOPICKÉ POZOROVANIE VČASNÝCH ZMIEN NA MYELINIZOVANÝCH NERVOVÝCH VLÁKNACH PO STLAČENÍ PERIFÉRNEHO NERVU

Fuseková E., Belej K., Ochodnická E., Bošelová Ľ.

Ústav histológie a embryológie, JLF UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin

Axóny s myelínotvornou Schwannovou bunkou, myelínovou pošvou a lamina basalis tvoria neoddeliteľnú morfologickú a funkčnú jednotku. Veľká pozornosť sa venovala vzájomným vzťahom axónov a Schwannových buniek v priebehu degenerácie nervových vlákien [1]. Ultraštrukturálne zmeny v nemyelinizovaných a myelinizovaných vláknach vyvolané ligatúrou sledovali viacerí autori [2].

Ako experimentálne zvieratá sme zvolili morčatá /Cavia porcellus/ oboch pohlaví. Zvieratám sme stláčali ľavý n. ischiadicus 1,5 cm nad rozvetevením na n. tibialis a n. peroneus communis. Zvieratá sme nechali krátkodobo prežívať. Súbežne s experimentálnou skupinou sme použili zvieratá ako sham kontrolu. Po operácii mali zvieratá poruchy hybnosti ľavej končatiny. Získaný materiál z experimentálnej a kontrolnej skupiny zvierat sme spracovali jednotnou technikou pre TEM.

Pri TEM pozorovaní zmien po stlačení neru sme sa zamerali na hodnotenie vzhľadu axoplazmy a na reakciu cytoplazmatických súčastí Schwannovej bunky. Cytoplazma Schwannovej bunky je uložená v tzv. Schmidtových - Lantermannových štrbinách, ktoré sú stálou súčasťou myelinizovaných nervových vlákien. Niektorí autori [3] opísali zvýšený počet Schmidtových - Lantermannových štrbín v počiatočnej fáze Wallerovej degenerácie. Pozorovali sme segmentáciu myelínovej pošvy do myelínových ovoidov. Pri tvorbe ovoidov zohrávajú Schmidtove - Lantermannove štrbiny dôležitú úlohu. Ich extrémne rozšírenie sme sledovali u väčšiny Schmidtových - Lantermannových štrbín s následným vytvorením širokých priestorov. Autori uzatvárajú, že dilatované Schmidtove - Lantermannove štrbiny sú irreverzibilne poškodené, devastované ako dôsledok štiepenia intraperiodálnej a hlavnej denznej línie. To vedie k zrúteniu lamelárneho materiálu a k tvorbe irregulárnej masy. Nevylučujeme práve preto aktívnu účasť Schmidtových - Lantermannových štrbín pri segmentácii myelínovej pošvy, súhlasne spolu s autormi [4, 5]. Axoplazmatické zmeny zahrňovali zhlukovanie neurotubulov a neurofilamentov, poprípade aj ich dezorientáciu.

Vplyvy, ktoré spôsobia poškodenie jednej zložky vedú následne k zmenám aj ostatných súčastí myelinizovaného nervového vlákna. Niektoré vplyvy pôsobia viac na jednu, iné viac na druhú zložku nervového vlákna. Axóny a Schwannove bunky sa líšia individuálnou citlivosťou na rôzne vplyvy.

- [1] Spencer /et al/, Posttraumatic peripheral nerve regeneration /1981/, 411 429
- [2] Kapeller /et al/, Proc.R.Soc.B., 167/1967/282 292
- [3] Webster : Ann.N.Y. Acad.Sci, <u>122</u>/1965/29 38
- [4] Ghabriel /et al/, Prog.Neurobiol. <u>17</u>/1981/25 58
- [5] Krinke /et al/, Acta neuropathol. 69 /1986/ 168 170

APPLICATION OF NONCHARGING MICROSCOPY IN SEMICONDUCTOR FABRICATION

Otakar Hutař

Institute of Scientific Instruments, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 147, CZ – 61264 Brno, Czech Republic, e-mail: ota@isibrno.cz

The manufacturers of VLSI integrated circuits become the greatest users of noncharging scanning electron microscopy. This technique employs a low PE landing energy in the range from approx. 500 to 3000eV in the dependence on the material being observed. The SEMs are used for two main purposes in production line: For checking patterned structures after lithographic and etch operation and for measuring critical dimensions /CD/ in the micron and submicron range. The image resolution is better than 3nm for the landing PE energy below 1keV. The low landing energy of PE reduces significantly the radiation damage of semiconductors /breakdown of pn junction/ and dielectrics. SEs collected by low voltage detectors carry information about the voltage contrast, which is utilised in a special category of low voltage SEMs – electron beam testers for the functionality evaluation of the complex devices like microprocessors.

To achieve the noncharging condition for the electrically nonconductive layers / photoresists SiO₂, Si ₃N₄, etc./ it is necessary to match the landing energy of PE /E₀/ so that the total yield of electrons /BSE + SE/ emitted from the surface would be equal to 1 in each point of the surface area imaged. This particular energy is denoted by E_2 on the curve of total electron emission yield versus E_{o} and it is characteristic for each material. The control of the PE energy can be ensured using PE electron retarders either a cathode lens or an electrostatic detector objective lens /EDOL/ system. The advantage of the EDOL system is the absence of strong electric field in the vicinity of the specimen surface, the specimen can be tilted and the working distance can be small. EDOL is usually immersed in the objective lens. The image is created mostly by SEs, which can cause overbrightness of the edges and sensitivity to the surface contamination. In the case of the cathode lens the BSEs contribute to the imaging much more than SE. The strong electric field between the specimen surface and anode disturb the natural space distribution of the emitted signal electrons. Therefore this field to the detector attracts more BSEs while the SE trajectories go near the optical axis and uselessly escape through a detector aperture. The working distance is higher compared to EDOL in order to prevent the discharges.

Another problem is the determination of the E_2 energies. E_2 value depends on the local tilt angle and also on the technological history of the specimen. For instance the plasma etch can cause the shift of the E_2 value by about more than hundreds of eV. Due to such an operation, the chemical composition of the layer is influenced, as well as the surface and bulk electrical conductivity of the dielectrics. Charging is also dependent on the scan speed.

A method that allows finding out the noncharging conditions for each point of the image field is still under development. This method is based on the measurement of the curve of the signal vs time for the first several microseconds and different energies. The noncharging condition is reached when the signal does not vary with time.

This project No.A2065703 is supported by the Grant Agency of the ASCR.

ULTRASTRUKTURA EPITELU TRACHEY KRÁLÍKŮ PO INHALACI PREPARÁTU PLACEBO INHALER

Václava Konrádová, Jiří Uhlík, Luděk Vajner, Jarmila Zocová

Ústav histologie a embryologie 2. LF UK, V úvalu 84, 150 06, Praha 5 - Motol e-mail: vaclava.konradova@lfmotol.cuni.cz

Abychom zjistili, zda pozorované změny v epitelu dýchacích cest po aplikaci jedné terapeutické dávky aerosolu bronchospasmolytických preparátů patřících jak do skupiny selektivních β_2 sympatomimetik tak i mezi parasympatolytika jsou způsobeny aplikovanými bronchospasmolytiky nebo nespecifickými látkami obsaženými v inhalovaném aerosolu, prostudovali jsme v experimentu účinek aplikace dvou vdechů aerosolu preparátu Placebo inhaler. Tento aerosol má podle výrobce stejné složení jako preparát Ventolin bez účinné látky.

30 minut po aplikaci 2 vdechů preparátu Placebo inhaler lemoval tracheu králíků lehce alterovaný víceřadý cylindrický epitel s řasinkami. Intercelulární prostory epitelu byly úzké, apikální spojovací komplexy zůstaly intaktní.

Poškození řasinkových buněk účinkem inhalace preparátu Placebo inhaler bylo lehké až středně závažné. Nepozorovali jsme téměř edém a alteraci kortikálních oblastí cytoplazmy řasinkových buněk, ani zánik části volných kinocilií. V hlubších partiích cytoplazmy řasinkových buněk se objevily jen mírné známky patologické alterace. Ke stimulaci diferenciace nových řasinkových buněk nedošlo.

Sekreční elementy byly po inhalaci preparátu Placebo inhaler stimulovány jen lehce. K vydávání sekretu bylo stimulováno pouze $16\pm1\%$ pohárkových buněk. U jednotlivých pohárkových buněk jsme se setkali se známkami počínajícího přechodu k apokrinnímu způsobu sekrece, ojediněle i se současným vyprazdňováním všech hlenových granul v buňce. Poškození pohárkových buněk vyvolané inhalací vehikul nebylo výrazné. Vyprázdněné, degenerované pohárkové buňky představovaly jen $4\pm0\%$ sekrečních elementů. Podle očekávání nedošlo ani k stimulaci diferenciace nových hlen secernujících elementů.

V souhlasu se stupněm patologické alterace řasinkových buněk byl řasinkový lem nad epitelem jen lehce narušen. Zaznamenali jsme jen lehký úbytek kinocilií na $8,4\pm0,4/\mu m^2$. Alterované řasinky představovaly celkem jen $4,4\pm1\%$ všech kinocilií. Došlo zejména k nárůstu lehce poškozených patologických řasinek. Aplikace malé dávky preparátu Placebo inhaler nenarušila proces ciliogeneze. V oblasti jen lehce narušeného řasinkového lemu jsme nepozorovali morfologické známky narušení samočistící schopnosti epitelu.

Poškození epitelu způsobené aplikací 2 vdechů preparátu Placebo inhaler bylo lehké až středně závažné. Předpoklad, že poškození epitelu dýchacích cest vyvolané aplikací bronchospasmolytických preparátů je více způsobováno látkami, které jsou k vlastní účinné substanci v tlakových dávkovacích nádobkách přidávány, se nám v našem experimentu nepodařil prokázat.

CHANGES IN THE DEVELOPING SPERMATOZOA AFTER LONG – TERM TREATMENT WITH LEAD ACETATE IN THE RABBIT

Milan Maretta, Elena Marettová

Department of anatomy and histology, University of veterinary medicine Košice, Komenského 73

Experimental investigations in animal treated with lead compounds revealed changes in the seminiferous epithelium and in the endocrine function of the testis [Hildebrand et al., 1973]. Some authors failed to demonstrate morphological changes in gonads of male animals treated with lead compounds [Baratt et. al, 1989; Wenda-Rozewicka et al., 1996]. The purpose the this study was to establish the effects of lead on the developping spermatozoa.

The experimental animals (n=6) were aloved to drink freely 1% aqueous solution of lead acetate while the controls (n=6) drank distilled water. The duration of the experiment lasted 80 days. For electron microscopic studie testes were cut into 1 mm blocks and fixed in 2,5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, pH 7.4 for 2 h at 4 $^{\circ}$ C and postifixed in 1% OsO₄. Dehydratation was carried out in acetone and embedded in Durcupan medium. Ultrathin sections were contrasted with uranylacetate and lead citrate.

The testicles from animals in the controll group consisted of seminiferous epithelium comprised of typical Sertoli cells and spermatogenic cell types at different developmental stages.

Seminiferous epithelium from animals of the treated group exhibited distortion in the general architecture. Concomitant with the first appearance of spermatids and spermatozoa several structural differences from the normal were noted. Membrane bounded vacuoles were conspicouous within the Sertoli cell cytoplasm. The vacuoles contained a diffuse flocculent material and were often in contact or associated with Sertoli cells. Their position within the tubule was variable, but most vacuoles were observed lateral to or at the lunimal aspect of Sertoli cell. Spermatids located near the tubular lumen exhibited vacuolated cytoplasm. The vacuoles, numerous Sertoli cell processes, and debris suggest a disorganization of this portion of the tubule. Testicular morphology was highly variable. This variability was noted in animals of the same age and in different areas of the testis of the same animal. A cell or group of cells show signs of degeneration as they lie among other viable cells. Some seminiferous tubules exhibites an essentially normal morphology. The number of germ cells in the tubules was markedly decreased. Processes of Sertoli cell cytoplasm did not completely fill the spaces between primary spermatocytes and spermatids and appeared thin and atrophic. Sertoli cells ceontained heightened number of lipid droplets and lysosmal elements. These findings support the conclusion that lead is a potent testicular toxin.

C.L. Barrat, (et al.), Andrologia 21, (1989), 161-166
D.C. Hildebrand (et al.), Amer. J. Obstet. Gynec. <u>115</u>, (1973), 1058-1065
L. Wenda-Rosewiczka (et.al.), Andrologia 28, (1996), 97-102

STAVBA LAMINA PROPRIA SEMENNÍKOV KRÁLIKA PO CHRONICKOM PÔSOBENÍ OLOVA

Elena Marettová, Milan Maretta

Katedra anatómie a histológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva Košice, Komenského 73

Poznatky o účinku olova na reprodukčnú činnosť početných druhov zvierat sú všeobecne známe. Zmenami je postihovaná gametogenéza ako i podporné zložky semenotvorných kanálikov. V práci podávame pozorovania na štruktúrach tvoriacich lamina propria semenníkov králika.

Experimentálnym zvieratám (n=6) bol podávaný v pitnej vode 1%-ný roztok octanu olovnatého po dobu 80 dní. Odobraté vzorky semenníkov boli fixované v 10%-nom neutrálnom formole. Pre elektromikroskopické štúdium vzorky boli fixované v 2,5%-nom glutaraldehyde v 0.1 M kakodylátovom pufri, pH 7.4, 2 hodiny pri 4 $^{\circ}$ C a v 1% OsO₄. Po odvodnení v stúpajúcom rade acetónu vzorky boli zaliate do Durcupanu. Ultratenké rezy boli ofarbené uranylacetátom a citrátom olova.

Lamina propria králikov kontrolnej skupiny (Obr. 1) pozostáva z amorfnej zložky, vláknitých štruktúr a bunkových elementov. Jej hrúbka sa pohybuje od 0.3 - 0.4 µm. Vláknité štruktúry sú zastúpené kolagénovými vláknami zatiaľ čo bunkové elementy zastupujú myofibroblasty a endoteliálne bunky lymfatických a krvných kapilár.

U experimentálnych zvierat (Obr. 2) neboli pozorované výrazné zmeny v zastúpení uvedených štruktúr. Zistené zmeny sa prejavovali v lokálnom pomnožení kolagénových vláken a ich rozličnom usporiadaní. Lamina basalis vykazovala lokálne zhrubnutie a invagináciu smerom k semenotvorným kanálikom. V myoepiteliálnych bunkách sme pozorovali zvýšenie intracytoplazmatických vakuól. Okrem uvedených zmien bola zaznamenaná zvýšená prítomnosť makrofágov a zmeny v povrchovom reliéfe steny lymfatických kapilár.

VÝSKYT ELEKTRÓNOVODENZNÝCH GRANÚL PRI EXPERIMENTÁLNEJ DIABETICKEJ NEUROPATII

Ochodnická, E., Ochodnický, M.*, Belej, K., Fuseková, E., Bošelová, Ľ.

Ústav histológie a embryológie, JLFUK, Malá hora 4, SK-036 01 Martin, e-mail: histology@jfmed.uniba.sk.*I. Interná klinika, JLF UK, Kollárova 2, 036 59 Martin

Dlhodobý diabetes mellitus vedie u človeka k poškodeniu periférneho nervu a k následným klinickým ťažkostiam [1,3]. Je veľmi málo informácií o morfologickom podklade včasnej neurologickej poruchy u ľudí, pre etické a technické problémy s vykonaním biopsie nervu u chorých bez klinických prejavov nervového ochorenia. Preto štúdium periférneho nervu pri experimentálnom diabetes mellitus môže prispieť k objasneniu hlavne včasných morfologických zmien pri diabetickej neuropatii [2,5,6].

V našom experimente sme použili dospelých samcov potkana bieleho kmeňa Wistar. Diabetes mellitus sme vyvolali podaním intraperitoneálnej injekcie streptozotocínu a nechali sme zvieratá prežívať 4, 8, 14 týždňov bez liečby inzulínom. Periférny nerv sme spracovali bežnou metodikou pre elektrónovú mikroskopiu.

Pri hodnotení priečnych a pozdĺžnych rezov periférneho nervu diabetických potkanov sme sledovali výskyt denzných granúl po 4, 8, 14 týždňoch trvania diabetu. Granuly, ktoré sme v našom materiáli nachádzali sú zhodné s morfologickým popisom granúl glykogénu. Pretože sme priamu chemickú identifikáciu granulárneho materiálu nerobili, nazývame granuly glykogénu podobné alebo elektrónovo denzné. V axónoch myelinizovaných nervových vlákien diabetických zvierat sme nachádzali zhluky elektrónovodenzných granúl, obklopených membránou. Ich veľkosť a počet sa zvyšoval s dĺžkou trvania diabetu. Po 14 týždňoch trvania diabetes mellitus boli agregáty granúl také veľké, že vypĺňali skoro celý axón, ktorý v niektorých prípadoch až deformovali. Často sa na okraji agregátov nachádzali zbytky membrán, ktoré pripomínali kristy mitochondrií. Iné zhluky elektrónovodenzných granúl boli obklopené len jednoduchou membránou a neobsahovali zvyšky membránových štruktúr. Ohraničujúca membrána bola u niektorých zhlukov prerušená, takže niekoľko granúl sa potom nachádzalo roztrúsených v axoplazme. Axóny u kontrolných zvierat takéto agregáty neobsahovali. Elektrónovodenzné granuly sme v našom materiáli pozorovali aj v cytoplazme Schwannových buniek. Tu sa nachádzali voľne roztrúsené v skupinkách, ale bez ohraničujúcej membrány.

U neliečeného diabetes mellitus sú známe poruchy glykogénového metabolizmu. Membránou obklopené granulá glykogénu, prítomné pri neuropatiách, sa pravdepodobne hromadia vo vonkajších kompartmentoch mitochondrií. Hromadenie glykogénu v mitochondriách je najskôr následkom defektu v oxidatívnom spracovaní glukózy v diabetických nervoch [4]. Niektoré zhluky granúl, ktoré sme nachádzali v axónoch, boli obklopené len jednoduchou membránou a membránové zbytky sme v nich nepozorovali. To by svedčilo pre hromadenie granúl aj v hladkom endoplazmatickom retikule. Schwannove bunky majú podstatný význam pre udržanie fyziologickej funkcie axónu aj myelínovej pošvy. Hromadenie glykogénu podobných granúl v ich cytoplazme by nasvedčovalo pre_prítomnosť metabolickej poruchy aj v týchto bunkách [7].

Za najpravdepodobnejšiu príčinu hromadenia elektrónovodenzných glykogénu podobných granúl v myelinizovaných vláknach periférneho nervu považujeme

hyperglykémiou vyvolané odchýlky v metabolizme neurónov a Schwannových buniek. Domnievame sa, že nemožno ani vylúčiť možnosť, že veľké depozity granúl, ktoré deformujú axón, môžu byť prekážkou axónového transportu. Tým by mohli prispievať k rozvoju funkčných a morfologických zmien myelinizovaných nervových vlákien pri experimentálnom diabetes mellitus potkanov.

- [1] Greene D. A. (et al), Diabetes Care 15 (1992), 1902-1925
- [2] Hounson L. (et al), Clin. Neurosci. 4; 6 (1997), 380-389
- [3] Nathan D. M., N. Engl. J. Med. 328 (1993), 1676-1685
- [4] Sima A. A. F. (et al), Acta Neuropathol. 58 (1982), 39-47
- [5] Sima A. A. F. (et al), Clin. Neurosci. 4; 6 (1997), 359-364
- [6] Thomas P. K., Can. J. Neurol. Sci. 19 (1992), 1-7
- [7] Yagihashi S., Diabetes Metab. Rev. 11 (1995), 193-225

A NOVEL STEREOLOGICAL EVALUATION OF COLOCALIZATION PATTERNS USING DOUBLE IMMUNOGOLD LABELLING: A STUDY ON DNA REPLICATION

Anatolij A. Philimonenko^{1,3}, Jiří Janáček², Ivan Krekule² and Pavel Hozák¹

¹Department of Cell Ultrastructure & Molecular Biology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20, Prague 4 -Krč, Czech Republic; e-mail: hozak@biomed.cas.cz; ²Department of Biomathematics, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20, Prague 4 - Krč, Czech Republic, e-mail: janacek@biomed.cas.cz; ³Institute of Cytology and Genetics; Academy of Sciences of Russia, Siberian Division, Lavrentjeva 10, 630090, Novosibirsk, Russia

DNA replication in cells takes place in foci scattered throughout the nucleoplasm. We have characterised the replicating foci and their dynamics in synchronised mid S-phase HeLa cells. Permeabilized cells were allowed to elongate nascent DNA chains in the presence of biotin-dUTP, and the replicating foci were then identified in ultrathin sections using immunogold labelling of the incorporated biotin. We have then screened a variety of proteins to see which are present in the mid-S phase foci. Double immunogold labellings were used, and the digital images were investigated by stereological and statistical approaches.

Random images of nuclear sections were inspected and the co-ordinates of all gold particles were recordered using a macro developed for LUCIA (LIM) imageprocessing software. In order to analyze the clustering of particles, the pair-correlation function (PCF) was estimated. PCF is a statistical function describing how many times the density of events (ie gold particles) differs from to the average density at a given distance from a typical label (particle). If a clustering is present, it causes an increase in the density of gold particles in the neighborhood of a typical particle. To analyze the colocalization, we calculated the pair cross-corelation function (PCCF) describing how the density of labels of one type changes at some distance from a typical label of the second type. The functions were estimated from all images of nuclei of each sample simultaneously. The effect of image boundaries was corrected using the image window covariogram and assuming stationarity of labels, which can cause some (assumingly low) bias because of the non-random and non-stationary nature of sampling of label co-ordinates. Finally, histograms of PCFs and PCCFs were constructed using the density-dependent width of histogram bars. Confidence intervals (95%) were estimated by Monte-Carlo simulations of Poisson processes with the density equal to that of the experimentally evaluated labels. The estimation of cluster sizes was based on the rate of the exponential PCF decrease down to PCF=1.

A set of experiments was performed for testing the novel stereological approach, addressing the colocalization of various proteins in replicating foci. The presence of following proteins in replicating foci was tested: 1), replicative proteins, 2), proteins that may be involved in regulating DNA synthesis, 3), proteins involved in RNA processing, 4), proteins involved in calcium metabolism, and 5), other proteins. Typical results are presented showing that the novel approach has a strong potential for providing new and rigorously verified data.

UNCOVERING THE SKELETAL STRUCTURES OF CELL NUCLEI: THE USE OF RESINLESS SECTIONS

Vlada V. Philimonenko^{1,2}, Milada Špátová¹ and Pavel Hozák¹

¹Department of Cell Ultrastructure & Molecular Biology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20, Prague 4 -Krč, Czech Republic, e-mail: hozak@biomed.cas.cz; ²Institute of Cytology and Genetics; Academy of Sciences of Russia, Siberian Division, Lavrentjeva 10, 630090, Novosibirsk, Russia

During the last three decades, a large amount of data has been obtained, showing that the cell nucleus is structurally highly organized and compartmentalized. An underlying structure which could provide a basis for this organization was described - the "nuclear matrix" or "nucleoskeleton". Visualization of this structure faces considerable difficulties because the cell nuclei are highly sensitive to experimental manipulations and chromatin masses obscure the nucleoskeleton. Another problem is that filamentous networks cannot be properly visualized in conventional ultrathin sections.

In order to overcome these difficulties and to eliminate the possible structural artefacts, we have developed a new combined method allowing the visualization of the nucleoskeleton in more physiological conditions. The cells are first embedded in agarose beads, permeabilised in "physiological" buffer (PB), the DNA is then cut by enzymes, and the obscuring chromatin is removed. Three modifications of this relatively gentle technique were tested, using HeLa cells. The first consists of permeabilization of cells with 0.2% Triton X-100, digestion of DNA with EcoRI and Hae III with subsequent electroelution of chromatin fragments. About 95 % of total chromatin can be removed from the nuclei by this procedure and the nuclei retained the capability to replicate and transcribe. The other two protocols involve DNA digestion with DNase I after permeabilization (with or without a subsequent prefixation with 2% formaldehyde), and removal of chromatin fragments by extensive washing in PB. After removal of the chromatin according to either of the three protocols, cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde, dehydrated and embedded in diethylglycoldistearate (DGD). Semi-thin sections (500-600 nm thick) were prepared, DGD was dissolved, and the sections were critical-point dried and observed under the electron microscope. In all cases, the appearance of the resulting nucleoskeleton was similar, though the degree of preservation differed. The nucleoskeleton visualized by these techniques consists of nuclear lamina, nucleolar remnants, and an inner fibrogranular network comprising "core filaments" mostly covered with granular material referred to as "the diffuse nucleoskeleton".

We then tested if the nucleoskeleton is a stable structure or a transient transcription-dependent structure as suggested in some papers. A treatment with various transcription inhibitors was used and the ultrastructure of the nucleoskeleton was then assessed. Incubation for various periods of time with alpha-amanitin, actinomycin D and DRB had no dramatic effect on the morphology of nucleoskeleton. Our data suggest that the nucleoskeleton is a permanent structure of the cell nucleus and it's stability does not depend on the ongoing DNA transcription.

VYUŽITIE ELEKTRÓNOVEJ MIKROSKOPIE PRI APLIKÁCII ROZMEROV ACIKULÁRNYCH MINERÁLOV NA ICH GENÉZU A POTENCIÁLNE ENVIRONMENTÁLNE RIZIKO

Jozef Stankovič, Eva Šamajová, Ivan Kraus

Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava stankovic@fns.uniba.sk

S rôznymi aplikáciami tvarov a foriem minerálov sa stretávame v geologickej lieratúre pomerne často. Najčastejšie býva využívaný vzťah dĺžky a šírky minerálu či už akcesorického, napr. zirkónu [1, 2, 3, 4, 5], ale aj takých, ktoré môžeme označiť ako horninotvorné, resp. ložiskotvorné, napr. illit, kaolinit, halloyzit, zeolity, chryzotil a pod. [6, 7, 8, 9].

V našej práci ktorú sme riešili rámci grantu VEGA MŠ SR č. 1/5234/98 (Elektrónovo-optické metódy v mineralógii prírodných materiálov na environmentálne ohrozených oblastiach Slovenska) sa bližšie zmienime o aplikáciach, ktoré tento vzťah posudzujú a zameriavajú sa na rôzne pretiahle, ihličkovité a vláknité, resp. acikulárne tvary minerálov, ktorým sa venvala zvýšená pozornosť nielen vzhľadom na aplikáciu ich morfologického charakteru na podmienky formovania, štruktúrnej usporiadanosti, obsahu voľnej vody, mechanizmu dorastania a vyzrievania, prípadnej redepozície atď. [6, 7], ale aj ich prípadného dopadu na podmienky životného prostredia [9, 10, 11].

V prípade halloyzitu aplikácia EM v štúdiu ich foriem tvarov umožnila vytvoriť obraz o morfologickej variabilite a indikovať existenciu niektorých vzťahov medzi tvarom častíc a štruktúrnym usporiadaním [7; 12].

Tvar a rozmery častíc ihlicovitých a vláknitých minerálov sú považované za dôležité charakteristiky pri úvahách o ich efekte na zdravie, t.j. ich dopadu na životné prostredie. V litratúre sa konvenčne pripúšťa [11], že dĺžka častíc nad 8 μ m a ich priemer pod 1 μ m najviac koreluje s ich toxicitou a preto reprezentujú potenciálne environmentálne riziko. Pre kategóriu vzťahu dĺžky verzus šírka takýchto minerálov sa zavádza [9; 10] index vláknitosti a z neho interpretovaný sklon regresnej krivky je špecifický pre každý sledovaný minerál: chryzotil, tremolit, wollastonit, riebeckit, krokydolit, amosit, mordenit.

- [1] G. Hoppe, Abh. Deutsch. Acad. Wiss. (1963), 130.
- [2] J. Pupin, Contr. Mineral. Petrology 73 (1980), 207 220.
- [3] F. Finger (et al), Geologica Carpathica 42, 2 (1991), 67 75.
- [4] K. Jakabská, Mineralia Slovaca 24, 6 (1992), 413 426.
- [5] J. Jablonská, Mineralia Slovaca 25, 3 (1993), 157 171.
- [6] H. Gerthofferová, V. Šucha, Acta Geologica 48, 1 (1992), 71 73
- [7] H. Gerthofferová, I. Kraus, Geologica Carpathica 30, 2 (1979), 189 206.
- [8] R. George, Reviews in Mineralogy 28 (1993),
- [9] K. Shedd (et al), U.S. Government Print. (1982), 1 20.
- [10] A. Wylie, P. Schweitzer, Environmental Res. 29 (1982), 52 73.
- [11] T. Vanessa, Reviews in Mineralogy 28 (1993), 545 554.

[12] I. Kraus, Západné Karpaty, sér. Mineral. 13 (1989), 1 – 287.

CHARAKTERISTIKA ZLATA NA ZRUDNENIACH V ZÁPADNÝCH

KARPATOCH SLEDOVANÁ ELEKTRÓNOVOU MIKROSONDOU

Jozef Stankovič, Jozef Krištín

CLEOM, Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, stankovic@fns.uniba.sk

V rámci grantu VEGA MŠ SR č. 1/5234/98 (Elektrónovo-optické metódy v mineralógii prírodných materiálov na environmentálne ohrozených oblastiach Slovenska) sa sledovali vzorky sulfidických minerálov z haldového materiálu niektorých banských a prieskumných diel, ktoré sú mimo prevádzky už niekoľko desaťročí. Oxidačné procesy na týchto mineráloch a ich biodegradácia zapričiňujú vznik povlakov a sekundárnych produktov, pričom sa však zachovávajú reliktné štruktúry pôvodnej mineralizácie. Tieto následné procesy a výluhy z háld sú zároveň späté s negatívnou acidifikáciou životného prostredia a bývajú súčasťou ekologických havárii na mnohých lokalitách [1; 2; 3; 4; 5].

Na výskum sa použili nábrusy rudných vzoriek v rámci ktorých pri štúdiu v odrazenom svetle sa zistila v minerálnej paragenéze prítomnosť zlata. Po úprave (pokovení uhlíkom) sa pristúpilo k ich analyzovaniu na EM Jeol 840 metódou WDS za podmienok: urýchlovacie napätia 20 kV, prúde 12 nA a použitia štandardov: Au (rýdzie zlato), Ag (rýdzie striebro), Cu (rýdzia meď), Fe (kovové železo), Bi (rýdzi bizmut), Te (rýdzi telúr), Sb (rýdzi antimón), Hg (rumelka).

Takto získané výsledky sa porovnali s obdobnými údajmi v literatúre, pričom sa potvrdilo, že jednotlivé inklúzie zlata v rôznych minerálnych asociáciach si zachovávajú svoje pôvodné chemické zloženie napriek výraznej deštrukcii okolitých minerálov. Táto vlastnosť sa preukázala jednak u zlatiniek s vysokou rýdzosťou, ktoré sú charakteristické pre jadrové pohoria ZK [6; 7; 8; 9; 14], ale aj pre zlato s vyšším obsahom Ag, typické pre mladšie sulfidické štádium a oblasť neovulkanitov [10; 11; 12; 13; 15] ako aj pre zlatinky zo sedimentov [6].

- [1] V. Šucha (et al), Mineralia Slovaca 29, 6 (1997), 407 416.
- [2] P. Andráš, I. Križáni, Uhlí Rudy GP 1 (1997), 26 31.
- [3] I. Križáni, P. Andráš, Enviromagazín 2, 3 (1997), 16 17.
- [4] P. Šottník, I. Rojkovič, Enviweath'97 (1997), 48-49.
- [5] S. Trtíková, M. Chovan, M. Kušnierová, Enviweath'96 (1996), 72 73.
- [6] M. Chovan (et al), Mineralia Slovaca 27, 6 (1995), 397 406.
- [7] J. Beňka, Š. Suchý, W-Au zrudnenie v Níz. Tatrách (1983), 71 84.
- [8] P. Andráš (et al), Geologica Carpathica 46, 6 (1995), 335 342.
- [9] M. Chovan, Acta Geologica 45 (1990), 89 101.
- [10] P. Andráš, F. Caňo, G. Nagy, Mineralia Slovaca 20, 5 (1988), 463 471.
- [11] Ľ. Rojkovičová, J. Štohl, Mineralia Slovaca 25, 1 (1993), 35 44.
- [12] Ľ. Maťo, J. Knésl, Mineralia Slovaca 29, 6 (1997), 427 430.
- [13] Ľ. Maťo, V. Maťová, Mineralia Slovaca 26, 1 (1994), 30 38.
- [14] B. Antal, Mineralia Slovaca 25, 2 (1993), 146 150.
- [15] Ľ. Maťo, J. Knésl, Ľ. Rojkovičová, Mineralia Slovaca 28, 4 (1996), 259 264.

SROVNÁNÍ ÚČINKU CHOLINERGNÍ STIMULACE NA SEKREČNÍ ELEMENTY TRACHEY A TERMINÁLNÍCH BRONCHIOLŮ

Jiří Uhlík, Václava Konrádová, Luděk Vajner, Jarmila Zocová

Ústav histologie a embryologie 2. LF UK, V úvalu 84, 150 06, Praha 5 - Motol e-mail:jiri.uhlik@lfmotol.cuni.cz

Cholinergní stimulace je jedním z hlavních mechanismů ovlivňujících funkci sekrečních buněk v dýchacích cestách. V experimentu jsme proto srovnali reakci pohárkových buněk v epitelu trachey a Clara buněk v epitelu terminálních bronchiolů na celkovou aplikaci acetylcholinu.

Experimentálním králíkům jsme podali intravenózně buď 0,1 mg, nebo 0,5 mg acetylcholinu a materiál pro elektronově mikroskopické vyšetření jsme odebírali 5 nebo 20 minut po aplikaci zkoumané látky. Pro kvantitativní hodnocení výsledků jsme užili naše metody hodnocení funkčního stavu pohárkových a Clara buněk.

Aplikace acetylcholinu stimulovala pohárkové buňky epitelu trachey k vydávání sekretu a urychlovala mechanismus jejich sekrece. Po aplikaci menší dávky acetylcholinu měl průběh reakce prolongovanější charakter a maximální stimulace pohárkových buněk bylo dosaženo až za 20 minut po aplikaci. Nadměrně stimulované buňky se po urychleném vyprázdnění sekretu již většinou nezapojovaly do dalších sekrečních cyklů, ale degenerovaly a byly z epitelu vylučovány. 20 minut po aplikaci vyšší dávky acetylcholinu jsme pozorovali v epitelu trachey známky masivní diferenciace nových sekrečních elementů. V epitelu se změnila distribuce pohárkových buněk a objevily se zde ve zvýšeném počtu časné fáze diferencujících se sekrečních buněk.

V epitelu terminálních bronchiolů byly po aplikaci větší dávky acetylcholinu v první fázi hlavním nálezem projevy patologické alterace cytoplazmy Clara buněk. Pozorovali jsme především dilataci tubulů hladkého endoplazmatického retikula, jež byla v jednotlivých buňkách různě výrazná. Buňky nebyly stimulovány k vydávání sekretu, granula byla v cytoplazmě spíše střádána. Po dalších 15 minutách od aplikace větší dávky acetylcholinu jsme pozorovali zřetelné známky stimulace Clara buněk k vylučování sekretu. Pouze dvě třetiny Clara buněk obsahovaly v cytoplazmě sekreční granula. Známky poškození cytoplazmy přetrvaly, byly však mírnější a jevily tendenci k reparaci. Po aplikace menší dávky acetylcholinu jsme zaznamenali menší rozsah projevů patologické alterace cytoplazmy i nižší stupeň stimulace sekreční aktivity Clara buněk. Ani v jedné experimentální skupině jsme nepozorovali známky proliferace Clara buněk.

Naše pozorování dokumentují odlišnou reakci sekrečních elementů trachey a terminálních bronchiolů na cholinergní stimulaci. Zatímco pohárkové buňky v epitelu trachey reagovaly na podání acetylcholinu urychlenou stimulací k vylučování sekretu, degenerací a následnou hyperplasií, v epitelu terminálních bronchiolů dominovala v první fázi alterace cytoplazmy Clara buněk spojená se zpomalením vyprazdňování sekretu a až později docházelo k nepříliš intenzivnímu urychlení sekrece.

METHODS OF BIOLOGICAL SPECIMEN PREPARATION FOR SEM

František Weyda, Jana Nebesářová

Institute of Entomology, Branišovská 31, 37005 České Budějovice, e-mail weyda@entu.cas.cz

In recent time a number of techniques enabling us preparation of biological specimens for SEM is available. We would like to remember you the old-fashioned rule that sometimes it is possible to reach good results even in very simple way.

Direct air-drying of wet samples can be used only for some rigid biological specimen. Nation [1] described rapid and simple procedure using hexamethyldisilazane (HMDS) followed by air-drying. We used similar method based on processing of various biological specimens in dimethoxypropane (DMP) followed by air-drying [2,3]. We applied our method to unfixed or fixed specimens placed in diluted DMP (mixture of 1 part of DMP acidified with 5 ul of concentrated HCl per 100 ml of DMP with 3 parts of absolute ethanol) for 30 minutes. DMP dehydrated specimens by a chemical way. Then the specimens were placed in pure DMP for 15 minutes and leaved to desiccate on air. We have applied this method to various animals and their tissues. Results obtained with DMP are sometimes comparable with those obtained with HMDS, sometimes HMDS revealed better preservation of the shape. Air-drying from DMP like as HMDS is quick and inexpensive method suitable for some biological specimens.

We have reached very good results with old and forgotten method, which we have simplified. Small metal block cooled for 20-30 minutes in liquid nitrogen has been located on polystyrene plate under binocular microscope. Small biological specimens were placed on the surface of the block where they frozen immediately. Then they were freeze-cracked by cutting them with cooled razor blades with mounted cork to prevent your fingers from damage. Fractured pieces of tissues were put into 70% ethanol at laboratory temperature and then dehydrated in 96% and absolute ethanol, acetone and CPD. Results were surprisingly good often resembling more precise cryomethods.

Removal of epoxy resin from the semithin sections by alcoholic KOH or NaOH has been used by various authors. That simple method expose embedded tissue for better staining or expose epitopes for immunogold techniques and also is useful for anatomic study, because resin embedding fix three-dimensional arrangement of body components. Dissolving of resin from previously pre-cutted blocks followed by CPD and gold coating could reveal many anatomical details even in very composite organs. Control of the whole dissolving procedure is possible: it could be stopped by absolute ethanol. Some artifacts could arise due to removal of some sensitive components as well as due to minor changes of volume during dissolving/drying.

[1] Nation J L., 1983 Stain Technol. 58, 347

[2] Weyda F., 1992: In:Bailey G.W., Bentley J. and Small J.A. (eds): Proc.50th Annu. Meeting of the EMSA, Boston, 760.

[3] Weyda F., Nebesářová J., 1994, Proc. 13th Int. Congr. El. Microsc., Paris, 933.

RASTROVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE NEVODIVÝCH VZORKŮ

Martin Zadražil, Luděk Frank a Ilona Müllerová

Ústav přístrojové techniky AV ČR, Královopolská 147, 612 64 Brno, martin@isibrno.cz

Při energii primárních elektronů v desítkách keV je výtěžek emitovaných elektronů výrazně menší než jednotka a podstatná část dopadajícího náboje zůstává ve vzorku. Ve vodivém vzorku tak vzniká proud vzorkem, v nevodivém setrvává náboj lokalizován u primární stopy a jeho pole má destruktivní účinek na trajektorie primárních i emitovaných elektronů a povrchovým výbojem může ohrozit citlivé části přístroje. Proto jsou nevodivé vzorky pro pozorování v REM napouštěny nebo pokrývány vodivými látkami, ačkoliv velmi žádoucí by bylo pozorovat je v původním stavu.

Obvyklá křivka energiové závislosti celkové emise elektronů protíná na tzv. kritických energiích dvakrát jednotkovou úroveň. Vyšší z těchto energií, obvykle v oblasti jednotek keV, se nastavuje automaticky: Je-li například na počátku energie vyšší než kritická, pak se povrch nabíjí záporně a postupně vznikající pole snižuje energii dopadu elektronů do té míry, až je na kritické energii dosaženo nábojové rovnováhy. Tento proces se ovšem projeví závislostí celkového proudu emitovaných elektronů na čase. Využití kritických energií pro zobrazení nevodivých vzorků je nasnadě, problematické je ovšem kritickou energii nalézt. Původní metoda zjišťování kritické energie na základě časové závislosti obrazového signálu z dosud neosvětleného bodu [1] umožnila přistoupit k vývoji rutinního postupu zobrazování nevodivých vzorků.

Metoda je závislá na počítačovém řízení polohy primárního svazku, sběru obrazových dat a předpětí vzorku, který hraje roli katody v katodové čočce, v níž je primární svazek bržděn na zvolenou energii dopadu bez významné změny rozlišení obrazu [2]. Časový vývoj celkového proudu emitovaných elektronů, detekovaného na anodě katodové čočky, je registrován v řadě přednastavených bodů. Nabíjecí křivky jsou poté integrovány vzhledem k úrovni svých asymptotických hodnot a postupně jsou vylučovány závislosti nejvíce se lišící od průměrné. Průměrný integrál je považován za úměrný velikosti vzniklého povrchového náboje a tedy i vzdálenosti od kritické energie. V uzavřené počítačem řízené smyčce je postupně kritická energie vyhledána a použita k sejmutí obrazu dosud nevyužité části zorného pole. Tento postup [3,4] umožňuje rutinně sejmout obraz nevodivého vzorku vykazujícího jednu kritickou energii anebo více navzájem blízkých hodnot, jak tomu často bývá u preparátů z biomedicinské oblasti.

Bude prezentován současný stav vývoje metody včetně příkladů výrazně heterogenních vzorků, jejichž rozptyl kritických energií neumožňuje sejmout obraz nezatížený vlivem povrchového náboje. Pro většinu preparátů je však tímto předkládán velmi efektivní postup zobrazení nevodivého povrchu.

- [1] L.Frank, I.Müllerová, Proc. ICEM13, Paris 1994, Vol. 1, 139.
- [2] I.Müllerová, L.Frank, Scanning 15 (1993), 193.
- [3] L.Frank, M.Zadražil, I.Müllerová, Mikrochimica Acta [Suppl.] 13 (1996), 289.

[4] M.Zadražil, L.Frank, I.Müllerová, Proc. ICEM 14, Cancun 1998, in print.

POROVNÁNÍ ULTRASTRUKTURNÍCH ZMĚN BUNĚK KOMÁRA *Culex sitiens* PO PŮSOBENÍ DVOU VYSOCE PURIFIKOVANÝCH MAKROTETROLIDŮ

Zdeněk Žižka¹, Jaroslav Weiser² a Josef Jizba³

¹Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha, ²Entomologický ústav AV ČR, České Budějovice a Laboratoř bioaktivních produktů, Praha; zizka@biomed.cas.cz

Účinky makrotetrolidů na ultrastrukturu buněk a tkání byly studovány zejména jako vliv směsi aktivních látek (monaktin, dinaktin, trinaktin a stopy tetranaktinu) na larvy komára *Culex pipiens* [1,2] a na samice roztoče *Tetranychus urticae* [3]. V této práci porovnáme účinky čistého monaktinu a tetranaktinu na buňky a tkáně larev komára *C. sitiens.*

Produkční kmen *Streptomyces griseus* byl kultivován v baňkách na mediu s rozpustným škrobem a kukuřičným extraktem při 28^{0} C po dobu 4 dnů. Mycelium bylo extrahováno metanolem a chloroformem a získaný produkt separován sloupcovou chromatografií. Frakce obsahující monaktin a tetranaktin byly purifikovány chromatograficky. K pokusům byly použity larvy (L₄) komára *C. sitiens* z laboratorního chovu, na které bylo působeno monaktinem nebo tetranaktinem v konečné koncentraci 0,5 mg/mL po dobu 24 hod. Larvy (včetně kontrolních) byly fixovány 3% glutaraldehydem v kakodylátovém pufru (1 hod. při 4⁰C), postfixovány 1% OsO₄ (4 hod. při 4⁰C) a po odvodnění zality do Vestopalu W. Ultratenké řezy kontrastované uranylacetátem a citrátem olova byly prohlíženy v elektronových mikroskopech Philips CM 100 (planfilm Kodak 4489) a Philips EM 300 (desky ORWO EU-2).

Při studiu ultrastruktury jsme se zaměřili zejména na změny ve svalové tkáni komářích larev. Chromatin v jádrech se shlukuje do bloků při jaderné membráně, které v případě monaktinu jsou menší, a dále dochází ke vzniku drobnějších granul v zóně kolem jadérka, které je zvětšené a kulovité na rozdíl od často se vyskytujícího členitého jadérka po působení tetranaktinu. Diference jsou také v morfologii jaderné membrány, kde po působení tetranaktinu dochází ke značné dilataci perinukleárního prostoru. Mitochondrie se vyznačují v obou případech nepravidelným tvarem, dilatací, kristolýzou a po působení monaktinu někdy navíc dochází i ke hromadění elektrondensních granul v matrix. Sarkoplasmatické retikulum se v obou případech vyznačuje dilatací, snížením density a někdy i rozpadem do vesikulů. Podobně i cytoplasma v obou případech vykazuje značný úbytek ribosomů a tím i snížení density. Svalové fibrily po působení monaktinu i tetranaktinu jsou značně neuspořádané zejména v I-zóně a mají často nepravidelnou Z-linii. Nejmarkantnějším rozdílem je hromadění kontrastního barviva při přípravě preparátů pro elektronový mikroskop v anizotropní zóně po působení tetranaktinu.

- [1] Žižka Z., Weiser J., Blumauerová M., Jizba J., Cytobios 58 (1989), 85.
- [2] Žižka Z., Folia Microbiol. <u>43</u> (1998), 7.
- [3] Žižka Z., Pelc R., Jizba J., Kandybin N.V., Sergeeva M.V., Pesticide Biochem. Physiol. <u>58</u> (1997), 165.