

Правила работы с оптическими приборами. Методика приготовления постоянных и временных препаратов

**Клеточная теория. Виды микроскопии.
Методика приготовления постоянных и
временных препаратов**

Клеточная теория

- Клетка – основное понятие при изучении медико-биологических дисциплин.
- Термин «Клетка или cellula» ввел Роберт Гук в 1665 году, английский физик и ботаник. Рассматривая при помощи увеличительных стекол срез пробки, обнаружил, что он состоит из ячеек, которые он назвал клетками.



Маттиас Якоб Шлейден (1804—1881) — немецкий ботаник и общественный деятель



Теодор Шванн (1810 - 1882) — немецкий цитолог, гистолог и физиолог, автор клеточной теории

- В 1839 году ботаник М. Шлейден и зоолог Т. Шванн доказали, что все растительные и животные организмы построены из клеток. Впервые это обобщение было сформулировано в 1839 году создателем клеточной теории Т. Шванном, согласно которой все организмы животных и растений состоят из клеток, каждая клетка организма функционирует независимо от других, и все клетки возникают из бесструктурного вещества неживой природы.



Рудольф Людвиг Карл Вирхов (1821-1902) — немецкий учёный и политический деятель второй половины XIX столетия, врач, патологоанатом, гистолог, физиолог, один из основоположников клеточной теории в биологии и медицине, основоположник теории клеточной патологии в медицине; был известен также как археолог, антрополог, палеонтолог и политик-демократ.

- В 1855 году выходят работы немецкого врача Рудольфа Вирхова, оказавшие большое влияние на развитие клеточной теории. В монографии «Целлюлярная патология» он убедительно доказал, что клетки являются постоянными структурами, и возникают только путём размножения себе подобных, — **«всякая клетка происходит от другой клетки. Там где возникает клетка, ей должна предшествовать клетка, подобная тому, как животное происходит только от животного, растение только от растения»**. Т. е. Вирхов опроверг ошибочное представление Т. Шванна об образовании клеток из бесструктурного вещества и обосновал одно из ключевых положений клеточной теории **«каждая клетки из клетки»** (*omnis cellula e cellula*). В этой работе он также обосновал положение, что патология формируется на клеточном уровне, что в последствии было доказано развитием медицины, а именно, что патология возникает на клеточном уровне.



**Karl Ernst Ritter von Baer
Edler von Huthorn (1792 –
1876)**

- Карл Бэр обосновал положение – клетка является не только единицей строения, но и единицей развития живых организмов на основе работ по яйцеклеткам млекопитающим.
- **Типы клеточной организации:**
 - прокариотический;
 - эукариотический

- В современной трактовке **клеточная теория** включает следующие основные положения:
- 1. **Клетка - элементарная единица живого**, структурная и функциональная единица жизни.
- 2. **Клетки** всех организмов сходны (**гомологичны**) по строению, выполняемым функциям, химическому составу, обмену веществ, что объясняется единством их происхождения.
- 3. **Размножение клеток** происходит путём их **деления**, и каждая новая клетка образуется в результате деления исходной (материнской) клетки. Клетка - элементарная единица размножения.
- 4. В **многоклеточных организмах клетки специализированы по выполняемым функциям**, объединены целостной системой тканей и органов, связанные между собой нейрогуморальными формами регуляции. Благодаря деятельности клеток в многоклеточных организмах осуществляется рост, развитие, обмен веществ и энергии.
- 5. **Клетки многоклеточных организмов тотипотентны**, т.е. обладают генетическими потенциями всех клеток живого организма, но отличаются друг от друга разной экспрессией (активностью) различных генов, дифференцировкой, что приводит к морфологическому и функциональному разнообразию клеток.

- Клетка характеризуется биологическими свойствами:

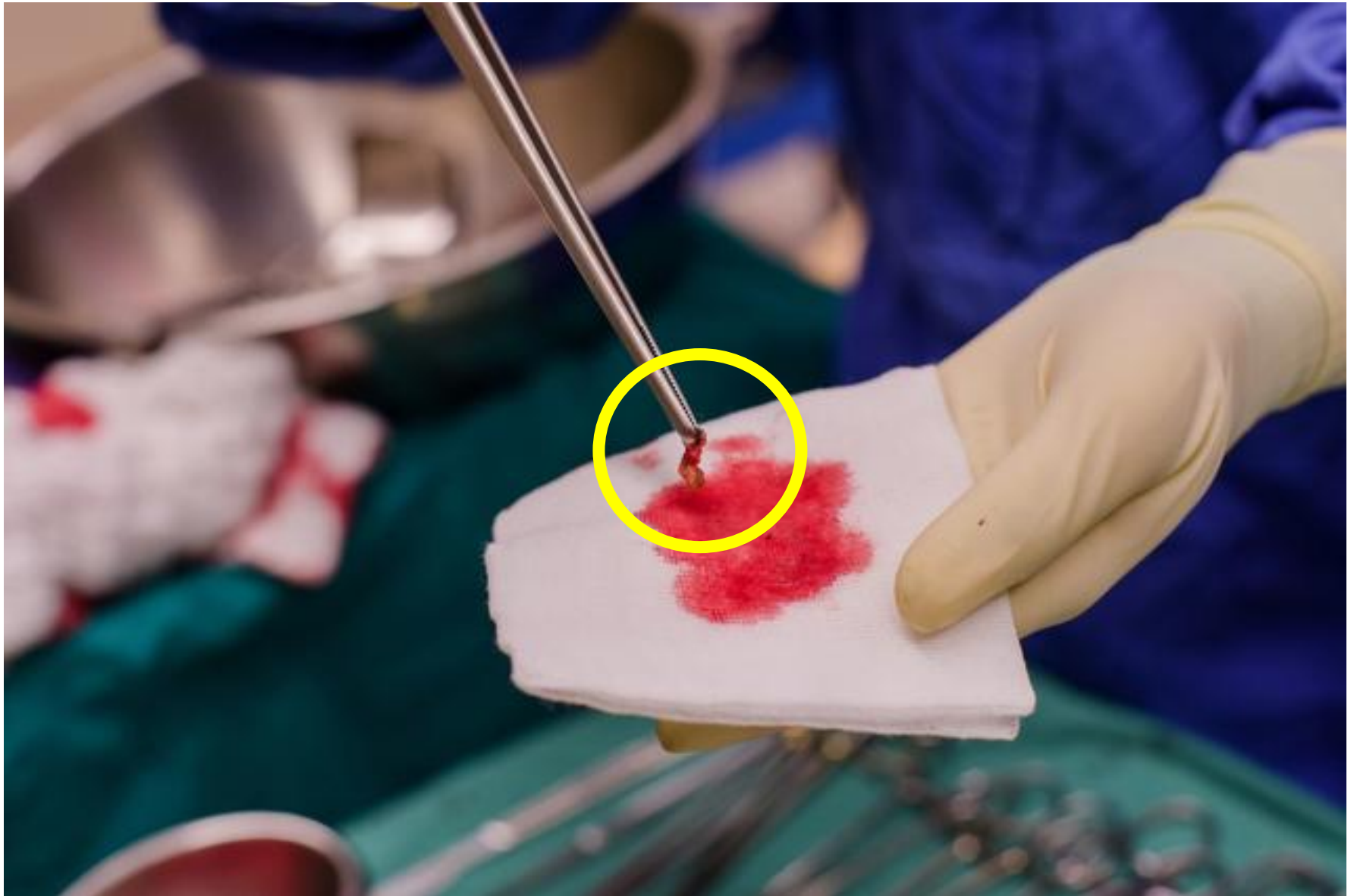
- **саморегуляция; - самовоспроизведение; - самообновление.**

- В основе саморегуляции клетки (организма) лежит механизм гомеостаза. Понятие гомеостаза было введено Уолтером, Кэнноном и разработано Клодом Бернаром.
- **Гомеостаз** - относительное постоянство внутренней среды клетки (организма). Различают гомеостаз физиологический и развития.
- ***Гомеостаз физиологический*** – это генетически детерминированная способность организма сохранять реакции, например: рН крови, осмотическое давление в клетке.
- ***Гомеостаз развития*** - это генетически детерминированная способность организма сохранять реакции под действием внешней среды, например: при удалении одной почки вторая почка выполняет двойную нагрузку и обеспечивает мочевыделительную функцию.

Этапы приготовления гистологического препарата

- 1). Взятие материала.
- 2). Фиксация материала.
- 3). Обезвоживание (дегидратация).
- 4). Заливка (в парафин, целлоидин и др.).
- 5). Изготовление срезов (при помощи микротомов).
- 6). Депарафинизация (при заливке в парафин).
- 7). Окрашивание срезов.
- 8). Дегидратация.
- 9). Заключение в бальзам (для постоянных препаратов).

Взятие материала



Фиксация материала

Гистологическая техника I этап - взятие и фиксация материала

ФИКСАЦИЯ

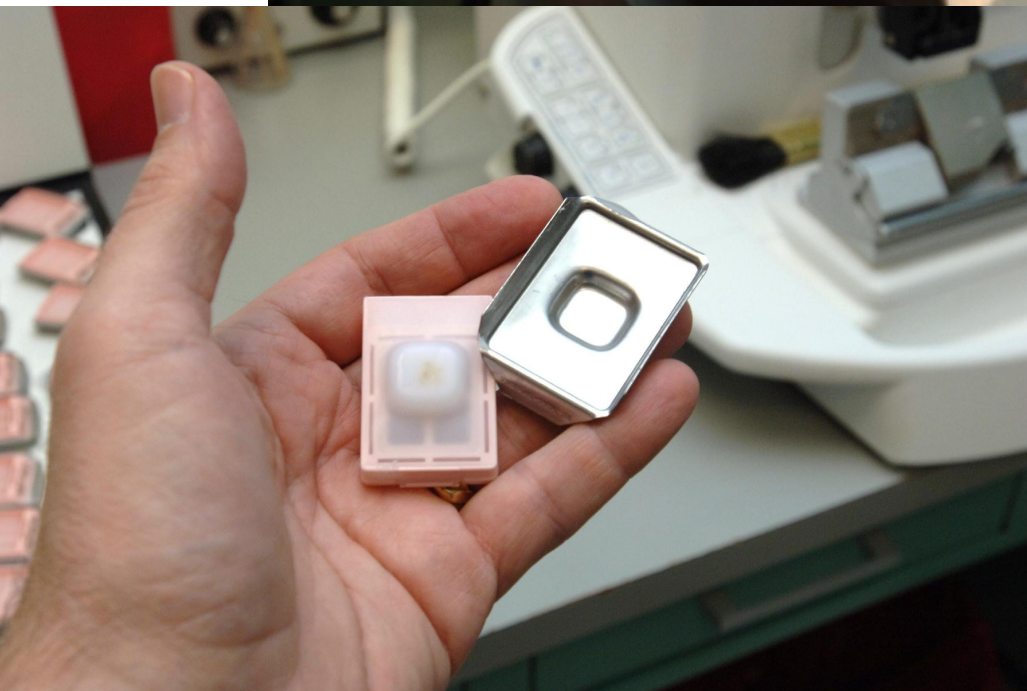


После вырезки маркированные кусочки немедленно помещены в достаточный объем фиксирующей жидкости

Дегидратация



Уплотнение (заливка)



Изготовление срезов. Микротом санный



Микротом ротационный



Криотом



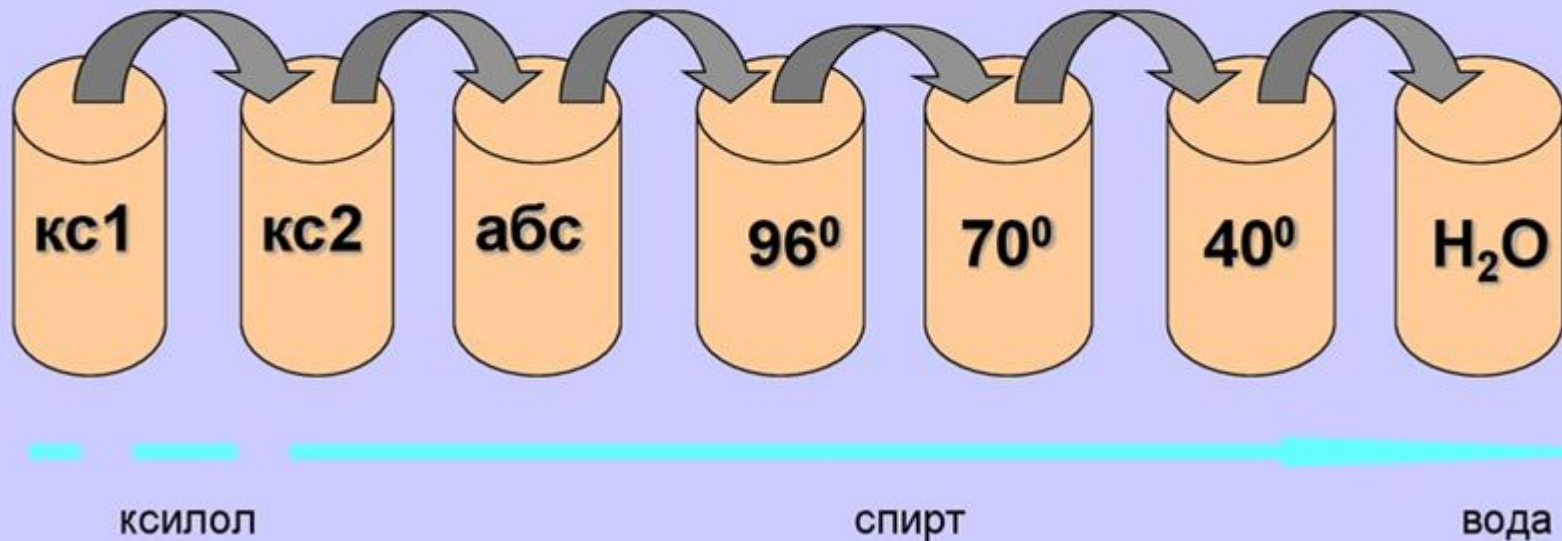
Наклейка срезов на предметные стёкла



Депарафинизация

- Препарат последовательно проводят через ксилол и батарею спиртов для удаления парафина.

-



Окрашивание препарата



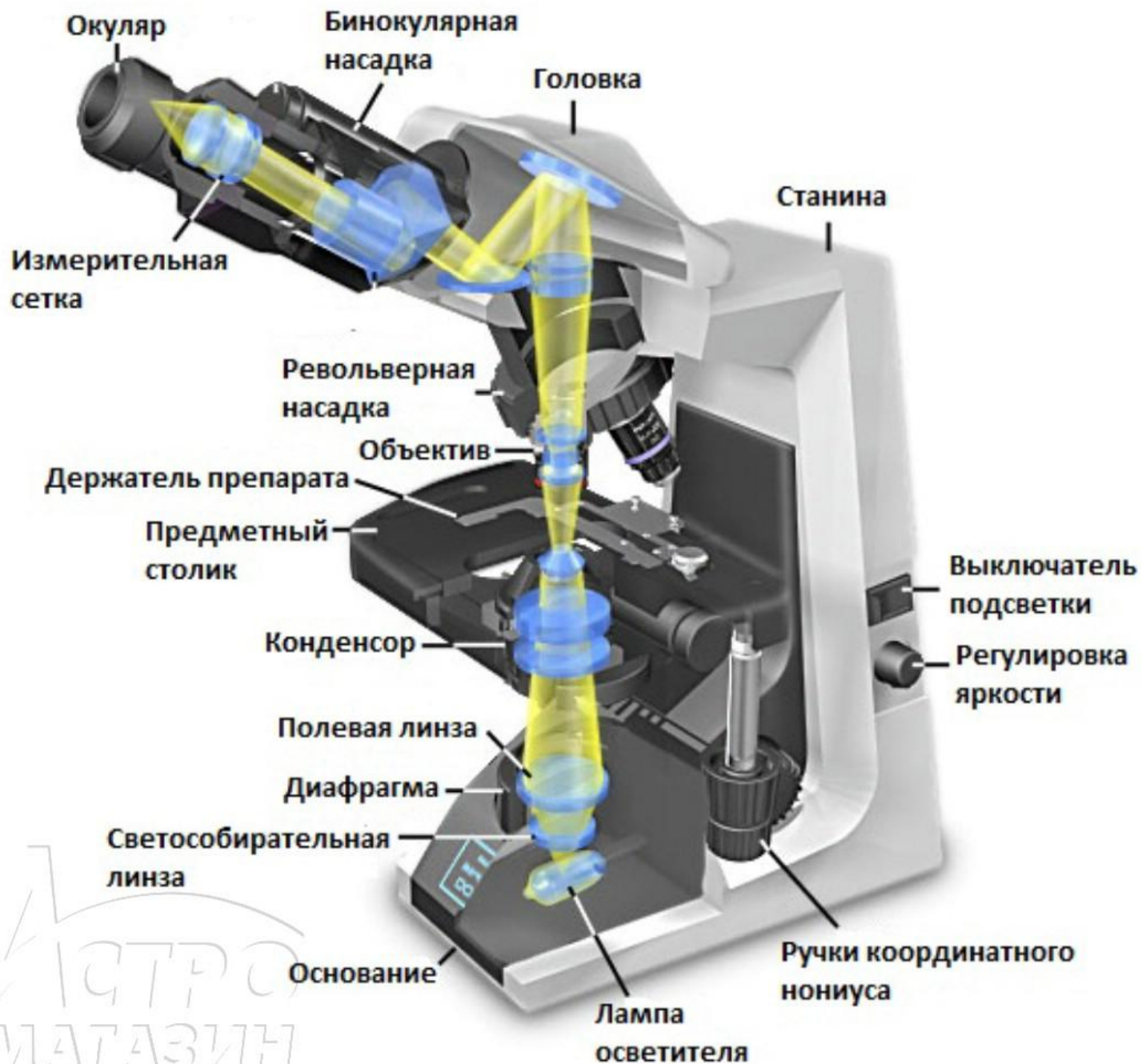
Дегидратация



Заклучение окрашенного среза в бальзам



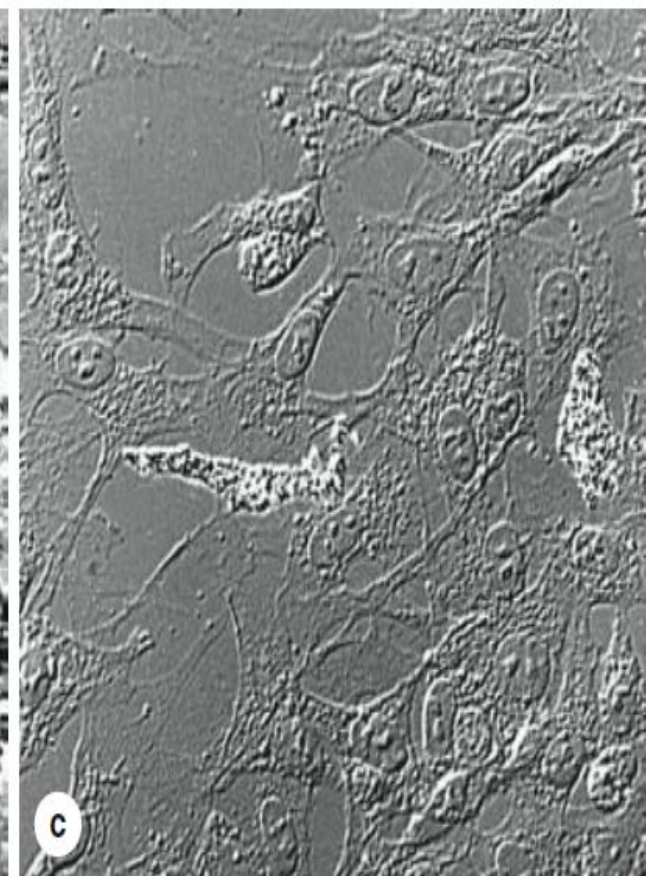
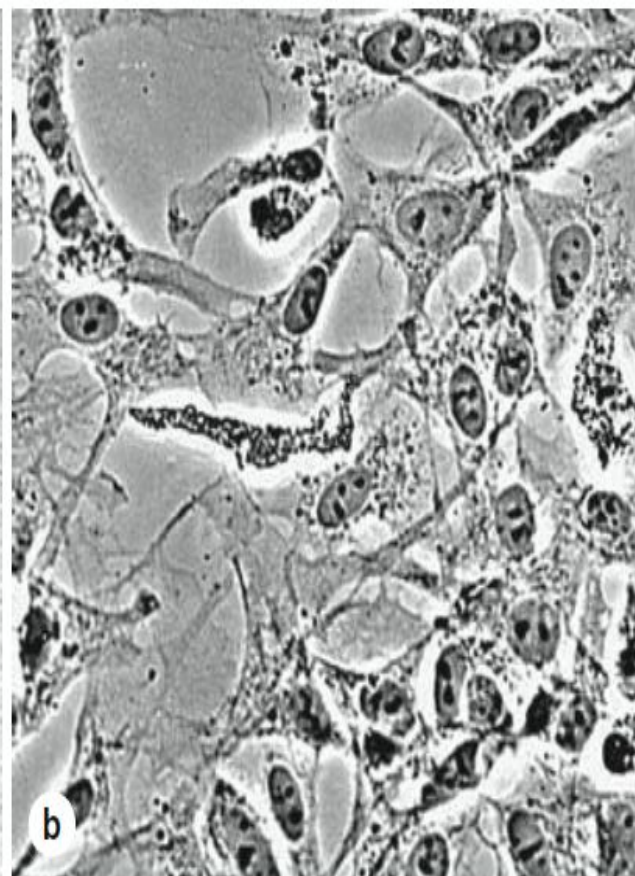
СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ



АСТРО
МАГАЗИН

СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ

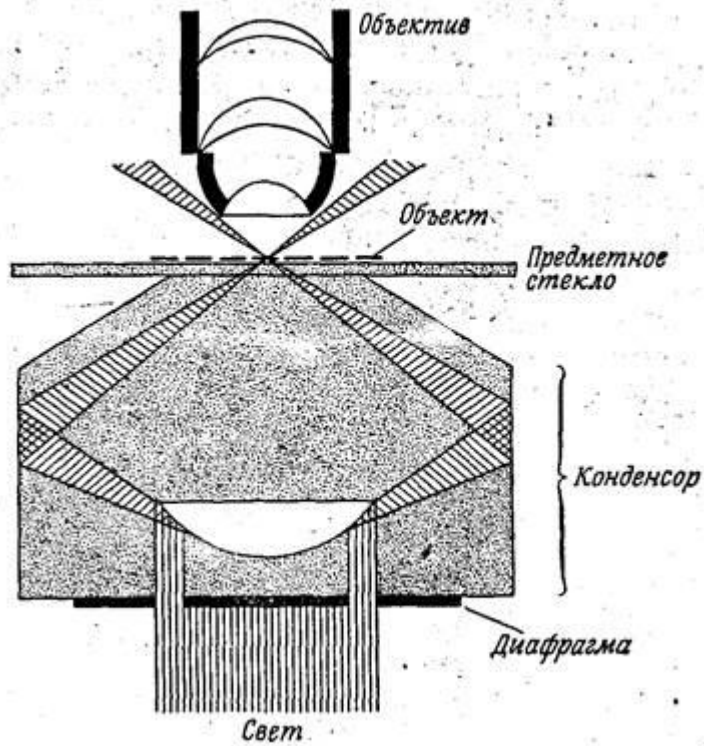
$$d = \frac{\lambda}{2A}$$



(a) Микроскопия яркого поля: нет фиксации и окрашивания, видны лишь две пигментные клетки.

(b) Фазово-контрастная: границы клеток, ядра, цитоплазматические структуры имеют разные коэффициенты преломления и изменяют фазу луча по-разному, получается картинка этих структур во всех клетках.

(c) дифференциально-интерференционная микроскопия: детали клеток подсвечены по-разному. Фазовоконтрастная микроскопия (с или без дифференциальной интерференции) широко используется для наблюдения за живыми клетками в культуре ткани.



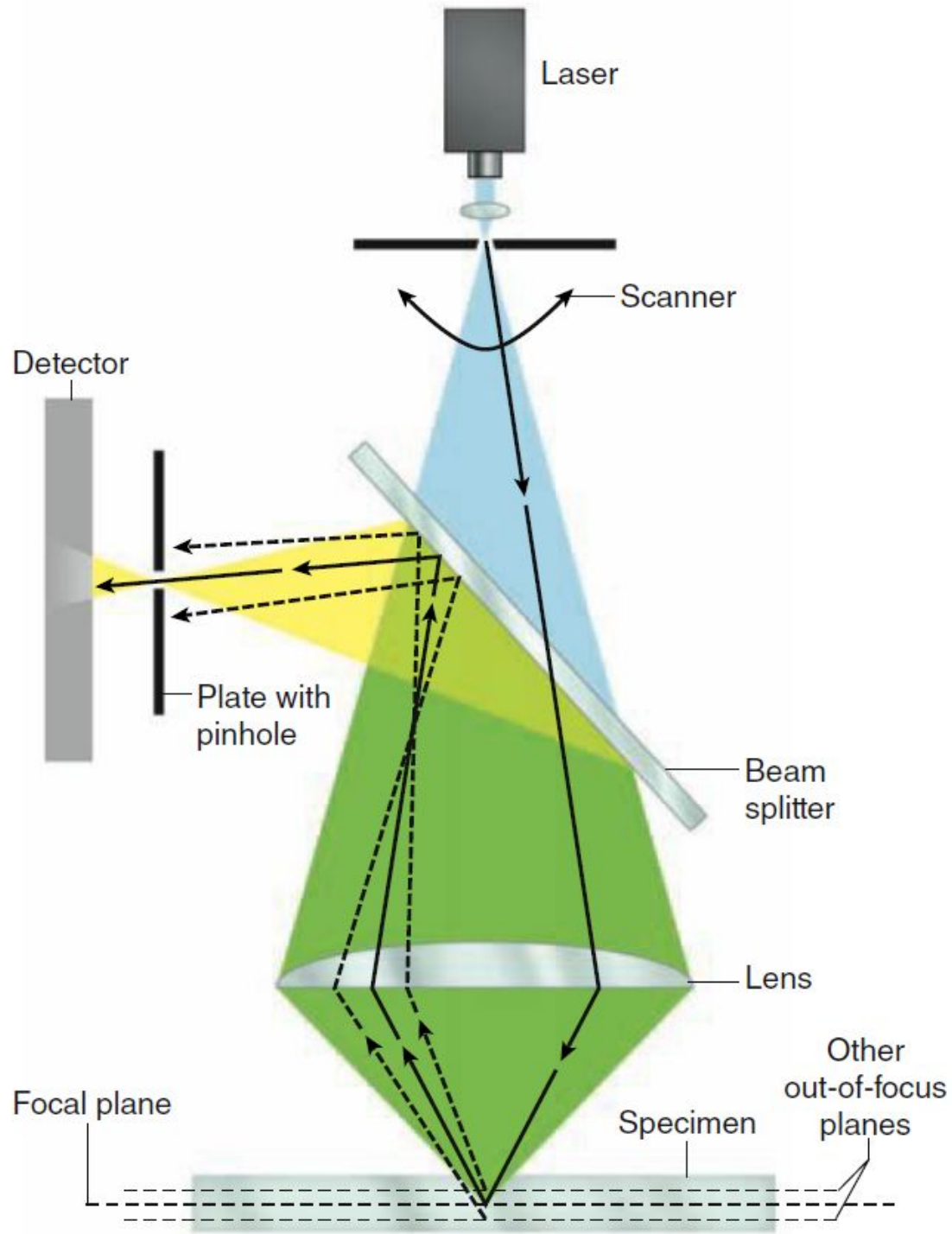
Темнопольная микроскопия. Бледная трепонема.

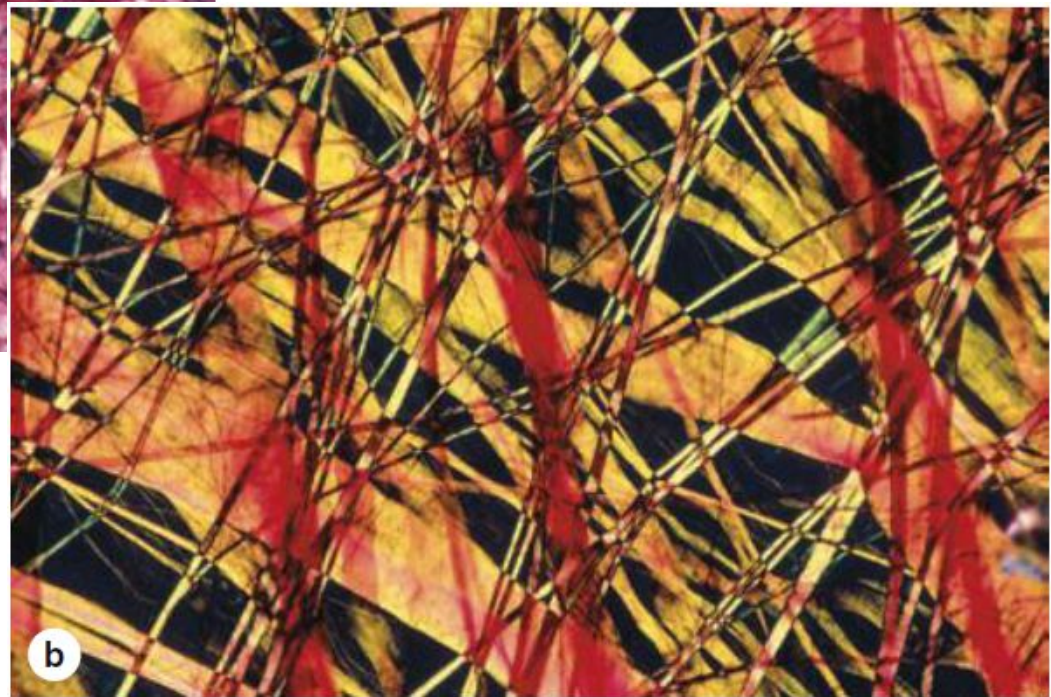
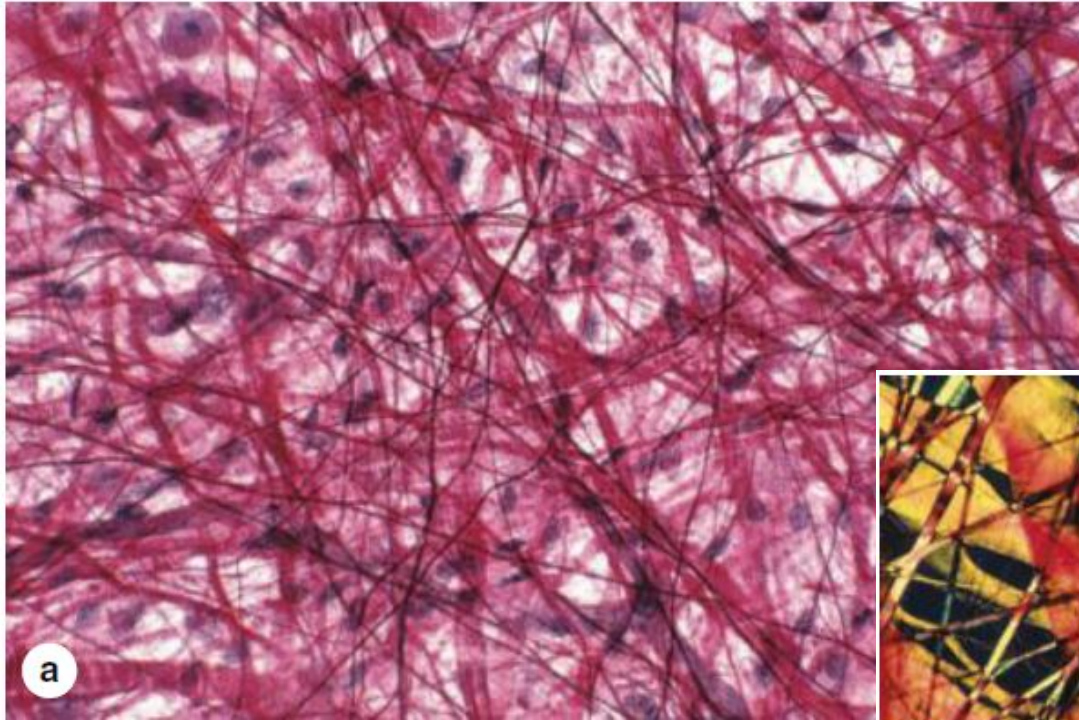


Темнопольная микроскопия обеспечивает наибольший возможный контраст изображения, но четкость его и полезное увеличение заметно ниже, чем при обычной М. Темнопольная М. успешно применялась для изучения спирохет, лептоспир и других слабо окрашиваемых микроорганизмов. При работе с гистологическими препаратами она неприменима.

Технически самостоятельным вариантом темнопольной микроскопии является **ультрамикроскопия**, при которой мельчайшие изучаемые частицы освещаются мощным боковым пучком света и видны точками на черном фоне. Ультрамикроскопия позволяет подсчитывать частицы, оценивать их размеры и другие свойства. Применяется для изучения коллоидных растворов, аэрозолей, суспензий.

Конфокальная микроскопия



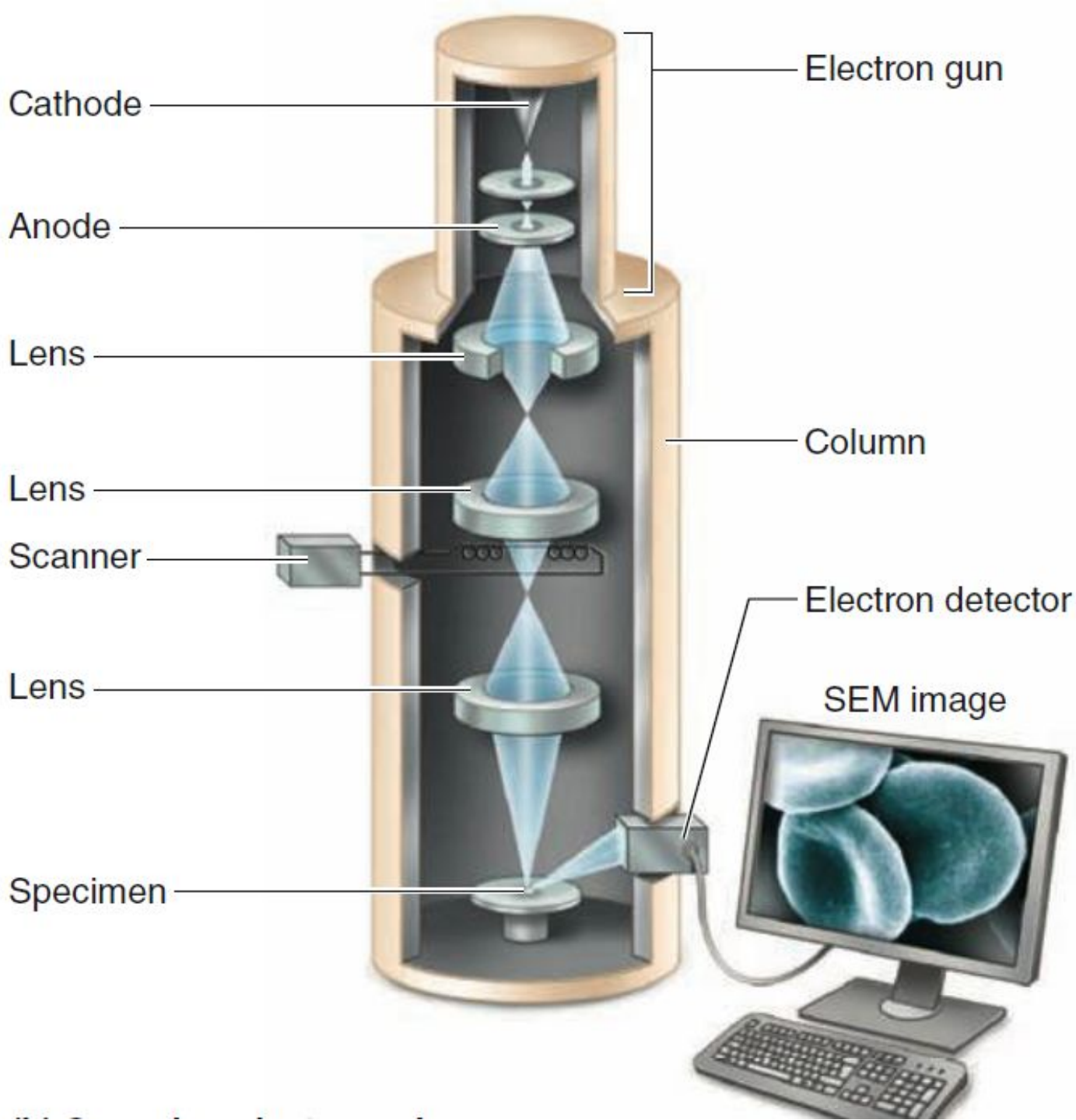


- (a) Яркое поле. Коллагеновые волокна выглядят красноватыми, эластичные волокна и ядра клеток выглядят более тёмными.**
- (b) Поляризованный свет. Видны только коллагеновые волокна, имеющие желтое или оранжевое двойное лучепреломление.**

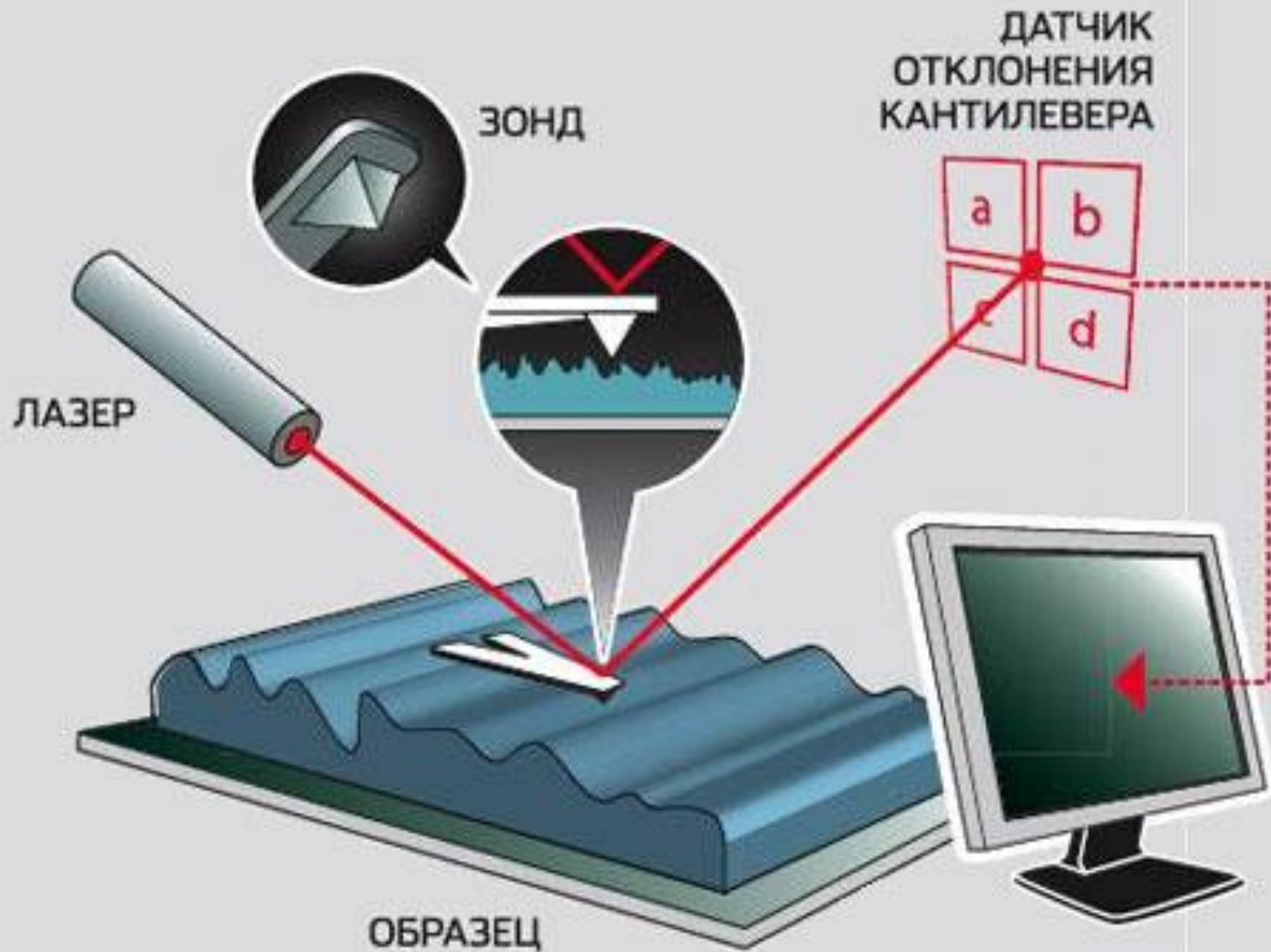
Электронный микроскоп (трансмиссионный)

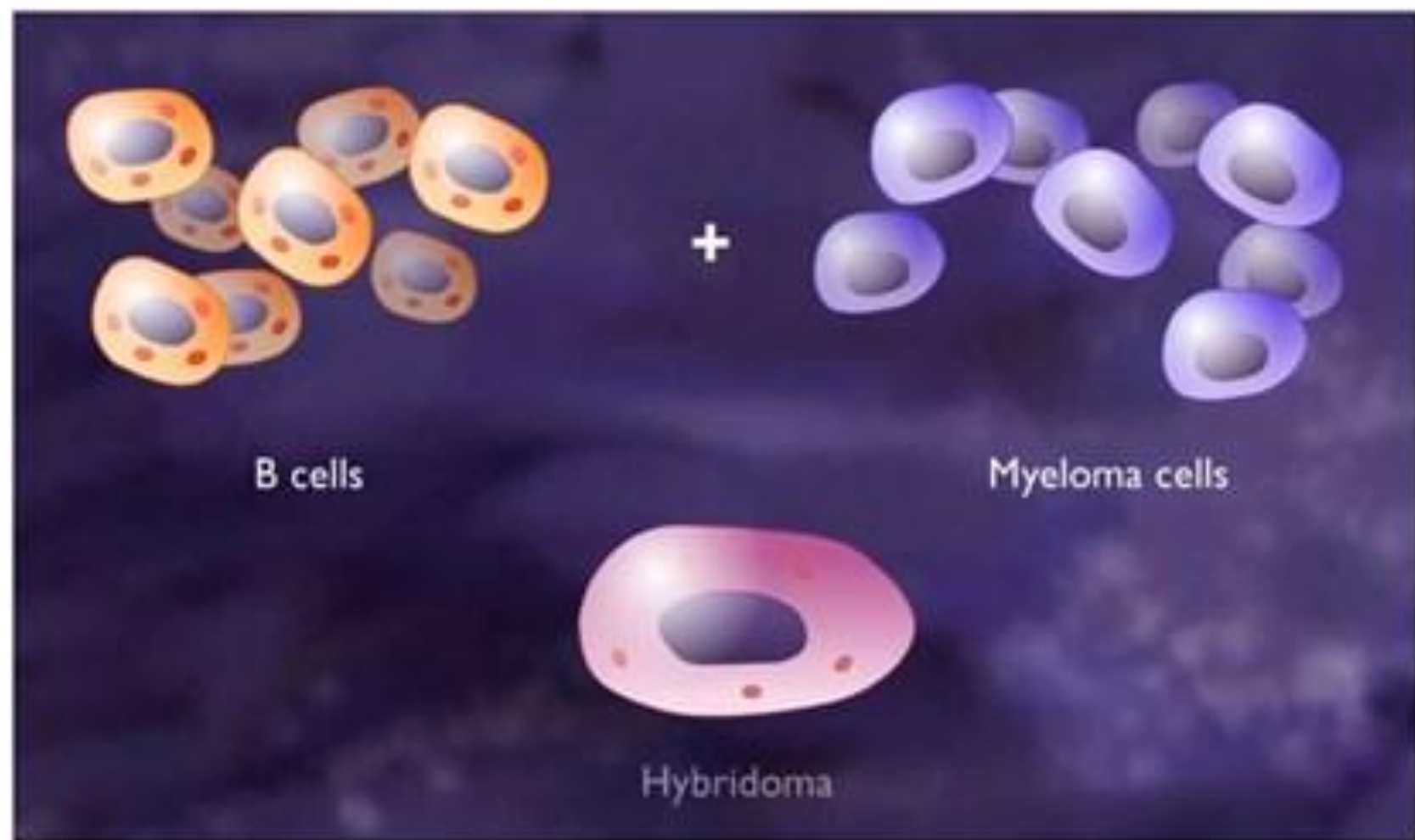


Электронный микроскоп (растровый, или сканирующий)



Атомный силовой микроскоп





ПРАВИЛА РАБОТЫ С МИКРОСКОПОМ

1. Поставить микроскоп в удобное для наблюдения положение у края стола, чтобы не приходилось к нему тянуться.
2. Установить освещение с объективом малого увеличения так, чтобы чрезмерно яркий свет не раздражал глаз;
3. Положить препарат на предметный столик микроскопа так, чтобы объект находился над отверстием столика. При этом надо обязательно проверить положение препарата покровным стеклом вверх.
4. Движением макрометрического винта найти фокус малого увеличения, при котором препарат будет ясно виден в поле зрения. Свободное расстояние между стеклом препарата и фронтальной линзой объектива при этом будет около 1 см (точнее 8,5 мм).
5. Рассмотреть препарат при малом увеличении. Сориентировавшись в препарате, найти место, подходящее для изучения при большом увеличении, поставить его в центр поле зрения (передвигая препарат по столику рукой), после чего можно закрепить препарат зажимами.

6. Не меняя положения тубуса, повернуть плавным движением револьвер на большой (40) объектив до щелчка.

7. Микрометрическим винтом отфокусировать объект. Если это не удастся, очень осторожным движением макрометрического винта установить фокус большого увеличения (слегка приподняв тубус) и затем отфокусировать объект микрометрическим винтом. При объективе 40 свободное расстояние будет меньше половины миллиметра, поэтому легко неосторожным движением раздавить препарат и повредить объектив. Студент должен всегда это помнить, переводя объектив на большое увеличение.

8. Изучить препарат при большом увеличении, а затем приступить к зарисовке.