

ЛЕКЦІЯ № 2

Тема: Мікроскоп і техніка мікроскопіювання

План:

1. Мікроскопія.
2. Різновиди мікроскопів.
3. Сучасні лабораторні методи мікроскопії

Діаметр типової клітини тварин становить 10-20 мкм. Тільки з появою удосконалених світлових мікроскопів на початку XIX століття вдалося встановити той факт, що всі тканини тварин і рослин складаються з окремих клітин. Це відкриття, узагальнене в формі клітинної теорії Шлейденом і Шванном в 1838 році, знаменує собою початок клітинної біології.

Будучи надзвичайно малими за розмірами, тваринні клітини до того ж безбарвні і прозорі; отже, відкриття їх основних структур стало можливим завдяки розробці набору барвників в кінці XIX століття. Саме барвники забезпечили достатній контраст для спостереження субклітинних структур.

Схожа ситуація спостерігалася на початку 40-х років XX століття, коли винахід потужного електронного мікроскопа зажадало нових методів збереження і забарвлення клітин. І тільки після того, як вони були розроблені, почала проявлятися вся складність клітинної структури.

В основі мікроскопії як методології досі лежать способи приготування зразка і можливості самого мікроскопа.

Мікроскоп (від лат. *Micros* - малий і *scopein* - розглядати, спостерігати) - прилад, що дозволяє отримувати збільшене зображення об'єктів і структур, недоступних для людського ока.

Мікроскопічні методи дослідження - способи вивчення різних об'єктів за допомогою мікроскопа.

У біології та медицині ці методи дозволяють вивчати будову мікроскопічних об'єктів, розміри яких лежать за межами роздільної здатності ока людини.

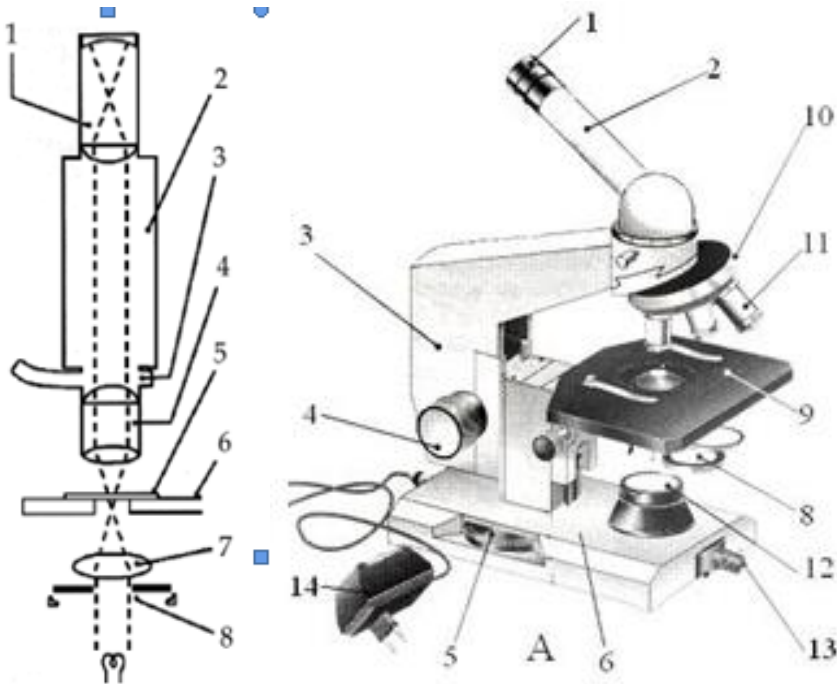
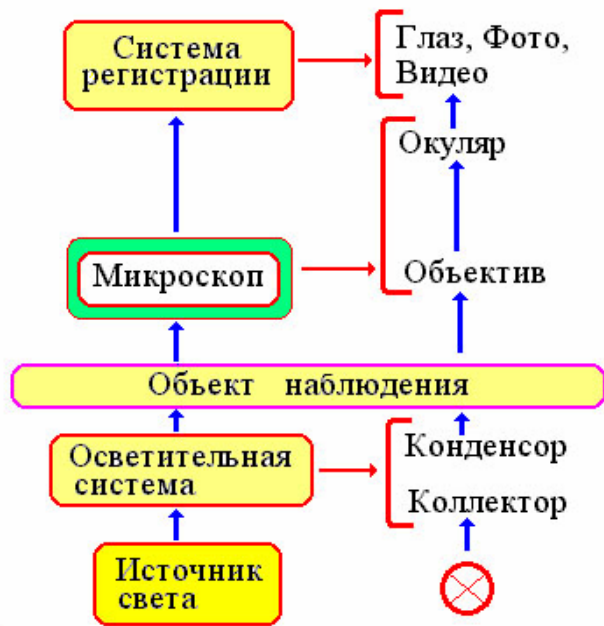
Основу мікроскопічних методів дослідження становить **світлова та електронна мікроскопія**.

Світлові мікроскопи збільшують об'єкт більш ніж у **1500** разів, а **електронні** мікроскопи - більш ніж у **20 000** разів.

У практичній і науковій діяльності вірусологи, мікробіологи, цитології, морфологи, гематологи і ін. крім звичайної світлової мікроскопії використовують фазово-контрастну, інтерференційну, люмінесцентну, поляризаційну, стереоскопічну, ультрафіолетову, інфрачервону мікроскопію. В основі цих методів лежать різні властивості світла.

Світлова мікроскопія ґрунтується на законах геометричної оптики і хвильової теорії утворення зображення.

Загальна блок-схема світлового мікроскопа:



1 — окуляр, 2 — тубус, 3 — тубусутримувач, 4 — гвинт грубого наведення, 5 — мікрометрений гвинт, 6 — підставка, 8 — конденсор, ірисова діафрагма і світлофільтр, 9 — предметний столик, 10 — револьверний пристрій, 11 — об'єктив, 12 — корпус колекторної лінзи, 13 — патрон з лампою, 14 — джерело електроживлення.

Світлові мікроскопи

Мікроскопи плаского поля (двовірні зображення об'єкта)

Мікроскопи стереоскопічні (об'ємне або тримірне зображення об'єкта)

Групи мікроскопів:

- Біологічні (із прохідним світлом);
- Інвертовані (із прохідним світлом);

- Люмінесцентні;
- Поляризаційні (із прохідним світлом);
- Аналізатори зображення;
- Стереоскопічні.

Групи мікроскопів за ступенем складності:

- Навчальні;
- Рутинні;
- Робочі;
- Лабораторні;
- Дослідницькі

Біологічний мікроскоп призначений для спостереження в світлі в світлому полі забарвлених і нефарбованих мазків крові, препаратів кісткового мозку, опадів сечі, клітинних концентратів, тканинних біотипів, гістологічних зрізів в спеціальних камерах і ін. При застосуванні фазово-контрастних пристроїв, конденсорів темного поля і косоного освітлення можливе спостереження мало-контрастних препаратів.

При гематологічному дослідженні мікроскоп дозволяє виробляти:

- Оглядовий перегляд препаратів крові і кісткового мозку,
- Диференціювання клітин крові за формою, структурою ядра і цитоплазми,
- Виявлення нормальних і патологічних еритроцитів,
- Виявлення малодиференційованих і атипичних клітин,
- Підрахунок формених елементів крові,
- Визначення лейкоцитарної формули та ін.

Найбільш поширеними в медико-біологічній практиці є **мікроскопи прохідного світла плоского поля**.

За допомогою мікроскопів прохідного світла плоского поля можна розглядати прозорі і напівпрозорі об'єкти

Товщина об'єкта для мікроскопів плоского поля має важливе значення, тому що це пов'язано зі здатністю біологічного об'єкта (препарату) до поглинання, відображення та пропускання світла. Безглуздо розглядати в мікроскопі прохідного світла об'єкт, який через свою товщину поглинає 80-90% світла або стільки ж відображає. Крім того, товщина об'єкта повинна бути такою, щоб оптичні елементи мікроскопа (і в першу чергу об'єктив) забезпечили розпізнавання об'єкта і розрішення складових його структур, а також найбільш точно відтворення геометричних параметрів об'єкта в площині в межах поля бачення, а по глибині - в межах глибини різкості об'єктива.

2. Види мікроскопів: Лабораторні мікроскопи



Мікроскоп монокулярний



Мікроскоп бінокулярний

Лабораторні мікроскопи призначені для спостереження та морфологічних досліджень препаратів в світлі за методом світлого поля, а також за методом темного поля з конденсором. На мікроскопі можна вивчати забарвлені і нефарбовані біологічні об'єкти у вигляді мазків і зрізів.

Люмінесцентні мікроскопи



Мікроскоп тринокулярний люмінесцентний призначений для досліджень мало контрастних клітинних культур тканин, осадів рідин і т.п., які перебувають у спеціальному посуді. Дослідження об'єктів проводяться в світлі за методом світлого поля і фазового контрасту, а також в світлі видимої люмінесценції.

Поляризаційні мікроскопи



Призначені для візуального спостереження і дослідження непрозорих об'єктів у відбитому поляризованому і звичайному світлі, а також прозорих об'єктів у світлі при малих збільшеннях. Пряма будова мікроскопу дозволяє досліджувати тільки тонкі плоскі об'єкти.

Цифрові мікроскопи



Широко застосовуються в біології, хімії, медицині. Цифровий мікроскоп передає зображення на вбудований ЖК-дисплей. Через USB з'єднання зображення можна передавати на екран комп'ютера або ноутбука - це робить процес дослідження зручним і наочним навіть для групи спостерігачів (цифрове збільшення до 500 крат).

3. Сучасні лабораторні методи мікроскопії

Метод світлого поля і його різновиди

Метод світлого поля в прохідному світлі

Основні характеристики мікроскопів прохідного світла плоского поля

Характерні ознаки	Обмеження у застосуванні
-------------------	--------------------------

об'єкт спостереження є спеціально приготований препарат у відповідності із прийнятими методами мікроскопіювання	• товщина об'єкта спостереження обмежена
об'єктиви розташовані над препаратом	• робоча відстань об'єктива малих збільшень (до 10х) - до 10 мм, середніх збільшень (до 40х) - до 2 мм, великих (до 100х) - до 0,07 мм
джерело світла розташовано під препаратом	• великі числові апертури об'єктивів обмежують глибину різкого огляду
максимальна товщина препарату 0,5 мм (або разом із покривним склом)	
об'єктиви розраховані на роботу із покривним та/або без покривного скла товщиною 0,17 мм (максимально 0,5 мм при роботі із камерою Горяєва)	

Біологічні об'єкти (препарати) у мікроскопах прохідного світла плоского поля:

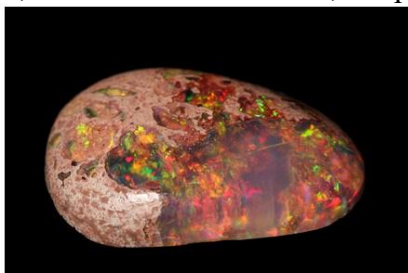
		
Гладка м'язова тканина	Кісткова тканина	Клітини крові
Застосовується при вивченні прозорих препаратів з включеними в них абсорбуючими (поглинаючими світло) частками і деталями, тому на світлому фоні видно більш темне зображення об'єкта. Це можуть бути, наприклад, тонкі забарвлені зрізи тваринних і рослинних тканин.		

Метод косо́го освітлення - різновид попереднього методу.



Відмінність між ними полягає в тому, що світло на об'єкт направляють під великим кутом до напрямку спостереження. Іноді це допомагає виявити «рельєфність» об'єкту за рахунок утворення тіней. Застосовують для розгляду об'єктів з нерівним за товщиною контуром на сірому тлі.

Метод світлого поля у відображеному світлі застосовується при дослідженні непрозорих об'єктів, що відбивають світло, наприклад, шлифів металів або руд



Метод темного поля і його різновиди

Метод темного поля в прохідному світлі використовується для отримання зображень прозорих неабсорбуючих об'єктів, які не можуть бути видимі, якщо застосувати метод світлого поля. Темнопольна мікроскопія заснована на здатності мікроорганізмів сильно розсіювати світло. Для темнопольної мікроскопії користуються звичайними об'єктивами і спеціальними **темнопольними конденсорами**. Принцип роботи наступний. Світло від освітлювача проходить через спеціальний конденсор темного поля, який формує пучок променів у вигляді порожнього конуса і направляє його на досліджуваний препарат. Основна частина променів проходить повз об'єктива, а зображення формується тільки світлом, розсіяним неоднорідною структурою зразка. В поле зору мікроскопа на темному тлі відображаються світлі ділянки структури препарату і великі частки зі світлими краями, що мають відмінний від навколишнього середовища показник заломлення.

Основна особливість темнопольних конденсоров полягає в тому, що центральна частина у них затемнена, і прямі промені від освітлювача в об'єктив мікроскопа не потрапляють. Об'єкт висвітлюється косими бічними променями, і в об'єктив мікроскопа потрапляють тільки промені, розсіяні частинками, що знаходяться в препараті. Темнопольна мікроскопія заснована на ефекті Тиндала, відомим прикладом якого служить виявлення порошинок у повітрі при висвітленні їх вузьким променем сонячного світла.

При темнопольній мікроскопії мікроорганізми яскраво світяться на чорному тлі. При цьому способі мікроскопії можуть бути виявлені дрібні мікроорганізми, розміри яких лежать за межами роздільної здатності мікроскопа. Однак темнопольна мікроскопія дозволяє побачити тільки контури об'єкта, але не дає можливості вивчити внутрішню структуру.



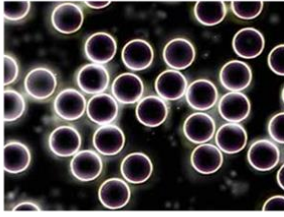
Лептоспіра в темному полі

Зображення мікрооб'єктів при темнопольній мікроскопії

Приклад: Сканування краплі живої крові на **темнопольному мікроскопі:**

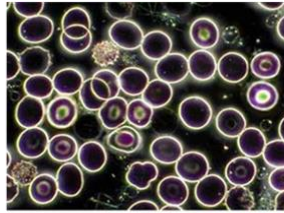
У цьому методі використовується той факт, що протягом близько 20 хвилин після забору окремої краплі крові клітини, що містяться в ній продовжують жити. Тому можна, використовуючи мікроскоп темного поля і працюючи на великому збільшенні, проводити спостереження за станом живої крові.

Конденсор темного поля дає можливість падати світлу на пробу крові з боку. Таким чином, клітини і різні компоненти світяться на темному тлі. Це дає можливість чітко побачити найдрібніші частинки, навіть менше клітини, які можна побачити в звичайний оптичний мікроскоп. Фон - темний, бо світло з конденсора проходить близько об'єктива, а не прямо через нього. Єдине видиме світло - це світло, відбите зі сторони і з поверхні частинок. Те, що видно, це світяться межі клітин або яскраві об'єкти (мікроорганізми, кристали і т.п.) на чорному тлі.

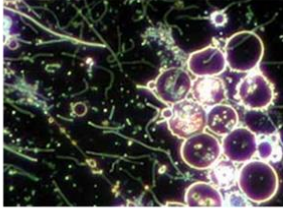


Нормальна кров

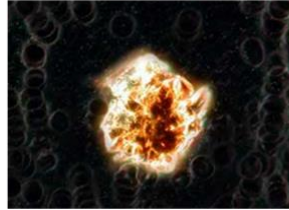
Клітини приблизно однакового розміру, що не склеюються одна з іншою.



Клітини у вигляді мішені. Показують погане засвоєння поживних речовин.



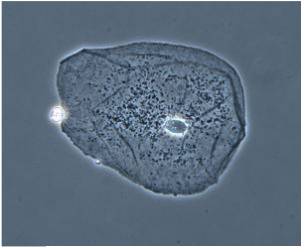
Хондрит: форма палички. Розпад червоних кров'яних клітин і вивільнення альбуміну і глобіну створюють волокнисті білки.



Червоні кристали. Містять актиноміцин і є показником інфекції в нижньому кишечнику.

Метод фазового контрасту

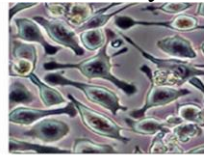
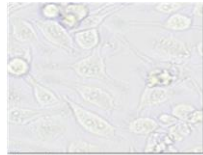
Призначений для отримання зображень прозорих і безбарвних об'єктів, невидимих при спостереженні за методом світлого поля. До таких належать, наприклад, живі незабарвлені тканини тварин). За результатами контраст живих нефарбованих мікроорганізмів різко збільшується, і вони виглядають темними на світлому фоні (позитивний фазовий контраст) або світлими на темному фоні (негативний фазовий контраст).



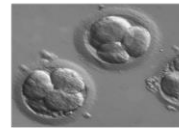
Ця мікроскопія особливо популярна в біології, оскільки не вимагає попереднього фарбування клітини, через яке та може загинути. У цих випадках часто застосовують біологічні мікроскопи із зворотним розташуванням оптики, коли об'єктиви розташовані знизу, а конденсор – зверху.

Суть методу : при проходженні світла через живу клітину фаза світлової хвилі змінюється згідно з коефіцієнтом рефракції клітини: світло, що проходить через відносно товсті ділянки клітини, такі, як ядро, затримується, і його фаза відповідно зсувається по відношенню до фази світла, що проходить через відносно тонкі ділянки цитоплазми.

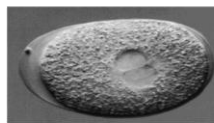
В результаті між променями, що пройшли через об'єкт, і променями світлового фону виникає різниця довжини хвилі. Якщо ця різниця становить не менше $1/4$ довжини хвилі, то з'являється зоровий ефект, при якому темний об'єкт чітко видно на світлому тлі.



Живі клітини у світло-польному освітленні (а) і фазовому контрасті (б)



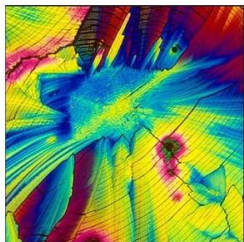
Ембріони людини



Діатомова водорість

Поляризаційна мікроскопія

Це метод спостереження в поляризованому світлі для мікроскопічного дослідження препаратів, що включають оптично анізотропні елементи (або цілком складаються з таких елементів). Такими є деякі тваринні і рослинні тканини та ін.

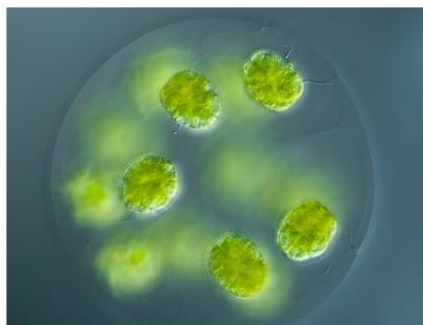


Така мікроскопія забезпечує кольорове, чітке і контрастне зображення на сірому або темному фоні.

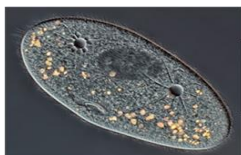
Спостереження можна проводити як у прохідному, так і у відбитому світлі. Світло, що випромінюється освітлювачем, пропускають через поляризатор. Повідомлена йому при цьому поляризація змінюється при подальшому проходженні світла через препарат (або віддзеркаленні від нього). Ці зміни вивчаються за допомогою аналізатора і різних оптичних компенсаторів.

Метод інтерференційного контрасту

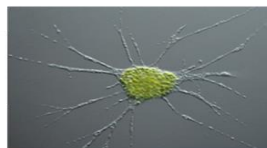
Полягає в тому, що кожен промінь роздвоюється, входячи в мікроскоп. Один з отриманих променів прямує крізь спостережувану частку, інший – повз неї по тій же або додатковій оптичній гілці мікроскопа. В окулярній частині мікроскопу обидва променя з'єднуються й інтерферують між собою.



Один з променів, проходячи через об'єкт, запізнюється по фазі (набуває різниці ходу в порівнянні з другим променем). Величина цього запізнювання вимірюється компенсатором. Можна сказати, що метод інтерференційного контрасту схожий з методом фазового контрасту - вони обидва засновані на інтерференції променів, що пройшли через мікрочастинку і минули її. Як і фазово-контрастна мікроскопія, цей метод дає можливість спостерігати прозорі і безбарвні об'єкти, але їх зображення можуть бути і різнокольоровими (інтерференційні кольори). Обидва методи придатні для вивчення живих тканин і клітин.



Інфузорія
туфелька

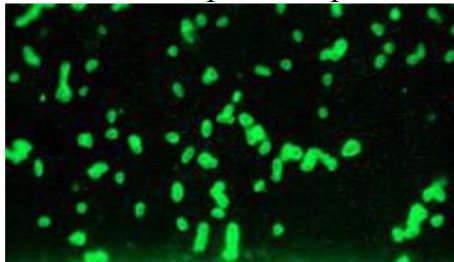


Дендритна
клітина

Люмінесцентна мікроскопія, або флуоресцентна мікроскопія

Ця мікроскопія заснована на здатності деяких речовин люмінесцирувати, тобто світитися при висвітленні невидимим ультрафіолетовим або синім світлом.

При збудженні люмінесценції синім світлом, колір її може бути від зеленого до червоного, якщо люмінесценція збуджується ультрафіолетовим випромінюванням, то світіння може бути в будь-якій частині видимого спектру. Ця особливість люмінесценції дозволяє, використовуючи спеціальні світлофільтри, які поглинають збудливе світло, спостерігати порівняно слабке люмінесцентне свічення.

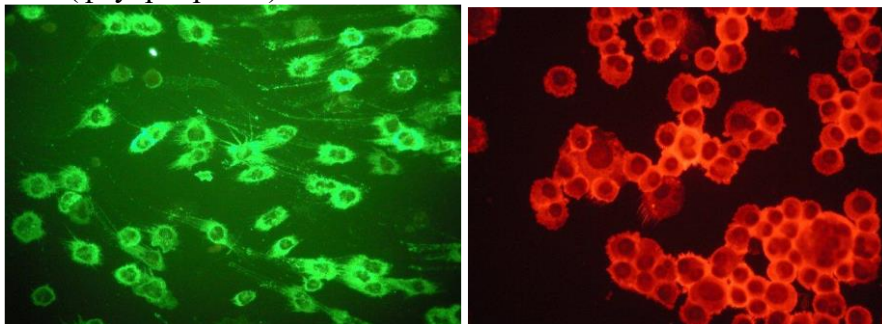


Препарат рикетсій у люмінесцентному мікроскопі

Пристрій флуоресцентного мікроскопа і правила роботи з ним відрізняються від звичайного світлового мікроскопа в основному наступним: в оптичну схему мікроскопа вводяться два світлофільтри. Один з них поміщають перед конденсором. Він пропускає від джерела-освітлювача

випромінювання лише ті довжини хвиль, які збуджують люмінесценцію або самого об'єкта (власна люмінесценція), або спеціальних барвників, уведених у препарат і поглинутих його частинками (вторинна люмінесценція). Другий світлофільтр, який встановлений після об'єктива, пропускає до ока спостерігача тільки світло люмінесценції. Люмінесцентний мікроскоп встановлюють у затемненій частині кімнати на міцному столі. Слід виключити вібрацію, повинна бути хороша вентиляція

Оскільки більшість мікроорганізмів і клітини крові не мають власної люмінесценції, існує кілька способів їх обробки для спостереження в флуоресцентному мікроскопі. Перш за все, це флуорохромування - фарбування сильно розведеними (до декількох мікрограмів / мл) розчинами флуоресціюючих барвників (флуорохромів).



Стереоскопічна мікроскопія

Для дослідження об'ємних об'єктів використовують **стереоскопічну** мікроскопію. Конструкція стереоскопічних мікроскопів дозволяє бачити об'єкт дослідження правим і лівим оком під різними кутами. Досліджують непрозорі об'єкти при відносно невеликому збільшенні (до 120 разів). Стереоскопічна мікроскопія знаходить застосування в мікрочірургії, в патоморфології при спеціальному вивченні матеріалу біопсії, операційного та секційного матеріалу, в судово-медичних лабораторних дослідженнях.



Морський хробак

Око креветки

Цифрові мікроскопи



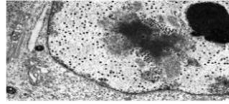
Широко застосовуються в біології, хімії, медицині. Цифровий мікроскоп передає зображення на вбудований ЖК-дисплей. Через USB з'єднання зображення можна передавати на екран комп'ютера або ноутбука - це робить процес дослідження зручним і наочним навіть для групи спостерігачів (цифрове збільшення до 500 крат).

Електронна мікроскопія

Для вивчення на субклітинному і макромолекулярному рівнях структури клітин, тканин мікроорганізмів і вірусів використовують електронну мікроскопію. Вона застосовується в морфології, мікробіології, вірусології, біохімії, онкології, генетики, імунології. Різке підвищення роздільної здатності електронного мікроскопа забезпечується потоком електронів, що проходять в вакуумі через електромагнітні поля, створювані електромагнітними лінзами. Електрони можуть проходити через структури досліджуваного об'єкта (трансмісійна електронна мікроскопія) або відбиватися від нього (скануюча електронна мікроскопія), відхиляючись під різними кутами, в результаті чого виникає зображення на люмінесцентному екрані мікроскопа. При трансмісійній (просвічуваній) електронній мікроскопії отримують площинне зображення структур (рис.), при скануючій - об'ємне (рис.).

При трансмісійній (просвічуваній) електронній мікроскопії отримують:

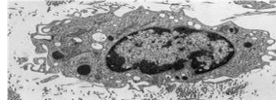
✓ **площинне зображення структур**



Специфічні аденовірусні включення в ядрі клітини через 24 години після інфікування аденовірусом



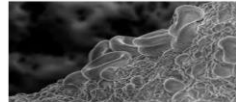
Зріз мітохондрії підшлункової залози



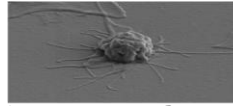
Макрофаг

При скануючій електронній мікроскопії отримують:

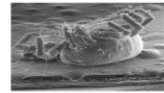
✓ **об'ємне**



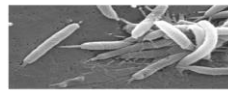
Фібриновий згусток у крові



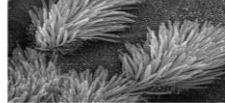
Активований тромбоцит з імобілізованим фібриногеном



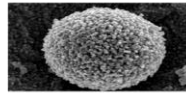
Кліца



Хелікобактер



Епітелій з трахеї



Пилко рослин

Електронна мікроскопія вимагає спеціальної підготовки об'єктів дослідження, зокрема хімічної або фізичної фіксації тканин і мікроорганізмів. Біопсійний матеріал і секційний матеріал після фіксації зневоднюють, заливають в епоксидні смоли, ріжуть скляними або алмазними ножами на спеціальних ультратомах, що дозволяють отримувати ультратонкі зрізи тканин товщиною 30-50 нм. Їх контрастують і потім вивчають в електронному мікроскопі. У скануючому (растровому) електронному мікроскопі вивчають поверхню різних об'єктів, напильюючи на них у вакуумній камері електронно-щільні речовини, і досліджують так звані репліки, що повторюють контури зразка





Схематично показаний метод приготування репліки з поверхні зразка (підкреслення металом). Товщина шару металу визначається контуром поверхні вихідного зразка.

Для отримання зображення в електронному мікроскопі, що просвічує, використовують електрони, що проходять через зразок, а в скануючому електронному мікроскопі використовуються електрони, що розсіюються або випромінюються поверхнею зразка. В останньому випадку зразок повинен бути зафіксований, висушений і покритий тонкою плівкою важкого металу. Потім зразок сканується дуже вузьким пучком електронів. При цьому оцінюють кількість електронів, що розсіюються при опроміненні послідовних точок металевої поверхні. Отримане значення використовують для контролю інтенсивності другого променя, що рухається синхронно першому і формує зображення на телевізійному екрані. Таким чином відбувається формування єдиного, цілісного і значно збільшеного зображення.

Оскільки масштаби розсіювання електронів визначаються кутом поверхні по відношенню до променя, на зображенні виникають світлі і темні ділянки, що чергуються і створюють враження тривимірності