



*Кафедра гистологии, цитологии
и эмбриологии*



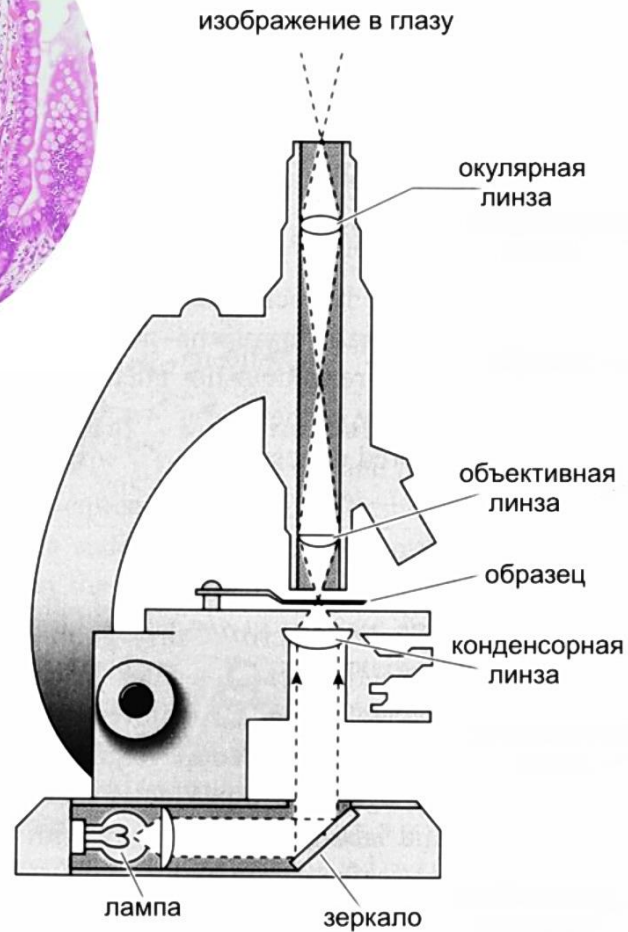
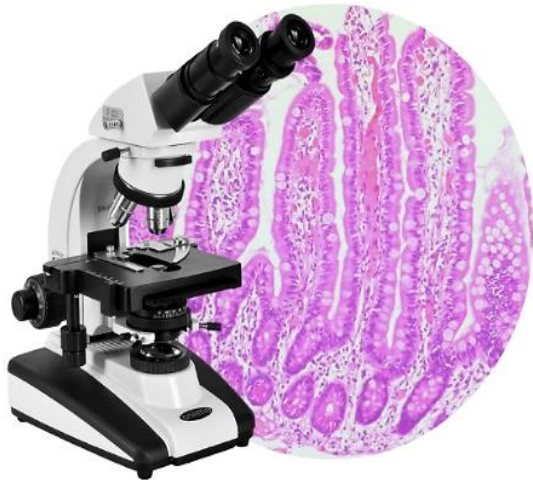
профессор
А.В.Павлов

Современная световая микроскопия

в изучении клеток, тканей и органов



❖ Световая микроскопия (светлое поле в проходящем свете)



- Наиболее распространенный, начиная с XIX века, метод световой оптической микроскопии, основанный на **изучении препарата в проходящем свете**:

- свет от источника (**осветитель**) собирается линзами **конденсора** и пропускается через изучаемый препарат
- далее свет направляется в линзы **объектива**, в фокальной плоскости которого формируется изображение
- сформированное изображение проецируется в линзы **окуляра** и после увеличения направляется непосредственно в **глаз** наблюдателя или выводится на экран монитора
- максимальное увеличение – **1300 раз**
- разрешающая способность – **0,2 мкм**



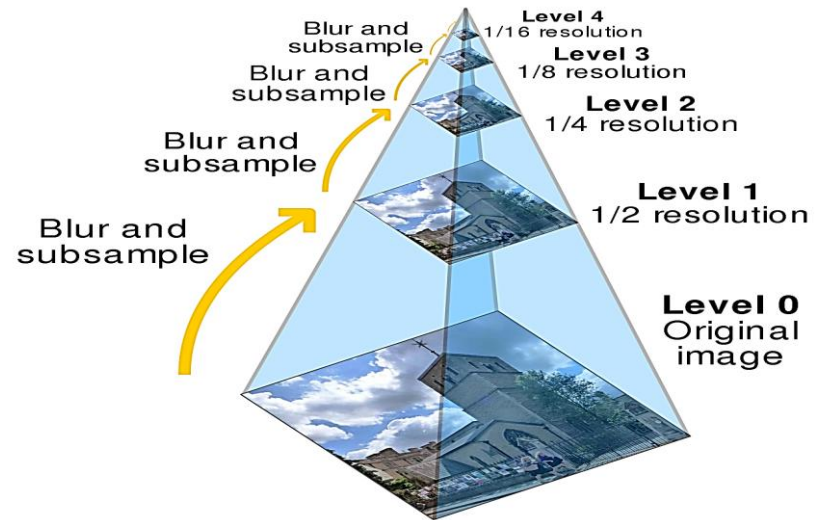
❖ Виртуальная световая микроскопия



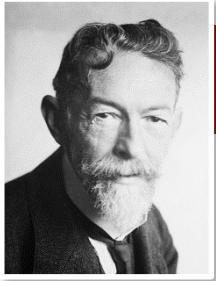
- Данная методика цифровой визуализации получила в литературе название технологии **WSI (Whole Slide Imaging)**, а проводимая на компьютере навигация по оцифрованным образцам обозначается как **виртуальная микроскопия**



- Прогресс биомедицинских технологий, телемедицины и компьютерной техники в XXI веке дал техническую возможность генерировать **качественные оцифрованные копии гистологических препаратов** с помощью специализированных роботизированных устройств (**гистосканеров**)



- Каждый виртуальный препарат в составе единого файла содержит графическую информацию в нескольких разрешениях (**«пирамида изображений»**) в виде «мозаики» составных элементов каждого уровня пирамиды



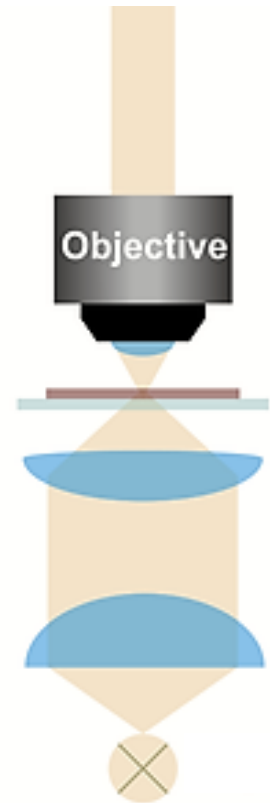
R.A. Zsigmondy
(1865-1929)



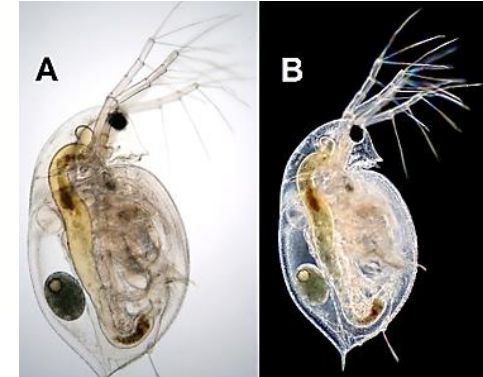
H.F. Siedentopf
(1872-1940)

❖ Световая микроскопия в темном поле

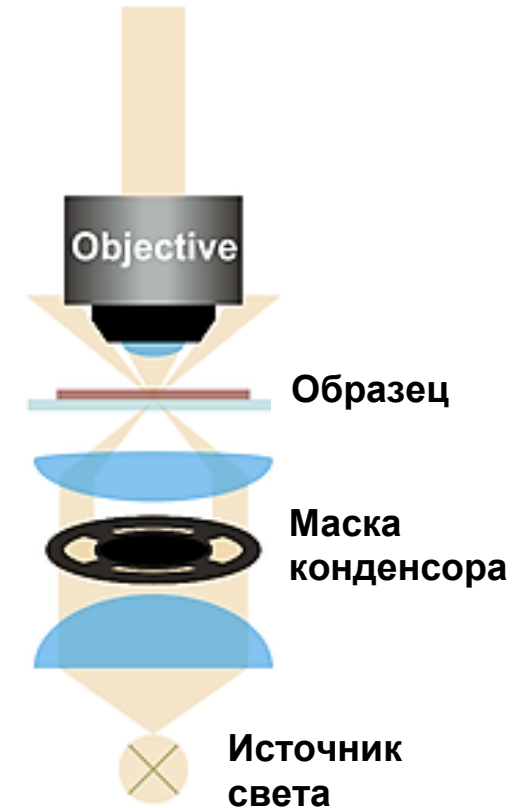
- Специальный вид световой микроскопии, в котором контраст изображения увеличивают **за счет регистрации только света, рассеянного изучаемым образцом**
- Предложен в 1906 г. R.A. Zsigmondy H.F. Siedentopf
- Особенностью метода является **боковой способ освещения образца**, при этом неоднородности микрообъекта рассеивают падающий свет и в микроскопе изображение образца наблюдают в рассеянном свете, а «освещающий» световой пучок не попадает в объектив
- Используется для изучения **живых неокрашенных биологических объектов** — простейших, изолированных клеток, тканевых культур



▪ *Светлое поле*



▪ *Темное поле*



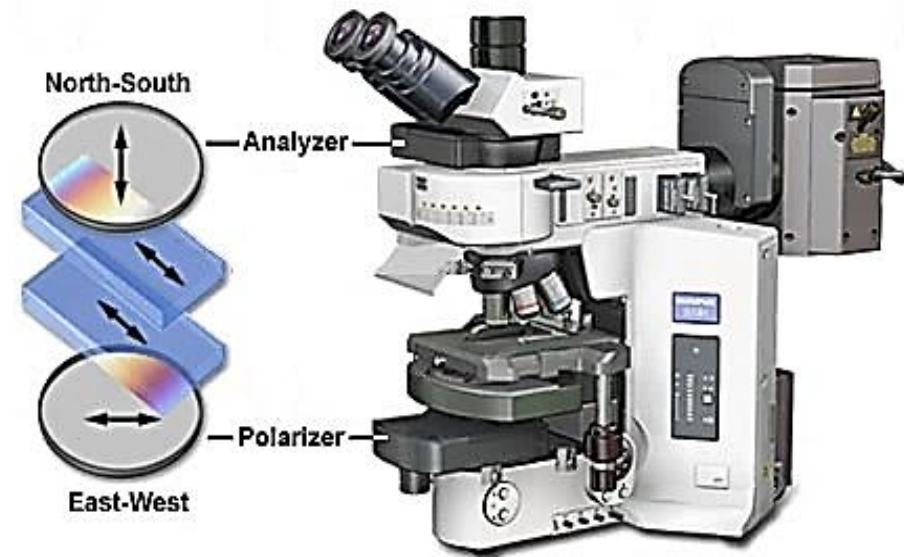


H.C.Sorby
(1826-1908)

❖ Поляризационная световая микроскопия

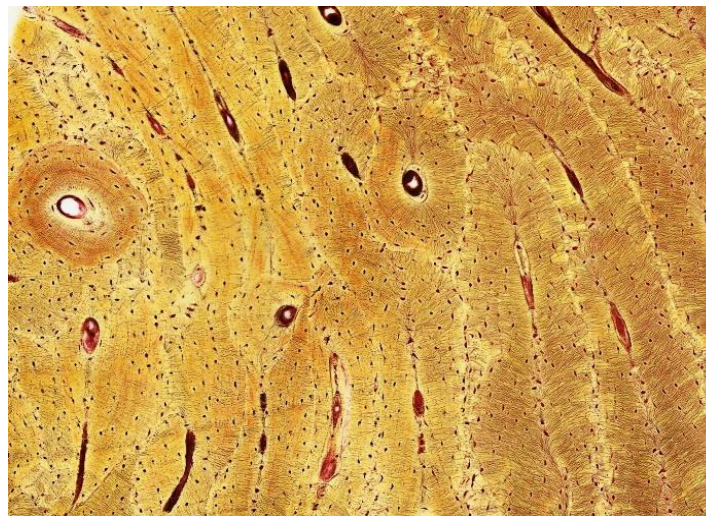
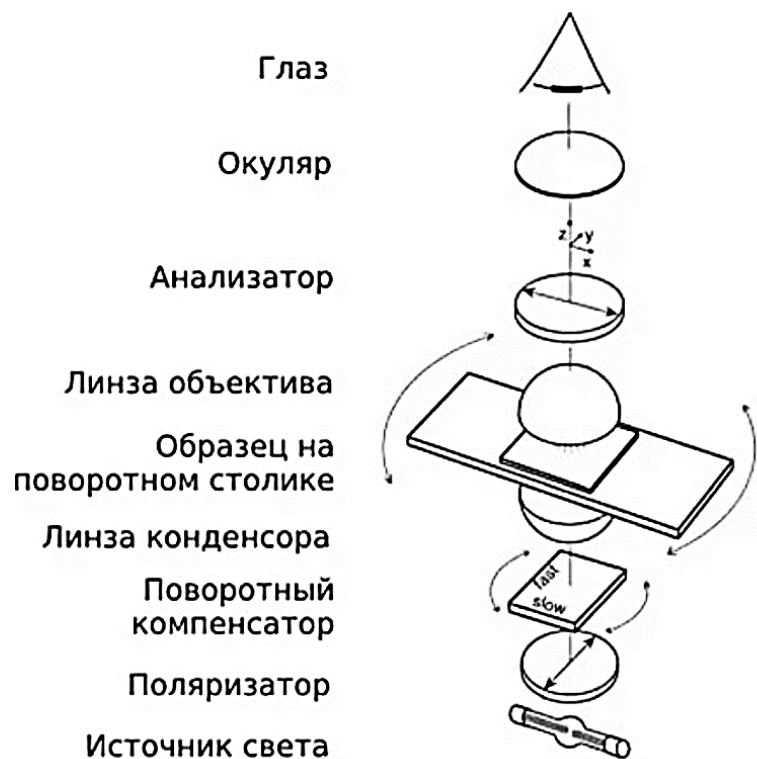
- Метод световой оптической микроскопии, основанный на освещении объекта **поляризованным светом**
- Предложен в 1863 г. H.C.Sorby

- Оптическая система микроскопа содержит несколько поляризационных фильтров, которые вращаются относительно друг друга (поляризатор и компенсатор перед конденсором и анализатор за линзой объектива)
- Когда двулучепреломляющий образец помещается между скрещенными поляризаторами, свет, падающий на материал, разделяется на два составляющих луча, амплитуда и интенсивность которых изменяются в зависимости от оптических свойств образца
- Настройка изображения производится вращением поляризационных фильтров или предметного столика.

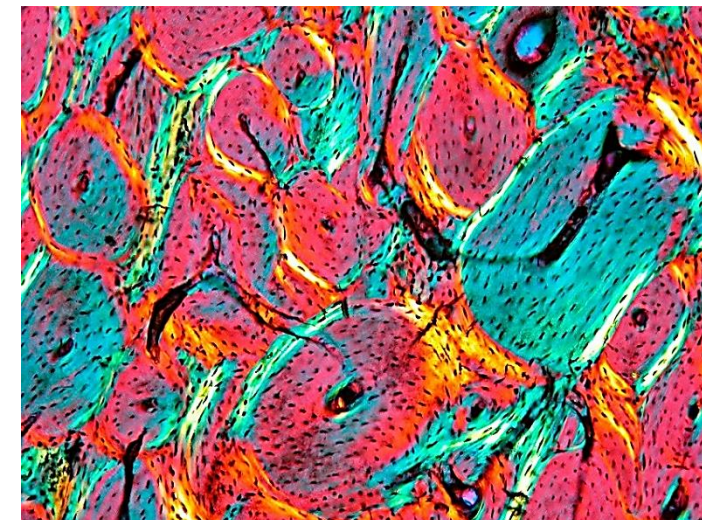


❖ Поляризационная световая микроскопия

○ *Пластинчатая кость*



Светлое поле



Поляризационная микроскопия

- Применяется для обнаружения и изучения объектов или их структур, обладающих свойствами **анизотропии или двойного лучепреломления** (миофибриллы, волокна соединительной ткани, кристаллические структуры)



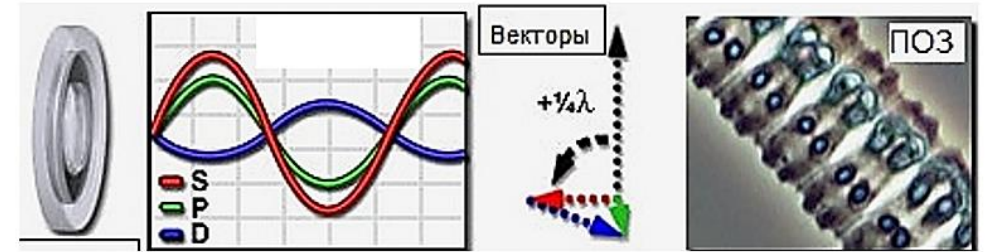
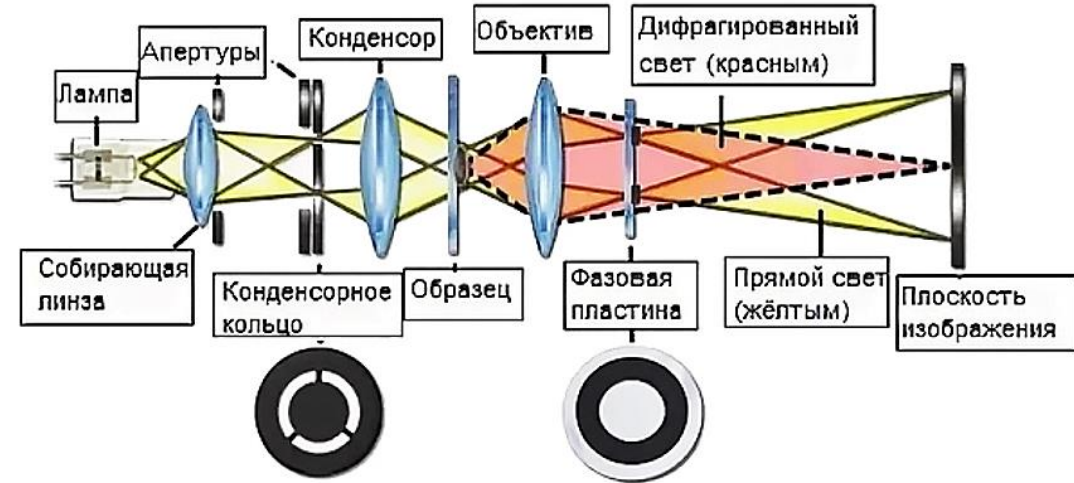
Frits Zernike
(1888-1966)

❖ Фазово-контрастная световая микроскопия



- В оптическую систему вводятся специальные устройств (**кольцо конденсора** и **фазовая пластина** объектива)

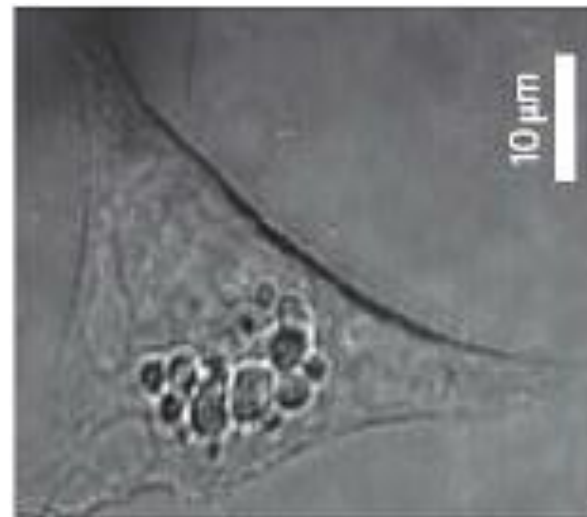
- Специальный метод световой микроскопии, основанный на **изменении фазы световой волны, проходящей через прозрачные бесцветные структуры**, благодаря чему повышается контрастность изображения
- Изобретен в 1932-35 гг Ф.Цернике (Нобелевская премия по физике 1953 г.)
- Используется для изучения **неокрашенных живых или фиксированных клеток**



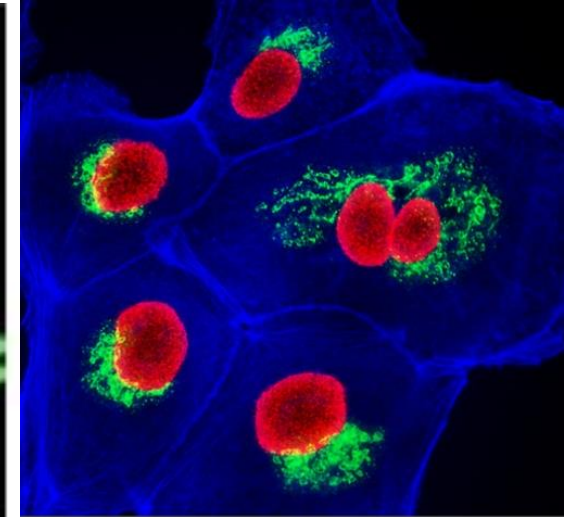
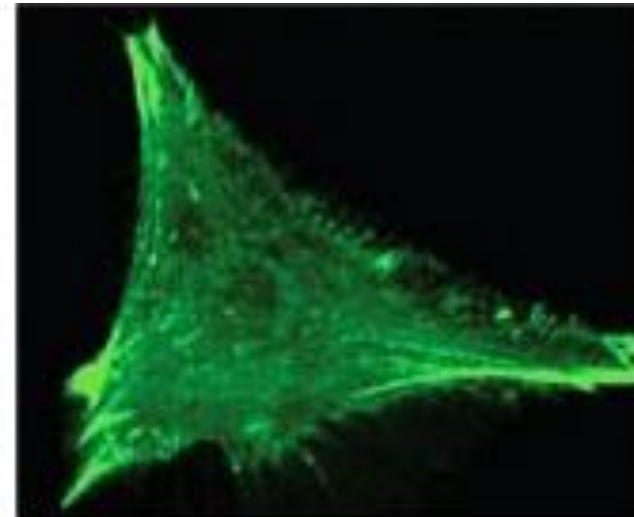
- Свет от источника разбивается на два когерентных световых луча, один из них называют опорным (желтый), другой предметным (красный), которые проходят разные оптические пути
- Фазовая пластинка, сдвигает по фазе на $1/2$ длины волны опорный луч относительно предметного, благодаря чему достигается контрастное изображение

❖ Люминесцентная (флуоресцентная) световая микроскопия

- Метод световой оптической микроскопии, основан на наблюдении **люминесцентного свечения микрообъектов в отраженном свете** при освещении их сине-фиолетовым светом или ультрафиолетовыми лучами
- Разработан в 1911 г. **О.Хеймштадт** и улучшен в 1929 г. **Ф.Эллинггер** и **А.Хирт**
- **Источники свечения:**
 - собственная (первичная) люминесценция
 - наведенная (вторичная) люминесценция после предварительной окраски **флюорохромами** (красители, которые избирательно связываются с определенными структурами клеток)



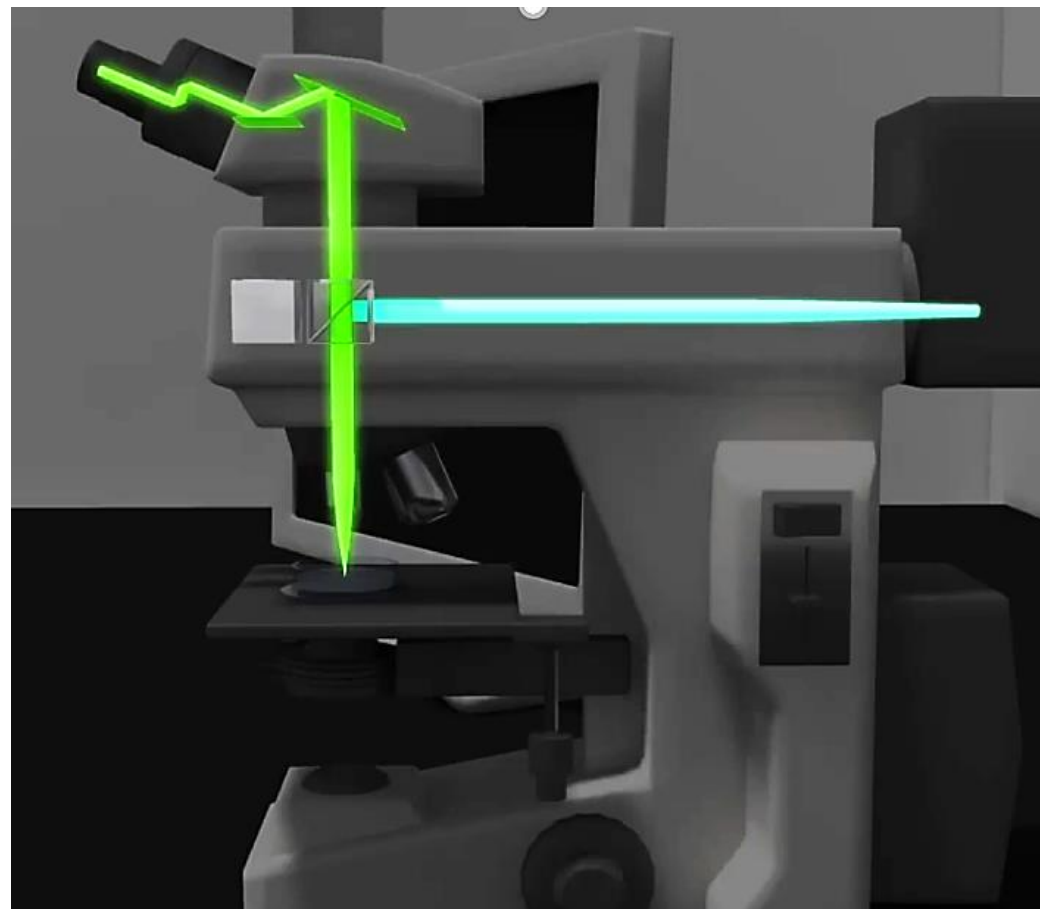
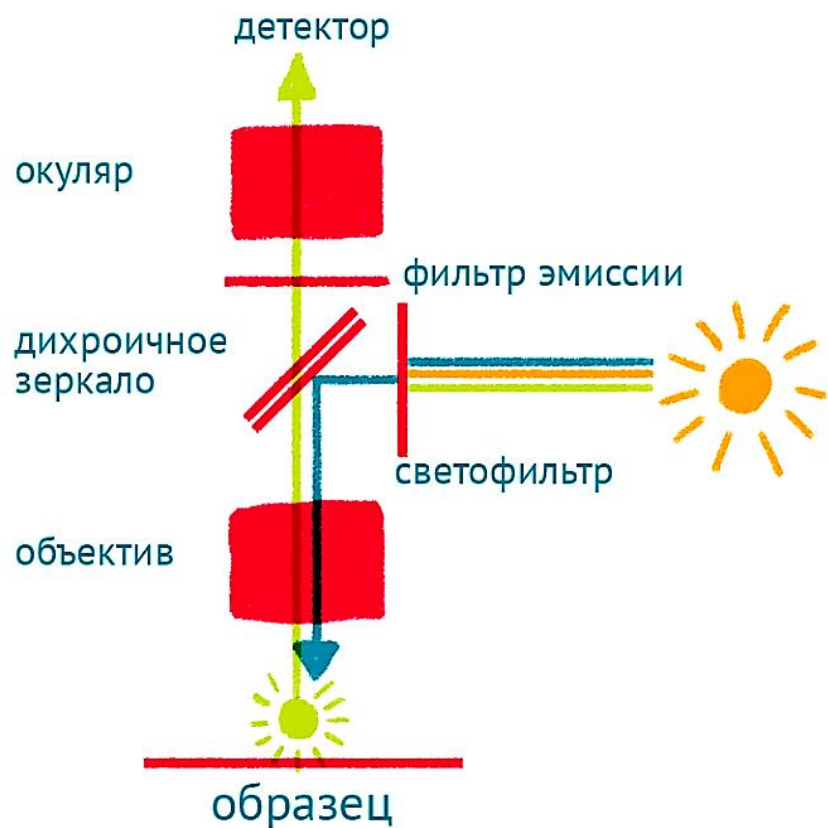
Светлое поле



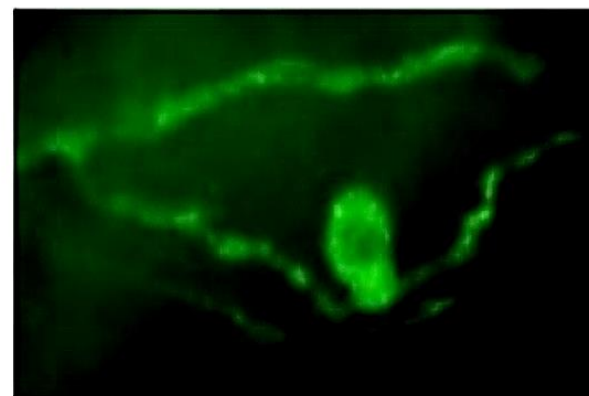
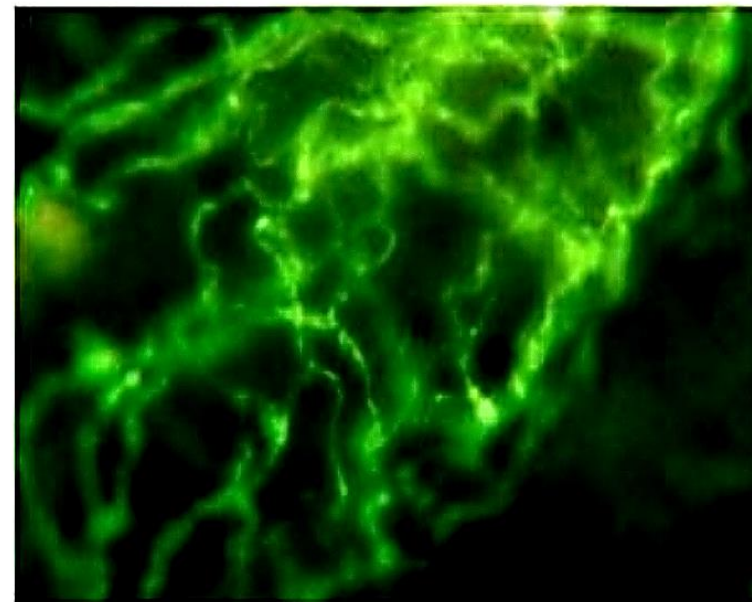
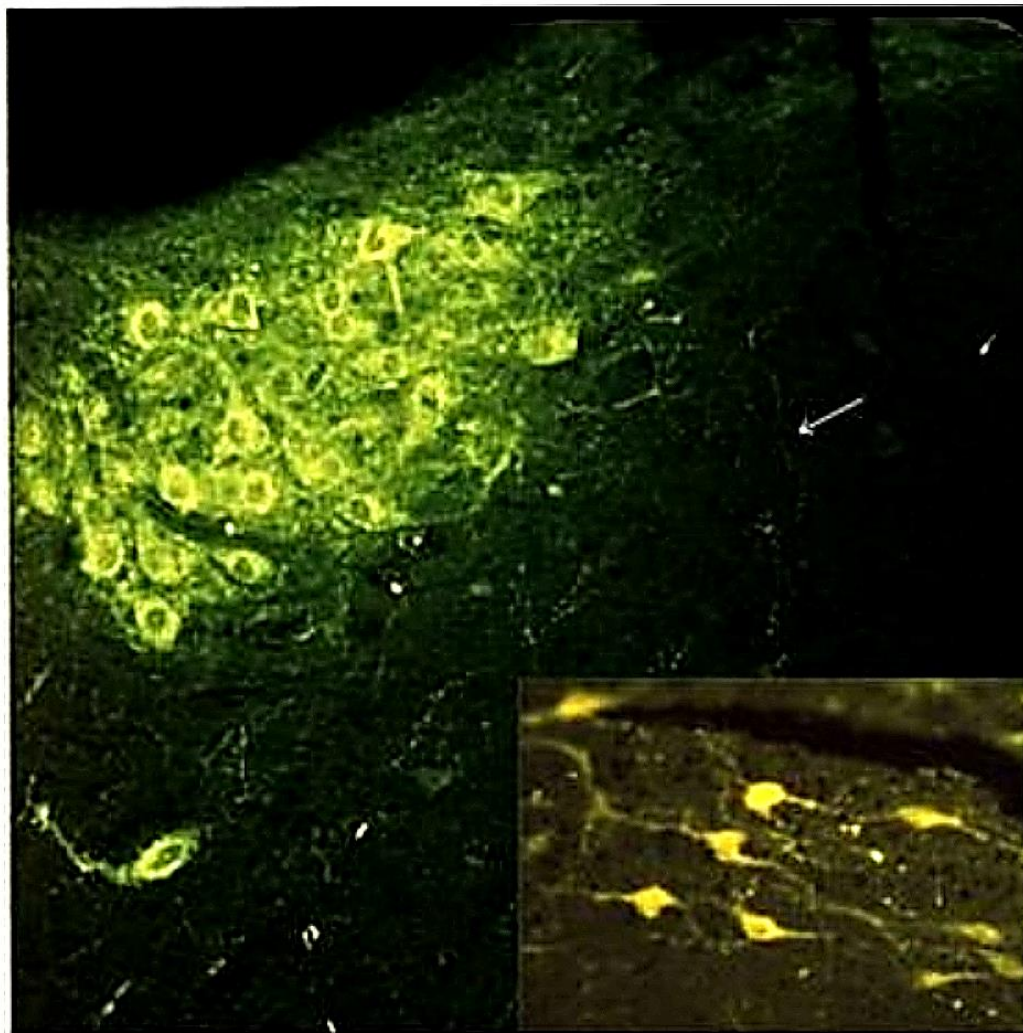
Люминесцентная микроскопия

❖ Люминесцентная (флуоресцентная) световая микроскопия

- Дихроичное зеркало и объектив фокусируют возбуждающий свет на препарате и направляют флуоресцентный свет к окуляру по другому оптическому пути

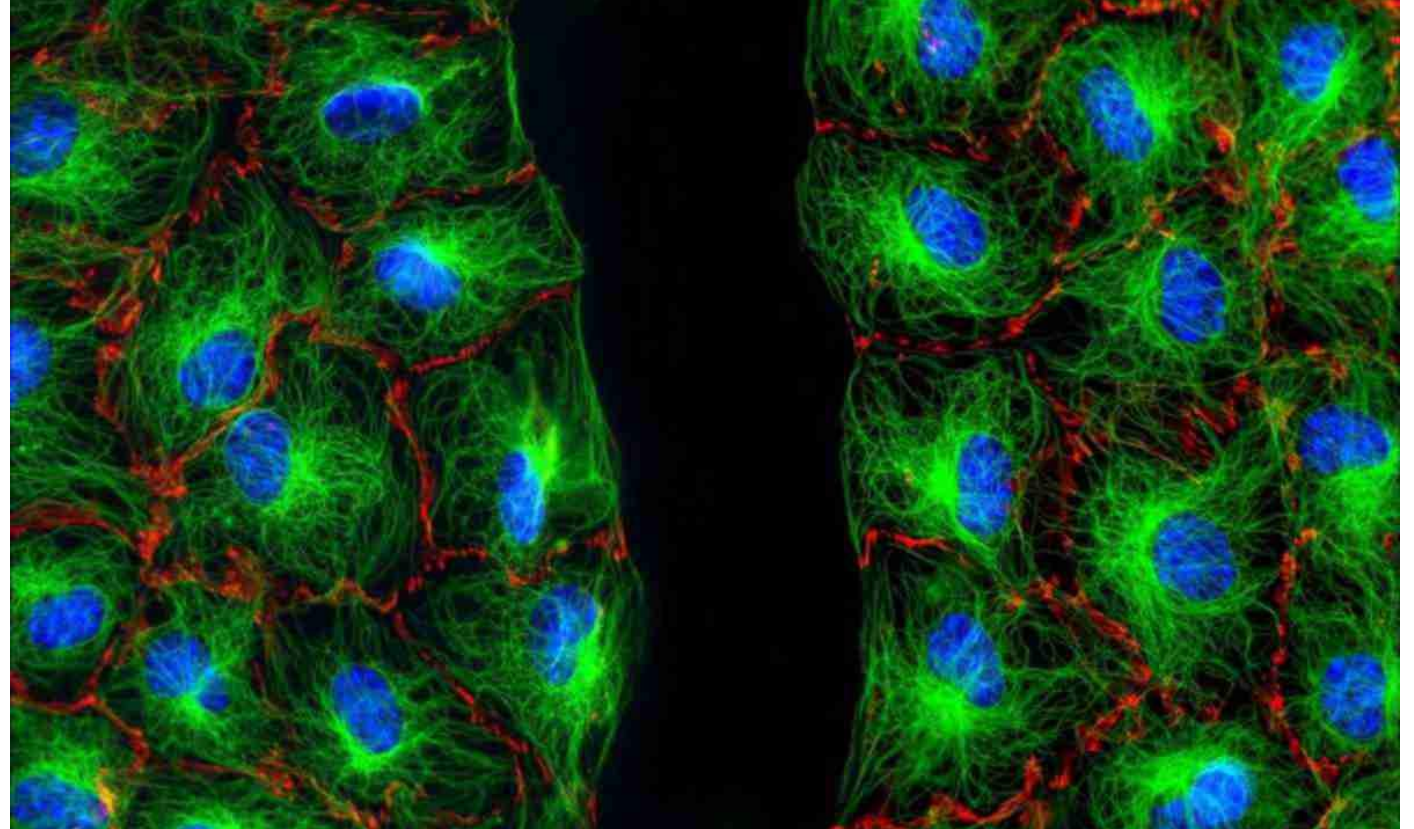
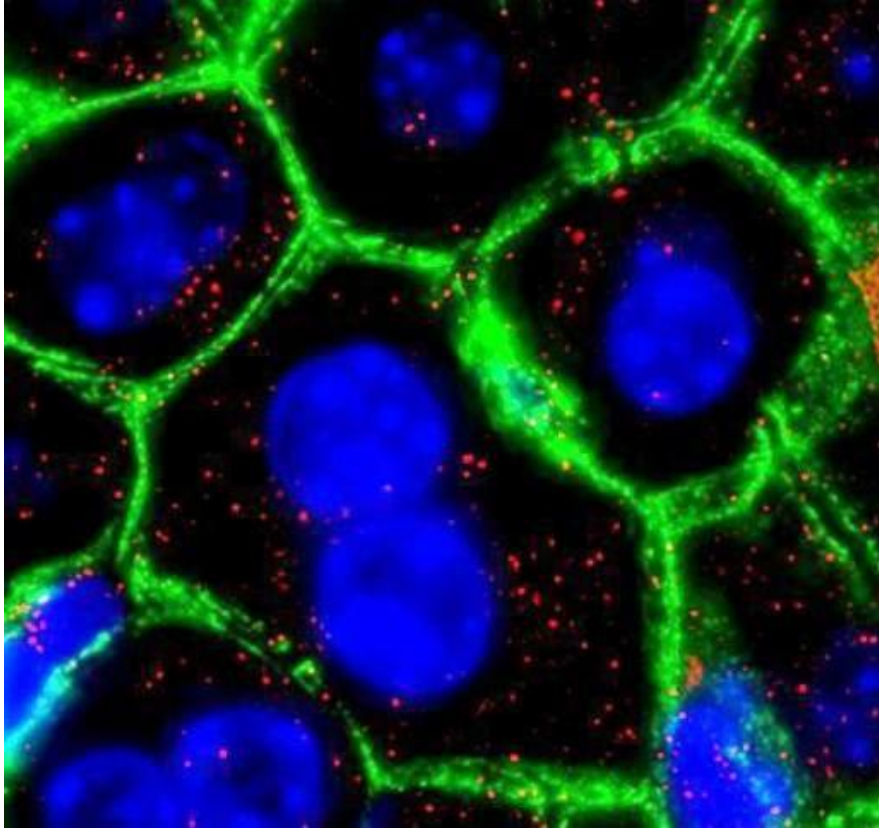


❖ **Первичная люминесценция: метод Фалька (моноамины)**



▪ **Катехоламины, серотонин**

❖ Вторичная люминесценция: флуорохромы



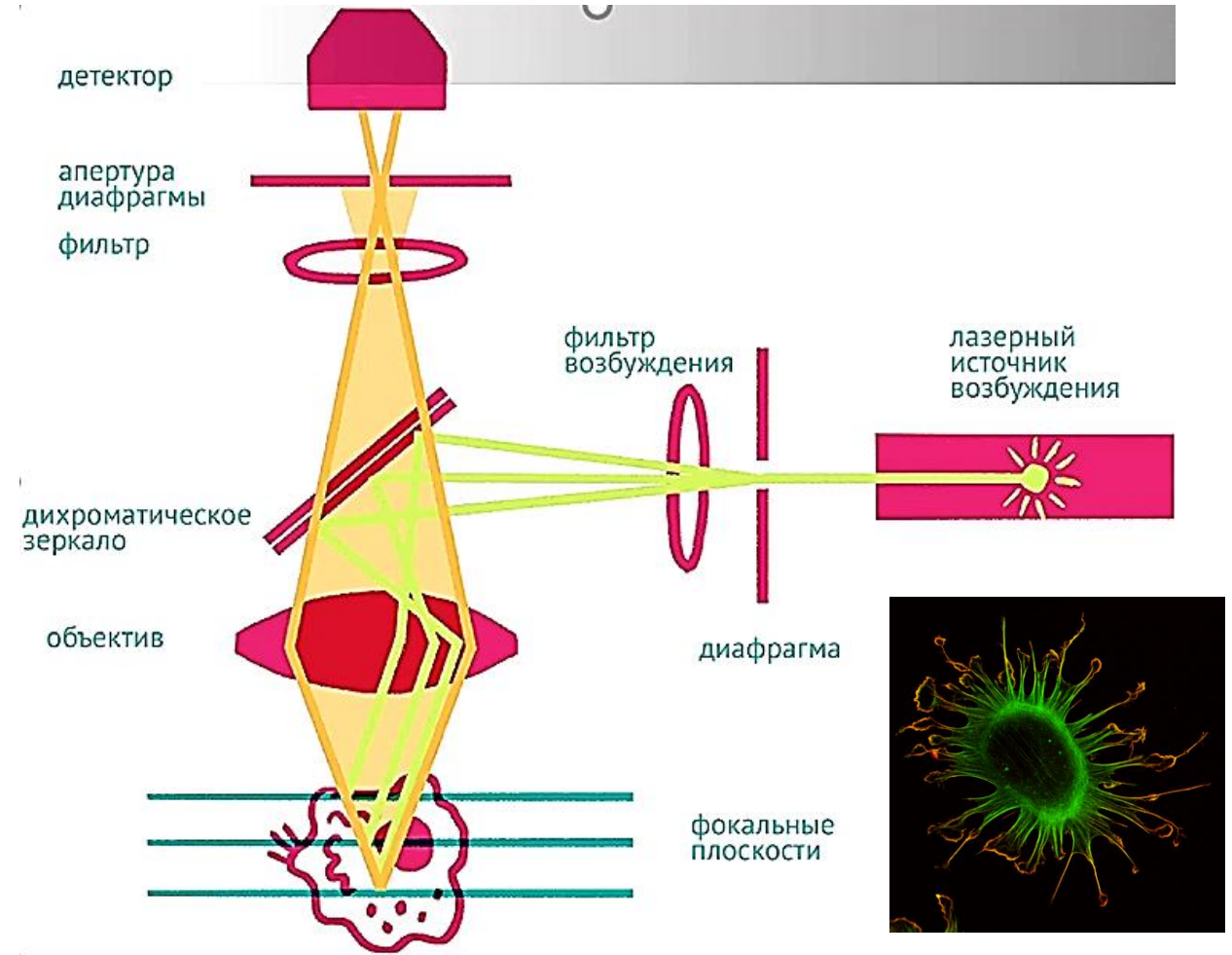
- ***DAPI*** - флуоресцентный краситель, который прочно связывается с ДНК; широко используется в флуоресцентной микроскопии (ДНК - синий цвет) для окрашивания как живых, так и фиксированных клеток.

- ***EGFP, ECFP, EYFP*** – цитоплазматические флуоресцентные белки

❖ Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия



- В конфокальном микроскопе **микрообъект сканируется лазерным лучом, вызывающим флуоресценцию специальных красителей в определенной плоскости** (оптический срез ткани)
 - разработан в 1969-1971 гг. **Д.Эггер и П.Давидович**
 - пучок света под воздействием лазера практически не расходится, что обеспечивает высокий контраст и разрешение
 - включает сканирование образца для создания **компьютерных оптических срезов** толщиной до 250 нм с использованием видимого света;
 - в результате серии послойных снимков формируется **трехмерное изображение микрообъекта**



- Метод позволяет изучать внутреннюю структуру клеток, **в том числе ЖИВЫХ**; исследовать развитие клеток и молекул в реальном времени



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud
Eric Betzig

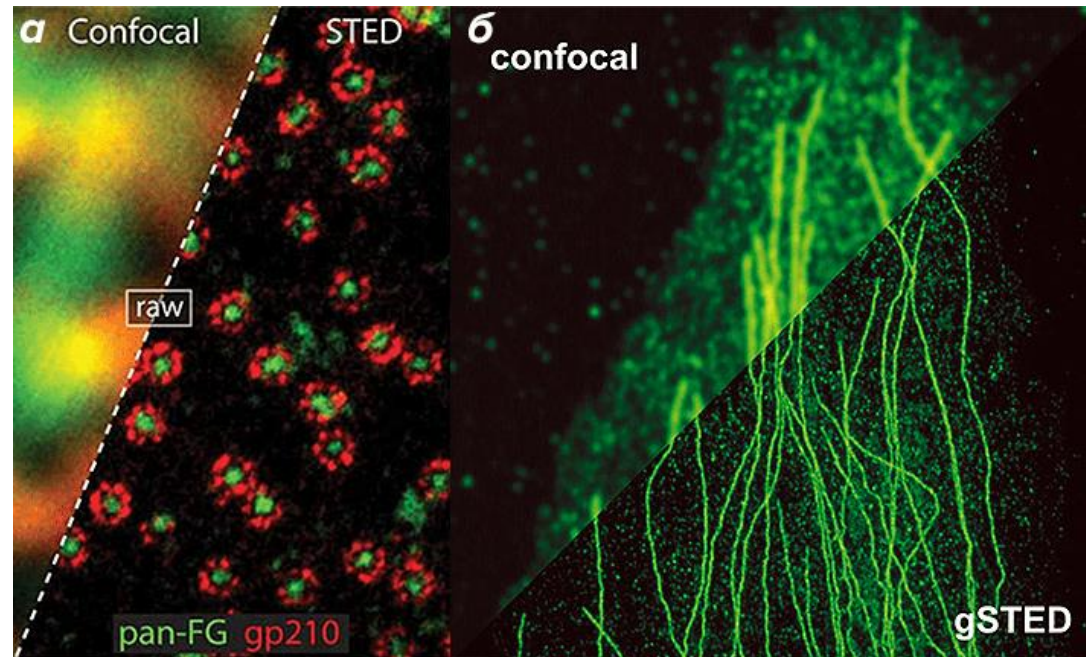
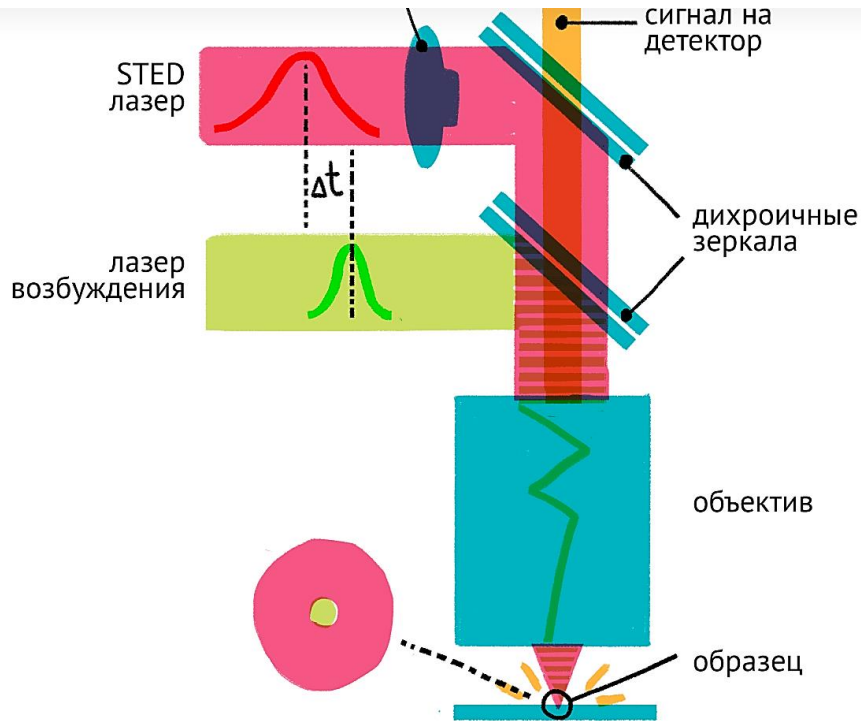
© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud
Stefan W. Hell

© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud
William E. Moerner

Нобелевская премия по химии, 2014 г.

❖ Методы суперразрешения (*STED*, *PALM/STORM*)

- Возбуждение флуорофора происходит с помощью двух лазеров — один возбуждает флуоресценцию в точке фокуса, в то время как другой тушит ее вокруг этой точки.
- Таким образом, флуоресценция возбуждается только в узкой фокусной точке, которая по размерам гораздо меньше предела дифракции.
- Метод позволяет получать изображения с разрешением меньше 20 нм в поперечном направлении, и около 40–50 нм в продольном направлении
- По сравнению с лазерной кофокальной микроскопией качество изображения существенно выше



Преимущества микроскопии суперразрешения. **а** — Ядерная пора («обычная» кофокальная микроскопия vs. STED). **б** — Цитоскелет («обычная» кофокальная микроскопия vs. STED).

❖ Микровидеосъемка живых объектов

- **Замедленная киносъемка**
видеосъемка с частотой, меньшей стандартной частоты и воспроизведения (24 кадра в секунду). При проекции полученного изображения с нормальной частотой движение объектов съёмки на экране выглядит ускоренным
- **Цейтраферная съемка /таймлапс** (от нем. Zeitraffer, англ. time lapse) - разновидность покадровой замедленной съёмки, когда интервалы между съемкой кадров строго равны между собой и задаются автоматически при помощи таймера



- **Эмбриоскоп** — инкубатор для культивирования эмбрионов с системой непрерывного наблюдения time-lapse.

- **Ускоренная съемка (рапид** - от фр. rapide — **быстрый**) - видеосъемка с частотой от 32 до 200 кадров в секунду
- Используется для получения эффекта замедленного движения при воспроизведении со стандартной частотой (24 кадра/сек) кадров