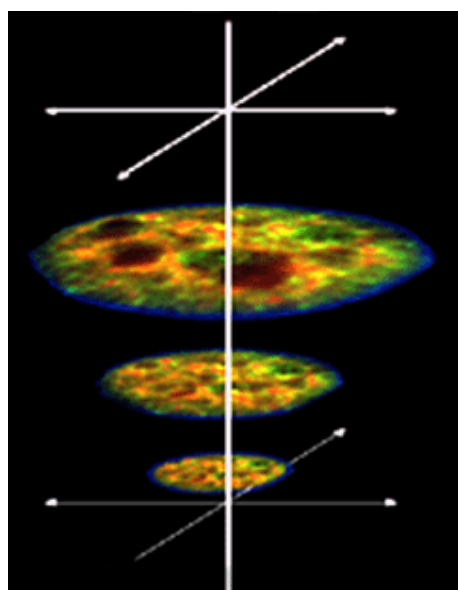


Mikroskopie 2006



Československá mikroskopická společnost

Hotel SKI, Nové Město na Moravě,

16. – 17. února 2006

Mikroskopie 2006

Pořádá:

Československá mikroskopická společnost

Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Tel./Fax +420-241 062 219

email: csms@biomed.cas.cz

www: <http://www.microscopy.cz>

Programoví organizátoři:

Dr. Luděk Frank

(fyzika, materiály, přístroje...)

email: ludek@isibrno.cz

Doc. Pavel Hozák

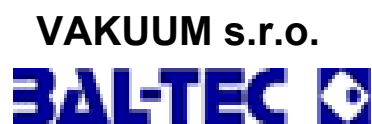
(biologie, medicína,...)

email: hozak@biomed.cas.cz

Hotel SKI, Nové Město na Moravě

16. – 17. února 2006

Sponzorují:



MIKRO, s.r.o.



OPTOTEAM s.r.o.



Mediální partner:

vesmír

Program

Čtvrtek 16. února

10:00-13:00 registrace

12.00-13.00 oběd

13:00-13:10 zahájení

13:10-13:20 **vyhlášení ceny ČSMS pro rok 2006 za zásluhy v mikroskopii**

Cenu získává Prof. Karel Smetana za celoživotní přínos v mikroskopickém poznávání buněk

13:20-13:50 **Karel SMETANA**, ÚHKT Praha:

Mikroskop a mikroskopická technika v hematologii

13:50-14:00 **vyhlášení ceny ČSMS za nejlepší PhD disertaci**

14:00-14:20 přednáška vítěze

I. blok přednášek - zvané přednášky

14:20-14:45 **Peter ŠVEC**, Fyzikální ústav SAV, Bratislava:

TEM charakterizácia nanostrukturovaných materiálů pripravených krystalizáciou z amorfnej fázy

14:45-15:10 **Miroslav OVEČKA**, Botanický ústav SAV, Bratislava:

Jednoduchá mikroskopická analýza niektorých dynamických procesov v rastlinných bunkách

15:10-15:45 **Ferdinand HOFER**, Research Institute for Electron Microscopy, Graz University of Technology, Austria:

Energy Filtering TEM - New Methods and Applications

15:45-16:15 **přestávka**

II. blok přednášek - firemní prezentace nových přístrojů/technik

16:15-16:35 **Tomáš VYSTAVĚL**, F.E.I.:

TITAN: 80 – 300kV monochromated and Cs corrected microscope

16:35-16:55 **Manfred BAUMANN**, Gatan/MB Science Service:

New developments in digital imaging for EM

16:55-17:15 **Jaroslav KLÍMA**, Tescan:

Nový autoemisní mikroskop MIRA firmy Tescan

17:15-17:35 **Josef MIKEŠ**, LIM:

Software a Hardware pro "Live Cell Imaging"

17:35-19:00 **výroční shromáždění ČSMS**

19:30-? **řízená ochutnávka vína (Znovín, a.s.) a banket conference**

Pátek 17. února

III. blok přednášek, vybraných na základě abstrakt

- 8:30-8:45 DELONG A., Delong Instruments, a.s., Brno:
Nízkovoltový TEM – mikroskop pro biologii
- 8:45-9:00 NEBESÁŘOVÁ J., Parazitologický ústav, České Budějovice a PřF UK, Praha:
První zkušenosti s oscilujícím diamantovým nožem při přípravě ultratenkých řezů z biologických vzorků pro TEM
- 9:00-9:15 STRÁDALOVÁ V., Ústav experimentální medicíny a Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha:
Detekce antigenů na tenkých řezech buněk bez chemické fixace
- 9:15-9:30 ROZKOŠNÝ I., Optoteam/Nikon, Praha:
Novinky spektrální konfokální mikroskopie
- 9:30-9:45 STARÝ V., Ústav materiálového inženýrství, Fakulta strojní, ČVUT v Praze:
Biomateriály a jejich aplikace v ortopedii
- 9:45-10:05 VÁVRA I. a ČIAMPOR F., Elektrotechnický ústav a Virologický ústav SAV Bratislava:
TEM analýza rozloženia magnetitových nanočástic použitých na cílený transport léčiva v bunkách kostnej drene
- 10:05-10:20 NADUBINSKÁ M., Botanický ústav SAV, Bratislava:
Lokalizácia zinku v bunkách rastlín tolerujúcich ťažké kovy
- 10:20-10:35 CHORVAT Jr. D., International Laser Centre, Bratislava:
Study of flavin autofluorescence in cardiac myocytes using spectrally and time-resolved fluorescence microscopy
- 10:35-12:20 **postery a firemní výstava s občerstvením**

IV. blok přednášek, vybraných na základě abstrakt

- 12:20-12:35 NOVÁK L., Ústav přístrojové techniky AV ČR, Brno:
Vliv Everhart-Thornleyho detektoru na zobrazovaný signál
- 12:35-12:50 ŠLOUF M., Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha:
Počítání nevážitelných množství otěrových částic uhmwpe pomocí elektronovémikroskopie a automatizované obrazové analýzy
- 12:50-13:05 SEDLÁCKOVÁ K., Ústav technickej fyziky a materiálového výskumu MAV, Budapešť a Elektrotechnický ústav SAV, Bratislava:
TEM a HREM analýza nanokompozitných tenkých vrstiev na báze nových štruktúrnych foriem uhlíka
- 13:05-13:20 GÄRTNEROVÁ V., Fyzikální Ústav AV ČR, Praha:
Aplikácia mikroskopie na výskum horčíkových zliatin

13:20 zakončení, oběd

PŘEDNÁŠKY

(uspořádáno podle jména prezentujícího autora)

1

MIKROSKOP A MIKROSKOPICKÁ TECHNIKA V HEMATOLOGII

Smetana K.

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

Jak je obecně známo, mikroskop měl určující úlohu při poznávání buněk, tj. jejich strukturálních komponent, funkcí, biologie a patologie. S rozvojem a zdokonalováním mikroskopů došlo i k rozvoji metod, které připravovaly buňky a samozřejmě i krevní buňky a krevetvorné tkáně k pozorování těmito přístroji. Různé typy mikroskopů a mikroskopické techniky jsou v hematologii užívány nejen pro studium patogenezy krevních chorob, ale i pro jejich diagnostiku a stanovení prognózy. Za poznámku stojí, že krevní buňky jsou také užívány jako modely pro studium buněčné diference a maturace.

V současné době supravitální pozorování mikroskopem využívá různého značení některých buněčných komponent a to nejen k odhalování jejich funkce v buňce, ale i ke stanovení její vitality. Moderní cytochemické a imunocytochemické přístupy pak umožňují poznávání chemického složení jednotlivých buněčných struktur a poskytují i diagnosticky cennou charakteristiku jednotlivých typů krevních buněk. Sledování vybraných buněčných struktur umožňuje stanovení zda nezralá krevní buňka, včetně maligní, je v klidové, či proliferativní fázi, zda "přechodně spí", nebo je na konci svého života. Je však nezbytné poznamenat, že některé z márníkových proteinů pro určité buněčné struktury se mohou v krevní buňce za určitých okolností přesunovat a tím ztrácejí svoji márníkovou úlohu. Na druhé straně umožňují sledování migračních a translokačních procesů v buňce.

Mikroskopickou a cytochemickou charakteristiku jednotlivých buněčných komponent *in situ* lze považovat za expresi procesů, které se na nich odehrávají a to přímo v "jedinečných" krevních buňkách za plného respektování jejich stavu. Tento přístup je nenahraditelný a to zejména v diagnostice, kdy počet buněk k vyšetření je velmi omezený.

2

NANOCRYSTALLIZATION FROM AMORPHOUS STATE: LOCAL CHARACTERIZATION OF METALLIC SYSTEMS

Švec P., Deanko M., Paluga M., Janičkovič D.

Institute of Physics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

Numerous modern nanocrystalline alloy systems are formed by crystallization from rapidly quenched amorphous state. Micromechanisms controlling this process are closely linked to the structure and atomic arrangement in the polycrystalline master alloy precursor and to the local ordering in amorphous state, leading to specific features of the (nano)crystalline phases formed during the transformation. Quantified morphological, chemical, compositional and structural characterization down to atomic scale level is an indispensable complement to thermodynamic characterization in these systems.

It will be shown that a complex information and insight into the structure of matter on the nanoscale can facilitate the design of unique knowledge-based material systems with extraordinary properties given by their specific local ordering and interactions. Examples of this approach using advanced microscopical methods will include high-resolution electron microscopy, energy-filtered elemental mapping and image analysis in direct and reciprocal spaces as well as surface analyses by means of atomic force and confocal microscopies. Specific cases of progressive materials containing nanocrystalline and nanoquasicrystalline structure and exhibiting significantly improved e. g. magnetic, mechanical or electrical properties or enhanced biocompatibility will be presented, demonstrating the potential of the methods of local characterization.

3

JEDNODUCHÁ MIKROSKOPICKÁ ANALÝZA NIEKTORÝCH DYNAMICKÝCH PROCESOV V RASTLINNÝCH BUNKÁCH

Ovečka M.¹, Lichtscheidl I.², Baluška F.³

¹ Botanický ústav, Slovenská Akadémia Vied, Bratislava, Slovensko

² Institution of Cell imaging and Ultrastructure Research, University of Vienna, Austria

³ Institute of Cellular and Molecular Botany, University of Bonn, Germany

Súčasný rozvoj rôznych disciplín prírodných vied priniesol nový pohľad na bunku, čo okrem iného znamenalo aj výrazný progres v mikroskopii. Zaznamenali sme významný posun od statických morfológických pozorovaní fixovaných štruktúr ku komplexnému štúdiu bunkovej architektúry v 3D obraze a zachyteniu dynamických molekulových procesov v živej bunke a v reálnom čase. Adekvátnym spôsobom sa vyvíjajú nové kvalitatívne a kvantitatívne mikroskopické metódy, výrazne sa však vylepšujú aj technické možnosti ovládania mikroskopov. To umožňuje použiť mikroskop na efektívne pozorovania aj pri využití jednoduchých funkcií prístroja. Cieľom prezentácie je jednoduchým spôsobom dokumentovať že použitím základných mikroskopických metód svetelnej, fluorescenčnej a konfokálnej mikroskopie spolu s využitím videotechnológie, počítačovej techniky a primeranej experimentálnej prípravy rastlinného materiálu je možné získať dostatok nových a zaujímavých údajov ktoré môžu výrazne prispieť k charakterizácii štruktúr a procesov v živej rastlinnej bunke. Príkladom štúdia dynamických procesov v koreňových bunkách rastlín môže byť spôsob prúdenia cytoplazmy, endocytóza externe aplikovaných markerov a vrcholový rast koreňových vlások.

Podporené Európskou Komisiou, projekt TIPNET (HPRN-CT-2002-00265) a Grantovou Agentúrou VEGA (grant 2/5085/25).

ENERGY FILTERING TEM - NEW METHODS AND APPLICATIONS

Hofer F., Schaffer B., Grogger W., Kothleitner G.

Research Institute for Electron Microscopy, Graz University of Technology, A
8010 Graz, Austria

With the spreading of micro- and nanotechnology there will be an increasingly strong need for imaging techniques that allow high spatial resolution studies of nanodevices and nanostructured materials. Here energy-filtering transmission electron microscopy (EFTEM) plays a central role as a means of measuring chemical and structural properties of very small regions of a thin specimen. The power of this technique depends significantly on two parameters: its spatial resolution and the energy resolution available in the spectrum and in the energy-filtered TEM image.

The major use of EFTEM is the mapping of elemental concentrations over large specimen areas with high spatial resolution in the range of one nanometre and a detection sensitivity lower than one monolayer. The procedures for quantitative EFTEM elemental mapping are now very well established and have been successfully applied to a broad range of specimens in materials science and biology. Energy-filtered images can be also used to visualize all physical properties which influence the EELS spectrum, such as electronic properties and bonding states by means of near edge fine structures (ELNES) and of the low-loss part of the spectrum.

Recent developments concentrated on the improvement of EFTEM data acquisition and analysis, e.g. for spectrum imaging. With the introduction of new energy-filtering microscopes which are largely corrected for spectral aberrations both transmissivity and non-isochromaticity could be essentially improved. In this paper we discuss these recent developments and their advantages for measuring the elemental composition, local physical properties and the local chemical bonding in materials science specimens at the nanometre scale.

5

TITAN™: 80 – 300KV (S)TEM WITH CS CORRECTOR AND MONOCHROMATOR

Vystavěl T.

FEI Company

Nanoresearch strives to increase our understanding of nanostructures and functional materials by linking the macroscopic material properties to the properties at the smallest level of detail: down to the atoms. This continuing drive pushes for the better understanding of local atom organization, the chemical bonding and even the electronic structure. The Titan™ microscope is balanced to bring the electron microscopy into a new era by expanding the boundaries, and assisting scientists and researchers to achieve ground-breaking results in nanoresearch.

In all TEM imaging, the spatial resolution is predominantly limited by the spherical aberration and chromatic aberration of the imaging lens. These imperfections cause the image information to be blurred. This information can be retrieved by the through-focus series reconstruction or by the electron holography. Alternatively, a more direct way is to correct the spherical aberration by incorporating a Cs corrector into the TEM column. For the situation where the aberrations are corrected on the image, a system shows enhancement of the resolution all the way down to the information limit. For the situation where the aberrations are corrected on the probe, the probe size as well as the current in the probe can be improved. Although good for conventional applications, the existing TEM platforms are not optimized to easily adapt the corrector technology. This is mainly due to their hardware and software incompatibility and most importantly, system stability. Titan™ is a new generation TEM that has been designed to remove the above mentioned weaknesses of the current TEM platforms. It works at accelerating voltages from 80 keV to 300 keV, with improved stabilities in mechanical, electrical and thermal behavior. This allows sub-ångström results to be obtained easily in imaging as well as in probe modes. In combination with a monochromator allowing an energy resolution to be in the 0.2 eV range, investigations similar to the ones reached with a synchrotron equipment could be done. Some recent results obtained with this system will be presented.

6

CCD PIXELS, THE MORE THE BETTER IN A TEM CAMERA?

Baumann M.

MBSS, Gatan distributor in East Europe

Do more pixels in a CCD camera necessarily mean higher image resolution? Most people believe this to be the case when purchasing a CCD camera for TEM work. This may seem so obvious that no explanation is needed. However, this is not a trivial question. The number of pixels in a CCD camera does not define its resolution.

The true and meaningful resolution can only be obtained by matching the CCD pixel size with the size of the electron generated “puddle”. This is the volume a single fast electron generates light from when interacting with the scintillator during the scattering process. In this process, electrons deviate significantly from their original paths. It is only under the condition that the size of the CCD pixels matches or is bigger than the „puddle“ that more pixels result in higher image resolution.

For CCD cameras that generate the “puddle” with size larger than a single pixel, in order to achieve the true single pixel resolution, one need combine the CCD pixels to form a “super pixel” so that it has the similar size as the “puddle”. For example one can combine 2 pixels in x and 2 pixels in y direction, termed 2 x 2 binning. Then the real effective pixels in the CCD camera are 4 times less than original number of pixels! For example, if the original number of

pixels is 2k x 2k or 4 Megapixels, then the real effective pixel in this camera is only 1k x 1k or 1 Megapixels!

7

NOVÝ FE REM TESCOAN MIRA

Klíma J., Lopour F., Zadražil M.

TESCAN, s.r.o., Libušina tř. 21, 602 00 Brno

MIRA je název celé nové rodiny rastrovacích elektronových mikroskopů nabízející vysoké i nízké vakuum v komoře mikroskopu.

Hlavními vlastnostmi nového mikroskopu jsou:

- [Schottkyho](#) tryska s vysokou směrovou proudovou hustotou pro dosažení vysokého rozlišení (pod 2 nm) při dostatečně vysokém proudu ve stopě a tím dosažení příznivého poměru signál/šum zobrazení a to i při nízkém urychlovacím napětí
- Unikátní tříčočková elektronová optika (Wide Field Optics™) umožňující různé pracovní módy obsahující originální mezičočku pro optimalizaci efektivní apertury dopadajícího svazku
- In-Flight Beam Tracing™ – originální vlastnost, která pomocí matematického modelu optické soustavy v paměti počítače a simulace pohybu elektronů v elektromagnetických a elektrostatických polích dokáže vypočítat v reálném čase parametry optické soustavy a vlastnosti dopadajícího svazku. Využívá zabudovaného jádra programu Electron Optical Design [2] a výrazně usnadňuje ovládání přístroje i pro nezkušeného operátora
- Vysoká zobrazovací frekvence
- Vysoký analytický potenciál přístroje
- Plně automatizované seřízení a nastavení mikroskopu
- Sofistikovaný software pro řízení mikroskopu a akvizici, archivaci, zpracování a analýzu obrazu
- Vysoký výkon při automatické analýze velkých ploch vzorku díky automatické lokalizaci a analýze částic
- Síťové operace a zabudované dálkové řízení a diagnostika přístroje – vše jako standardní vybavení

Reference:

[1] TESCAN, s.r.o., www.tescan.com

[2] B. Lencová, J. Zlámal, Proc. of Dreiländertagung Microscopy Conference, Davos, 2005

8

SOFTWARE A HARDWARE PRO „LIVE CELL IMAGING“

Mikeš J.

NÍZKOVOLTOVÝ TEM – MIKROSKOP PRO BIOLOGII

Delong A., Štěpán P.

DELONG INSTRUMENTS a.s., 612 00 Brno, Bulharská 48

V příspěvku budou srovnány parametry nízkovolto-vého TEMu s analogickými parametry 200 kV TEMu důležitými pro aplikaci v biologii a polymerní chemii. Mezi sledované parametry jsou zařazeny: kontrast obrazu, laterální rozlišovací schopnost, citlivost k radiačnímu poškození, náročnost preparačních metod a možnosti dalšího přístrojového zdokonalení.

Kontrast: Kontrast biologických (polymerních) objektů se specifickou hmotností okolo 1g/cm^3 je v LVTEMu nejméně o řád větší. Objekty menší než 30nm, které jsou v centru zájmu současné biologie (viry, enzymy, proteiny, DNA apod.) dávají při energii elektro-nů 5 keV dostatečný amplitudový kontrast v zaostřeném obraze. Při energii 200 keV je nutné pracovat s fázovým kontrastem při relativně značně rozostřeném obraze.

Rozlišovací schopnost: Přístrojová rozlišovací schopnost 200kV TEMu (0,27nm) přesahuje několikanásobně rozlišení současného LVTEMu (2nm). Rozlišovací schopnost 200kV TEMu se však při rozostření potřebném pro získání dostatečného kontrastu výrazně sníží (na 1-2nm).

Radiační poškození: Neelastický rozptyl elektronů klesá s tloušťkou objektu kterým elektrony zobrazovacího svazku procházejí. Bylo pozorováno, že zejména elektrony s energií 5keV prostupují objekty s tloušťkou okolo 15-30 nm, složenými z materiálů se specifickou hmotností okolo 1g/cm^3 s minimálními ztrátami.

Preparační metody: Potřeba používat v LVTEMu objekty s tloušťkou ne větší než 30-40nm je v případě důležitých částic splněna automaticky. Tenké řezy, které jsou další kategorií biologických objektů, je v současnosti možné připravit v ultramikrotomu s vibrujícím diamantovým nožem až do tloušťky 15nm s relativně malou deformací. Významná je současně možnost vynechat do značné míry kontrastování pomocí těžkých kovů.

10

PRVNÍ ZKUŠENOSTI S OSCILUJÍCÍM DIAMANTOVÝM NOŽEM PŘI PŘÍPRAVĚ ULTRATENKÝCH ŘEZŮ Z BIOLOGICKÝCH VZORKŮ PRO TEM

Nebesářová J.^{1,2}, Vancová M.^{1,3}

¹ Biologické centrum AV ČR, Parazitologický ústav, Branišovská 1160/31, České Budějovice

² Přírodovědecká fakulta UK, Viničná 7, Praha 2

³ Biologická fakulta JU, Branišovská 31, České Budějovice

Příprava ultratenkých řezů z biologických preparátů zalitých do pryskyřic představuje stále z hlediska časové náročnosti a požadavku na manuální zručnost nejnáročnější krok v přípravě biologických vzorků pro TEM. Navíc je zdrojem řady artefaktů, mezi jiným výrazné komprese řezů při jejich odkrajování z bločku, která se projevuje např. změnou velikosti zalitých objektů nebo navlněním řezů. Oscilující diamantový nůž Diatome s úhlem řezné hrany 35°, který při krájení kmitá s frekvencí v intervalu 25-45 kHz, slibuje odstranění těchto vad a usnadnění přípravy ultratenkých řezů.

Nůž jsme nejprve vyzkoušeli při přípravě ultratenkých řezů s tloušťkou 50-70 nm pro vysokonapěťový TEM ze vzorků zalitých do epoxidových pryskyřic PolyBed 812 a Spurr (Polysciences) a můžeme potvrdit, že změnou amplitudy lze snadno ovlivnit délku odkrajovaných ultratenkých řezů a tím i míru jejich komprese.

Oscilující diamantový nůž se nám osvědčil i při přípravě super ultratenkých řezů s tloušťkou okolo 20 nm pro nízkonapěťový TEM. Opět jsme ho vyzkoušely pro vzorky zalité do nejtvrdějších variant výše uvedených epoxidových pryskyřic, kdy nám velmi usnadnil přípravu 20 nm řezů, dokonce nám umožnil krájet řezy s tloušťkou kolem 15 nm. Navíc jsme prokázaly v LV TEM, který reaguje na nepatrné změny v tloušťce řezu výraznou změnou kontrastu ve výsledném obrazu, že oscilující nůž nevytváří „chatter“ na řezu, tedy pravidelné změny tloušťky řezu v důsledku jeho vibrace. Z hlediska nízkonapěťového mikroskopu přispívá k vyhlazení zrnitého vzhledu zalévacího média ve výsledném obrazu.

DETEKCE ANTIGENU NA TENKÝCH ŘEZECH BUNĚK BEZ CHEMICKÉ FIXACE

Strádlová V., Gaplovská-Kyselá K., Hozák P.

ÚEM a ÚMG AVČR, Vídeňská 1083, Praha

Klasická příprava preparátů pro transmisní elektronovou mikroskopii využívá chemické fixace buněk aldehydickými činidly (FA, GA). Použití chemických fixativ má ale svá omezení a řadu nevýhod. Je to fixace pomalá, pH či tonicita použitého pufru nikdy plně nevyhovuje všem buněčným kompartmentům a nelze kontrolovat ani předvídat stupeň zachování buněčných antigenů pro následnou imunochemickou detekci.

Tyto nedostatky chemické fixace lze odstranit použitím kryofixace. Nejúčinnější metodou kryofixace v současné době je vysokotlaké zamrazování (*high pressure freezing*, HPF), kdy je živý vzorek zamražen během ms za velmi vysokého tlaku (kolem 2000 barů) a dojde k tvorbě amorfního ledu. Vitrifikovanou vodu ve vzorku je poté možno za velmi nízké teploty (kolem -90°C) nahradit acetonem (či metanolem) a zalít do pryskyřice (metoda *freeze substitution*, FS).

V naší laboratoři používáme přístroje Leica EM-PACT a Leica AFS. Modifikovali jsme používané metody HPF a FS tak, že buňky zamražené bez jakýchkoliv chemických fixativ, substituované acetonem a zalité do pryskyřice LR White měly v TEM velmi dobrou ultrastrukturu, nesrovnatelně lepší, než při použití stejné pryskyřice po chemické fixaci. Mírným problémem byl pouze nižší kontrast membránových struktur a jadérek, který lze ovšem částečně kompenzovat přidávkem uranylacetátu do substitučního média. Velký přínos těchto metod je v jejich velmi dobré schopnosti zachovat buněčné antigeny pro imunoznačení. Experimentálně kvantifikované imunoznačení pomocí koloidního zlata na tenkých řezech bylo u buněk zpracovaných metodou HPF/FS o řád vyšší ve srovnání s chemicky fixovanými buňkami.

12

NOVINKY SPEKTRÁLNÍ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Rozkošný I.

Optoteam s.r.o., Kyjevská 6, 160 00 Praha 6, www.mikroskopy.cz:

V současné době existují dva spektrální systémy používané v konfokální mikroskopii:

systemy založené na výběru vlnových délek používají prizmata nebo mřížky k výběru určitých oblastí spektra, produkovaná data jsou obdobná datům získaným při použití úzkopásmových filtrů před detektorem fotonásobiče.

systemy založené na spektrální detekci používají mřížky a poskytují širokospektrální data. Každý obrazový bod zahrnuje kompletní širokopásmové spektrum. Tyto systémy umožňují rychlé snímání spektra s různým rozlišením. Spektrální konfokální systémy jsou dnes nabízeny předními světovými výrobci mikroskopů v různých variantách, o nichž detailněji informuje přednáška.

BIOMATERIÁLY A JEJICH APLIKACE V ORTOPEDII

Starý V.¹, Kabátová J.¹, Bačáková L.², Douděrová M.¹, Tolde Z.¹, Horník J.¹, Fencel J.³

¹Ústav materiálového inženýrství, Fakulta strojní, ČVUT v Praze,

²Fyziologický ústav AV ČR Praha,

³Beznoska s.r.o., Kladno

Zcela převládajícími materiály pro výrobu implantátů jsou v současné době kovy, především slitiny, které mají potřebné mechanické a antikorozi vlastnosti. Nejrozšířenější slitiny jsou chromniklové austenitické korozivzdorné oceli, chrommolybdenová slitina kobaltu a hliníkovánadová slitina titanu. Tyto kovy převažují a budou ještě dlouho převažovat v materiálové základně umělých náhrad kloubů u většiny výrobců a také u firmy Beznoska s.r.o., Kladno. Naše práce je zaměřena na titan a titanové slitiny s různými povrchovými úpravami, které firma Beznoska používá pro výrobu endoprotéz. Cílem je zjistit a kvantitativně vyhodnotit souvislosti mezi drsností povrchu a růstem kostních buněk na modelových vzorcích s různou drsností a s různým složením (Ti, Ti6Al4V, Ti5Al2.5Fe).

Vzorky byly tvořeny disky s odpovídajícího materiálu, jejichž povrch byl připraven jednou ze čtyř technologií: mechanickým obráběním (MO), navíc dodatečným leštěním (ML), elektroerozí (EO), nebo plasmatickým nástřikem Ti prášku (PL) na TiAlV příp. TiAlFe. Metodou EDX bylo změřeno složení, které odpovídá před-pokládanému s přesností ~0.5%. Poté byla stanovena u všech vzorků drsnost (parametry Ra, Rq, Rsk, Rku, Rt, R3z, Rp, Rpm, Sm) a sejmuty obrazy povrchu v SEM. Na takto připravených vzorcích byly pěstovány buňky (osteoblastům podobné kostní buňky linie M 63) po dobu 1 a 4 dny. Nakonec byly změřeny počty buněk adhero-vaných na vzorcích za tuto dobu (N1 a N4) a vypočítána doba zdvojnásobení počtu buněk DT, u vzorků po 1 dni byla provedena fixace, příp. pozlacení a povrchy s buňkami opět sledovány v SEM.

Výsledky ukázaly významnou závislost počtu adhero-vaných buněk na parametru drsnosti Ra, objevila se také významná korela-ce doby zdvojnásobení na parametru Rsk. Počet adhero-vaných bu-něk ani čas zdvojnásobení na plasmaticky nastříkaném a elektroero-dovaném povrchu se statisticky významně nelišily.

TEM ANALÝZA ROZLOŽENIA MAGNETITOVÝCH NANOČASTÍC POUŽITÝCH NA CIELENÝ TRANSPORT LIEČIVA V BUNKÁCH KOSTNEJ DRENE

Vávra I.¹, Čiampor F.², Rosocha J.³, Timko M.⁴

¹Elektrotechnický ústav SAV, Bratislava;

²Virologický ústav SAV Bratislava;

³Združená tkanivová banka LF UPJŠ a FNsP Košice; ⁴Ústav experimentálnej fyziky SAV Košice

V prednáške sa prezentujú čiastočné výsledky výskumu využitia magnetitových nanočastíc ako nosičov liečiva na určené miesto do buniek tkanív ľudského organizmu. Bude vysvetlený princíp cieleného transportu liečiva pomocou magnetických nanočastíc a metodika TEM charakterizácie magnetických kvapalín (súbory magnetitových nanočastíc nachádzajúcich sa v kvapaline).

Magnetická kvapalina bola pridaná do živného rastového média, v ktorom sa nachádzali kmeňové ľudské mezenchýmové bunky z kostnej drene množené in vitro. Bunky boli fixované glutaraldehydom a po odvodbení zaliate do média LR White. TEM pozorovaním ultratenkých rezov buniek v tmavom a svetlom poli sme zistili, že magnetické častice prenikajú do cytoplazmy buniek. Lokalizácia častíc nie je viazaná na žiadne cytoplazmatické organely, ale nachádzajú sa neusporiadane po celej cytoplazme. Ukázali sme, že magnetické nanočastice neprenikajú do bunkového jadra.

LOKALIZÁCIA ZINKU V BUNKÁCH RASTLÍN TOLERUJÚCICH ŤAŽKÉ KOVY.

Nadubinská M.¹, Čiamporová M.¹, Lichtscheidl I.²

¹Botanický ústav SAV, Bratislava;

²University of Vienna, Cell Imaging and Ultrastructural Research Unit, Division of Cell Physiology and Scientific Film.

Študovali sme anatomické a fyziologické adaptácie rastlín *Arabidopsis halleri* a *Thlaspi caerulescens* na zvýšený obsah zinku. Oba druhy sa hojne vyskytujú na stanovištiach zaťažených ťažkými kovmi a vyznačujú sa schopnosťou akumulovať extrémne vysoké množstvo Zn.

Metódou SEM-EDX sme dokázali zvýšený obsah Zn vo všetkých analyzovaných vzorkách dospelých listov. Transmisnou elektrónovou mikroskopiou sme zistili prítomnosť elektrónodenzných inklúzií vo vakuolách epidermy; menej často a v menšom množstve aj vo vakuolách mezofylu. Na vizualizáciu Zn v živých bunkách (tzv. „live-cell microscopy“) sme použili fluorescenčnú farbičku Newport Green PDX a pozorovali sme v konfokálnom mikroskope (CLSM). Táto metóda potvrdila sekvestráciu Zn do vakuol predovšetkým v epiderme. Intenzita signálu nebola vo všetkých bunkách epidermy rovnaká, čo naznačuje rozdiely v koncentrácii Zn.

Kombinácia zvolených metód naznačuje možnosti využitia fluorescenčnej farbičky Newport Green PDX pre subcelulárnu lokalizáciu Zn v živých bunkách dospelých listov, ako i v klíčencoch tolerantných rastlín.

Výskum finančne podporili Grantová agentúra VEGA # 2/5086/25, Akcia Rakúsko - Slovensko # 46s5 a Hochschuljubiläumsstiftung der Stadt Wien # 1128/2004.

STUDY OF FLAVIN AUTOFLUORESCENCE IN CARDIAC MYOCYTES USING SPECTRALLY AND TIME-RESOLVED FLUORESCENCE MICROSCOPY.

Chorvat JR. D.¹, Kirchnerova J.², Cheng Y.³, Mateasik A.¹, Chorvatova A.^{3,4}

¹International Laser Centre, Bratislava;

²Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University, Bratislava; ³Research Centre of Sainte-Justine Hospital, Montreal;

⁴Department of Pediatrics, University of Montreal, Montreal

Numerous cardiac diseases, including hypertension and diabetes, are associated with mitochondrial dysfunction. It is therefore highly relevant to develop appropriate tools for investigation of metabolic changes directly in living cells, such as redox fluorimetry and imaging based on the intrinsic cellular fluorophores. The main sources of cell autofluorescence excited by visible light are oxidized mitochondrial flavins and flavoproteins.

In our study we applied linear unmixing approach to reveal individual components of intrinsic flavin fluorescence signal recorded in living cardiac cells by spectrally-resolved confocal microscopy. Responses of whole-cell autofluorescence to modulators of cell metabolism and respiration were used as a tool of separation of its components; their spectral profiles, estimated by principal component analysis, correspond to free FAD and FAD bound to different enzymes of electron transport chain.

Next we evaluated the possibility to characterize the metabolic state of living isolated cardiac cells measuring simultaneously their fluorescence spectra and fluorescence lifetimes. We found that at least 3 exponential decay model, with 0.3-0.7 ns, 1.3-1.7 ns and 4-5 ns lifetimes is necessary to describe the autofluorescence decay kinetics in living cardiomyocytes, excited by blue/violet picosecond laser diode. The fluorescence lifetime values and their fractional amplitudes were dependent on the cellular metabolic state and were compared to the lifetimes and spectral profiles of purified flavins.

VLIV EVERHART-THORNLEYHO DETEKTORU NA ZOBRAZOVANÝ SIGNAL

Novák L., Müllerová I.

Ústav přístrojové techniky, AV ČR, Brno

Everhart-Thornleyho detektor je využíván k detekci sekundárních elektronů již po více než čtyři desetiletí. Přestože se za tuto dobu stal nedílnou součástí všech standardních rastrovacích elektronových mikroskopů, nebyl dosud mechanismus přenosu signálu detekční trasou tohoto detektoru blíže popsán. Cílem provedeného výzkumu bylo zjistit jakým způsobem je zkreslován přenášený a zesilovaný signál. Bylo použito experimentální zařízení, které poskytovalo velmi malé proudy elektronového svazku dopadajícího do detektoru. Měřicí technika připojená na výstup detektoru pak zaznamenávala pulsy způsobené jednotlivými dopadajícími elektrony. Tímto způsobem byly získány statistické údaje o tvaru pulsů v závislosti na volitelných parametrech detekční trasy. Vzhledem k tomu, že právě z těchto elementárních pulsů je složen výsledný signál, bylo následně možné popsat rovněž jeho hlavní charakteristiky. Na základě porozumění procesům, jež se uplatňují při přenosu signálu jednotlivými částmi detektoru byla sestavena počítačová simulace detekční trasy. Tato pak umožňuje nalézt optimální konfiguraci parametrů jednotlivých částí detekční trasy. Takto může být pro konkrétní pracovní podmínky detektoru zvolena vhodná návaznost jeho jednotlivých částí, která zaručí co možná nejmenší zkreslení detekovaného signálu a potlačí vliv šumu. Pomocí vytvořeného softwaru je dále možné určovat DQE aktuální konfigurace detektoru, či vyhodnocovat dynamické charakteristiky obrazu, jako například zkreslení původně ostrých změn intenzity signálu. Ze závěrů dílčích měření plynou mnohé rady užitečné i pro běžného uživatele rastrovacího elektronového mikroskopu.

Projekt je podporován firmou FEI Czech Republic s.r.o. a GA 102/04/2144

POČÍTÁNÍ NEVÁŽITELNÝCH MNOŽSTVÍ OTĚROVÝCH ČÁSTIC UHMWPE POMOCÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE A AUTOMATIZOVANÉ OBRAZOVÉ ANALÝZY

Šlouf M.¹, Synková H.¹, Berger S.², Kumstátová J.³, Eklová S.³, Entlicher G.³, Pokorný D.⁴, Sosna A.⁴

¹Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, Heyrovskeho nam. 2, 16206 Praha 6, Czech Republic;

²Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Clermont-Ferrand, Ensemble scientifique des Cézeaux, 24 Avenue des Landais BP 187, 63174 Aubière Cedex, France;

³Faculty of Sciences, Charles University, Hlavova 8, 12840 Praha 2, Czech Republic,

⁴Orthopaedics Clinic, Hospital Motol, V uvalu 84, 15606 Praha 6, Czech Republic.

Totální náhrady kyčelních a koleních kloubů (TJR) se obvykle skládají ze dvou hlavních částí, z nichž první bývá kovová a druhá vyrobená z polyethylenu z ultravysokou molekulovou hmotností (UHMWPE). Tato kombinace materiálů se vyznačuje výbornými frikčními vlastnostmi a velmi dobrými mechanickými charakteristikami. Za největší problém lze tudíž v současnosti považovat vznik submikronových částic UHMWPE, které se uvolňují v důsledku otěru (wear) z kloubního prostoru a způsobují v okolí TJR zánětlivé reakce.

Jedním z cílů našeho projektu je prokázání korelace mezi množstvím otěrových částic a rozsahem poškození tkání v okolí TJR. Hlavní překážkou se ukázalo být vypracování spolehlivé techniky zahrnující (i) definované odběry poškozených tkání při reoperacích TJR, (ii) reprodukovatelné izolace UHMWPE částic ze vzorků a zejména (iii) počítání prakticky nevážitelných a neviditelných otěrových částic UHMWPE. Za tímto účelem byla vyzkoušena celá řada nových metod založených na mikroskopii, rozptylu či absorpci záření. V tomto příspěvku popíšeme „přímou“ techniku založenou na (semi)automatizované obrazové analýze elektronových mikrofotografií.

Poděkování: grant GAČR 106/04/1118.

TEM A HREM ANALÝZA NANOKOMPOZITNÝCH TENKÝCH VRSTIEV NA BÁZE NOVÝCH ŠTRUKTÚRNYCH FORIEM UHLÍKA

Sedláčková K.^{1,2}, Lobotka P.², Vávra I.², Czigány ZS.¹, Bertóti I.³, Ujvári T.³, Radnóczy G.¹

¹Ústav technickej fyziky a materiálového výskumu MAV, Konkoly-Thege M. Út 29-33, 1121 Budapešť, Maďarsko;

²Elektrotechnický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 841 01 Bratislava, Slovensko;

³Chemické výskumné centru, Laboratória materiálov a enviromentálnej chémie, H-1525 Budapešť POB 17, Maďarsko.

Nanokompozitné vrstvy na báze uhlíka sú novou generáciou materiálov so širokým využitím v priemysle. Dôvodom sú ich mechanické vlastnosti, najmä zvýšená tvrdosť a elasticita a nízky koeficient trenia. Vrstvy majú široké využitie v priemysle ako ochranné povrchy pevných diskov, čítacích hláv.

V prednáške ukážeme, že výsledné vlastnosti nanokompozitu závisia od zastúpenia jednotlivých fáz uhlíka (amorfná, graphite-like, fullerene-like a diamond-like) v matrici. Miera výskytu fullerénu podobných štruktúr ovplyvňuje elektrické aj mechanické vlastnosti nanokompozitov.

Nanokompozitné vrstvy typu kov- uhlík sme pripravili dc magnetronovým naprašovaním pri rôznych depozičných teplotách. Na štruktúrnu charakterizáciu vrstiev sme použili transmisný elektrónový a vysokorozlišovací mikroskop. Ukážeme koreláciu štruktúrnych, elektrických a mechanických vlastností C-Ni nanokompozitov [1].

This work was supported in part by the European Community's Human Potential Programme under contract HPRN-CT-2002-00209, (New Fullerene-like Materials). Katarína Sedláčková acknowledges the financial support provided through the same project.

[1] Sedláčková K., Lobotka P., Vávra I., Radnóczy G., Carbon 43 (2005) 2192

APLIKÁCIA MIKROSKOPIE NA VÝSKUM HORČÍKOVÝCH ZLIATIN

Gärtnerová V., Jäger A.

Fyzikální Ústav AV ČR, Na Slovance 2, 182 21 Praha 8

Kombinácia svetelnej mikroskopie (LM), riadkovacej (SEM) a transmisnej (TEM) elektrónovej mikroskopie predstavuje optimálnu a veľmi významnú kombináciu metód, ktorá sa používa pre výskum štruktúry a identifikáciu defektov v pevných látkach. Aplikácie budú prezentované na Mg zliatinách, u ktorých nižšia koróziivzdornosť spôsobuje isté problémy s prípravou vzoriek a hexagonálna štruktúra horčíka a väčšina jeho zliatin vykazuje isté špecifiká pri interpretácii výsledkov.

POSTERY

(uspořádáno podle jména prezentujícího autora)

1

LOCALIZATION OF THE ScpD PROTEIN SUBUNIT IN PHOTOSYSTEM II FROM SYNECHOCYSTIS 6803 USING THE HIS-TAGGED Ni-NTA NANOGOLD LABELING

Bumba L.¹, Komenda J.², Tichy M.², Vacha F.³

¹Institute of Mikrobiology, Videnska 1042, 142 20 Praha 4;

²Institute of Mikrobiology, Opatovicky mlyn, 379 81 Trebon;

³Institute of Molecular Biology, Branisovska 31, 37005 Ceske Budejovice.

In the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 five open reading frames (*scpA-sc pE*) have been identified that code for single-helix proteins resembling helices I and III of chlorophyll *a/b*-binding (Cab) antenna proteins from higher plants. Four of these five proteins (ScpB, ScpC, ScpD, and ScpE) are small (4-8 kDa) and they have been proposed to function in transient pigment binding, chlorophyll scavenging, dissipation of excess excitation energy, quenching of reactive oxygen species and regulation of heme/chlorophyll biosynthesis. Protein pulse labeling (³⁵S methionine/cysteine mix) of the wild type cells followed by 2D-electrophoresis (Blue-native/SDS) of thylakoid membranes revealed ScpC and ScpD to be associated with photosystem II (PSII) reaction center complex. In strain overexpressing ScpD as a 6xHis tagged protein, the ScpD-His protein was detected in the PSII core as well as in the subcore lacking CP43 indicating that CP43 subunit does not play role in the binding of ScpD to the PSII complex. In order to identify the exact location of the ScpD subunit, the PSII complex with His-tagged ScpD protein was isolated and the His tag labeled with a Ni²⁺-nitrilo triacetic acid (Ni-NTA) Nanogold. Electron microscopy followed by single particle image analysis identified the location of the labeled His-tagged ScpD protein at the periphery of the dimeric PSII complex. These results indicate that the N terminus of the ScpD protein is located at the stromal surface of the PSII complex and in the vicinity of the PsbH and CP47 subunits.

2

3D VIZUALIZACE BIOLOGICKÝCH DAT S VYUŽITÍM KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Čapek M.^{1,2}, Janáček J.¹, Kubínová L.¹, Hána K.², Smrčka P.²

¹Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 - Krč

²FBMI ČVUT, nám. Sítná 3105, 272 01 Kladno 2

Objemová rekonstrukce je metoda sloužící k vizualizaci trojrozměrné struktury biologických vzorků, jejichž velikost může být větší než je horizontální či axiální zorné pole snímacího systému (v našem případě laserového konfokálního mikroskopu).

Velké vzorky je nutné nařezat na tenké fyzické řezy. Pak se snímají všechny sousedící a překrývající se objemové obrazy v rámci jednotlivých fyzických řezů (kompenzace omezeného horizontálního zorného pole). Takové sousedící obrazy se dále získají pro všechny sériové fyzické řezy (kompenzace omezeného axiálního zorného pole).

První krok objemové rekonstrukce představuje složení překrývajících se sousedních zorných polí téhož fyzického řezu. Tento krok může být realizován registračním algoritmem založeným na nejmenších čtvercích s využitím Euklidovské transformace [1]. Složené objemové obrazy fyzických řezů je pak nutno složit ve výsledný objemový obraz reprezentující celý biologický vzorek. K tomuto účelu je vhodná registrace s využitím elastické deformace, protože ve fyzických řezech dochází k deformaci objektů. Vhodným způsobem je využití elastické deformace modelované pomocí B-splinů [2].

Výsledný digitální objem jsem vizualizovali s využitím karty VolumePro nabízející 3D zobrazení rastrových dat v reálném čase. Tato vizualizace nám umožnila vyšetřovat vnitřní strukturu biologických vzorků, kvantifikovat a kvalifikovat zobrazené biologické objekty.

Podpořeno granty GA AVČR (projekty č. A100110502, A600110507, A500200510, AV0Z 50110509), GAČR (projekt č. 304/05/0153) a VZ MŠMT MSM6840770012.

[1] Karen, P., et al., *Microscopy Research & Technique*, 2003, 62(5): p. 415-422.

[2] Sorzano, C.O.S., Thevenaz, P. and Unser M., *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2005, 52(4): p. 652-663.

3

ELECTRON MICROSCOPY IN STRUCTURAL STUDIES OF PHOTOSYSTEM I FROM THE RED ALGAE CYANIDIUM CALDARIUM

Gardian Z.^{1,2}, Buma L.^{2,3}, Vácha F.^{1,2}

¹Institute of Physical Biology in Nové Hradý, CZ;

²Institute of Plant Molecular Biology in České Budějovice, CZ;

³EXBIO Praha, Nad Safinou II 366, 252 42, Vestec u Prahy

Oxygenic photosynthesis is a process in which plants, algae and cyanobacteria use light energy to drive synthesis of organic compounds and produce all molecular oxygen. The light-harvesting and energy-transducing functions of oxygenic photosynthesis are localized in specialized photosynthetic membranes, thylakoids, and carried out by several types of protein complexes. Various techniques of electron microscopy have been employed, since now, to gain much of the structural information of photosynthetic complexes.

In our work we used technique of negative staining and particle averaging to study the structure of PS I complexes isolated from the red alga *Cyanidium caldarium* which was cultivated at low light ($20 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) and high light ($200 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Isolated thylakoid membranes were solubilized with 1.5 % dodecyl maltoside and loaded onto a 0-0.55 M continuous sucrose gradient and centrifuged at 150 000g for 14 h. After centrifugation the second band with the most of PS I was loaded onto a DEAE sepharose CL-6B anion-exchange column. The PS I complex was eluted from column at a concentration of 25 mM NaCl. Freshly prepared PS I complexes were used for electron microscopy. The specimen was placed on glow-discharge carbon-coated copper grids and negatively stained. Micrographs were digitized and analysed with 'Spider and web' software. The single particle analysis of micrographs showed that PS I isolated from red alga *Cyanidium caldarium* is similar to PS I from green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and that there is no significant difference between structure of PS I from *Cyanidium caldarium* cultivated at high and low light.

4

LOCAL STRESS IN SAMPLES STRAINED BY IN SITU TEM

Gemperlová J., Zárubová N., Gemperle A.

Institute of Physics AS CR, Na Slovance 2, CZ-18221 Praha 8

Stress distribution in an *in situ* TEM strained foil is strongly affected by the polished depression and the hole. This effect has been investigated in detail on a Fe-Si foil plastically deformed under uniaxial straining in TEM. The slip trace direction varied considerably around the hole indicating local changes of the macroscopic slip plane. Since non-crystallographic slip occurs in Fe-Si under conditions used in the experiment, and the crystallographic relation between the macroscopic slip plane and the tensile stress direction is known, the local tensile axes could be established. It was found that the deviations of the local tensile stress from the external one might be as large as $\pm 60^\circ$. The stress distribution determined experimentally is compared with the analytical solution [1] as well as finite element analysis [2] of the problem.

The authors highly acknowledge financial support of GA CR (Contract 202/04/2016).

[1] S. Timoshenko, Theory of elasticity, McGraw-Hill, 1934, pp.75-79, 1934.

[2] A. Coujou, Ph. Lours, N.A. Roy, D. Caillard, N. Clement, Acta Metall. 38 (1990).

5

EFFECT OF ELECTRON BEAM ON POLY[METHYL(PHENYL)SILYLENE]

Horák P., Schauer P.

Institute of Scientific Instruments, AS CR, Královopolská 147, CZ-61264 Brno

The study of the properties of poly[methyl(phenyl)silylene] (PMPSi) was based on the measurement of intensity of the cathodoluminescent (CL) emission after passing through the specimen. The study of the PMPSi properties using the CL method is complicated by the material degradation characterized by the fall of the CL intensity. Therefore, the measurement in the synchronous mode was used to eliminate the influence of the background and of the noise.

At the excitation energy of 10 keV the irradiation time dependence of the PMPSi CL intensity was measured for the different electron beam current densities. For the highest current density, both the strongest intensity and the fastest fall have been observed. The speed of degradation depends on the irradiation time as well as on the current density of the excitation beam. The effect mentioned impedes the utilization of PMPSi as a detecting or signaling element. On the other hand, the degradation of PMPSi could be utilized in electron lithography.

The recovery of CL intensity in absence of oxygen proved the formation of the metastable states in PMPSi. The process of the recovery is the strongest at the smallest current density and decreases with increasing density. CL investigation of PMPSi proved creating of metastable states in the material. The degradation is a reversible process in this case. The understanding of physical and chemical mechanism of the degradation and of the reversible process of the PMPSi CL emission is interesting from both scientific and application points of view. This knowledge can lead to material stabilization. The recovery process, if fully reversible (the degradation level is less than about 40%), could be applicable to optical memory media or to molecular switches.

6

DETEKCE A PROSTOROVÁ STATISTIKA KREVNÍCH VLÁSEČNIC VE 3D KONFOKÁLNÍCH MIKROSKOPICKÝCH SNÍMCÍCH

Janáček J.¹, Saxl I.², Kubínová L.¹

¹Fyziologický ústav AVČR, Praha;

²Matematický ústav AVČR, Praha.

Kvantitativní odhady vaskularizace živočišných tkání mohou posloužit k objasnění rozdílů ve funkci nebo reakci na terapeutické zásahy. 3D fluorescenční konfokální mikroskopie poskytuje vhodná zdrojová data pro stanovení objemové intenzity délky vlásečnic, intenzity Eulerova-Poincarého čísla postihující bohatost větvení vlásečnic a pro charakterizaci prostorové anizotropie průběhu vlásečnic.

Předzpracování 3D obrazu vlásečnic zahrnuje jednak obecné metody odstraňování obrazového pozadí a šumových artefaktů, např. Lipschitzův filtr a objemové otevření, jednak specifické metody sloužící ke zvýraznění vláken, např. morfologické otevření tref-či-miň s válcovým strukturním prvkem.

Prezentované metody byly použity na vzorky mozkové tkáně obarvené perfúzí FITC-dextranu (spolupráce s Loma Linda University Hospital, Dr. J. Archambeau) a vzorky svalu obarvené pomocí protilátek (spolupráce s Anatomickým ústavem lékařské fakulty v Lublani, Prof. I. Eržen).

Grantová podpora: IAA100110502

7

SFÉROLITY

Lednický F., Pavlova E., Šlouf M.

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského náměstí 2, 16206
Praha 6

Kulové krystalické útvary se středovou symetrií - sférolity - lze najít mezi krystalickými projevy různých materiálů, anorganických i organických, od hornin až k produktům živé přírody. Snad nejpřednější místo mezi organickými materiály krystalizujícími ve sférolitické podobě zauímají materiály polymerní. U nich je sférolitická krystalizace natolik běžná, že téměř všechny krystalizující polymery vykazují tuto stavbu. Experimentálně snadné způsoby přetváření struktury syntetických polymerů jsou zřejmě příčinou toho, že jejich struktura, morfologická variabilita i příslušné mechanismy jsou podrobně propracovány. Prezentovaný příspěvek shromažďuje dostupné příklady sférolitů shora uvedených materiálů a podrobněji diskutuje strukturu, vlastnosti a vznik sférolitů polymerních. Většinu příspěvku tvoří utříděný přehled poznatků o polymerních sférolitech. Jsou uvedeny modely jejich stavby z lamelárních monokrystalů, lamelární uspořádání ve sférolitech i charakteristiky růstu sférolitů. Podrobněji je referováno o tvarech hranic srůstu a jejich významu pro charakterizaci sférolitického procesu krystalizace polymerů.

Poděkování: Akademie věd České republiky (projekt AVOZ40500505).

8

NAPĚŤOVÝ KONTRAST V ESEM

Linhart J.^{1,2}, Neděla V.², Aufrata R.²

¹ Ústav elektrotechnologie, FEKT, VUT v Brně, Údolní 53, 602 00 Brno;

² Ústav přístrojové techniky AV ČR, Královopolská 147, 612 64 Brno.

Jednou z diagnostických metod používaných v polovodičovém průmyslu je diagnostika pomocí tzv. napěťového kontrastu v rastrovací elektronové mikroskopii.

Podstatou je přivedení potenciálu (řádově jednotky až desítky voltů) na pozorovaný polovodičový materiál nebo součástku. Ta část, na kterou je tento potenciál přiveden, je v obraze zobrazeném pomocí sekundárních elektronů světlejší (nebo tmavší) než jeho okolí, které je na nulovém potenciálu. Lze tedy sledovat např. rozložení elektrických polí, vznik poruch na povrchu zkoumané součástky, přerušení vodivých cest atd.

Při pozorování elektricky nevodivých vzorků, tedy např. součástek a integrovaných obvodů obsahujících nevodivé části, dochází ke kumulaci záporného náboje na povrchu vzorku - tzv. nabíjení vzorku, které zcela znehodnocuje jakékoliv pozorování. Jednou z možností eliminace tohoto nabíjení je použití environmentální rastrovací elektronové mikroskopie.

Prezentované obrázky ukazují vývoj napěťového kontrastu na polovodičové součástce (bipolární tranzistor BCY59) po přiložení napětí na přechod emitor – báze v závěrném směru v rozmezí 0 až 9 V. Protože napěťový kontrast je pozorovatelný pouze v obraze sekundárních elektronů, byly snímky pořízeny ionizačním detektorem sekundárních elektronů a to při tlaku 400 Pa.

[1] Raimier, L.: Scanning Electron Microscopy. Berlin, Springer – Verlag, 1998, 527 p.

[2] Romanovský V., Aufrata R., Hutař O.: Voltage contrast imaging in environmental SEM. In: Proceedings of the 4th Multinational Congress on Electron Microscopy (1999). - Veszprém, p. 357-358

[3] Poděkování grantům GAČR 102/05/0886, FRVŠ 855/2006 a KJB 2006 50 602

9

KONTRAST DOPOVANÝCH OBLASTÍ V POLOVODIČI ZOBRAZENÝ SEKUNDÁRNÍMI ELEKTRONY V SEM

Mika F., Frank L.

ÚPT AV ČR

Ačkoliv je kontrast dopantu v SEM studován více než jedno desetiletí, bezsporné vysvětlení jeho vzniku prozatím nebylo publikováno. Bylo zjištěno, že p-typ křemíku je v obraze SE světlejší než n-typ. V dřívějších pracech byl vznik kontrastu připisován existenci elektrostatických polí nad [1] a pod povrchem polovodiče [2]. Nově publikovanou myšlenkou je vliv emisního úhlu signálních elektronů na kontrast [2], uplatňující se při průchodu povrchovou potenciálovou bariérou.

Mikroskop VEGA MM5130 s katodovou čočkou byl upraven pro detekci elektronů opouštějících vzorek pod určitým emisním úhlem. Systém obsahuje imersní elektrostatickou čočku tvořenou dvojicí elektrod na potenciálech $E_1 = 0V$ a $E_2 = -7 kV$, umístěných mezi roviny dolního pólového nástavce a vzorku. Energie primárního svazku je při průchodu tímto systémem postupně snižována z 10 keV až na 1 keV. Signální elektrony jsou naopak urychlovány směrem k detektoru s velmi úzkým vstupním úhlem, který je polohově nastavitelný. Zařízení bylo testováno na vzorcích s dopovanými oblastmi n-typu ($1 \times 10^{18} \text{ cm}^{-3}$, fosfor), implantovaných do Si substrátu (100) p-typu ($1 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$, bór).

Experimenty ukázaly, že pozorovaný SE kontrast je ovlivněn dávkou elektronů dopadajících na vzorek polovodičové struktury, a že v závislosti na proudu lze vyvolat i inverzi kontrastu. Dochází k ní u vzorků, které nebyly bezprostředně před vložením do vakua zbaveny spontánně narostlé oxidové vrstvy. Vývoj kontrastu v závislosti na čase a dávce elektronů bude blíže zkoumán na vzorcích s opačným sestavou typů vodivosti a s různou koncentrací dopantu.

[1] Sealy C. P., Castell M. R., Wilshaw P. R., J. Electron Microsc. 49 (2000) 311.

[2] Müllerová I., El-Gomati M. M., Frank L., Ultramicroscopy 93 (2002) 223.

[3] Tato práce je podporována grantovým projektem GA ČR č.GA102/05/2327.

10

ADDITIONAL HYDRATION METHODS FOR OBSERVATION OF WET SAMPLES IN ESEM

Neděla V., Autrata R.

Institute of Scientific Instruments ASCR, 61264 Brno, Czech Republic

Higher pressure of the water vapour creates optimum condition for the detection of SE by the secondary electron detector (SED) and ensures hydration of the water containing samples in the environmental scanning electron microscope. Some methods that enable to create and to retain high relative humidity in the specimen chamber, e.g. hydration system [1], cooled specimen holder (Peltier stage), blowing water vapour by a capillary up to specimen, utilize of agar [2], were published. However, problems with imaging of biomedical samples in „wet mode“, connected with contrast effects, resolution, magnification etc. have not been removed fully. The most serious difficulty remains in initialization of the pumping process and the initial irrigation process, during which the wetness is insufficient and the sample begins to dry. To prevent the influence of the dehydration within the initial pumping process, utilization of agar as the mean for additional hydration is advantageous. What is important, the sample must be embedded into agar, that it is surrounded with agar from all sides (excluding the position of beam impact). The specimen of small intestine could be observed without dehydration up to 50min. If the sample is only put on the agar plate, slight changes of surface structure, caused by dehydration, can be observed. For comparison, the result of the method with water vapour blowing up to sample surface was realised. Hydration conditions with the flooding of water vapour into the sample chamber have been preserved in all additional methods.

[1] Cameron R.E., Donald A.M., Journal of microscopy, vol.173 (1994) 227-237.

[2] Neděla V., Autrata R.: Fine mechanics and optics vol.4 (2004) 112-114.

[3] This work was supported by Grant Agenture of the Czech Republic, grant No. GA 102/05/0886 and and by the Academy of Sciences of the Czech Republic, Grant No. KJB 200650602

11

DLOUHODOBÉ ZMĚNY VE STRUKTUŘE CHRUPAVKY POUŽITÉ PŘI REKONSTRUKCI UŠNÍHO BUBÍNKU

Novotný R.¹, Hitari F.², Stárek I.²

¹Pracoviště mikroskopických metod LF UP Olomouc;

²klinika ORL a chirurgie hlavy a krku LF UP a FN Olomouc

Při rekonstrukci ušního bubínku se používá elastická chrupavka ušního boltce s perichondriem, které zajišťuje její výživu. Přenos zvuku takto rekonstruovaným bubínkem se dlouhodobě mění. Tyto změny se vlastnosti jsou způsobeny změnami ve struktuře použité elastické chrupavky.

Pro hodnocení struktury chrupavky jsme použili materiál odebraný při revizní operaci bubínku, při které byla také odebrána čerstvá chrupavka použitá pro srovnání morfologických vlastností buněčné i nebuněčné složky.

Materiál byl zpracován klasickým způsobem přípravy ultratenkých řezů. Pro vyhodnocení množství elastických vláken pomocí obrazové analýzy ACC (ČR) jsme použili poloténkové řezy ve světelném mikroskopu. Součástí hodnocení byla také analýza pomocí transmisního elektronového mikroskopu na ultratenkých řezech.

Při srovnání jsme zjistili, že oproti čerstvé chrupavce je struktura nebuněčné elastické složky méně kompaktní, je rozdělena do více menších kompartmentů. Stejně tak jsme zaznamenali, že lakuny chrupavky obsahují buněčné zbytky chondrocytů nebo jsou často prázdné. Zachované chondrocyty obsahují dominantní lipidové vakuoly se sekundárními lyzomy. Z literatury je známé, že se struktura elastické chrupavky mění s věkem. Podle našich zjištění stav chrupavky dlouhodobě použité jako náhrada ušního bubínku odpovídá chrupavce věkově staršího pacienta, než je skutečnost.

12

MICROSCOPIC AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF ARTICULAR SURFACES OF JOINT REPLACEMENTS

Pavlova E.¹, Dybal J.¹, Schmidt P.¹, Brunclíková M.¹, Pokorný D.², Sosna A.², Šlouf M.¹

¹Institute of Macromolecular Chemistry AS CR, Heyrovskeho nam. 2, 16206 Praha 6, Czech Republic;

²Orthopaedics Clinic, Hospital Motol, V uvalu 84, 15606 Praha 6, Czech Republic.

Total joint replacements, which are used in surgery, consist of two main parts: the first is metallic and the second is made of ultrahigh molecular weight polyethylene (UHMWPE). The articular surfaces of retrieved UHMWPE components were studied by light microscopy, scanning electron microscopy, X-ray microanalysis and infrared spectroscopy. Various kinds and levels of surface damage were found for UHMWPE's from different manufacturers. Extent of oxidative degradation depended not only on the material and its origin, but also on the distance from the articulating surface.

Acknowledgement: grant GAČR 106/04/1118.

13

STUDIUM STUPNĚ DISPERGACE VRSTVENÝCH SILIKÁTŮ V EPOXIDOVÉ MATRICI BĚHEM PŘÍPRAVY EPOXY-JÍLOVÝCH NANOKOMPOZITŮ.

Rýznarová B.¹, Zelenka J.², Lednický F.³, Vraštil J.²

¹Univerzita Pardubice, Nám. Čs. Legií 565, 53210 Pardubice;

²Synpo a.s., S. K. Neumanna 1316, 53210 Pardubice;

³Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského nám. 2, 16206 Praha 6.

Kompozitní systémy založené na dispergaci malých množství vrstvených silikátů v polymerních maticích představují novou alternativu polymerních kompozitů s výbornými mechanickými, tepelnými nebo optickými vlastnostmi. V závislosti na podmínkách jejich přípravy lze dosáhnout různých stupňů rozptýlení silikátů v dané matici, přičemž z hlediska maximálního vylepšení materiálových vlastností je žádoucí dosažení exfoliace jílu v polymeru. Pomocí metod optické a elektronové mikroskopie a metody širokoúhlého rozptylu rentgenového záření (WAXS) byl studován vliv jednotlivých fází přípravy nanokompozitů na výsledný stupeň dispergace jílu v matici.

Poděkování: MSM 0021627501

14

NOVÁ TECHNIKA KONTRASTOVÁNÍ ULTRATENKÝCH ŘEZŮ PRO TEM, KTERÁ VEDE KE ZVIDITELNĚNÍ KRYSTALICKÉ STRUKTURY UHMWPE

Synková H., Pavlova E., Hromádková J., Vlková H., Šlouf M.

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského náměstí 2, 16206
Praha 6

Polyethylen s ultravysokou molekulovou hmotností (UHMWPE) se těší již téměř půl století značné pozornosti výzkumníků i výrobců, neboť se využívá jako klíčová komponenta umělých kloubů neboli totálních endoprotéz (TJR). V průběhu několika desetiletí se jednoznačně potvrdilo, že životnost TJR je limitována především kvalitou použitého UHMWPE, kterážto závisí zejména na jeho molekulární a nadmolekulární struktuře.

Strukturu UHMWPE lze zkoumat pomocí celé řady mikroskopických, spektrálních, difrakčních i termických metod. Jednou z možností, která poskytuje přímý obraz krystalických lamel v polymeru, je transmisní elektronová mikroskopie ultratenkých kontrastovaných řezů. Klasická kontrastovací technika popsána v literatuře obsahuje je dvoukroková, přičemž první krok zahrnuje pětihodinové vaření vzorku v koncentrované chlorsulfonové kyselině, HSO_3Cl . Práce s HSO_3Cl je nepříjemná jak z hlediska bezpečnosti práce, tak z hlediska likvidace.

V naší laboratoři se podařilo vyvinout alternativní kontrastovací postup, který je pouze jednokrokový, nevyžaduje var a nahrazuje nepopulární chlorsulfonovou kyselinu o něco přijatelnějším oleem, což je směs koncentrované kyseliny sírové a SO_3 . V příspěvku budou srovnány výsledky dosažené starší, klasickou technikou a novější, námi vyvinutou technikou. Na TEM mikrofotografiích budou rovněž demonstrovány změny krystalické struktury UHMWPE v důsledku ozařování, teplelných úprav a oxidativní degradace.

Poděkování: Grant GAČR 106/04/1118; Akademie věd České republiky (projekt AVOZ40500505).

15

ANALÝZA LOKALIZACE A INTERAKCE FLUORESCENČNĚ ZNAČENÝCH MOLEKUL V ŽIVÝCH I FIXOVANÝCH LIDSKÝCH BUŇKÁCH

Vařecha M.¹, Amrichová J.¹, Zimmermann M.¹, Kozubek M.¹, Kozubek S.²

¹Centrum analýzy biomedicínského obrazu, Fakulta informatiky MU, Botanická 68a, Brno 60200; ²Laboratoř molekulární cytologie a cytometrie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno 61265.

Pro analýzu lokalizace fluorescenčních molekul z obrazových dat nasnímaných na fixovaných i živých buňkách byly zavedeny nové metody analýzy vhodné pro 2D, 3D i 4D data, které se využily ke sledování translokace některých proteinů z mitochondrie do jádra buňky během apoptotického procesu. Z výsledků je zřejmé, že jsme obdrželi jak u fixovaných tak u živých buněk v první půlhodině po iniciaci apoptózy výraznou translokaci proteinů endonukleázy G i AIF do jádra buňky. Pro detekci vzájemné interakce sledovaných molekul se zavedla metoda FRET. Námi zavedená analýza dat získaných metodou FRET se provádí z 2D, 3D nebo i 4D dat. První výsledky ukazují na pozitivní interakci mezi AIF a endonukleázou G pozorovano ve fixovaných lidských buňkách.

Tento výzkum je podporován výzkumným záměrem MŠMT číslo MSM0021622419, projekty GA ČR (číslo 202/04/0907, 204/03/D031, 204/05/P090) a projektem GA AV ČR číslo IAA1065203.

16

CHANGES IN THE DISTRIBUTION OF INTRA-MEMBRANE PROTEINS AFTER INSONATION OF THE PLASMA MEMBRANE

Vaškovicová N.¹, Škorpíková J.¹, Janisch R.²

¹ Department of Biophysics and

² Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno

The aim of preliminary experiments was to gain insight into the morphology and distribution of intra-membrane granules on plasma membrane fracture faces, visualised by freeze-etching, after exposure to therapeutic ultrasound, using a BTL-07 unit. The HL-60 human promyeloid leukaemia cells were treated with a horizontal beam of ultrasound waves in a continuous mode, at an intensity of 2 W/cm² and a frequency of 1 MHz, for 15 min.

Immediately after insonation the cells were fixed in 3% glutaraldehyde and subsequently transferred to 25% glycerol. Replicas were made in a BAF 060 BAL-TEC freeze-etching unit and viewed and photographed with a Morgagni 268D Philips transmission electron microscope. Electron micrographs were evaluated by an ACC image analysis programme (Adaptive Contrast Control).

We investigated the distribution of granules on both the protoplasmic and the exoplasmic face of the plasma membrane. In comparison with the control specimen, we observed a significant difference ($P < 0.05$) in numbers of intra-membrane granules per 0.1 μm^2 on each of the two faces. The control, non-treated specimens showed similar numbers of granules on both faces at the beginning and the end of the experiment. We also observed a change in the fracture plane of the plasma membrane lipid bilayer in the ultrasound-treated cells.

Exposure to ultrasound resulted in changes in the morphology and distribution of intra-membrane proteins on both fracture faces of the plasma membrane. It probably also led to alteration of physical characteristics of the lipid bilayer, which was manifested as an atypical uneven plane of fraction.

This study was supported by grants 305/05/2030/S and 301/03/H005 from the Grant Agency of the Czech Republic.

17

NEW BSE DETECTOR FOR LOW VOLTAGE SEM

Wandrol P.¹, Autrata R.¹

¹Institute of Scientific Instruments AS CR, Brno.

Application of a low accelerating voltage of the primary electron beam became due to its obvious advantages very popular in last decade. Instruments which are able to work with accelerating voltage of 3 keV and lower are called Low Voltage Scanning Electron Microscopes (LV SEMs). Detection of the backscattered electrons (BSEs) in LV SEM is because of their low energy very questionable. The planar YAG backscattered (BSE) detector installed under the pole piece that is the most efficient BSE detection system in SEM can not be used in LV SEM because the low energy BSEs do not produce sufficient number of photons in the scintillator and therefore signal provided by this detector is low as well as the quality of the image. This problem is adequately solved in the newest types of LV SEMs equipped by an immersion objective lens where the BSE detection performs in the objective lens by scintillation detector or by transformation of BSE to SE3.

New scintillation detector of low energy BSEs was developed at Institute of Scientific Instruments AS CR. Detector can operate at three different detection modes: BSE, signal mix BSE+SE, SE. Which mode is used depends on energy filter settings and on the detector position. Low energy BSEs are detected if there is a negative bias around -100 V on the energy filter. Signal mix BSEs + SEs is detected when the energy filter is grounded. SE image can be obtained when the detector is put out of the BSE emission angle and on the energy filter is positive bias around +300 V.

This work is supported by the Academy of Sciences of Czech Republic, grant no. KJB200650501.

ARTEFAKTY- NOČNÍ MŮRA ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPIKA

Weyda F.

Biologická fakulta Jihočeské univerzity a Biologické centrum AV ČR,
Entomologický ústav

Každý elektronový mikroskopik se permanentně setkává při své práci s artefakty. Jsou poněkud "viditelnější" než v řadě jiných vědeckých disciplín, protože zvětšení elektronových mikroskopů jim dovoluje se dost dobře "zviditelnit". Řadu jich pozná každý a patří už do oborové "klasiky": "chatter", "pepper" a další. Jiné pozná jen zkušenější badatel. A jsou další artefakty, jejichž existence (natož přesná identifikace) dlouho uniká naší pozornosti. Některé jsou dost kuriozní a vypátrání jejich původ se blíží dobré detektivce. Přitom vzniku artefaktů se nevyhneme v žádné fázi přípravy zkoumaných objektů, ani při jejich pozorování a dokonce ani při zpracování jejich zaznamenaného obrazu.

Problematika artefaktů je každému pracovníkovi v oboru elektronová mikroskopie dobře známa, není ovšem na škodu si ji občas znovu připomenout. Je řada možností, jak artefakty identifikovat a někdy i vysvětlit jejich původ. Základem práce je zpracování dostatečně velkého souboru zkoumaných objektů, abychom zachytili biologickou variabilitu. Dostatek času na takovou práci, ač je to jeden ze základních požadavků tohoto typu činnosti, může být v dnešní "uspěchané" době problém (nezanedbatelná není ani finanční náročnost). Velmi doporučovanou cestou je aplikace více různých technik přípravy objektů, abychom vyloučili co nejvíce artefaktů spojených s tou kterou technikou. Také doplnění konvenčních technik kryotechnikami se jeví jako cesta úspěšná. Korelační mikroskopie a zapojení co největšího počtu vědeckých dat (třeba morfologická data doplněná daty fyziologickými, biochemickými atd.) je zde nezbytností.

Prezentovány budou příklady některých třeba i kurioznějších artefaktů včetně historie jejich vzniku.

Práce byla podpořena grantem FRVŠ č.3633/2005 z MŠMT.

19

CHANGES OF CELL ARCHITECTURE DUE TO MOUSE POLYOMAVIRUS INFECTION

Žíla V.^{1,2}, Štokrová J.^{1,2}, Korb J.¹, Forstová J.²

¹Institute of Molecular Genetics AS CR, Flemingovo nám. 2, 166 37 Prague 6;

²Faculty of Science, Charles University in Prague, Viničná 5, 128 44 Prague 2.

Electron microscopic examination was addressed to the question of substructural changes of mouse fibroblast architecture during polyomavirus (PyV) infection. Unlike noninfected cells the nuclear compartment markedly increased its volume already during the first steps of PyV infection, when virions were internalized by the cells. After 12 hpi, large nucleoli with nucleolonemas were observed. The cytoplasmic organelles were also changed, particularly rough endoplasmic reticulum (ER) became swollen, showing increased synthesis of proteins. With progression of infection (24 hpi) the volume of nucleoli still increased and their architecture was changed from nucleolonemas to a more compact type. The finding of giant mitochondria in the cytoplasm indicated early steps of apoptosis. The first virus progeny located at specific sites of the nucleus were observed after 36 hpi. However, at the same time, some cell nuclei were filled with virions and displayed openings in the nuclear membrane. All nucleoli revealed the compact character, typical for transformed cells. The apoptosis continued by chromatin clumping, indicating its later stages. At 48 hpi, surprisingly, new virions released from cell nuclei, were found attached to intracellular membranes decorating membranous vesicles and mitochondria.

Rejstřík autorů

- Amrichová J. 15
Autrata R. 8,10,17
Bačáková L. 13
Baluška F. 3
Baumann M. 6
Berger S. 18
Bertóti I. 19
Brunclíková M. 12
Buma L. 3
Bumba L. 1
Czigány Zs. 19
Čapek M. 2
Čiampor F. 14
Čiamporová M. 15
Deanko M. 2
DeLong A. 9
Douděrová M. 13
Dybal J. 12
Eklová S. 18
Entlicher G. 18
Fenc J. 13
Forstová J. 19
Frank L. 9
Gaplovská-Kyselá K. 12
Gardian Z. 3
Gärtnerová V. 20
Grogger W. 4
Hána K. 2
Hitari F. 11
Hofer F. 4
Horák P. 4,5
Horník J. 13
Hozák P. 12
Hromádková J. 14
Cheng Y. 16
Chorvat Jr. D. 16
Chorvatova A. 16
Jäger A. 20
Janáček J. 2,6
Janičkovič D. 2.
Janisch R. 16
Kabátová J. 13
Kirchnerova J. 16
Klíma J. 7
Komenda J. 1
Korb J. 19
Kothleitner G. 4
Kozubek M. 15
Kozubek S. 15
Kubínová L. 2,6
Kumstátová J. 18
Lednický F. 7,13
Lichtscheidl I. 3,15
Linhart J. 8
Lobotka P. 19
Lopour F. 7
Mateasik A. 16
Mika F. 9
Mikeš J. 8
Müllerová I. 17
Nadubinská M. 15
Nebesářová J. 11
Neděla V. 8,10
Novák L. 17
Novotný R. 11
Ovečka M. 3
Paluga M. 2
Pavlova E. 7,12,14
Pokorný D. 18,12
Radnóczy G. 19
Rosocha J. 14
Rýznarová B. 13
Saxl I. 6
Sedláčková K. 19
Schaffer B. 4
Schauer P. 4,5
Schmidt P. 12
Smetana K. 1
Smrčka P. 2
Sosna A. 18,12
Stárek I. 11
Starý V. 13
Strádlová V. 12
Synková H. 18,14
Škorpíková J. 16
Šlouf M. 18,7,12,14
Štěpán P. 9
Štokrová J. 19
Švec P. 2
Tichý M. 1
Timko M. 14
Tolde Z. 13
Ujvári T. 19
Vacha F. 1,3
Vancová M. 11
Vařecha M. 15
Vaškovicová N. 16
Vávra I. 14,19
Vlková H. 14
Vraštil J. 13
Vystavěl T. 5
Wandrol P. 17
Weyda F. 18
Zadražil M. 7
Zelenka J. 13
Zimmermann M. 15
Žíla V. 19

Adresář účastníků

Mgr., Ing. Amrichová Jana, PhD.
Centrum analýzy biomed. obrazu
Botanická 68a
602 00 Brno
Tel.: 549496696
e-mail.: amrich@fi.muni.cz

Dr. Baumann Manfred
MB science servis
Hodrusha Hamre 485
SK-96663 Hodrusha
Tel. 421456844083
e-mail:
mbssbaumann@bb.telecom.sk

Bumba Ladislav, PhD.
MBÚ AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062141
e-mail.: bumba@biomed.cas.cz

Ing. Čapek Martin, PhD.
FGÚ AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 296442334
e-mail: capek@biomed.cas.cz

Mgr. Čerňavský Alexandr
FGÚ AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 296442274
e-mail.: kubnova@biomed.cas.cz

Prof., MUDr. Čiampor Fedor, DrSc.
Virologický ústav SAV
Dúbravská cesta 9
845 05 Bratislava
Tel.: 421259302401
e-mail.: ciampor@up.opsav.sk

RNDr. Čiamporova Milada CSc.
Botanický ústav SAV
Dúbravská cesta 14
845 23 Bratislava
Tel.: 421259426114
e-mail:
milada.ciamporova@savba.sk

Prof. Delong Armín
Delong Instruments a. s.
Bulharská 48
612 00 Brno
Tel.: 541122530
e-mail:
armin.delong@dicomps.com

Dvořák Pavel
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062718
e-mail: pavel@biomed.cas.cz

Ing. Dzijak Rastislav
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062579
e-mail: dzijak@biomed.cas.cz

RNDr. Frank Luděk, DrSc.
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514204
e-mail: ludek@isibrno.cz

Mgr. Filimoněnko Anatolij
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062597
e-mail: tolja@biomed.cas.cz

Mgr. Fulková Helena
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062597
e-mail: fulkova@biomed.cas.cz

Ing. Gardian Zdeno
BC AVČR
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Tel.: 387775522
e-mail: gardian@greentech.cz

Ing. Gärtnerová Viera
FZÚ AV ČR
Na Slovance 2
182 21 Praha 8
Tel.: 266052146
e-mail: gartner@fzu.cz

RNDr. Gemperlová Juliana, CSc.
FZÚ AV ČR
Na Slovance 2
182 21 Praha 8
Tel.: 266052146
e-mail: gemper@fzu.cz

Prof. Hofer Ferdinand
Research Institute for Electron
Microscopy
Graz University of Technology
Steyrergasse 17
A-8010 Graz Austria
Tel.0043 (0)316 873 8820
e-mail: ferdinand.hofer@TUGraz.at

Mgr. Hora Jaroslav, PhD.
FEI Czech Republic
Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311308
e-mail: jhora@cz.feico.com

Ing. Horáček Miroslav, PhD.
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514318
e-mail: mih@isibrno.cz

Ing. Horák Petr
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514324
e-mail: horak@isibrno.cz

Ing. Horník Jakub
ČVUT Praha -fakulta strojní
Technická 4
166 07 Praha 6
Tel.: 224357531
e-mail: jakub.hornik@fs.cvut.cz

Doc. RNDr. Hozák Pavel, DrSc.
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062219
e-mail: hozak@biomed.cas.cz

Hromádková Jiřina
ÚMCH AV ČR
Heyrovského nám. 2
162 06 Praha 6
Tel.: 296809273
e-mail: hromadko@imc.cas.cz

Doc., Ing. Hůlek Zbyněk, CSc.
Vakuum servis s.r.o.
Zvonařská 885
156 00 Praha 5 –Zbraslav
Tel.: 257924300
e-mail: zbynek.hulek@iol.cz

Mgr. Hyliš Miroslav
PřF UK
Viničná 7
128 44 Praha
Tel.: 221951942
e-mail: lem@natur.cuni.cz

RNDr. Chorvát Dušan, PhD.
Medzinár. laserové centrum
Ilkovočova 3
812 19 Bratislava
Tel.: 421264421575
e-mail: dušan@ilc.sk

Ing. Chrástka Tomáš, PhD.
ÚFP AV ČR
Za Slovankou 3
182 00 Praha
Tel.: 266053307
e-mail: tchrastka@ipp.cas.cz

RNDr. Janáček Jiří, DrSc.
FGÚ AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel: 241062768
e-mail: janacek@biomed.cas.cz

Prof. MUDr. Janisch Roman, DrSc.
BÚ LF MU
Joštova 10
662 43 Brno
Tel.: 542126268
e-mail: rjanisch@med.muni.cz

Jelínková Iva
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062597
e-mail: ivaje@biomed.cas.cz

MUDr. Kahle Michal
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
14220 Praha 4
Tel.: 241062764
e-mail: michalkahle@atlas.cz

Ing. Klíma Jaroslav
Tescan, s.r.o.
Libušina třída 11
623 00 Brno
Tel.: 547130412
e-mail: klima@tescan.cz

Ing. Kovačič Vladimír, EUR Ing
Hálkova 6
TU Liberec
461 17 Liberec
Tel.: 485353280
e-mail: vladimir.kovacic@vslib.cz

RNDr. Kubínová Lucie, CSc.
FGÚ AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062314
e-mail: kubinova@biomed.cas.cz

Doc. RNDr. Lednický František
ÚMCH AV ČR
Heyrovského náměstí 2
162 06 Praha 6
Tel.: 296809310
e-mail: ledn@imc.cas.cz

Ing. Linhart Jan
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514333
e-mail: linhart@isibrno.cz

Lukešová Věra
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062764
e-mail: lukesova@biomed.cas.cz

Ing. Mika Filip
UPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514298
e-mail: fumici@isibrno.cz

Milučká Jana
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062764
e-mail: milucka@biomed.cas.cz

RNDr. Moško Tibor
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062597
e-mail: mosko@biomed.cas.cz

Ing. Mráz Maroš
FEI Czech Republic
Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311312
e-mail: mmraz@cz.feico.com

Ing. Müllerová Ilona DrSc.
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514300
e-mail: ilona@isibrno.cz

Mgr. Nadubinská Miriam, PhD.
Botanický ústav SAV
Dúbravská cesta 14 845 23
Bratislava
Tel.: 42125926102
e-mail:
miriam.nadubinska@savba.sk

Ing. Nebesářová Jana, CSc.
PaÚ AV ČR
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Tel.: 387775402
e-mail: nebe@paru.cas.cz

Ing. Neděla Vilém
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514333
e-mail: vilem@isibrno.cz

Mgr. Novák Libor
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514298
e-mail: kdovikdo@email.cz

Nováková Ivana
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062597
e-mail: inovakova@biomed.cas.cz

Mgr. Nováková Zora
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062764
zora@biomed.cas.cz

RNDr. Novotný Radko, PhD.
LF pracoviště mikroskop. Metod
I.P. Pavlova 35
775 20 Olomouc
Tel.: 585854521
e-mail: rnovot@centrum.cz

RNDr. Očadlík Jiří
FEI Czech Republic s.r.o
Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311101
e-mail: jo@cz.feico.com

Mgr. Ovečka Miroslav, PhD.
Botanický ústav SAV
Dúbravská cesta 14
845 23 Bratislava
Tel.: 421259426102
e-mail: miroslav.ovecka@savba.sk

Ing. Pavlová Ewa
ÚMCH AV ČR
Heyrovského nám. 2
162 06 Praha 6
Tel.: 296809310
e-mail: bogdan@imc.cas.cz

Pišlová Lenka
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062597
e-mail: pislova@biomed.cas.cz

RNDr. Podbrdský Josef, CSc.
FEI Czech Republic
Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311318
e-mail: jpodbrds@cz.feico.com

Mgr. Pokorná Zuzana
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514316
e-mail: zuza@isibrno.cz

Mgr. Polouček Pavel
FEI Czech Republic
Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311312
e-mail: ppol@cz.feico.com

Ing. Přerovský Richard
FEI Czech Republic
Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311312
e-mail: rpre@cz.feico.com

Přidalová Jarmila
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062697
e-mail: pridalova@biomed.cas.cz

Mgr. Rossmeislová Lenka
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062764
e-mail: ljana@biomed.cas.cz

Ing. Rýznarová Blanka
UP FCHT
Nám.Čs.Legii 565
532 10 Pardubice
Tel.: 466037186
e-mail: b.ryznarova@post.cz

Mgr. Sed'a Bohuslav
FEI Czech Republic s.r.o
Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311237
e-mail: bseda@cz.feico.com

Ing .Sedláčková Katarína, PhD.
Ústav tech.fyziky a mat.výzkumu
Konkoly-Thege M. út.29-33
1121 Budapest
Tel.: 3613922225
e-mail: sedlacek@mfa.kfki.hu

RNDr. Schauer Petr, DrSc.
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514313
e-mail: petr@isibrno.cz

Ing. Skřivánek Jaroslav, PhD.
FEI Czech Republic
Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311312
e-mail: pskrivan@cz.feico.com

RNDr. Starý Vladimír, CSc.
ÚMI ČVUT Praha
Karlovo náměstí 13
121 35 Praha 2
Tel.: 224357273
e-mail: vladimir.stary@fs.cvut.cz

Mgr. Strádalová Vendula
ÚEM AV ČR
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062697
e-mail: stradal@biomed.cas.cz

Ing. Synková Hana
ÚMCH AV ČR
Heyrovského náměstí 2
162 06 Praha 6
Tel.: 296809268
e-mail: synkova@imc.cas.cz

Mgr. Šafářová Klára
UP Kat.exp.fyziky
tř. 17.listopadu 50
771 46 Olomouc
Tel.: 777981000
e-mail: safarova.k@seznam.cz

Doc.RNDr.Škorpíková Jiřina
BFU LF MU
Kamenice 3
625 00 Brno
Tel.: 549497667
e-mail: jskorpik@med.muni.cz

RNDr. Šlouf Miroslav PhD.
ÚMCH AV ČR
Heyrovského náměstí 2
162 06 Praha 6
Tel.: 296809291
e-mail: slouf@imc.cas.cz

Mgr. Štencel Mikuláš
FGÚ AV ČR
Víteňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 296442334
e-mail: mikulas.stencel@gmail.com

Ing. Švec Peter, DrSc.
FU SAV
Dúbravská cesta 9
845 11 Bratislava
Tel.: 421259410561
e-mail: fyzisvec@savba.sk

Mgr. Vancová Marie
PaÚ AV ČR
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Tel.: 387775938
e-mail: vancova@paru.cas.cz

Mgr. Vařecha Miroslav, Ph.D.
Fakulta informatiky MU
Botanická 68a
602 00 Brno
Tel.: 549493024
e-mail: varecha@fi.muni.cz

Mgr. Vaškovičová Naděžda
BFU LF MU
Kamenice 3
625 00 Brno
Tel.: 549492890
e-mail: nvaskovicova@seznam.cz

Ing. Vávra Ivo, CSc.
ELÚ SAV
Dúbravská cesta 9
841 04 Bratislava
Tel.: 421254775806
e-mail: elekvavr@savba.sk

Mgr. Vlasáková Jana
ÚEM AV ČR
Víteňská 1083
142 20 Praha 4
Tel.: 241062764
e-mail: janavlas@biomed.cas.cz

Vlková Helena
ÚMCH AV ČR
Heyrovského nám. 2
162 06 Praha 6
Tel.: 296809268
e-mail: vlkova@imc.cas.cz

Ing. Vystavěl Tomáš, PhD.
FEI Czech Republic
Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311312
e-mail: tvystave@cz.feico.com

Ing. Wandrol Petr
ÚPT AV ČR
Královopolská 147
612 64 Brno
Tel.: 541514298
e-mail: wandrol@isibrno.cz

RNDr. Weyda František, CSc.
Entomol. Úst. AV ČR
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Tel.: 387775257
e-mail: weyda@entu.cas.cz

Žíla Vojtěch
ÚMG AV ČR, PřF UK
Flemingovo náměstí 2
166 37 Praha 6
Tel.: 220183350
e-mail: vojzilla@gmail.com

Adresář firem

Carl Zeiss s.r.o.

Thákurova 4/531
160 00 Praha 6 Dejvice
Tel.: 233101221
e-mail: berkova@zeiss.cz,
jahoda@zeiss.cz

Diagenes s.r.o.

Nad Safinou II 365
252 42 Jesenice - Vestec
Tel.: 261090572
e-mail: diagenes@diagenes.cz,
vosahlova@diagenes.cz

Edlin s.r.o.

Koněvova 141
130 83 Praha 3
Tel.: 267108255
e-mail: zemek@edlin.cz

FEI Czech Republic s.r.o.

Podnikatelská 6
612 00 Brno
Tel.: 533311101
e-mail: info@cz.feico.com

Jeol (Europe) s.a.

ČVUT FSI
Karlovo náměstí 13
121 35 Praha 2
Tel.: 224916714
e-mail: zuzana@jeol.fr

Labimex s.r.o.

Na Zámecké 11
140 00 Praha 4
Tel.: 241740119
e-mail: gaba@labimex.cz

Laboratory Imaging s.r.o.

Za drahou 171/17
102 00 Praha 10
Tel.: 272081400
e-mail: josef.mikes@lim.cz

MB Science Servis

Hodrusha Hamre 485
SK-96663 Hodrusha
Tel.: 421 456844083
e-mail:
mbssbaumann@bb.telecom.sk

Mikro s.r.o.

Dolnokrčská 54
140 00 Praha 4 Krč
Tel.: 267108255
e-mail: rous@leica-mikro.cz

Olympus C&S s.r.o.

V Jirchářích 10
111 21 Praha 1
Tel.: 221985211
e-mail: mikroskopy@olympus.cz

Optoteam s.r.o.

Kyjevská 6
160 00 Praha 6
Tel.: 224315650
e-mail: ivan.rozkosny@optoteam.cz

Tescam s.r.o.

Libušina třída 21
623 00 Brno
Tel.: 547130411
e-mail: klima@tescan.cz

Vakuum servis s.r.o.

Hasičská 2643
756 61 Rožnov pod Radhoštěm
Tel.: 571842314
e-mail: kuban@vakuum-servis.cz