

Методы современной микроскопии

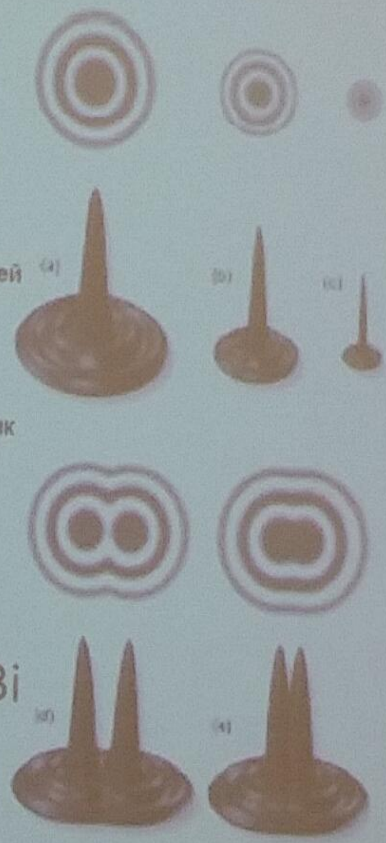
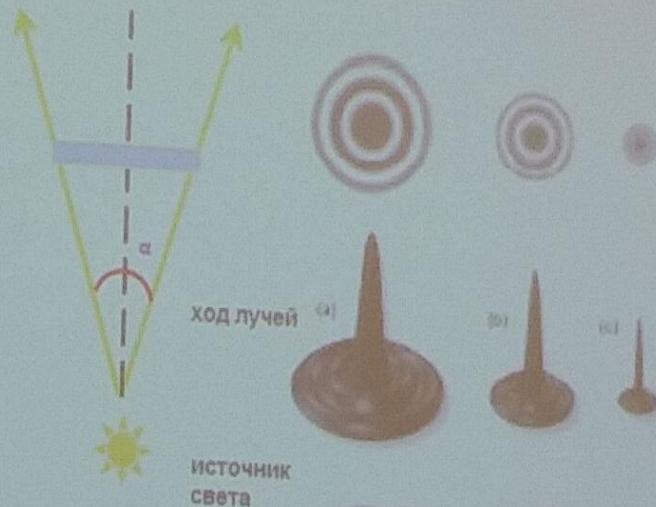
Лекция 3

Методы оптической микроскопии

Основы формирования изображения

$$d = 1.22(\lambda/2 \cdot NA)$$

d – расстояние между двумя соседними элементами изображения,
 λ – длина волны,
 NA – числовая апертура объектива микроскопа



Способы повышения контраста

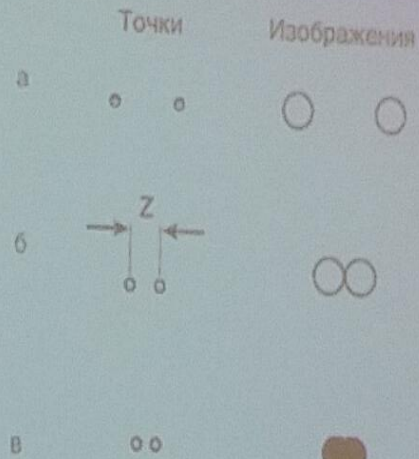
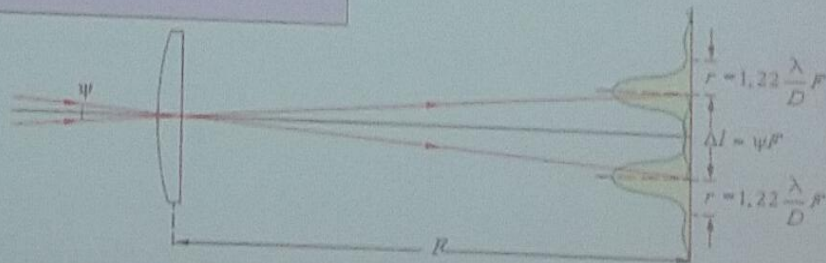
$$\text{Процент контраста} = [(B_i - S_i) \times 100] / B_i$$

B_i – интенсивность фона,
 S_i – интенсивность элемента изображения.

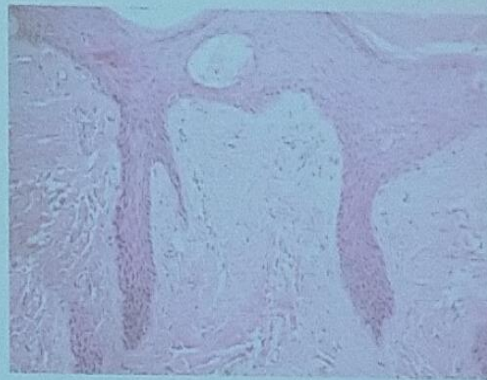
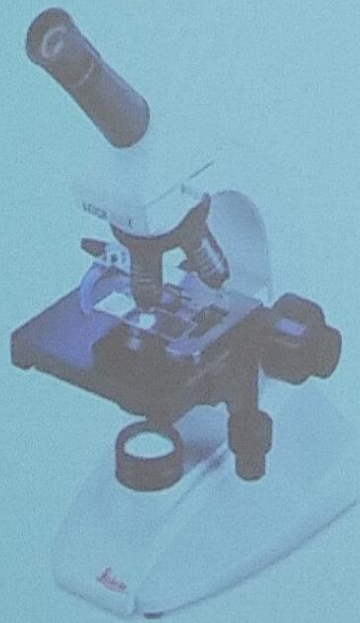
Разрешающая способность – способность оптического прибора различать мелкие детали.

Предел разрешения – наименьшее расстояние между двумя точками, которые различаются как две отдельные точки.

Разрешающая сила связана обратной зависимостью с пределом разрешения. Чем меньше предел разрешения, тем выше разрешающая способность микроскопа.



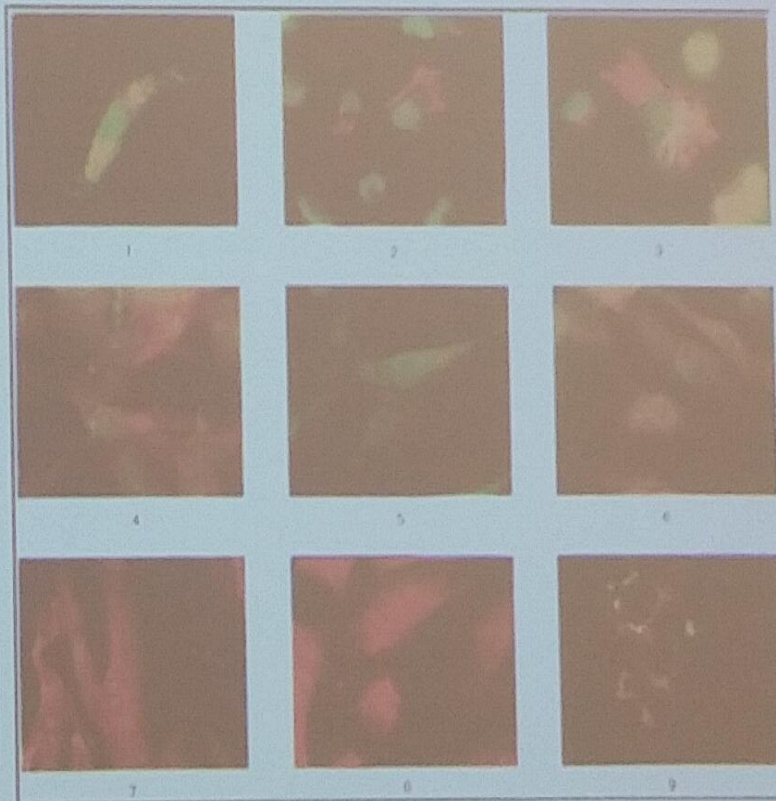
Световая микроскопия



Минимальная длина волны видимой части спектра равна примерно 0,4 мкм. Следовательно, для обычного светового микроскопа наименьшее разрешаемое расстояние равно приблизительно 0,2 мкм ($d_0 = \lambda / 2 = 0,4 \text{ мкм} / 2 = 0,2 \text{ мкм}$), а общее увеличение (произведение увеличения объектива на увеличение окуляра) может быть 1500-2500.

Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия

В флюоресцентном микроскопе в качестве источников света для возбуждения флюоресценции применяют ртутные или ксеноновые лампы сверхвысокого давления, обладающие высокой яркостью в области спектра 0,25-0,4 мкм (ближние ультрафиолетовые лучи) и 0,4-0,5 мкм (сине-фиолетовые лучи).



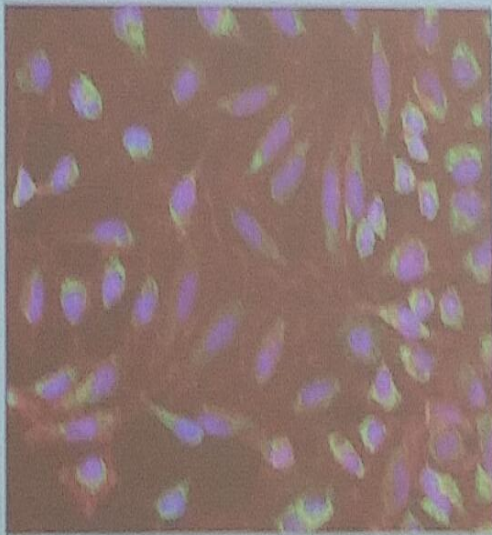
Флюоресценция возникает при
обработке препаратов специальными
красителями - флюорохромами

родамин

флюоресцин

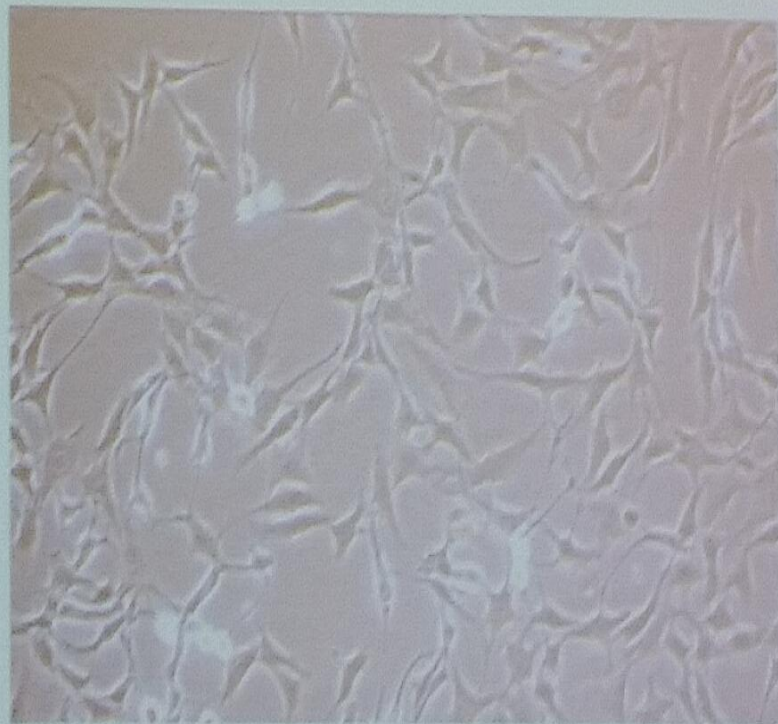


акридин оранжевый



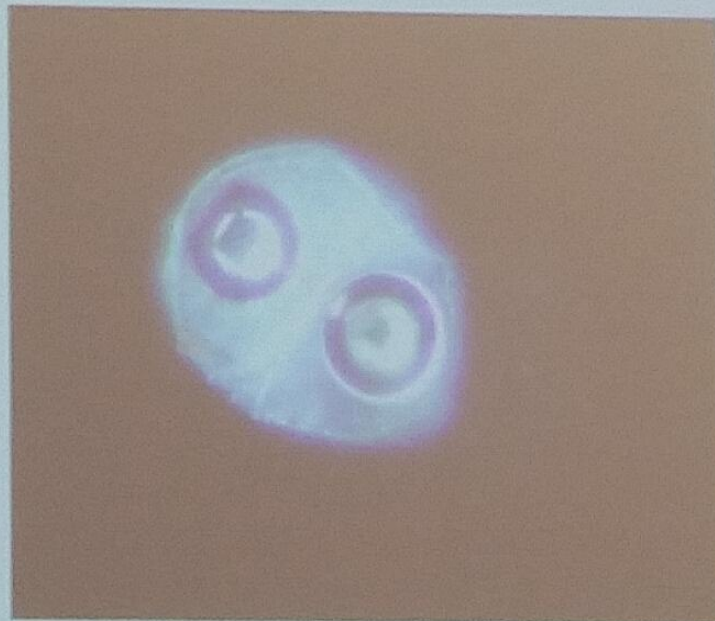
DAPI

Фазово-контрастная микроскопия



Метод фазового контраста обеспечивает контрастность изучаемых неокрашенных структур за счет специальной кольцевой диафрагмы, помещаемой в конденсоре, и так называемой фазовой пластинки, находящейся в объективе.

Микроскопия в темном поле



В темнопольном микроскопе только свет, который дает дифракцию структур в препарате, достигает объектива. Происходит это благодаря наличию в микроскопе специального конденсора. Разрешение этого микроскопа не может быть лучше, чем у светлопольного микроскопа, так как используется такая же длина волны. Но здесь достигается больший контраст

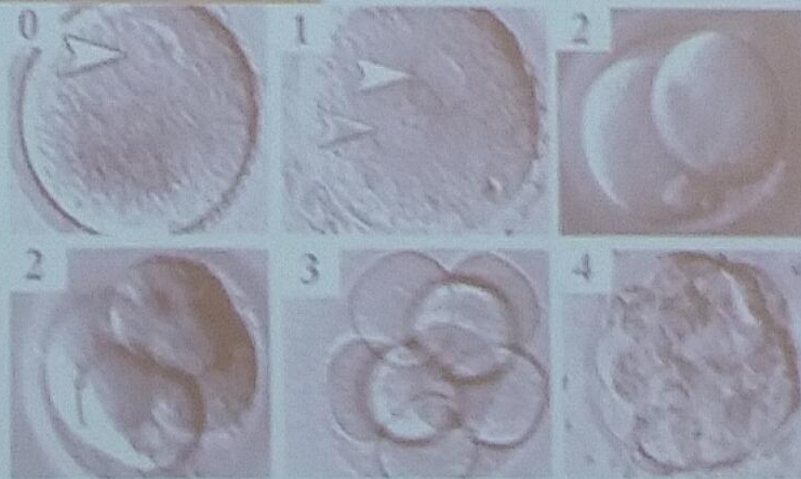
Фазово-контрастная микроскопия

Интерференционный микроскоп

пучок света от осветителя разделяется на два потока: один проходит через объект и изменяет по фазе колебания, второй идет, минуя объект

Дифференциальный интерференционный микроскоп

используют для изучения рельефа поверхности клеток и других биологических объектов



Поляризационная микроскопия

Поляризационные фильтры

Поляризатор

между пучком света, и объектом

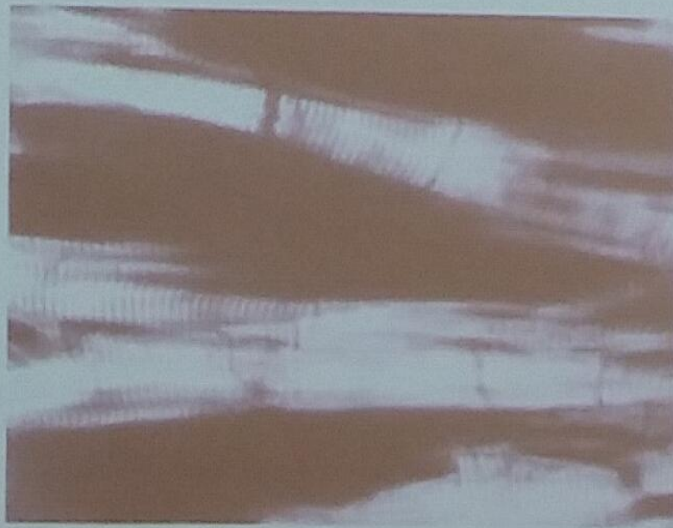
свет проходит только в одном
направлении

Анализатор

между линзой объектива и глазом

имеет главную ось, которая располагается
перпендикулярно первому фильтру.

Свет не пропускает



Миокард
в поляризационном свете

Электронная микроскопия

ТЭМ

трансмиссионные (просвечивающие)
электронные микроскопы

Плоское изображение

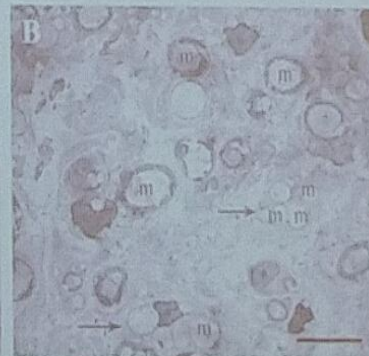
СЭМ

сканирующие (растровые)
электронные микроскопы

Объемное изображение

Используется поток электронов с более короткими, чем в световом микроскопе,
длинами волн

Разрешаемое расстояние составляет около 0,1-0,7 нм



Электронная микроскопия

Метод
замораживания
– скалывания

Метод
криоэлектронной
микроскопии

Метод
замораживание -
травление

Метод
контрастирования
солями тяжелых
металлов

Метод
криоультра-
микротомии

Метод
сверхвысоковольтной
микроскопии

Рентгеноструктурный анализ

метод с использованием рентгеновских
лучей, имеющих длину волны около 0,1 нм

Атомно-силовая микроскопия

Контактная атомно-силовая микроскопия

измерение топографии поверхности в контактном методе.

Бесконтактная атомно-силовая микроскопия

измерение топографии поверхности в бесконтактном методе, основанном на использовании вибрационной методики.

Полуконтактная атомно-силовая микроскопия (или прерывисто- контактная атомно-силовая микроскопия)

в данном случае используется вибрационная методика, при которой колеблющееся острие слегка стучит по поверхности образца.

Конфокальная микроскопия

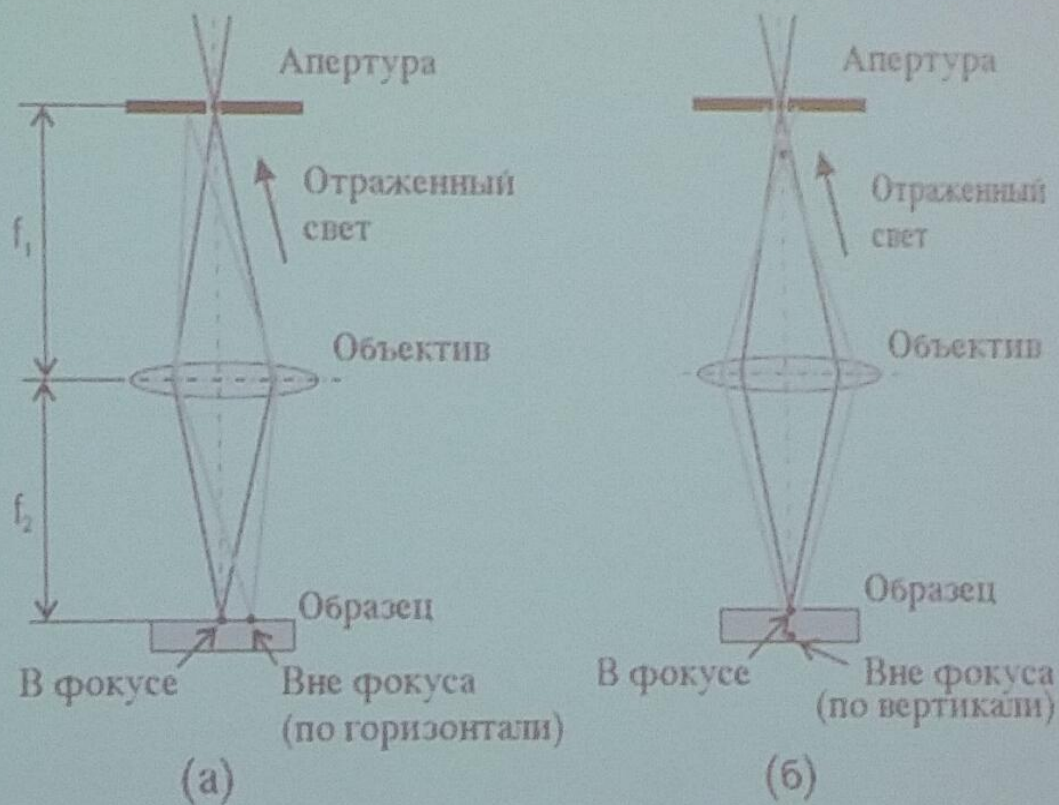
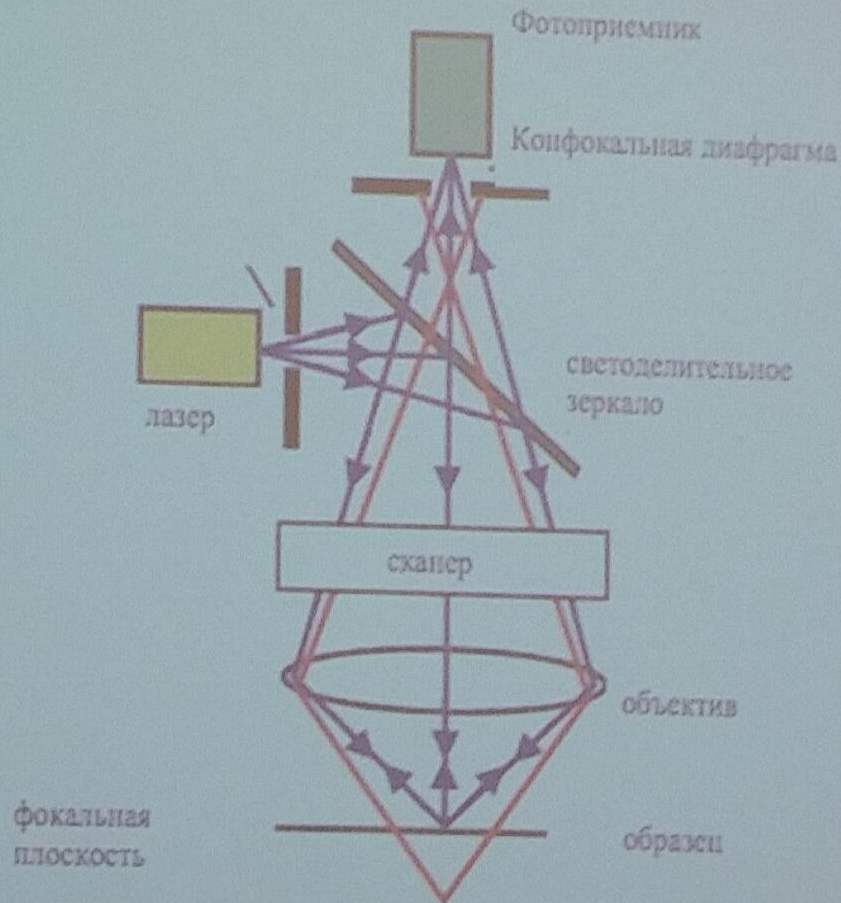
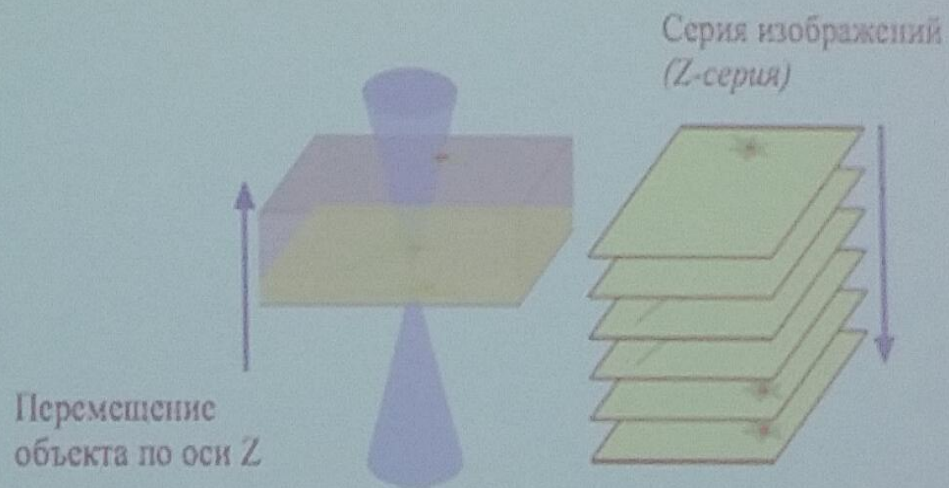


Рис. 1.2.21. Схема формирования пучков в конфокальной микроскопии.

Конфокальная микроскопия



Конфокальная микроскопия



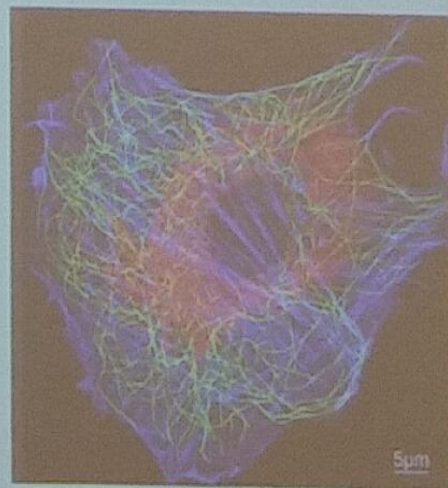
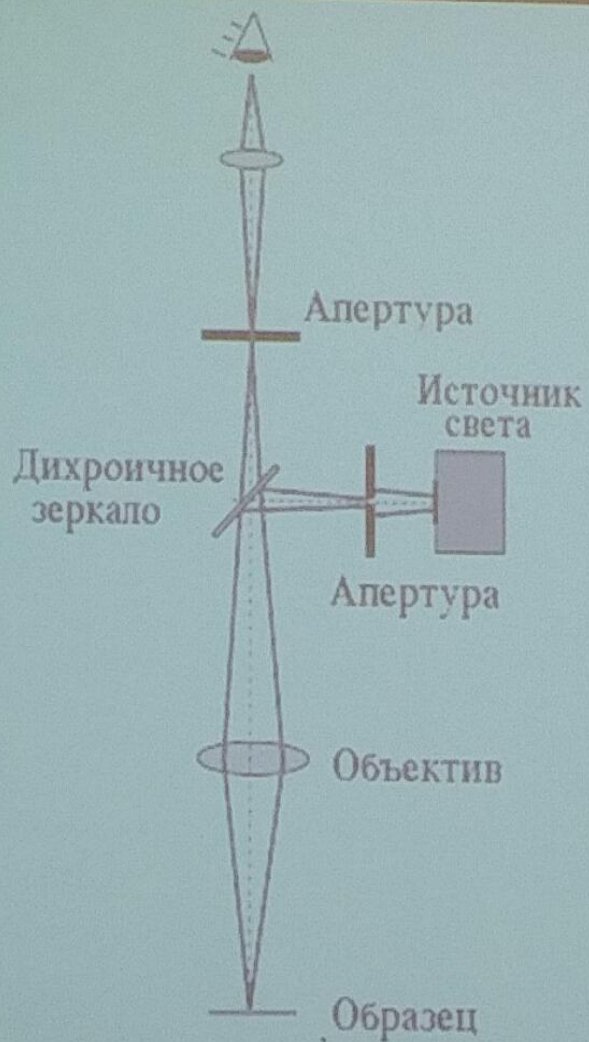
Конфокальная микроскопия

Преимущества:

1. Высокая контрастность изображения.
2. Улучшенная разрешающая способность (латеральная в 1.4 раза, аксиальная – в зависимости от размера конфокальной диафрагмы).
3. Получение «оптических срезов», трехмерная реконструкция.
4. Мультиспектральные исследования с высокой степенью разделения сигналов от разных флуорохромов.
5. Возможности применения методов цифровой обработки изображений.

Недостатки:

1. Сложность настройки прибора.
2. Отсутствие в ЛСКМ «оптического» изображения. Оно существует только в цифровой форме и отображается на экране монитора.
3. Высокая стоимость оборудования и его эксплуатации.



3D-серии и 4D-серии в конфокальной микроскопии

1. Последовательный просмотр изображений серии, меняя их вручную или автоматически (play) и выбирая наиболее информативный срез.
2. Создание ортогональных проекций XZ или YZ. Положение разреза может задаваться вручную. Можно сделать также XZ сканирование.
3. Объемная (3D) реконструкция. Изображение объекта может наблюдаться под разными углами зрения (рис. В.5, В.6).
4. То же, но с автоматическим изменением угла зрения (анимация).
5. Стереοизображение. Программа на основании 3D серии создает два изображения разных цветов (например, красный и зеленый), сдвинутые на небольшой угол. Совмещенное изображение рассматривается на экране с помощью специальных очков.
6. То же, но с автоматическим изменением угла зрения (стереοанимация)



| RCK 1 | | RCK 2 | | RCK 3 | |
|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
| Length | = 672.50 um | Length | = 672.50 um | Length | = 672.50 um |
| Mean Amplitude | = 30.72 | Mean Amplitude | = 40.27 | Mean Amplitude | = 18.00 |
| Max. Amplitude | = 52.00 | Max. Amplitude | = 51.00 | Max. Amplitude | = 20.00 |
| Pos. Max. Ampl. | = 602.50 um | Pos. Max. Ampl. | = 543.25 um | Pos. Max. Ampl. | = 554.50 um |
| Min. Amplitude | = 0.00 | Min. Amplitude | = 0.00 | Min. Amplitude | = 0.00 |
| Pos. Min. Ampl. | = 668.13 um | Pos. Min. Ampl. | = 663.75 um | Pos. Min. Ampl. | = 663.75 um |
| Avg. Deviation | = 11.97 | Avg. Deviation | = 24.75 | Avg. Deviation | = 6.20 |
| Std. Deviation | = 14.00 | Std. Deviation | = 27.40 | Std. Deviation | = 7.32 |
| Variance | = 212.72 | Variance | = 751.02 | Variance | = 50.72 |
| R(672.50 nm) | = 0.00 | R(672.50 nm) | = 0.00 | R(672.50 nm) | = 0.00 |
| R(672.50 nm) | = 0.00 | R(672.50 nm) | = 0.00 | R(672.50 nm) | = 0.00 |
| dI | = 0.00 m | dI | = 0.00 m | dI | = 0.00 m |
| dIa | = 0.00 m | dIa | = 0.00 m | dIa | = 0.00 m |

Конфокальная микроскопия

Преимущества:

1. Высокая контрастность изображения.
2. Улучшенная разрешающая способность (латеральная в 1.4 раза, аксиальная – в зависимости от размера конфокальной диафрагмы).
3. Получение «оптических срезов», трехмерная реконструкция.
4. Мультиспектральные исследования с высокой степенью разделения сигналов от разных флуорохромов.
5. Возможности применения методов цифровой обработки изображений.

Недостатки:

1. Сложность настройки прибора.
2. Отсутствие в ЛСКМ «оптического» изображения. Оно существует только в цифровой форме и отображается на экране монитора.
3. Высокая стоимость оборудования и его эксплуатации.

Методы исследования фиксированных клеток и тканей

Этапы приготовления препаратов:

Типы препаратов:

Мазок
Отпечаток
Пленка
Тонкий срез

Световая М -
окрашивание срезов
Электронная М -
напыление солями
металлов

взятие материала и
его фиксация

уплотнение

приготовление срезов

окрашивание или
контрастирование
срезов

Фиксаторы:
спирт, формалин, растворы
солей тяжелых металлов,
осмиевая кислота,
специальные фиксирующие
смеси. Заморозка

Уплотнители:
парафин, целлоидин, смолы

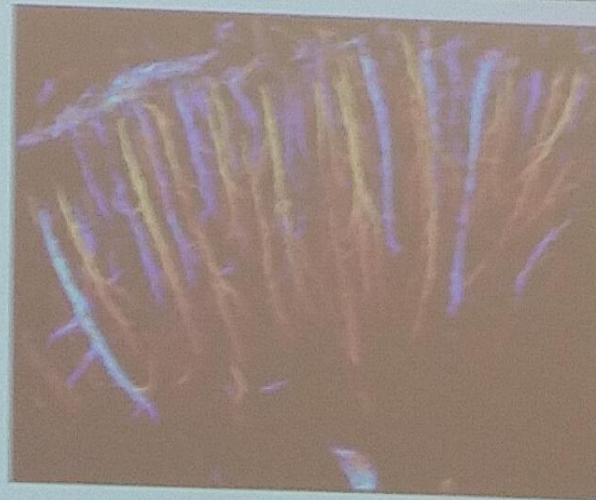
Микротом, Ультратом,
Криотом

кислые, основные и
нейтральные

Методы исследования живых клеток и тканей

Прижизненные исследования клеток и тканей в организме

In vivo



Витальное

Краситель вводят в организм животного

Суправитальное

Окрашивание живых клеток выделенных из организма

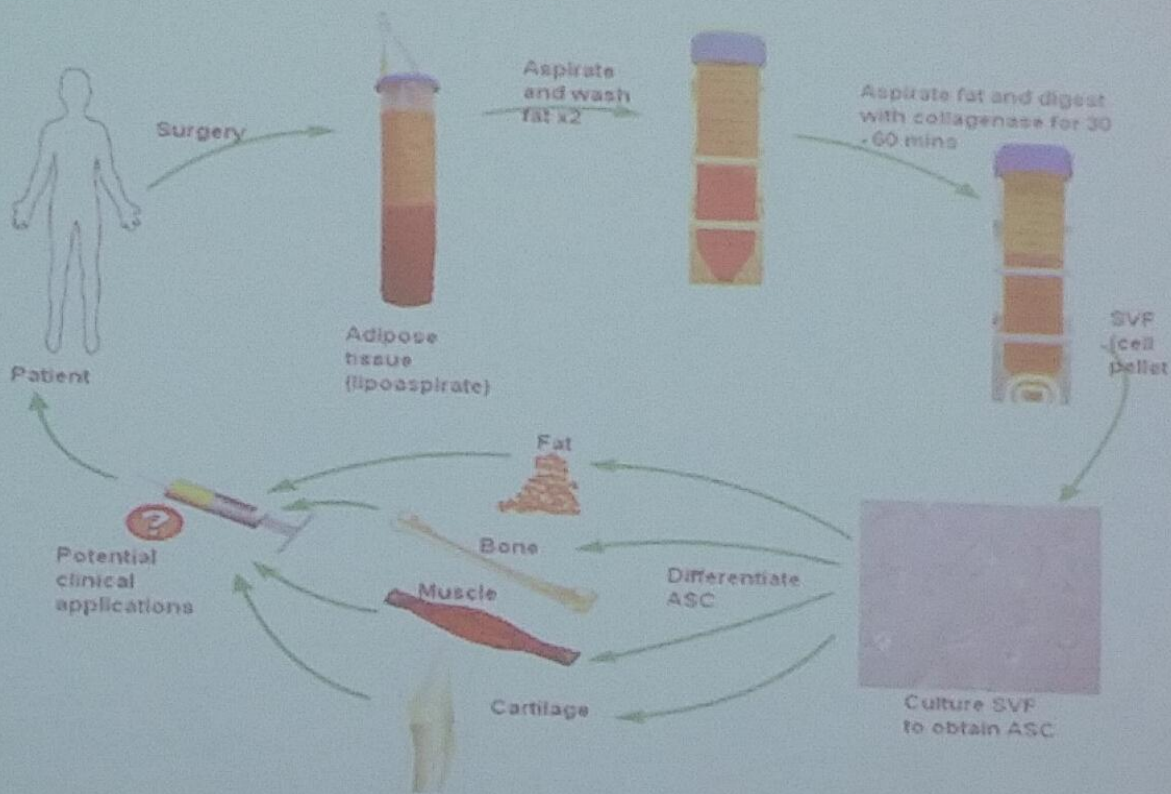
Методы прижизненного окрашивания клеток и тканей

Красители:

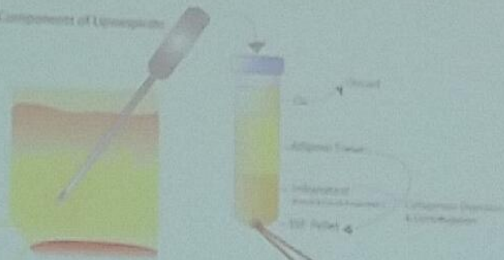
Световые

Флуорисцентные

Исследования живых клеток и тканей в культуре (in vitro)



A Components of Liposuction

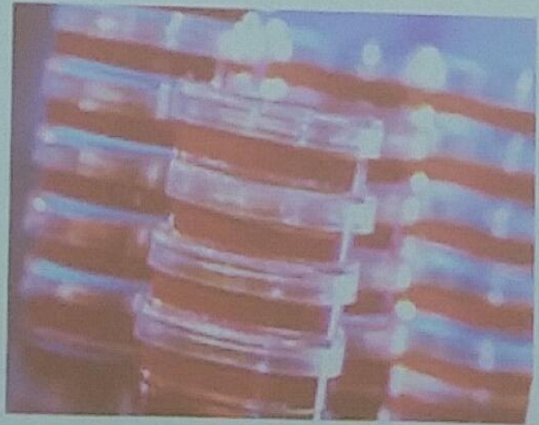
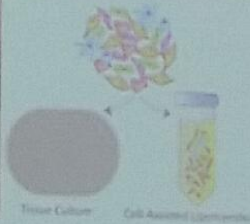


B Components of Adipose Tissue

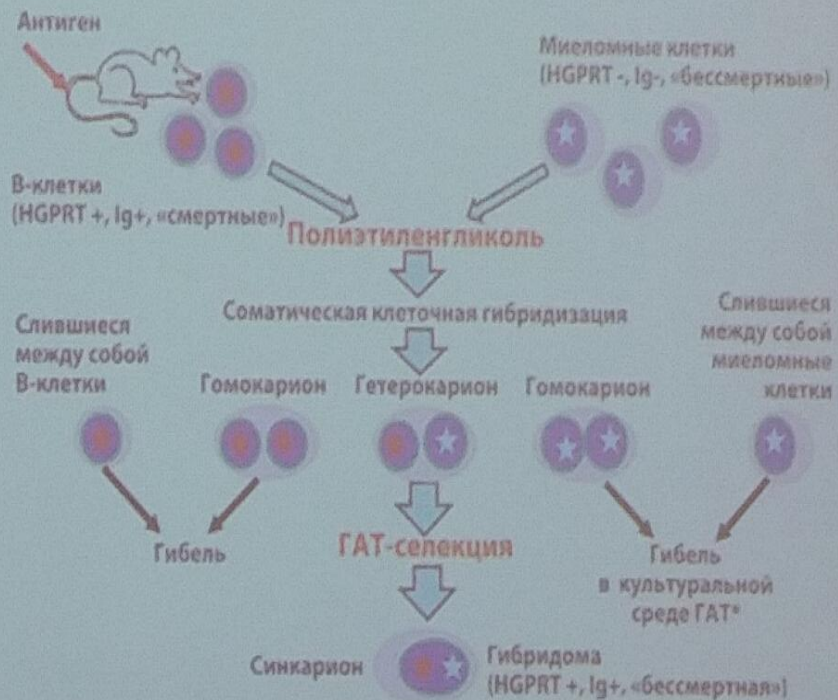
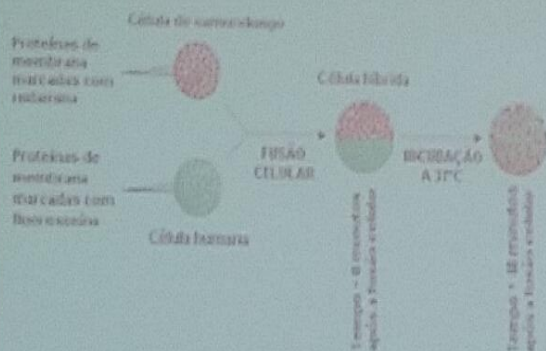


- MSCs** Mesenchymal
 - CD146⁺, CD146⁻, NG2⁺
 - CD31⁻, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻
- Adipocytes**
- Adipose-Derived Stem Cells**
 - CD31⁻, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD133⁺
 - CD14⁻, CD37⁻, CD45⁻, CD106⁺, CD144⁺
 - CD145⁻, CD45⁺
- Pre-Adipocytes**
- Endothelial & Pericyte Cells**
 - CD31⁺, CD34⁺, CD97⁺, CD146⁺, VEGF⁺
 - EGFR⁺
- Haemopoietic Cells**
Monocytes/Macrophages

C Components of SIF Pellet



Клеточные гибриды



* ГАТ - культуральная среда, содержащая гипоксантин, инозинотрицин, тимидин. Синкарионы не растут в гибридоме.

Методы исследования химического состава и метаболизма клеток и тканей

Цито-
и гистохимически
е методы

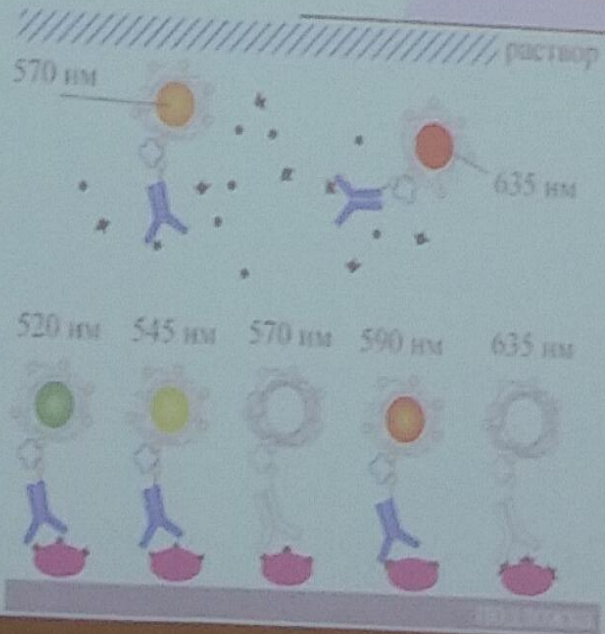
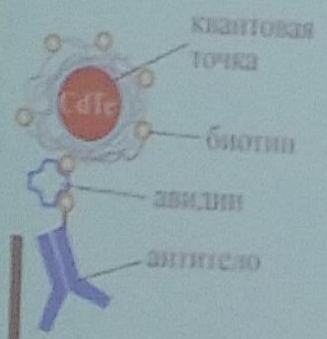
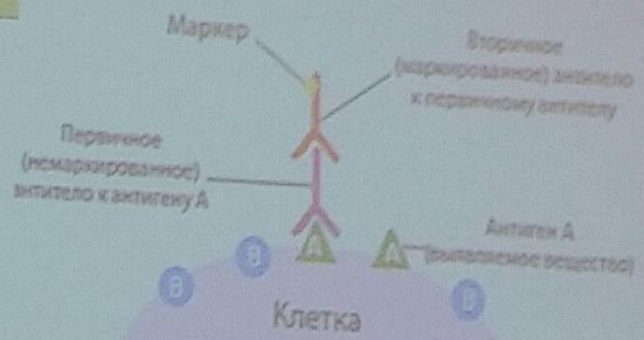
Электронная
гистохимия

Метод
радиоавтографии

Функции:
локализация различных
химических веществ в
структурах клеток, тканей и ор-
ганов - ДНК, РНК, белков,
углеводов, липидов,
аминокислот, минеральных
вещества, витаминов,
активность ферментов



Методы иммунофлюоресцентного анализа. Применение антител



- DEX
 - ▲ GM
 - CZP
 - ▲ MPA
 - ◆ CEF
- определяемые антигены

Количественные и качественные гистохимические методы

Цитоспектрофотометрия

метод количественного изучения внутриклеточных веществ по их абсорбционным спектрам

Цитоспектрофлюориметрия

метод количественного изучения внутриклеточных веществ по спектрам их флюоресценции или по интенсивности флюоресценции на одной заранее выбранной волне (цитофлюориметрия).

Интерферометрия

метод позволяет оценить сухую массу и концентрацию плотных веществ в живой и фиксированной клетках. С помощью этого метода, например, можно установить суммарное содержание белков в живых и фиксированных клетках.

Методы анализа изображения клеточных и тканевых структур

Количественный анализ гистологических препаратов

Денситометрические методы

Основаны на избирательном поглощении различными веществами лучей со строго определенной длины волны. Интенсивность поглощения света зависит от концентрации вещества (оптической плотности структуры).

Цитоспектро-
фотометрия

Цитоспектро-
флюориметрия

Морфометрические методы

Описывают метрические свойства морфологических структур в двух- и трехмерной системе, позволяют провести трехмерную реконструкцию объекта.

Планиметрия
(на плоскости)

Стереометрия
(в объеме)

Статистические методы

Позволяют установить характер связи между различными признаками, сравнивать объекты одного и разных организмов и т.д.

Применение новых методов исследований в гистологии, цитологии и эмбриологии позволяет выяснить общие закономерности организации тканей и клеток, структурные основы биохимических процессов, определяющих функцию конкретных структурных компонентов клетки