

КАЗАНСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ



2025г.

Тема № 9

Микроскопия

лекция

Тяпкина Оксана Викторовна

к.б.н., доцент кафедры
медицинской биологии и генетики
КГМУ

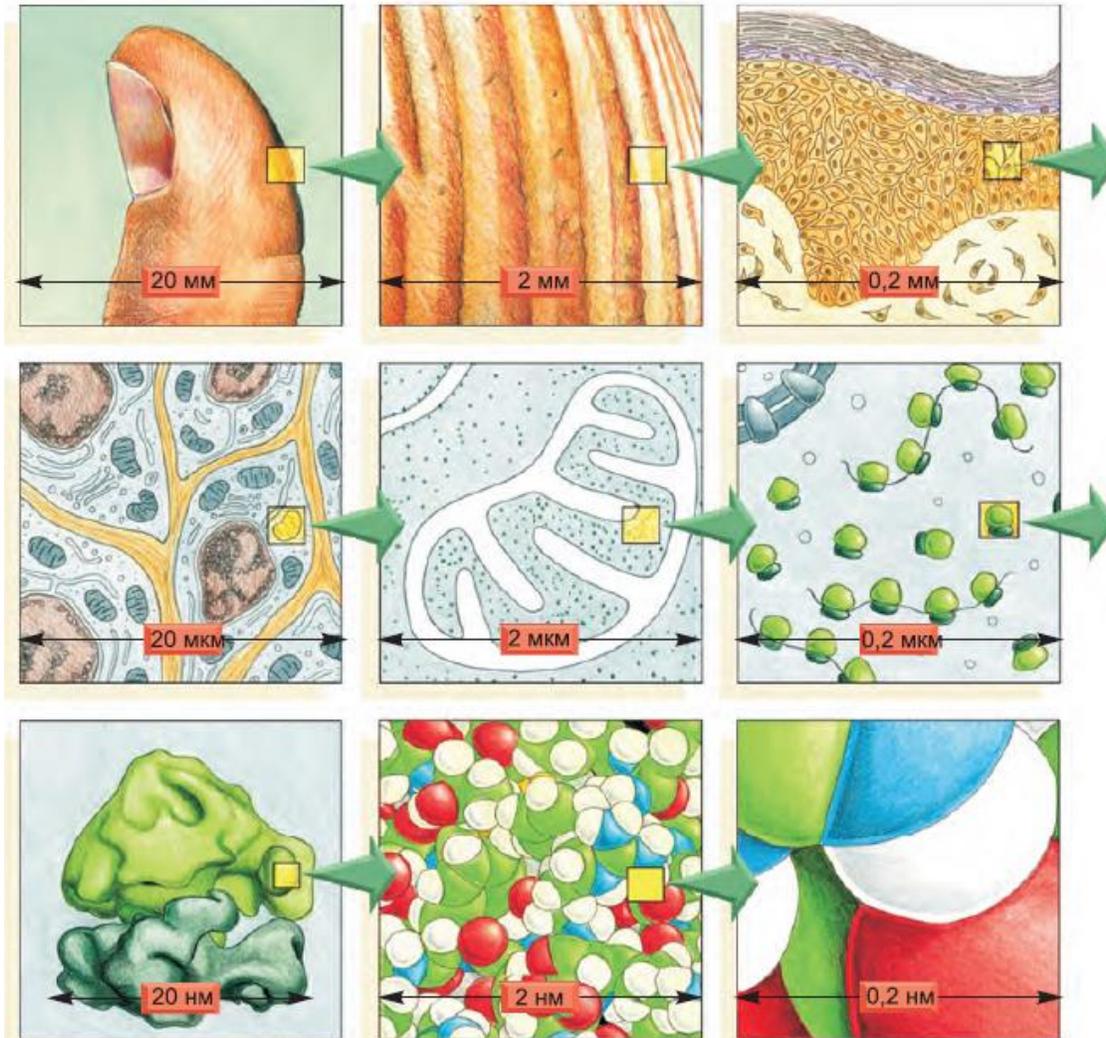
ПЛАН

1. Современные методы микроскопии в биологии и медицине.
2. Подготовка материала для микроскопии и возможностях современных методов микроскопии в диагностических и исследовательских целях.

Соотношение

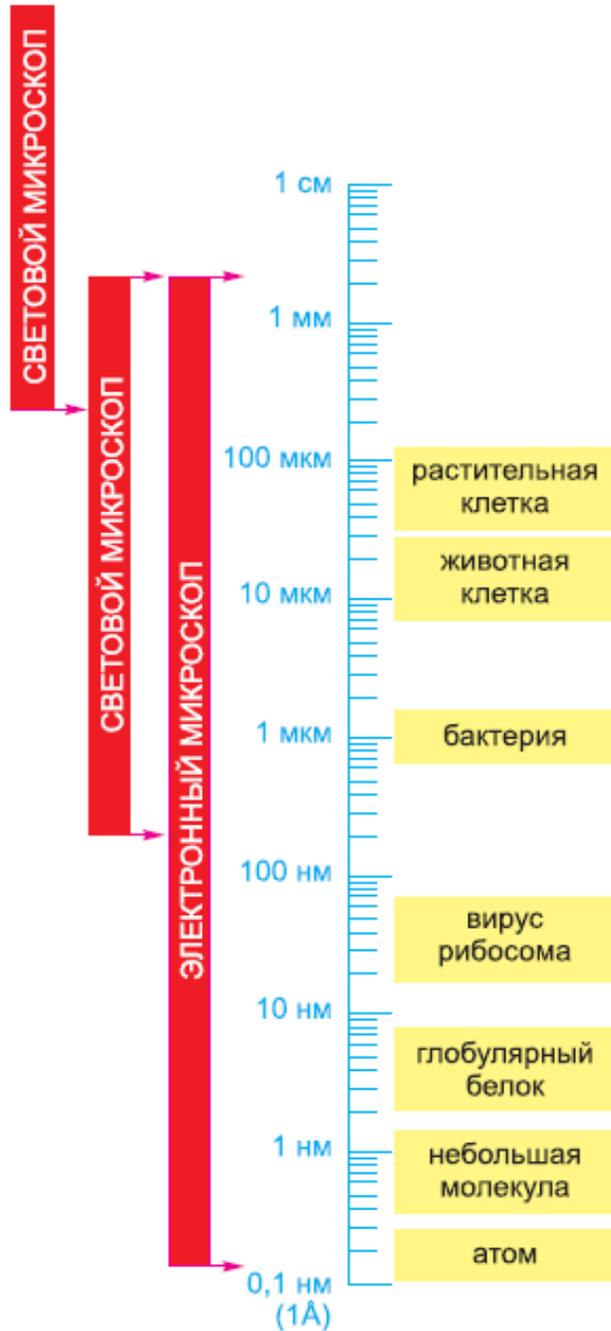
масштабов

ЖИВЫХ КЛЕТОК И АТОМОВ



Изображения, увеличенные в десять раз по сравнению с предыдущим, в ряду от большого пальца, через клетку кожи, до рибосомы и набора атомов, составляющего одну из множества белковых молекул нашего организма. Атомное строение макромолекул, как показано на двух последних картинках, обычно лежит за пределами мощности электронного микроскопа.

Разрешающая способность



Размеры клеток и их компонентов приведены на логарифмической шкале, объекты, легко разрешимые невооруженным глазом, световым и электронным микроскопами.

В микроскопии используют следующие единицы длины:

$$1 \text{ мкм (}\mu\text{м, микромметр)} = 10^{-6} \text{ м}$$

$$1 \text{ нм (наномметр)} = 10^{-9} \text{ м}$$

$$1 \text{ \AA (ангстрем)} = 10^{-10} \text{ м.}$$

Общие принципы световой микроскопии

Свет – электромагнитная волна,
скорость распространения которой в вакууме
приблизительно 300000 км в секунду.

Свет проявляет себя и как поток частиц, свет имеет
корпускулярно-волновую природу.

Носителями света являются фотоны – частицы, не
обладающие массой покоя и зарядом.

Каждая частица обладает энергией (ε), величина которой
зависит от частоты колебаний электромагнитной волны (ν):

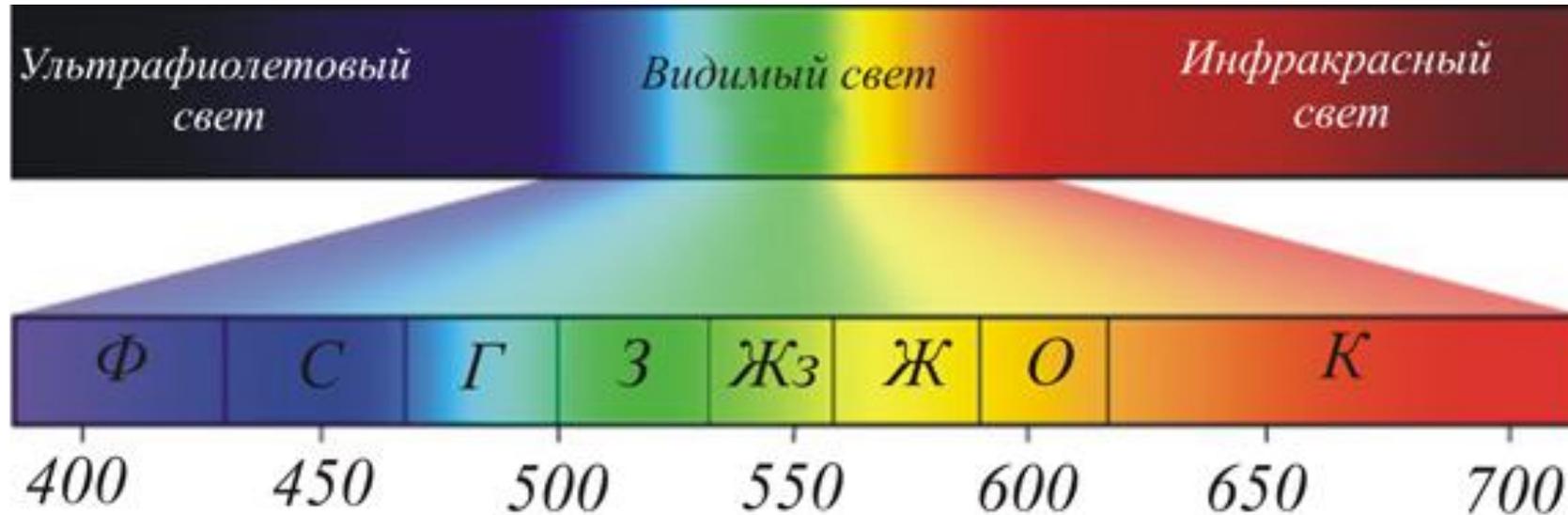
$$\varepsilon = h\nu ,$$

и, соответственно, от длины волны (λ):

$$\varepsilon = \frac{hc}{\lambda}$$

где h – постоянная Планка , c – скорость света в вакууме.

Цвет света в зависимости от длины волны (в нанометрах)

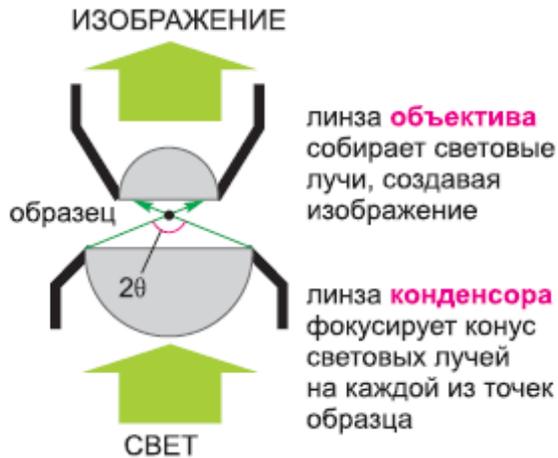


Одной из характеристик света является его цвет, который определяется длиной волны для монохроматического излучения или суммарным спектром для сложного.

Человеческий глаз воспринимает электромагнитные волны длиной от 380 до 760 нм (от фиолетового до красного).

Этот диапазон электромагнитных волн называют видимым светом. К свету относят не только видимую часть спектра, но и часть ультрафиолетового (УФ) и инфракрасного (ИК) диапазонов.

ЛИНЗЫ



РАЗРЕШЕНИЕ: разрешающая способность микроскопа зависит от ширины конуса освещения, следовательно, также от конденсора и линзы объектива. Рассчитывается по формуле:

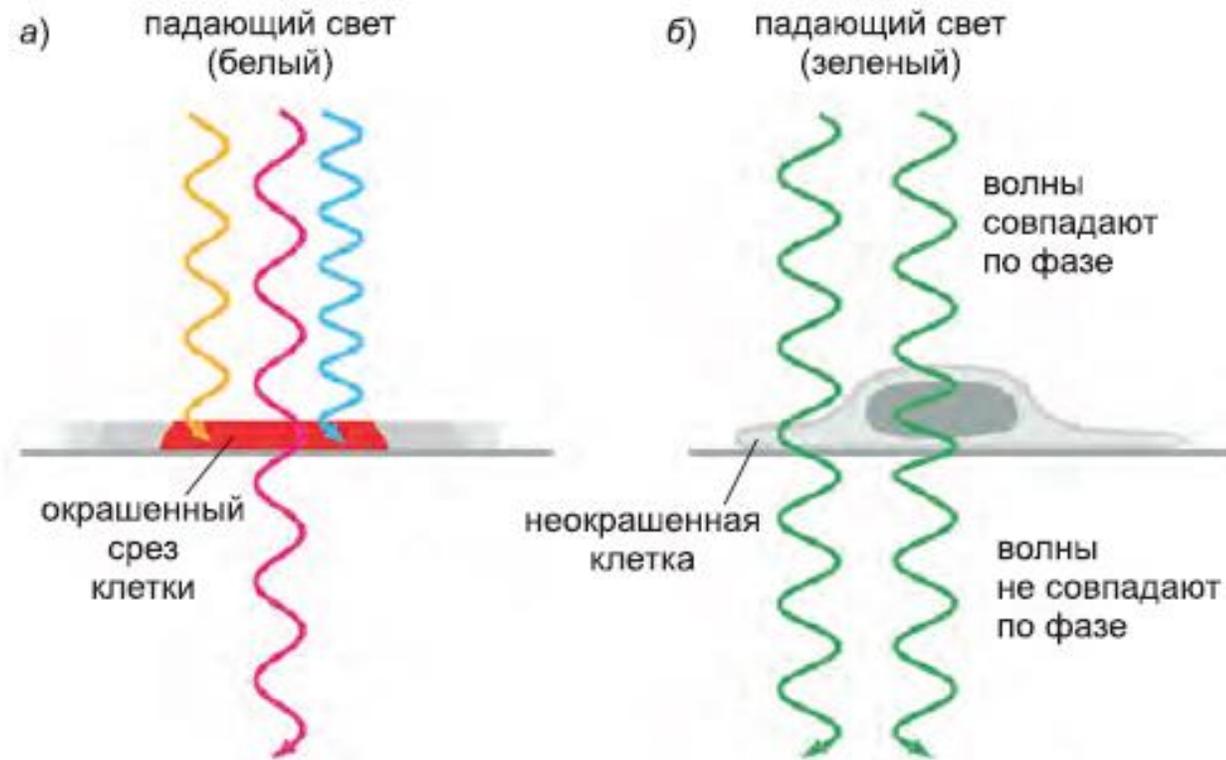
$$\text{разрешение} = \frac{0,61\lambda}{n \sin \theta},$$

где:

- θ = 1/2 угловой ширины конуса световых лучей, собираемых линзой объектива с типичной точки образца (поскольку максимальная ширина составляет 180° , максимум $\sin \theta = 1$);
- n = показатель преломления среды (обычно воздуха или масла), отделяющей образец от линз объектива и конденсора;
- λ = длина волны использованного света (для белого света обычно принимают значение 0,53 мкм)

ЧИСЛОВАЯ АПЕРТУРА: $n \sin \theta$ в приведенном выше уравнении называют числовой апертурой линзы (ЧА). ЧА является функцией светособирающей способности линзы. Для сухих линз ЧА не может превышать 1, а для иммерсионных линз она может достигать 1,4. Чем выше числовая апертура, тем выше разрешающая способность и тем ярче изображение (яркость важна для флуоресцентной микроскопии). Однако это преимущество достигается за счет очень короткого рабочего расстояния и очень малой глубины резкости

Числовая апертура. Траектория световых лучей, проходящих через прозрачный образец в микроскопе, иллюстрирует понятие числовой апертуры и ее соотношения с пределом разрешения.



Два способа получения контрастного изображения в световой микроскопии. (а) Окрашенная часть клетки будет поглощать свет некоторых длин волн, в зависимости от красителя, но остальные длины волн будут проходить через нее. Таким образом, получается цветное изображение клетки, видимое в обычный светопольный микроскоп. (б) Амплитуда света, проходящего через неокрашенную живую клетку, почти не меняется, поэтому даже при очень большом увеличении невозможно рассмотреть подробности структуры. Фаза света, однако, изменяется за счет прохождения луча через более толстые или плотные участки клетки. При помощи интерференции в фазово-контрастном или дифференциальном интерференционном контрастном микроскопе можно сделать видимыми небольшие изменения фазы.

Предел разрешения — минимальное расстояние, на котором два объекта различимы по отдельности (зависит как от длины волны света, так и от числовой апертуры используемой системы линз).

Числовая апертура — это мера ширины входного зрачка микроскопа, масштабированная относительно расстояния до объекта; чем шире микроскоп «раскрывает свой глаз», тем «острее» он «видит».

При наилучших условиях, с фиолетовым светом (длина волны = 0,4 мкм) и численной апертурой 1,4, световой микроскоп теоретически способен дать разрешение около 0,2 мкм.



Основные элементы простейшего светового микроскопа

Обычный прямой световой микроскоп состоит из следующих обязательных оптических элементов:
объектива,
конденсора,
окуляра,
источника света
и коллектора.

Световой микроскоп

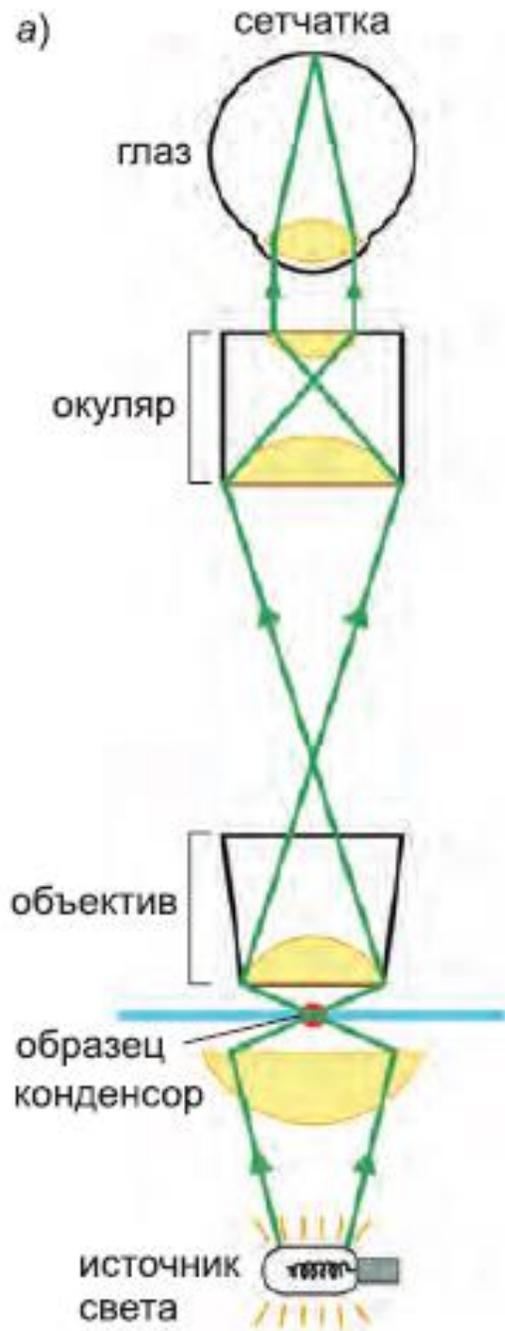


Схема прохождения света в микроскопе. Свет фокусируется на препарате линзами конденсора. Линзы объектива и окуляра настраивают таким образом, чтобы сфокусировать изображение освещенного препарата в глазе.

Объектив – собирает лучи света от объекта исследования и создает первичное действительное перевернутое изображение (дают увеличение объекта в 2.5-150 раз). Объективы устанавливаются в подвижное револьверное устройство, при повороте которого легко происходит смена объектива, при этом соблюдается принцип *парфокальности* – объект остается в фокусе при смене объектива.

Система линз конденсора – получает расходящиеся пучки света от источника и концентрирует их на образце, обеспечивая одинаковое освещение по всему полю зрения. В системе конденсора устанавливается ирисовая диафрагма для контроля апертуры освещения (называемая *апертурной диафрагмой*). С помощью апертурной диафрагмы можно регулировать контраст, глубину фокуса и разрешение изображения.

Коллекторная линза служит для настройки освещения образца. Рядом с ней находится *полевая диафрагма*, с помощью которой меняют площадь освещения образца. Изменение отверстия полевой диафрагмы не влияет на разрешение изображения.

Система линз окуляра – переводит действительное первичное изображение в мнимое вторичное и дает дополнительное увеличение в 5-25 раз, а также корректирует хроматические aberrации оптической системы микроскопа.

Источник света – в простейшем случае – дневной свет или лампа накаливания. В современных микроскопах используются галогеновые лампы (в рутинной микроскопии), которые дают яркое и постоянное при неизменном напряжении освещение. Во флуоресцентной микроскопии применяются ртутные или ксеноновые лампы, дающие широкий спектр света (в том числе ультрафиолетовое излучение), а также лазеры различных длин волн (для лазерной конфокальной и мультифотонной микроскопии).

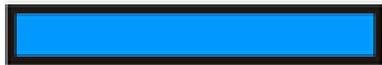
Оптические элементы микроскопов

Маркировка объектива



В поле «специальных свойств» могут быть указана специализация объектива. Например, DIC – дифференциальный интерференционный контраст, Ph – фазовый контраст, Pol – поляризационный контраст, ND – темнопольный контраст и т.д.

Цветовой код увеличения объективов

| | | | |
|------------|-------------|--|-----------------------------|
| Увеличение | 1.0/1.25 |  | Цвет кольца объектива |
| | 2.5 |  | |
| | 4/5 |  | |
| | 6.3 |  | |
| | 10 |  | |
| | 16/20/25/32 |  | |
| | 40/50 |  | |
| | 63 |  | |
| | 100/150 |  | |

Контрастирование в микроскопии и его принципы

Один из важнейших параметров объектива – его *апертура*, которая оценивается по величине апертурного угла, то есть наибольшего угла между оптической осью объектива и крайними лучами, попадающими в объектив. Апертурный угол равен половине *входного угла* объектива (угла между крайними лучами конического светового пучка, входящего в объектив).

Произведение синуса апертурного угла (α) на показатель преломления иммерсионной среды (n), с которой работает объектив, называется *числовой апертурой* (NA):

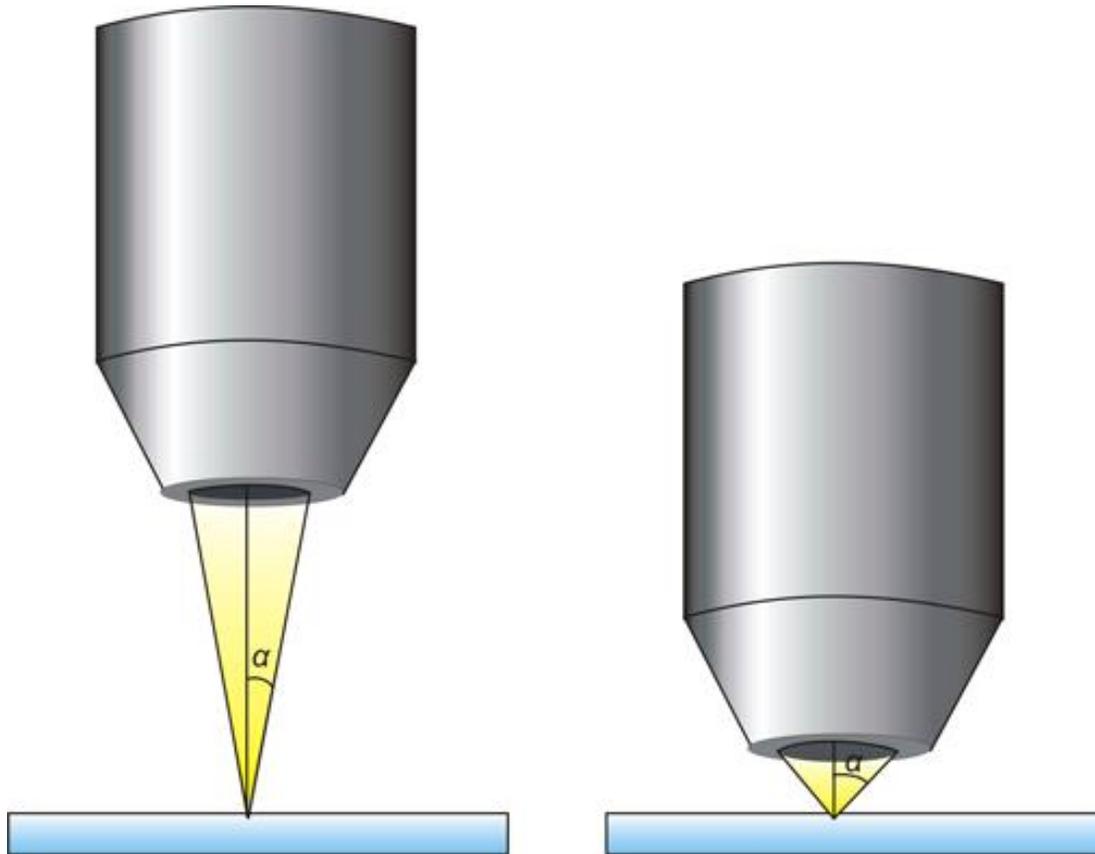
$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

Водноиммерсионный объектив НСХ АРО 20x 1.0 W для электрофизиологии



Этот объектив имеет керамическую нижнюю часть, рабочее расстояние 2 мм и угол доступа 39° (это позволяет удобно проводить микроманипуляции с препаратом).

Апертура объектива



Объективы с меньшей (слева) и большей (справа) апертурой отличаются по способности собирать свет от препарата и рабочему расстоянию. α – апертурный угол объектива.

Окуляр



На окуляре обозначены увеличение (10 крат),
ширина поля зрения (18 мм)
и тип окуляра (WF – широкоугольный окуляр)

Линзы и объективы микроскопа



Линзы объективов собраны в дублеты и триплеты для коррекции оптического пути света и хроматических aberrаций.

Объективы устанавливаются на револьверном устройстве.

Прямой (Leica DM 5500В) и инвертированный (Leica DMI 3000В) микроскопы



Специальные виды световой микроскопии

Темнопольная микроскопия. Лучи от осветителя падают на объект сбоку, а в оптическую систему микроскопа поступают только рассеянные лучи. Наблюдаемый объект выглядит как освещённый на тёмном поле. Темнопольная микроскопия позволяет исследовать, например, неокрашенные живые одноклеточные организмы.

Фазово-контрастная микроскопия применяется для исследования прозрачных (неокрашенных) биологических объектов, структуры которых имеют разную оптическую плотность. Для фазово-контрастной микроскопии применяются специальные окуляры и конденсор, или специализированный фазово-контрастный микроскоп.

Поляризационная микроскопия — метод исследования объекта в поляризованном свете с помощью специализированного микроскопа, предназначена для формирования изображения неокрашенных анизотропных структур (например, коллагеновые волокна и миофибриллы).

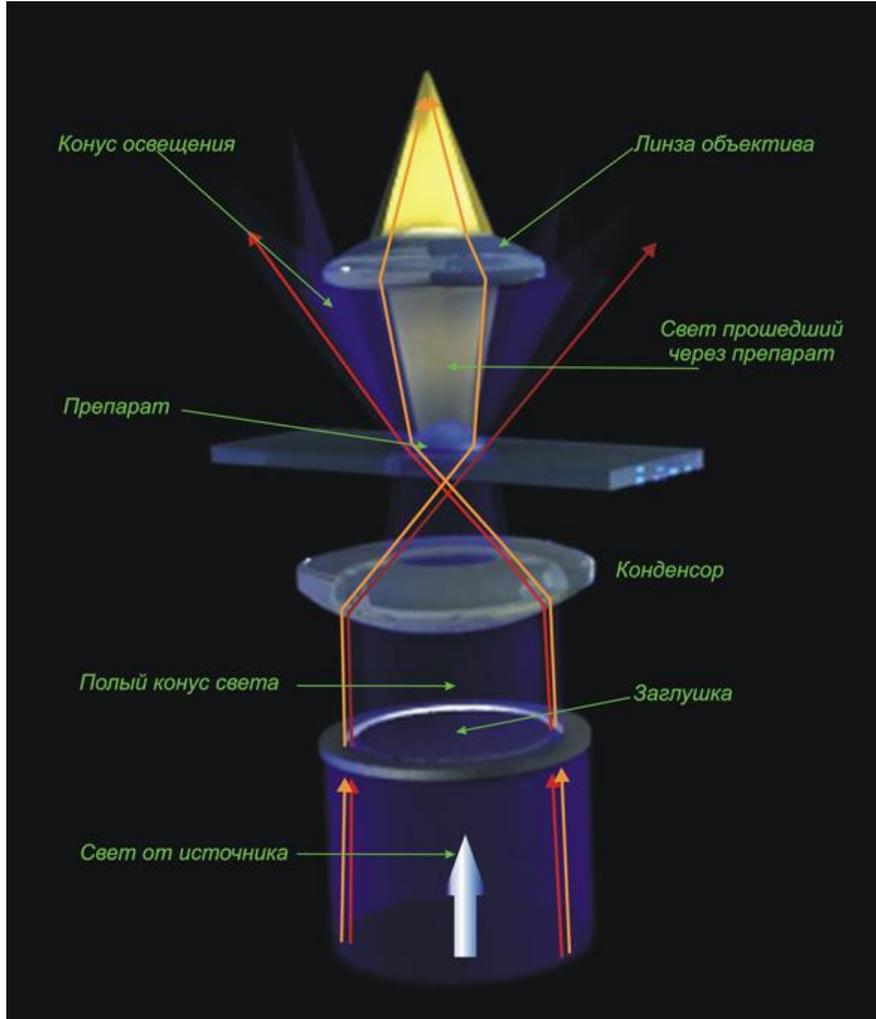
Интерференционная микроскопия — метод интерференционного контраста, основанный на интерференции световых волн, прошедших через неокрашенный объект. Специальная интерференционная оптика (оптика Номарского) применяется в микроскопах с дифференциальным интерференционным контрастом.

Люминесцентная микроскопия применяется для обнаружения флюоресцирующих (люминесцирующих) объектов. В люминесцентном микроскопе свет от мощного источника проходит через два фильтра. Один фильтр задерживает свет перед образцом и пропускает свет длины волны, возбуждающей флюоресценцию образца. Другой фильтр пропускает свет длины волны, излучаемой флюоресцирующим объектом. Таким образом, флюоресцирующие объекты поглощают свет одной длины волны и излучают в другой области спектра.

Контрастирование в микроскопии и его принципы

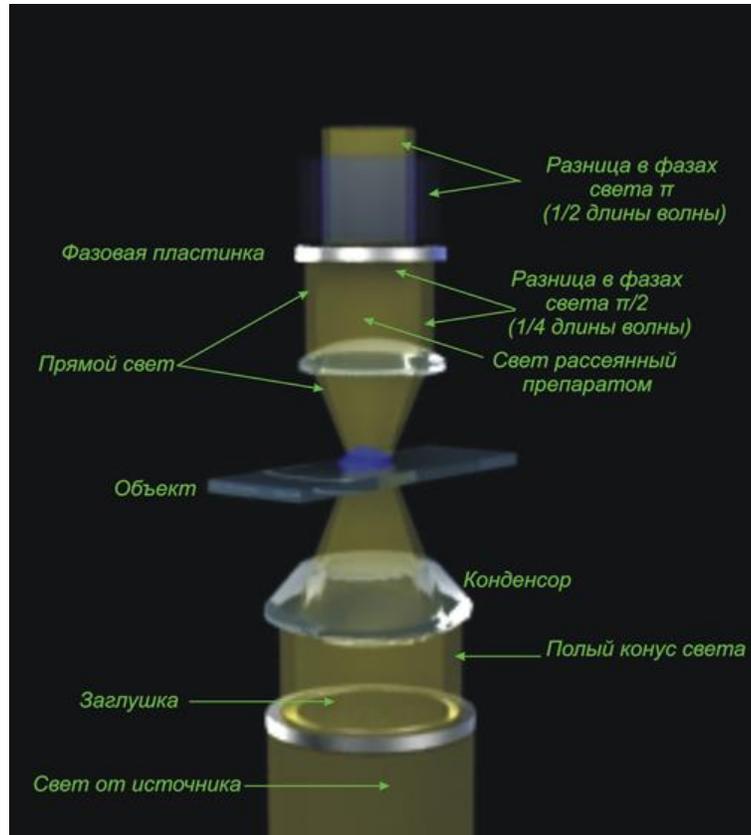
Цель контрастирования заключается не столько в том, чтобы улучшить качество изображения в целом, а в том, чтобы сделать наилучшим образом видимыми те его детали, которые интересуют исследователя. Принцип всех методов контрастирования заключается в создании различий в характеристиках между светом, прошедшим через разные точки препарата и окружающую препарат среду. Такими характеристиками могут быть полярность света, различие в фазе, а также его направление и взаимодействие. В соответствии с тем, какой способ достижения контраста был использован, существуют различные методы микроскопии, которые оптимальны для решения конкретных задач.

1. Принцип работы темнопольного микроскопа



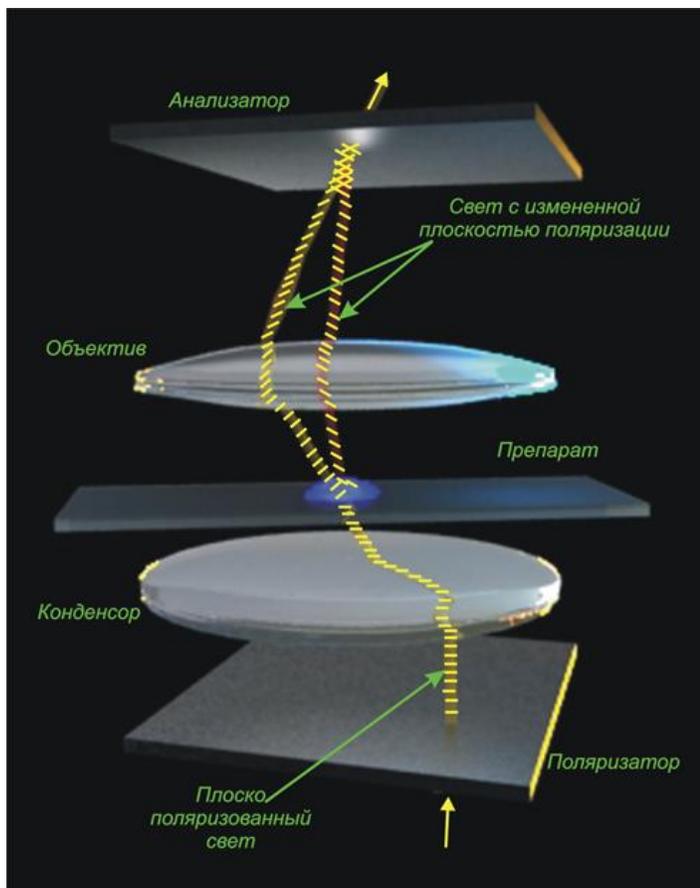
Стрелками показан путь лучей попавших на препарат (оранжевый цвет) и прошедших мимо него (красный цвет).

2. Принцип работы фазово-контрастного микроскопа



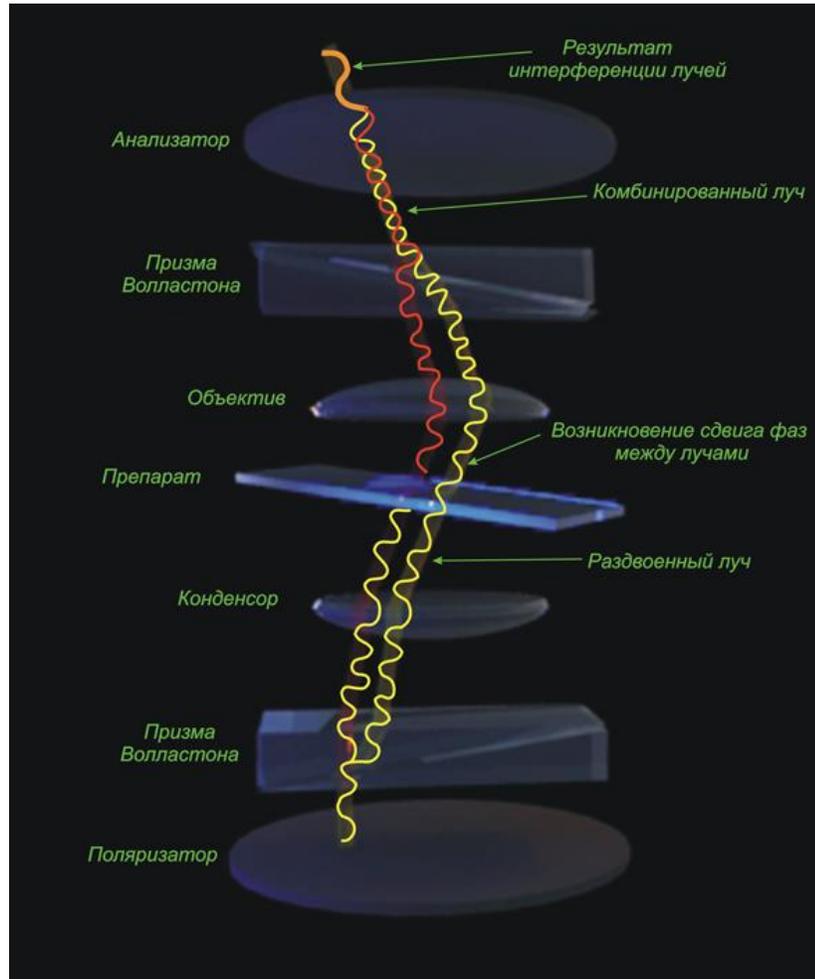
В отличие от темнопольной микроскопии с помощью фазового контраста можно выявлять не только контуры, но и структуру объекта. Однако при работе с очень толстыми препаратами и образцами, интенсивно отражающими свет, могут возникать некоторые проблемы. Например, на таких образцах может происходить образование ореолов и даже обращение контраста (негативный контраст переходит в позитивный и, наоборот) за счет изменения фазового сдвига до 3π (разница хода в 1,5 длины волны света). Поэтому фазовый контраст идеален для очень тонких препаратов (например, монослоя клеток). Фазово-контрастная микроскопия, также как и темнопольная, широко применяется при исследовании живых или неокрашенных биологических объектов, например, при исследовании как фиксированных, так и живых клеток растений и животных (например, в культурах клеток), а также при изучении микроорганизмов, простейших и т.д.

3. Поляризационная микроскопия

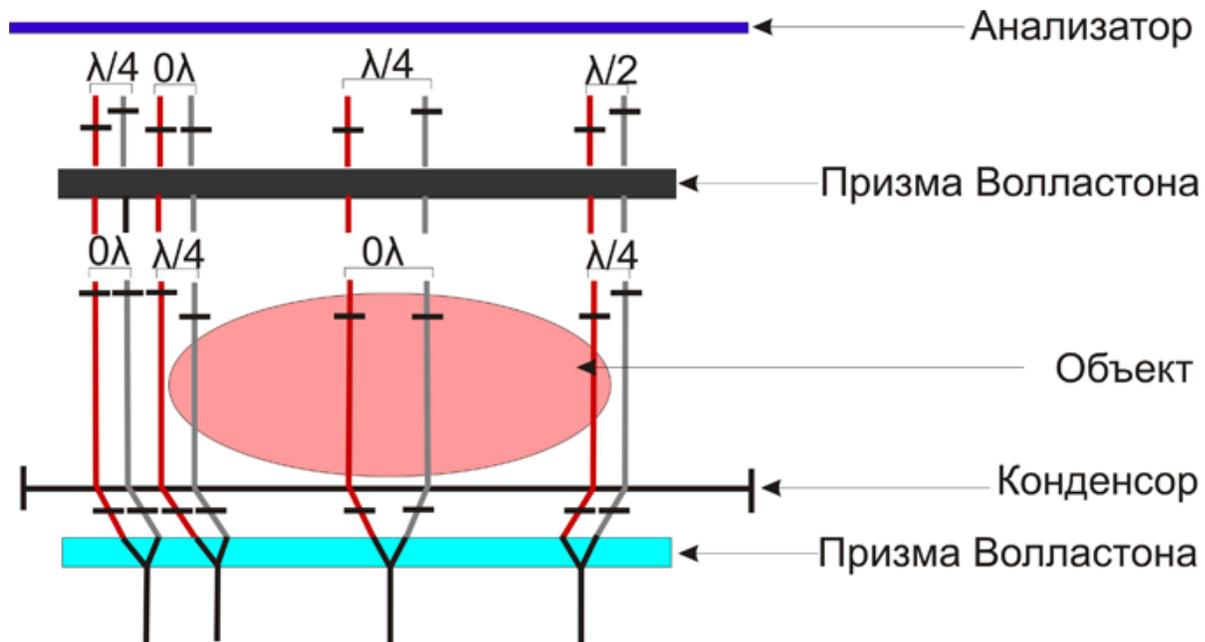


Поляризационная микроскопия работает следующим образом: Свет в микроскопе поляризуется до входа в препарат (с помощью первого поляризатора), и полностью запирается вторым поляризатором (анализатором). Многие кристаллические и волокнистые вещества обладают свойством двойного лучепреломления – луч плоско поляризованного света, проходя через них, разделяется на два луча, поляризованных в плоскостях, перпендикулярных друг другу. Поляризация меняется также при прохождении (или отражении) лучей света через неоднородные по свойствам структурные компоненты клеток и тканей. Таким образом, если в препарате содержатся такие вещества и структуры (например, волокна коллагена, нейрофибриллы, миофибриллы, и др.), то образуются волны света с измененной плоскостью поляризации, способные пройти через анализатор. В этом случае на темном фоне можно наблюдать яркое изображение объекта. Разница в яркости изображения разных структур объекта будет зависеть от угла, на который повернется плоскость поляризации света, прошедшего через них.

4. Принцип контраста по Номарскому (DIC)



4. Механизм возникновения псевдо-рельефа при DIC-контрасте

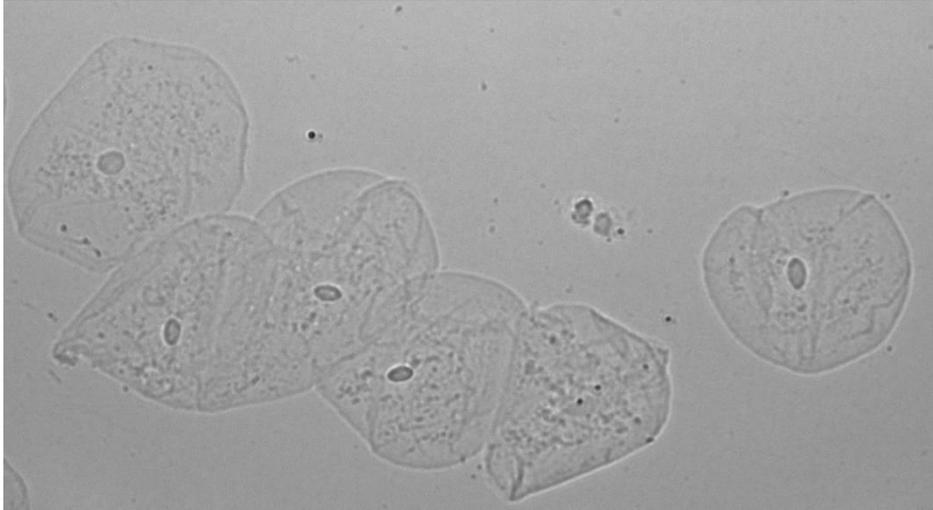


Линейно (плоско) поляризованный свет разделяется первой призмой Волластона на обыкновенный (показан красным цветом) и необыкновенный (показан серым цветом) лучи, находящиеся в фазе (показано горизонтальными штрихами). На выходе из препарата пары лучей, прошедшие одинаковый оптический путь (первая и третья), не будут иметь разницу хода между обыкновенным и необыкновенным лучами в них. В паре лучей, в которой необыкновенный луч прошел больший оптический путь (вторая пара), он отстанет на $\lambda/4$. В четвертой паре лучей на $\lambda/4$ отстанет, наоборот, обыкновенный луч. Проходя через вторую призму Волластона, обыкновенные лучи всех пар будут задержаны еще на $\lambda/4$ относительно необыкновенных. В результате в первой и третьей паре лучей разница хода составит $\lambda/4$, что после рекомбинации лучей даст круговую поляризацию. Во второй паре лучей разницы хода не будет, и комбинированный луч будет линейно поляризован в плоскости *перпендикулярной* плоскости максимального пропускания анализатора. В четвертой паре разница хода лучей составит $\lambda/2$, и комбинированный луч будет линейно поляризован в плоскости *параллельной* плоскости максимального пропускания анализатора. В итоге участки препарата, через которые прошли первая и третья пары лучей будут на изображении выглядеть серыми, там, где прошла вторая пара – темными, а четвертая – яркими. Таким образом, объект выглядит освещенным с одной стороны. По Wayne, 2009.

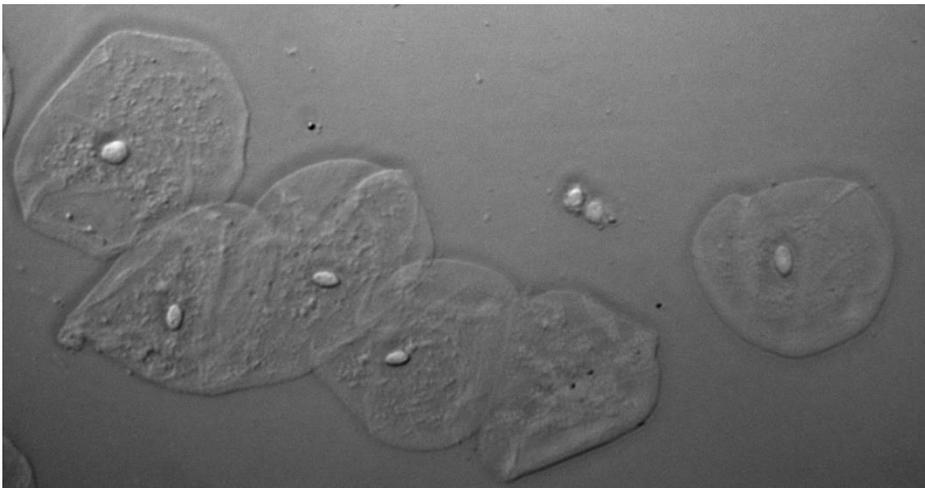
Изображение, полученное с помощью DIC-контраста, выглядит рельефным, однако, следует иметь в виду, что оно не может дать истинной информации о трехмерном строении объекта. Разница в фазах между лучами света в этом методе обычно не превышает одной длины волны, поэтому ореолы и обращение контраста (как в фазово-контрастной микроскопии) не наблюдается. Две призмы Волластона применяются, если микроскоп работает в режиме проходящего света. В случае работы микроскопа в отраженном свете используется только одна двоякопреломляющая призма Номарского – она выполняет обе функции: разложение луча на два и его «сборку».

DIC малоэффективен для тонких препаратов, а вот для толстых дает отличные результаты. Следует также иметь в виду, что материалы, сами по себе деполаризующие свет, не должны находиться на пути луча. По этой причине, нельзя исследовать объекты с помощью DIC, если они находятся в пластиковых чашках Петри. Впрочем, в последние годы фирмой Carl Zeiss разработан вариант DIC-контраста, который работает и при применении пластиковых чашек – так называемый «Plas-DIC». Суть этой технологии состоит в том, что в отличие от классического DIC, препарат в нем (например, в пластиковой чашке) располагается вне *зоны, чувствительной к поляризации*

Клетки слизистой оболочки человека

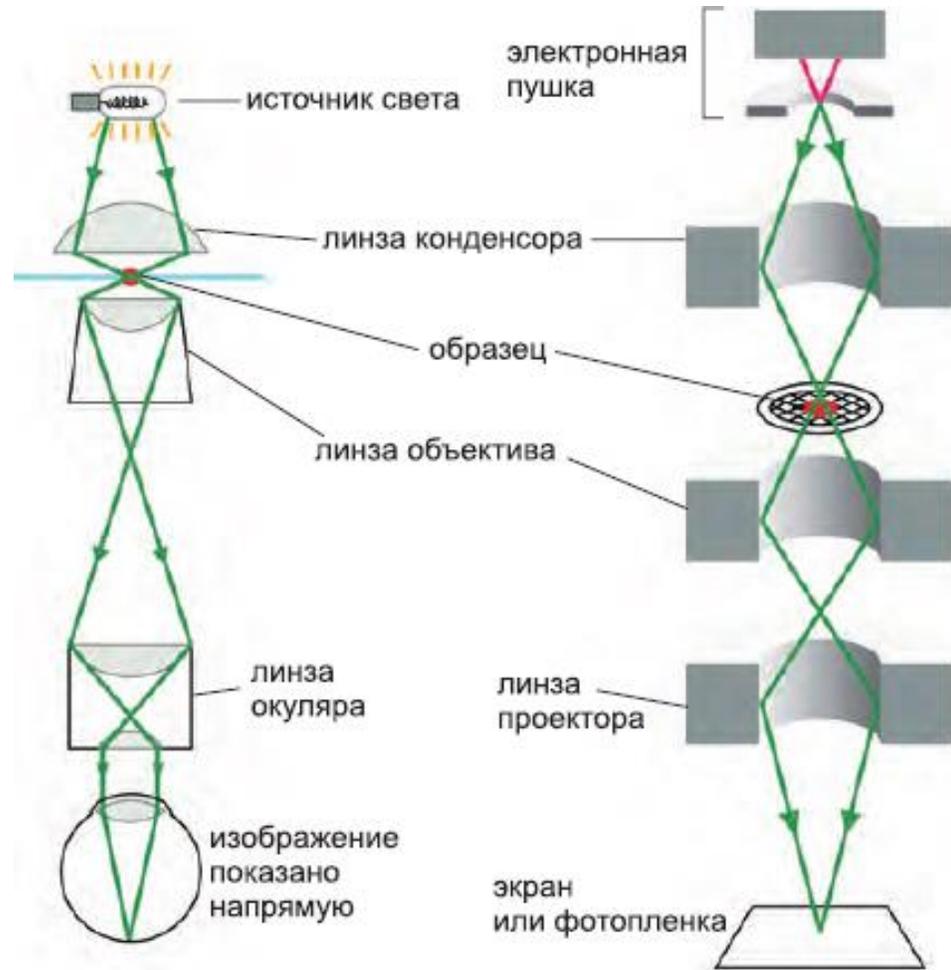


Без контрастирования

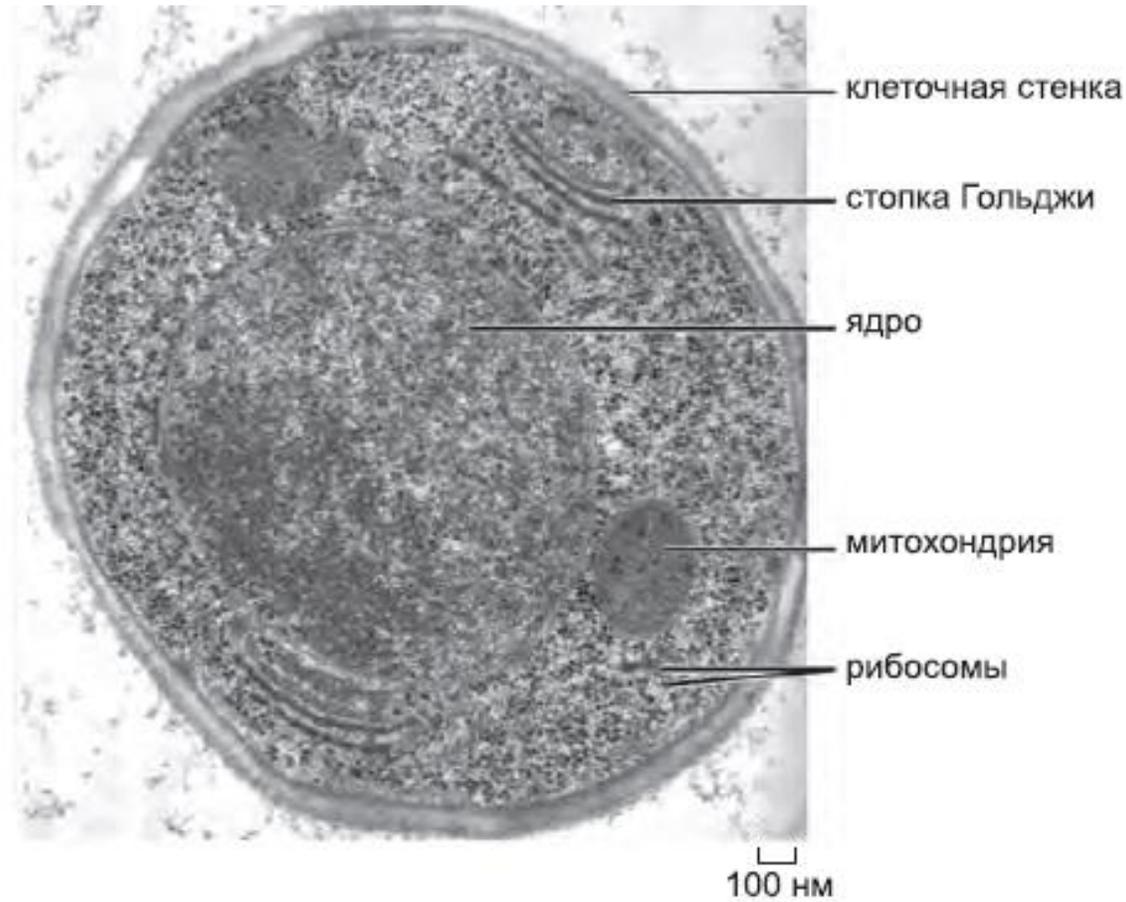


**С применением DIC
контраста (внизу)**

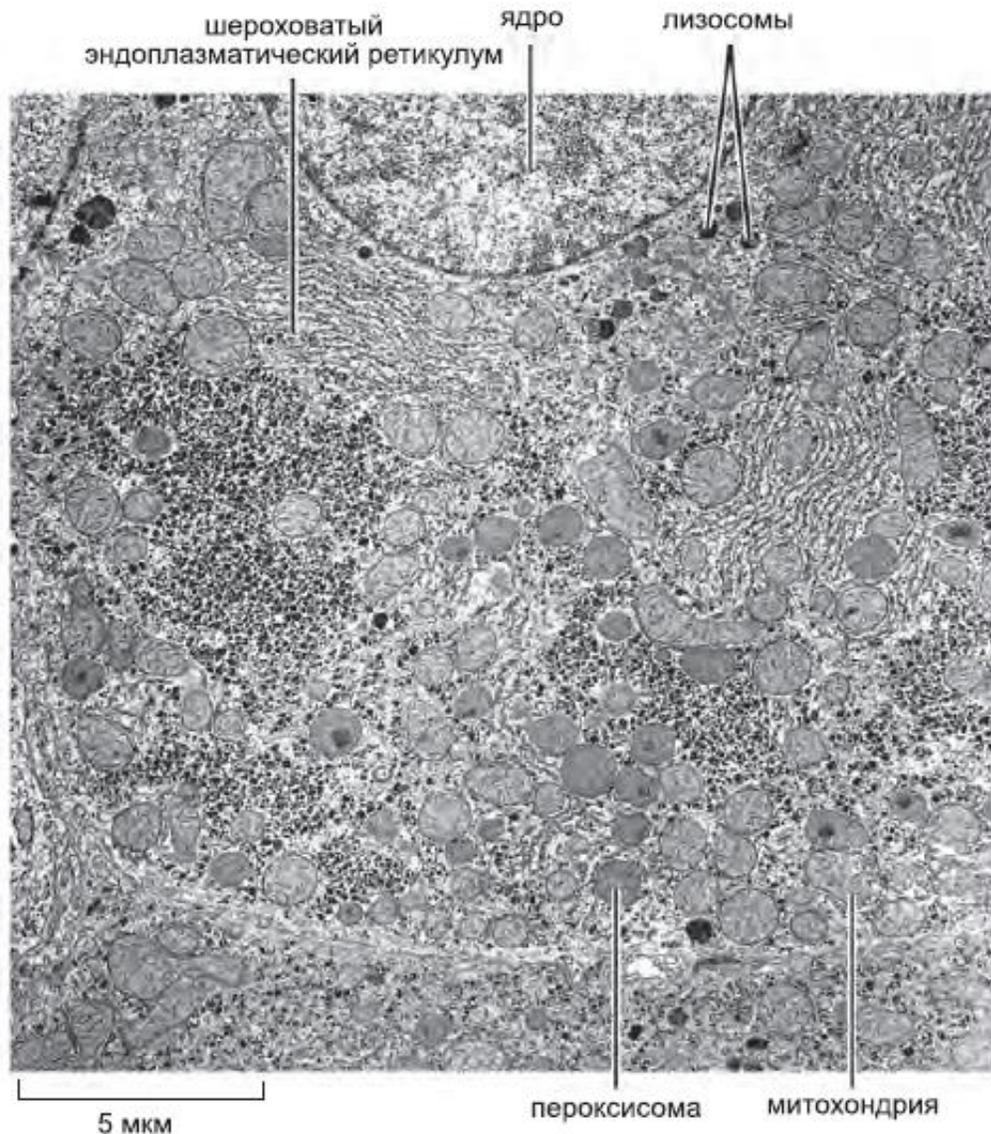
Электронная микроскопия



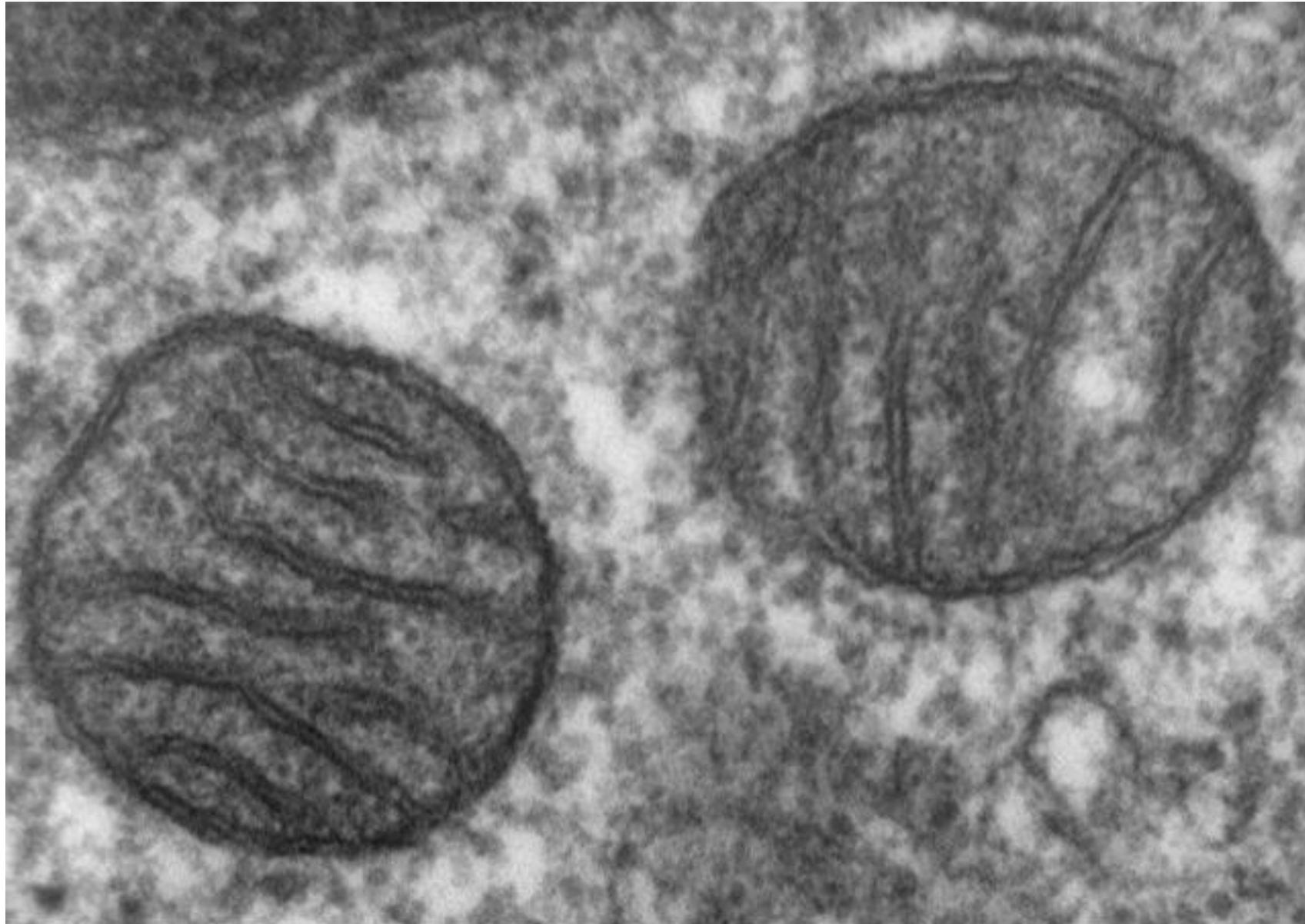
Принципиальное строение светового микроскопа и трансмиссионного электронного микроскопа. На данном рисунке отмечено сходство внутреннего устройства микроскопов. Стеклянным линзам светового микроскопа в электронном микроскопе соответствуют магнитные катушки. В электронном микроскопе необходимо, чтобы образец находился в вакууме. На фотографии показан рабочий трансмиссионный микроскоп.



Тонкий срез клетки принадлежит очень быстро замороженной дрожжевой клетке, в которой стекловидный лед был замещен сначала органическим растворителем, а затем пластмассой на основе смолы. Видны ядро, митохондрии, клеточная стенка, аппарат Гольджи и рибосомы в состоянии, которое можно считать настолько приближенным к живой клетке, насколько это возможно.



Электронная
микрофотография
поперечного среза
участка клетки печени.
Показаны примеры
большинства основных
внутриклеточных
компарментов.



50 nm

08LungTEM

1/7/0 REMF

Гистологическая техника

Подготовка материала

- Фиксация
- Обезвоживание
- Заливка

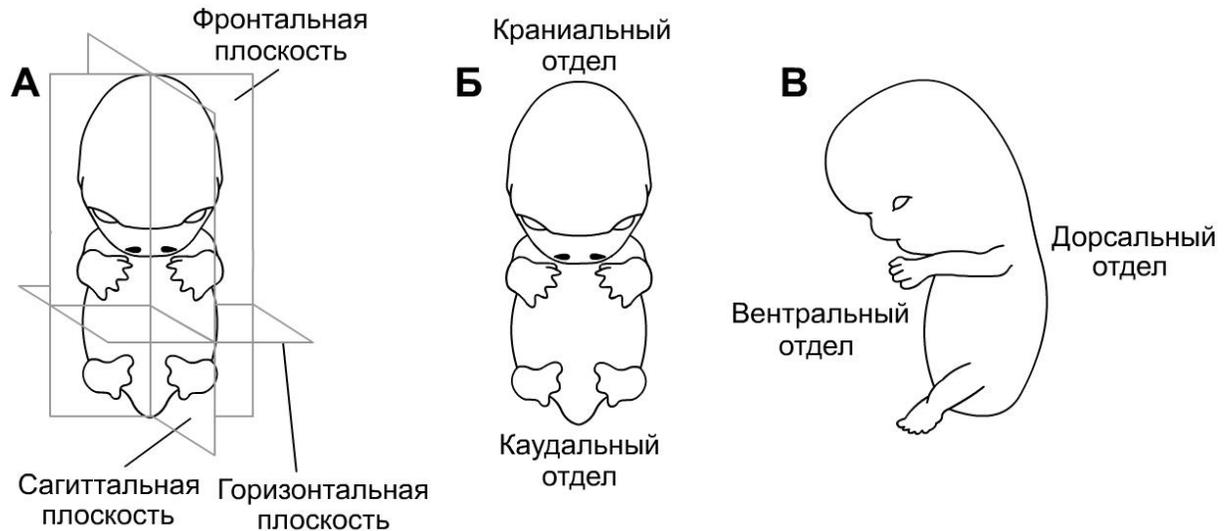
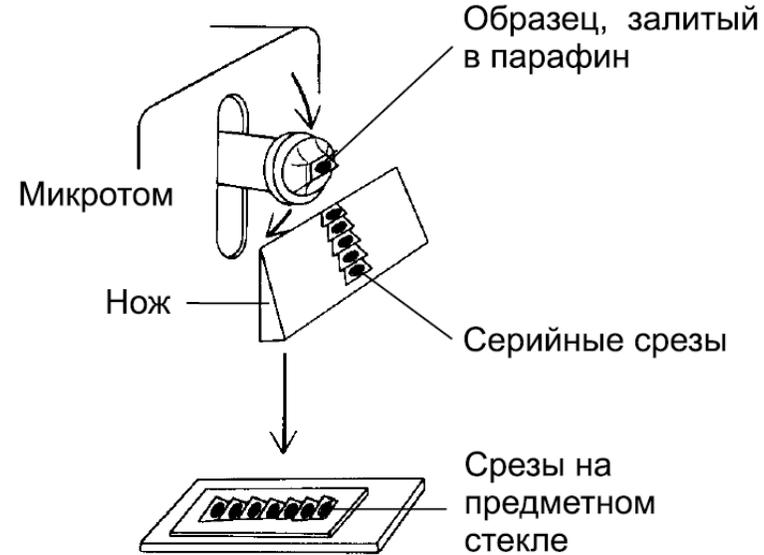
Приготовление срезов

- Микротом
- Криостат (интраоперационная диагностика)

Процессирование срезов

(окрашивание гистологическими красителями, гистохимия, иммуногистохимия, гибридизация)

Микроскопия (световая, флуоресцентная, электронная, сканирующая зондовая, лазерная, рентгеновская)



Гистологические красители

Способность тканевых (внутриклеточных) компонентов по-разному окрашиваться зависит от кислотно-щелочных свойств молекул, входящих в их состав. В начале 19 века Ян Эвангелист Пуркинье впервые применил краситель индиго. Описал ряд гистологических структур, которые носят его имя (напр., *Пуркинье волокна*, *Пуркинье клетки*).

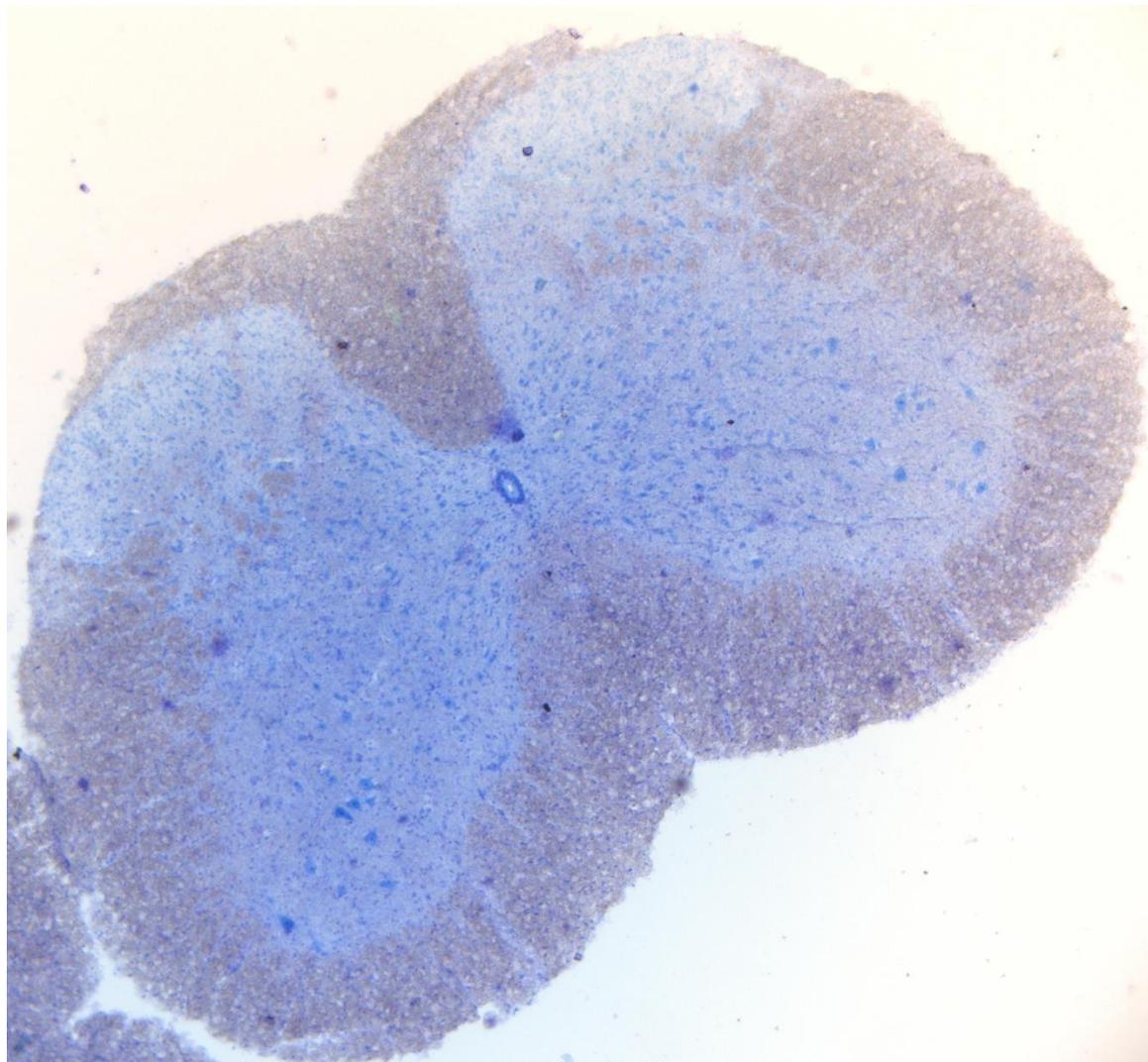
Индиго известный с глубокой древности краситель, добывался в Китае и Индии из *индигоносных растений* (напр., *Indigofera tinctoria*); широко применялся для крашения хлопка и шерсти в синий цвет, традиционно используется в производстве джинсовой ткани.

Кислые красители (эозин, конгокрасный) связываются со структурами или веществами, имеющими щелочную реакцию. По окрашиванию секреторных гранул различают ацидофильные клетки аденогипофиза, эозинофилы крови.

Щелочные красители (*например*, гематоксилин, метиленовый синий) связываются с кислыми молекулами (*например*, нуклеиновые кислоты ядра и рибосом). По окрашиванию секреторных гранул различают базофильные клетки аденогипофиза, базофилы крови.

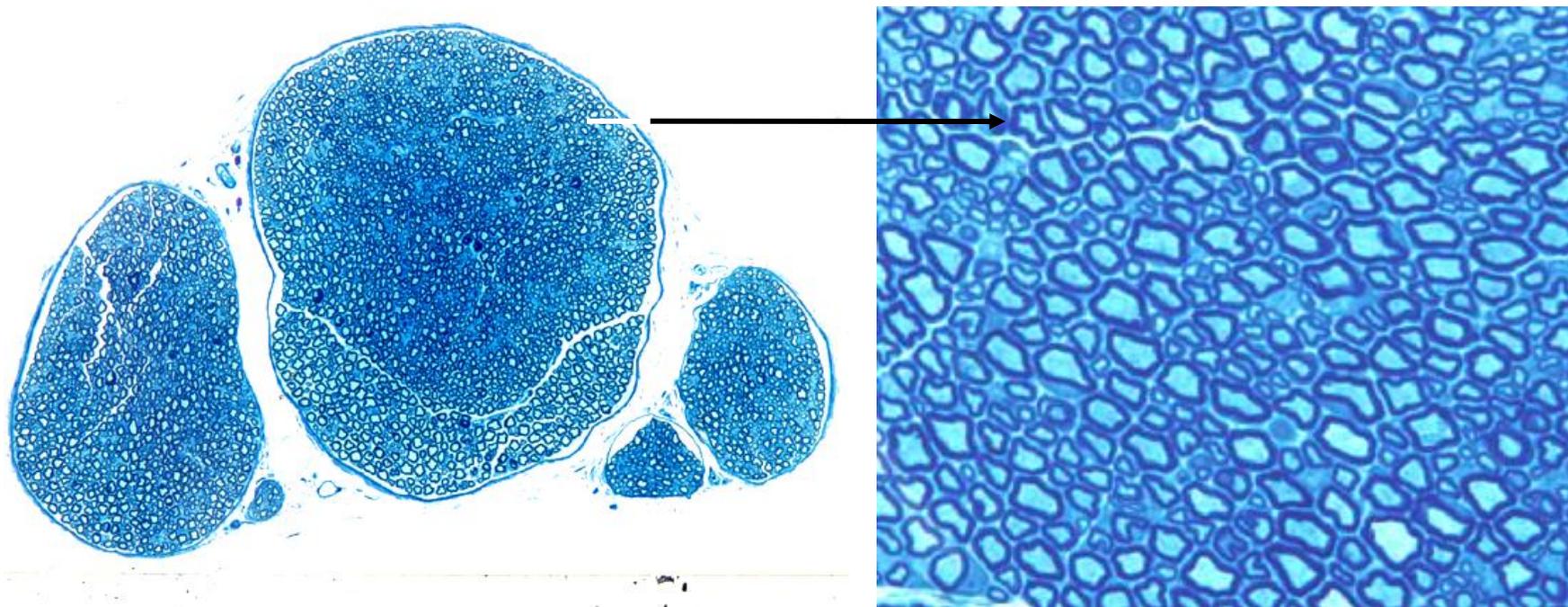
Стандартные красители. Часто используют смеси кислых и щелочных красителей (*например*, гематоксилин + эозин).

Поперечный срез спинного мозга мыши после космического полета



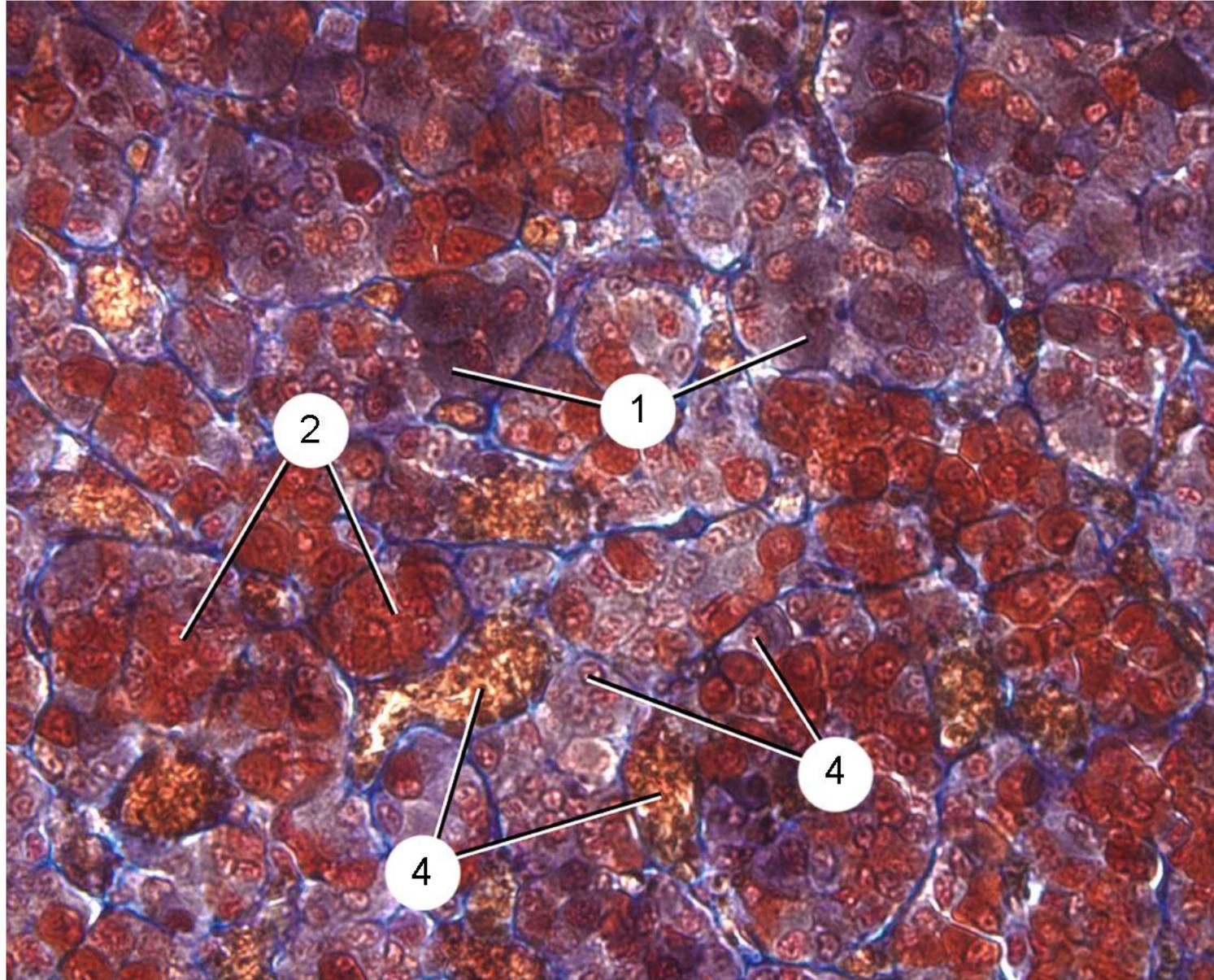
Поперечный срез седалищного нерва

Полутонкий срез (1мкм), окраска метиленовым синим



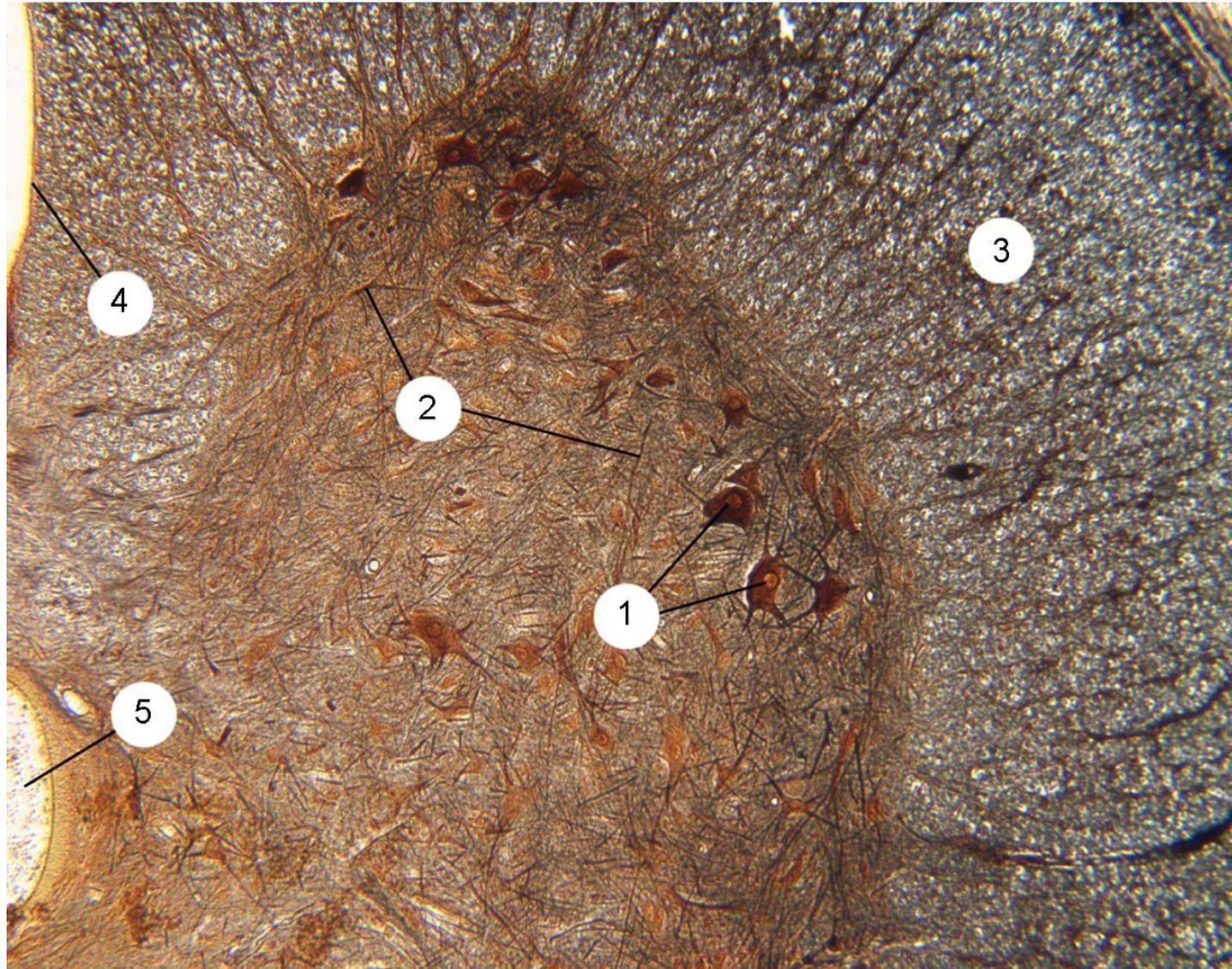
Аденогипофиз

Окраска гематоксилином и эозином



Спинной мозг

Импрегнация азотнокислым серебром. Камило Гольджи в 1906 г. получил нобелевскую премию за открытие метода импрегнации нервной ткани азотнокислым серебром





Спасибо за внимание!