

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Porovnání metod pro fixaci a přípravu vzorků tasemnic pro
skenovací elektronovou mikroskopii**

Bakalářská práce

Pavla Šedivá

Školitel: RNDr. Roman Kuchta, PhD.

České Budějovice, 2011

Šedivá, P., 2011: Porovnání metod pro fixaci a přípravu vzorků tasemnic pro skenovací elektronovou mikroskopii. [Comparisons of methods for fixation and preparation of samples for tapeworms by scanning electron microscopy. Bc. Thesis, in Czech.] – 49p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Bakalářská práce nabízí základní informace o vývoji elektronové mikroskopie, stručný popis funkce skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) a přípravě vzorků. Různé metody přípravy vzorků pro SEM jsou srovnávány za použití tasemnice rodu *Senga* jako modelu.

Annotation:

The bachelor thesis provides a review of the basic information about the development of electron microscopy, a brief description of scanning electron microscope (SEM) and preparation of samples. Different methods of processing samples for SEM observations have been compared using tapeworms of the genus *Senga* as a model.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedené v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 12.12.2011

.....
Pavla Šedivá

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych na tomto místě poděkovat zejména mému školiteli Romanu Kuchtovi za odborné vedení práce, rady, podporu a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Tomášovi Scholzovi a Ing. Janě Nebesářové za rady a pomoc při psaní, Jiřímu Vaněčkovi a Martině Tesařové za pomoc při práci na skenovacím elektronovém mikroskopu a Martině Borovkové za přípravu trvalých preparátů. Také chci poděkovat celé laboratoři helmintologie za přátelské prostředí.

Obsah

1.	ÚVOD	1
2.	CÍL PRÁCE	1
3.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
3.1.	Historie	2
3.1.1	Vývoj elektronové mikroskopie	2
3.1.2.	Vývoj transmisní elektronové mikroskopie	2
3.1.3.	Vývoj skenovací elektronové mikroskopie	3
3.2.	Princip skenovacího elektronového mikroskopu	6
3.2.1.	Stručný popis	6
3.2.2.	Zdroj elektronů	6
3.2.3.	Soustava elektromagnetických čoček	8
3.2.4.	Tvorba obrazu	9
3.2.5	Záznam obrazu	11
3.2.6.	Vakuový systém	11
3.2.7.	Typy skenovacích elektronových mikroskopů	12
3.3.	Příprava preparátu	13
3.3.1.	Odběr a očištění vzorku	13
3.3.2.	Fixace	13
3.3.3.	Odvodnění	20
3.3.4.	Sušení	21
3.3.5.	Lepení	25
3.3.6.	Pokovení	25
4.	METODY A MATERIÁL	27
4.1.	Modelový organismus	27
4.2.	Fixace materiálu	31
4.3.	Roztlakové a trvalé preparáty	31
4.4.	Příprava preparátu pro SEM	32
4.4.1.	Sušení HMDS bez postfixace	32
4.4.2.	Postfixace oxidem osmičelým a sušení HMDS	33
4.4.3.	Sušení metodou kritického bodu	33
4.4.4.	Mrazová sublimace	33

4.5.	Skenovací elektronový mikroskop FESEM JSM-7401 F	34
5.	VÝSLEDKY	35
5.1.	Vyhodnocení jednotlivých způsobů fixace	35
5.1.1.	Fixace horkým 4% formaldehydem (HF)	35
5.1.2.	Fixace studeným 4% formaldehydem (CF).....	35
5.1.3.	Fixace studeným 1,5% glutaraldehydem a 1,5% formaldehydem (GA).....	35
5.1.4.	Fixace 70% etanolem (70%)	36
5.1.5.	Relaxace ve fyziol. roztoku před fixací studeným 4% formaldehydem (F \odot).....	36
5.1.6.	Relaxace ve vodě před fixací studeným 4% formaldehydem (H ₂ O)	36
5.1.7.	Fixace tlakem s přidáním studeného 4% formaldehydu (ROZ).....	37
5.2.	Vyhodnocení jednotlivých způsobů přípravy pro SEM	41
5.2.1.	Postfixace oxidem osmičelým (OSM)	41
5.2.2.	Sušení metodou kritického bodu (CPD).....	41
5.2.3.	Sušení mrazovou sublimací (KRYO).....	41
6.	DISKUZE	44
6.1.	Problematika taxonomie rodu <i>Senga</i> Dollfus, 1934.....	44
6.2.	Příprava preparátů	44
6.2.1.	Fixace	44
6.2.2.	Způsob přípravy vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii	47
7.	ZÁVĚR	48
8.	LITERATURA	49

1. ÚVOD

Elektronový mikroskop je jedním z vynálezů, k jehož vytvoření nestačila pouze jedna geniální myšlenka. Poskytuje nám možnost zkoumat úžasný mikrosvět již po několik desetiletí. Vedle zlepšování parametrů mikroskopu se vyvíjejí také metody přípravy preparátů. Elektronovou mikroskopii můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny, a to na transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) a skenovací elektronovou mikroskopii (SEM).

Transmisní (prozařovací) elektronová mikroskopie je považována za jednu z přímých experimentálních metod. Zobrazuje vnitřní strukturu v rozlišení až desetin nanometru. Obraz je tvořen převážně elektrony procházejícími preparátem. Preparáty připravené k pozorování musejí být velmi tenké (do 100 nm) vzhledem k malé penetrační schopnosti elektronového svazku a zbavené vody z důvodu vysokého vakua v tubusu. Tato metoda umožnila pozorovat tak malé organizmy jako jsou například viry.

Skenovací (rastrovací, řádkovací) elektronová mikroskopie je metodou nepřímou, protože vytváří obraz za pomoci sekundárního signálu vzniklého interakcí primárních elektronů s preparátem. Dosahuje rozlišení v řádu nm. Zobrazuje topografii povrchu preparátu, který musí být ve většině případů zbavený vody z důvodu vysokého vakua a dostatečně tepelně a elektricky vodivé.

2. CÍL PRÁCE

1. Provést literární rešerši na téma skenovací elektronová mikroskopie a příprava vzorků.

2. Porovnání různých fixačních metod a postupů přípravy vzorků pro SEM na materiálu tasemnice *Senga* sp. (Cestoda: Bothriocephalidea)

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Historie

3.1.1 Vývoj elektronové mikroskopie

Sir Thompson, anglický experimentální fyzik, stál v roce 1897 u objevu elektronu, prvního kroku na cestě k elektronovému mikroskopu. V roce 1929 získal de Broglie Nobelovu cenu za navržení principu duality vlny a částice. Roku 1927 došlo k nezávislému potvrzení tohoto jevu v práci Davissona s Germerem a v obdobné práci Thompsona s Reidem elektronovou difrakcí, jenž ukázala vlnovou povahu elektronu (Nebesářová, 2001). Při experimentu s vysokovoltovým oscilografem v roce 1926 Gabor ukázal, že krátká cívka je schopna koncentrace elektronového svazku. To vedlo k sestavení první zaostřovací cívky v kovovém pouzdře. Tento jev byl roku 1926 vysvětlen Buschem, který spočetl trajektorii elektronu pohybujícího se v magnetickém poli krátké cívky. Bush později popsal podobnost ve vychylování paprsku elektronů magnetickým polem solenoidů a světla skleněnou čočkou (Busch, 1927).

3.1.2 Vývoj transmisní elektronové mikroskopie

Všechny tyto výsledky vedly Knolla a Rusku k sestavení testovacího zařízení. Roku 1931 byl vytvořen na Technologické univerzitě v Berlíně první přístroj s elektromagnetickou čočkou. Nejednalo se o mikroskop jaký známe dnes, neboť měl studený zdroj, urychlovací napětí 75 kV a dvě elektromagnetické čočky (Mráz a Polónyí, 1988). Verze Rusky z roku 1933 již měla podstatné znaky dnešních mikroskopů a Ruska obdržel roku 1936 Nobelovu cenu za konstrukci elektronového mikroskopu. Od roku 1939 se začal vyrábět první komerční transmisní elektronový mikroskop firmou Siemens a Halske. Na jeho vývoji se podílel Ruska a Von Borry. Tento mikroskop dosahoval rozlišovací schopnost 10 nm. Vývojem elektronového mikroskopu se však zabývali i jiní. Na univerzitě v Torontu tým vedený Burtonem vyvinul elektronový mikroskop, který se stal základem pro výrobu v Radio Corporation of Americas. Tato firma jako první komerčně vyráběla mikroskopy v Severní Americe. K evropským společnostem zabývajícím se konstrukcí elektronových mikroskopů patřily Carl Zeiss, Siemens a Philips. Roku 1939 se začínají elektronovou

mikroskopii zabývat i některé japonské společnosti jako Japan Electron Optics Laboratory (JEOL), Hitachi, Toshiba či Akashi (Fujita, 1986). První komerčně vyráběný mikroskop v Japonsku byl od firmy Hitachi v roce 1941, v roce 1948 následovaly mikroskopy firmy JEOL. Od roku 1965 elektronová mikroskopie zaznamenala rychlý rozvoj. Jedním z významných impulzů byl vývoj katody s krystalem LaB_6 (hexaboridu lanthatu). Roku 1966 byla Crewem vynalezena autoemisní tryska. Oba tyto zdroje poskytují koherentnější svazek elektronů.

Ani bývalé Českoslovenko nezůstalo pozadu. V Ústavu přístrojové techniky v Brně vznikla v šedesátých letech skupina vedená Drahošem a Delongem zabývající se konstrukcí elektronových mikroskopů. Výsledkem jejich práce byla řada mikroskopů Tesla BS s rozlišovací schopností 2–5 nm, zdrojem wolframové katody a urychlovacím napětím 30 až 75 kV (Mráz a Polónyi, 1988). Na počátku osmdesátých let se rozlišovací schopnost mikroskopů posunula až na 0,15 nm. V současné době se vývojem a výrobou zabírají zejména firmy FEI, JEOL, Hitachi a Carl Zeiss. Současné transmisní elektronové mikroskopy dosahují hranice rozlišení 0,1 nm, s urychlovacím napětím 100–300 kV a standardní výbavou je autoemisní elektronový zdroj. Společnost FEI v roce 2004 pokořila bariéru rozlišení 0,1 nm s přístrojem 200kVTecnaTM (Wikipedie, 2011). Stejná společnost představila v roce 2005 TEM Titan s rozlišením menším než 1 Angström. V současné době je společností FEI na trh dodáván mikroskop G2 Tecnai 30 kombinující všechny zobrazování, difrakce a analytické techniky na vysoké prostorové rozlišení a detekční účinnosti (FEI, 2011).

3.1.3. Vývoj skenovací elektronové mikroskopie

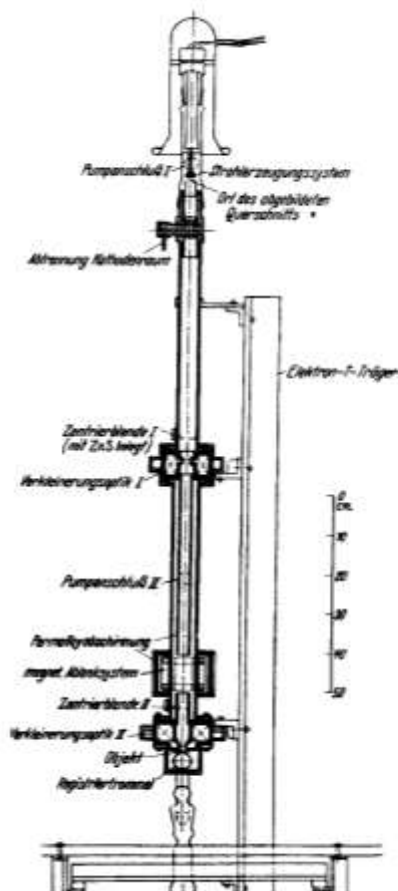
První popis skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) pochází od německého fyzika von Ardenneho z roku 1938. Ardenne položil teoretický i praktický princip řádkování u transmisní elektronové mikroskopie. Přidal vychylovací cívku mezi dvě čočky transmisním elektronovém mikroskopu a tím vytvořil první skenovací transmisní elektronový mikroskop (STEM) (Obr. 2). Mikrofotografie krystalů oxidu zinečnatého (ZnO) byly zhotovené tímto přístrojem při urychlovacím napětím 23 kV, zvětšením 8000× a s rozlišením 50–100 nm (Obr. 1). Tvorba obrazu trvala dlouhých 20 minut, protože film byl mechanicky skenován paprskem elektronů (Ardenne, 1938 a, b).

První skenovací mikroskop byl sestaven v roce 1942 rusko-americkým vědcem Zworykinem, který rozpoznal, že sekundární elektrony mohou být zodpovědné za topografický kontrast. Rozlišení 1 μm , kterého bylo tímto přístrojem dosaženo, bylo považováno za neúspěch. Zworykin se zaměřil na

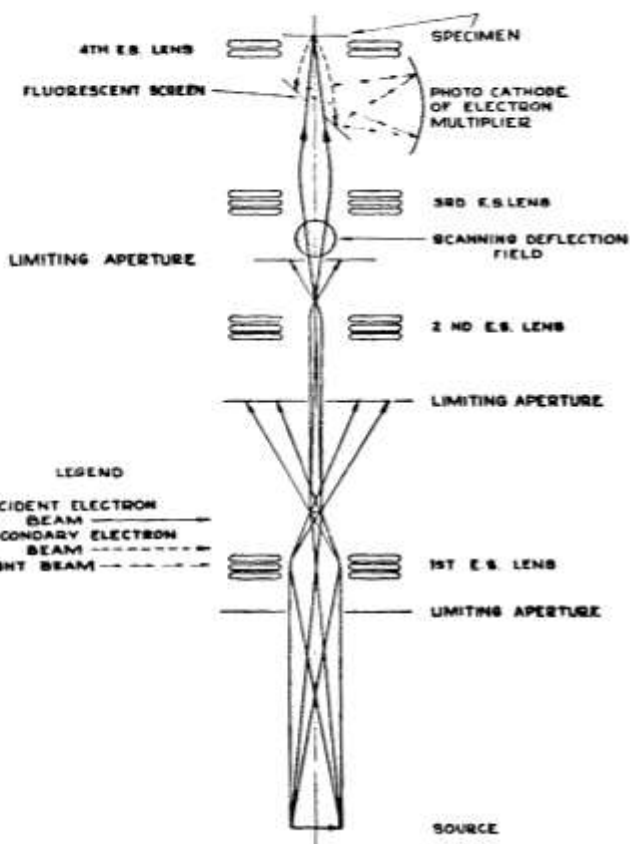


Obr. 1. Mikrofotografie krystalů ZnO (převzato z Ardenneho. 1938 b)

redukování velikosti zdroje a zlepšení poměru signál-šum použitím účinnějšího detektoru. Rovněž analyzoval vztah mezi aberacemi čočky, hustotou proudu ve svazku a velikostí stopy. Tento vývoj vedl k mikroskopu, který měl tři čočky a vychylovací cívka byla umístěna mezi druhou a třetí čočkou, zdroj urychlených elektronů se nacházel na dně a vzorková komora byla v pohodlné operační výšce. Rozlišovací schopnost tohoto přístroje byla 50 nm (Goldstein a kol., 1981) (Obr. 3). Další vývoj byl pozastaven druhou světovou válkou.



Obr. 2. STEM - průřez (převzato z Ardenneho, 1938b)



Obr. 3. SEM – elektronová optika (převzato z Zworykina a kol., 1942)

Anglický vědec Oatley, zabývající se vývojem skenovacího elektronového mikroskopu na univerzitě v Cambridge roku 1952 sestrojil společně McMullanem skenovací elektronový mikroskop s rozlišovací schopností 50 nm (McMullan, 1993; Smith, 1997). Na jejich práci navázal Smith (1959), který se zabýval úpravou signálu ke zlepšení obrazu. Představil nelineární zesílení signálu, zlepšil skenovací systém zavedením dvoupatrového skenování, zaměnil elektrostatické čočky za elektromagnetické a jako první vložil do SEMu stigmátor (pro korekce astigmatismu viz. kap. 3.2.3.). Wells postavil roku 1953 druhý SEM s elektrostatickými čočkami, ale propagoval použití detektoru odražených elektronů před sekundárními elektrony (Breton, 2009).

Dalším krokem kupředu byla modifikace detektoru sekundárních elektronů navrženého Zworykinem. Everhart a Thornley (1957) připojili na vlnovod scintilátor a na jeho čelo zesilovač. Toto zlepšení zvýšilo množství sebraného signálu. Výsledkem byl lepší poměr signálu a šumu a mohly být detekovány i slabé signály. Užití tohoto detektoru umožnilo Oatleyovi a Everhartovi sledovat poprvé jev popsáný jako napěťový kontrast (Everhart a Thornley, 1960).

Pease (1963) sestavil přístroj nazvaný SEM V, který obsahoval tři elektromagnetické čočky, zdroj ve spodní části a detektor sekundárních elektronů podle Everharta a Thornleye. SEM V se stal předlohou pro prototyp Cambridge Scientific Instruments Mark I. Vyvinutím katody LaB₆ Broersem (1969) došlo k dalšímu pokroku. Tato katoda produkovala proud, který bylo možné koncentrovat do menšího svazku a tím zlepšit rozlišovací schopnost (Pease, 1963; Pease a Nixon, 1965).

Firma JEOL v letech 1966–1969 vytvořila čtyři komerční přístroje SEM. Pracovaly s urychlovacím napětím od 5 do 50 kV a jejich rozlišovací schopnost se z původních 50 nm zvýšila na 20 nm. V roce 1977 společnost Philips vyrobila SEM 501 s urychlovacím napětím 30 kV a rozlišením 7 nm. V SEM 501B byly poprvé použity EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy) a WDS (wavelength dispersive X-ray spectroscopy) (Palucka, 2002). Vývoj postupoval dopředu a v letech 1980–1986 bylo vytvořeno několik typů mikroskopů. V roce 1980 instalovala společnost Philips do svého modelu SEM 505 nový scintilátor pro detekci zpětně odražených elektronů, jehož citlivost byla 200× větší než dřívější detektory. Do SEM 515 byla přidána počítačová kontrola zaostření a korelace astigmatismu. Mikroskopy JSM-T firmy JEOL byly vybaveny v roce 1986 autostigmátorem a automatickým zaostřováním (Palucka, 2002). V současné době se rozlišovací schopnost mikroskopů s termoemisním zdrojem při urychlovacím napětí 30 kV pohybuje mezi 3–4 nm. SEM s autoemisní tryskou

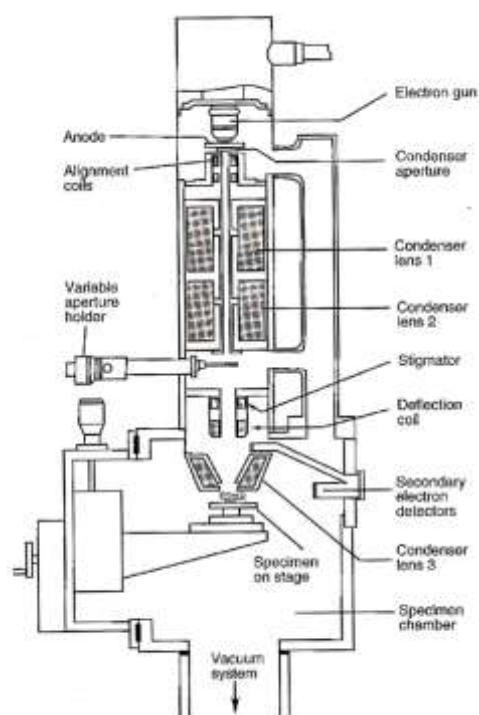
(FED-Field Emission Gun) dosahuje rozlišení až 1 nm při urychlovacím napětí 15–30kV (FEI, 2011; JEOL, 2011).

Enviromentální elektronový mikroskop (ESEM) byl vynalezen Danilosem a v roce 1988 byl uveden na trh první komerčně vyráběný přístroj společností ElectroScan Corporation v USA (Neděla, 2008).

3.2. Princip skenovací elektronové mikroskopie (SEM)

3.2.1 Stručný popis

Skenovací elektronový mikroskop nám umožňuje studovat ultrastrukturu pomocí elektronového svazku ve vakuu. Elektronový svazek vzniká emisí elektronů z katody a dále je urychlován k anodě. Svazek je následně zaostřován elektromagnetickým, elektrickým nebo magnetickým polem čoček a rozpoříván před dopadem na preparát vychylovací cívkou. Svazek elektronů vytváří obraz interakcemi s pozorovaným preparátem. V blízkosti preparátu je mikroskop vybaven různými detektory, kterými můžeme zjistit nejen topografii, ale také prvkové složení preparátu (Obr. 4).



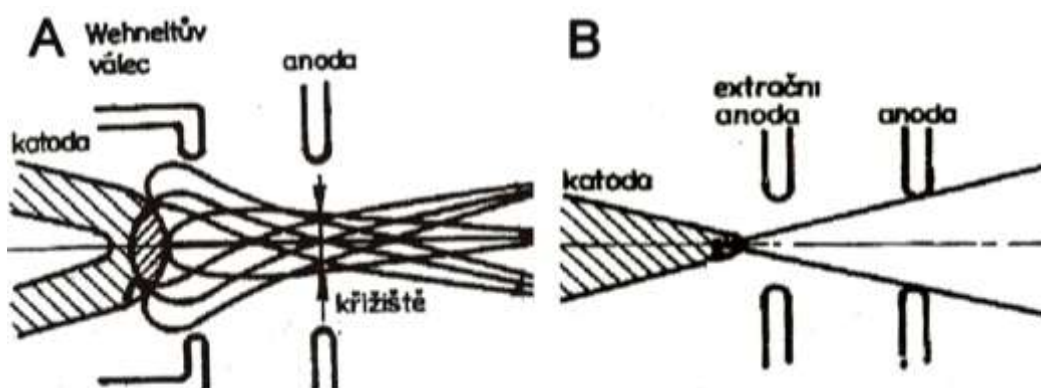
Obr. 4. Schéma skenovacího elektronového mikroskopu (převzato z Bozzoly a Russela, 1999)

3.2.2. Zdroj elektronů

Osvětlovací systém je podobný pro TEM i SEM. Transmisní elektronové mikroskopy vyžadují větší možnost regulace proudu elektronového svazku. U skenovacích elektronových mikroskopů základním požadavkem je dosažení maximální hustoty elektronového proudu do minimální plochy (Bílý, 2007). Primární elektrony jsou emitovány ve vakuu ze zdroje, který je umístěn ve špičce tubusu. Emise elektronů spojuje působení teploty a elektrického proudu. Zdroje obecně dělíme na dvě skupiny termoemisní a autoemisní, oba by měly poskytovat koherentní a monochromatický svazek elektronů.

Při termoemisi jsou z povrchu katody do vakua emitovány elektrony, které v důsledku tepelného působení překonají energetickou bariéru. Elektrony procházejí Wehneltovým válcem k anodě (Obr. 5A). Před anodou se dráhy elektronů křížují a vytvářejí nejužší průřez svazku tzv. „křížičště“, tedy reálný zdroj. Wehneltův válec je proti katodě, má záporný potenciál -100 kV, funguje jako filtr zadržující elektrony s nízkou energií. Nejpoužívanější katoda je vyrobena z tenkého wolframového drátku (o průměru ~ 0,1 mm) ve tvaru V, přímo žhavené na teplotu kolem 2800 K. Tato katoda produkuje elektrony se směrovou proudovou hustotou kolem $10^9 \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sr}^{-1}$ (Karlík, 2005). Podstatně lepších výsledků lze dosáhnout s katodou z hexaborid lanthanu (LaB_6). Katoda při obvyklé pracovní teplotě 1800 K dosahuje směrové proudové hustoty elektronů $\sim 10^{10} \text{ A}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sr}^{-1}$. U obou těchto katod má nejmenší průměr primární svazek v elektronové trysce velikost řádu μm (wolframová 9 μm , LaB_6 5 μm) (Nebesářová, 2001). Termoemisní katody potřebují hodnotu vakua 10^{-2} – 10^{-4} Pa (Eckertová a Frank, 1996)

U autoemisního zdroje se na emisi podílí z větší části účinek elektronického pole, zatímco teplota pouze podporuje emisi a udržuje čistotu a stabilitu povrchu katody. Vlastní tryska je tvořena katodou připevněnou na vysokonapěťový zdroj a dvou za sebou jdoucích anod (Obr. 5B). První anoda má poměrný potenciál (2–5 kV), kterým je řízen emisní proud. Druhá anoda je uzemněna. Katoda je hrotová, tvořena monokrystalem wolframu určité krystalové orientace. Hrot je připraven elektrolytickým leptáním do průměru kolem 100 nm. Výhodami jsou menší velikost zdroje, vyšší koherence, monochromaticnost a asi 1000× vyšší směrová proudová hustota. Průměr primárního svazku je 1–2 nm. Autoemisní tryska vyžaduje vysoké hodnoty vakua 10^{-8} Pa (Eckertová a Frank, 1996).



Obr. 5. Emisní charakteristika **A.** Termoemisní trysky, **B.** Autoemisní trysky (převzato z Eckertové a Franka.1996)

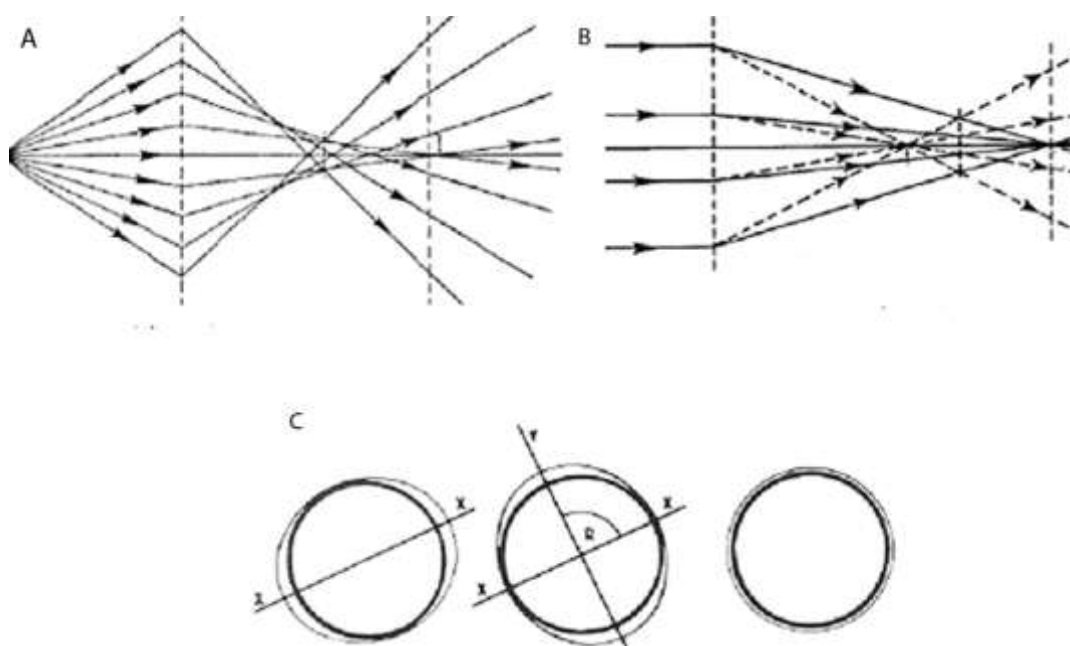
Termoautoemisní zdroje jsou katody, které pracují při teplotách, kdy se projevuje termoemise, ale principem se blíží k autoemisním katodám. Pracují v obdobném uspořádání jako autoemisní zdroje. Aktivace spočívá v pokrytí povrchu katody atomární vrstvou jiného prvku. V důsledku vzniklé vazby se snižuje výstupní energie elektronů. Nečastěji se aktivuje wolframové vlákno kyslíkem nebo zirkoniem a kyslíkem (Eckertová a Frank, 1996). Provozní teplota je v rozmezí 1200–1800 K. Při zvýšené teplotě snáší aktivovaná katoda nižší vakuum (10^{-7} – 10^{-6} Pa). Směrová proudová hustota vzrůstá na 10^{14} A.m⁻².sr⁻¹ (Eckertová a Frank, 1996).

3.2.3. Soustava elektromagnetických čoček

Primární elektrony jsou urychleny potenciálem mezi katodou a anodou. Otvorem v anodě prolétají do soustavy elektromagnetických čoček. Soustava čoček zajišťuje úzký průměr svazku primárních elektronů a obvykle je tvořena jednou nebo dvěma kondenzorovými čočkami a objektivovou čočkou. Objektivová čočka je nejdůležitější částí a na jejích vlastnostech závisí dosažená rozlišovací schopnost. Před objektivovou čočkou jsou umístěny vychylovací cívky, které vychylují primární paprsek ve dvou na sebe kolmých směrech. Pro každý směr se užívá dvojice cívek, čímž se snižují optické vady zobrazení. Vychýlením primárního paprsku dochází k postupnému skenování povrchu po jednotlivých řádkách. Rychlost přeběhu paprsku se může měnit, ale nejvhodnější je 25 obrazů za sekundu (Nebesářová, 2001).

Vady optické soustavy jsou důvodem, proč se nám nedaří dosáhnout teoretické rozlišovací schopnosti. Sférická vada je způsobena neschopností zaostřit všechny paprsky vycházející z dobového zdroje opět do jednoho bodu (Obr. 6), a proto je zvětšení na okrajích jiné než ve středu čočky. Tato vada se odstraňuje clonami (Nebesářová, 2001). Chromatická vada je způsobena rozdílnou energií elektronů ve svazku. Pomalejší elektrony mají větší vlnovou délku a v magnetickém poli cívek jsou vychylovány jinak než rychlejší elektrony (Obr. 6) (Nebesářová, 2001). Osový astigmatismus je vada, která se nejvíce projevuje u skenovacího elektronového mikroskopu (Obr. 6), a která je dána nesymetrií magnetického pole. Čočka má různé ohniskové vzdálenosti ve dvou na sebe kolmých osách. Projevem této vady je zdeformovaný obraz. Astigmatismus je způsoben nejčastěji nečistotami, které jsou nevodivé nebo mají prostorový náboj, a může být korigován stigmátorem. Tato soustava cívek umožňuje plynulé změny magnetického pole proti poli vyvolávajícímu asymetrii (Nebesářová, 2001).

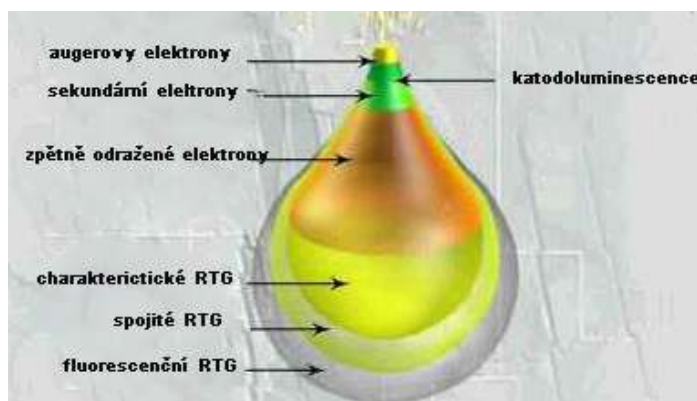
Prohlížení preparátu může být doprovázeno rušivými jevy, jako například nabíjením preparátu, kdy dopadající záporně nabitě primární elektrony se odkloní a dojde k zahlcení detektoru sekundárních elektronů. Tento jev nastává v případě, kdy není preparát dostatečně elektricky vodivý, a projevuje se bílými řádky až pulzací obrazu. Dalším jevem, který ovlivňuje obraz, je hranový jev, kdy primární svazek dopadá na hranu a tím se zvětšuje oblast produkce sekundárních elektronů. Ve výsledku je takové místo přesvícené a světlejší, aniž by muselo být vyvýšené (JEOL, 2005).



Obr. 6. Vady optické soustavy **A.** Sférická vada, **B.** Chromatická vada, **C.** Astigmatismus (převzato z Nebesářové, 2001)

3.2.4. Tvorba obrazu

Po průchodu optickou soustavou dopadá rastrující paprsek na preparát. Základním jevem při tvorbě obrazu je interakce urychlených elektronů s atomy preparátu (Obr. 7). Elektrony primárního svazku jsou rozptylovány, nebo ztrácejí část energie v poli jader a



Obr. 7. Prostorové rozdělení interakcí (převzato z Geology, 2011).

elektronových obalů. Výsledky interakce můžeme rozdělit na dva případy: pružný rozptyl, kdy dochází ke změně směru primárního elektronu, a nepružný rozptyl, při kterém nastává ztráta energie (Hulínský, 1982).

Detekovaným signálem, který nám poskytuje informace o topografii, jsou sekundární elektrony (SE). Vznikají nepružným rozptylem po nárazu primárních elektronů do elektronů ve valenčním nebo vodivém pásu. Při této situaci dochází ke ztrátě energie, a proto se mohou sekundární elektrony uvolňovat jen v blízkosti povrchu do hloubky 5 nm. Horní hranice energetického spektra sekundárních elektronů je 50 eV (Bílý, 2007). Sekundární elektrony jsou nejčastěji detekované detektorem podle Evertharta a Thornleye (ET). Detektor je tvořen scintilátorem, který po dopadu elektronu uvolní záblesk světla ve vlnové délce 550–650 nm. Intenzita světelného pulzu je přímo úměrná energii elektronů, které ho vyvolaly. Tenký kovový film na přední straně scintilátoru má potenciál 10 kV, který urychluje dopadající elektrony, aby měly dostatečnou energii k vyvolání pulzu. Mimo vakuum se nachází fotonásobič, k němuž je světlo přivedeno světlovodem a průchodem přes křemenné okénko. Fotonásobič zachytí světelný signál a převádí jej na elektrický. Při převodu dochází k zesílení zhruba 10^3 až $10^6\times$ (Nebesářová, 2001). Scintilátor je umístěn pod pólovými nástavci, cca 10–20 mm od vzorku, aby neovlivňoval dopadající primární svazek, a je umístěn do Faradaovy klece s předpětím 200 V. Na detektor dopadá asi 60% uvolněných sekundárních elektronů, ale scintilátor postupně ztrácí svou citlivost, což je jeho nevýhodou (Nebesářová, 2001).

Dalšími druhy signálu, který můžeme zahrnout pod nepružný rozptyl jsou rentgenové (RTG) záření, Augerovy elektrony a katodoluminescence. RTG záření vzniká při srážce primárního elektronu s elektrony ve vnitřní vrstvě obalu atomu preparátu. Tím dojde k předání většího množství energie a elektrony opouštějí svou energetickou vrstvu. Ionizovaný atom se z excitovaného stavu snaží přejít do základního stavu zaplněním vzniklé díry elektronem z vnější vrstvy. Energie je při tomto procesu vyzářena jako RTG záření. Pro detekci RTG záření jsou používány počítače plněné plynem nebo polovodičovým detektorem pracujícím na principu fotoefektu (Bílý, 2007). Alternativním jevem k RTG záření jsou Augerovy elektrony. Jejich vznik nastává u prvků s malým atomovým číslem. Energie Augerova elektronu je charakteristická pro daný atom, a tyto elektrony vznikají v malé vzdálenosti od povrchu preparátu do hloubky 3 nm (Bílý, 2007). Katodoluminescence se uplatňuje spíše při studiu polovodičových struktur. Vzniká přechodem elektronu z valenční vrstvy do vodivé. Po tomto přechodu vyvolaného srážkou nastane rekombinace

elektronů k zaplnění vzniklé díry. Přebytečná energie je vyzářena v podobě fotonu (Bílý, 2007).

Zpětně odražené elektrony (BSE) nám poskytují informace o prvkovém složení preparátu, neboť jejich množství je závislé na středním atomovém čísle. Všechny emise nad 50 eV jsou považovány za zpětně odražené elektrony (Bílý, 2007). Při tomto snímání lze s dobrým kontrastem odlišit prvky, jejichž rozdíl atomových čísel je roven alespoň 3 (Černohorský a Jandera, 1997). Zpětně odražené elektrony vznikají pružným rozptylem, kdy dochází ke změně hybnosti, ale jen s malou ztrátou energie. Jedná se o výsledek interakce primárních elektronů s elektrostatickým potenciálem jader atomů, které odklání jejich původní dráhu. Díky zachované energii se uvolňují z hloubky 300 nm. Jejich detektor bývá umístěn na okraji pólových nástavců objektivové čočky, kde jeho účinnost záchytu přesahuje 50% (Nebesářová, 2001). Zpětně odražené elektrony lze detekovat již dříve popsáním detektorem podle Everhart-Thornleye nebo polovodičovým, který je založen na vzniku párů elektron-díra při průchodu nabitě částice s určitou energií. Vzniklé páry nesou informaci o proletujících částicích, zatímco páry vzniklé náhodně představují šum (Goldstein a Yakowitz, 1975). Výhodou polovodičového detektoru je jeho jednoduchost, nízká cena, variabilita tvaru a velikosti. Nevýhodou jsou nižší poměr signálu k šumu a nízkou citlivost (Neděla, 2008).

3.2.5. Záznam obrazu

V minulosti byl kromě pozorovacího monitoru součástí mikroskopu i fotomonitor s jemnějším zrnem, k němuž se připojoval fotoaparát (Nebesářová, 2001). V současnosti je SEM tradičně dodáván s digitálním záznamem obrazu. Digitalizace obrazu není tak náročná jako u TEM, protože signál nese informaci obrazovou i informaci o pozici. Digitální obraz nám rovněž umožňuje úpravy v počítačových programech.

3.2.6. Vakuový systém

V celém vnitřním prostoru tubusu s elektronovou optickou soustavou a preparátovou komorou musí být vakuum odpovídající elektronovému zdroji. Důvodem je nutnost zamezit srážkám primárních elektronů s molekulami plynu a nečistot, které by vedly k jejich vychýlení nebo změně energie. K získání a udržení vakua je užíváno dvou- nebo třístupňového systému pump. Prvním je rotační pumpa, která pracuje na principu

mechanického přemístování plynu (vzduchu) z uzavřeného prostoru do atmosféry, a dosahuje snížení tlaku zhruba na hodnotu 10^{-1} Pa. Tato pumpa je užívána pro předčerpání zavzdušněného vnitřku mikroskopu nebo přechodové komory při výměně preparátu. Druhá pumpa je difúzní, a je založena na cirkulaci speciálního oleje s nízkou tenzí par, která snižuje tlak na 10^{-3} Pa. Zejména v oblasti elektronové trysky je zapotřebí podstatně vyšší vakuum, které je zajištěné iontovou vývěvou využívající pohlcování molekul plynů, jenž je zvyšováno jejich ionizací, na 10^{-5} – 10^{-9} Pa podle potřeb zdroje. Rovněž se používají turbomolekulární a kryogenní pumpy (Nebesářová, 2001).

3.2.7. Typy skenovacích elektronových mikroskopů

Prvním typem je vysokorozlišovací SEM, jehož zdrojem je autoemisní tryska poskytující primární svazek elektronů v průměru jednotek nm. Tato tryska vyžaduje vysoké hodnoty vakua (10^{-8} – 10^{-9} Pa) a mikroskop je schopen poskytnout zvětšení až 500 tisíckrát. Vzorky, které prohlížíme v tomto mikroskopu, musejí být zbaveny vody, odplyněné a pokryté vrstvičkou dobře elektricky a tepelně vodivého kovu (Jurečka a Nebesářová, 2010).

Vysokovakuový SEM má trysku termoemisní, a proto nevyžaduje tak vysoké hodnoty vakua vnitřního prostoru a dostačují hodnoty 10^{-4} – 10^{-5} Pa. Mikroskop dosahuje nižšího zvětšení než vysokorozlišovací, a to maximálně 100 tisíckrát. Vzorky musejí být pro prohlížení suché a potažené vrstvičkou kovu (Jurečka a Nebesářová, 2010).

Nizkovakuový SEM nám umožňuje pozorovat zavodněné preparáty až s 70% obsahem vody. Vnitřní prostor mikroskopu je rozdělen na oddělení s různým tlakem. Tlak v preparátové komoře je 200 Pa. Obraz je tvořen za pomoci zpětně odražených elektronů. Ty poskytují menší rozlišení, ale mají dostatečnou energii a rychlost, aby v zaplyněném prostředí preparátové komory dorazily k detektoru. Pokovení zvyšuje množství zpětně odražených elektronů a eliminuje nabíjení (Jurečka a Nebesářová, 2010).

Enviromentální skenovací elektronový mikroskop (ESEM) je druhým typem mikroskopu, který umožňuje studium vzorku obsahujícího vodu. V tomto mikroskopu můžeme pozorovat preparáty až s 90% obsahem vody. Mikroskop může být vybaven oběma druhy zdroje tedy jak termoemisním tak autoemisním. Vnitřní prostor je rozdělen na komory se vzrůstajícím tlakem. V preparátové komoře je tlak až 2 kPa, což nám umožňuje pozorování zavodněných vzorků bez explozivních reakcí vody. K tvorbě obrazu se využívá sekundárních i zpětně odražených elektronů, které ionizují molekuly plynu v prostoru mezi vzorkem a detektorem. Elektrony uvolněné při ionizaci přenáší signál dál do tzv. ionizačního

detektoru. Nevýhodou je zde opět nižší rozlišovací schopnost, ale elektricky nevodivé materiály lze pozorovat bez pokovení (Jurečka a Nebesářová, 2010).

Mikroskopy Quanta™ společnosti FEI mají rozlišovací schopnost 2,5–3 nm při 30 kV pro dva režimy (nízké vakuum a ESEM) (FEI, 2011). Tyto hodnoty jsou však vždy výrazně nižší u biologických vzorků, u kterých záleží na jejich složení a případné úpravě.

3.3. Příprava preparátů

3.3.1. Odběr a čištění vzorků

Při odběru vzorku je důležitá velikost, nejlépe 1–10 mm³. Měla by zhruba odpovídat velikosti posuvného preparátového stolku mikroskopu. Veškeré úpravy musejí být prováděny ostrými nástroji, abych nebyl poškozen povrch zkoumaného preparátu. Některé ploché blanité tkáně, které se ohýbají, mohou být vyrovnány před fixací na navlhčeném filtračním papíře.

Prvním krokem po odebrání vzorku je jeho očištění. Většina biologických preparátů má povrch znečištěný, což zabraňuje pozorování. Větší částice se z povrchu odstraňují jemným štětečkem nebo preparační jehlou a následně se opláchnou izotonickým roztokem. Jedná se o kapalinu o známém pH a osmolaritě. Nejčastěji se užívá 2–5% fyziologický roztok při pokojové teplotě (Goldstein a kol., 1981). Pokud je nám známá biochemická povaha kontaminace můžeme k oplachu využít malé množství povrchově aktivních látek (Goldstein, 1981). U organismů s křemičitou nebo vápenatou schránkou používáme oxidační činidla, jako například manganistan draselný (Goldstein a kol., 1981). Intenzita oplachování je individuální. Jemné oplachování vzorek nezbaví kontaminace, ale příliš silné oplachování může vzorek poškodit. Mezi účinné, ale potenciálně riskantní metody očištění patří sonifikace nebo ofukování tlakovým vzduchem (Nebesářová, 2001). U suchých vzorků se doporučuje oprašování. Očištění musí být přiměřené typu vzorku a hlavně rychlé, aby nedošlo k autolýze tkání.

3.3.2. Fixace

Fixace je hlavním krokem při přípravě preparátů. Jedná se o proces, kterým se snažíme u biologických vzorků zabránit rozkladným procesům. Vysoce mobilní molekuly rozložené v cytoplazmě jsou znehybněny procesy precipitace, denaturace a tvorbou sítí

(Goldstein a kol., 1981), protože jakákoliv fixace vzorek ovlivňuje (Jurečka a Nebesářová, 2010), za nejlepší fixaci považujeme takovou, která uchovává preparát s minimem změn proti nativnímu stavu, brání autolytickým procesům a stabilizuje vzorek pro další postupy (Nebesářová, 2001). U skenovací elektronové mikroskopie se požaduje od fixace zpevnění struktur a povrchů, které chceme prohlížet.

Fixaci můžeme rozdělit podle několika parametrů. Základní dělení je na fixaci chemickou, která je nejpoužívanější a je založena na reakci chemických činitelů se složkami biologických objektů (Nebesářová, 2001), a na fyzikální, jenž zahrnuje metodu mrazovou neboli kryofixaci, využívající rychlé ochlazení vzorku pod rekrystalizační teplotu bez tvorby krystalů. Dále můžeme fixaci dělit podle způsobu provedení, a to na imerzní, kdy zkoumaný vzorek ponoříme do fixačního činidla (tento způsob je to nejčastěji užívaný a technicky nenáročný) a perfuzní, kdy při použití laboratorních zvířat v celkové anestézii vstříkneme fixační roztok přímo do krevního řečiště. Jiným způsobem je možnost předfixovat tkáň určenou k odebrání nebo obnažit hledaný orgán a nakapat fixační roztok přímo na něj a teprve poté odebrat vlastní vzorek (Nebesářová, 2001). Pro kvalitu vzorku je zásadní zda studovaný živočich umře pomalu ve stresu a křečích, což vede k jejich zkroucení a zdeformování nebo zda dojde k rychlému omámení a smrti. K omámení se používá řada různých látek a výběr té nejvhodnější záleží na studované skupině organismů. Éter nebo butylalkohol používá při přípravě preparátů hmyzu (Jurečka a Nebesářová, 2010). Sama fixace je do značné míry závislá na řadě podmínek jako výběr fixačního činidla, velikost vzorku, způsob fixace, koncentrace a rychlost penetrace fixačního činidla, teplota, osmolarita, pH fixačního roztoku, délka fixace, přídavky látek ovlivňující průběh fixace, apod. (Nebesářová, 2001).

Chemická fixace

Ačkoliv škála chemikálií pro fixaci biologických preparátů je široká, obecně se většina tkání fixuje pomocí dvoustupňové fixace organickými aldehydy s následnou postfixací oxidem osmičelým. Nejčastěji je užíváno aldehydů, a to zejména nižších. Jedná se o látky s aldehydickou skupinou $-CH=O$. Jsou známé štiplavým zápachem, dobrou rozpustností ve vodě, vysokou reaktivitou a redukčními vlastnostmi. K nežádoucím vlastnostem patří tendence polymerizovat ve vodných roztocích, což zapříčiňuje ztrátu reaktivity a snižuje koncentraci účinné monomerní složky (Nebesářová, 2001). Při fixaci aldehydy dochází k navázání zejména s aminoskupinou za vzniku Schiffových bází. Buňky si zachovávají zčásti enzymatickou a imunologickou aktivitu (Nebesářová, 2001). Jednou

z velkých nevýhod je toxicita aldehydů a podezření z karcinogeních účinků (Jurečka a Nebesářová, 2010).

Formaldehyd (FA)

Běžně užívaný je například formaldehyd byl objeven Butlerovem v roce 1859. Zprvu byl používán jako účinný, ale pomalý prostředek pro hubení bakterií (Blum, 1893). Již v posledním desetiletí 19. století se ukázal vhodnější pro fixaci tkání pro histologii než do té doby běžně používaný alkohol. Vykazoval pouze okrajové smrštění a deformace na rozdíl od alkoholu a dosahoval také lepších výsledků při barvení (Fox a kol., 1985). Formaldehyd je nejjednodušší aldehyd obsahující 1 funkční skupinu. Komerčně je prodáván ve vodném roztoku s koncentrací až 36–38% pod názvem formalin, ale tento roztok obsahuje degradační produkty a stabilizátory, které zhoršují fixaci. Častěji je užíván čerstvý 2–5% roztok připravený depolarizací paraformaldehydu (Jurečka a Nebesářová, 2010). Takto připravený roztok neporušuje konfiguraci proteinů a proto se využívá k imunolokalizaci a pro konfokální mikroskopii (Nebesářová, 2001). Formaldehyd reaguje s tkání několika způsoby, včetně zasíťování proteinů, glykoproteinů, nukleových kyselin a polysacharidů (Hopwood a kol., 1989). Zachovává sekundární strukturu proteinů a jeho síť je reverzibilní (Buesa, 2008).

Fixace formaldehydem je složitý proces. Jednou z anomálií, která je dobře popsána, je paradox mezi rychlostí penetrace a tvorbou vazeb. Vzhledem ke své malé molekule (30 g/mol) proniká do tkáně rychle. Medawar roku 1941 díky svému modelu koagulované kuřecí plazmy zjistil, že formaldehyd vykazuje relativně konstantní rychlost penetrace nezávisle na koncentraci, ale neurčil, zda je sraženina fixována. Výsledná penetrační rychlost 5,5 mm/h však bude ve skutečnosti menší, jelikož do plazmové sraženiny proniká lépe než do pevné tkáně (Medawar, 1941). Baker v roce 1958 změnil podmínky pokusu a napodobil tvrdou tkáň želatin/bílkovinným gelem. Zjistil, že se rychlost penetrace pohybuje okolo 3,6 mm/h. Avšak zdůraznil, že skutečná rychlost může být nižší kvůli odporu lipidů (Baker, 1958). V jiných zdrojích je uváděna rychlost penetrace 2 mm/h (Hopwood, 1967).

Intenzita a míra penetrace se zvyšuje s teplotou a také za zvýšeného tlaku (Chesnick a kol., 2010). Formaldehyd proniká do tkáně rychle, ale k jeho reakci s proteiny dochází pomalu. Počáteční navázání při pokojové teplotě je z velké části dokončeno do 24 hodin (Helander, 1994), ale vytvoření methylenových můstků je pomalejší (Kiernan, 2000). Při teplotě 37°C je rovnováha nastolena asi za 18 hodin (Fox a kol., 1985). Rychlost je vyšší při vyšší teplotě (Helander, 1994) a neutrálním pH (Chesnick a kol., 2010). Mikrovlnné záření

také urychluje a zlepšuje vazbu formaldehydu, ale dochází k tvorbě nebezpečných výparů a tepelné koagulace.

Formaldehyd je dostupný, levný a dobře fixující. Jednou z hlavních nevýhod je však toxicita, karcinogenita a pomalá fixační rychlost, která je problémem zejména v lékařské histologii (Buesa, 2008).

Glutaraldehyd (GA)

Byl představen jako fixační prostředek Sabatinem a kolektivem roku 1963 (Hopwood, 1967). Dodnes je obecně považován za nejlepší fixační činidlo pro účely elektronové mikroskopie (Mráz a Polónyi, 1988; Nebesářová, 2001; Jurečka a Nebesářová, 2010). Glutaraldehyd obsahuje dvě funkční skupiny, které mu umožňují vazbu na aminoskupiny aminokyselin proteinů. Komerčně je dodáván v roztoku o koncentraci 6–70%. Vzhledem k jeho nestálosti je vhodné pracovat s čerstvými roztoky o nižší koncentraci. K vlastní fixaci je většinou užíván v roztoku s fosfátovým nebo kakodylátovým pufrům o koncentraci 2–5% (Jurečka a Nebesářová, 2010). Již při krátkém skladování při pokojové teplotě dochází k tvorbě degradačních látek. Vznik těchto látek je rychlejší při vyšší teplotě a při nižším pH. Proto kontrolujeme kvalitu GA a následně jej upravujeme pročištěním (Mráz a Polónyi, 1988).

Při fixaci glutaraldehydem dochází k vazbě s peptidy a bílkovinami a následné komformační změny jsou malé. Nejrychleji reaguje s aminoskupinami lisynu. Nereaguje s lipidy, některými polysacharidy a proteoglykany (Nebesářová, 2001). Molekula GA je ve srovnání s formaldehydem velká (100 g/mol) a penetrační rychlost je poměrně malá, neboť se pohybuje okolo 0,22–0,34 mm/h. Zóna penetrace je stejná jako zóna fixace (Hopwood, 1967). Reakce bílkovin s glutaraldehydem vytváří gelovou vrstvu do 20–30 vteřin, ale dokončení fixace je pomalé a trvá až několik hodin (Mráz a Polónyi, 1988). V průběhu fixace se spotřebovává kyslík, jeho nedostatek vede ke zpomalení a zhoršení fixace vzorku. Kyslík můžeme do reakce dodávat několika způsoby. Například přidávkem peroxidu vodíku nebo provzdušňováním roztoku.

Glutaraldehyd je vynikající fixační prostředek zachovávající nejjemnější buněčné struktury, ale jeho účinek je pomalý a nereaguje s proteiny uniformně (Mráz a Polónyi, 1988). Má své uplatnění zejména v transmisní elektronové mikroskopii (Nebesářová, 2001).

Akrolein

Byl používán za 1. světové války jako chemická zbraň. Jedná se o nejjednodušší nenasycený aldehyd s jednou funkční skupinou. Při skladování za pokojové teploty, na světle a při kontaktu se vzduchem polymerizuje. Komerčně se pro větší stabilitu dodává s malým množstvím hydrochinonu. Ten zamezuje samovolné oxidaci a polymerizaci. Koncentrace pro fixaci nepřekračuje 5% (Goldstein a kol., 1981).

Pokusy potvrdily, že akrolein reaguje s polysacharidy, některými lipidy, které se stávají méně rozpustné a s buněčnými membránami, které jsou lépe fixované než pomocí glutaraldehydu. Ireverzibilně fixuje proteiny. Molekula akroleinu (56,06 g/mol) je přibližně o polovinu menší než u glutaraldehydu, z čehož vyplývá jeho rychlejší pronikání do tkání. Reakce akroleinu je velmi podobná reakcím glutaraldehydu, avšak dvakrát rychlejší a je také závislá na spotřebě kyslíku.

Kvalita fixace kolísá v závislosti na množství degradačních produktů. Výhodou fixace akroleinem je rychlá penetrace a dobrá fixace proteinů. Většímu rozšíření akroleinu jako fixačního činidla, brání jeho velká nestabilita společně s jeho toxicitou a problémy spojenými s jeho manipulací (Nebesářová, 2001).

Oxid osmičelý (OSM)

Druhou velkou skupinou fixačních činidel jsou oxidační činidla. Spolu s oxidem osmičelým tato skupina zahrnuje oxid ruteničitý a manganistan draselný, které se užívají převážně pro TEM. Oxid osmičelý se používá v elektronové mikroskopii od roku 1934. Před rokem 1962 byl považován za nejvhodnější fixační prostředek, chrání buněčné struktury tím, že se váže s lipidy zejména v membránách a tím imobilizuje některé bílkoviny (Kiernan, 2000). Jedná se o silné oxidační činidlo. Pro účely elektronové mikroskopie se užívá čirých, nažloutlých vodných roztoků, jejichž koncentrace se pohybuje mezi 0,5–4%. (Mráz a Polónyi, 1988). Oxid osmičelý reaguje s dvojnými vazbami olefinových uhlovodíků a mastných kyselin (Nebesářová, 2001). Jednu s nejrozsáhlejších studií uveřejnil v roce 1954 Bahr. Při svých pokusech sledoval reakci osmia za různých teplot s 290 látkami, které by mohly přijít do styku s osmiem během zpracování vzorku jako rozpouštědla nebo jako příměsi v roztocích. Zjistil, že tyto látky nereagují s oxidem osmičelým při 20°C ani po 48 hodinách (Mráz a Polónyi, 1988). Oxid osmičelý nereaguje s glycidy, nedenaturovanými DNA a jinými komponenty buněk. Molekula oxidu osmičelého je poměrně velká (254,23 g/mol), což má vliv na rychlost jejího průniku, která je pouze 0,2 mm/hod (Hopwood, 1967). S organickými látkami reaguje oxid osmičelý za vzniku tzv. osmiové černi. Průběh této

reakce je závislý na přítomnosti sloučenin a typu tlumivého roztoku. Kvalitu fixace ovlivňuje teplota (čím vyšší teplota, tím je reakce rychlejší), pH (nízké pH snižuje reaktivitu) a koncentraci (při 4–8 mmol/l je pomalejší než při 40 mmol/l) (Mráz a Polónyi, 1988). Oxid osmičelý se v TEM užívá jako kontrastní činidlo. Pro skenovací elektronovou mikroskopii je důležité, že zpevňuje povrchy, zvyšuje permeabilitu membrán a díky vysokému atomovému číslu snižuje riziko nabíjení (Jurečka a Nebesářová, 2010). Naopak mezi jeho nevýhody lze zařadit vysokou toxicitu, dráždivost par a jejich leptavý účinek na sliznice, velkou těkavost, která se však uplatňuje při fixaci velmi křehkých vzorků (Smith a Tiedl, 1991; Jurečka a Nebesářová, 2010). V skenovací elektronové mikroskopii se užívá zejména jako postfixace po předchozí aldehydové fixaci. Jedním z problémů jeho užití je tvorba densních precipitátů při reakci s etanolem, jenž se nejčastěji užívá pro následné odvodnění (Nebesářová, 2001). Proto je nutné zbavit se důkladně všech zbytků fixačního roztoku před dalším postupem.

Fyzikální fixace (Kryofixace)

Mezi fyzikální metody fixace je možné zařadit kryofixaci. V současné době je považována za nejlepší způsob, jak zachovat preparáty co nejbližší nativnímu stavu bez použití cizorodých látek (Jurečka a Nebesářová, 2010). Poprvé byla kryofixace pro SEM použita v roce 1960, ale rozšíření této metody nastalo až od 80. let, kdy došlo ke komerční výrobě dostupných systémů a ty se postupně staly běžnou součástí v mnoha laboratořích (JIC, 2011). Cílem kryofixace je co nejrychleji dosáhnout vitrifikovaného stavu, kdy je vzorek zchlazen pod rekrystalizační teplotu bez vzniku krystalů (Nebesářová, 2001). Z experimentů je známo, že v buňce obsahující cca 80% vody dochází k zamrazení při teplotě -40°C . Rekrystalizační teplo je -85°C , krátí se tak čas, při kterém se mohou tvořit krystaly (Nebesářová, 2001). V literatuře je uváděno, že pro kvalitní kryofixaci je nutná chladicí rychlost minimálně $10\,000^{\circ}\text{C/s}$ (Robards a Sleytr, 1985).

Pro zkrácení teplotního intervalu lze vzorek ošetřit kryoprotektanty. Tyto látky snižují množství volné vody ve vzorku, snižují teplotu nukleace (tvorby krystalických zárodků) a zvyšují rekrystalizační teplotu (Nebesářová, 2001). Kryoprotektanty dělíme na dvě skupiny. Penetrující, mezi které patří glycerol, dimetylsulphoxid nebo etylen glykol a nepenetrující, jako například polyvinylpyrolidon či sacharóza (Nebesářová, 2001). Kryoprotektanty prostupují vzorek a zabraňují tvorbě ledových krystalů.

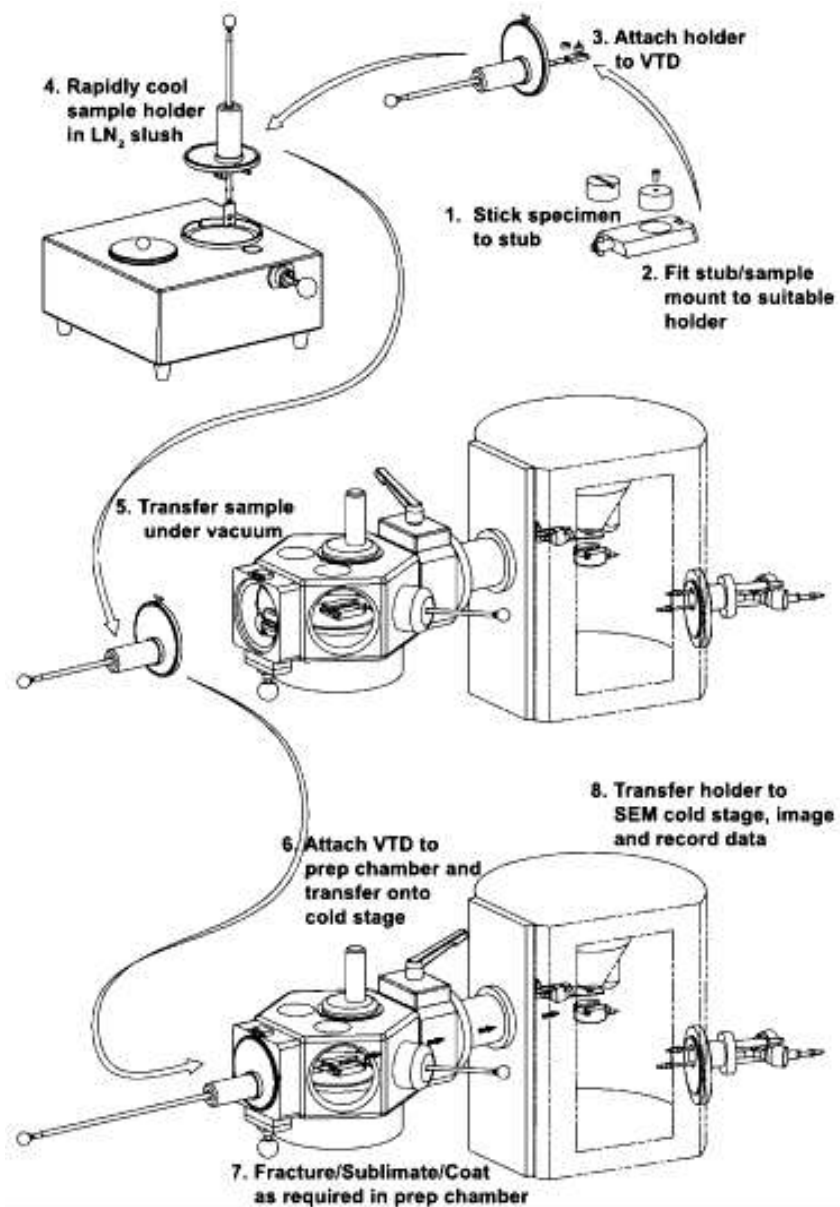
Existuje několik způsobů zmrazení. Výběr je závislý na několika podmínkách, jakými jsou jednoduchost, reprodukovatelnost, rychlost a finanční nenáročnost. Jednou z nejpoužívanějších metod je imerzní zmrazení, kdy je vzorek je na kovovém nosiči ponořen

do chladicího media. Toto medium musí splňovat řadu základních předpokladů, mezi které patří zejména dobrá tepelná vodivost, velká tepelná kapacita, vysoká tekutost při nízkých teplotách, vysoká hustota, bezpečné použití a nízká cena. Propan a etan splňují většinu předpokladů, ale jedná se o látky vysoce výbušné. Nejběžněji používaným chladivem je kapalný dusík. Jeho nevýhodou je blízký bod tání (-210°C) a bod varu (-196°C) (Nebesářová, 2001).

Druhou používanou metodou je vysokotlaké mražení (HPF), při kterém dochází ke zmrazení vzorku do hloubky 200 μm a šířky 2 mm (Schatten a Pawley, 2008). Jedná se o metodu rychlého zmrazení, která lze použít pro větší vzorky než 10 μm . Při této metodě dochází ke snížení bodu tání vody, a tím zmenšení intervalu růstu krystalů. Vzorek je vystaven tlaku 2100 atm, neboť v tomto stavu se ve vodě netvoří krystaly ledu do teploty -90°C . Při tlaku 2045 atm se sníží teplota tání z 0°C na -22°C a krystaly se netvoří až do -100°C (Müller a Moor, 1984; Hayat, 2000). Tato metoda vyžaduje speciální aparaturu, ale poskytuje velmi dobré výsledky (Nebesářová, 2001). V ideálním případě je mikroskop vybaven kryostolkem, který umožňuje prohlížet preparát přímo ve vakuu při teplotách okolo -130°C (Jurečka a Nebesářová, 2010) (Obr. 8).

Vzorek je po zmrazení v tekutém dusíku přenesen do předkomory, kde může být vysušen mrazovou sublimací, pokoven, nebo upraven jednotlivými metodami, které nám umožňují pohled na vnitřní struktury. Mrazové lámání odkrývá vnitřní povrchy cestou nejmenšího odporu, nejčastěji podél membrán. Jeho výhodou je, že nedochází k poškození odhalovaných povrchů tlakem žiletky. Mrazové leptání se provádí odkrojením zmrzlého preparátu a následná sublimace ledu z takto obnaženého povrchu za sníženého tlaku (Nebesářová, 2001).

Mezi hlavní výhody kryofixace patří rychlost. K fixaci dochází během několika milisekund, což je podstatně méně než při jakékoliv známé chemické fixaci. Zobrazuje detaily, které při chemické fixaci a zpracování nebývají zachovány (Kusamichi, 1990). Vysokotlaké mražení je nyní obecně uznáváno jako zlatý standard pro přípravu buněk a tkání pro elektronovou mikroskopii (Hohenberg a kol., 2003). Rychlé zmrazení nepochybně imobilizuje buněčné struktury a dynamické děje mnohem rychleji a spolehlivěji než klasické chemické fixace při pokojové teplotě (Müller a kol., 1980; Sitte a kol., 1987; Heuser, 1997; McIntosh, 2001). Jednou z hlavních nevýhod je náročnost na vybavení a skladování zmrazených preparátů (Nebesářová, 2001).



Obr. 8. Popis postupu přípravy vzorku do KRYO-SEM (převzato z Gatana, 2006)

3.3.3. Odvodnění

Preparáty, které prohlížíme ve vysokorozlišovacím SEM, nesmějí obsahovat vodu. Ta by se při vysokém vakuu explozivně uvolňovala. Proto se voda ve fixovaných vzorcích postupně nahrazuje za jiné médium, které je mísitelné s vodou. Vzorek je umisťován do roztoků s rostoucím podílem dehydratačního činidla. Koncentrace vzrůstá postupně, aby nedocházelo k poškození preparátu intenzivním pohybem vody. I přes to je dehydratace považována za jeden z nejčastějších zdrojů artefaktů (Goldstein a kol., 1981). Často dochází k tvarovým i objemovým změnám vzorků (Jurečka a Nebesářová, 2010). Preparát musí být

ponořeny do dostatečného množství dehydratačního činidla. Je několik způsobů, jak postupovat při odvodnění. Urychlením a zkvalitněním tohoto procesu můžeme dosáhnout ozáření v mikrovlné troubě v každém kroku (Nebesářová, 2001).

Nejčastěji se k odvodnění užívá etanol nebo aceton. Etanol je nejběžněji užívaným dehydratačním činidlem. Jedná se o druhý nejnižší alkohol, který je však řazen do hořlaviny 1. třídy. Dalším dehydratačním činidlem je aceton. Jeho užívání je složitější vzhledem k jeho dráždivosti, výbušnosti a hořlavosti. Způsobuje menší tvarové deformace než etanol a v případě sušení metodou kritického bodu je narozdíl od etanolu neomezeně mísitelný s kapalným oxidem uhličitým (Nebesářová, 2001).

Alternativou k těmto dvěma běžným způsobům je dehydratace pomocí 2,2-dimetoxypropanu (DMP). Vzorek je po fixaci a promytí přenesen do 100% 2,2-dimetoxypropanu a ten reaguje s vodou za vzniku metanolu a acetonu (Goldstein a kol., 1981; Nebesářová, 2001). Po 2 minutách se roztok vymění za čerstvý. Pokus provedený na průdušnici a předním úseku střeva laboratorní myši popisuje DMP jako vhodnou alternativu dehydratace. Vzorky s porovnáním k alkoholovým dehydratačním činidlům nevykazovaly žádný rozdíl (Kahn a kol., 1977; Maser a Trimble, 1977; Mráz a Polónyi, 1988). DMP je levnější a rychlejší metodou, jelikož odpadá fyzická výměna činidel (Kahn a kol., 1977; Maser a Trimble, 1977; Mráz a Polónyi, 1988). Reakce je však exotermická, což je jeden z důvodů proč výsledky nedosahují kvalit acetonového nebo etanolového odvodnění (Nebesářová, 2001). DMP je mísitelný s kapalným CO₂, čímž umožňuje sušení kritickým bodem (Maser a Trimble, 1977). Odvodnění se můžeme vyhnout při použití nízkovakuového nebo enviromentálního mikroskopu, v nichž se dají pozorovat vzorky s 70–90% vody.

3.3.4. Sušení

Je jedním z kritických bodů přípravy pro vysokovakuový a vysokorozlišující SEM. Vzorek po dehydrataci obsahuje dehydrateční činidlo, kterého se musíme zbavit. Vzhledem k existenci povrchového napětí kapalin je obyčejné sušení na vzduchu příčinou tvarových deformací či dokonce rozpadu vzorku. Je několik způsobů, jak můžeme vzorky vysušit bez velkého poškození. Mezi fyzikální metody patří metoda kritického bodu a mrazová sublimace. K chemickým metodám se používají látky s nízkým povrchovým napětím, jako je například hexamethyldisilazan (HMDS). Vzácnější alternativou těchto metod je komerčně prodáváná sloučenina Peldri II nebo mrazová sublimace t- butylalkoholu.

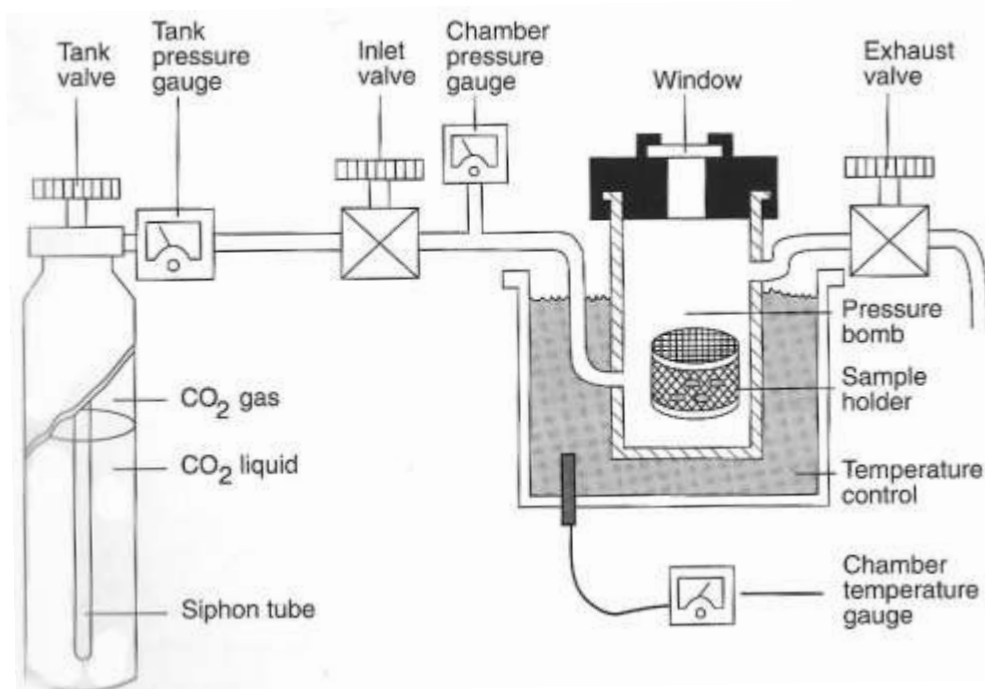
Sušení metodou kritického bodu

Metoda sušení kritickým bodem (CPD) byla objevena Andersonem roku 1951 při studiu bakteriálních bičíků (Goldstein a kol., 1981) a jedná se o nejběžnější metodu. Je založena na dosažení kritického bodu vhodné kapaliny. Při určitém tlaku a teplotě dochází k vymizení rozhraní mezi kapalnou a plynou fází. V tomto bodě je převedena veškerá kapalina do plynné fáze. Pokud dojde k vypuštění plynu, vzorek je vysušen, aniž by jím prošlo fázové rozhraní, které ho může poškodit díky povrchovému napětí kapaliny (Jurečka a Nebesářová, 2010).

Jako vhodné kapaliny se používá oxid uhličitý a dříve také freon. Oxid uhličitý má kritický bod při 30,85°C a 7,39 MPa, je levnější a snáze získatelný než freon (Goldstein a kol., 1981). Oxid uhličitý je mísitelný s amylacetátem a acetonem. Freon 13 má kritický bod při teplotě 37,85°C a tlaku 3,87 MPa a je mísitelný s acetonem. Dosahoval velmi dobrých výsledků, ale jeho užívání bylo omezeno zákonem. Voda má kritickou teplotu při 374,85°C, nelze používat protože by došlo k uvaření vzorku.

Pro využití metody sušení kritickým bodem je zapotřebí speciální aparatura (Obr. 9). Přístroj sestává z komůrky, která je vychlazena vodou nebo adiabatickou expanzí (Nebesářová, 2001). Do ní je vložen vzorek ve speciálním košíčku, který umožňuje prosycení požívanou kapalinou. Po uzavření komory je do ní pomalu, aby nevznikly turbulence, napuštěn kapalným oxidem uhličitým. Několikrát dojde k jeho výměně, aby došlo k nahrazení organického rozpouštědla. Komůrka je poté naplněna oxidem uhličitým do cca 1/3. Po dosažení kritického bodu je vzniklý plyn pomalu vypuštěn neboť rychlá dekomprese by mohla poškodit vzorek. Po dosažení atmosférického tlaku otevřeme komůrku a vyjmeme vysušený vzorek (Nebesářová, 2001).

Tato metoda dosahuje velmi dobrých výsledků, a její velkou výhodou je odstranění problému s povrchovým napětím (Smith a Finke, 1972). Její nevýhodou je však časová náročnost a nutnost převést vzorky do acetonu kvůli omezené mísitelnosti oxidu uhličitého s etanolem a s vodou. Tato metoda může být zdrojem některých artefaktů způsobených tlakem (Barré, 2001; Jurečka a Nebesářová, 2010). U větších vzorků (> 1mm) může dojít k otokům nebo popraskání povrchů, zatímco u drobných (pod 20 μm) vzorků ke ztrátě, nebo u jemných povrchových struktur může k jejich slepení (Hochberg a Litviatis, 2000).



Obr.9. Schéma aparatury na metodu sušení kritickým bodem (převzato z Bozzoly a Russella, 1999).

Mrazová sublimace

Je šetrnou metodou pro přípravu biologických vzorků. Podstatou metody je pomalá sublimace ledu z hluboce zmrazeného vzorku, ke které dochází ve vakuu při kontrolovaném vzestupu teploty. Nejčastěji používaným mrazícím médiem je stejně jako u kryofixace tekutý dusík. Biologické vzorky se liší tvarem, velikostí a strukturou, což neumožňuje stanovit jednotná pravidla pro jejich přípravu. Čas mrazové sublimace v optimálních vakuových podmínkách je závislý na teplotě preparátu, z čehož plyne, že nejkratšího času je dosahováno je-li vzorek držen právě pod rekrystalizační teplotou (Maroušek, 2007). Pro biologické vzorky není používána vyšší teplota než -80°C , neboť nedochází k degradaci vzorku a sublimace probíhá v přijatelném časovém horizontu (Maroušek, 2007). Mrazová sublimace se provádí ve speciálních aparaturách, jako například Kryoattachment ALTO 2500 nebo v lyofilizátoru, kde výsledky závisí na odolnosti preparátu a často bývají nereprodukovatelné. Tato metoda je účinnou možností sušení.

Hexamethyldisilazan

Nation (1983) popsal alternativní metodu sušení spočívající v sušení na vzduchu za pomoci hexamethyldisilazanu (HMDS). Tato metoda byla s úspěchem použita u bakterií (Araujo a kol., 2003), u kultivovaných jaterních endoteliálních buněk a cévních vzorků (Breat a kol., 1997; Slížová, 2003), u rostlin (Chissoe a kol., 1994), obrněnek (Botes a kol.,

2002), vodních bezobratlých, jako například vajíček korýšů, perlooček a břichobrvěk (Moraes a Bouzon, 1995; Hochberg a Litvaitis, 2000; Laforsh a Tollrian, 2000), škeblí (Schöne a Bentley, 2002; Barré a kol., 2006), a u hmyzu (Nation, 1983; Heraty a Hawsk, 1998). HMDS je chemikálie užívaná v plynné chromatografii, která má nižší povrchové napětí než voda a podle některých zdrojů poskytuje strukturální podporu vytvořením proteinových sítí (Nation, 1983; Breat a kol., 1997).

Jako sušící medium HMDS reaguje s vodou za vzniku hexamethyldisiloxanu a čpavku, který se po odpaření vzorek kompletně vysuší (Heraty a Hawsk 1998). Po dehydrataci 100% alkoholem převedeme vzorek do HMDS a necháme 10 minut prosytit. Poté odsajeme veškerou tekutinu a necháme vzorek na vzduchu vysušit cca 10 minut.

Tato metoda přináší řadu výhod. Především nevykazuje takové smrštění a poškození jako sušení na vzduchu ani tlakové deformace jako u CPD, také dobře zachovává jemné povrchové struktury (Hochberg a Litvaitis, 2000; Barré a kol., 2006). Jedná se o dobrou alternativu CPD, která je levná s výraznou časovou úsporou (Araujo a kol., 2003; Al-Salihi, 2004; Barré a kol., 2006; Al-Jashamy a Islam, 2007). HMDS je však toxický a s dráždivými účinky, a proto je nutné pracovat s ním v digestoři. Jedním z nepříznivých výsledků sušení HMDS je občasné srážení zlata v případě, že nedojde k úplnému odpaření roztoku před pokovením. Tomu lze zabránit prodloužením času odpaření (> 15min). Podobné artefakty nebyli u CPD pozorovány (Bray a kol., 1993; Hochberg a Litvaitis, 2000).

Peldri II

Byl komerčně dodávaný prostředek, který se užíval jako srovnatelná metoda k sušení kritickým bodem. Tato látka je za pokojové teploty tuhá a nad 25°C se stává tekutou. Postup užití je následující. Po odvodnění se vzorek prosytí roztokem Peldri II a na pět minut umístí do nižší teploty (4°C). Poté co sloučenina ztuhne bez tvorby krystalů přemístíme vzorek do vakua a dojde k sublimaci a vysušení vzorku (Zimmer, 1989; Dystka, 1993; Nebesářová, 2001). Čas sublimace je závislý na množství chemikálie, kvalitě vakua, velikosti vzorku a povrchu (Zimmer, 1989). Výsledky, kterých dosahuje Peldri II, jsou srovnatelné s CPD (Bray a kol., 1993).

Povrchová morfologie je zachována a strukturální znaky jsou dobře viditelné. Výhodou této metody oproti CPD je rychlost, časová úspora, možnost zpracovat větší množství vzorků a absence drahých aparatur. Velkou nevýhodou je v současné době její vysoká cena.

Vakuová sublimace t- butylalkohlem (TB)

Jedná se o další ze šetrnějších způsobů sušení vzorku (Inoué a Osatake, 1988). Principem této metody je prosycení odvodněných vzorků TB, který je při teplotě nad 25°C kapalný. Následně jsou vzorky zmrazeny a odsublímovány ve vakuu. Ve srovnání s CPD vykazuje tato metoda menší objemové změny (Pšenička a kol. 2010). Vzhledem k lepší dostupnosti se stává v některých laboratořích náhradou za Peldri II.

3.3.5. Lepení

Po vysušení je třeba vzorky uchytit na vhodný nosič, nejčastěji hliníkový terčík (Obr. 10). Vzorek můžeme na terčíky upevnit pomocí lepidla, které musí splňovat určité požadavky: nesmí obsahovat vodu a být vztlínavé, musí být vodivé, musí být stabilní ve vakuu a udržet vzorek i při náklonu (Nebesářová, 2001). Vhodná je například oboustranná lepicí páska nebo koloidní stříbro. Nastavení pozice vzorku je možné kontrolovat pod stereomikroskopem. Tato část přípravy vyžaduje přesnost a citlivost, protože může dojít k poškození nebo ztrátě vzorku.



Obr. 10. Vhodné nosiče pro uchycení biologických vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii (převzato z Bozzoly a Russella, 1999)

3.3.6. Pokovení

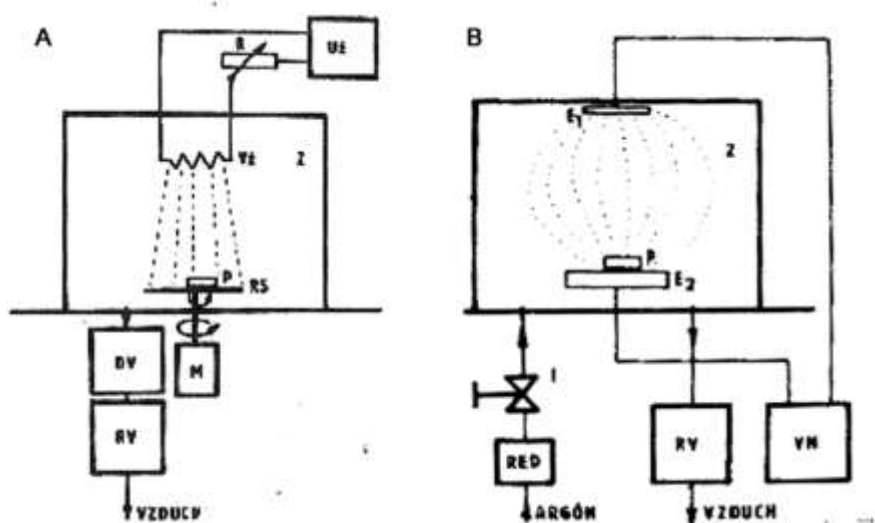
Biologické preparáty zbavené vody jsou elektricky a tepelně téměř nevodivé. Při nárazu primárních elektronů na povrch nepokoveného preparátu dojde k nabíjení projevující se deformacemi a ztrátou ostrosti obrazu. Pokovení spočívá v pokrytí preparátu tenkou vrstvou (10-20nm) kovu, nejčastěji zlata, platiny nebo slitiny palatiny a paladia. Tato vrstva má za úkol odvádět negativní náboj, zvýšit intenzitu signálu a minimalizovat poškození teplem. Pokovení se provádí různými způsoby. Výběr kovu se odvíjí od požadované

granulity vrstvy kovu (čím je menší tím je pokovení kvalitnější). Obecně platí, že čím větší je bod tání (Au 1063°C, Pt 1550°C) , tím menší je granulita (Au 5–7 nm, Pt 5 nm) (Nebesářová, 2001).

Princip vakuového napařování (Obr. 11) spočívá v zahřátí kovu ve vakuu na teplotu, při které dochází k odpařování molekul z jeho povrchu. Ty se šíří všemi směry a po dopadnutí na chladnější předměty kondenzují. Výhodou této metody je možnost pokovit i velké vzorky. Nevýhodou je možná tvorba stínů, jenž lze odstranit rotací stolku a opakovaným pokovením (Nebesářová, 2001).

Iontové napařování (Obr. 11) je založeno na vzniku usměrněného výboje v prostředí nízkotlaké argonové atmosféry účinkem elektrického napětí. Dochází k ionizaci plynu a ionty jsou přitahovány ke katodě, která obsahuje prstenec z napařovaného kovu. Ionty kovu narážejí do prstence a vyrážejí částičky kovu, které se rozptylují srážkami s dalšími molekulami a s ionty plynu vytvářejí prostorový mrak. Tento mrak obalí povrch preparátu tenkou vrstvičkou kovu (Nebesářová, 2001).

Vytvořit vrstvičku kovu na povrchu preparátu lze i chemickou cestou, a to impregnací. Tato metoda se užívá pokud není k dispozici vhodná aparatury nebo je vzorek částečně vodivý. Nejznámějšími metodami jsou TAO (Tannic Acid-Osmium), která je založena na reakci osmia a kyseliny tanové (Murakami, 1974) a OTO (Osmium-Thiocarbohydrazide-Osmium), založena na schopnosti thiokarbohydrazidu vázat osmium (Kelley a kol., 1973). Tyto a jiné techniky založené na chemické impregnaci kovem jsou shrnuty v pracích Mungera (1977) a Murpheye (1978, 1980) (Goldstein a kol., 1981).

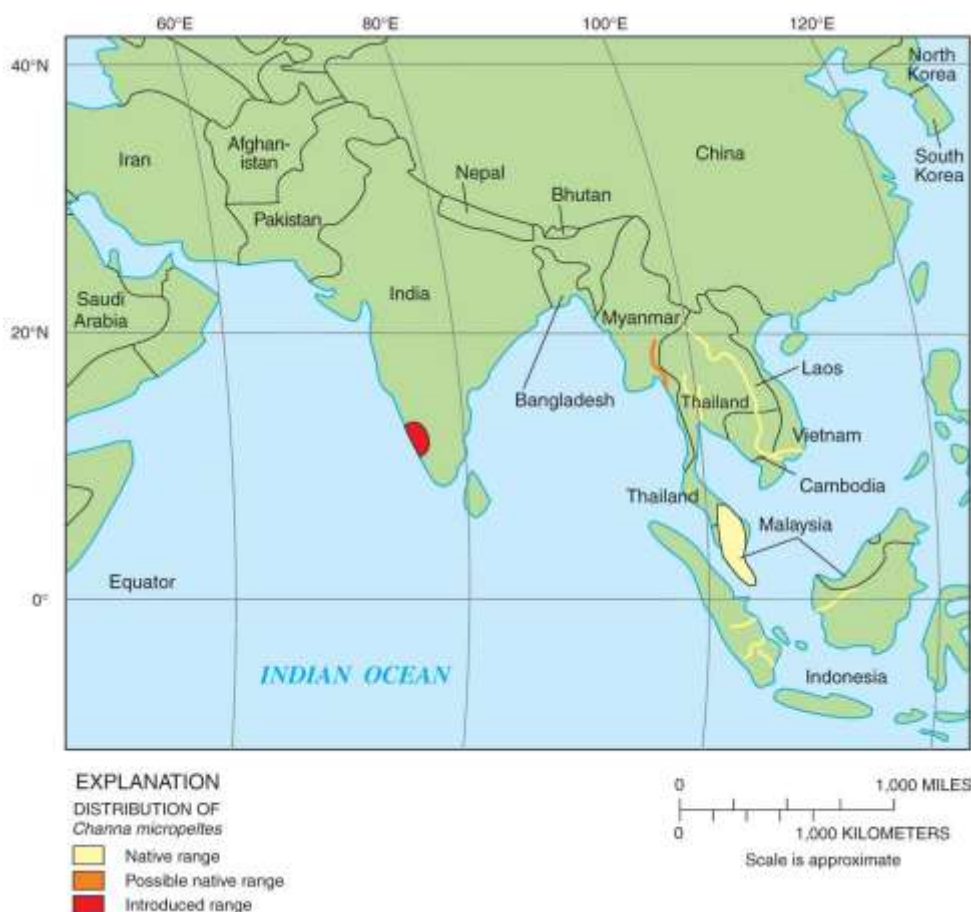


Obr. 11. Schéma pokovovací aparatury. **A.** Vysokovakuová, **B.** Iontová (převzato z Mráze a Polónyiho, 1988)

4. Metody a materiál

4.1. Modelový organismus

Jako modelový organismus pro testování vhodnosti jednotlivých metod fixace a přípravy vzorků na SEM jsme zvolili tasemnice rodu *Senga* Dollfus, 1934 (Cestoda: Bothriocephalidea) z ryby *Channa micropeltes* (Cuvier, 1831) (Perciformes: Channidae), které se hojně vyskytují ve sladkých vodách Asie (Kuchta a kol., 2008) (Obr. 12). Ryby čeledi Channidae (hadohlavci) jsou častými hostiteli tasemnic rodu *Senga* (Obr. 13). Dosud jich bylo popsáno kolem třiceti druhů z nichž 4 druhy jsou popsány z námi zvoleného hostitele *C. micropeltes*. Dospělé tasemnice se nacházely ve střevě, skolemem přichyceny ke sliznici pylorických přívěsků (Obr. 14A, B). Vzhledem k složité systematice rodu *Senga*, nejsme schopni tohoto zástupce identifikovat do druhu a uvádíme jej jako *Senga* sp. (Kuchta a Scholz, 2007).



Obr. 12. Rošíření hostitele *Channa micropeltes* (převzato z Courtenay a Williams, 2004)



Obr. 13. *Channa micropeltes* (Cuvier, 1831)



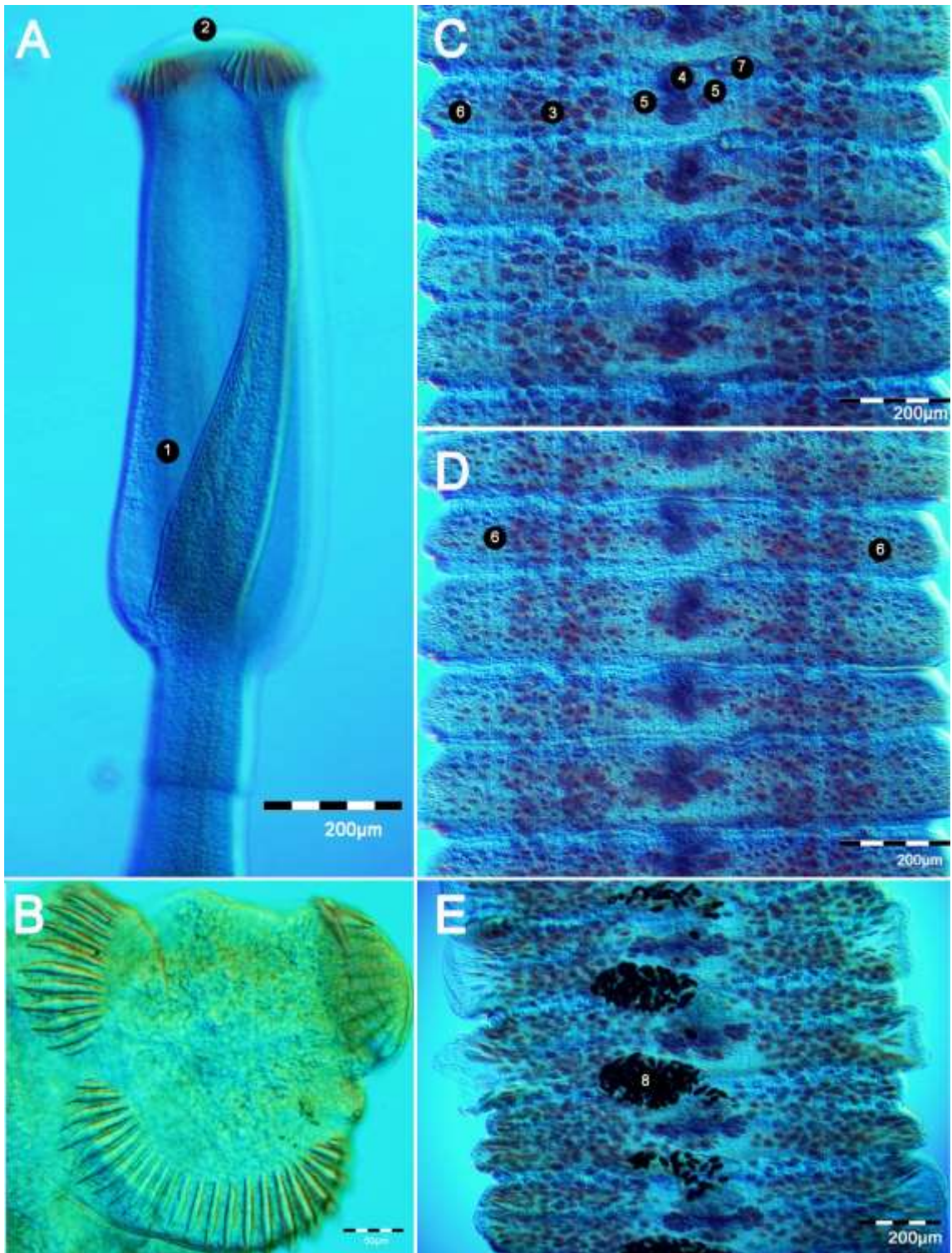
Obr. 14. Dospělé tasemnice *Senga* sp. ve střevě *Channa micropeltes* (pitva).

Materiál byl získán školitelem při studium parazitů ryb v Kambodži a Vietnamu. Tasemnice rodu *Senga* byly nalezeny v hojném počtu ve všech 5 vyšetřovaných hostitelích, kteří byli získáni na rybím trhu v Phompenhu (18. x. 2010) a pocházeli z chovu. Pro tuto práci byly zvoleny tasemnice ze tří hostitelů (hostitelská čísla VNT- 382, 384, 385).

Následující stručný popis je založen na materiálu fixovaného horkým formaldehydem. Dospělé tasemnice jsou středně velké (kolem 10 cm). Skolex je oválný se dvěma dorzoventrálními mělkými bothriemi (Obr. 15A). Velikost skolexu je $672-914 \times 255-301 \mu\text{m}$ ($n = 4$). Skolex má maximální šířku v zadní části ($255-301 \mu\text{m}$) ($n = 4$). Je opatřen apikálním diskem, který je ozbrojen jednou řadou háčků, které jsou uspořádány do kruhu, který může být přerušen dorzoventrálně nad bothriemi (Obr. 15A, B) Počet háčků kolísá mezi 49–54 ($n = 5$); háčky jsou 50–74 μm dlouhé a 6–10 μm široké ($n= 20$). Největší háčky se nacházejí na přechodu mezi dorzoventrální a laterální stranou, naopak nejmenší háčky jsou na dorzoventrálních stranách apikálního disku (Obr. 18 H). Krček chybí, první kraspedotní články se nacházejí hned za skolexem.

Povrch je pokryt kapiliformními filitrichy (viz. Chevy, 2009) (Obr. 19–21). Na scolexu se nacházejí také tumuly. Jedná se o vystouplé kulovité struktury o velikosti v průměru 1–2 μm (Obr. 19H). Jejich funkce je nejasná, zřejmě sensorická (Obr. 19–21).

Tvar prvních segmentů je víceméně čtvercový, gravidní segmenty jsou zpravidla širší než delší (899–1220 x 126–313 μm) (n=25). Podélná svalovina je dobře vyvinutá. Početná varlata mají kulovitý tvar a jsou uložena ve dvou laterálních polích (Obr. 15C) a přecházejí do dalších segmentů. Cirový vak je oválný, uložen mediálně ve střední části segmentu za děložním váčkem (Obr. 15C). Cirus je neozbrojený. Vaječník se nachází v zadní části segmentu a skládá se ze dvou symetrických laloků (Obr. 15C). Mnohočetné žlutkové folikuly jsou v kortikálním parenchymu ve dvou laterálních polích (Obr. 15D). Nepřerušeně přecházejí z jednoho segmentu do druhého. Vagina vyúsťuje za cirovým vakem. Děložní kanál je tvořen četnými kličkami. Terminální část dělohy se v gravidních segmentech rozšiřuje do oválného vaku, který vyplňuje velkou část segmentu (Obr. 15E). Děloha se otvírá děložním pórem, který je umístěna před středem článku. Vajíčka jsou oválná s pevným obalem, s víčkem (operculum) a nejsou embryonovaná (neobsahují zformovanou onkosféru s embryonálními háčky).



Obr. 15. Mikrofotografie tasemnice *Senga* sp. z *Channa micropeltes* fixované horkým formaldehydem (trvalé preparáty). **A.** Skolex, dorzoventrální pohled;; **B.** Skolex, apikální pohled (roztlak); **C.** Zralé segmenty, zaostřeno na orgány mediálním (dřeňovým) parenchymu; **D.** Zralé segmenty, zaostřeno na kortikální parenchym; **E.** Gravidní segmenty; **1.** Bothrie; **2.** Apikální disk s háčky **3.** Varlata, **4.** Cirrový vak, **5.** Vaječníky, **6.** Žloutkové žlázy, **7.** Děloha, **8.** Děloha plná vajíček v gravidním segmentu.

4.2. Fixace materiálu

Ryby byly ihned po zakoupení vypitvány podle standardních postupů (Ergens a Lom, 1970). Střevo bylo rozstříženo a jeho obsah prohlížen proti temnému pozadí. Jednotlivé živé tasemnice byly vyjmuty pomocí měkké entomologické pinzety a očištěny oplachováním ve fyziologickém roztoku. Následně byly živé tasemnice rozděleny do 7 skupin podle způsobu fixace zhruba po 5 jedincích (u některých jedinců byl odtržen skolex) (Obr. 16).

- A. Okamžitá fixace 4% horkým formaldehydem (HF) (Obr. 16A).
- B. Okamžitá fixace studeným 4% formaldehydem (CF) (Obr. 16B).
- C. Okamžitá fixace 1,5% glutaraldehyd a 1,5% formaldehyd (připravený z paraformaldehydu) v 0,1M HEPES pufru (pH 7,4) (GA) (Obr. 16C)
- D. Okamžitá fixace studeným 70% alkoholem (70%) (Obr. 16D).
- E. Relaxace ve fyziologickém roztoku po dobu 20 hodin (do jejich odumření) při pokojové teplotě (cca 28 °C) a poté fixace ve studeném 4% formalinu (F⊙) (Obr. 16E).
- F. Relaxace 5 hodin (do jejich odumření) v pokojové teplotě (cca 28°C) v čisté vodě a následná fixace studeným 4% formaldehydem (H₂O) (Obr. 16F).
- G. Fixace tlakem mezi dvěma skleněnými deskami 20 minut za současného přidání studeného 4% formaldehydu (ROZ) (Obr. 16G, H).

4.3. Roztlakové a trvalé preparáty

Počet a velikost háčků zjišťujeme na roztlakových preparátech (Kuchta a Caira, 2010). Vybrané skolexy byly převedeny do destilované vody na 10 min, poté do Berlandova roztoku (roztok 4%formaldehydu a kyseliny octové) na dalších 10 min. Nakonec byly vzorky přeneseny na podložní sklíčko, překryty krycím sklíčkem, roztláčeny a studovány pod mikroskopem (Olympus BX 51). Trvalé preparáty byly připraveny podle standardních postupů (Scholz a Hanzelová, 1998).



Obr. 16. Mikrofotografie tasemnic *Senga* sp. z *Channa micropeltes* fixovaných odlišným způsobem. **A.** Horký 4% formaldehyd; **B.** Studený 4% formaldehyd; **C.** Studený 1,5% glutaraldehyd a 1,5% formaldehyd; **D.** Studený 70% etanol; **E.** Studený 4% formaldehyd po relaxaci ve fyziologickém roztoku při pokojové teplotě; **F.** Studený 4% formaldehyd po relaxaci ve vodě při pokojové teplotě; **G,H.** Fixace tlakem a studeným 4% formaldehydem.

4.4. Příprava preparátu pro SEM

4.4.1. Sušení HMDS bez postfixace

Všechna fixační činidla byla po návratu do laboratoře nahrazena 70% alkoholem. Z každé skupiny bylo odebráno 2–8 skolexů a několik kousků strobily délky 1cm, které byly podrobeny přípravě na SEM podle metodiky Kuchty a Cairy (2010).

Po fixaci byly části strobil a skolexy odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 80%, 90%, 96% a 2× 100% etanol v intervalu 15 minut). Poté byly vzorky ponořeny

na 10 minut do hexametyldisilazanu (HMDS) a po odstranění média vysušeny v digestoři po dobu cca 10 minut. Vysušené vzorky byly umístěny pomocí oboustranné lepicí pásky na nosný hliníkový terčík a ve vakuu pokoveny vrstvičkou zlata metodou iontového naprašování (cca 10 nm). Výsledné mikrofotografie byly pořízeny za pomoci mikroskopu FESEM JSM 7401F při urychlovacím napětí 4 kV. Všechny mikrofotografie povrchu byly pořízeny při zvětšení 10.000x z dorzoventrální strany pod háčky (Obr. 19–21)

4.4.2. Postfixace oxidem osmičelým a sušení HMDS

Část vzorků fixovaných ve 4% horkém formaldehydu (HF) byla postfixována 2% roztokem oxidu osmičelého (OSM). Vzorky pro tento postup byly ze 70 % alkoholu převedeny sestupnou alkoholovou řadou do destilované vody. Ke vzorku byl přidán 2% oxid osmičelý a vzorek byl uložen ve tmě po dobu 20 hodin při 4°C. Dále byl vzorek zpracován standardním způsobem (Kuchta a Caira, 2010).

4.4.3. Sušení metodou kritického bodu

Pro porovnání jsme zvolili i několik metod sušení. Vedle standardního postupu za použití HMDS jsme část vzorků fixovaných ve 4% horkém formaldehydu zbavili dehydratačního činidla metodou kritického bodu (CPD). Jelikož není oxid uhličitý mísitelný s etanolem, byly vzorky převedeny vzestupnou řadou do acetonu (koncentrace 25%, 75% a 100%, vždy 15 minut). S použitím aparatury Pelco CPD II byly vzorky vysušeny v tlakové komoře pomocí kapalného oxidu uhličitého.

4.4.4. Mrazová sublimace

Na vysušení poslední skupiny jsme použili metodu mrazové sublimace (KRYO). Tasemnice byly uchyceny do speciálního nosiče lepidlem a zmrazeny v tekutém dusíku o teplotě -135°C. Pomocí aparatury byly vysušeny mrazovou sublimací při -95°C, vysoušení trvalo od 2 do 20 minut. Následně byly vzorky pokoveny slitinou platiny a paladia ve vrstvě tloušťky 10 nm a prohlíženy při teplotě -130°C v komoře mikroskopu.

4.5. Skenovací elektronový mikroskop FESEM JSM-7401 F

Na naše pozorování jsme použili skenovací mikroskop JSM-7401 F. Jedná se o nízkonapětový mikroskop japonské firmy JEOL s ultravysokým vakuem (10^{-9} Pa) a rozlišovací schopností 1 nm při 15 kV a 1,5 nm při 1 kV. Zdrojem elektronů je studená autoemisní tryska typu (field emission – FE). Velikost tohoto elektronového zdroje je od 5 do 10 nm a umožňuje vytvoření elektronového svazku v řádech nanometrů. Teoretické zvětšení je v rozsahu od 25 do 1.000.000×. Zvětšení udává poměr mezi velikostí obrazu na monitoru k velikosti snímané plochy na vzorku. Hodnota zvětšení se zvyšuje s tím, jak se zmenšuje velikost snímané plochy na preparátu.

V blízkosti preparátu jsou umístěny detektory signálu. Tento mikroskop je vybaven dvěma detektory sekundárních elektronů (SE) a jedním detektorem zpětně odražených elektronů (BSE). Na boční straně od preparátu je umístěn první detektor sekundárních elektronů LEI (Lower), zatímco druhý SEI (Semi-in-lens) se nachází uvnitř poslední objektivové elektromagnetické čočky. SEI detektor je vhodný pro kratší pracovní vzdálenost (6 mm a méně). Obraz je méně plastický, ale poskytuje více povrchových detailů. LEI detektor používáme pro delší pracovní vzdálenost. Detektor zpětně odražených elektronů Aurata-YAG se nasouvá mezi preparát a poslední elektromagnetickou čočku. Jedná se o monokrystalický scintilační detektor s citlivostí pro BSE s energií od 1,5 keV.

Při srážce primárního svazku s povrchem preparátu dochází k uvolnění elektronů s různou energetickou hladinou. Mikroskop je také vybaven r-filtrem, který zajišťuje selektivní detekci sekundárních nebo zpětně odražených elektronů o stejné energii, a tím může snížit nabíjecí efekt. Elektrony o nízké energii jsou zachyceny filtrem a detekovány jsou elektrony s vyšší energií. Tento mikroskop také umožňuje užití několika prohlížecích módů. Vedle standardního SEM módu (při vysokém rozlišení) můžeme použít LM mód pro zobrazování obrazu při malých zvětšeních a vyhledávání v širším zorném poli. Novou technologií tohoto mikroskopu je GB mód, který zachovává vysoké rozlišení při nízkém urychlovacím napětí (0,1–3 kV). Elektronový svazek je před dopadnutím na povrch preparátu zbrzděn. Výhodou je udržení úzkého elektronového svazku, a tím vysoké rozlišovací schopnosti, snížení okrajového a hranového jevu, zamezí nabíjení a poškození preparátu. Sb a Bs mód umožňují kombinovat materiálový (BSE) a topografický (SE) kontrast. Mikroskop JSM-7401F je vybaven kryokomorou ALTO 2500 firmy Gatan, umožňující prohlížení čerstvých vzorků a jejich další úpravu jako lámání, mrazovou sublimaci a následné pokovení (JEOL, 2005).

5. VÝSLEDKY

5.1. Vyhodnocení jednotlivých způsobů fixace

5.1.1. Fixace horkým 4% formaldehydem (HF)

Tato metoda se ukázala jako nejvhodnější, protože výsledky nejlépe odpovídaly nativnímu stavu. Vlivem vysoké teploty došlo k okamžitému usmrcení tasemnice bez výrazných morfologických změn. Tělo tasemnice se natáhlo a nedocházelo k jeho pokroucení (Obr. 16A). Tvar skolexu i segmentů byly dobře zachovány (Obr. 17A, 18A). Jednotlivé segmenty měly navzájem podobný tvar bez deformací. Při porovnání čtyř skolexů fixovaných horkým formaldehydem nevykazoval žádné výrazné svraštění a jejich povrch byl hladký bez rýh. Tvarové rozdíly byly nepochybně způsobeny vnitrodruhovou (individuální) variabilitou nikoliv způsobem přípravy (Obr. 18A, 20A–C). Povrch tasemnic nebyl porušen, jednotlivé mikrotrichy byly dobře odděleny (nebyly slepeny do svazků) a tumuly byly dobře viditelné (Obr. 19A, H, 20G).

5.1.2. Fixace studeným 4% formaldehydem (CF)

Vlivem nižší teploty docházelo k pomalému usmrcení tasemnice pouze pronikáním fixáže do jejich těla, což vedlo k tvarovým a velikostním deformacím (Obr. 16B). Těla tasemnic byla zkroucená. Tvar skolexu vykazoval mírné rozdíly mezi oběma vzorky a povrch (okraj) skolexu byl nerovný (nesymetrický) (Obr. 17B). Jednotlivé segmenty byly nepřirozeně smrštěné a zvrásněné (Obr. 18B). Povrch tasemnic nebyl poškozen, ale jednotlivé mikrotrichy byly slepeny a překrývaly tumuly, které nebyly viditelné (Obr. 19B).

5.1.3. Fixace studeným 1,5% glutaraldehydem a 1,5% formaldehydem (GA)

Tak jako u předchozí skupiny docházelo vlivem nižší teploty k pomalému usmrcení tasemnic pouze vlivem pronikání fixačního činidla. U této fixace došlo k mnohem většímu svraštění těla tasemnice, než u předchozí skupiny (Obr. 16C). Skolex byl také více tvarově pozměněn než při fixaci studeným formaldehydem a na jeho povrchu byly rýhy (Obr. 17C). Jednotlivé segmenty vykazovaly značné tvarové deformace vlivem smrštění (Obr. 18C).

Povrch nebyl poškozen, avšak jednotlivé mikrotrichy byly silně slepeny a tumuly nebyly dobře viditelné (Obr. 19C).

5.1.4. Fixace 70% etanolem (70%)

Opět se jednalo o metodu s využitím studeného fixačního činidla jako v předchozích dvou skupinách. Také zde docházelo k tvarovým a velikostním změnám (Obr. 16D). Skolexy u této skupiny vykazovaly nestandardní tvarové rozdíly a tvar a povrch byly pokryty vráskami (n = 3) (Obr. 17D). Segmenty byly zvrásněné, avšak ne tolik svraštělé jako u předchozích dvou skupin (5.1.2., 5.1.3.) (Obr. 18D). Povrch nebyl poškozen, ale mikrotrichy byly značně slepeny ve shlucích a překrývaly tumuly, které nebyly viditelné (Obr. 19D).

5.1.5. Relaxace ve fyziologickém roztoku před fixací studeným 4% formaldehydem (F☉)

Na rozdíl od předchozích metod zde nedocházelo k fixaci tasemnic okamžitě, což zvyšovalo možnost artefaktů a posmrtných změn. U této skupiny nastalo nepřírozené zkroucení těla tasemnic (Obr. 16E). Skolexy byly výrazně deformované a tvarově se mezi sebou lišily. Tvar byl asymetrický a povrch pokryt rýhami (n = 3) (Obr. 17E). Segmenty byly značně deformované a nebylo možné je mezi sebou rozlišit, neboť jejich tvar byl výrazně pozměněn (Obr. 18E). Povrch byl nepochybně poškozen posmrtnými změnami. Mikrotrichy byly částečně slepeny a na některých místech vypadané, tumuly byly dobře viditelné (Obr. 19E).

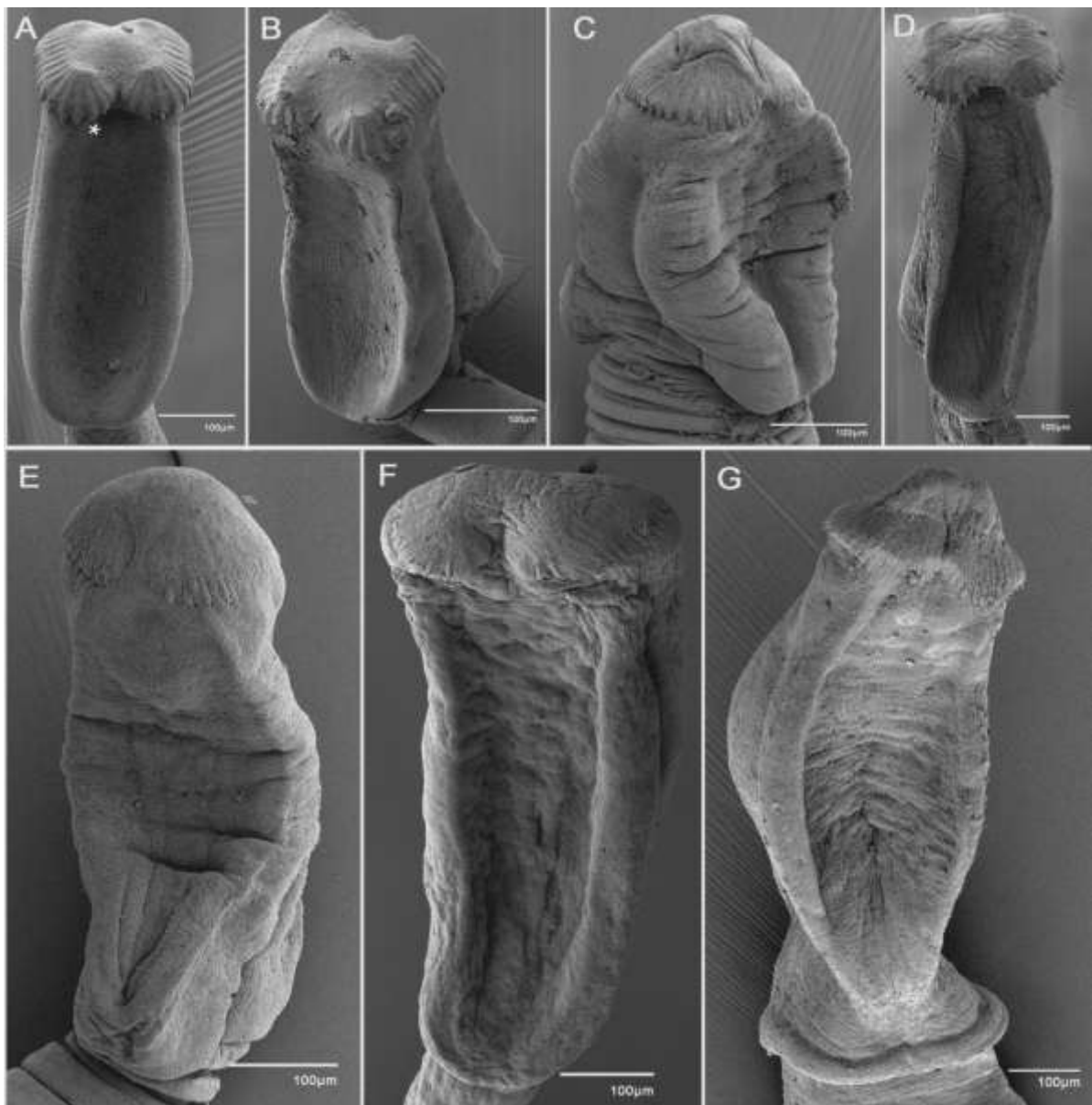
5.1.6. Relaxace ve vodě před fixací studeným 4% formaldehydem (H₂O)

Stejně jako předchozí skupina nedocházelo k fixaci ihned což způsobilo posmrtné změny. K usmrcení tasemnic došlo mnohem dříve než u předešlé skupiny (v průměru 5 hod proti 20 hod), přesto byly námi pozorované změny výraznější. Tasemnice byly nepřírozeně zkroucené (Obr. 16F). Skolexy v této skupině také vykazovaly rozdíly ve velikosti i tvaru. Povrch skolexu byl asymetrický a zvrásněn (Obr. 17F). Segmenty byly nepřírozeného tvaru a deformované, někdy výrazně protáhlejší než při použití ostatních metod (Obr. 18F). Povrch i

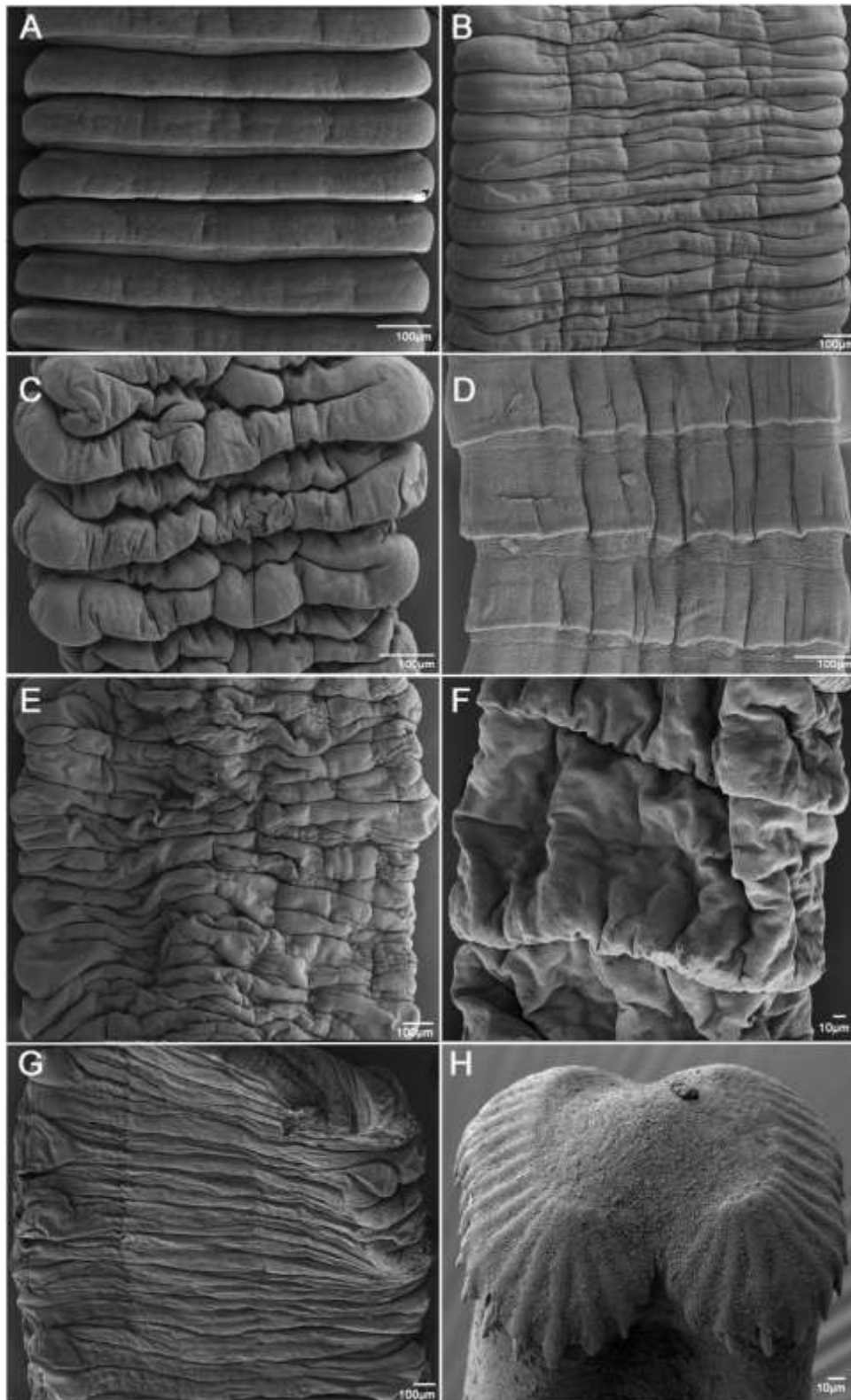
při menších zvětšeních byl viditelně poškozen. Mikrotrichy byly z velké části vypadané a tumuly nebyly pozorovány (Obr. 19F).

5.1.7. Fixace tlakem s přidáním studeného 4% formaldehydu (ROZ)

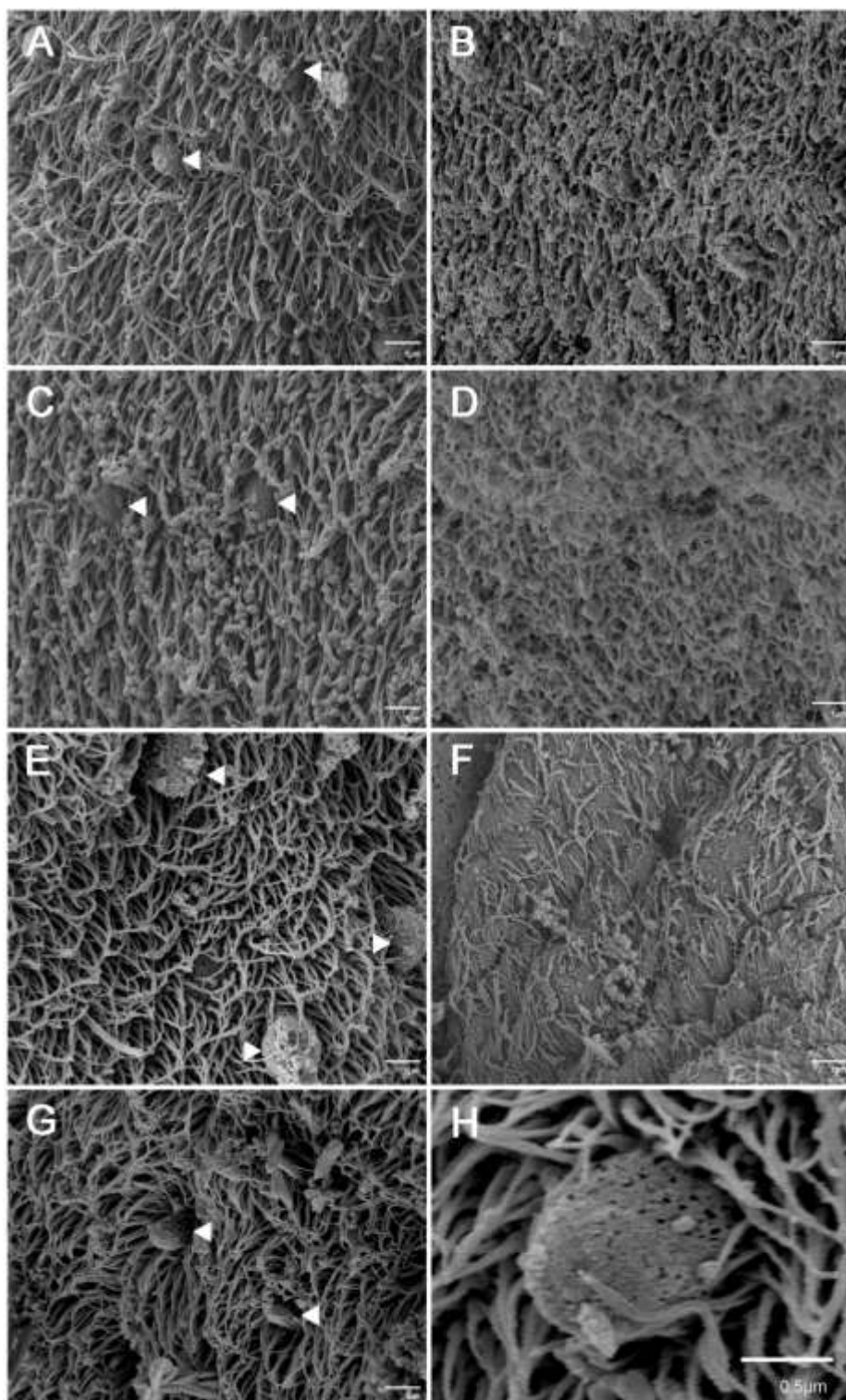
U této metody docházelo k částečnému roztlačení tasemnic a okamžitému přidání fixačního činidla (Obr. 16G, H). Působením tlaku nastaly značně nepřirozené morfologické změny ve tvaru a velikosti strobily (Obr. 16G). Tudiž skolexy ($n = 2$) i segmenty byly značně deformované a lišily se mezi sebou tvarově (Obr. 17G; 18G). Tvar skolexu byl asymetrický a vnitřní část botrií byla pokryta rýhami. Povrch byl poměrně dobře zachovalý. Jednotlivé mikrotrichy byly částečně slepeny a tumuly byly částečně viditelné jako u fixace studeným 4% formaldehydem (CF) (Obr. 19G).



Obr. 17. Mikrofotografie skolexů *Senga* sp. z *Channa micropeltes* po různých fixacích. **A.** Horký 4% formaldehyd. **B.** Studený 4% formaldehyd. **C.** Studený 1,5 %glutaraldehyd a 1,5% formaldehyd. **D.** Studený 70% etanol. **E.** Relaxace ve fyziologickém roztoku při pokojové teplotě a následná fixace studeným 4% formaldehydem. **F.** Relaxace ve vodě při pokojové teplotě a následná fixace studeným 4% formaldehydem. **G.** Fixace tlakem a studeným 4% formaldehydem. Hvězdička (*) označuje místo mikrofotografii povrchu (viz.Obr. 19)



Obr. 18. Mikrofotografie segmentů tasemnice *Senga* sp. z *Channa micropeltes* po různých fixacích. **A.** Horký 4% formaldehyd. **B.** Studený 4% formaldehyd. **C.** Studený 1,5% glutaraldehyd a 1,5% formaldehyd. **D.** Studený 70% etanol. **E.** Relaxace ve fyziologickém roztoku při pokojové teplotě a následná fixace studeným 4% formaldehydem. **F.** Relaxace ve vodě při pokojové teplotě a následná fixace studeným 4% formaldehydem. **G.** Fixace tlakem a studeným 4% formaldehydem. **H.** Mikrofotografie apikálního disku.



Obr. 19. Mikrofotografie povrchu tasemnic *Senga* sp. z *Channa micropeltes* po různých fixacích z dorzoventrální strany v oblasti pod háčky při zvětšení 10 000× (viz Obr. 15A). Šipky označují tumuly. **A.** Horký 4% formaldehyd. **B.** Studený 4% formaldehyd. **C.** Studený 1,5% glutaraldehyd a 1,5% formaldehyd. **D.** Studený 70% etanol. **E.** Relaxace ve fyziologickém roztoku při pokojové teplotě a následná fixace studeným 4% formaldehydem. **F.** Relaxace ve vodě při pokojové teplotě a následná fixace studeným 4% formaldehydem. **G.** Fixace tlakem a studeným 4% formaldehydem. **H.** Detail tumulu při fixaci horkým 4% formaldehydem.

5.2. Vyhodnocení různých způsobů přípravy pro SEM

5.2.1. Postfixace oxidem osmičelým (OSM)

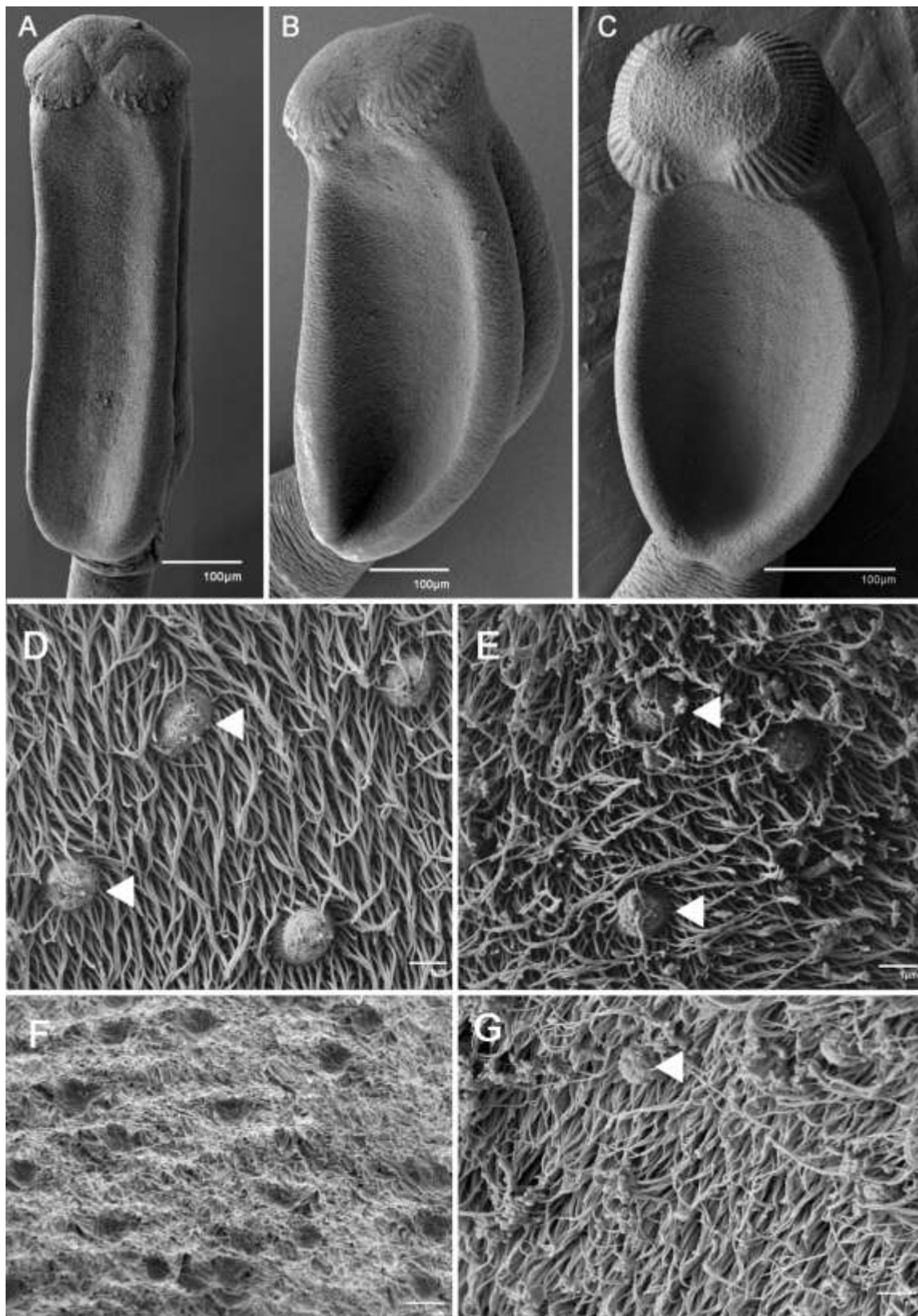
Při menších zvětšeních nebyly patrné rozdíly se vzorky bez postfixace (Obr. 20A). Pouze při větších zvětšeních při pohlížení docházelo méně často k nabíjení povrchu vzorku. Ani povrch tasemnic nevykazoval žádné změny oproti vzorkům bez postfixace (Obr. 20D).

5.2.2. Sušení metodou kritického bodu (CPD)

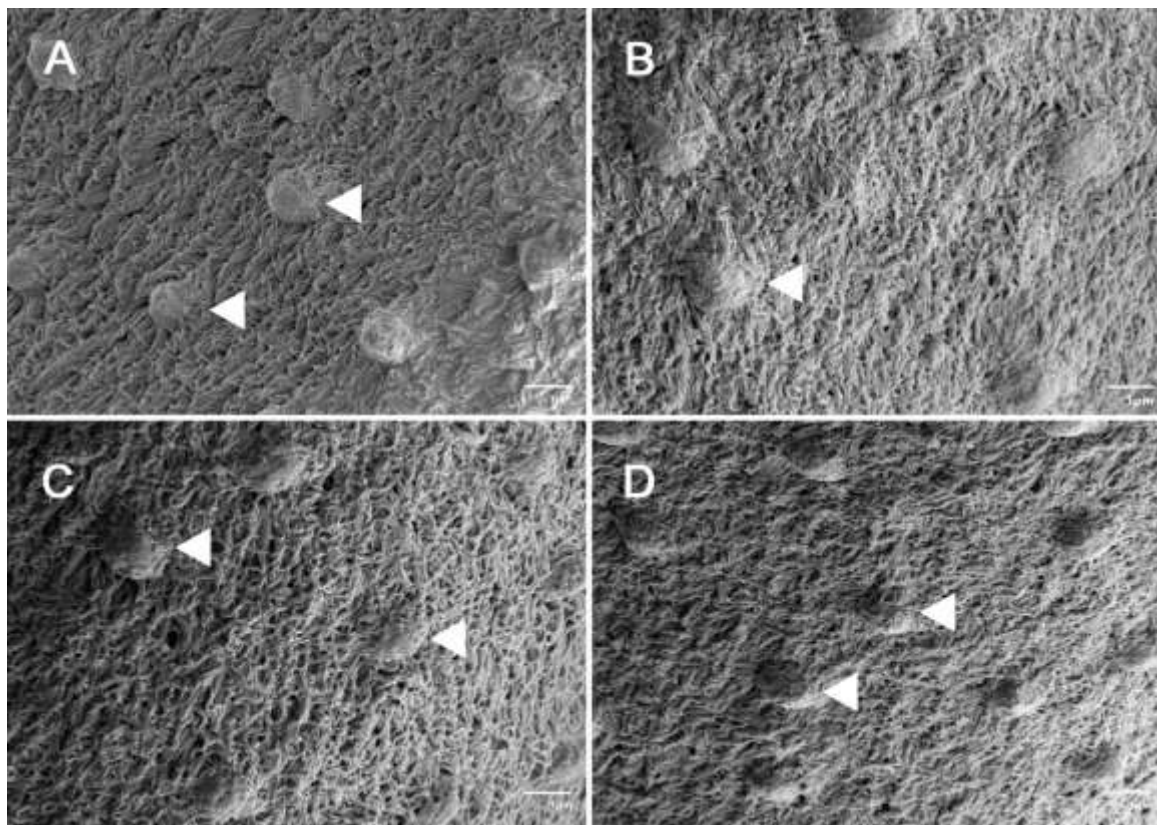
Tato metoda sušení byla použita pro srovnání s chemickou metodou sušení pomocí HMDS, která byla použita u všech předchozích skupin. U našich vzorků jsme nenašli rozdíly mezi těmito dvěma metodami ani při větších zvětšeních (Obr. 20B, E).

5.2.3. Sušení mrazovou sublimací (KRYO)

Touto metodou jsme se chtěli vyhnout dehydrataci vzorků. Vyzkoušeli jsme několik časových intervalů od 2 do 20 minut (Obr. 21). Tvar skolexů i segmentů je dobře zachován (Obr. 20C). Výrazné změny byly pozorovány při větším zvětšení. Povrch vzorků byl jednolité, jednotlivé mikrotrichy byly navzájem slepeny a tvořily povlak překrývající tumuly (Obr. 20F). I při prodlužování doby sublimace se tento problém nevyřešil.



Obr. 20. Mikrofotografie skolexů tasemnice *Senga* sp. z *Channa micropeltes* připravených různými metodami. **A.** Postfixace oxidem osmičelým. **B.** Sušení metodou kritického bodu. **C.** Mrazová sublimace, 2 min při -95°C . **D–G.** Mikrofotografie povrchu z dorzoventrální strany v oblasti pod háčky při zvětšení $10\,000\times$ (viz Obr. 17A). Šipky označují tumuly. **D.** Postfixace oxidem osmičelým. **E.** Sušení metodou kritického bodu. **F.** Mrazová sublimace, 2 min. -95°C . **G.** Sušení pomocí HMDS.



Obr. 21. Mikrofotografie povrchu z dorzoventrální strany v oblasti pod háčky při zvětšení 10 000× (viz Obr. 17A) tasemnice *Senga* sp. z *Channa micropeltes* sušené mrazovou sublimací při -95°C a různou dobu. Šípky označují tumuly. **A.** 5 minut; **B.** 10 minut; **C.** 15 minut; **D.** 20 minut.

6. DISKUZE

6.1. Problematika taxonomie rodu *Senga* Dollfus, 1934

Systematika rodu *Senga* je velmi složitá. V nejnovější revizi řádu Bothriocephalidea byli všichni zástupci ze sladkovodních ryb Asie s háčky na apikálním disku zahrnuti do rodu *Senga* (viz.Kuchta a kol., 2008). Zástupci tohoto rodu byli popsáni ze sladkovodních ryb pěti čeledí Bagridae Bleeker, 1858; Channidae Scopoli, 1777; Cyprinidae Bleeker, 1858; Mastacembelidae Scopoli, 1777 a Osphronemidae Bleeker, 1858. Zástupci rodu *Senga* a *Polyonchobothrium* popsání z Afriky (zejména ze sumců čeledi Claridae) byli zařazeni do jiných rodů (Kuchta a kol., 2008). Vzhledem k hostitelské specifitě jiných zástupců řádu Bothriocephalidea je pravděpodobné, že v jednom druhu (nebo dokonce rodu) hostitele se bude vyskytovat pouze jeden druh rodu *Senga*, jak předpokládali Kuchta a Scholz (2007). Situace v Asii je komplikovaná především kvůli velkému počtemu nedostatečných popisů nových druhů, které často dokonce odporují pravidlům zoologické nomenklatury. V současné době je z Asie popsáno cca 50 druhů. K důkladné revizi je nezbytné získat čerstvých materiál z typových hostitelů a lokalit. Jednotlivé druhy jsou odlišovány na základě velikosti a počtu háčků či varlat, rozměrů a tvaru skolexů a segmentů. Tyto znaky jsou však velmi variabilní i v rámci jednoho druhu (jedné populace), jak naznačuje studie Kuchty a kol. (2012) i tato studie. Proto v této práci není studovaný zástupce rodu *Senga* identifikován do druhu.

6.2. Příprava preparátů

6.2.1. Fixace

Mikrofotografie studovaného materiálu ukazují rozdíly mezi jednotlivými metodami. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití horkého formaldehydu jako fixačního činidla. Tato metoda je jednoduchá a rychlá. Vyžaduje jen rychlé zahřátí činidla (uvedení do varu) a ke smrti tasemnic dochází téměř okamžitě. Tato metoda ve studiích tasemnic řádů Caryophyllidea, Bothriocephalidea, Spathebothriidea, Proteocephalidea vykazuje nejlepších výsledků (de Chambrier a kol., 2008, 2009; Kuchta a kol., 2009a; Oros a kol., 2010; Ash a kol., 2011; Scholz a kol., 2011). Vzorky tasemnic po fixaci horkým formaldehydem mají

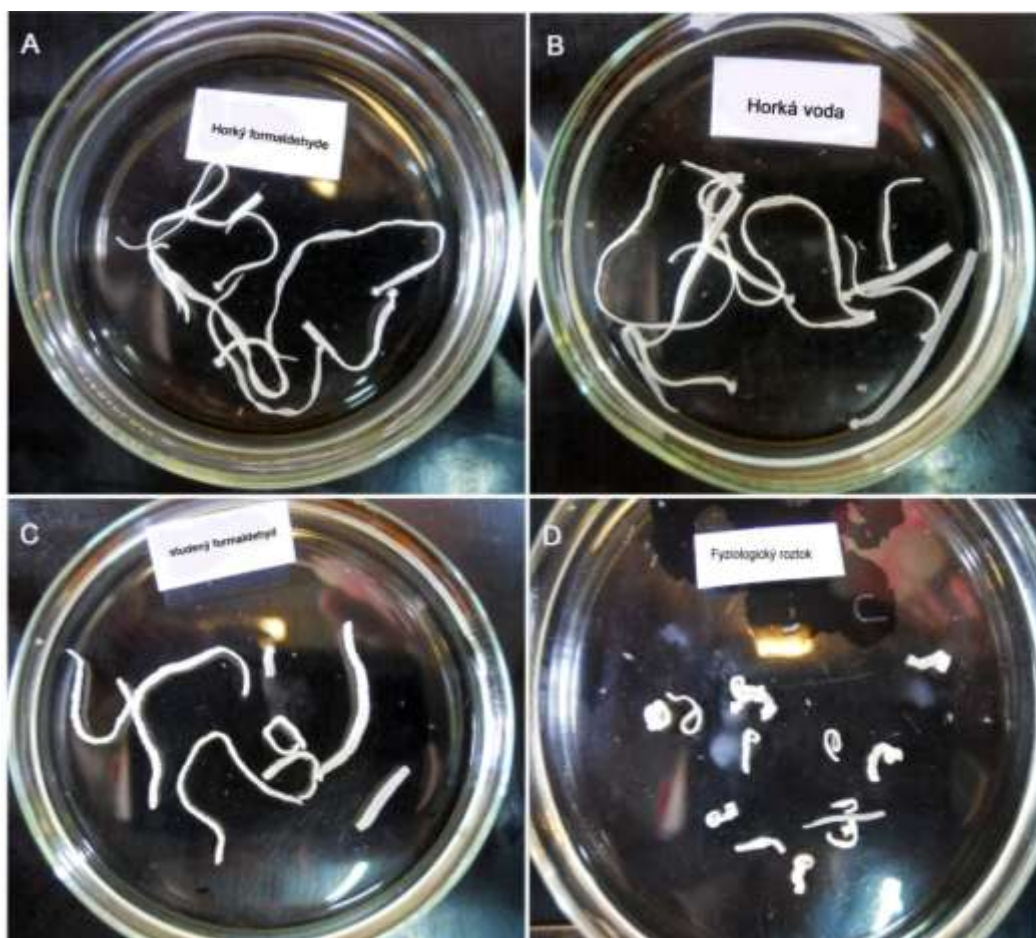
poměrně jednotný tvar bez ohledu na velikost nebo zralost tasemnic (Oros a kol., 2010). V případě tasemnic řádu Bothriocephalidea není povrch porušený a mikrotrichy nejsou slepeny a nepřekrývají tumuly. To umožňuje zjistit srovnatelné výsledky u vzorků tasemnic získaných různými osobami, z různých hostitelů a oblastí. Vhodnost této metody byla již ověřena řadou taxonomických i morfologických studií (Trematoda, Monogenea, Cestoda, Nematoda) a to nejen pro SEM, ale i pro světelnou mikroskopii a histologii (např. de Chambrier a Vaucher, 1997, 1999; Scholz a Hanzelová, 1998, de Chambrier a kol., 2007, 2008, 2009; de Chambrier a Scholz, 2008; Foitová a kol., 2008; Hodová a kol., 2008; Kuchta 2008, 2009 a,b; Scholz a kol. 2009, Hodová a kol., 2010, Mašová a kol. 2011). Horký formaldehyd, který je toxický a nepříjemně zapáchá, může být nahrazen horkou (vroucí) vodou a poté již mrtvé tasemnice můžeme fixovat studeným 4% formaldehydem. Vlivem teploty jsou tasemnice rychle usmrceny. Tato metoda, která je nejvíce používaná u motolic (např. Cribb a Bray, 2010) byla úspěšně použita u proteocephalidních tasemnic *Monticellia amazonica* de Chambrie a Vaucher, 1997 z *Calophysus macropterus* (Lichtenstein, 1819) (Kuchta a de Chambrie, nepublikované údaje). Ve srovnání s horkým 4% formaldehydem nevykazovaly výrazné rozdíly, naopak v porovnání s relaxací ve fyziologickém roztoku byl výsledek výrazně lepší (Obr. 22). Stejná metoda byla použita u severoamerických vzorků tasemnic *Essexiella fimbriatum* Essex, 1928 z *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818) (Scholz a kol., 2011).

Studený 4% formaldehyd proniká do tkáně poměrně rychle (2 mm/h), což však nestačí k rychlému usmrcení tasemnice, a to vede k deformacím a smrštění. Penetrace glutaraldehydu je ještě pomalejší (0,22–0,34 mm/h), což je kompenzováno přidáním 1,5% formaldehydu. S využitím pufru HEPES je tato metoda úspěšně užívaná jak v SEM tak v TEM (Fyler, 2007; Levron, nepublikované výsledky). V našem případě však tato fixace nevykazovala dobré výsledky. 70% etanol se běžně pro přípravu vzorků nepoužívá, ale jako fixační činidlo pro přípravu trvalých preparátů býval běžný. V porovnání s horkým formaldehydem došlo u těchto studených fixází k výrazným tvarovým změnám, zejména ke smrštění (Obr. 17B–D; 18B–D). Mikrotrichy na povrchu byly často velmi slepené (Obr. 19B–D). Studené fixace se nám jeví jako nevhodný pro srovnávací morfologii tasemnic.

Mnoho autorů provádí relaxaci tasemnic před jejich fixací (Al-Bassel, 2003; Eissa a kol., 2011). Tito autoři nechávají tasemnice přirozeně zemřít ve vodě nebo ve fyziologickém roztoku při laboratorní nebo snížené teplotě. Tato metoda je v porovnání s horkými i studenými fixážemi naprosto nevhodná, protože dochází k nepřirozeným změnám tvaru těla tasemnic a také k výraznému poškození povrchu vlivem posmrtných změn (Obr. 17E, F,

18E, F, 19E, F). I jiné studie uvádějí, že tasemnice jsou po relaxaci poškozené, vnitřní tkáň se rozpadají, pohlavní orgány se rozvolňují a varlata a vaječné folikuly nejsou jasně vymezeny (Oros a kol., 2010). Již Kennedy (1965) podotkl, že u vzorků relaxovaných ve vodě se mění tvar skolexu a bothrie se stávají méně zřetelné.

Dalším způsobem používaným různými autory je fixace roztlakem mezi skly (Faisal a kol., 1989; Scholz, 1989; Eissa a kol., 2011). Tato metoda poskytuje také ve srovnání s horkým formaldehydem špatné výsledky a pro morfologické studie se nehodí (Obr. 17G, 18G, 19G).



Obr. 22. Mikrofotografie tasemnic *Monticellia amazonica* z *Calophysus macropterus* fixovaných odlišným způsobem. **A.** Horký 4% formaldehyd, **B.** Usmrcení v horké vodě (po dobu 1 min.) a následná fixace studeným 4% formaldehydem, **C.** Studený 4% formaldehyd, **D.** Relaxace ve fyziologickém roztoku při pokojové teplotě (po dobu 5 hodin) a následná fixace studeným 4% formaldehydem.

6.2.2. Způsob přípravy vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii

Postfixace oxidem osmičelým je metoda, která poskytuje shodné výsledky se vzorky fixovanými jen horkým 4% formaldehydem. Délka přípravy preparátů se prodloužila o 24 hodin, avšak jediným efektem bylo nižší nabíjení. To je v našem případě možné řešit volbou nižšího urychlovacího napětí pro prohlížení nebo režimem fotografování pomocí integrací, kdy je výsledný snímek složen z více snímků vytvořených rychlým přeběhem paprsku.

Sušení metodou kritického bodu i pomocí hexametyldisilazanu dává srovnatelné výsledky. Bez výrazných tvarových deformací a poškození povrchů. HMDS však má řadu výhod popsaných již v rešeršní části, jako například snadnější manipulaci bez nutnosti speciálních aparatur a časovou úsporu.

Poslední metodou, kterou jsme vyzkoušeli, je sušení mrazovou sublimací. Je to možnost prohlížet vzorky bez předchozích úprav v téměř nativním stavu. V našem případě odpadlo odvodnění, které je zdrojem mnoha artefaktů. S využitím kryokomory a kryorežimu se dosahuje vynikajících výsledků se značnou časovou úsporou. Avšak pro zobrazování detailů povrchu je tato metoda nevhodná. I při prodloužení času sublimace na 20 minut jsme nedosáhli uspokojivých výsledků (Obr. 21). Možné zlepšení by mohlo nastat při výměně sublimovaného media za těkavější. Další nevýhodou je skladování vzorků, které je náročné a proto většina vzorků je po prohlédnutí zničena.

7. ZÁVĚR

Provedla jsem literární rešerši, ve které jsem shrnula některé základní způsoby přípravy biologických preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii. Rešerše poukázala na výhody a nevýhody jednotlivých metodických postupů.

Přesto, že jsem použila pouze omezené množství jedinců jediného druhu tasemnice, na základě mých výsledků doporučuji používat horké fixáže a pouze čerstvého (živého) materiálu. Tato metoda je vhodná nejen pro skenovací elektronovou mikroskopii, ale také pro přípravu trvalých preparátů či histologických řezů. Užití studených fixáží stejně jako relaxace nebo fixace tlakem se mi jeví jako nevhodné metody. Při fixaci 1,5% glutaraldehydem a 1,5% formaldehydem v 0,1M HEPES jsem dosáhla špatných výsledků, což odporuje literárním údajům (viz. kapitola 6.2.1.). Ráda bych fixaci s glutaraldehydem zopakovala.

Postfixace oxidem osmičelým nepřinesla výrazně lepší výsledky než fixace pouze horkým formaldehydem. Při větších zvětšení zamezovala nabíjení preparátu, což však lze řešit nižším urychlovacím napětím a nebo jiným režimem focení. Postfixace oxidem osmičelým mi nejen prodloužila dobu přípravy o den, ale tato sloučenina je navíc vysoce toxická.

Dále jsem zjistila, že metoda sušení pomocí HMDS poskytuje srovnatelné výsledky se sušením metodou kritického bodu, což se shoduje s literárními údaji zjištěnými při studii jiných biologických preparátů než tasemnic (viz. kapitola 3.3.4.) . HMDS skýtá řadu výhod, především rychlejší a snadnější manipulaci.

Mrazová sublimace mi poskytla dobré výsledky, ale není vhodná pro zobrazování mnou zvolených povrchů (tedy studium povrchové ultrastruktury tasemnic) a to ani při prodloužení času sublimace. Metoda by mohla být vylepšena prodloužením času sublimace na hodiny, nebo výměnou sublimovaného media či kombinací obojího.

V této práci jsem vyzkoušela pouze několik možných způsobů přípravy preparátů, jistě by bylo zajímavé pokračovat s metodami méně užívanými (např. vakuovou sublimací t-butylalkoholu) a porovnat výsledky. Já jsem se zaměřila pouze na způsoby fixace nejčastěji používané v terénních podmínkách naší laboratoří. Nalezení nejvhodnější fixace a metody přípravy by se nemělo omezit pouze na jeden modelový organismus. Dle mého názoru je správně fixovaný materiál základem dobré morfologické studie.

8. LITERATURA

- **Al-Bassel D.A.H.M. 2003:** A general survey on the helminth parasites of some fish species from Fayoum Governorate in Egypt. *Parasitol. Res.* 90: 135–139.
- **Al-Jashamy K., Islam M. N. 2007:** Morphological study of *Taenia taeniaeformis* scolex under scanning electron microscopy using Hexamethyldisilazane. *Ann. Microsc.* 7: 80–83.
- **Al-Salihi K. A., Al-Jashamy K., Samsudin A.R., Afandi J., Patchamuthu R. 2004:** Comparative study between a new method using hexamethyldisilazane. *Ann. Microsc.* 4: 35–37.
- **Araujo J.C., Téran F. C., Oliveira R.A., Nour E.A.A., Montenegro M.A.P., Campos J.R., Vazoller R.F. 2003:** Comparison of hexamethyldisilazane and critical point drying treatments for SEM analysis of anaerobic biofilms and granular sludge. *J. Electron Microsc.* 52: 429–433.
- **von Ardenne M. 1938a:** The scanning electron microscope. Theoretical fundamentals. *Z. Phys.* 109: 553–572.
- **von Ardenne M. 1938b:** The scanning electron microscope. Practical construction. *Z. Tech. Phys.* 19: 407–416.
- **Ash A., Scholz T., Oros M., Kar P.K. 2011:** Tapeworms (Cestoda: Caryophyllidea), parasites of *Clarias batrachus* (Pisces: Siluriformes) in the Indomalayan Region. *J. Parasitol.* 97: 435–459.
- **Baker J.R. 1958:** Principles of Biological Microtechnique. *Methuen, London:* 357
- **Barré C. 2001:** Ontogenèse des organes de l'alimentation et sensoriels chez deux Pectinidés: *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791) et *Argopecten irradians* (Lamarck 1819). Diplôme d'études supérieures. *Université Paris VI Jussieu, France.*
- **Barré C., O'Neil D., Bricelj V.M. 2006:** Preparation of large bivalve specimens for scanning electron microscopy using hexamethyldisilazane (HMDS). *J. Shellfish Res.* 25: 639–641.
- **Bílý T. 2007:** Fyzikální principy transmisní a skenovací mikroskopie. Bakalářská práce. *Pedagogická fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice*
- **Blum F. 1893:** Der Formaldehyd als Antisepticum. *München. Med. Wochenschr.* 32: 601–602.
- **Botes L., Price B., Waldron M., Pitcher G.C. 2002:** A simple and rapid electron microscope preparative technique for delicate “gymnodinioid” dinoflagellates. *Microsc. Res. Techniq.* 59: 128–130.
- **Bozzola J.J., Russell L.D. 1999:** Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. Second Edition. *Jones and Bartlett Publishers, Boston,* 670 pp.
- **Braet F., De Zanger R., Wisse E. 1997:** Drying cells for SEM, AFM and TEM by hexamethyldisilazane: a study on hepatic endothelial cells. *J. Microsc.* 186: 184–187.
- **Bray D.F., Bagu J., Koegler P. 1993:** Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc. Res. Techniq.* 26: 489–495.
- **Breton B. 2009:** The Early History and Development of the Scanning Electron Microscope. <http://www2.eng.cam.ac.uk/~bcb/history.html>, listopad 2009
- **Buesa R.J. 2008:** Histology without formalin? *Ann. Diagn. Pathol.* 12: 387–396
- **Busch H. 1927:** Über die Wirkungsweise der Konzentrierungsspule bei der Braunschen Röhre. *Arch. Elektrotech.* 18: 583–594.

- **de Chambrier A., Mariaux J., Sène A., Mahmoud Z.N., Scholz T. 2008:** *Sandonella sandoni* (Lynsdale, 1960), an enigmatic and morphologically unique cestode parasitic in the osteoglossiform fish *Heterotis niloticus* in Africa. *J. Parasitol.* 94: 202–211.
- **de Chambrier A., Scholz T. 2008:** Tapeworms (Cestoda: Proteocephalidea) of firewood catfish *Sorubimichthys planiceps* (Siluriformes: Pimelodidae) from the Amazon River. *Folia Parasitol.* 55: 17–28.
- **de Chambrier A., Scholz T., Beletew M., Mahmoud Z.N. 2007:** Redescription of *Proteocephalus sulcatus* (Klaptocz, 1906) (Cestoda: Proteocephalidea), a poorly known parasite of *Clarotes laticeps* (Pisces: Siluriformes) in the Sudan. *Rev. Suisse Zool.* 114: 693–702.
- **de Chambrier A., Scholz T., Beletew M., Mariaux J. 2009:** A new genus and species of proteocephalidean (Cestoda) from *Clarias* catfishes (Siluriformes: Clariidae) in Africa. *J. Parasitol.* 95: 160–168.
- **de Chambrier A., Vaucher C. 1997:** Revision of the cestodes (Monticelliidae) described by Woodland (1934) in *Brachyplatystoma filamentosum* with a redefinition of the genera *Endorchis* Woodland, 1934, and *Nomimoscolex* Woodland, 1934. *Syst. Parasitol.* 37: 219–233.
- **de Chambrier A., Vaucher C. 1999:** Proteocephalidae and Monticelliidae (Eucestoda: Proteocephalidea) parasites of freshwater fishes in Paraguay, with description of a new genus and ten new species. *Rev. Suisse Zool.* 106: 165–240
- **Chervy L. 2009:** Unified terminology for cestode microtriches: a proposal from the International Workshops on Cestode Systematics in 2002-2008. *Folia Parasitol.* 56: 199–230.
- **Chesnick I.E., Mason J.T., O'Leary T.J., Fowle C.B. 2010:** Elevated pressure improves the rate of formalin penetration while preserving tissue morphology. *J. Cancer.* 1: 178–183
- **Chissoe W.F., Vezey E.L., Skvarla J.J. 1994:** Hexamethyldisilazane as a drying agent for pollen scanning electron microscopy. *Biotech. Histochem.* 69: 192–198.
- **Courtenay W.R., Jr., Williams J.D. 2004:** Snakeheads (Pisces: Channidae). A biological synopsis and risk assessment. *U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey Circular 1251*, 143 pp.
- **Cribb T.H., Bray R.A. 2010:** Gut wash, body soak, blender and heat-fixation: approaches to the effective collection, fixation and preservation of trematodes of fishes. *Syst. Parasitol.* 76: 1–7
- **Černohorský T., Jandera P. 1997:** Atomová spektroskopie (skripta). *Univerzita Pardubice, Pardubice*
- **Dystka M.J. 1993:** A Manual of Applied Techniques for Biological Electron Microscopy. *Plenum Press, New York and London*, 257 pp.
- **Eckertová L.; Frank L. 1996:** Metody analýzy povrchů, elektronová mikroskopie a difrakce. *Academia, Praha, Česká republika*, 379 pp.
- **Eissa I.A.M., Gado M.S., Iaila A.M., Zaki M.S., El-Deen N.A.E. 2011:** Field studies on prevailing internal parasitic diseases in male and hybrid tilapia relation to monosex tilapia at Kafr El-Sheikh Governorate fish farms. *J. Am. Sci.* 7: 722–727.
- **Ergens R., Lom J. 1970:** Původci parazitárních nemocí ryb. *Academia, Praha*, 383 pp.
- **Everhart T.E., Thornley R.F.M. 1960:** Wide-band detector for micro-microampere low-energy electron currents. *J. Sci. Instrum.* 37: 246–248.
- **Faisal M., Heikal F., Shalaby S.I. 1989:** Helminthic parasites of the African catfish *Clarias lazera* (C & V) on Lower Egypt: *Polyonchobothrium clarias* Woodland. *Angew. Parasitol.* 76: 176–188.
- **FEI 2011:** <http://www.fei.com/default.aspx>, srpen 2011

- **Foitová I., Baruš V., Hodová I., Koubková B., Nurcahyo W. 2008:** Two remarkable pinworms (Nematoda: Enterobiinae) parasitizing orangutan (*Pongo abelii*) in the Sumatra (Indonesia). *Helminthologia* 45: 162 – 168
- **Fox C.H., Johnson F.B., Whiting J., Roller P.P. 1985:** Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 845–853.
- **Fujita H. 1986:** History of electron microscopes. the 11th International Congress on Electron Microscopy, Kyoto, Japan: 187–193.
- **Fyler C.A. 2007:** Comparison of microtrix ultrastructure and morphology on the plerocercoid and adult scolex of *Calliobothrium* cf. *verticillatum* (Tetraphyllidea: Onchobothriidae). *J. Parasitol.* 93: 4–11.
- **Gatan 2006:** www.gatan.com/knowhow14/cryo.htm, prosinec 2006
- **Geology 2011:** <http://www.geology.cz/extranet/sluzby/laboratore/larem/sluzby/SEI>, listopad 2011
- **Goldstein J.I., Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C., Fiori Ch., Lifshin E. 1981:** Scanning electron microscopy and X-Ray Microanalysis: A text for Biologists, Material Scientists and Geologists. *Plenum Press, New York*, 673 pp.
- **Goldstein J.I., Yakowitz H. 1975:** Practical Scanning Electron Microscopy : electron and ion microprobe analysis. *Plenum Press, New York*, 582 pp.
- **Hayat M. A. 2000:** Principles and Techniques of Electron Microscopy Fourth Edition, *Cambridge University Press*, 546 pp.
- **Helander K.G. 1994:** Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech. Histochem.* 69: 177–179.
- **Heraty J., Hawks D. 1998:** Hexamethyldisilazane a chemical alternative for drying insects. *Entomol. News* 109: 369–374.
- **Heuser J.E., Reese T.S., Dennis M.J., Jan Y., Jan L., Evans L. 1979:** Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell Biol.* 81: 275–300
- **Hodová I., Baruš V., Tukač V. 2008:** Note on morphology of two nematode species *Ascaridia hermaphrodita* and *Ascaridia platyceri* (Nematoda): scanning electron microscope study: *Helminthologia* 45: 109–113.
- **Hodová I., Matejusova I., Gelnar M. 2010:** The surface topography of *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) developmental stages parasitizing carp (*Cyprinus carpio* L.). *Centr. Eur. J. Bio.* 5: 702–709.
- **Hohenberg H., Muller-Reichert T., Schwarz H., Zierold, K. 2003:** Special issue on high pressure freezing – foreword. *J. Microsc. – Oxford* 212: 1–2.
- **Hochberg R., Litvaitis M.K. 2000:** Hexamethyldisilazane for scanning electron microscopy of Gastrotricha. *Biotech. Histochem.* 75: 141–144.
- **Hopwood D. 1967:** Some aspects of fixation with glutaraldehyde. *J. Anat.* 101: 83–92.
- **Hopwood D., Slidders W., Yeaman G.R. 1989:** Tissue fixation with phenol—formaldehyde for routine histopathology. *Histochem. J.* 21: 228–234.
- **Hulínský V., Jurek K. 1982:** Zkoumání látek elektronovým paprskem. *Státní nakladatelství technické literatury, Praha*, 401 pp.
- **Inoué T., Osatake H. 1988:** A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: the t-butyl alcohol freeze-drying method. *Arch. Histol. Cytol.* 51: 53–59
- **JEOL 2005:** JSM-7401F Field Emission Scanning Electron Microscope. *JEOL Ltd., Tokyo*
- **JEOL 2011:** <http://www.jeol.com>, listopad 2011
- **JIC 2011:** CRYO-SEM. http://www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_19.htm, září 2011
- **Jurečka P.J., Nebesářová J. 2010:** Skenovací elektronový mikroskop (SEM) ve službách biologie. V: *Moderní zobrazovací metody v biologii* Ďuriš Z., Horká I., Dolný A., Drozd

P., Juračka P.J., Nebesářová J., Ševčík J., <http://www.paru.cas.cz/lem/cs/vzdelavani.php>, prosinec 2010

- **Kahn L. E., Frommes S.P., Cancilla P.A., 1977:** Comparison of ethanol and chemical dehydration methods for the study of cells in culture by scanning and transmission electron microscopy. *Scan. Electron. Microsc. 1*: 501–506
- **Karlík M. 2005:** Transmisní elektronová mikroskopie: pohled do nitra materiálů. *Čs. čas. fyz. 55*: 457–464.
- **Kelley R.O., Dekker R.A.F., Bluemink J.G. 1973:** Ligand mediated osmium binding: its application in coating biological specimens for scanning electron microscopy. *J. Ultra. Mol. Struct. R. 45*: 254
- **Kennedy C.R. 1965:** Taxonomic studies on *Archigetes* Leuckart, 1878 (Cestoda: Caryophyllaeidae). *Parasitology 55*: 439–451
- **Kiernan J.A. 2000:** Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microsc. Today 1*: 8–12.
- **Kuchta R., Burianová A., Scholz T., Jirků M., de Chambrier A., Oros M. 2012.** Bothriocephalidean tapeworms (Cestoda) from freshwater fish of Africa. *Zootaxa*
- **Kuchta R., Caira J.N. 2010:** Three new species of *Echinobothrium* (Cestoda: Diphyllidea) from Indo-Pacific stigrays of the genus *Pastinachus* (Rajiformas: Dasyatidae). *Folia Parasitol. 57*: 185–196
- **Kuchta R., Scholz T. 2007:** Diversity and distribution of fish tapeworms of the “Bothriocephalidea” (Eucestoda). *Parassitologia 49*: 21–38.
- **Kuchta R., Scholz T., Bray R.A. 2008:** Revision of order Bothriocephalidea Kuchta, Scholz, Brabec & Bray, 2008 (Eucestoda) with amended generic diagnoses and keys to families and genera. *Syst. Parasitol. 71*: 81–136
- **Kuchta R., Scholz T., Justine J.-L. 2009a:** Two new species of *Bothriocephalus* Rudolphi, 1808 (Cestoda: Bothriocephalidea) from marine fish off Australia and New Caledonia. *Syst. Parasitol. 73*: 229–238
- **Kuchta R., Scholz T., Vlčková R., Říha M., Walter T., Yuniar A.T., Palm H.W. 2009b:** Revision of tapeworms (Cestoda: Bothriocephalidea) from lizardfish (*Saurida*: Synodontidae) from the Indo-Pacific region. *Zootaxa 1977*: 55–67
- **Kusamichi M., Monodane T., Tokunaga M., Koike, H. 1990:** Influence of surrounding media on preservation of cell ultrastructure of *Candida albicans* revealed by low temperature scanning electron microscopy. *J. Electron Microsc. 39*: 477–486
- **Laforsch C., Tollrian R. 2000:** A new preparation technique of daphnids for scanning electron microscopy using hexamethyldisilazane. *Arch. Hydrobiol. 149*: 4587–4596.
- **Maroušek R. 2007:** Mrazová sublimace v kryonástavci Gatan Alto 2500 skenovacího elektronového mikroskopu JSM-7401F. Diplomová práce. *Pedagogická fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice*
- **Maser M.D., Trimble J.J. 1977:** Rapid chemical dehydration of biologic samples for scanning electron microscopy using 2,2-dimethoxypropane. *J. Histochem. Cytochem. 25*: 247–251
- **Mašová Š., Baruš V., Moravec F. 2011:** New morphological data on the first-stage larvae of two *Procamallanus* species (Nematoda: Camallanidae) based on SEM studies. *Folia Parasitol. 58*: 318–321
- **McIntosh J.R. 2001:** Electron microscopy of cells: a new beginning for new century. *J. Cell Biol. 153*: 25–32
- **McMullan D. 1993:** Scanning electron microscopy 1928–1965. <http://www-g.eng.cam.ac.uk/125/achievements/mcmullan/mcm.htm>, srpen 1993
- **Medawar P.B. 1941:** The rate of penetration of fixatives. *J. Roy. Microsc. Soc. 61*: 46–57.

- **Moraes N., Bouzon Z.L. 1995:** Comparative analysis of the external morphology of *Macrobrachium potiuna* eggs by using hexamethyldisilazane and critical point in the scanning electron microscopy. *Arq. Biol. Technol.* 38: 3689–3692,
- **Mráz P., Polónyi J. 1988:** Metódy elektronevej mikroskopie živočišných tkanív. *Veda, Bratislava*, 312 pp.
- **Müller M., Meister N., Moor H. 1980:** Freezing in a propane jet and its application in freeze-fracturing. *Mikroskopie* 36: 129–140.
- **Müller M., Moor H. 1984:** Cryo-fixation of suspensions and tissues by propane jet freezing and high-pressure freezing. *Proc. 42nd Ann. Meet. Electron. Microsc. Soc. Am. 1984:* 6-9
- **Murakami T. 1974:** A revised tannin-osmium method for noncoated scanning electron microscope specimens. *Arch. Histol. Jap.* 36: 189–192.
- **Nation J. L. 1983:** A new preparation method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain. Technol.* 58: 347–351.
- **Nebesářová J. 2001:** Elektronová mikroskopie pro biology. <http://www.paru.cas.cz/lem/book/>, leden 2001
- **Neděla V. 2008:** Detekce signálních elektronů v prostředí vysokého tlaku plynů EREM. Doktorská práce. *Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické, Brno*
- **Oros M., Scholz T., Hanzelová V., Mackiewicz J.S. 2010:** Scolex morphology of monozoic cestodes (Caryophyllidea) from the Palaearctic Region: a useful tool for species identification. *Folia Parasitol.* 57: 37–46.
- **Palucka T. 2002:** Electron microscopy in the 1960s–1990s. <http://authors.library.caltech.edu/5456/1/hrst.mit.edu/hrs/materials/public/ElectronMicroscopy/EM1960s.htm>, červenec 2002
- **Pease R.F.W., Nixon W.C. 1965:** High-resolution scanning electron microscopy. *J. Sci. Instrum.* 42: 31–35.
- **Pease R.F.W. 1963:** Ph D dissertation. *Cambridge University, England.*
- **Pšenička M., Tesařová M., Těšitel J., Nebesářová J. 2010:** Size determination of *Acipenser ruthenus* spermatozoa in different types of electron microscopy. *Micron* 41: 455–460.
- **Robards A.W., Sleytr U.B. 1985:** Low Temperature Methods in Biological Electron Microscopy. *Practical Methods in Electron Microscopy, Vol.10, Glauert A.M. (ed), Elsevier, Amsterdam*, 551 pp.
- **Schatten H., Pawley J.P. 2008:** Biological Low Voltage Field Emission Scanning Electron Microscopy. *Springer Science, New York*, 317 pp.
- **Scholz T. 1989.** *Amphilinida and Cestoda, Parasites of Fish in Czechoslovakia.* Acta Scientiarum Naturalium Brno 23, No. 4, 56 pp.
- **Scholz T., de Chambrier A., Beletew M., Mahmoud Z.N. 2009:** Redescription of *Proteocephalus glanduligerus* (Cestoda: Proteocephalidea), a parasite of clariid catfishes in Africa with a unique glandular apical organ. *J. Parasitol.* 95: 443–449.
- **Scholz T., de Chambrier A., Mariaux J., Kuchta R. 2011 :** Redescription of *Corallobothrium solidum* (Cestoda: Proteocephalidea) and erection of new genus, *Essexiella*, for tapeworms from channel catfish (Ictaluridae). *J. Parasitol.* (in press).
- **Scholz T., Hanzelová V. 1998:** Tapeworms of the genus *Proteocephalus* Weinland, 1858 (Cestoda: Proteocephalidae), parasites of fishes in Europe. *Studie AV ČR, No 2/98, Prague, Academia*, 119 pp.
- **Schöne B.R., Bentley D. 2002:** Use of HMDS (hexamethyldisilazane) to dry organic microstructures in etched bivalve mollusk and barnacle shells. *Nautilus* 116: 125–131

- **Sitte H., Edelman L., Neumann K. 1987:** Cryofixation without pretreatment at ambient pressure. *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*, Steinbrecht R.A., Zierold K. (eds.), Springer, Berlin: pp. 87–113.
- **Slížová D., Krs O., Pospíšilová B. 2003:** Alternative method of rapid drying vascular specimens for scanning electron microscopy. *J. Endovasc. Ther.* 10: 285–287.
- **Smith K.C.A. 1997:** Charles Oatley: Pioneer of scanning electron microscopy. <http://www2.eng.cam.ac.uk/~bcb/cwo1.htm>, 1997
- **Smith M.E., Finke E.F. 1972:** Critical point drying of soft biological material for the scanning electron microscope. *Invest. Ophthalmol.* 11: 127–132.
- **Smith G.F., Tiedt L.R. 1991:** A rapid, non-destructive osmium tetroxide technique for preparing pollen for scanning electron microscopy. *Taxon* 40: 195–200.
- **Wikipedie 2011:** FEI company. http://cs.wikipedia.org/wiki/FEI_Company, červenec 2011
- **Zimmer B. 1989:** PELDRI II: A quick and easy alternative to critical point drying for scanning electron microscopy. *Amer. Fern J.* 79: 146–150.
- **Zworykin V.A., Hillier J., Snyder R.L. 1942:** A scanning electron microscope. *Astin. Bull.* 117: 15–23.