

Το οπτικό μικροσκόπιο



Zeiss, Stativ 1, 1857



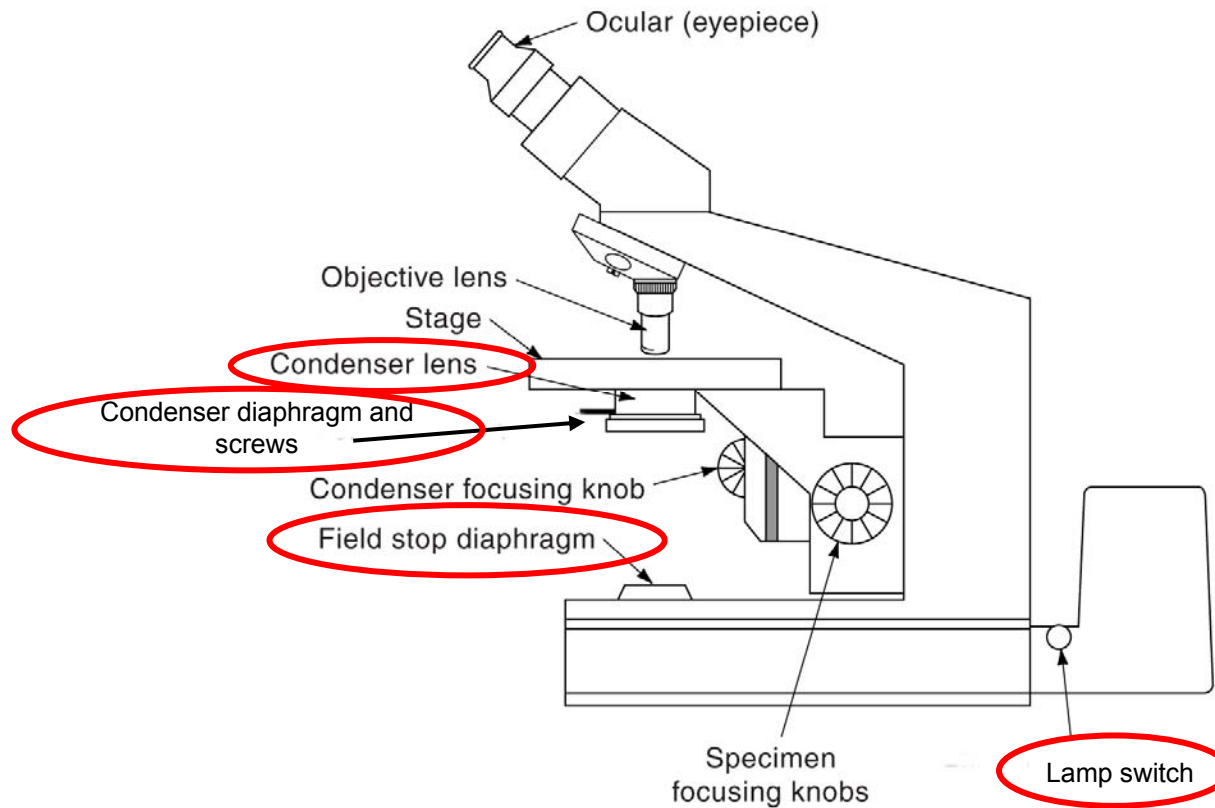
Zeiss, Axiovert 200, 2006

Φωτισμός του δείγματος



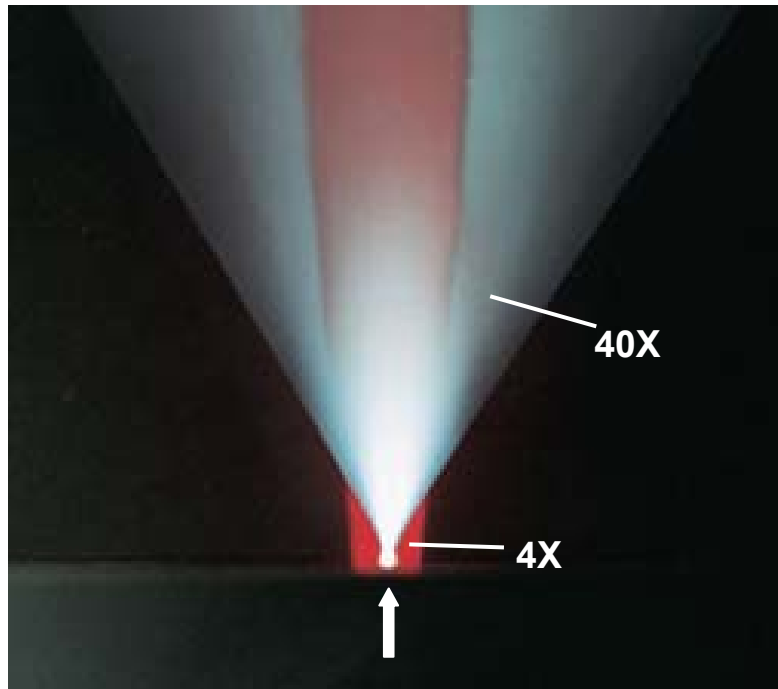
Διατάξεις φωτισμού του δείγματος στο σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο

Κλασικό μικροσκόπιο



Βέλτιστος φωτισμός του δείγματος

- Ομοιογενής φωτισμός του δείγματος



- Μεγαλύτερη μεγέθυνση = μεγαλύτερο εύρος πεδίου και απαιτείται εντονότερος φωτισμός

- «Επιπλέον» φως εκτός οπτικού πεδίου μειώνει τη ικανότητα παρατήρησης λόγω εσωτερικών ανακλάσεων

- Απαιτείται ισορροπία μεταξύ ικανής έντασης φωτός (intensity) και βέλτιστης αντίθεσης εικόνας (contrast)

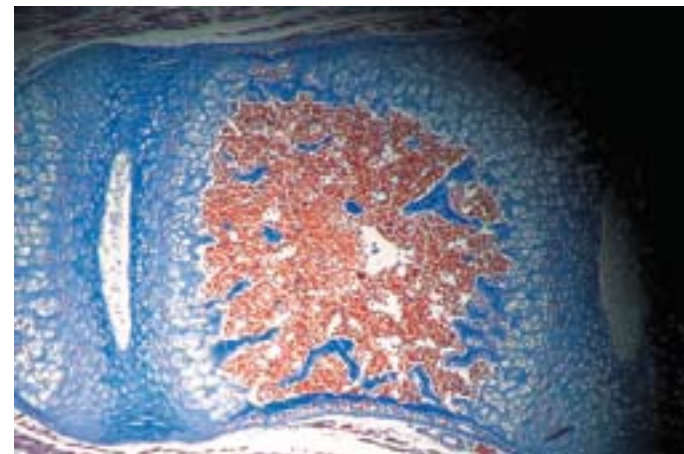
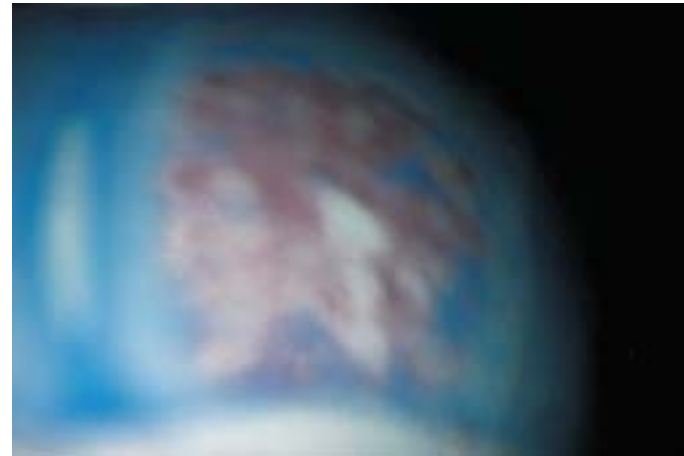
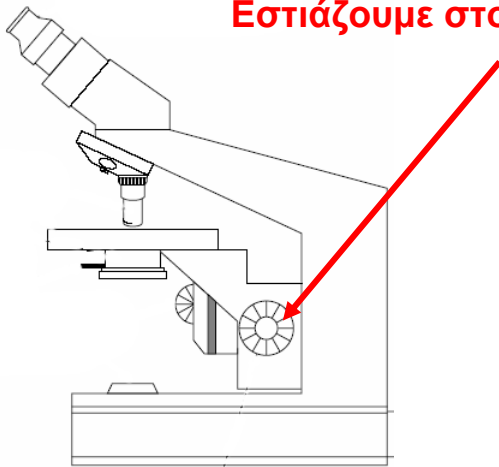
Ο φωτισμός του δείγματος στο οπτικό μικροσκόπιο ρυθμίζεται από τον πυκνωτή (condenser) και το διάφραγμα πεδίου (field stop diaphragm)

Επίτευξη βέλτιστου φωτισμού του δείγματος (Φωτισμός Köhler)

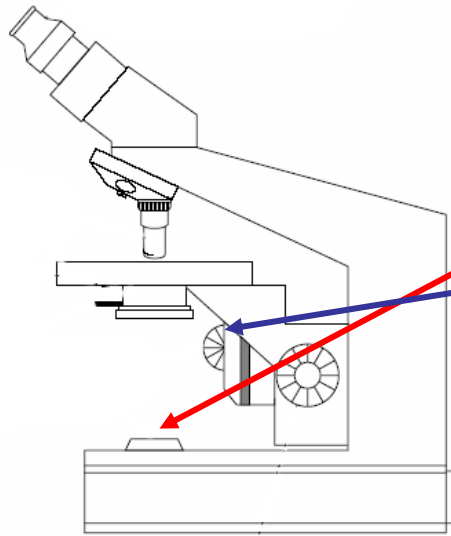
- Ο August Köhler (καθηγητής και από τους πρώτους εργαζόμενους στην εταιρία Zeiss στη Γερμανία) ανέπτυξε την τεχνική που πήρε το όνομα του για να επιτυγχάνεται ο πλέον ομαλός φωτισμός του δείγματος και η καλύτερη δυνατή παρατήρηση
- Με τον φωτισμό Köhler πετυχαίνουμε να έχουμε τόσο φως ώστε να μην προκαλεί εσωτερικές ανακλάσεις που μειώνουν την αντίθεση και ταυτόχρονα ιδανική τοποθέτηση του πυκνωτή ώστε με την ρύθμιση του διαφράγματος του να επιτυγχάνουμε ιδανική σχέση αντίθεσης – διακριτικής ικανότητας

Πετυχαίνοντας φωτισμό Köhler (στάδιο 1)

Αρχική εικόνα χωρίς φωτισμό Köhler
Εστιάζουμε στο παρασκεύασμα

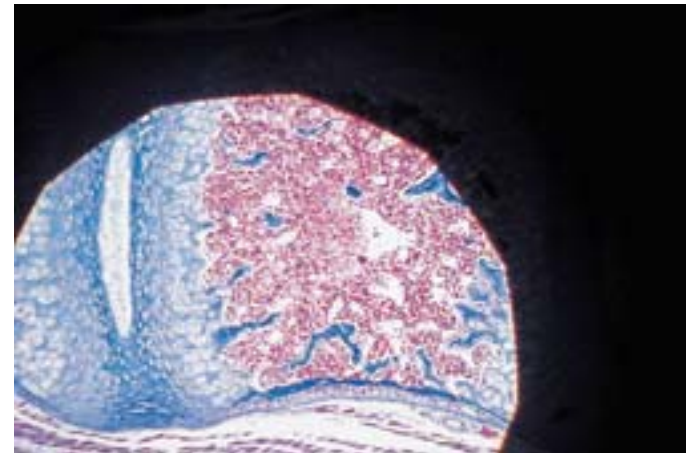


Πετυχαίνοντας φωτισμό Köhler (στάδιο 2)

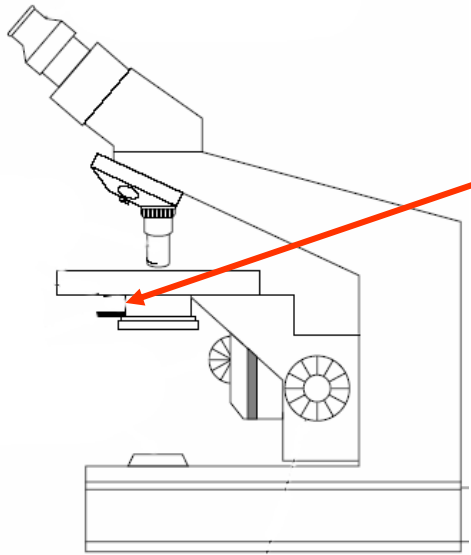


Κλείνουμε το διάφραγμα πεδίου αρκετά ώστε να σκοτεινιάσει το πεδίο αλλά να εξακολουθούμε να βλέπουμε το παρασκεύασμα

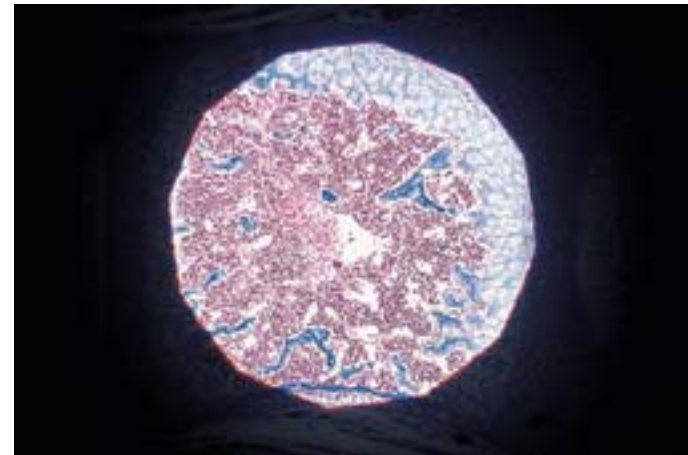
Κινούμε τον πυκνωτή πάνω-κάτω ώστε να δούμε καθαρή εικόνα



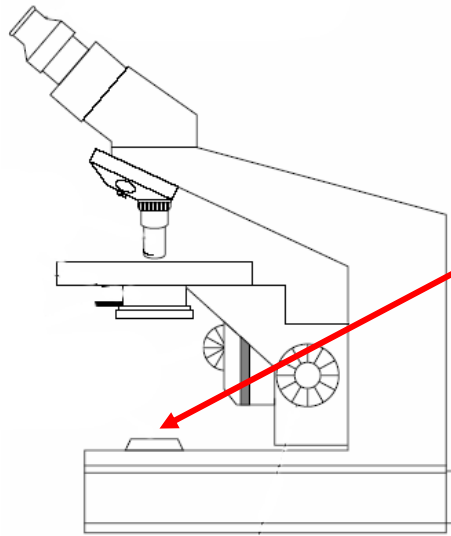
Πετυχαίνοντας φωτισμό Köhler (στάδιο 3)



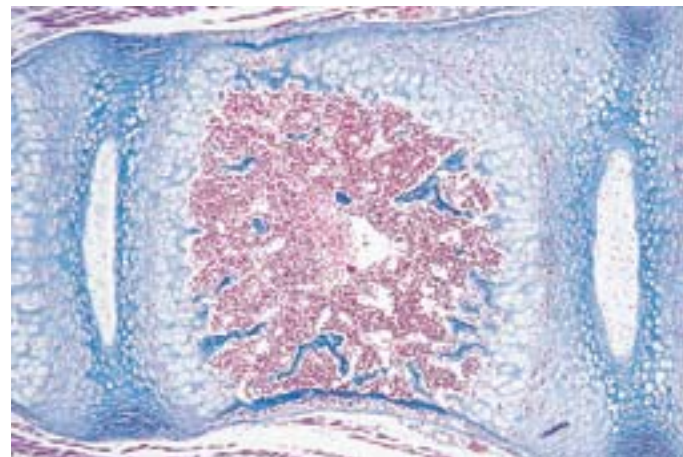
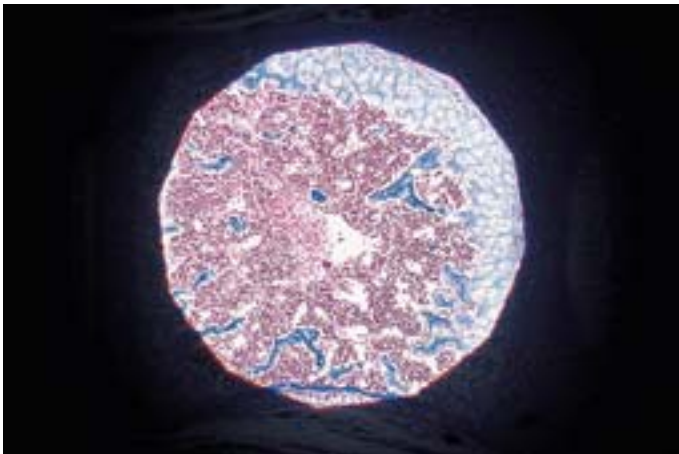
Χρησιμοποιώντας τις βίδες
προσανατολισμού του πυκνωτή
φέρνουμε την εικόνα του διαφράγματος
στο κέντρο της εικόνας



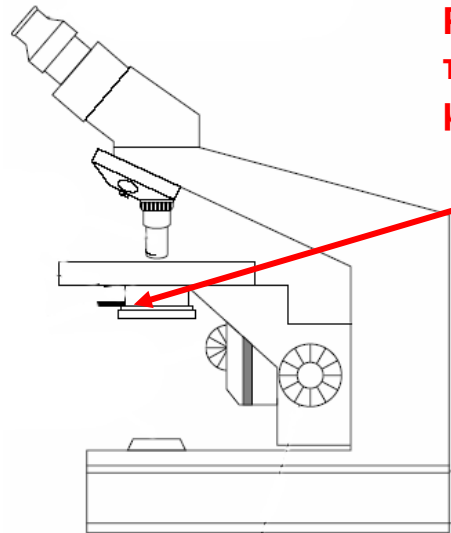
Πετυχαίνοντας φωτισμό Köhler (στάδιο 4)



Ανοίγουμε το διάφραγμα πεδίου όσο απαιτείται ώστε να βλέπουμε ολόκληρο το οπτικό πεδίο

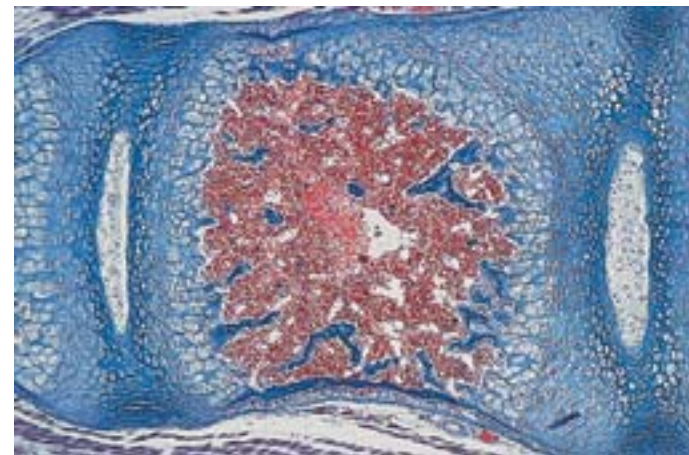
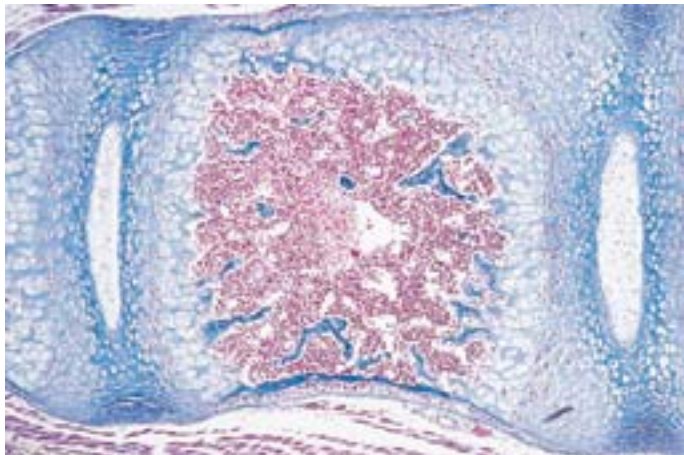


Πετυχαίνοντας φωτισμό Köhler (τελικό στάδιο: αντίθεση)



Ρυθμίζουμε το διάφραγμα του πυκνωτή ώστε να επιτύχουμε μέγιστη αντίθεση

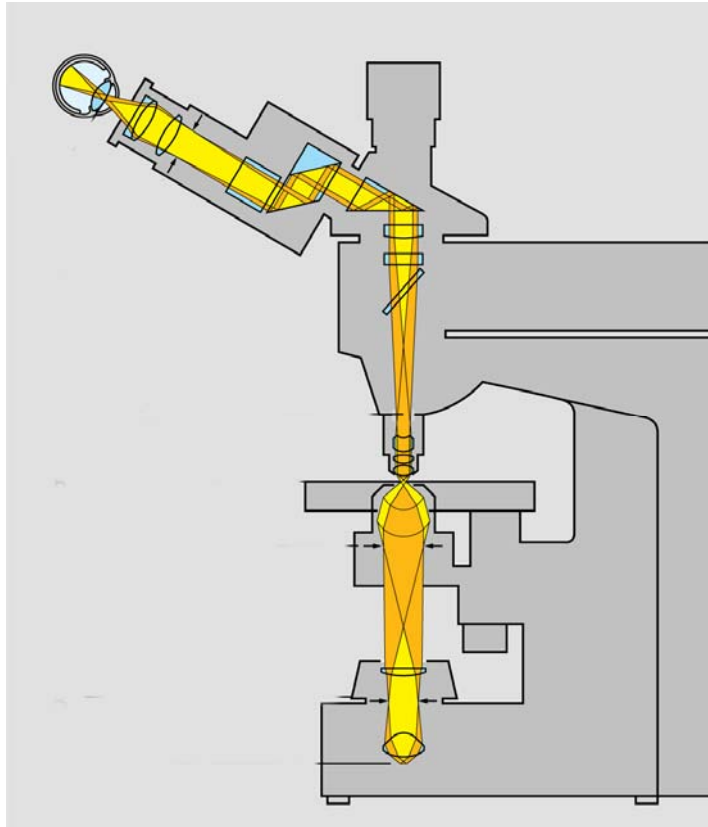
Το μικροσκόπιο διαθέτει φωτισμό Köhler



Πετυχαίνοντας φωτισμό Köhler

- Επιλογή της κατάλληλης μεγέθυνσης
 - Εστίαση στο παρασκεύασμα
- Ρύθμιση φωτεινότητας (διάφραγμα φωτεινού πεδίου)
- Ρύθμιση αντίθεσης (διάφραγμα πυκνωτή)

Παρατήρηση αντικειμένων στο οπτικό μικροσκόπιο



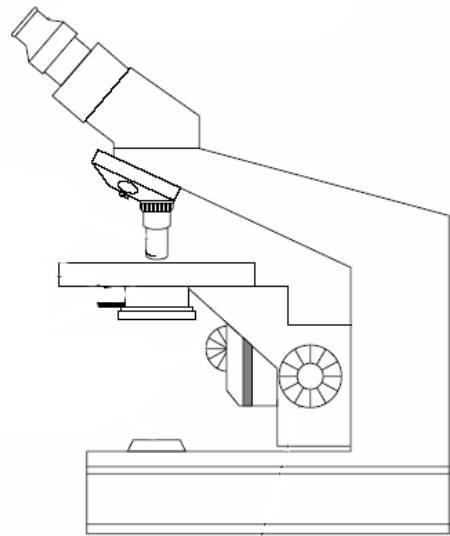
Σημαντικές παράμετροι

1. Διακριτικό όριο (d)
2. Ωφέλιμη μεγέθυνση
3. Επιδιόρθωση οπτικών σφαλμάτων
4. Φωτεινότητα εικόνας (I)
5. Αντίθεση εικόνας (C)

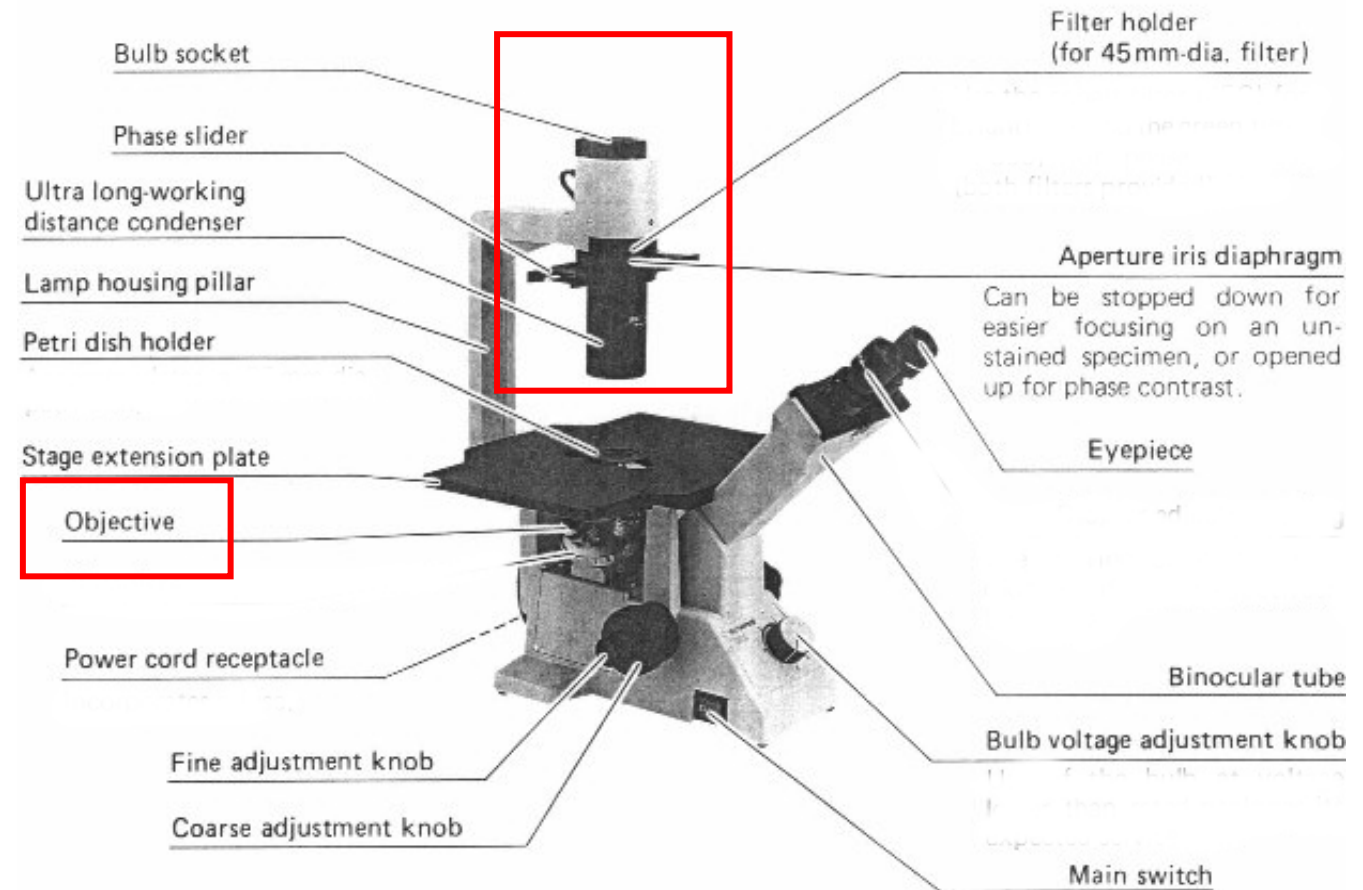
Οπτικές διατάξεις

1. Αντικειμενικός φακός
2. Αντικειμενικός και προσοφθάλμιος φακός
3. Αντικειμενικός και ενδιάμεσος ή προσοφθάλμιος φακός
4. Διάφραγμα φωτεινού πεδίου
5. Διάφραγμα πυκνωτή

Ανάστροφο μικροσκόπιο (Inverted microscope)

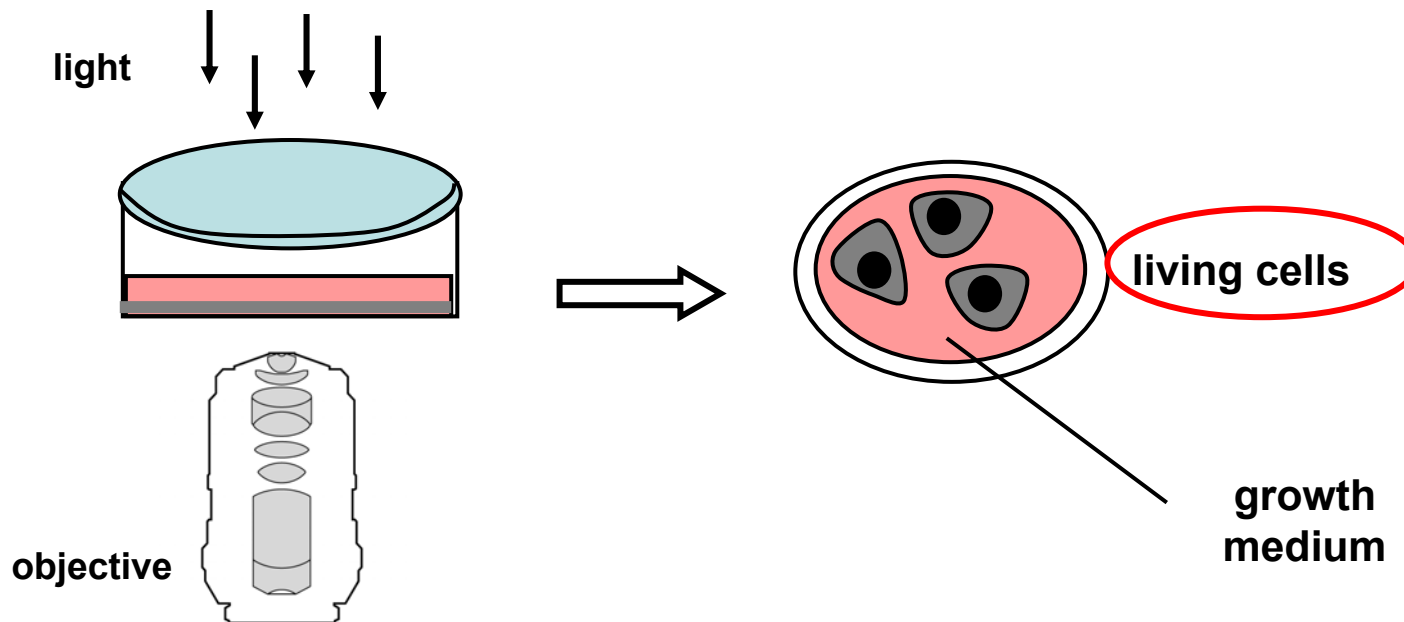


Κλασικό
μικροσκόπιο (upright
microscope)

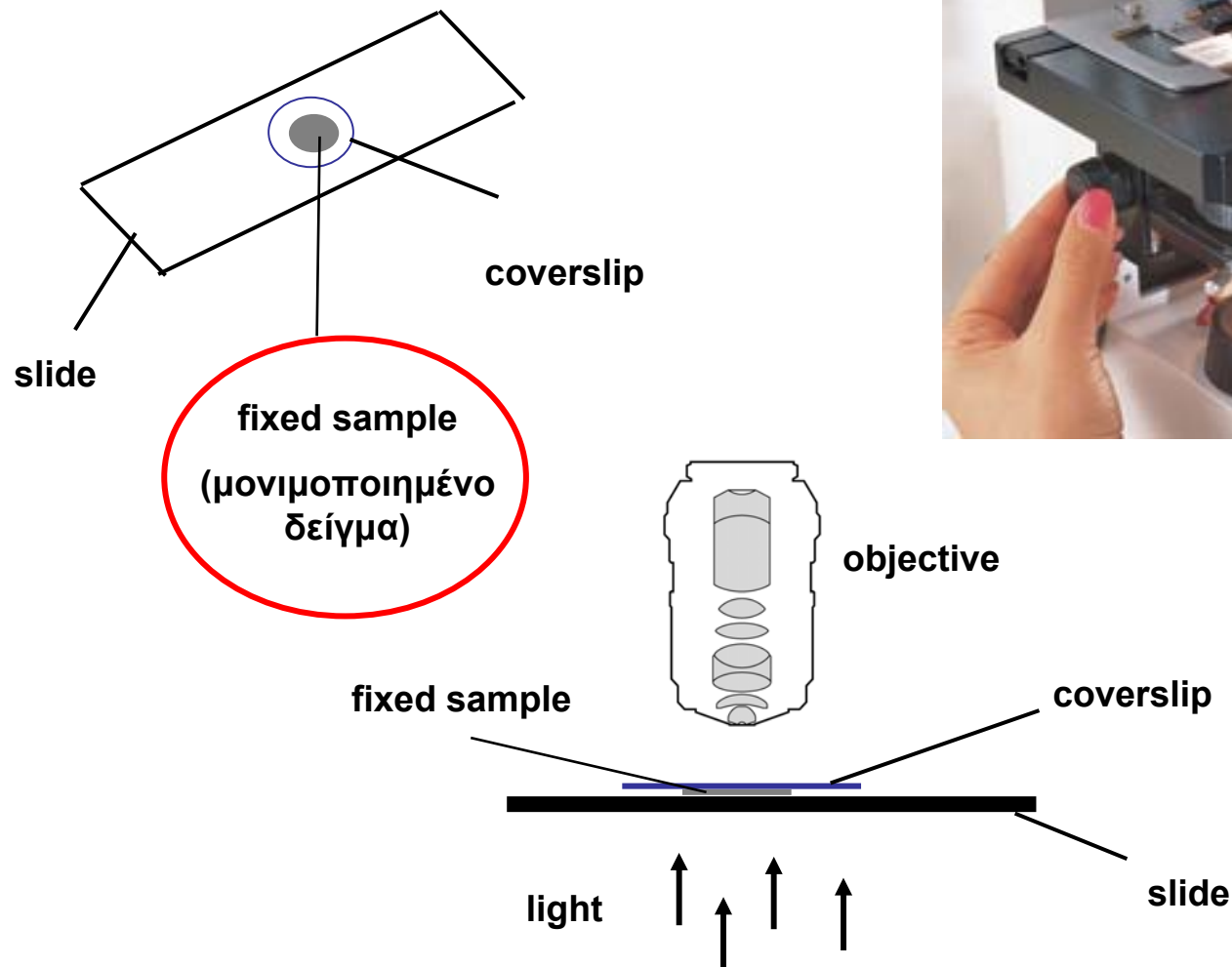


Παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο

Επιτρέπει την παρατήρηση δειγμάτων ζωντανών κυττάρων τα οποία μεγαλώνουν στον πυθμένα του δοχείου (flask, petri dish, etc)



Παρατήρηση σε κλασικό μικροσκόπιο



Παρατήρηση βιολογικών δειγμάτων



phase contrast

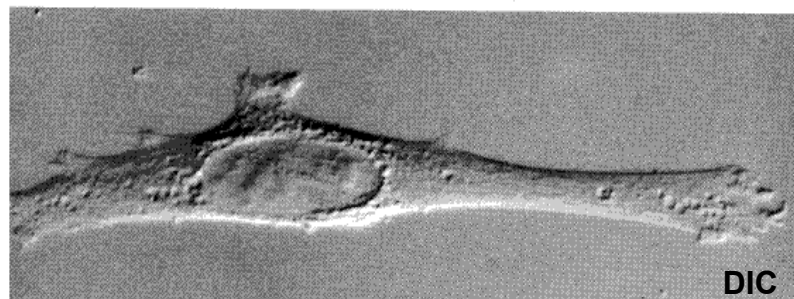
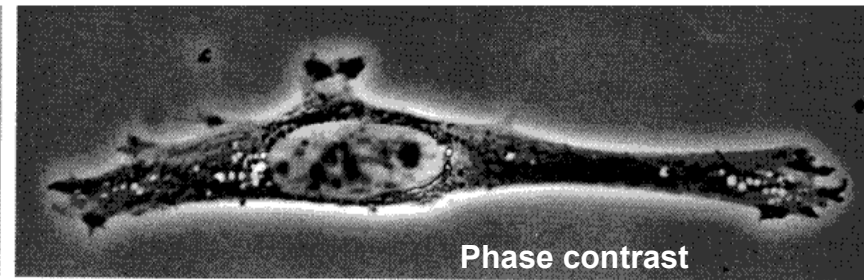
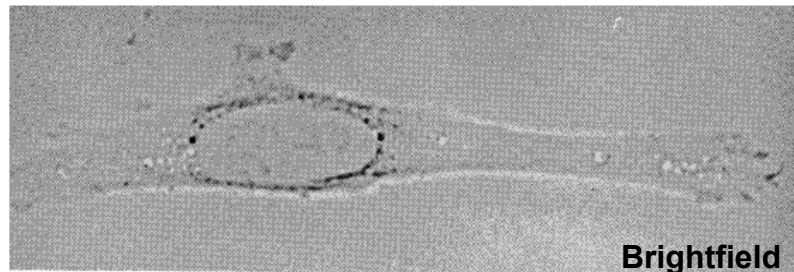
Τα βιολογικά δείγματα (κύτταρα, βακτήρια, ιστοί, κ.ά.) και τα συστατικά τους είναι σχεδόν διαφανή

Για να παρατηρήσουμε βιολογικά δείγματα (ζωντανά ή μονιμοποιημένα) πρέπει να δημιουργήσουμε κατάλληλες συνθήκες αντίθεσης (contrast)

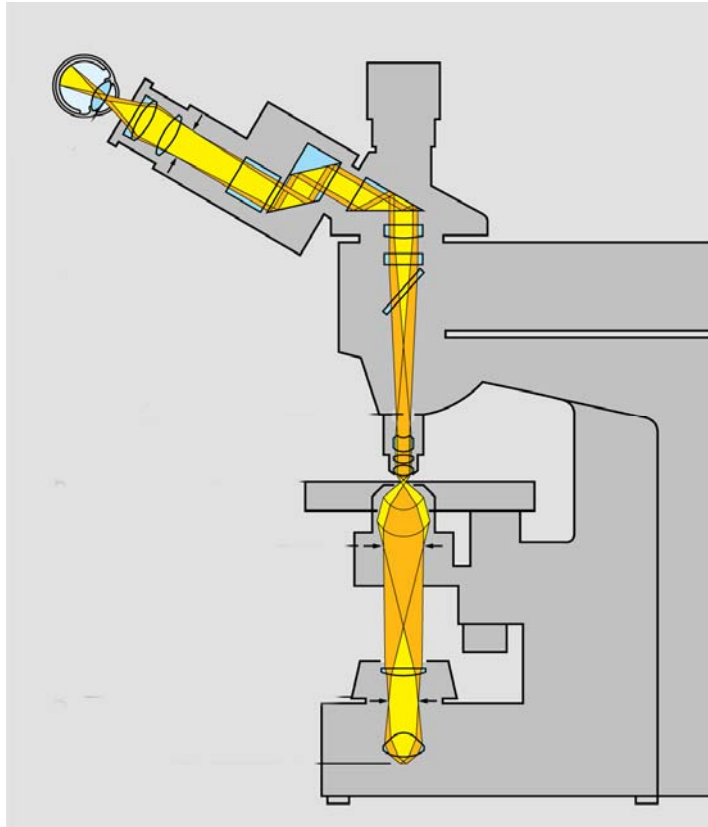
Ανάλογα με την τεχνική αντίθεσης που επιλέγεται, συχνά απαιτείται σήμανση (χρώση) συστατικών του κυττάρου

Τεχνικές δημιουργίας αντίθεσης

- Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου (Brightfield microscopy)
- Μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου (Darkfield)
- Μικροσκοπία αντίθεσης φάσεως (Phase Contrast)
- Μικροσκοπία πολωμένου φωτός (Polarization Contrast)
- Differential Interference Contrast (DIC)
- Μικροσκοπία φθορισμού (Fluorescence Contrast)



Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου (Brightfield microscopy)



Δέσμη φωτός πέφτει στο
παρασκεύασμα, διέρχεται από αυτό και
μέσω της οπτικής οδού του
μικροσκοπίου η εικόνα φτάνει στο
όργανο παρατήρησης (μάτι, camera)

Χαρακτηριστικά της μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου

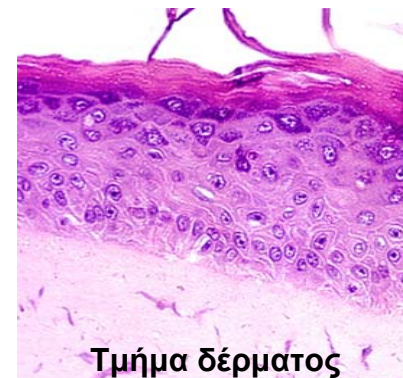
- Τα βιολογικά δείγματα απορροφούν ελάχιστο φως
- Σε φωτεινό υπόβαθρο το μάτι αντιλαμβάνεται διαφορές στην ένταση του φωτός μεγαλύτερες του 10%
- Η διαφορά στην ένταση του διερχόμενου φωτός μεταξύ παρασκευάσματος και υποβάθρου είναι μικρή, συνεπώς η αντίθεση είναι μικρή και το παρασκεύασμα δυσδιάκριτο



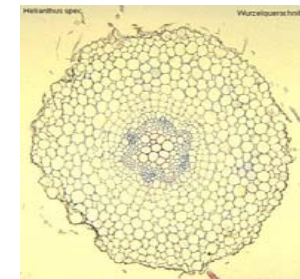
Καλλιέργεια κυτάρων
(Brightfield)

• Για παρατήρηση βιολογικών δειγμάτων σε συνθήκες φωτεινού πεδίου απαιτείται χρώση αυτών

- Με τη χρώση, οπτικά χαρακτηριστικά του δείγματος τα οποία είναι αόρατα για το μάτι μεταφράζονται σε ορατές διαφορές έντασης του φωτός



Τμήμα δέρματος



Κάθετη τομή
ρίζας

Χαρακτηριστικά της μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου

- Η μικροσκοπία φωτεινού πεδίου απαιτεί απλά (μη εξειδικευμένα) μικροσκόπια και χρήστες
 - Εύκολη και φτηνή
- Εφαρμόζεται ευρέως για την παρατήρηση ιστολογικών δειγμάτων (π.χ. βιοψίες)

Βασικά στάδια:

- 1. Παρασκευή ιστολογικών δειγμάτων**
- 2. Χρώση ιστολογικών δειγμάτων**

Παρασκευή ιστολογικών δειγμάτων

1. Μονιμοποίηση

Σταματά την αυτόλυση του ιστού

Διαφυλάσσει τη δομική σταθερότητα των κυττάρων

Κατάλληλα μονιμοποιητικά υλικά είναι αλδεΐδες (φορμαλδεΐδη, γλουταραλδεΐδη), άλατα του υδραργύρου, κ.ά.

2. Αφυδάτωση

Σταδιακή αφυδάτωση του ιστού με τη βοήθεια διαλυμάτων αιθανόλης

3. Διαύγηση

Ανταλλάσσεται το μέσο αφυδάτωσης με διαλύτη συμβατό με το μέσο έγκλεισης, για παράδειγμα ξυλόλη

Παρασκευή ιστολογικών δειγμάτων

4. Έγκλειση

Ο ιστός περιβάλλεται με υλικό που του δίνει δομική σταθερότητα ώστε να κόβεται με ακρίβεια σε λεπτές τομές. Για τομές μέχρι 0.5 μm χρησιμοποιείται παραφίνη

5. Μικροτομή

Κόψιμο δειγμάτων και συλλογή τομών με τη βοήθεια μικροτόμου και κατάλληλου μαχαιριού από ατσάλι

6. Διάλυση του μέσου έγκλεισης και ενυδάτωση

7. Χρώση ώστε να γίνουν ορατά τα στοιχεία του ιστού

8. Κάλυψη με καλυπτρίδα και παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο

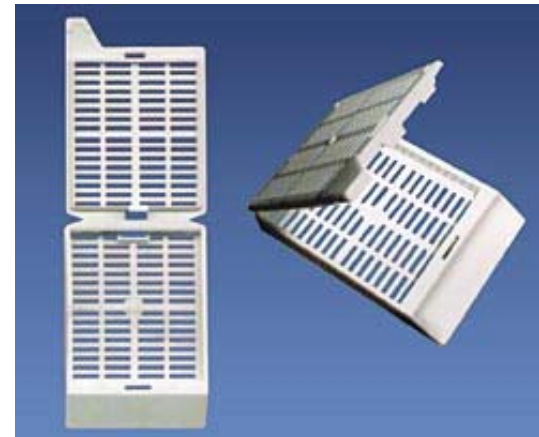
Μικροτόμος

Ο μικροτόμος χρησιμοποιείται για την παραγωγή λεπτών τομών παραφίνης. Υπάρχουν πολλοί τύποι μικροτόμου με πιο σύγχρονο τον περιστροφικό



Παρασκευή τομών παραφίνης

1. Μονιμοποίηση με διάλυμα φορμαλδεΐδης (2% – 4%)
2. Σταδιακή αφυδάτωση με διαλύματα 50%, 70%, 90% και 100% αιθανόλης
3. Διαύγαση με ξυλόλη
4. Έγκλειση σε λιωμένη παραφίνη σε ειδικά καψίδια (κασέτες) στους 55 – 65 °C για να εμποτιστεί ο ιστός με παραφίνη
5. Στερεοποίηση σε θερμοκρασία δωματίου και μικροτομή
6. Χρήση τομών για ιστοχημικές ή ανοσοϊστοχημικές χρώσεις



Παρασκευή κρυοτομών

Φρέσκα (όχι μονιμοποιημένα) δείγματα καλύπτονται με ειδικό υδατοδιαλυτό υλικό κάλυψης και παγώνονται με εμβάπτιση σε ισοπεντάνιο στους $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ με χρήση ξηρού πάγου ή υγρού αζώτου

Τα δείγματα κόβονται σε θερμοκρασία $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ και συλλέγονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες για ιστολογική ή ανοσο-ιστοχημική ανάλυση

Στις κρυοτομές η δομή του ιστού δεν διατηρείται τόσο καλά όσο σε αυτές της παραφίνης, είναι όμως ευκολότερες και ταχύτερες στην παρασκευή (π.χ. ταχείες βιοψίες)

Κρυοστατικός μικροτόμος

Ο κρυοστατικός μικροτόμος είναι τοποθετημένος σε ένα καταψύκτη ώστε να διατηρούνται χαμηλές θερμοκρασίες κατά το κόψιμο του δείγματος



Παρατήρηση ιστολογικών δειγμάτων:

1. Παρασκευή δειγμάτων

2. Χρώση (Ιστοχημικές και ανοσοϊστοχημικές χρώσεις)

Η παρασκευή και παρατήρηση ιστοχημικών χρώσεων ονομάζεται *Ιστοχημεία*

Η παρασκευή και παρατήρηση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων ονομάζεται *Ανοσοϊστοχημεία*

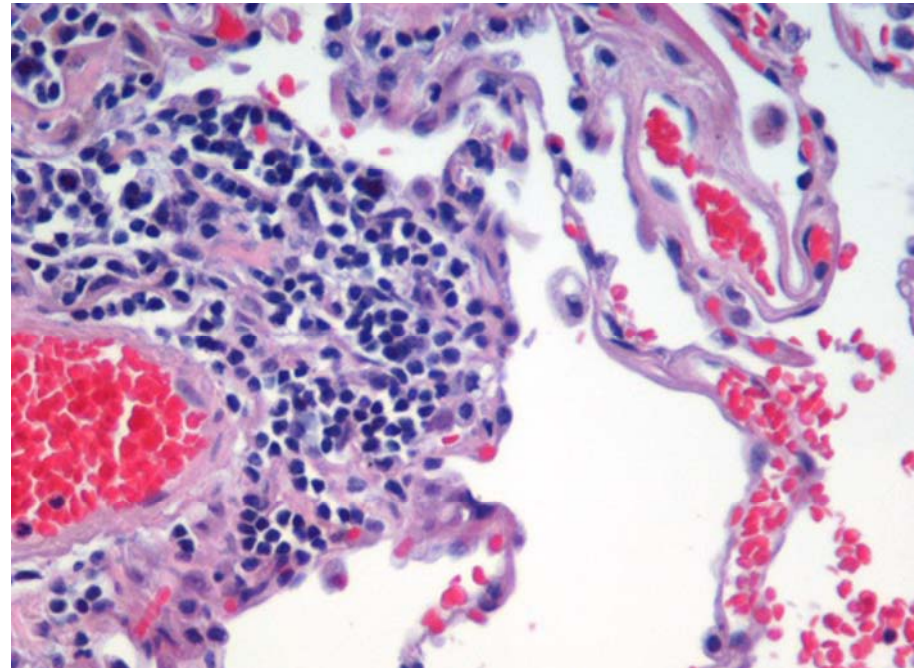
Ιστοχημεία (Histochemistry)

Είναι η παρατήρηση της μορφολογίας κυττάρων ή ιστών στο οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρήση χρωστικών (χρώση δειγμάτων με χρωστικές)

Η χρώση Αιματοξυλίνης-Ιωσίνης (Haematoxylin-Eosin) είναι από τις πιο διαδεδομένες στην Ιστολογία. Χρησιμοποιείται για γενική εκτίμηση της εικόνας του ιστού

Η Αιματοξυλίνη προσδένεται σε νουκλεϊκά οξέα και χρωματίζει μπλε περιοχές όπως ο πυρήνας και τα ριβοσώματα

Η Ιωσίνη προσδένεται σε πρωτεΐνες και χρωματίζει ροζ το κυτταρόπλασμα και έντονα κόκκινα τα ερυθροκύτταρα

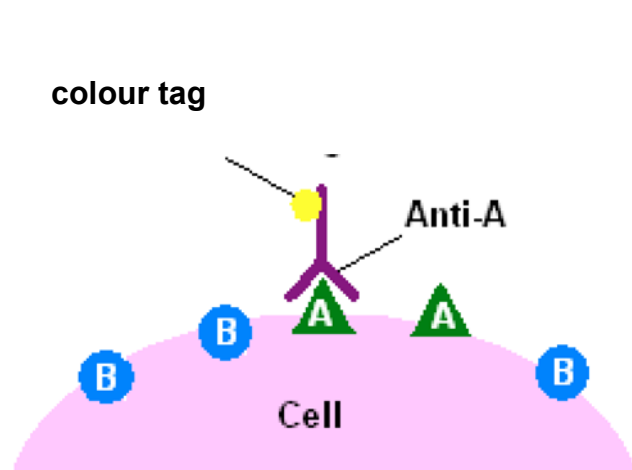


Ιστολογική ανάλυση δείγματος πνεύμονα του ανθρώπου με χρώση Αιματοξυλίνης-Ιωσίνης

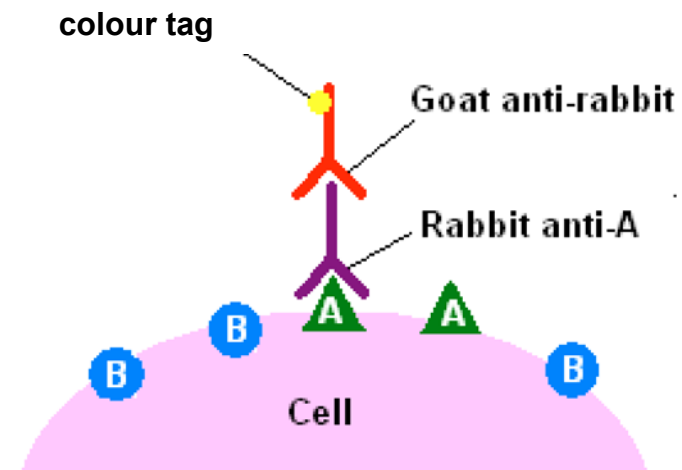
Ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry, IHC)

Είναι ο εντοπισμός συγκεκριμένων πρωτεϊνικών αντιγόνων σε δείγματα κυττάρων ή ιστών με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων συνδεδεμένων με χρωμοφόρες ουσίες (χρώση με αντισώματα συνδεδεμένα σε χρωμοφόρες ουσίες, π.χ. υπεροξειδάση)

Η μέθοδος εξαρτάται από την ειδικότητα του αντισώματος



Άμεση μέθοδος ανοσοϊστοχημείας



Έμμεση μέθοδος ανοσοϊστοχημείας

Εφαρμογές της ανοσοϊστοχημείας στην χειρουργική παθολογία

Χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση και ταυτοποίηση νεοπλασιών

Έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών χαρακτηρίζει την ύπαρξη νεοπλασιών ή και το είδος της νεοπλασίας. Τέτοια πρωτεϊνικά αντιγόνα (**καρκινικοί δείκτες**) δύνανται να ανιχνευθούν με ανοσοϊστοχημεία σε ιστολογικά δείγματα ασθενών

Παραδείγματα καρκινικών δεικτών:

- **Carcinoembryonic antigen (CEA):** Ταυτοποίηση αδενοκαρκινωμάτων οποιασδήποτε προέλευσης
- **CD117 (KIT):** Καρκίνος του συνδετικού ιστού του γαστρικού συστήματος και του λεπτού εντέρου

Εντοπισμός καρκινικών δεικτών με ανοσοϊστοχημεία: CEA

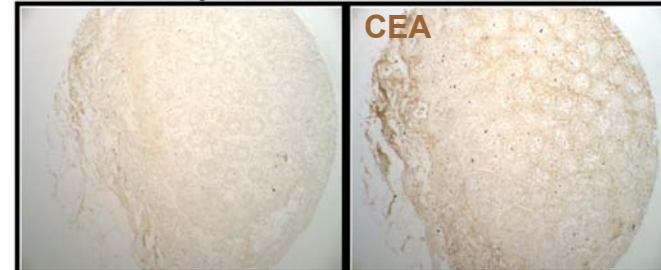
Είναι διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στην κυτταρική πρόσδεση (cell adhesion). Εκφράζεται κατά την εμβρυική ανάπτυξη και η παραγωγή της σταματά πριν τη γέννηση

Υπερέκφραση του CEA εμφανίζεται σε νεοπλασίες του γαστρικού συστήματος, του παχέος εντέρου, των πνευμόνων, του ήπατος και του στήθους

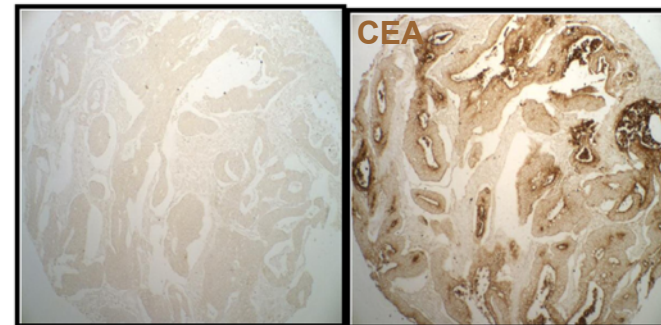
Δείγματα με υψηλά επίπεδα CEA εντοπίζονται με ανοσοϊστοχημεία με χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων

COLON

Background CEACAM5
Non-Neoplastic



Adenocarcinoma



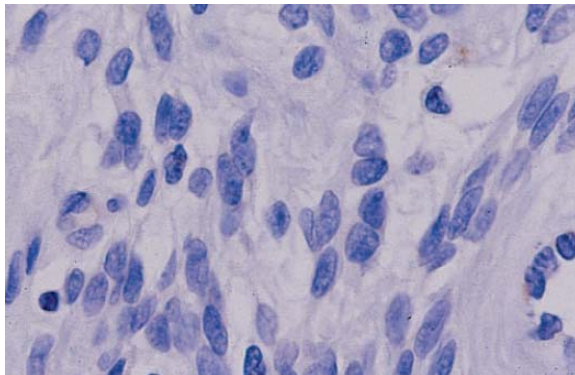
From Blumenthal *et al*, BMC Cancer 2007, 7:2

Εντοπισμός καρκινικών δεικτών με ανοσοϊστοχημεία: CD117 (KIT)

Είναι διαμεμβρανικός υποδοχέας της κυτοκίνης SCF (stem cell factor). Έχει ενεργότητα κινάσης Tyrosίνης και συμμετέχει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

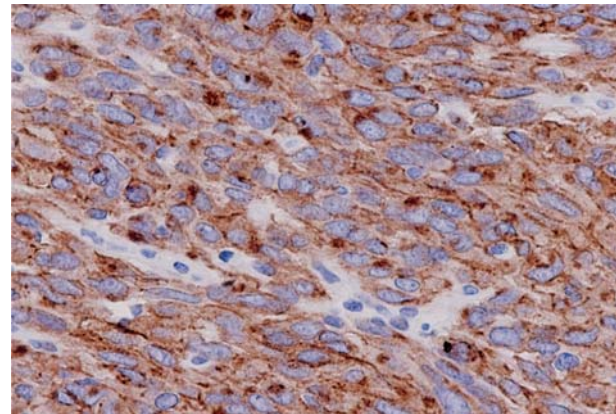
Υπερέκφραση της πρωτεΐνης KIT εμφανίζεται σε ποσοστό 85-90% καρκίνων του συνδετικού ιστού του γαστρικού συστήματος και του λεπτού εντέρου (gastrointestinal stromal tumour, GIST)

Φυσιολογικά κύτταρα



Haematoxylin CD117

Καρκινικά κύτταρα (GIST)



Haematoxylin CD117



- Για την μικροσκοπική παρατήρηση βιολογικών δειγμάτων απαιτείται δημιουργία αντίθεσης
- Διαφορετικά είδη μικροσκοπίας
- Η μικροσκοπία φωτεινού πεδίου (brightfield) είναι εύκολη και φτηνή και χρησιμοποιείται για παρατήρηση ιστολογικών δειγμάτων
- Στη μικροσκοπία φωτεινού πεδίου η αντίθεση δημιουργείται με χρωστικές ή αντισώματα τα οποία συνδέονται με χρωμοφόρες ουσίες