

Úvod do tkáňového inženýrství Mikroskopie

20.2.2024

doc. RNDr. Jana Horáková, Ph.D.

Osnova přednášky

- Definice (tkáňového) inženýrství, propojení s dalšími předměty studia
- Mikroskopické metody:
 - Optická
 - Fluorescenční
 - Elektronová mikroskopie

Inženýrství

Technická disciplína, která aplikuje technické a vědecké poznatky, **využívá zákonů přírody** a přírodních i lidských prostředků k vytváření materiálů, staveb, strojů, systémů a procesů, které splňují bezpečnostní i funkční kritéria s ohledem na ekonomiku, společnost a životní prostředí

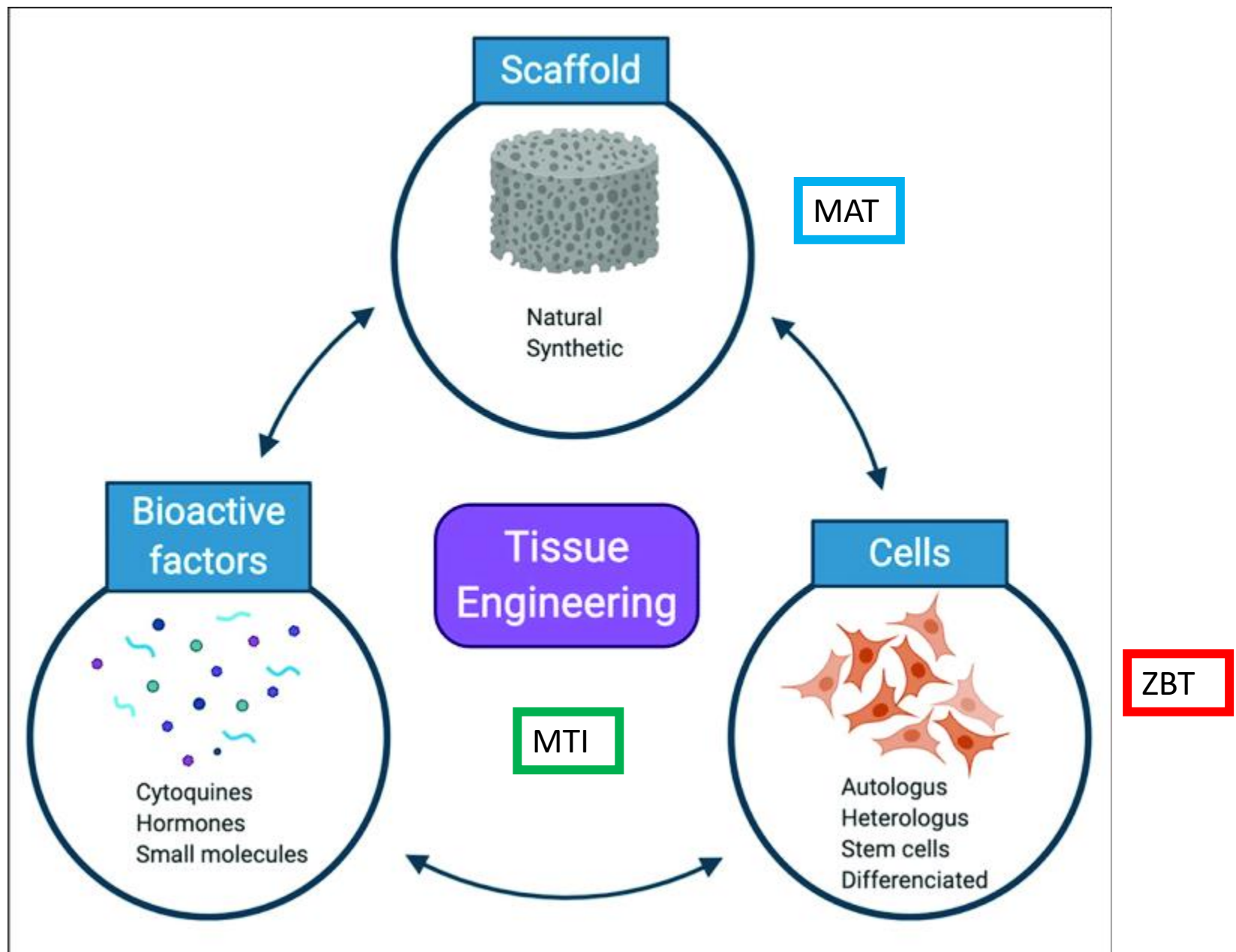
Tkáňové inženýrství

Interdisciplinární obor využívající znalostí **inženýrství a přírodních věd** k vývoji biologických náhrad sloužících k obnově, zachování nebo zlepšení funkcí tkání nebo orgánů

(Langer et Vacanti, 1993)



„Vacanti mouse“ – slavný experiment



Buněčná biologie

= cytologie

- Dějiny jsou spjaty s objevy mikroskopie → pozorování buněk pomocí optické / fluorescenční / elektronové mikroskopie
- Velikost buněk obvykle 5-20 μm

Porovnání mikroskopických metod

	Zvětšení	Maximální rozlišovací schopnost
Lidské oko		0,2 mm
Optický mikroskop	20-2 000x	200 nm
Elektronový mikroskop	1 000-250 000x	0,5 nm

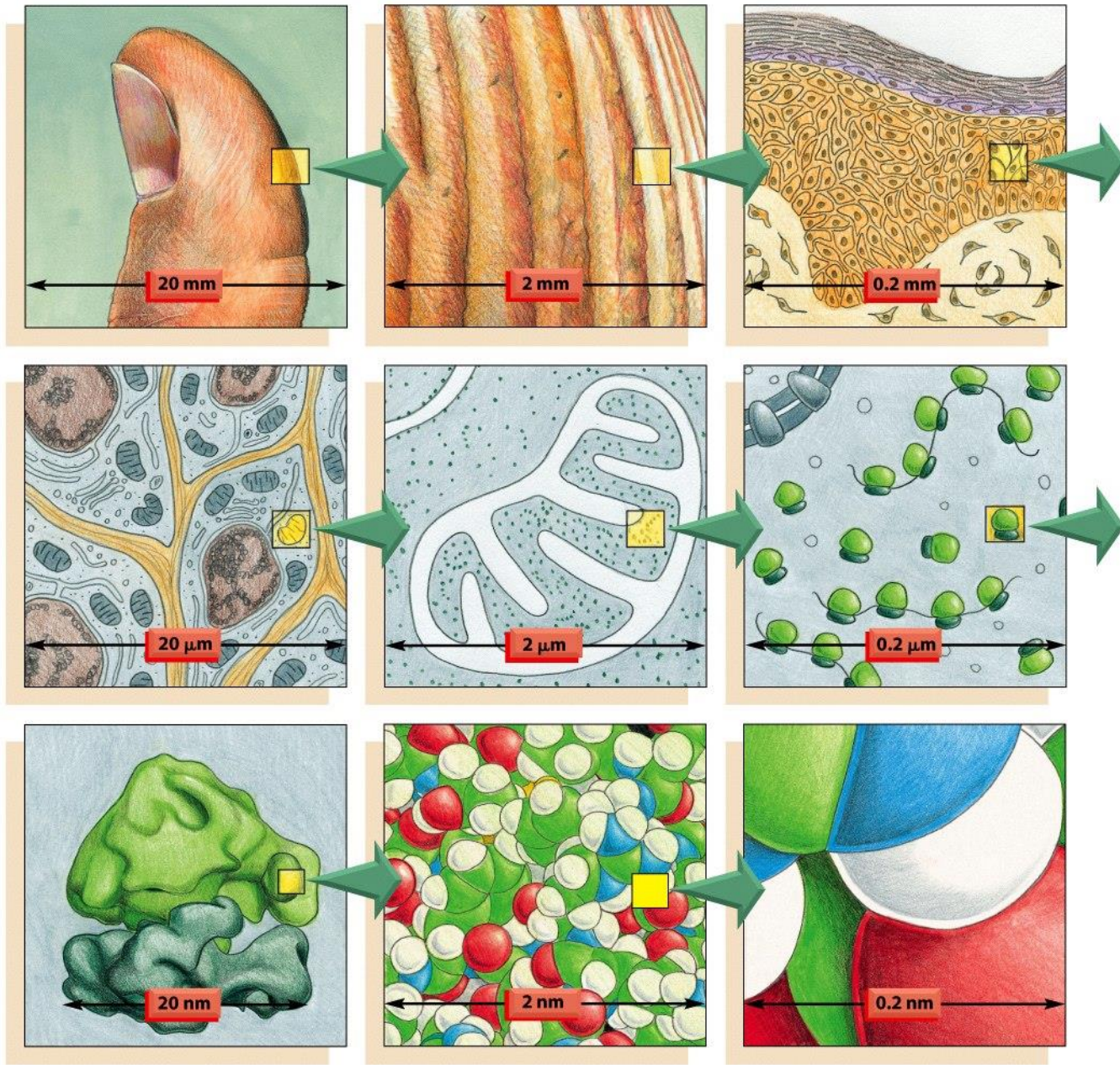


Figure 9-1 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

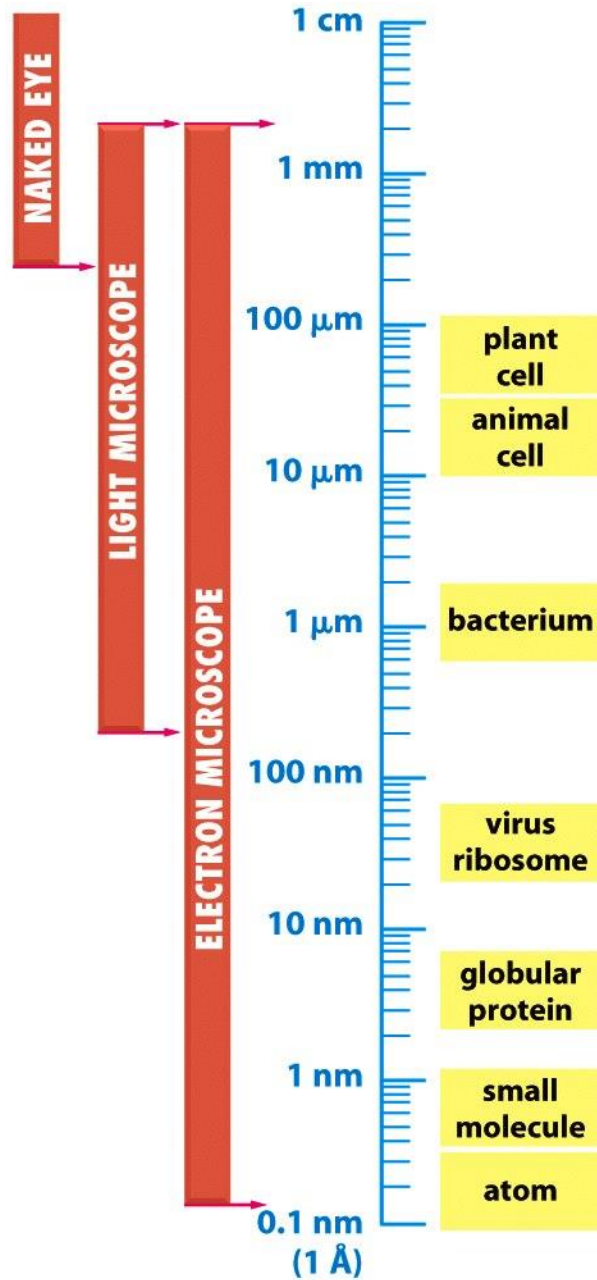


Figure 9-2 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Historie světelné mikroskopie

17. století

- *Robert Hook* (1665, Anglie) – pozorování korku – komůrky „*cellulae*“
- *Anthony van Leeuwenhoek* (Nizozemí) – sestrojení prvních mikroskopů → pozorování prvoků, bakterií, spermií, objev krve v kapilárách,...

Historie světelné mikroskopie

19. století

- Vznik buněčné biologie jako samostatné vědy
→ rozšířená mikroskopie k pozorování živých buněk
- *Matthias Schleiden* (botanik, 1838), *Theodor Schwann* (zoolog, 1839) – buňky jsou univerzálními stavebními jednotkami všech živých tkání = základy buněčné teorie

Optický mikroskop

- Vynalezen v 17. století
- Dnes rutinně používán v každé biologické laboratoři
- Soustava 3 optických soustav: osvětlovací soustava, objektiv, okulár + mechanické části
- Pozorování buněk (cytoplazmatická membrána, jádro)

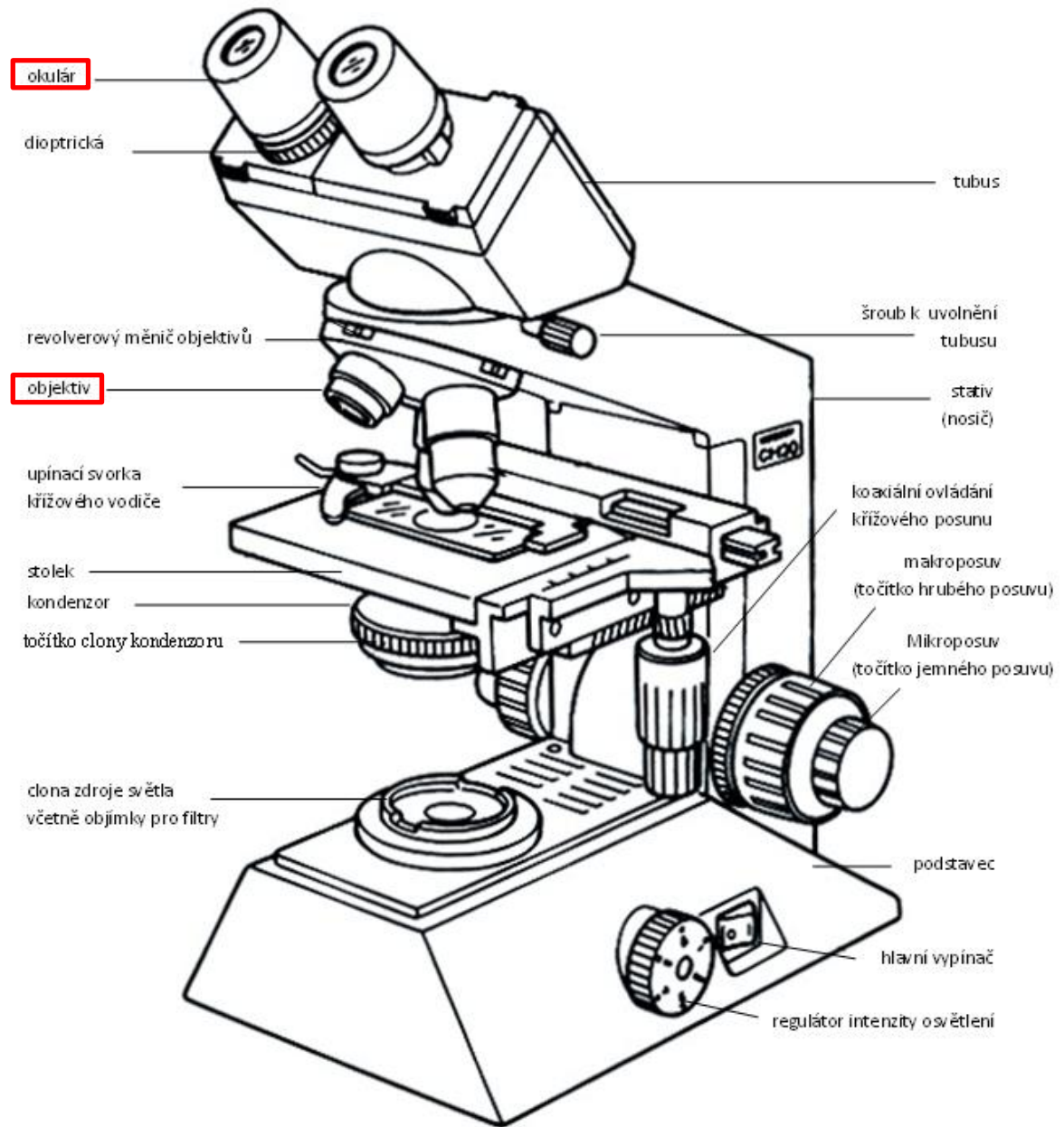
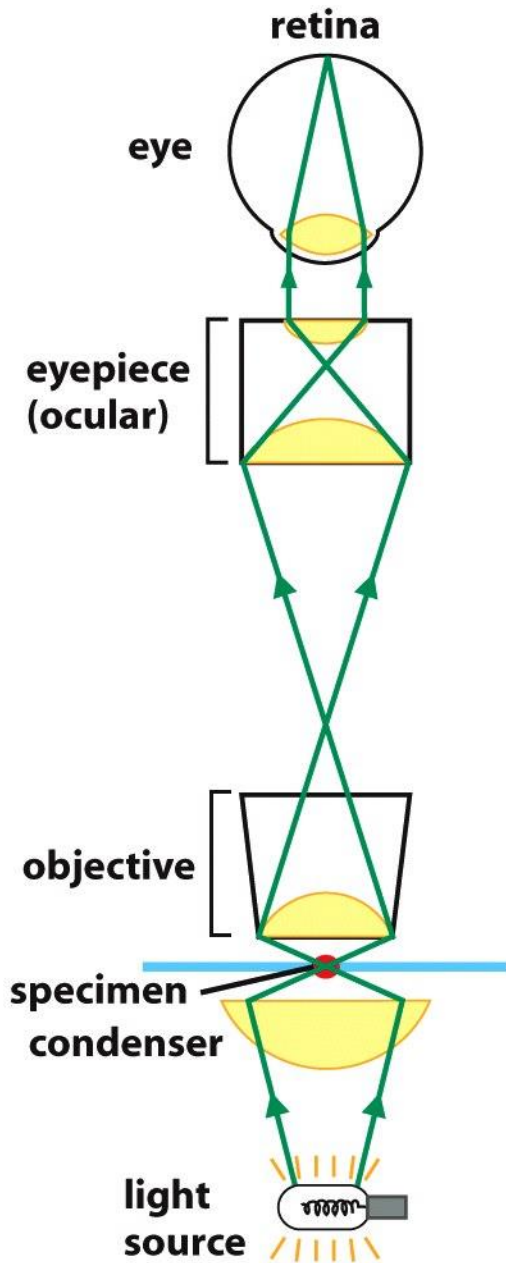


Figure 9-3a *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-svetelne-mikroskopy&lang=cz&goonpage>, 26.2.2023

Rozlišovací schopnost mikroskopu

- Omezená vlnovou délkou světla
- **Numerická apertura (N.A.)**=vlastnost objektivu – ovlivňuje rozlišovací schopnost R

$$R = k * (\lambda / N.A.)$$

k – optická konstanta (0,61)

λ – vlnová délka použitého světla
(0,55 u žlutozeleného světla)



Rozlišovací schopnost

$$R = k * (\lambda / N.A.)$$

Vypočítejte rozlišovací schopnost objektivů s těmito charakteristikami:

Zvětšení 10x / N.A. 0,25

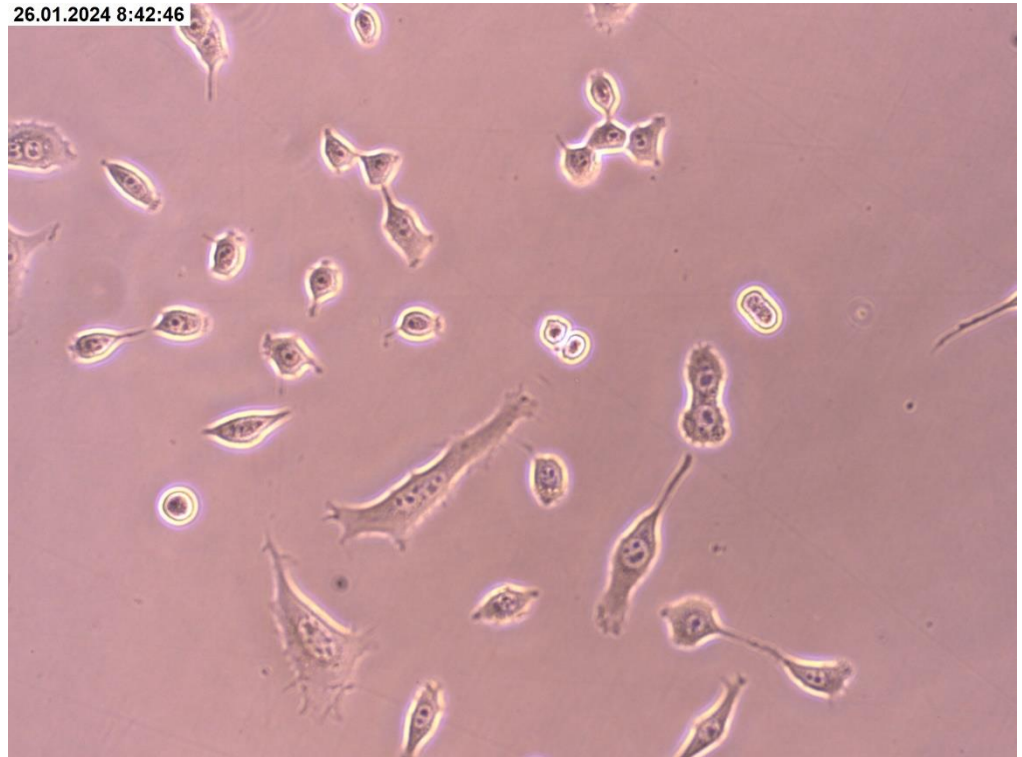
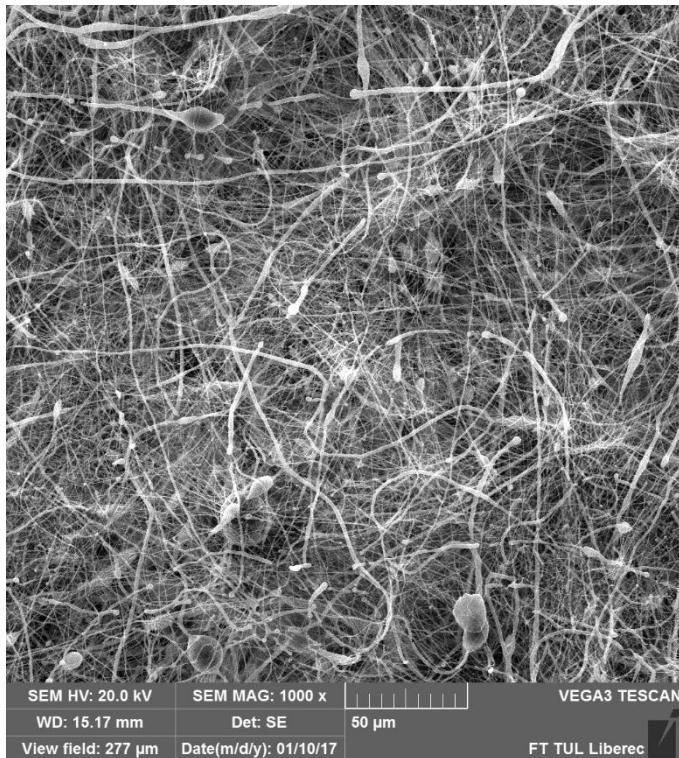
Zvětšení 20x / N.A. 0,40

$$k = 0,61$$

$$\lambda = 0,55$$

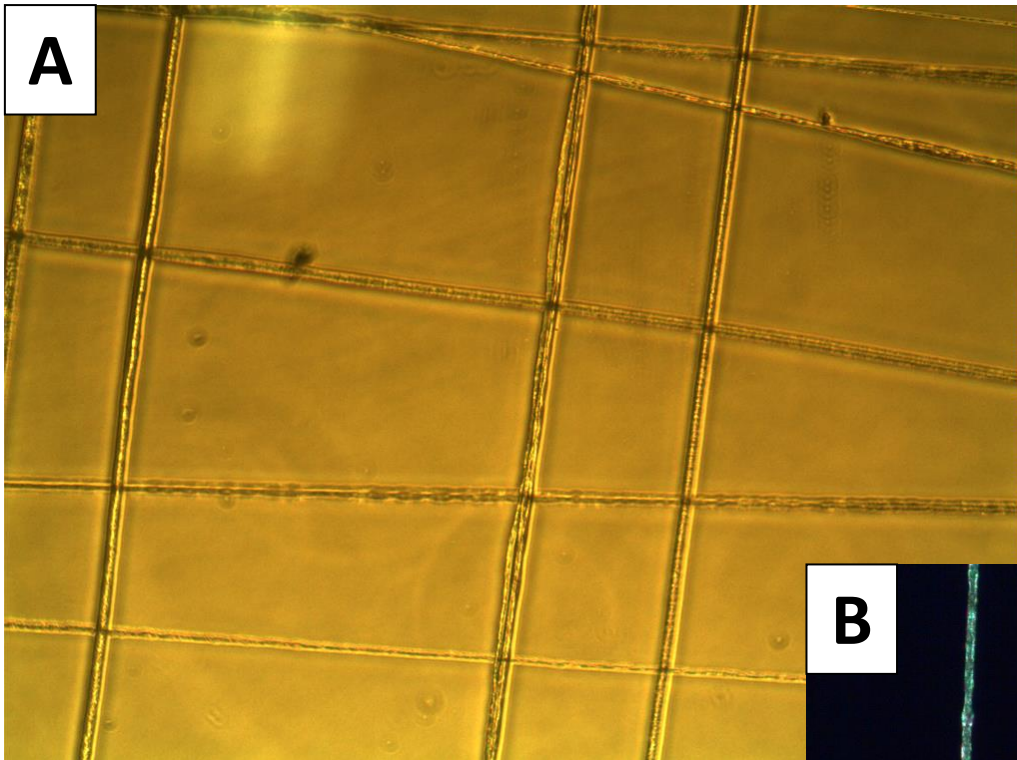
Pozorování předmětů

- v dopadajícím světle – episkopické osvětlení
- v procházejícím světle – diaskopické osvětlení

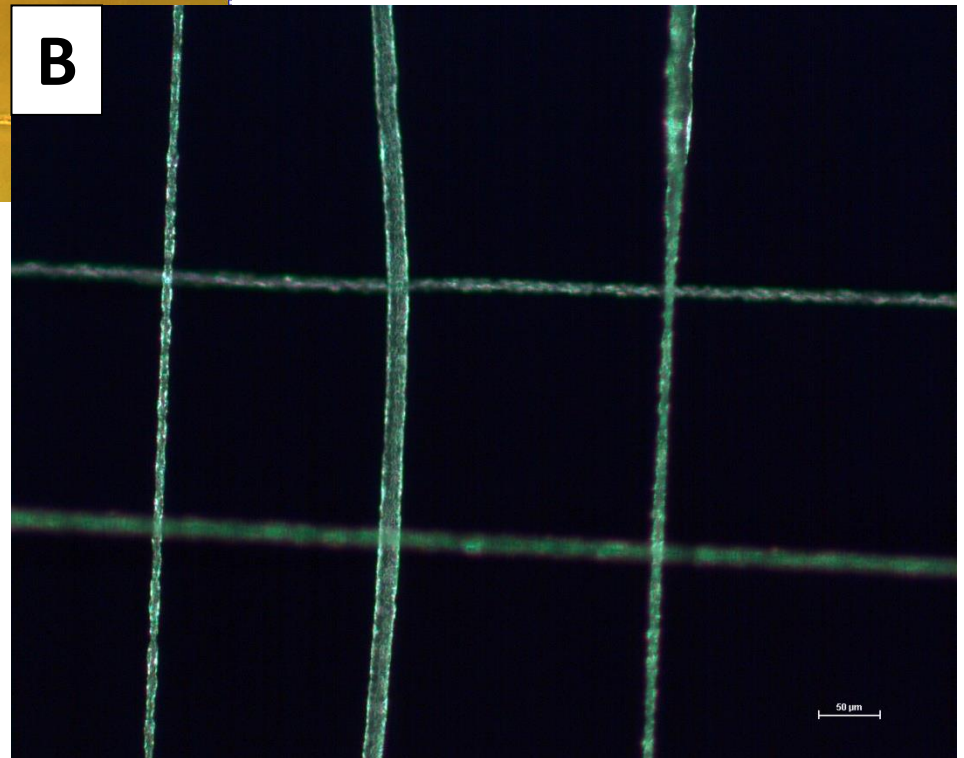


Zobrazovací metody

- ***Metoda procházejícího světla*** – základní uspořádání, pozorovaným objektem prochází světlo
- ***Metoda tmavého pole*** – objekt je osvětlený ze stran, paprsky se o něj odráží a lámou → do objektivu vstupuje světlo rozptýlené předmětem, zobrazení svítícího objektu na tmavém pozadí → zvýšení kontrastu zobrazovaného objektu



Zobrazení vláken
tažených metodou
drawing – procházející
světlo (A), tmavé pole (B).

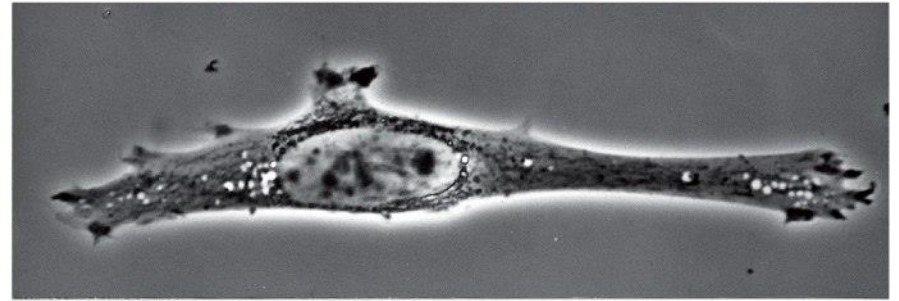


Zobrazovací metody

- ***Metoda fázového kontrastu*** – využívá se pro zviditelnění neobarvených fázových objektů, např. buněk
- ***Frits Zernik*** (Nizozemí, 1932) – objev fázového kontrastu, 1953 Nobelova cena ze fyziky
- Speciální destička s kruhovou štěrbinou (kondenzor), fázová destička (objektiv) → pozorování detailů buněk



(A)

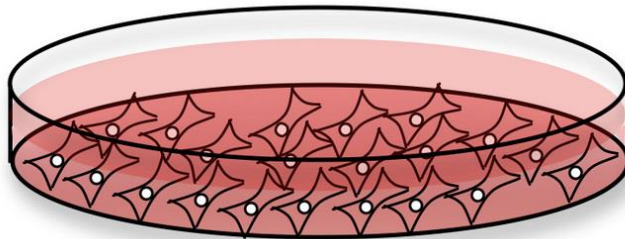


(B)

Buňka zobrazená pomocí metody procházejícího světla (A),
fázovým kontrastem (B).

Inverzní mikroskopie

- rozdílné umístění optické soustavy – objektiv se nachází pod pozorovaným objektem, zdroj světla a kondenzor nad ním, využívá metodu fázového kontrastu
- Pozorování buněčných kultur v kultivačních nádobách / Petriho miskách (korekce na silnější stěny → omezené zvětšení)



Konfokální mikroskopie

- umožňuje sledovat 3D objekty s nezanedbatelnou tloušťkou
- Snímání jednotlivých optických rovin pozorovaného objektu → rekonstrukce 3D obrazu

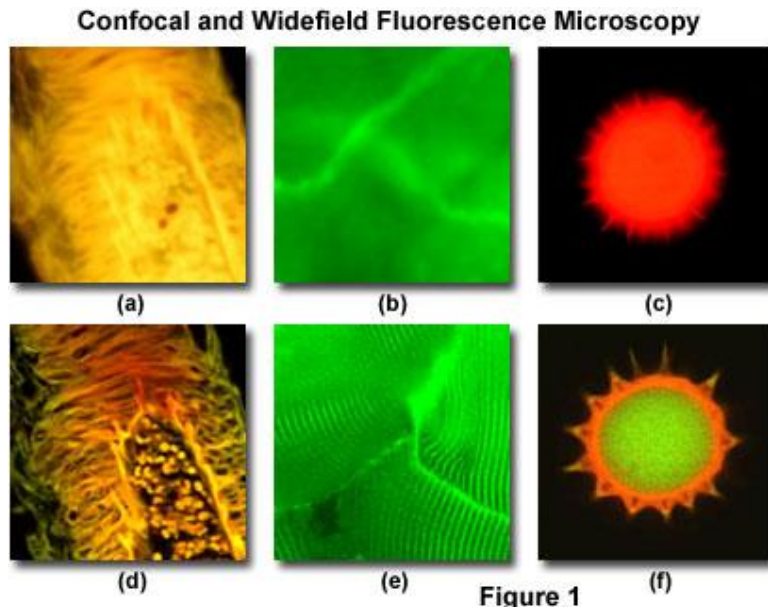


Figure 1

Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy

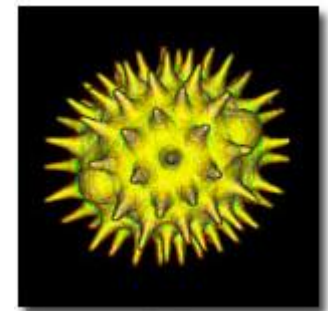
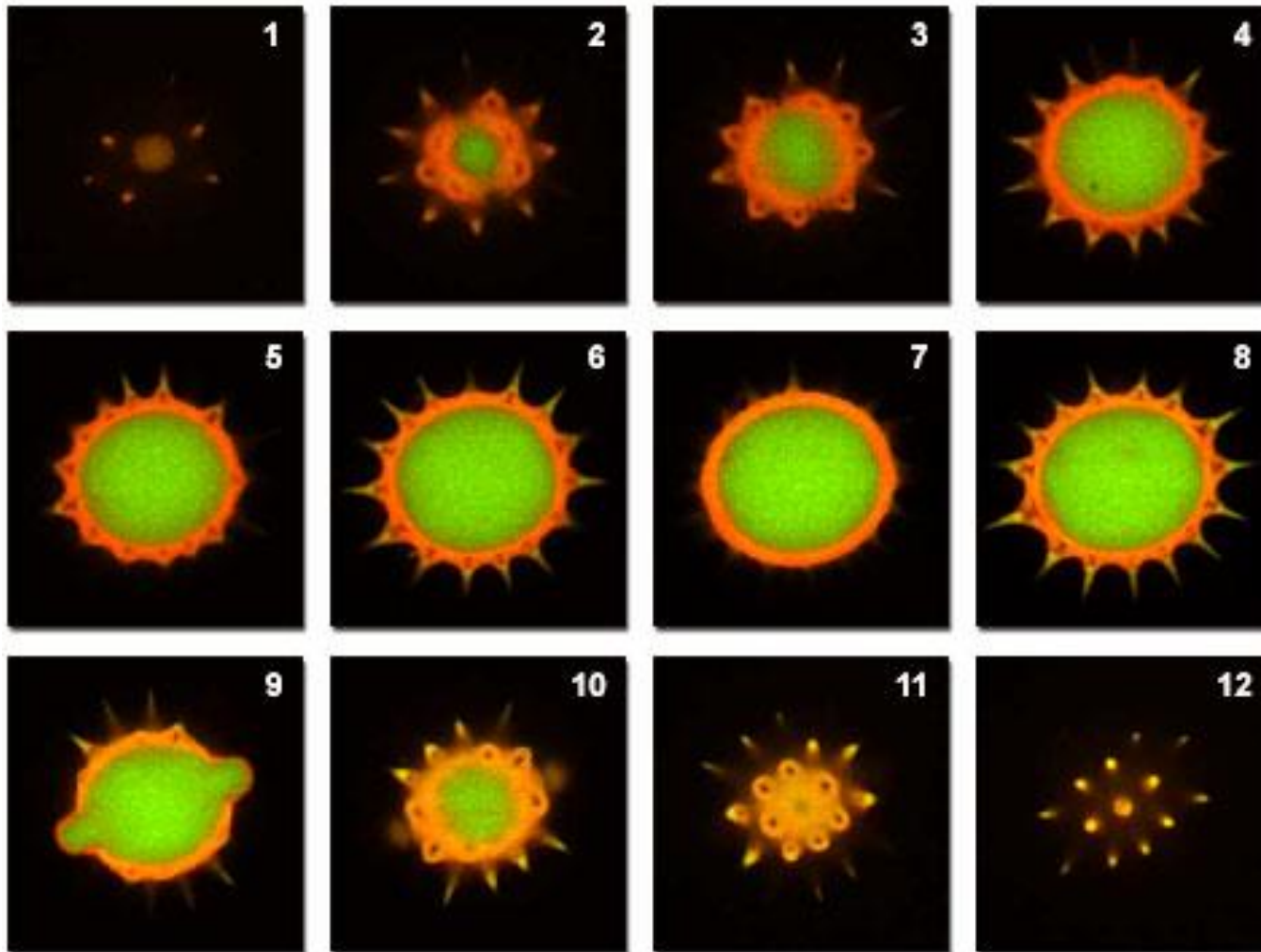


Figure 6

Fluorescenční mikroskopie

- optická mikroskopie využívající fluorescenci k zobrazení specifických struktur
- Fluorescence = absorpce kvanta záření → emise záření o delší vlnové délce
- Uspořádání mikroskopu: osvětlení (rtuťová výbojka) → excitační filtr → polopropustné (dichroické) zrcadlo → emisní filtr

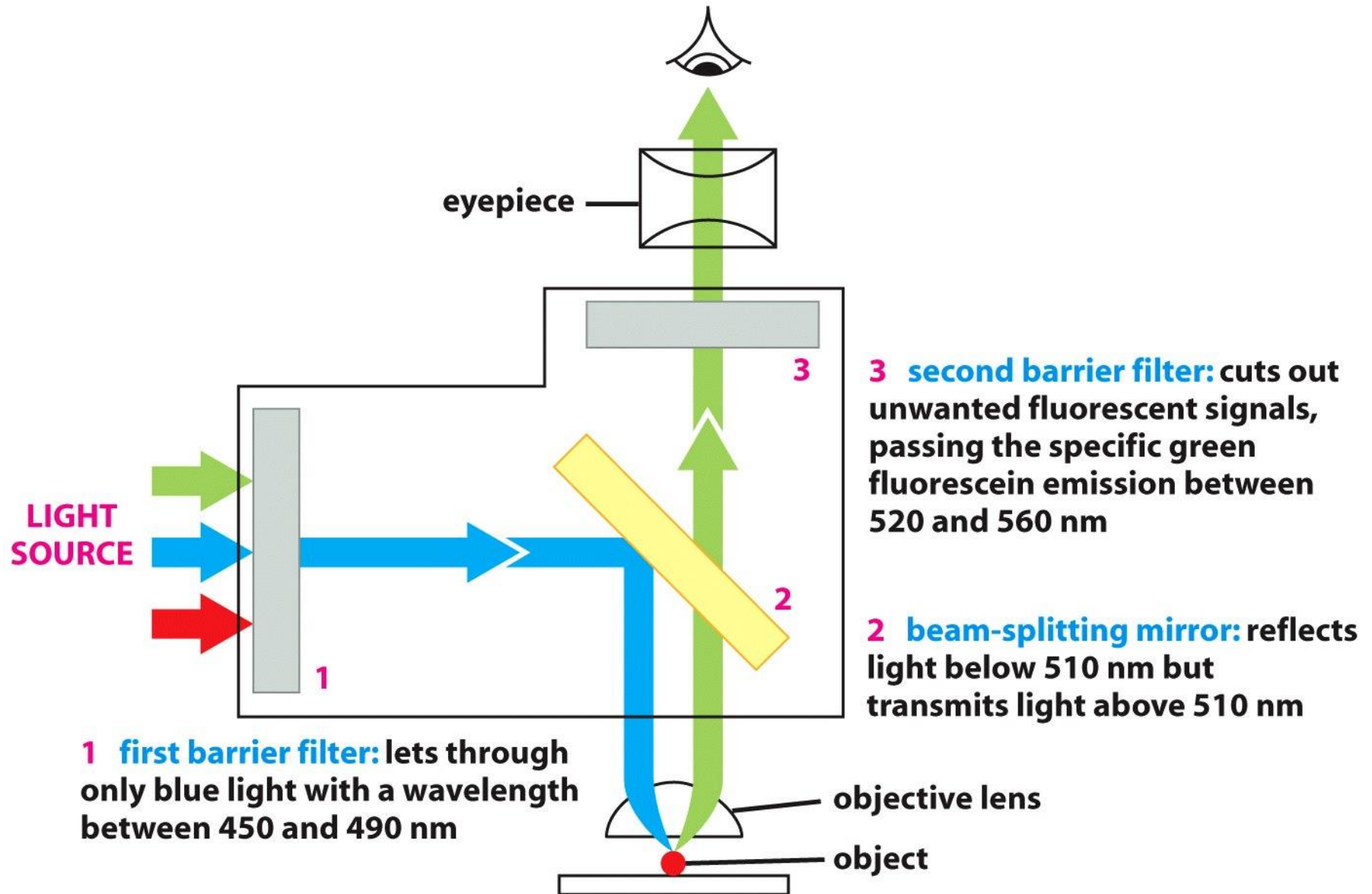
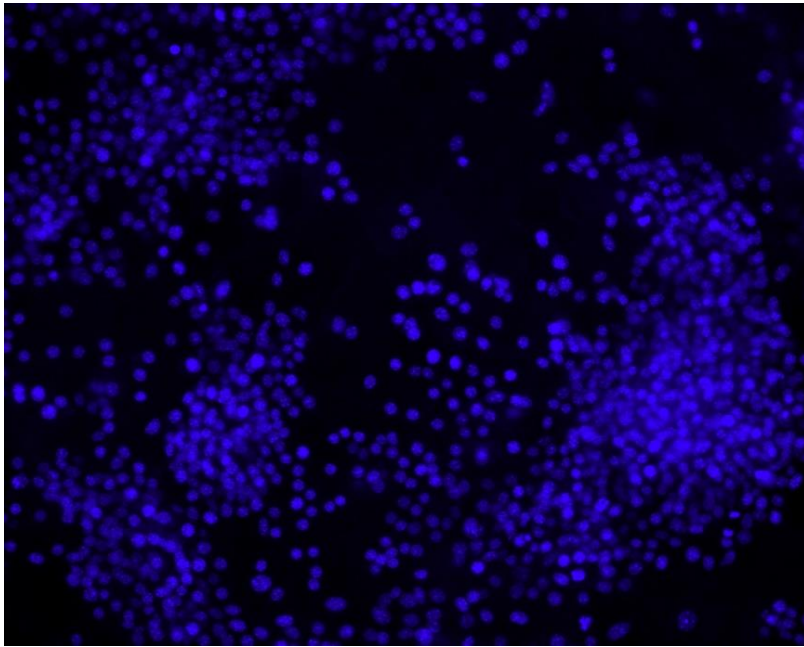
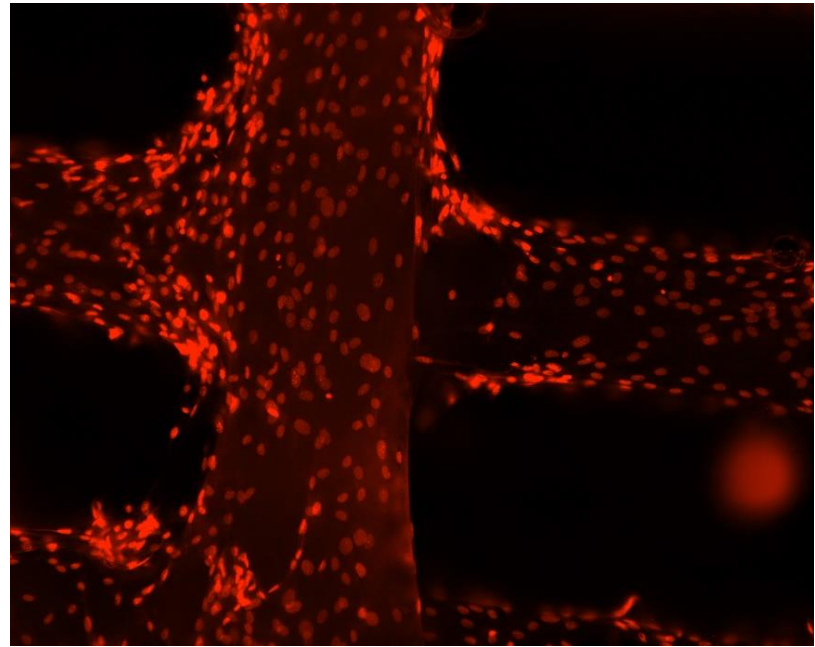


Figure 9-13 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

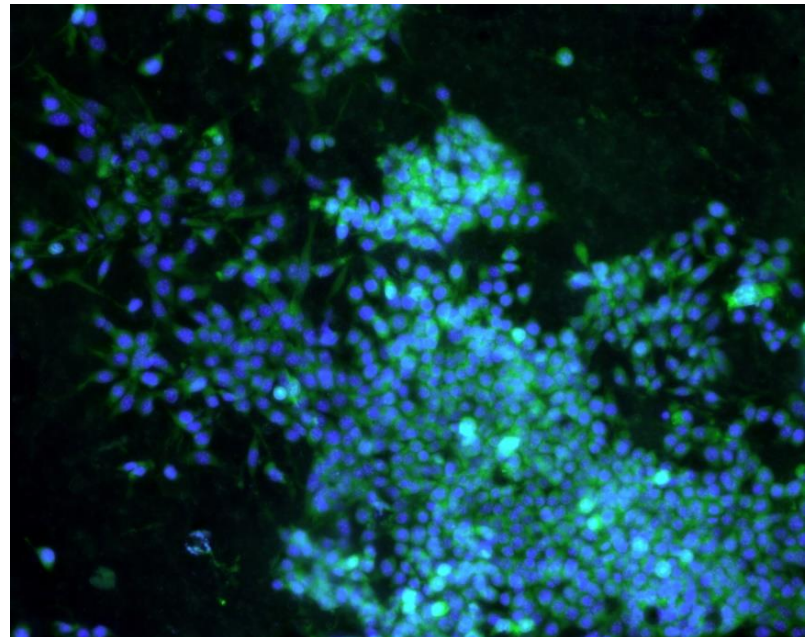
Obarvení buněčných jader – DAPI



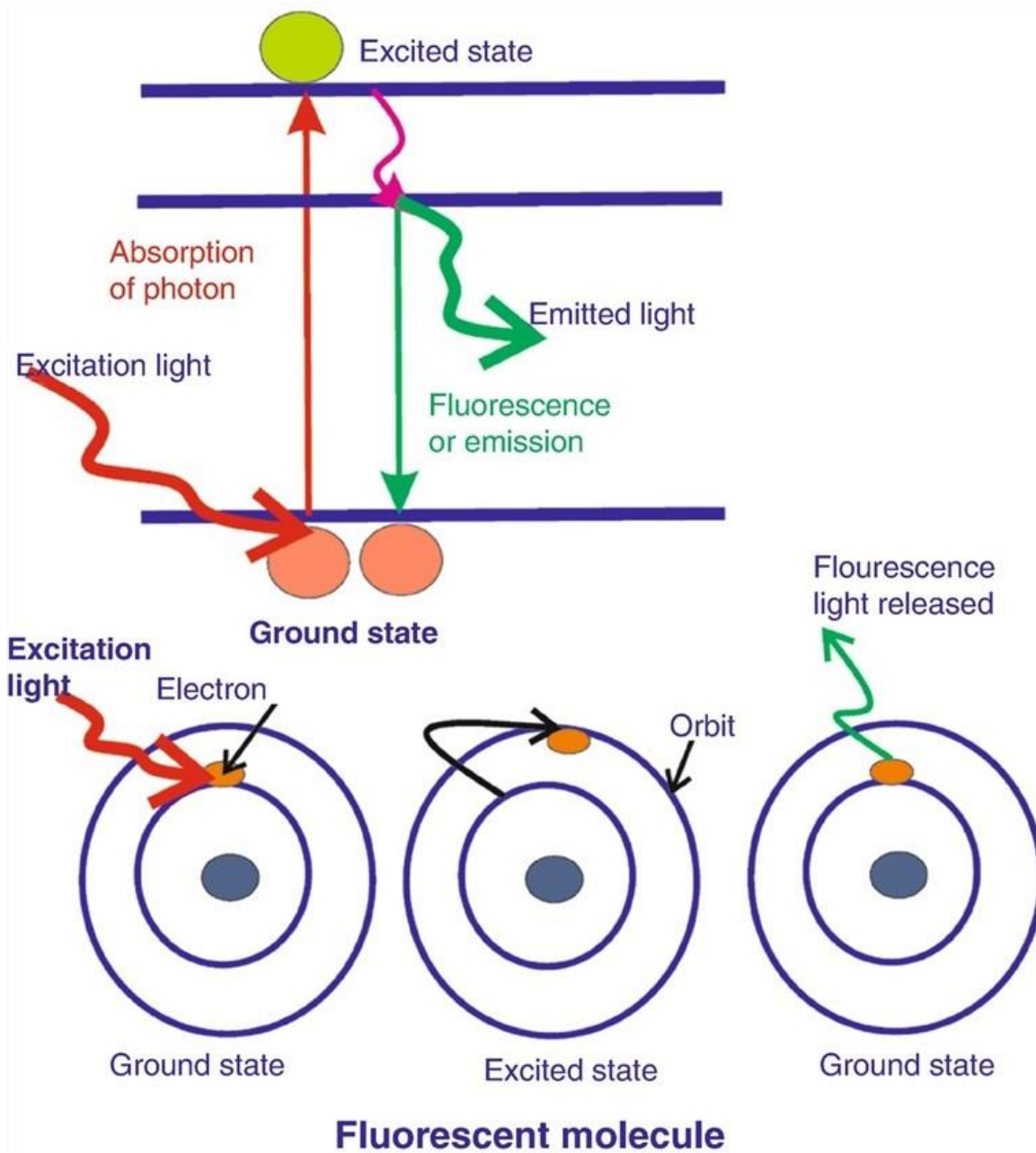
Obarvení buněčných jader – PI



Kombinace barvení jader a
aktinových filament (cytoplazmy):
DAPI+phalloidin-FITC



Fluorescenční barvivo	Zobrazovaná struktura	Excitační vlnová délka	Emisní vlnová délka
Propidium jodid (PI)	Buněčné jádro (vazba na DNA, RNA)	535 nm	617 nm (červená)
4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI)	Buněčné jádro (vazba na DNA)	358 nm	461 nm (modrá)
Phalloidin-fluorescein isothiokyanát (FITC)	Aktinová vlákna cytoskeletu	495 nm	520 nm (zelená)



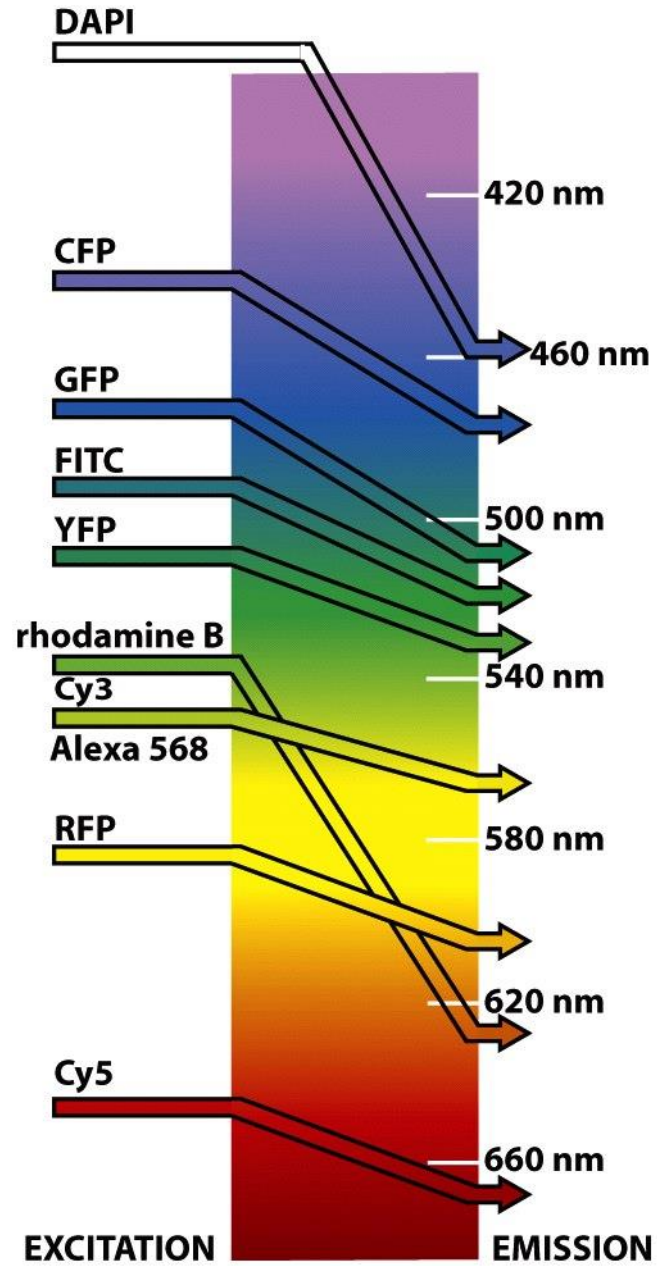
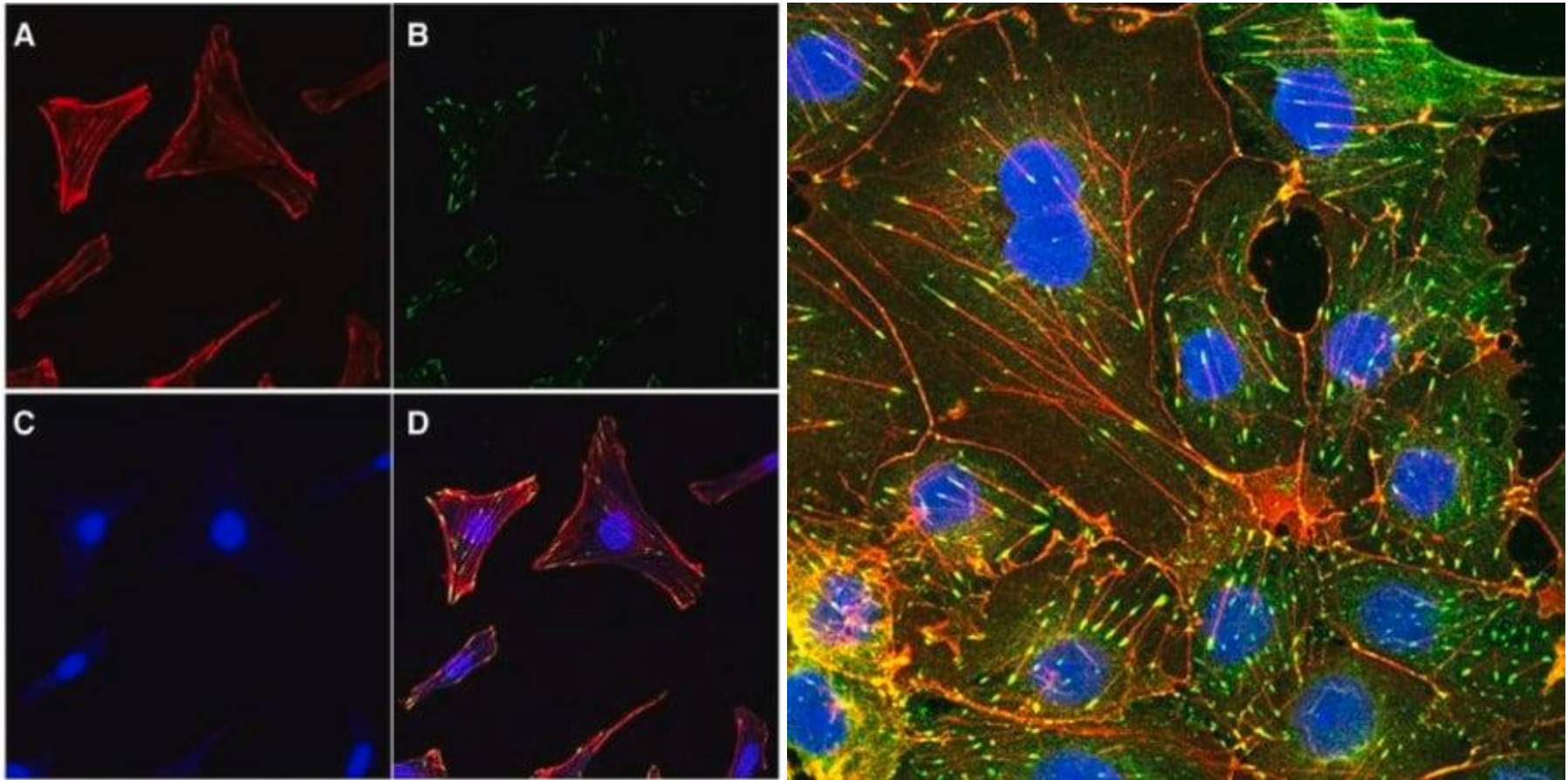


Figure 9-14 *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)



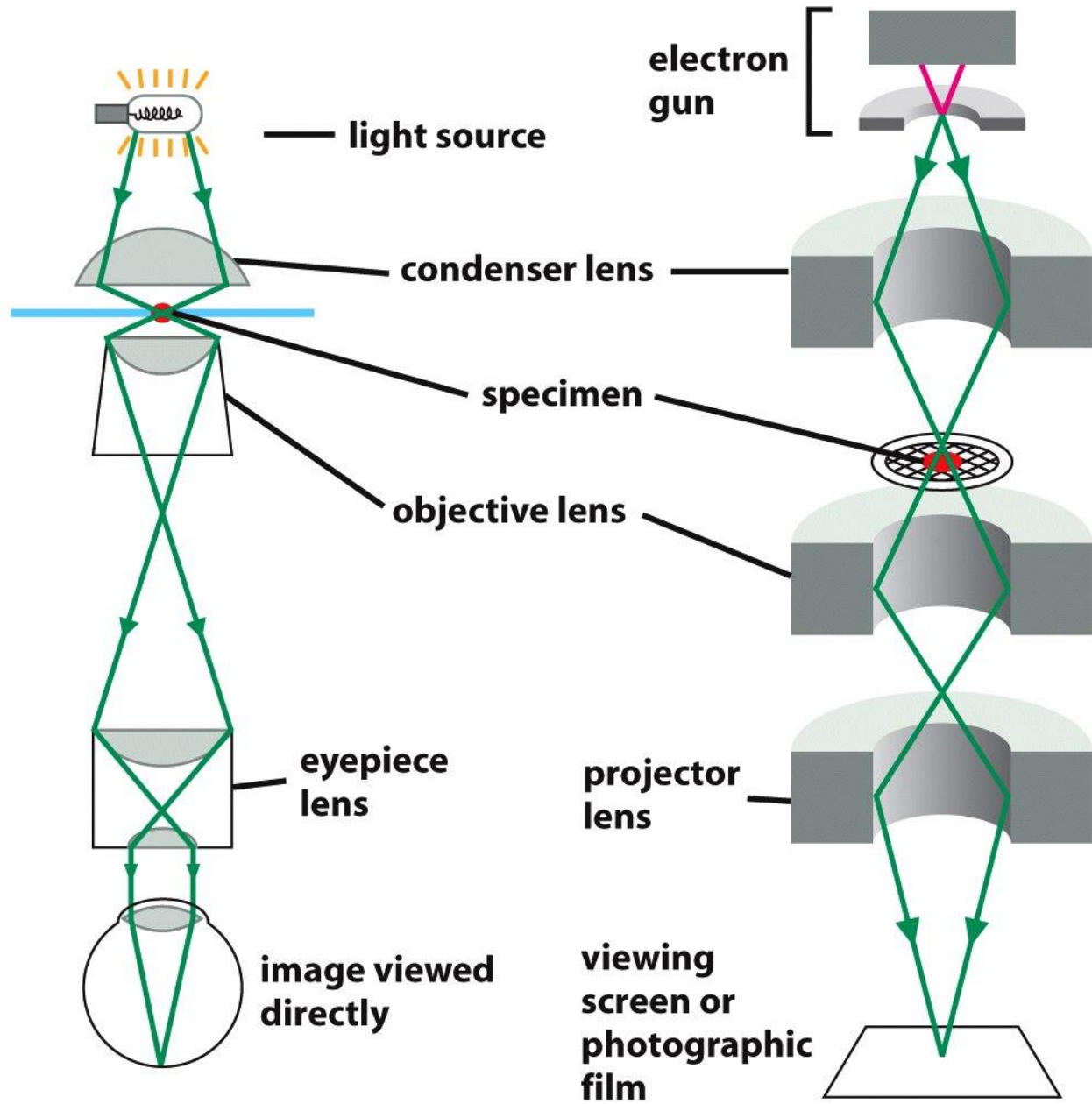
- A – phalloidin-TRITC – aktinový vlákna
- B – anti-vinkulin - fokální adheze
- C – DAPI – buněčná jádra
- D – souhrnné barvení

Použito stejné barvení u jiného typu buněk

Elektronový mikroskop

- Vynalezen ve 30. letech 20. století
- Pro zobrazení je využit proud elektronů ve vakuu
- Záporně nabitě elektrony – možnost urychlení elektrickým napětím
- Skenovací elektronová mikroskopie
- Transmisní elektronová mikroskopie

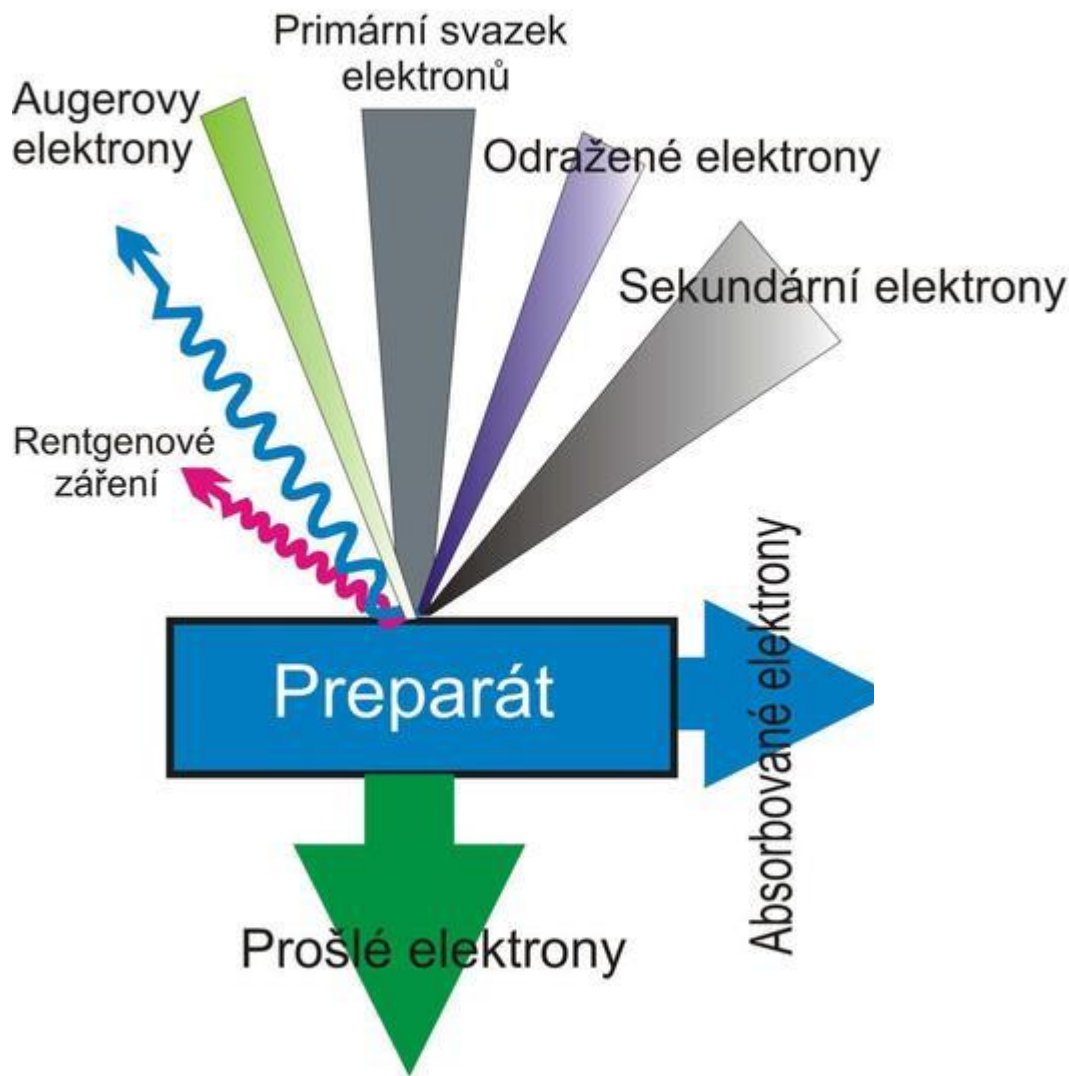
OM



TEM

Figure 9-42 (part 1 of 2) *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

Interakce elektronů s preparátem



Skenovací elektronová mikroskopie

- Pozorování povrchů objektů
- Detekce sekundárních (SE) / zpětně odražených elektronů (BSE)
- Velká hloubka ostrosti
- Urychlovací napětí 0,1-30 kV
- Pozorování struktury scaffoldu, porůstání povrchu buněk tkáňového nosiče (nelze rozlišit jednotlivé buňky)

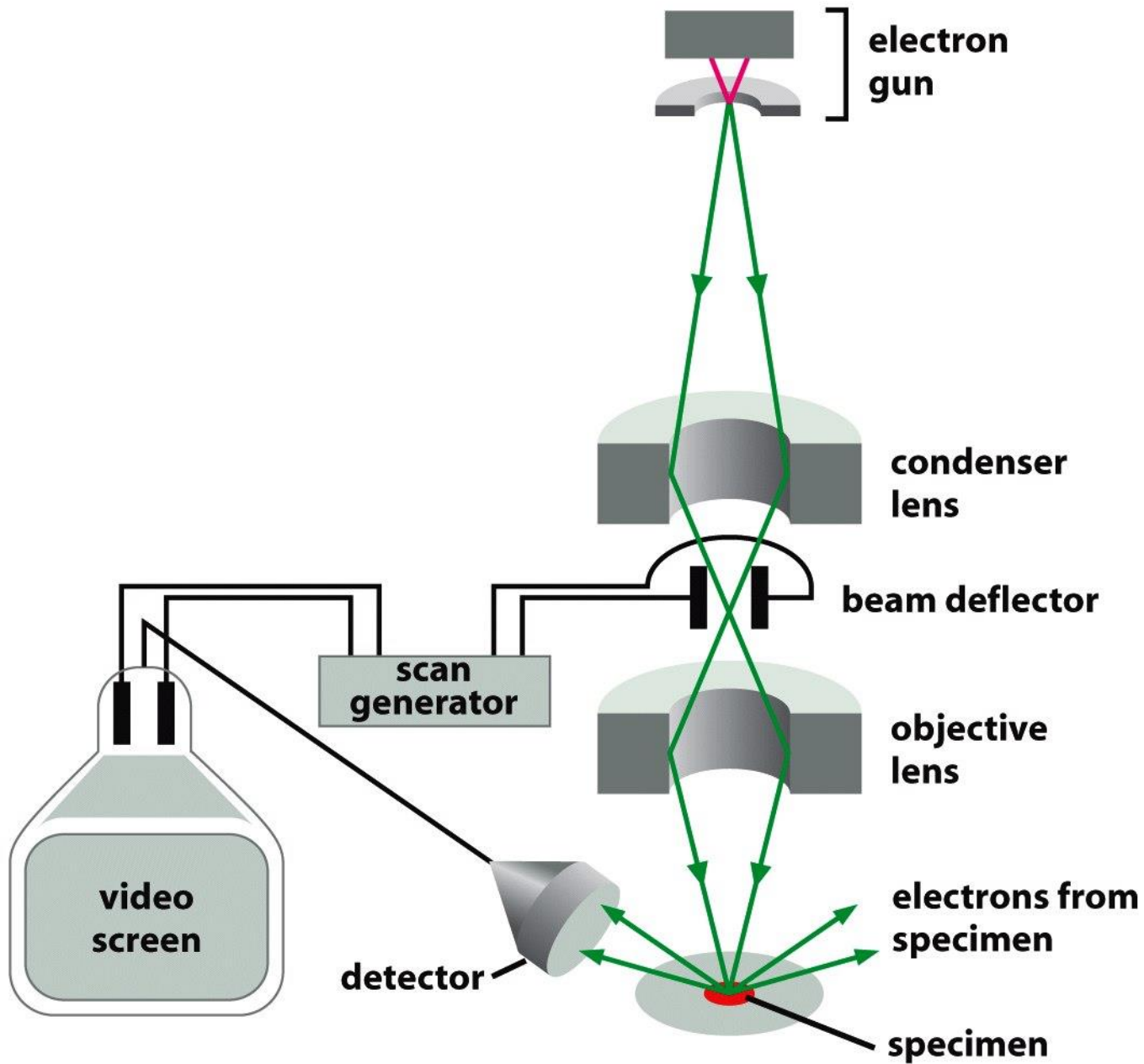
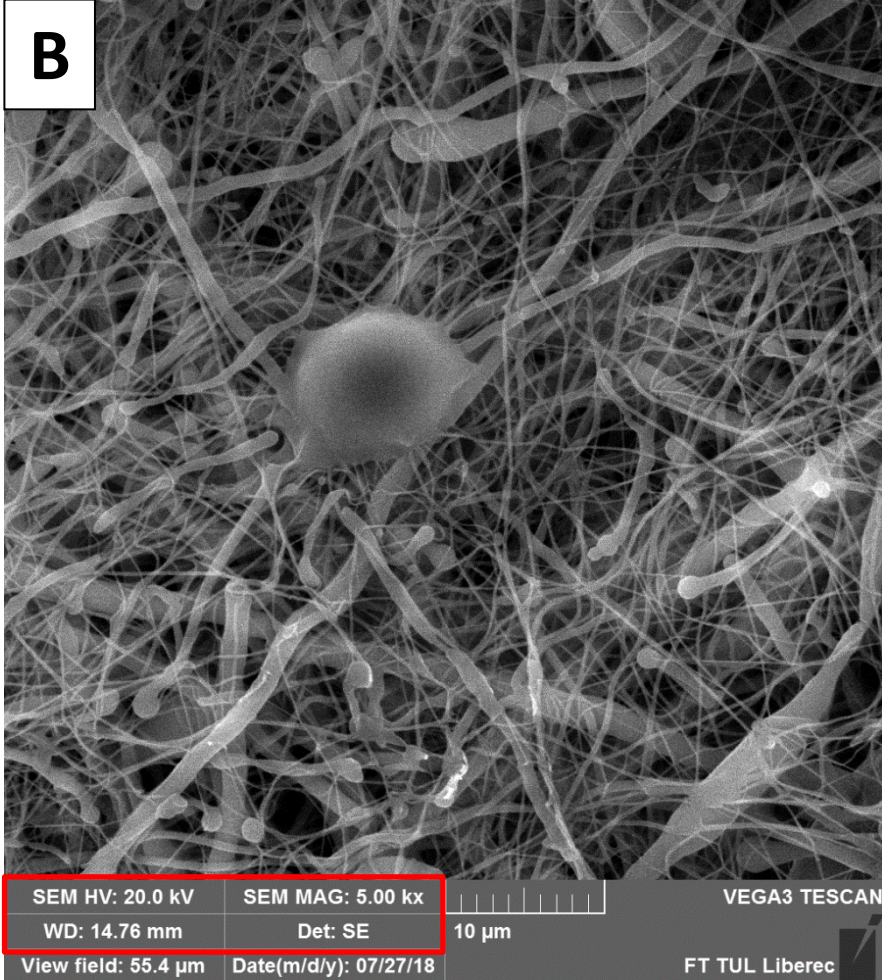
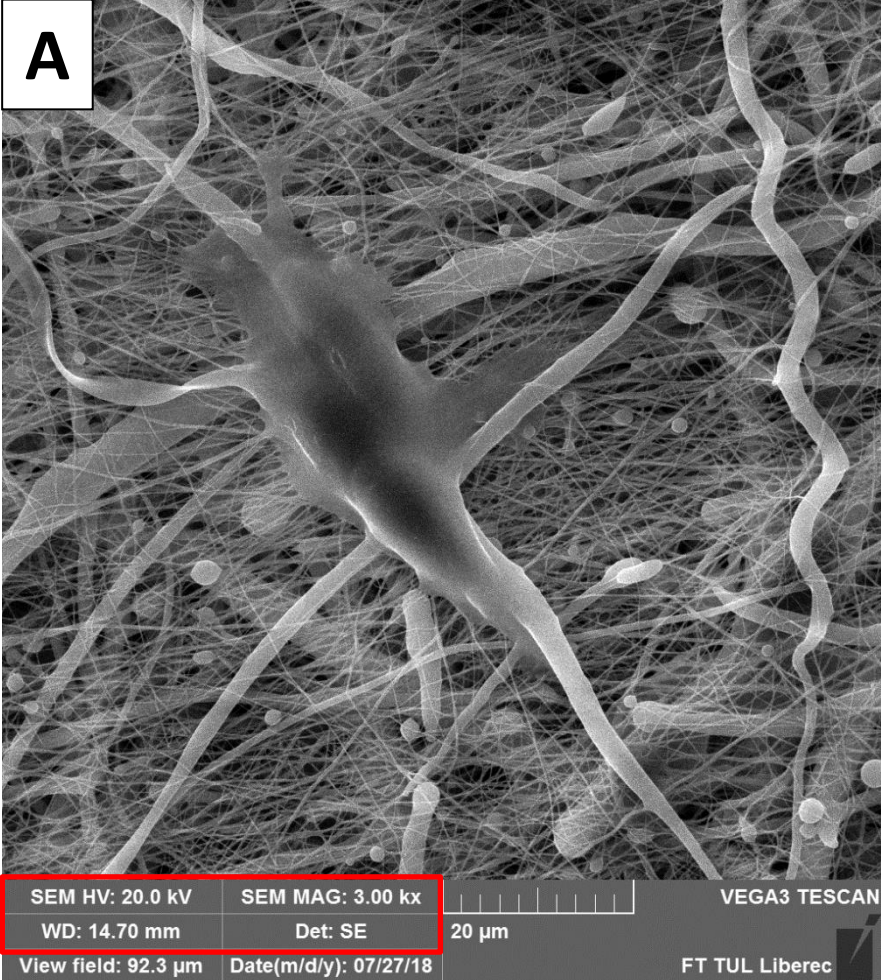


Figure 9-49 (part 1 of 2) *Molecular Biology of the Cell* (© Garland Science 2008)

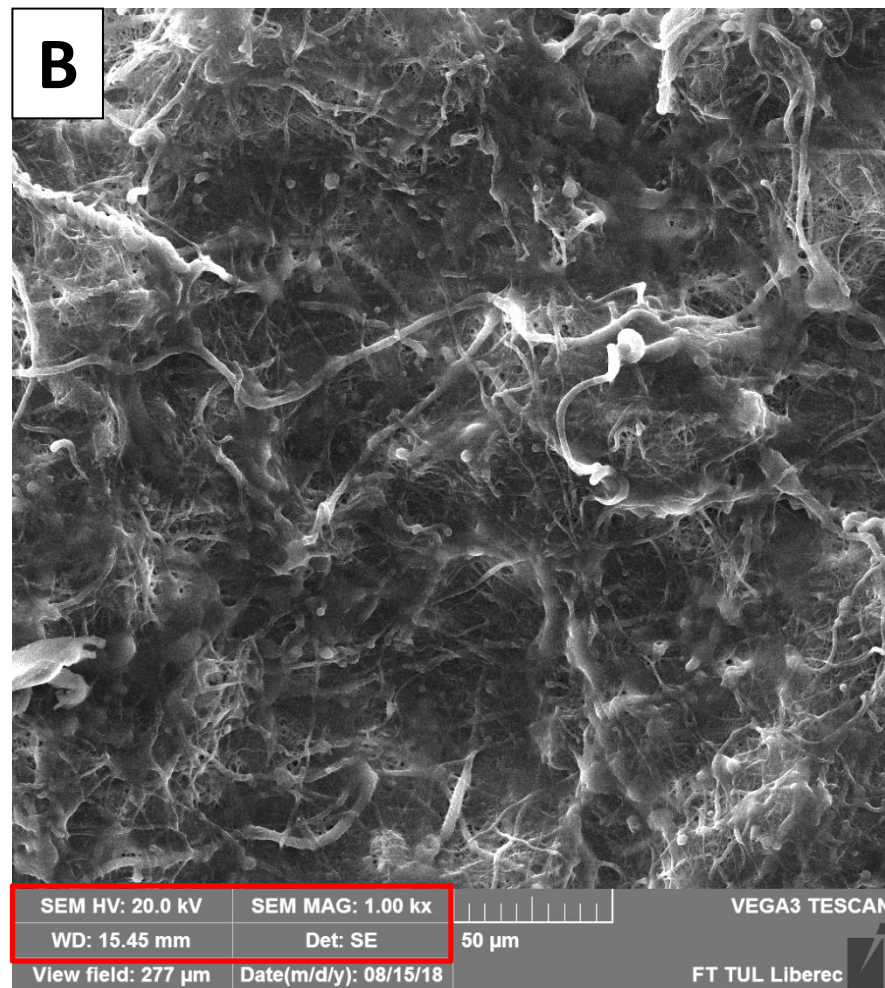
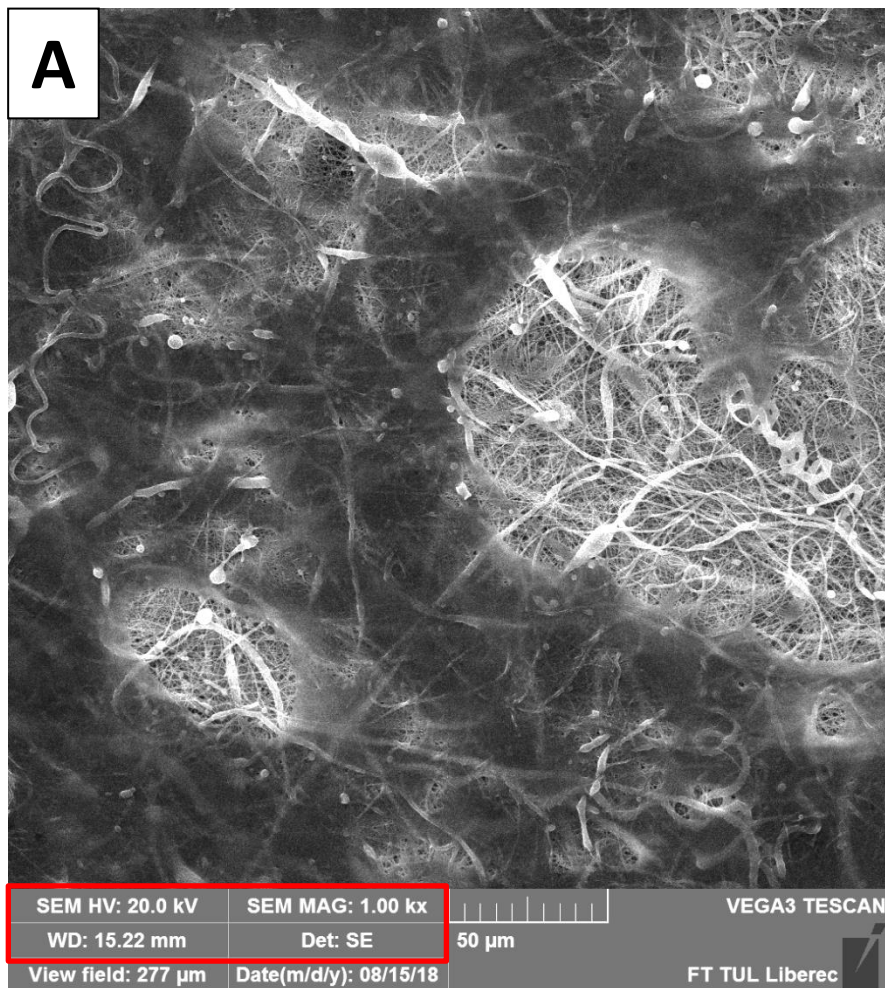
Skenovací elektronová mikroskopie

- Příprava vzorků s buňkami: fixace (glutaraldehyd) → odvodnění
- Před pozorováním je nutné zvýšení povrchové vodivosti (potažení vrstvou kovu – Au, Pt)
- Často možnost detekce prvkového složení pomocí energiově dispersního analyzátoru (EDS) – detekce rtg záření

Fibroblast po 24 hodinách na nanovláknenném scaffoldu – rozprostřený (A), zakulacený (B).



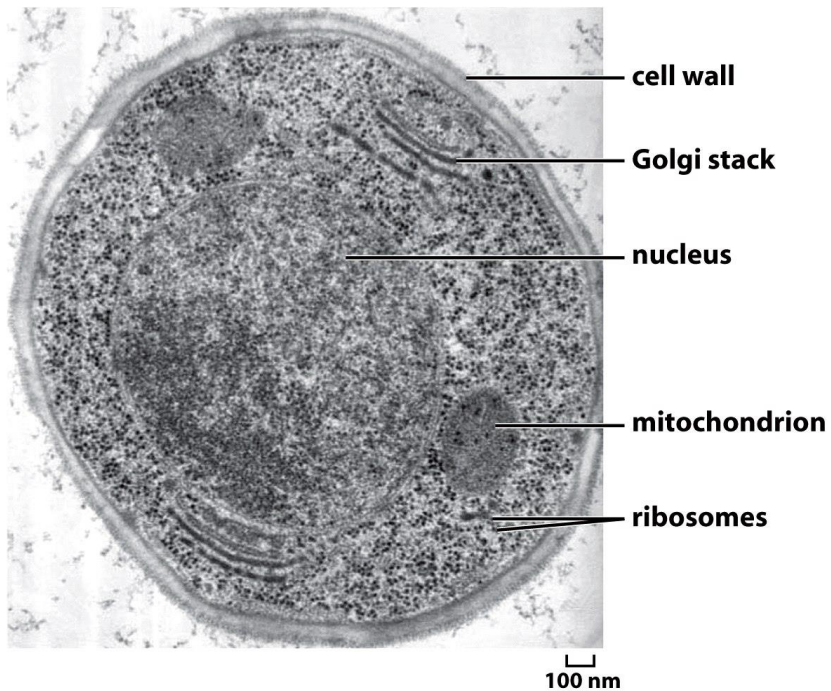
Fibroblast po 14 dnech kultivace na nanovláknenném scaffoldu – částečná pokrytí povrchu scaffoldu (A), plné pokrytí povrchu scaffoldu (konfluence) (B).



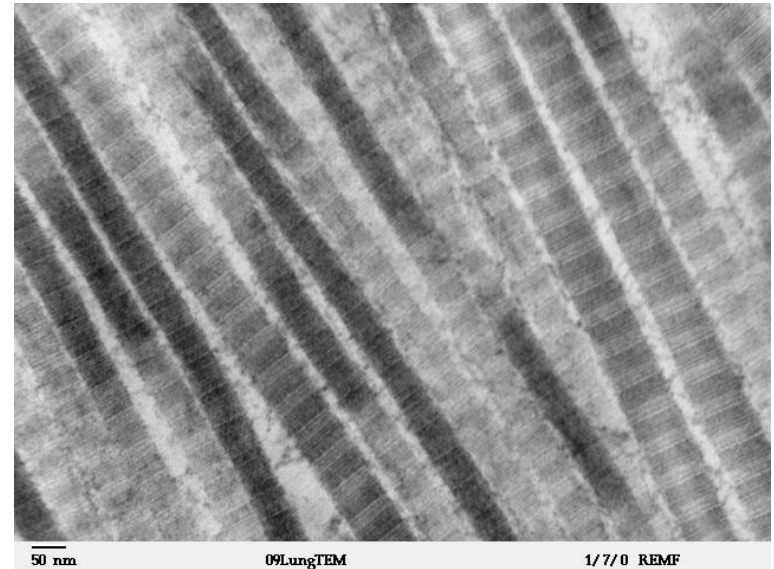
Transmisní elektronová mikroskopie

- Zobrazení struktury pomocí detekce prošlých elektronů
- Urychlovací napětí 100-400 kV
- Speciální příprava vzorků – ultratenké řezy (10-500 nm)
- Umožňuje pozorování detailů buněk
- Využití pro analýzu materiálů

Řez buňkou



Struktura kolagenních vláken



Dostupné z:

https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Fibers_of_Collagen_Type_I_-_TEM.jpg (7.2.2024)

Shrnutí = zkouškové otázky

- **Optická mikroskopie** – procházející světlo / tmavé pole / fázový kontrast / inverzní / konfokální / fluorescenční mikroskopie
- **Elektronová mikroskopie** – skenovací / transmisní

Diskuse

Které mikroskopické metody jsou využitelné spíše pro pozorování buněk a které jsou výhodnější pro materiálovou analýzu?

Úkol 1

Seřadte mikroskopické metody podle rozlišovací schopnosti:

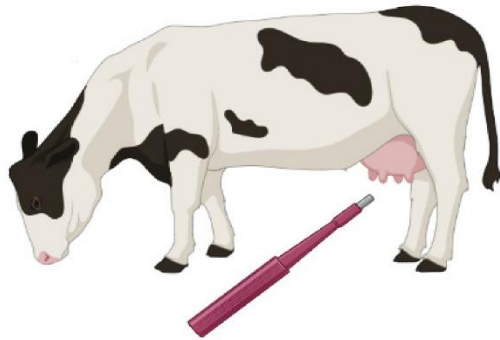
- Fluorescenční mikroskopie
- Skenovací elektronová mikroskopie
- Optická mikroskopie
- Transmisní elektronová mikroskopie

Domácí úkol

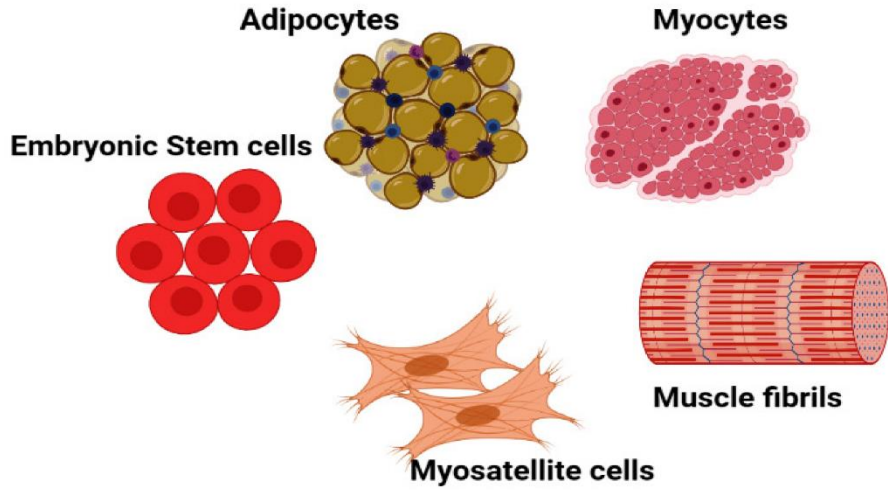
- Z čeho je složené maso?
- Lze vytvořit maso in vitro = „ve zkumavce“
(v laboratorních podmínkách)



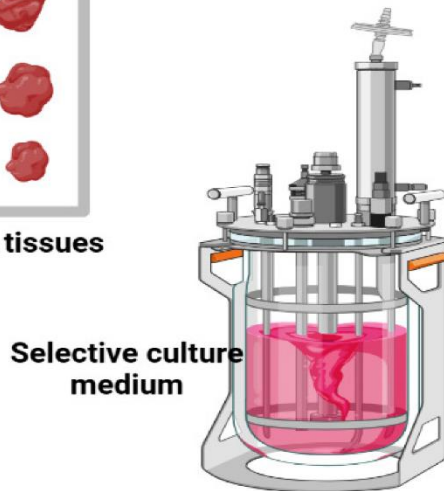
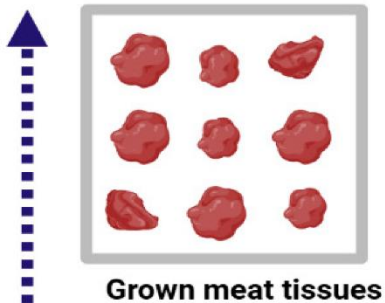
1. Harvest of cells through biopsy from live animal



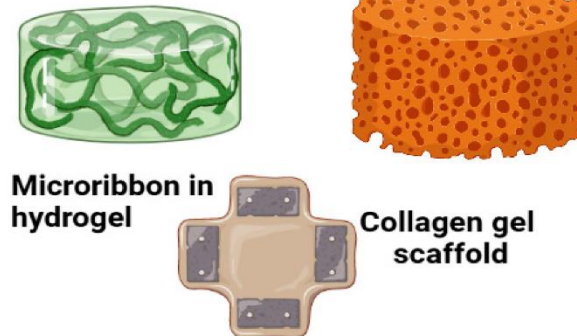
2. Selection of different types of cells from the host



5. Lab cultured meat

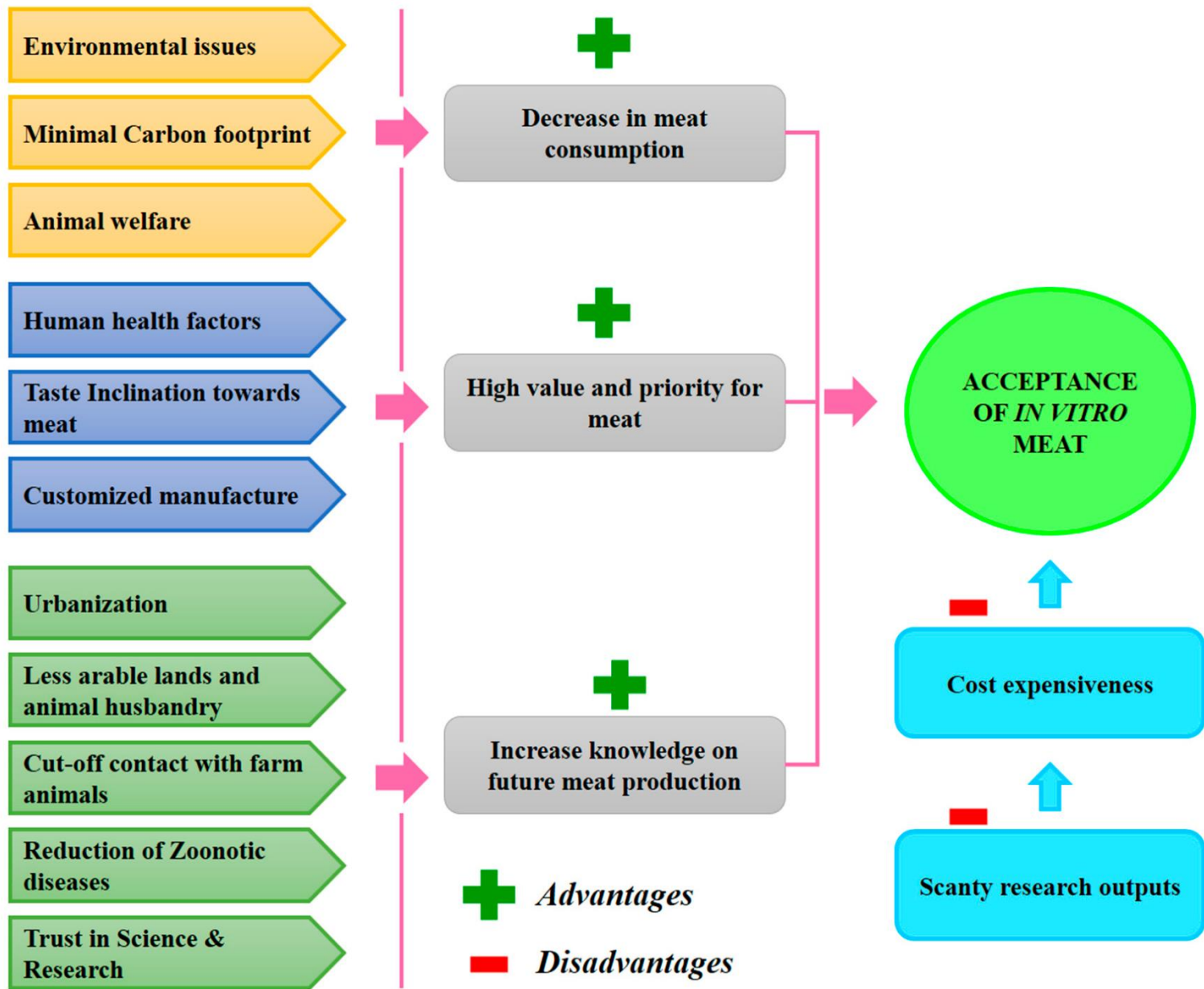


3. Scaffolding techniques



4. Culture in suspension bioreactor for continuous cell culture

3. Scaffolding techniques



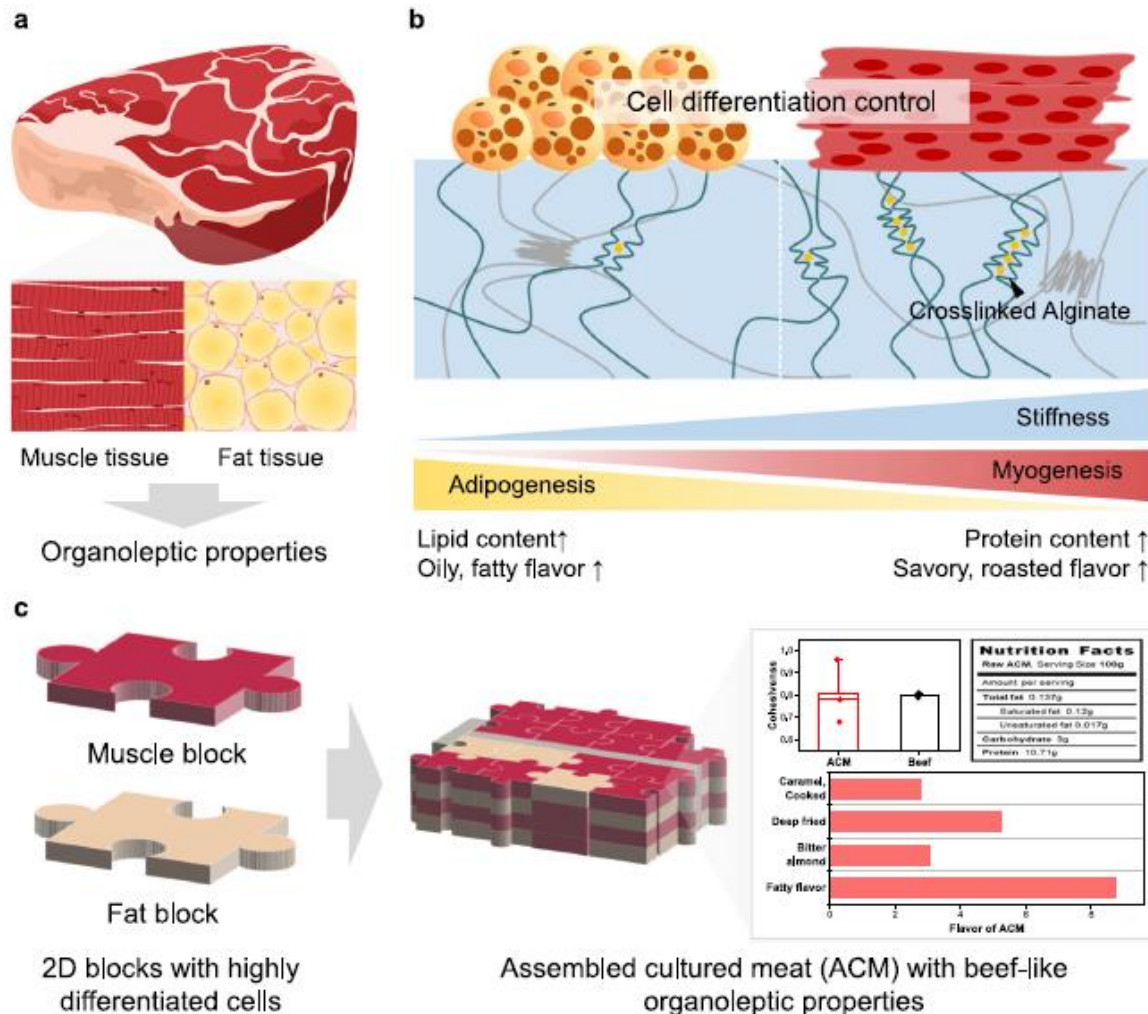


Fig. 1 | Schematic illustration of the proposed strategy. a Muscle and fat tissues consisting slaughtered beef determine the organoleptic properties of beef. b Scaffold engineering for controlling myogenesis and adipogenesis affects the

nutritional and sensorial properties of cultured meat. c Assembled cultured meat composed of the 2-dimensional meat blocks with highly differentiated cells owns beef-like organoleptic properties.