

**Питання для підготовки:**

1. Світлова мікроскопія. Різновиди.
2. Електронна мікроскопія.
3. Методи дослідження біологічних об'єктів на тканиновому рівні: культура тканин, гістологічні методи.
4. Приготування гістологічних препаратів тканин.

**ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА**

**1. Пристрій мікроскопа і правила роботи з ним**

*Мікроскоп* - це оптичний прилад, що дозволяє отримати зворотне зображення досліджуваного об'єкта і розглянути дрібні деталі його будови, розміри яких лежать за межами дозвільної здатності ока.

Дозвільна здатність мікроскопа дає роздільне зображення двох близьких одна до одної ліній. Неозброєне людське око має дозвільну здатність близько 1/10 мм або 100 мкм. Кращий світловий мікроскоп приблизно в 500 разів покращує можливість людського ока, тобто його дозвільна здатність становить близько 0,2 мкм або 200 нм.

Дозвільна здатність і збільшення не одне і теж. Можна отримати велике збільшення, але не поліпшити його дозвіл.

Розрізняють корисне і некорисне збільшення. Під корисним розуміють таке збільшення об'єкта, що спостерігається, при якому можна виявити нові деталі його будови. Некорисне – це збільшення, при якому, збільшуючи об'єкт в сотні і більше разів, не можна виявити нових деталей будови.

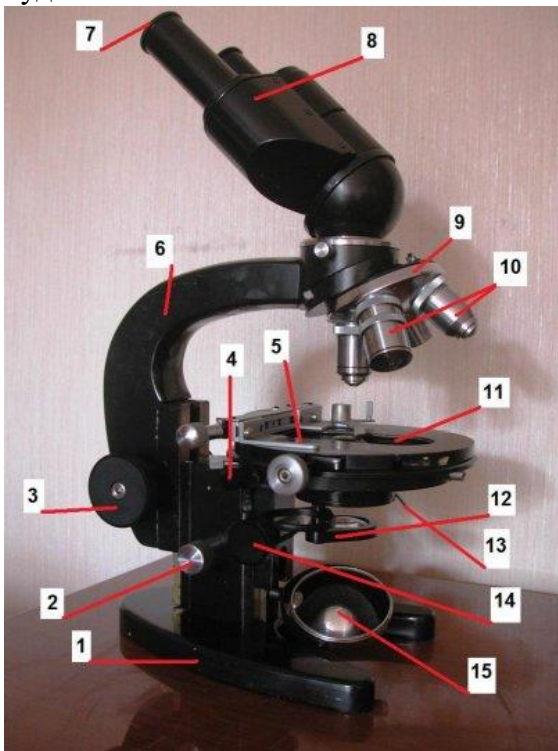


Рис. 1. Пристрій мікроскопа МБР-1

1 - основа (штатив); 2 - мікрометричний гвинт; 3 - макрометричний гвинт; 4 - гвинти, що переміщують столик; 5 - предметний столик; 6 - тубусутримувач; 7 - окуляр; 8 - тубус; 9 - револьвер; 10 - об'єктиви; 11 - отвір предметного столика; 12 - конденсор; 13 - діафрагма конденсора; 14 - гвинт конденсора; 15 - дзеркало

*Окуляр* складається з 2-3 лінз. Збільшення окулярів позначено на них цифрами: x7, x10, x15. Окуляри не виявляють нових деталей будови і в цьому відношенні їх збільшення марно.

У навчальних лабораторіях зазвичай використовують світлові мікроскопи, на яких мікропрепарати розглядаються з використанням природного або штучного світла. Найбільш поширені світлові біологічні мікроскопи: БЮЛАМ, МІКМЕД, МБР, МБІ і МБС. Вони дають збільшення в межах від 56 до 1350 разів.

Стереомікроскоп (МБС) забезпечує об'ємне сприйняття мікрооб'єкту і збільшує від 3,5 до 88 разів.

У мікроскопі виділяють дві системи: оптичну і механічну (рис. 1). До оптичної системи відносять об'єктиви, окуляри і освітлювальну систему (конденсор з діафрагмою і світлофільтром, дзеркало або електроосвітлювач).

*Об'єктив* - визначає корисне збільшення об'єкта. Об'єктив складається з декількох лінз. Збільшення об'єктива позначено на ньому цифрами. У навчальних цілях використовують зазвичай об'єктиви x8 і x40.

Для визначення загального збільшення мікроскопа слід помножити збільшення об'єктива на збільшення окуляра. У разі використання біокулярної або триокулярної насадки, в дане рівняння потрібно додати власне збільшення насадки. Для біокулярної насадки АУ-12 ЛОМО, збільшення становить 1,5 х. У таких насадках як АУ-26 або МФН-11 збільшення можна міняти, власне змінне збільшення насадки АУ-26 - 1,1х; 1,6х і 2,5х

Освітлювальний пристрій складається з *дзеркала* або електроосвітлювача, *конденсора* з ірисовою діафрагмою і світлофільтром, розташованих під предметним столиком. Вони призначені для освітлення об'єкта пучком світла.

Механічна система мікроскопа складається з підставки, коробки з мікрометричним механізмом і мікрометричним гвинтом, тубусотримувача, гвинта грубої наводки, кронштейна конденсора, гвинта переміщення конденсора, револьвера, предметного столика.

### **Правила роботи з мікроскопом**

При роботі з мікроскопом необхідно дотримуватися операції в такому порядку:

1. Працювати з мікроскопом слід сидячи;
2. Мікроскоп оглянути, витерти від пилу м'якою серветкою об'єктиви, окуляр, дзеркало;
3. Мікроскоп встановити перед собою, трохи зліва на 2-3 см від краю столу. Під час роботи його не зрушують;
4. Відкрити повністю діафрагму, підняти конденсор в крайнє верхнє положення;
5. Роботу з мікроскопом завжди починати з малого збільшення;
6. Опустити об'єктив 8 х в робоче положення, тобто на відстань 1 см від предметного скла;
7. Дивлячись одним оком в окуляр і користуючись дзеркалом з увігнутою стороною, направити світло від вікна в об'єктив, а потім максимально і рівномірно освітити поле зору;
8. Покласти мікропрепарат на предметний столик так, щоб досліджуванний об'єкт знаходився під об'єктивом. Дивлячись збоку, опускати об'єктив за допомогою макрогвинта до тих пір, поки відстань між нижньою лінзою об'єктива і мікропрепарата не стане 4-5 мм;
9. Дивитися одним оком в окуляр і обертати гвинт грубої наводки на себе, плавно підводячи об'єктив до положення, при якому добре буде видно зображення об'єкта. Не можна дивитися в окуляр і опускати об'єктив. Фронтальна лінза може розчавити покривне скло, і на ній з'являться подряпини;
10. Пересуваючи препарат рукою, знайти потрібне місце, розташувати його в центрі поля зору мікроскопа;
11. Якщо зображення не з'явилося, то треба повторити всі операції пунктів 6, 7, 8, 9;
12. Для вивчення об'єкта при великому збільшенні спочатку потрібно поставити обрану ділянку в центр поля зору мікроскопа при малому збільшенні. Потім поміняти об'єктив на 40 х, повертаючи револьвер, так щоб він зайняв робоче положення. За допомогою мікрометричного гвинта домогтися гарного зображення об'єкта. На коробці мікрометричного механізму є дві риски, а на мікрометричному гвинті - точка, яка повинна весь час знаходитися між рисками. Якщо вона виходить за їх межі, її необхідно повернути в нормальне положення. При недотриманні цього правила, мікрометричний гвинт може перестати діяти;
13. Після закінчення роботи з великим збільшенням, встановити мале збільшення, підняти об'єктив, зняти з робочого столика препарат, протерти чистою серветкою всі частини мікроскопа, накрити його поліетиленовим пакетом і поставити в шафу.

## **2. Приготування препаратів для мікроскопії**

Препарати для мікроскопіювання готують з крові, колоній бактерій, тканин тварин і рослин та ін. В деяких випадках приготування препаратів нескладно, в інших - вимагає спеціальної техніки.

Найбільш просто готують так звані нативні препарати, тобто об'єкти в природному їх вигляді. В цьому випадку матеріал наносять на предметне скло і покривають тонким покривним склом. Іноді його змішують з фізіологічним розчином хлориду натрію або гліцерином для розрідження, освітлення і запобігання від висихання.

Широко поширений метод забарвлення препаратів для мікроскопії. Спосіб забарвлення залежить від особливостей досліджуваного матеріалу і цілі дослідження.

Різні частини препарату сприймають фарбу по-різному, що робить їх більш чіткими, дозволяє відрізнити один від одного окремі структури. Наприклад, мазки крові фарбуються азур-еозином для підрахунку лейкоцитарної формули, фуксином – для підрахунку тромбоцитів, азуром II – для підрахунку ретикулоцитів.

Для бактеріоскопії – випромінювання під мікроскопом мікроорганізмів – існує велика кількість методів забарвлення, в тому числі і складних – двома і більше барвниками. Існує негативний метод забарвлення, тобто забарвлюється фон препарату, на якому чітко видно нефарбовані мікроорганізми, наприклад бліда трепонема.

Препарат для мікроскопії не може бути товстим або щільним, так як світло повинне добре проходити крізь нього, тому приготування гістологічних препаратів з тканин вимагає досить складної техніки. Тканину обробляють спиртами, формаліном або фіксують сумішами, просочують целоїдином, парафіном або желатином. Потім отримують найтонші зрізи тканини за допомогою спеціального приладу – мікротома. Після цього зрізи забарвлюють гематоксилін-еозином, Суданом, складними сумішами барвників, сріблом тощо. Зрізи закріплюють на предметних склах сумішшю білка з гліцерином. Для збереження препаратів зрізи заливають канадським бальзамом і покривають покривним склом. Бальзам засихає і гістологічний препарат може зберігатися протягом багатьох років.

Тимчасові препарати так називаються тому, що не зберігаються довго. Після ознайомлення з мікрооб'єктом тимчасовий препарат змивається з предметного скла.

Для вивчення живих клітин мікроорганізмів застосовують препарати «розчавлена крапля», «висяча крапля», «відбиток», «агарова плівка» («мікрокультура»). Препарати живих клітин розглядають із "сухими системами" мікроскопа. Препарати, робота з якими вже закінчена, перш ніж вимити, витримують в дезінфікуючому розчині.

Мікропрепарати дозволяють проводити широкий ряд дослідів. Вони призначені для детального вивчення мікроскопічних структур під мікроскопом.

## **ПРАКТИЧНІСТЬ ЧАСТИНА**

### **Способи приготування тимчасових мікропрепаратів.**

#### **Дослід № 1: Приготування препарату шкірочки цибулі і розглядання його під мікроскопом**

Мета роботи: навчитися користуватися мікроскопом, навчитися готувати і розглядати мікроскопічний препарат.

Матеріали та обладнання: лупа, 2 предметних і 2 покривних скла, 1 препаративна голка, стакан з водою, розчин йоду, 1 безпечна бритва, частина цибулини цибулі, 2 шматочки марлі, 1 паличка з дерева або скла.

Хід роботи:

1. Приготувати мікропрепарат з шкірки цибулі:

- а) витерти марлею предметне і покривне скло;
- б) капнути паличкою воду на середину предметного скла;
- в) зняти з внутрішньої сторони м'якшої луски цибулини шкірку і покласти в краплю води на склі;
- г) відрізати невеликий шматочок шкірки, розправити голкою;
- д) капнути на шкірку краплю йоду;
- е) покрити шкірку покривним склом.

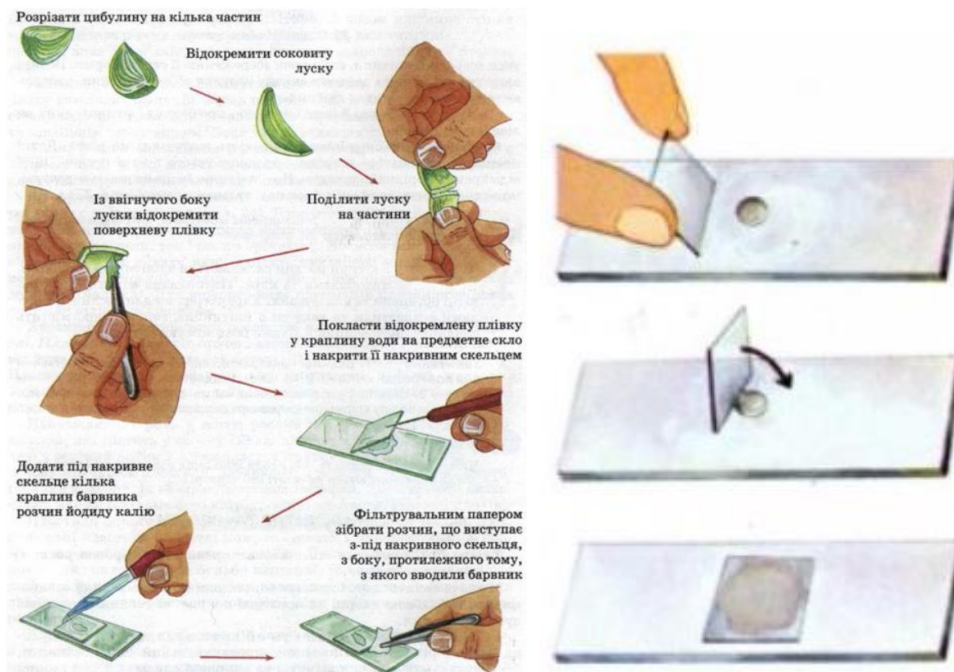


Рис. 1. Виготовлення мікропрепарату із шкірки цибулі

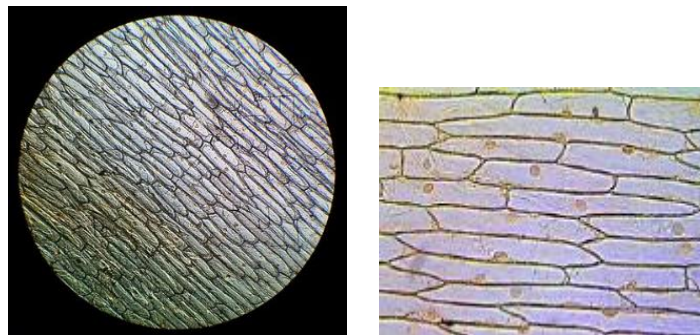


Рис. 2. Клітини цибулини під мікроскопом

Роздивитися препарат під мікроскопом та замалювати

### Дослід № 2: Вивчення дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*)

**Мета роботи.** Розглянути під мікроскопом поодинокі і дріжджові грибки, що брункуються і вивчити їх будову.

**Матеріали та обладнання.** Пресовані дріжджі, цукор, фільтрувальний папір, стакан, очна піпетка, термостат, мікроскоп.

#### Коротке теоретичне пояснення.

Дріжджові гриби (Сахароміцети), відносяться до порядку первинносумчастих грибів. Дріжджі - одноклітинні мікроорганізми, що мають овальну або яйцеподібну форму.

Для дріжджових грибів характерно безстатеве розмноження, що має назву брунькування. На тілі материнської клітини утворюється виріст – брунька, яка поступово зростає і відшнуровується від материнської клітини. Деякі дріжджі розмножуються поділом.

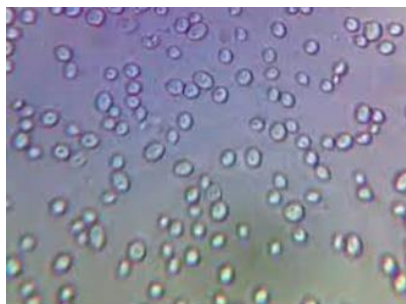
Розрізняють дикі і культурні дріжджові гриби. Дикі дріжджові гриби знаходяться в ґрунті, в повітрі, на поверхні ягід, в нектарі квіток, в меді, в молоці тощо. Культурні дріжджові гриби – це дріжджі, виділені в культурі з диких дріжджових грибів. У вигляді чистої культури вони широко використовуються в практиці, наприклад, при випічці хліба, виготовленні молочнокислих продуктів тощо.

#### Хід роботи.

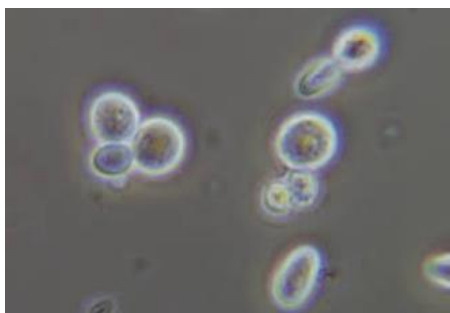
У склянці теплої води розчиняють одну столову ложку цукру і кладуть невелику кількість дріжджів. Стакан закривають фільтрувальним папером і поміщають у тепле місце при температурі + 25 / + 30 ° С (краще в термостат). Через 1,5-2 год приготований розчин починає бродити, що



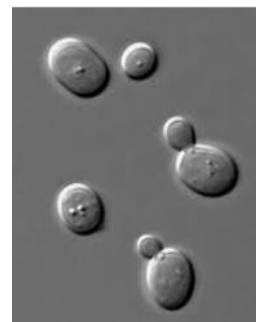
говорить про те, що культура готова. Беруть піпеткою краплю рідини, що бродить, поміщають її на предметне скло і накривають покривним. Поодинокі і клітини дріжджів, що брунькуються, розглядають під мікроскопом і замальовують.



А



Б



В

Рис. 3. Дріжджі під мікроскопом (А, Б, В). Брунькування дріжджів (Б, В)

### Дослід № 3: Приготування препарату з клітинами слизової оболонки порожнини рота

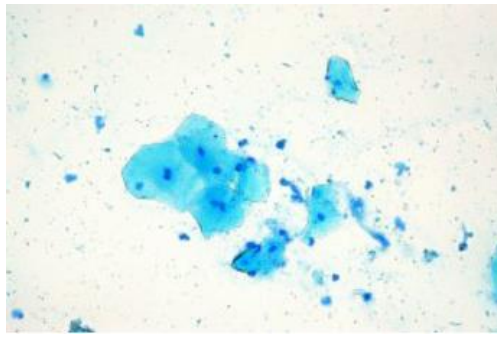
**Матеріали та обладнання:** мікроскоп, предметне і покривне скло, препарувальна голка, шпатель, піпетка, 0,9-процентний розчин NaCl (фізіологічний розчин), підфарбований метиленовою синню або чорнилом, спирт, вата.

#### Порядок роботи

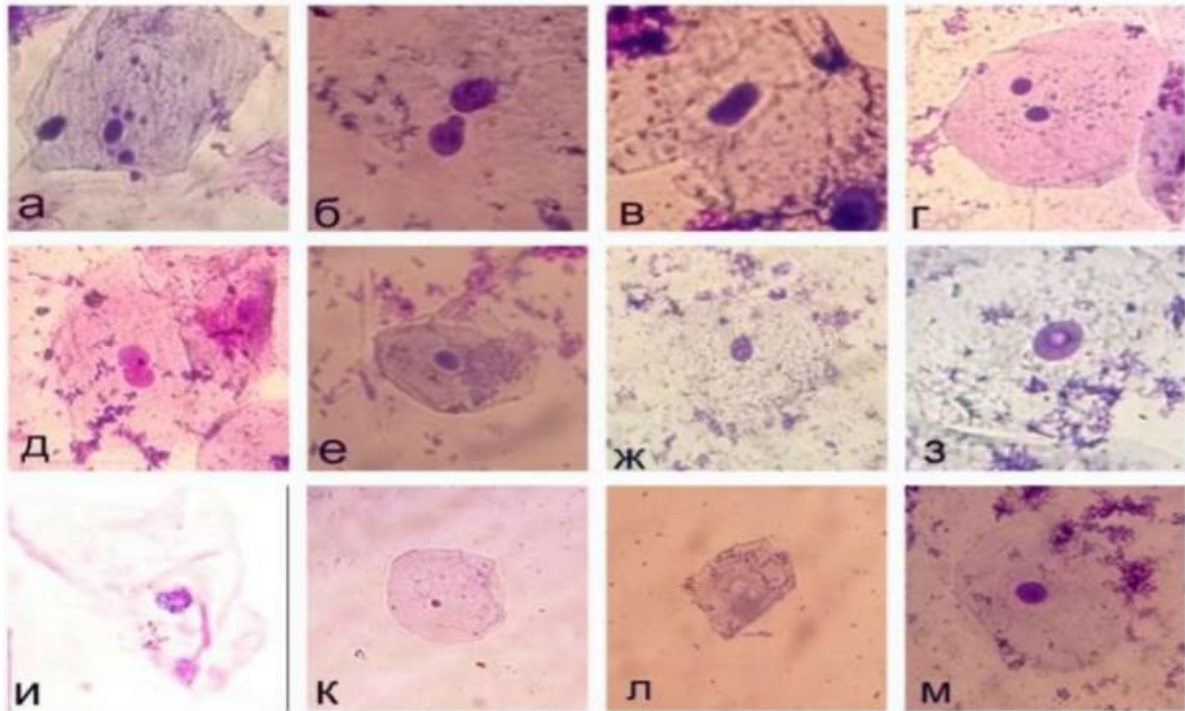
1. Ретельно протріть предметне і покривне скла.
2. За допомогою піпетки нанесіть на предметне скло крапельку підфарбованого фізіологічного розчину.
3. Потерши ручку шпателя спиртом, проведіть нею кілька разів по внутрішній поверхні щоки або нижньої губи. Ви знімете трохи слизу разом зі злущеними клітинами слизової оболонки порожнини рота.
4. Перенесіть цей слиз в краплю на предметному склі за допомогою препарувальної голки, обережно змішайте слиз з підфарбованим розчином і накрийте препарат покривним склом.
5. Помістіть препарат під мікроскоп і розгляньте його. Знайдіть злегка забарвлені клітини. Розгляньте в них блідо пофарбовану цитоплазму і більш темне ядро.
6. Замалюйте розглянуті вами клітини в зошиті і зробіть надписи.



Рис. 4. Етапи приготування препарату (посилання: <https://ppt-online.org/541058>).



**Рис. 5. Клітини слизової оболонки порожнини рота**



а – мікроядерність; б – протрузія типу «бульбашка»; в – ядро атипової форми; г – двоядерна клітина; д - ядро з круговою насічкою; е – ядро з перинуклеарною вакуоллю; ж – конденсація хроматину; з – вакуолізація ядра; і - каріорексіс; к - каріопікноз; л – каріолізіс; м – нормальна клітина (Посилання: <https://ppt-online.org/541058>).

**Рис. 6. Морфологічні особливості ядер у букальних клітинах ротової порожнини**



**Рис. 7. Тільце Барра в ядрі клітини букального епітелію жінки. Забарвлення ацетоорсеїном, замалювати клітини з ядрами**