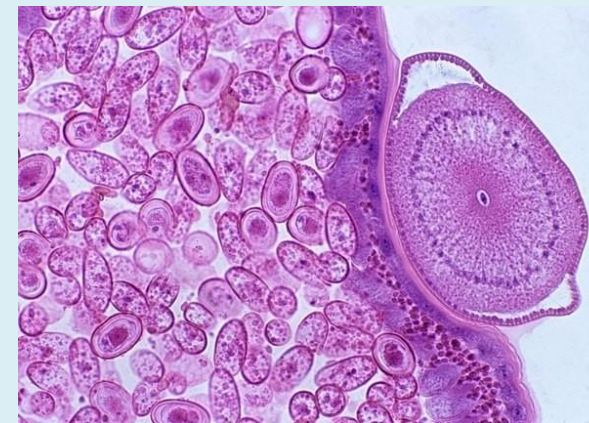
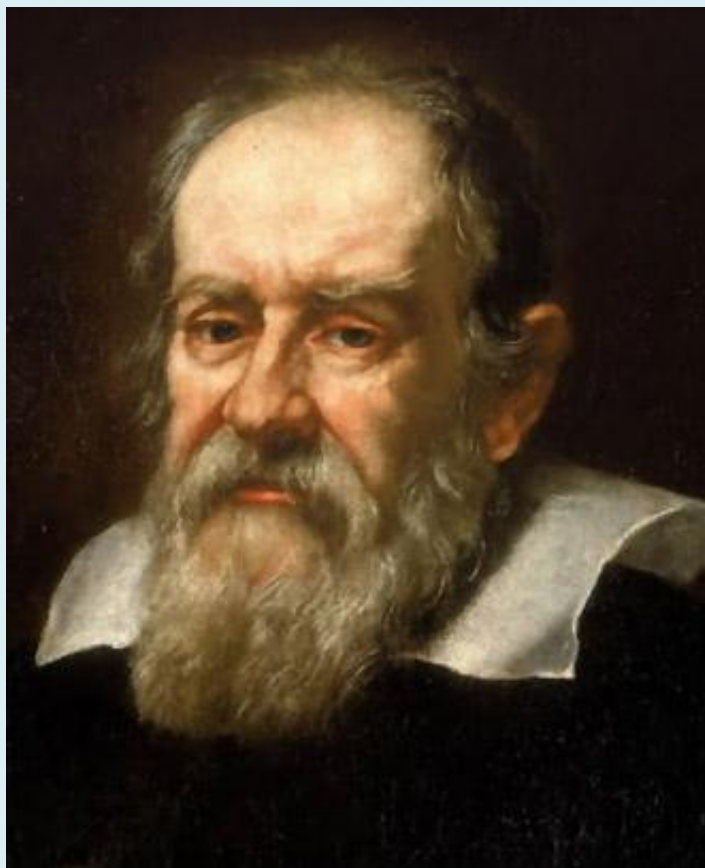


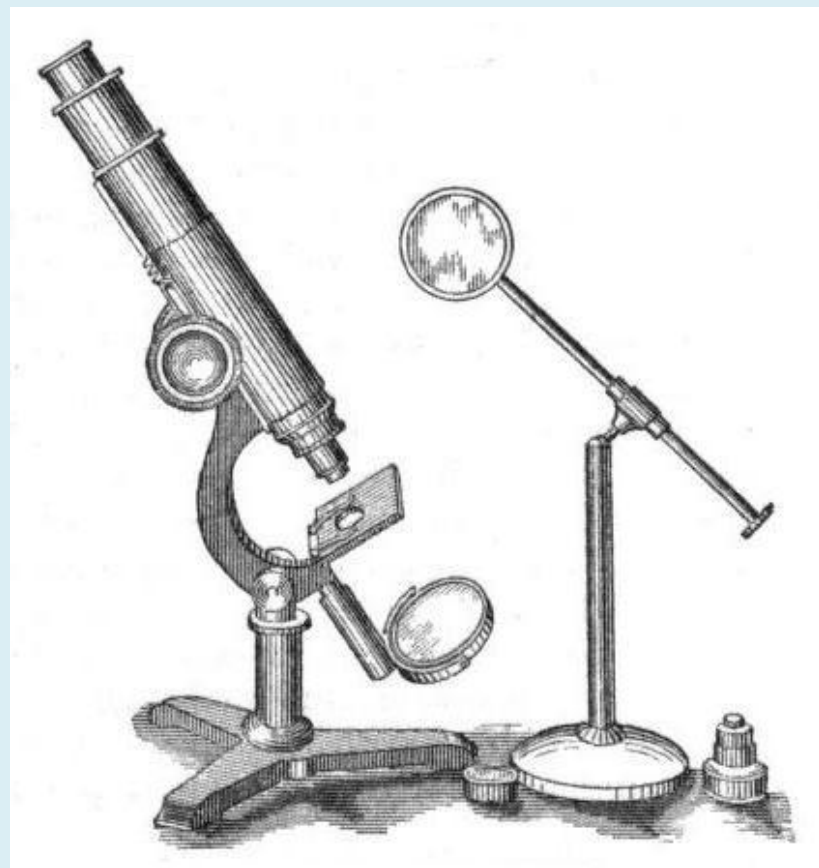
Цитология – наука о клетке

Современные методы исследования





Галилео-Галилей (1564-1642)
(итальянский философ, математик, физик
и астроном, оказавший значительное
влияние на науку своего времени;
изобретатель микроскопа)



**Один из первых
микроскопов
(1876)**



Микроскоп Левенгука



**Микроскоп
как предмет роскоши**

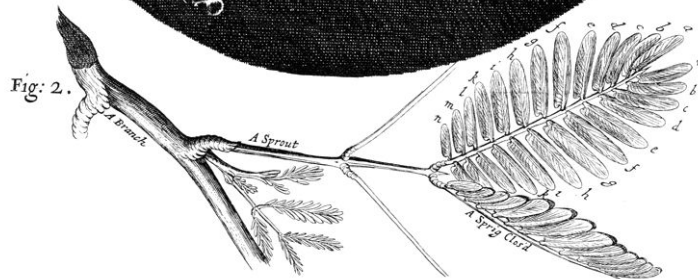
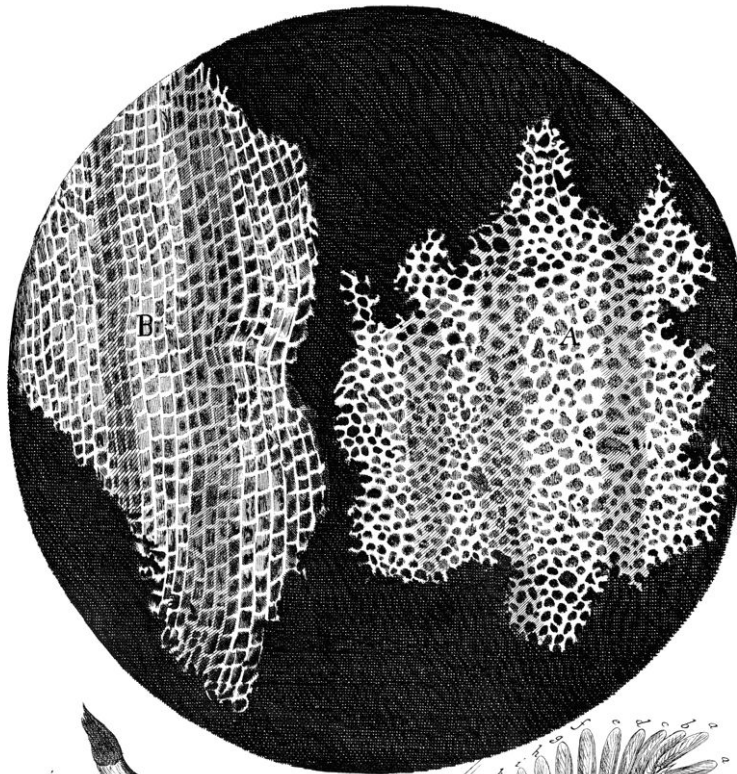


Микроскоп Гука

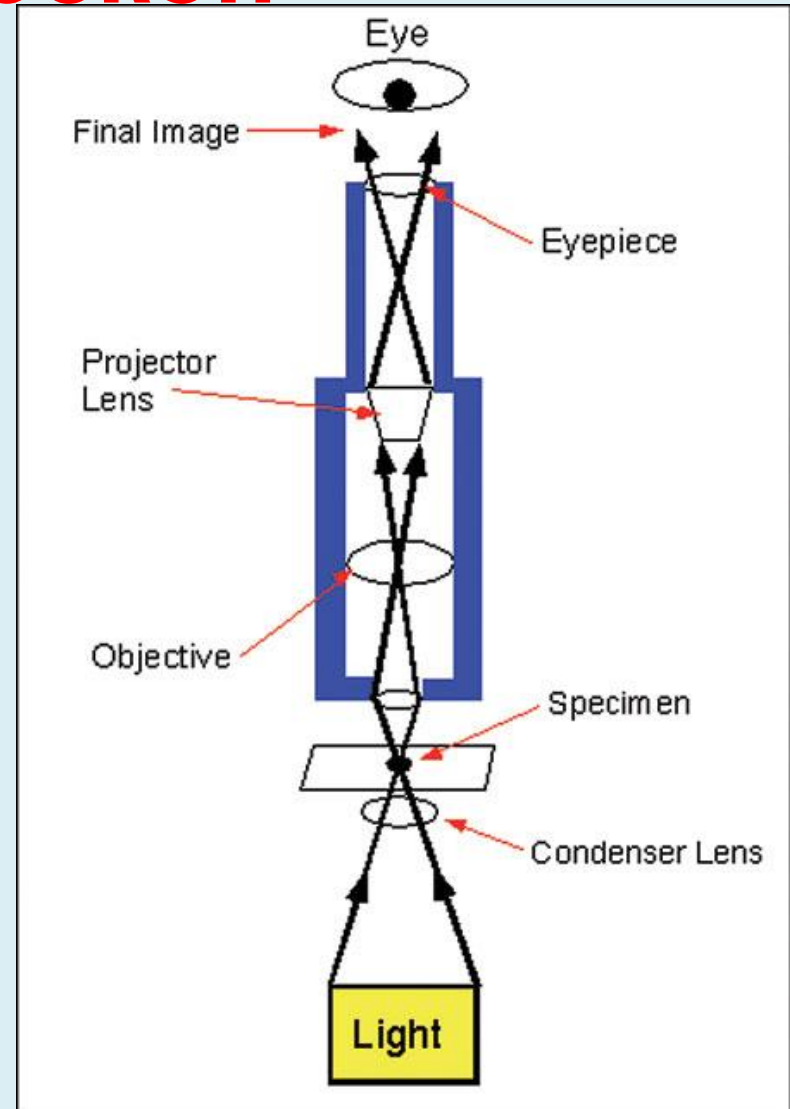
Световая микроскопия

1665 г – монография
«Микрография», где описаны его
микроскопические и
телескопические наблюдения

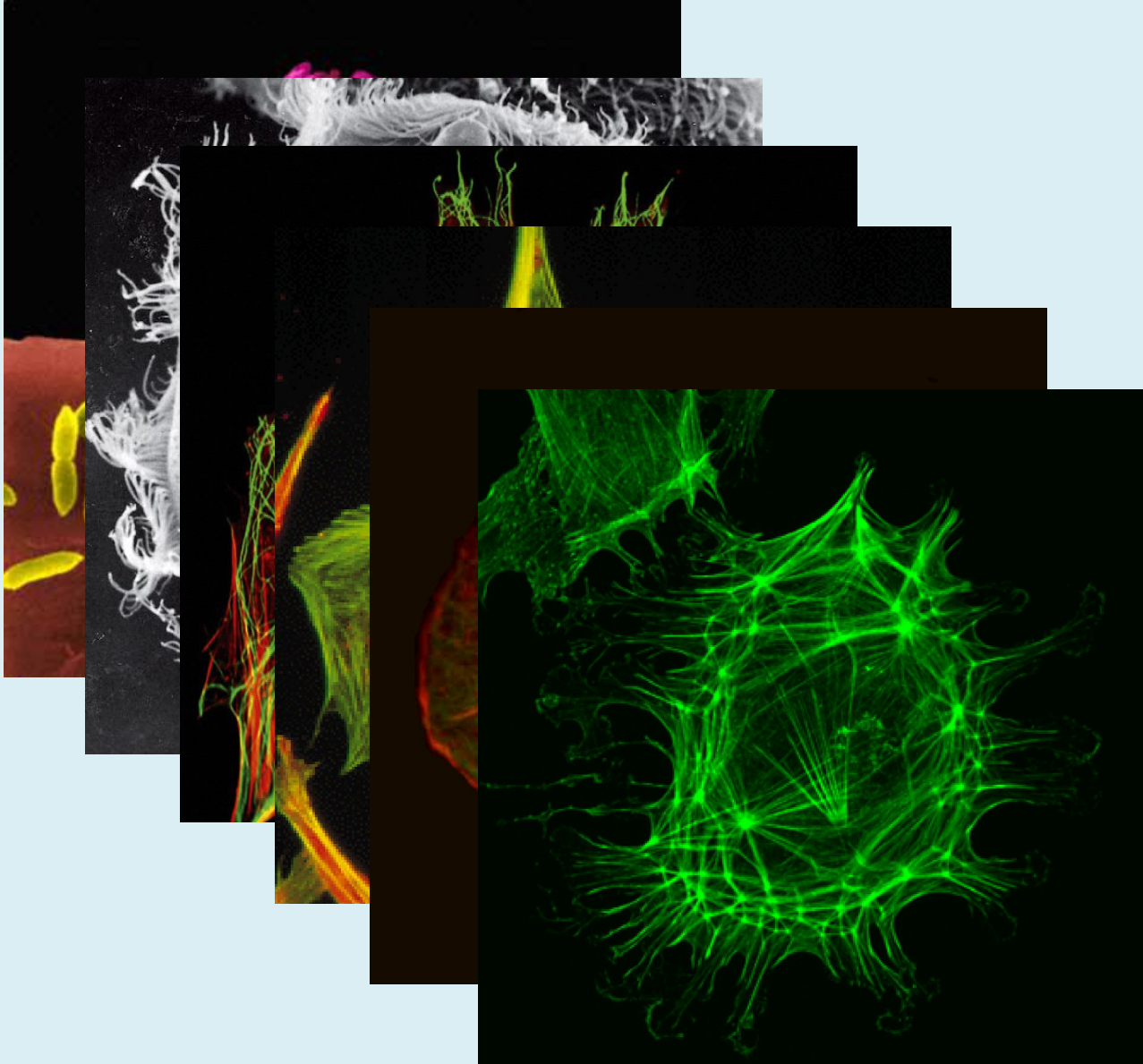
Роберт Гук
(1635-1703)



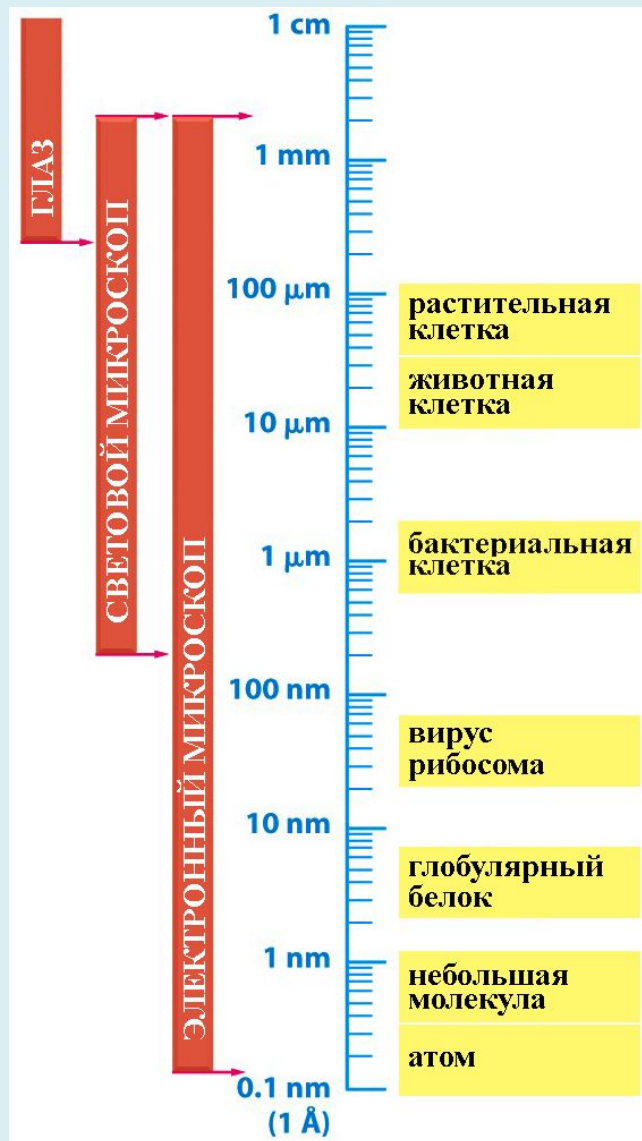
Современный световой микроскоп



КЛЕТКА КАК ЧУДО ИНЖЕНЕРИИ ПРИРОДЫ



СРАВНИТЕЛЬНАЯ ШКАЛА РАЗРЕШАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НЕВОООРУЖЕННОГО ГЛАЗА, СВЕТОВОГО И ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПОВ



УСТРОЙСТВО И ПРИНЦИП РАБОТЫ МИКРОСКОПА

1. Механическая часть

1.1. Корпус

1.2. Механический
(предметный) столик

1.3. Бинокулярная насадка

1.4. Фокусирующий
механизм

2. Осветительная система

2.1. Источник света

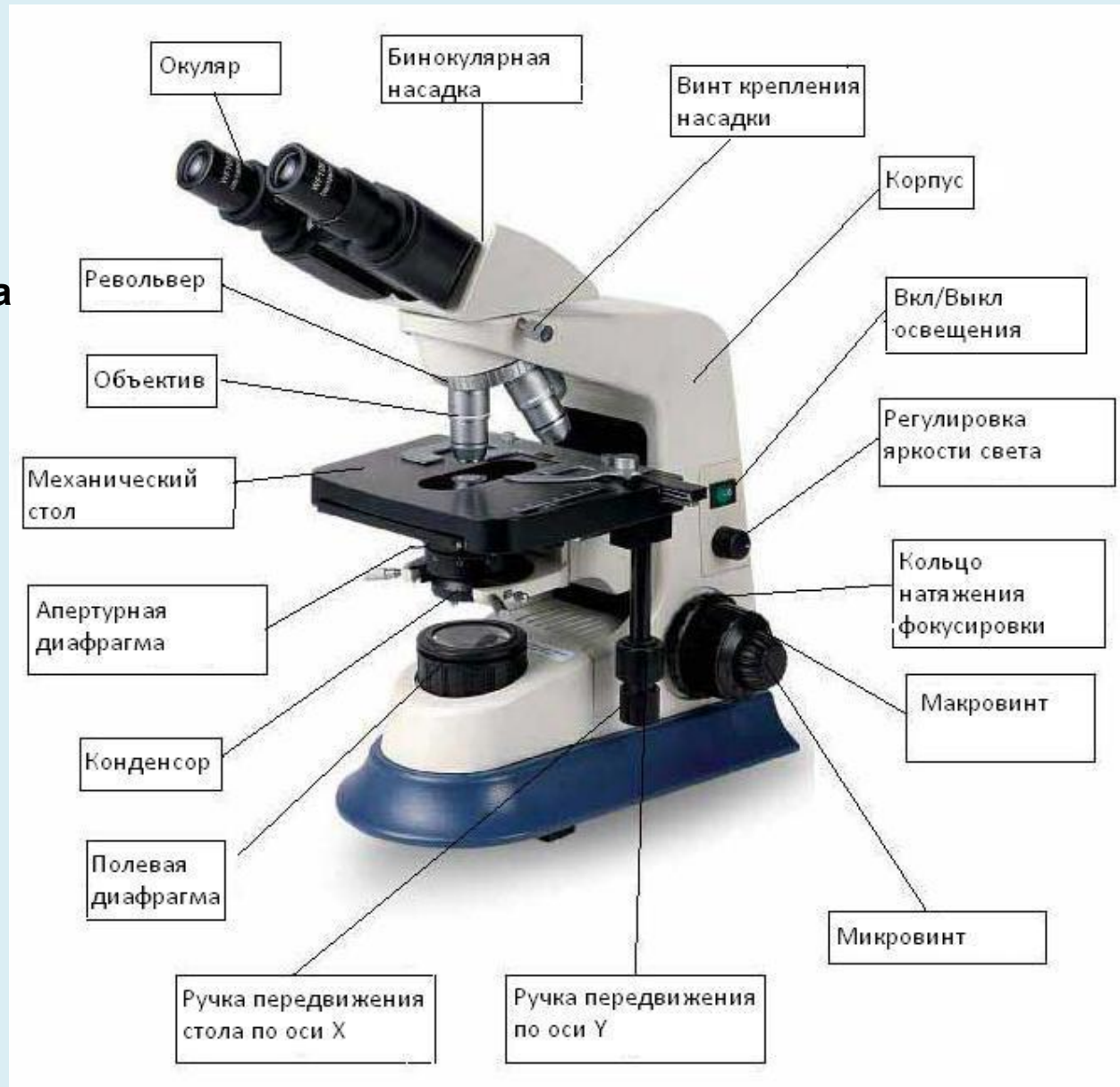
2.2. Коллектор

2.3. Конденсор

3. Оптическая часть

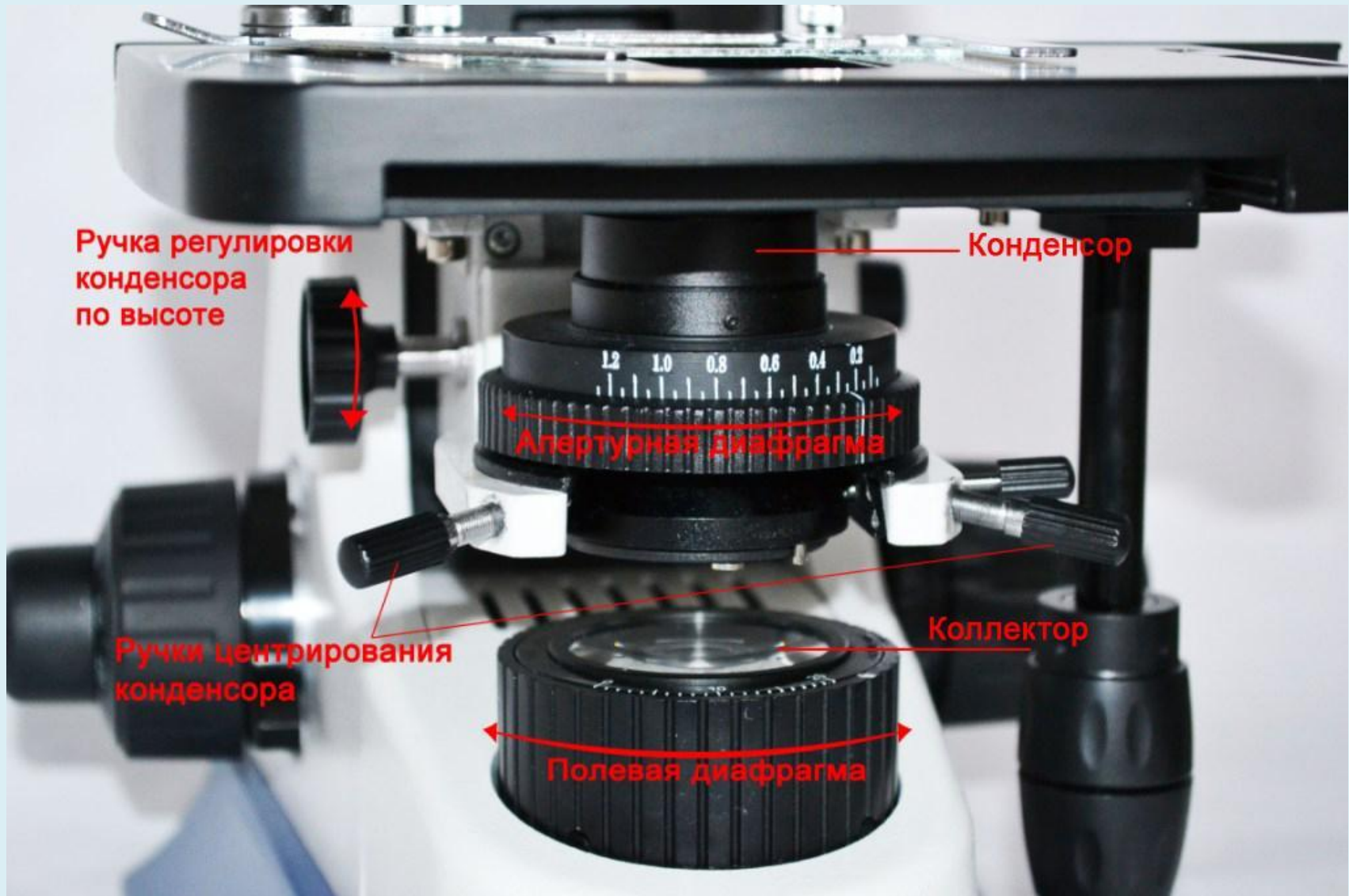
3.1. Объективы

3.2. Окуляры



Современный световой микроскоп

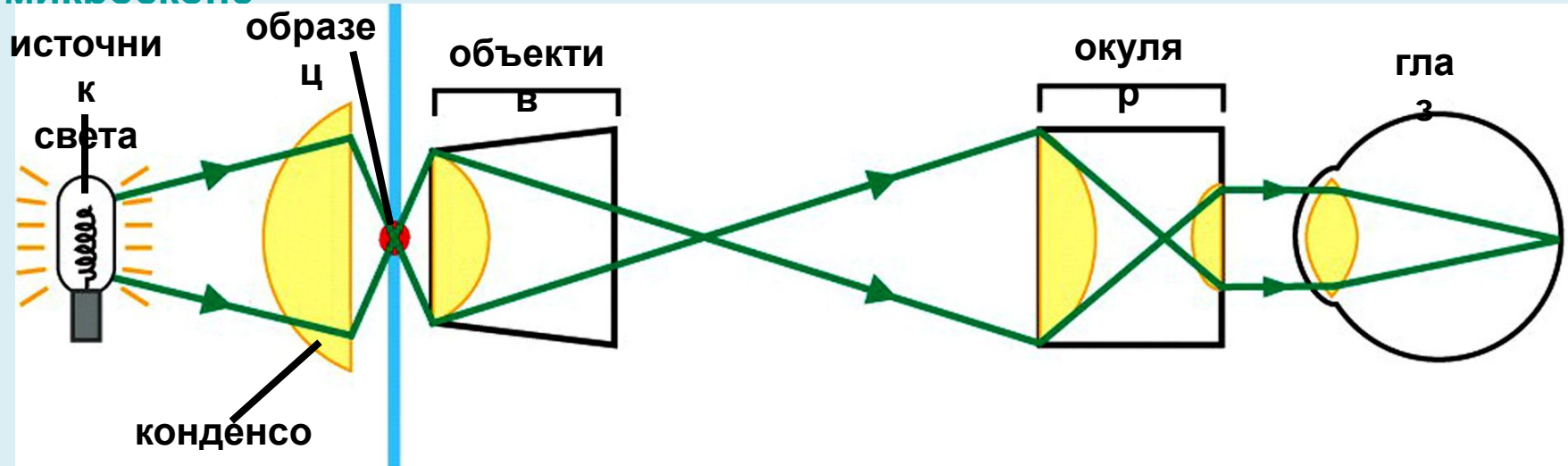
УСТРОЙСТВО И ПРИНЦИП РАБОТЫ МИКРОСКОПА



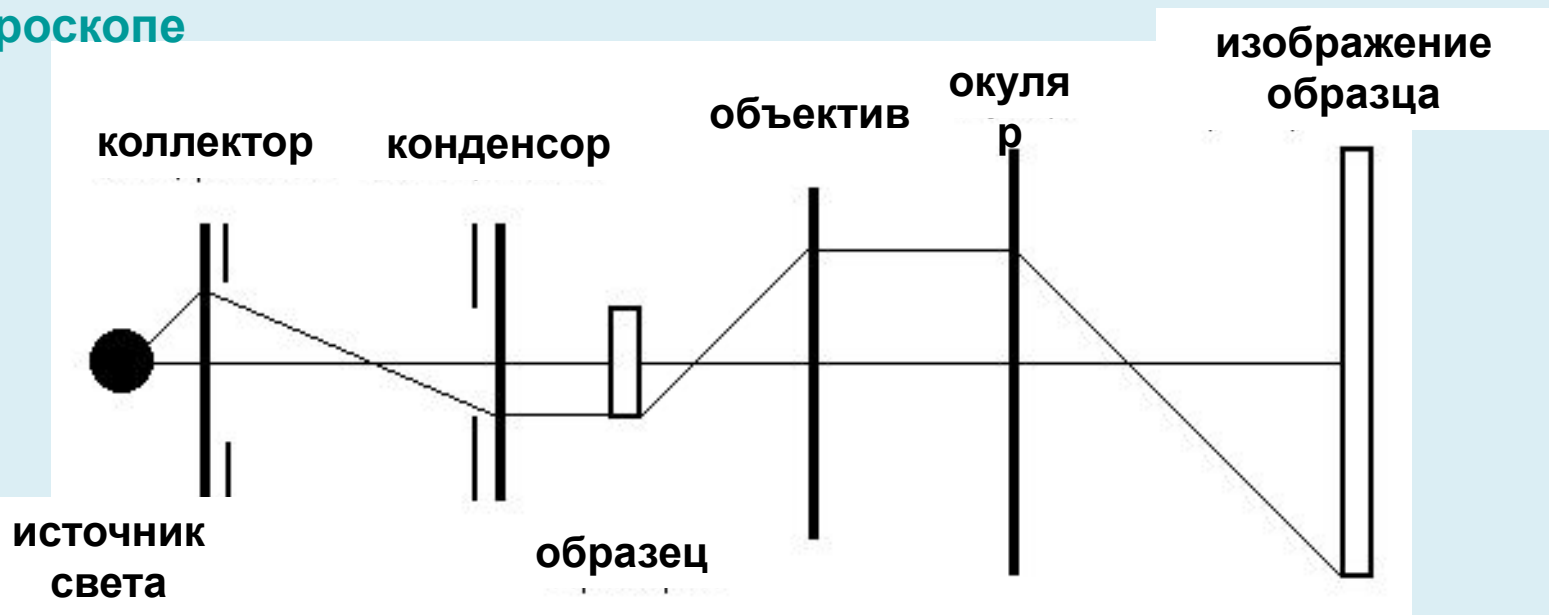
Осветительная система светового микроскопа

УСТРОЙСТВО И ПРИНЦИП РАБОТЫ МИКРОСКОПА

Ход лучей в стандартном микроскопе



Ход лучей в современном микроскопе



РАЗРЕШЕНИЕ МИКРОСКОПА

Разрешение микроскопа по полю – минимальное расстояние между двумя точками

формируемого им изображения, пока они еще видны раздельно.

Формула

Рэля:

$$d = \frac{\lambda}{2 \times n \times \sin \alpha / 2}$$

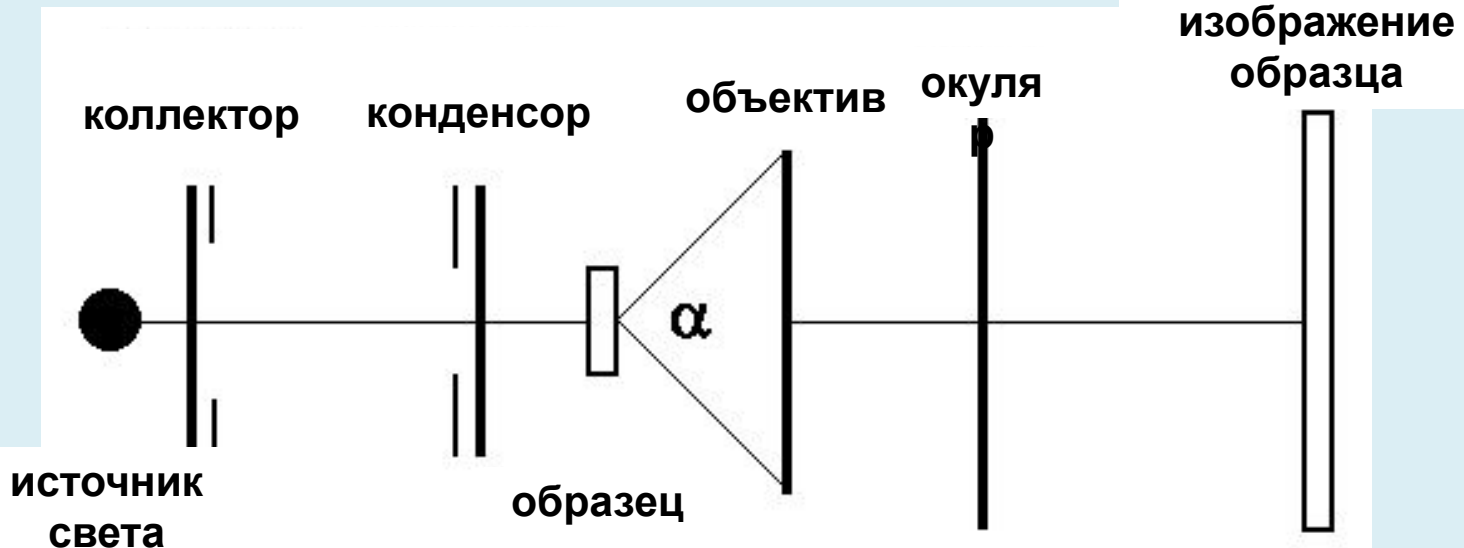
где λ – длина волны используемого света,

n – показатель преломления среды,

α – угол раскрытия объектива.

Угол раскрытия объектива

α :



Формула

Аббе:

$$d = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$$

где NA – численная апертура объектива, равная $n \times \sin(\alpha/2)$.

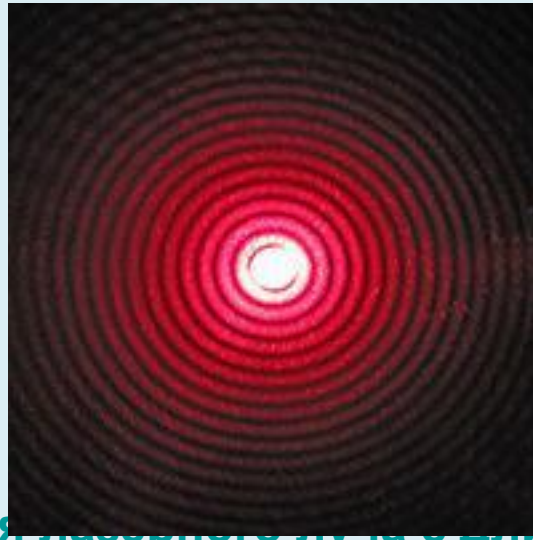
Разрешение микроскопа по глубине – глубина

Формула

Янга:

$$dz = \frac{\lambda}{4 \times n \times \left\{ 1 - \sqrt{1 - \left(\frac{NA}{n} \right)^2} \right\}}$$

МИКРОСКОП КАК ДИФРАКЦИОННЫЙ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЬ



Дифракция лазерного луча с длиной волны
650 нм,
прошедшего через отверстие диаметром 0,2
мм

$$F(u) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) [\cos(2\pi x u) - i \sin(2\pi x u)] dx$$

Прямое преобразование Фурье

$$f(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(u) [\cos(2\pi x u) + i \sin(2\pi x u)] du$$

Обратное преобразование Фурье

Закон масштаба, который гласит, что чем меньше размеры объекта, тем больше размеры его дифракционной картины

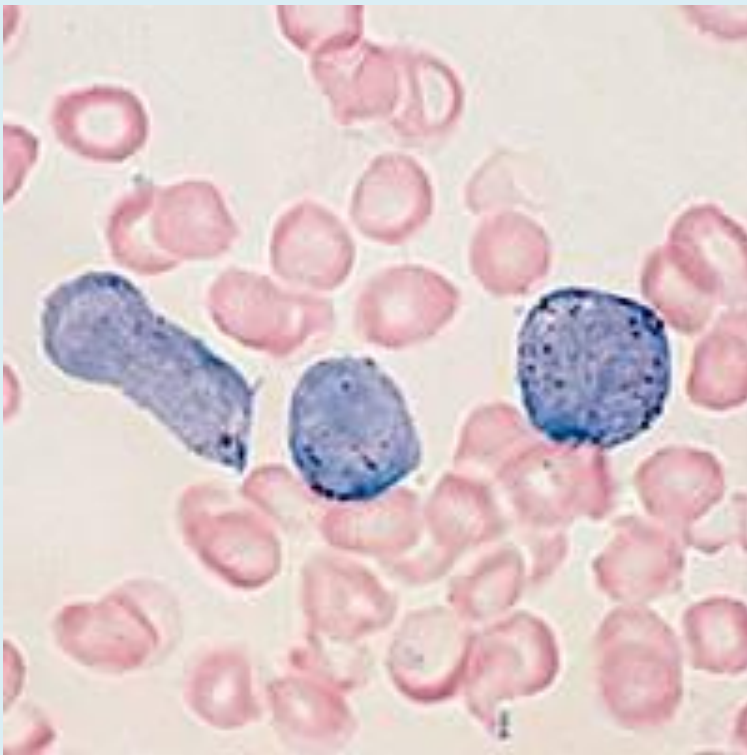
МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ

- 1) Метод светлого поля:**
 - метод светлого поля в проходящем свете**
 - метод косого поля**
 - метод светлого поля в отраженном свете**
- 2) Метод темного поля**
- 3) Метод фазового контраста**
- 4) Метод поляризационной микроскопии**
- 5) Метод интерференционной микроскопии**
- 6) Метод флуоресцентной микроскопии**
- 7) Метод люминисцентной микроскопии**
- 8) Метод электронной микроскопии**
 - сканирующая электронная микроскопия**

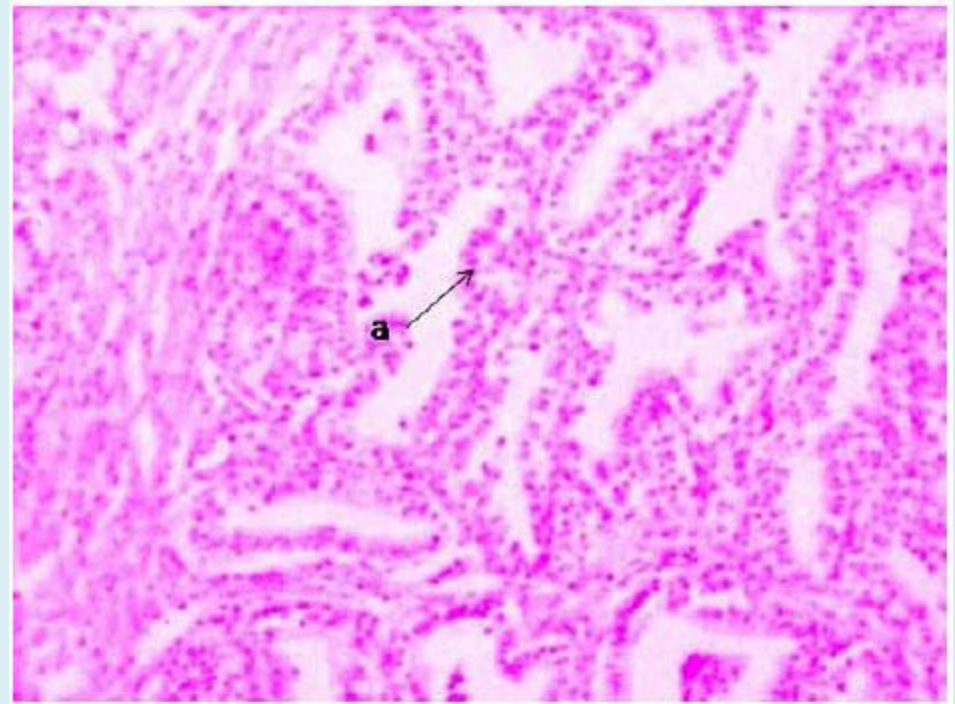
Методы современной цитологии

Цитохимия

Методы основанные на использовании специфических красителей (судан черный)



Проведение химической реакции на срезе на предметном стекле (реакция Фельгена на выявление ДНК)



Методы современной цитологии

Цитохимия

С помощью цитохимических цветных реакций в клетках выявляют

полисахариды,

специфические **аминокислоты** в белках,

нуклеиновые кислоты,

жиры,

липиды

и **множество ферментов**, участвующих в метаболических процессах обмена и превращения веществ.

Ферменты обычно выявляют по наличию продуктов их активности.

Методы современной цитологии

Иммуноцитохимия

Новое направление цитохимии – **иммуноцитохимия,**

в настоящее время является одним из самых передовых методов клеточной биологии.

Для этого метода используются **люминисцентные микроскопы.**

Разрешение таких микроскопов соответствует световым.

Их особенность в том, что препарат освещается снизу не пучком видимого света, а ультрафиолетовым лучом определенной длины волны.



ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИИ



Возможности технологии флуоресцентной микроскопии и не только

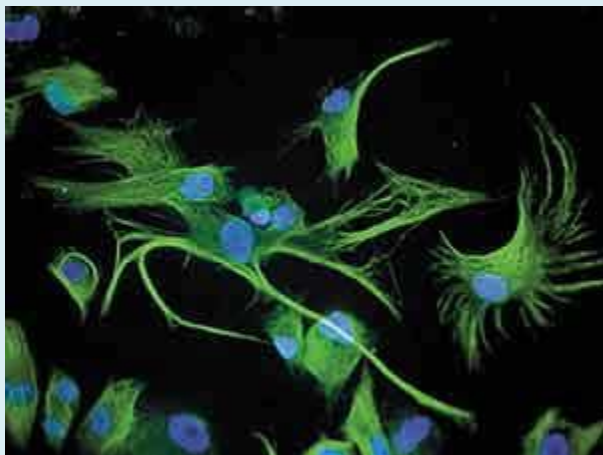
Методы современной цитологии

Иммуноцитохимия

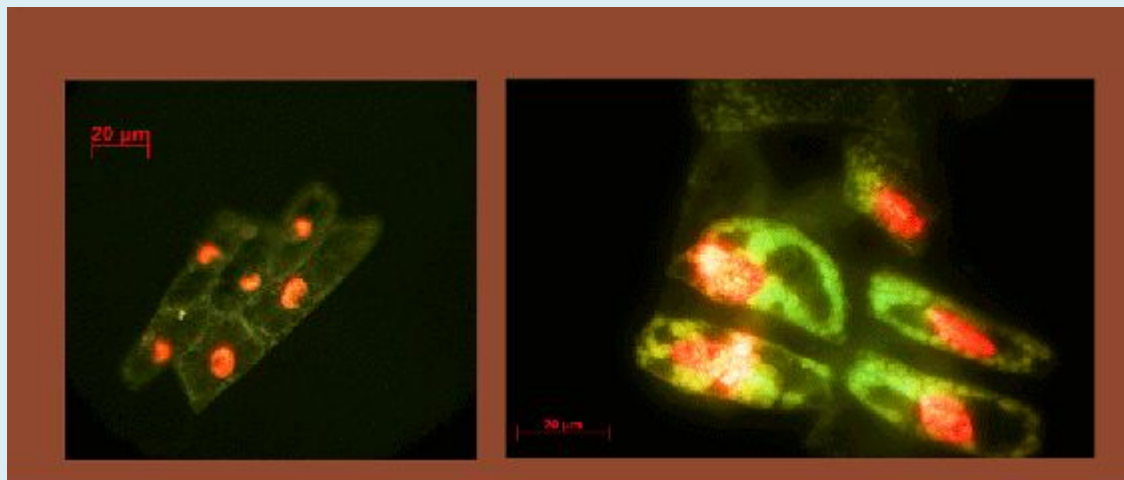
Другая особенность метода в том, что используются не обычные, а **люминисцентные**, или **флюоресцентные** красители для окрашивания препаратов.

Такие красители под воздействием ультрафиолета дают **яркое свечение**.

Исследователь видит препарат на темном фоне, где ярко светятся окрашенные участки клеток.



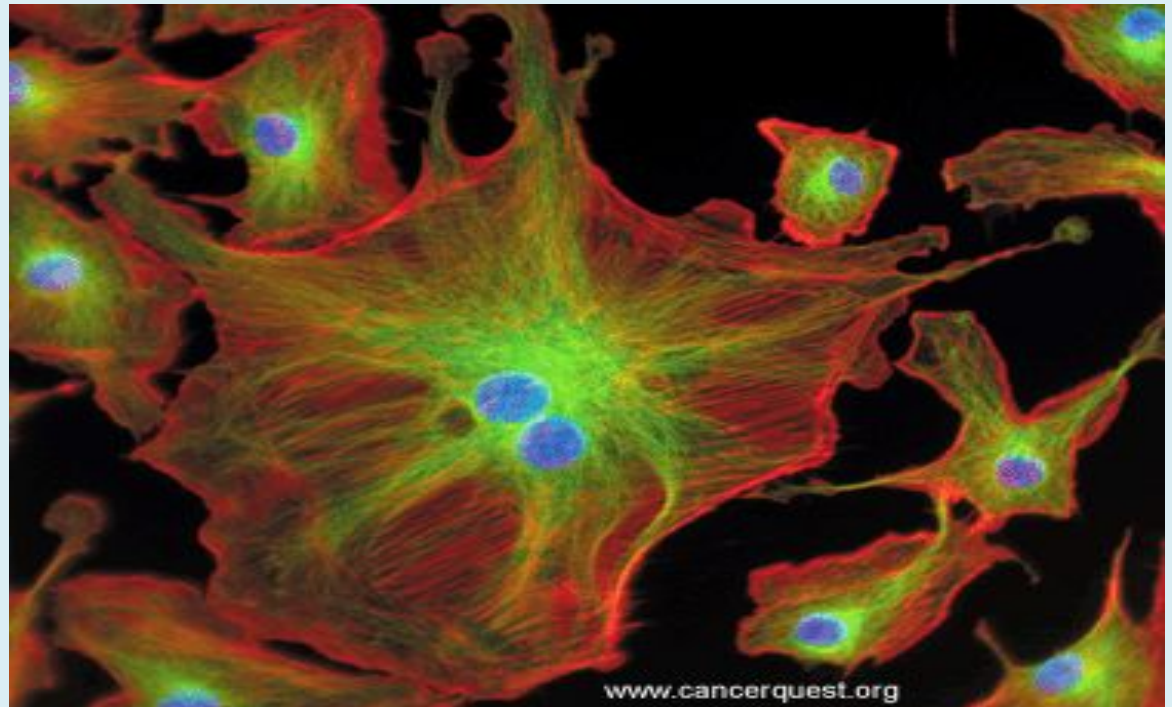
Культура стромальных стволовых клеток человека. Зеленым флюоресцирует цитоплазма, содержащая нестин, синим — ядерный материал.



красным цветом флуоресцирует ДНК клеток, зеленым – клеточная стенка и цитоплазма с содержащимися в ней пластидами.

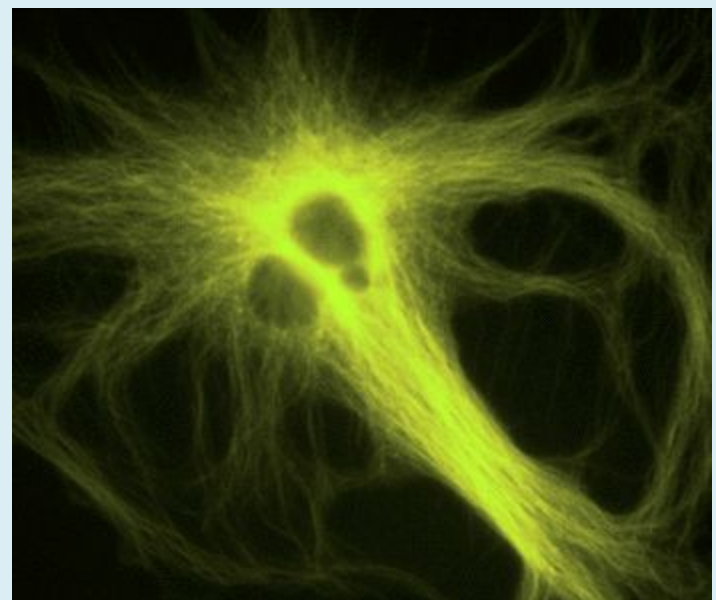
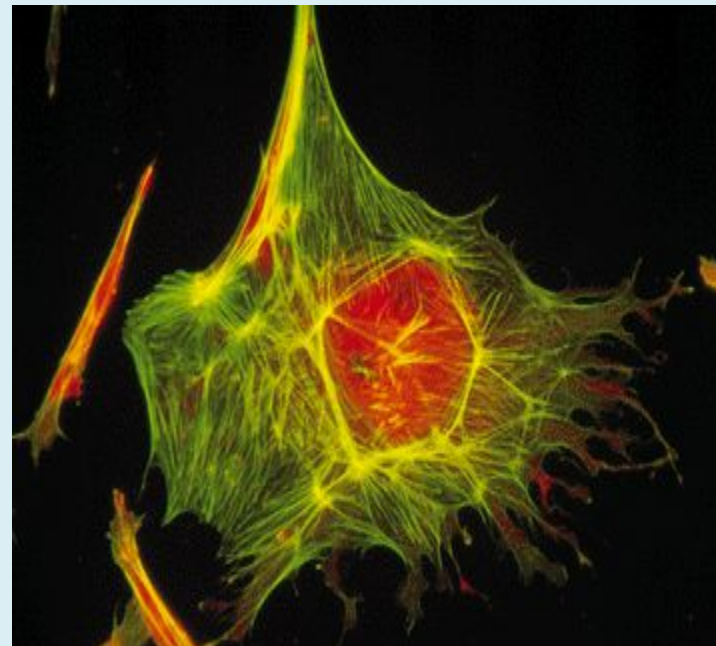
С помощью метода **иммуноцитохимии** изучили состав и расположение **элементов цитоскелета** клеток растений и животных, какие особенности цитоскелета характерны для опухолевых клеток.

С помощью этого метода научились выявлять индивидуальность **хромосом** человека, что необходимо при изучении развития патологий, а так же в судебной медицине.



Метод **иммуноцитохимии** позволил выявить на поверхности разнообразных клеток свои индивидуальные маркеры, что облегчило понимание многих патологических процессов, позволило выяснить, какие клеточные типы являются отправной точкой в развитии ряда болезней.

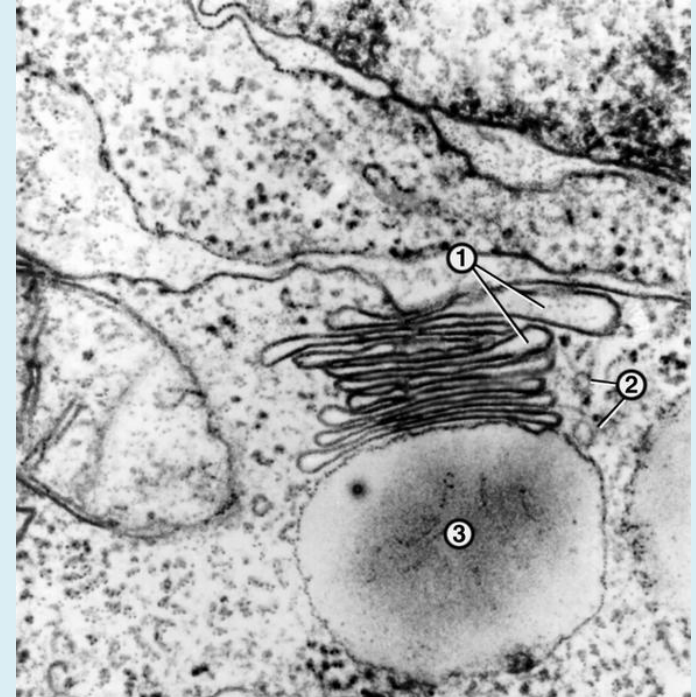
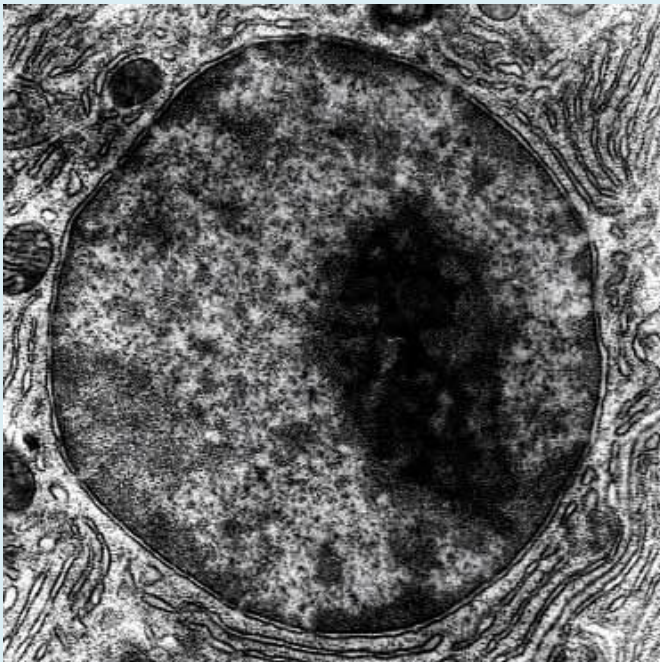
Например, показана роль макрофагов и гладкомышечных клеток кровеносных сосудов в развитии атеросклероза.



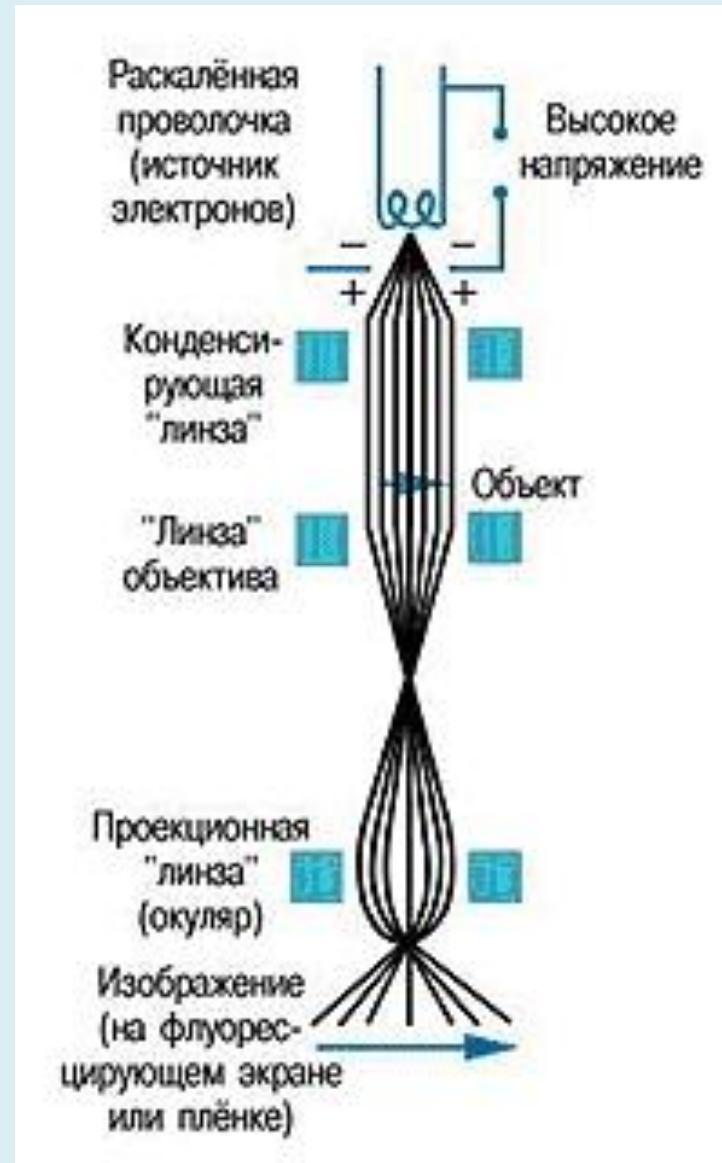
Электронная микроскопия

Электронная микроскопия дает в 100 раз большее разрешение биологических объектов по сравнению со световой микроскопией.

В электронном микроскопе изображение строится с помощью узкого пучка электронов, с высокой скоростью проходящего через срез ткани и взаимодействующего с ним.



Электронная микроскопия



Сканирующий электронный микроскоп



Сканирующая электронная микроскопия

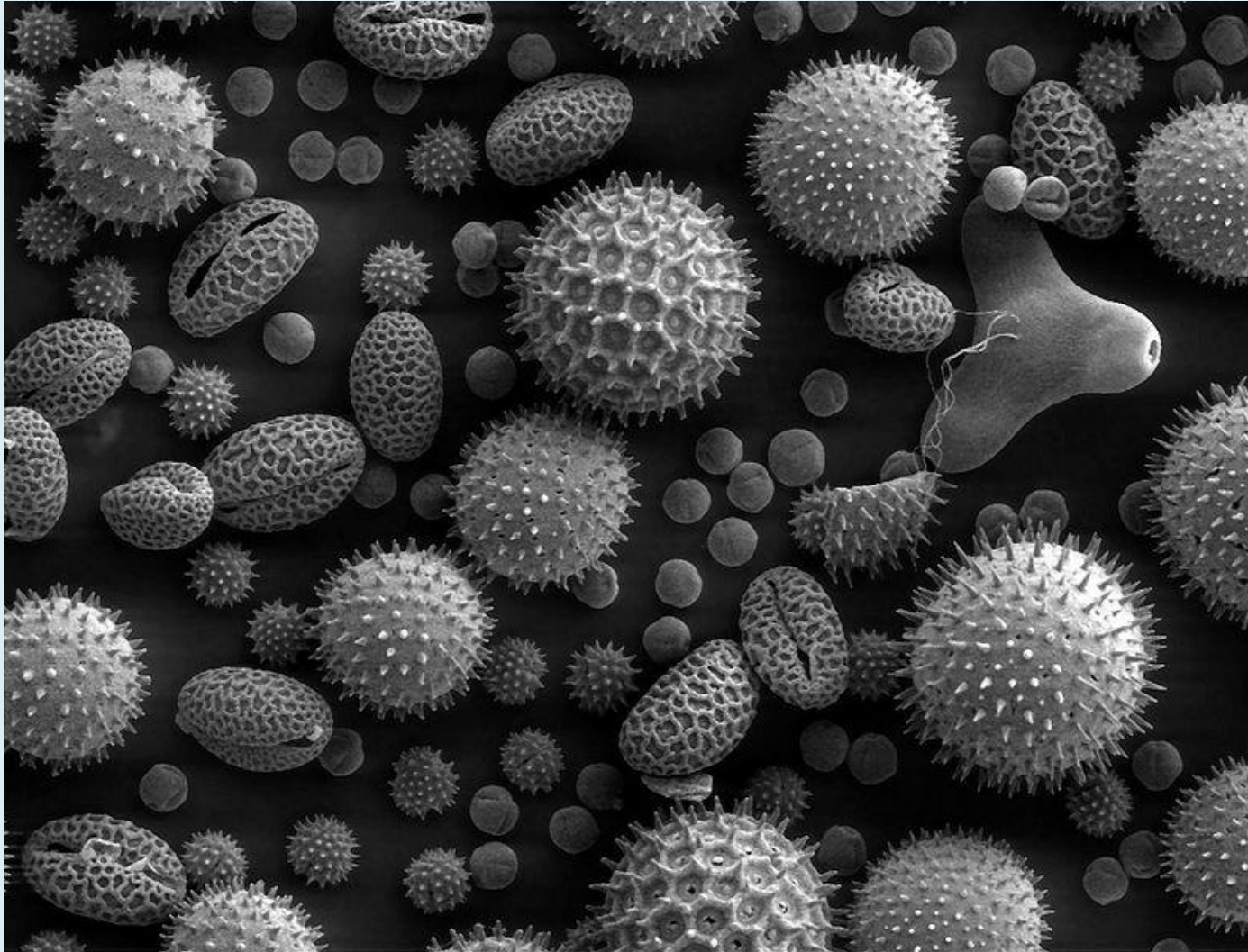
Помимо трансмиссионной электронной микроскопии существует растровая (сканирующая) электронная микроскопия, когда изображение строится с помощью электронного луча, отраженного с поверхности изучаемого объекта. Такие электронные микроскопы называются сканирующими.

В микроскопе образец сканируется узким пучком электронов.

Когда луч электронов попадает на образец, то поверхность образца, на которую нанесен тонкий слой золота, испускает «вторичные электроны». Они регистрируются прибором и преобразуются в изображение на телевизионном экране. Максимальное разрешение сканирующего микроскопа меньше, чем трансмиссионного, и составляет 10 нм для биологических объектов, а увеличение X20 000.

С помощью сканирующих микроскопов изучают внутренние поверхности кровеносных сосудов, поверхности клеток и небольших структур. Сканирующий микроскоп дает **объемное изображение**.

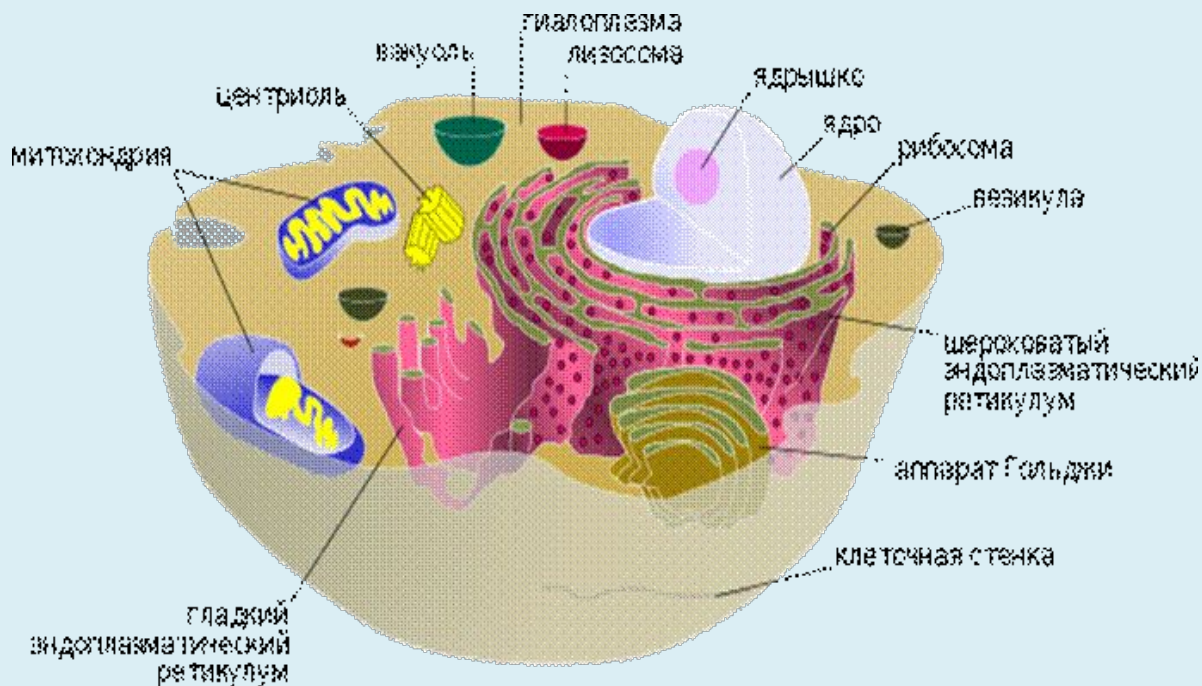
Пыльца под сканирующим электронным микроскопом



Фракционирование клеток

С середины XX века цитологи получили возможность исследовать не только целые клетки, но и отдельные органоиды, выделенные из клеток в жизнеспособном состоянии.

Для этого используется метод фракционирования клеток, основанный на дифференциальном центрифугировании.



Метод фракционирования

Центрифуг

а



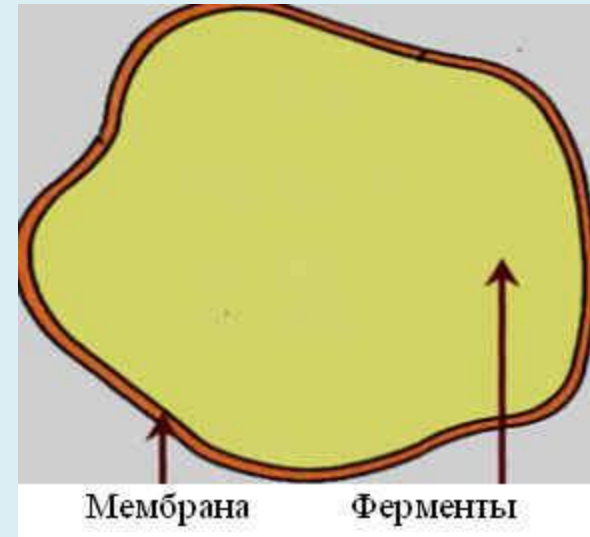
Разные органоиды осаждаются на дно пробирки при разных скоростях центрифугирования.

Скорость оседания зависит от размера частицы и ее плотности.

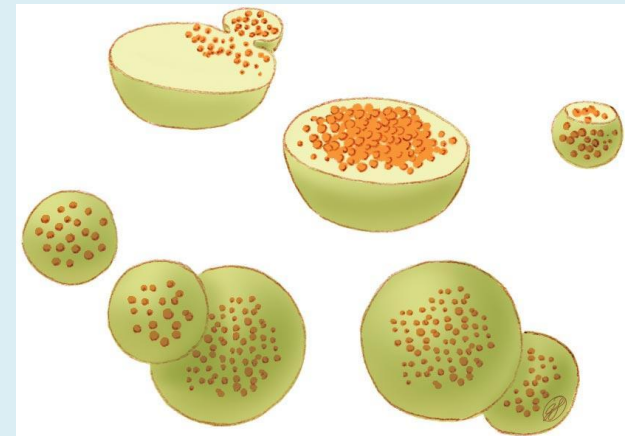
При низких скоростях центрифугирования в первую очередь осаждаются ядра. Получив осадок ядер, оставшуюся суспензию переливают в другую пробирку для следующего этапа центрифугирования. Осадок, состоящий из клеточных ядер, размешивают и используют в экспериментальной работе. Так повторяют несколько раз, увеличивая скорость и продолжительность центрифугирования. Самые высокие скорости центрифугирования необходимы для получения самых маленьких органелл – рибосом.

Метод фракционирования

С помощью этого метода впервые в клетках были открыты лизосомы – небольшие вакуоли, содержащие гидролитические ферменты и выполняющие пищеварительные функции в клетках. После открытия лизосом методом фракционирования, их обнаружили на срезах клеток под световым и электронным микроскопом с помощью метода цитохимии, выявив работу специфических ферментов.



Возможность получения чистых фракций отдельных органоидов позволила изучить их химический состав, набор ферментов и, в конечном итоге, понять, как работает та или иная клеточная структура.



Метод автордиографии

Метод автордиографии используют для выяснения, в каких местах в клетке идет синтез тех или иных полимерных молекул, для изучения, куда переносятся синтезированные вещества.

Иначе метод называют радиоавтографией.

Этот метод может использоваться применительно и к световой, и к электронной микроскопии.

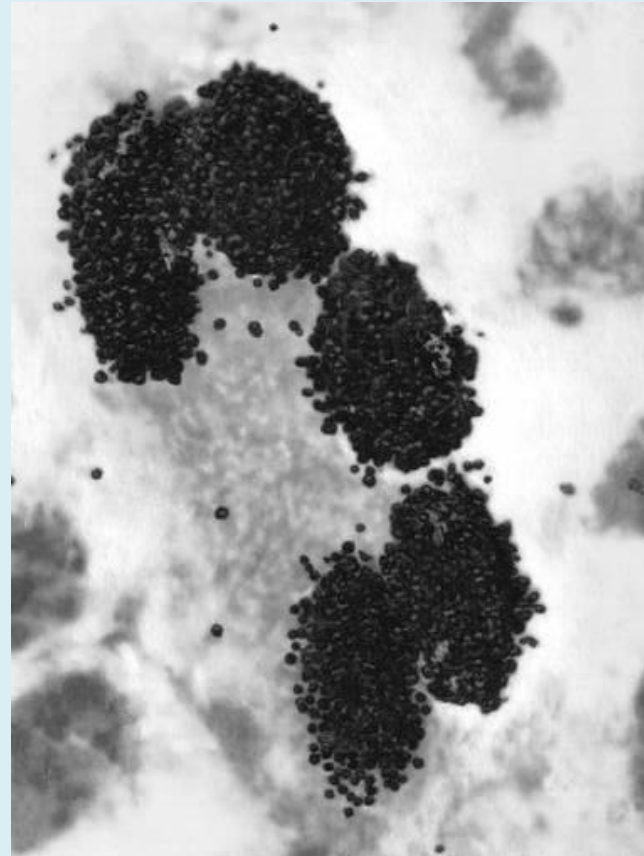
Метод позволяет обнаруживать в клетке биологические полимерные молекулы, меченые радиоактивными изотопами.

Ядра радиоактивных изотопов нестабильны, подвергаются распаду, испуская заряженные частицы или γ -лучи. Экспериментатор регистрирует этот радиоактивный распад на фотопленке.

Метод автордиографии



**Автордиограмма,
показывающая
распределение фосфора в
листьях томата**



**Включение в ядра
соединительнотканых
клеток меченого тритием
тимина
(H³-T)**

Метод автордиографии

Именно методом автордиографии было показано, что

ДНК всегда находится в ядре и никуда оттуда не выходит.

РНК, напротив, синтезируется в ядре, а затем выходит в цитоплазму.

Белок никогда не синтезируется в ядре.

Место синтеза белка – рибосомы цитоплазмы. Отсюда белок может перемещаться и в ядро, и внутрь органелл цитоплазмы.

Метод клеточных культур

Для получения клеточной культуры небольшие кусочки ткани диссоциируют на отдельные клетки, используя ферментативную и механическую обработку, и получают суспензию клеток.

Затем клетки помещают в специальные сосуды с плоским дном: стеклянные или пластиковые, и заливают искусственной питательной средой.

Для каждого типа клеток среда индивидуальна.

Для большинства животных клеток питательная среда имеет в своем составе глюкозу, незаменимые аминокислоты, витамины и небольшой процент сыворотки крови.

Важно поддерживать нейтральную реакцию среды, оптимальную температуру, не допускать инфекционного заражения.



Именно с помощью метода клеточных культур впервые были описаны особенности опухолевых клеток.

Первая особенность – **способность к бесконечному делению**.

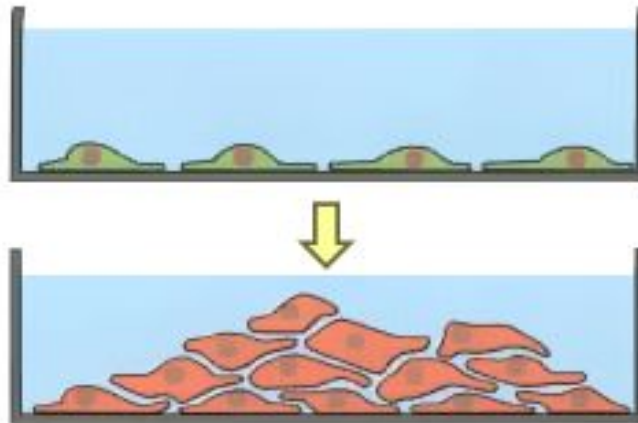
В 50-ые годы XX века была получена перевиваемая клеточная культура раковых клеток опухоли молочной железы.

Культура получила название HeLa по инициалам оперированной пациентки. Эти клетки живы до сих пор, и с ними работают во многих лабораториях мира. За прошедшие годы ученые вырастили тонны этих клеток, хотя самой пациентки давно уже нет.

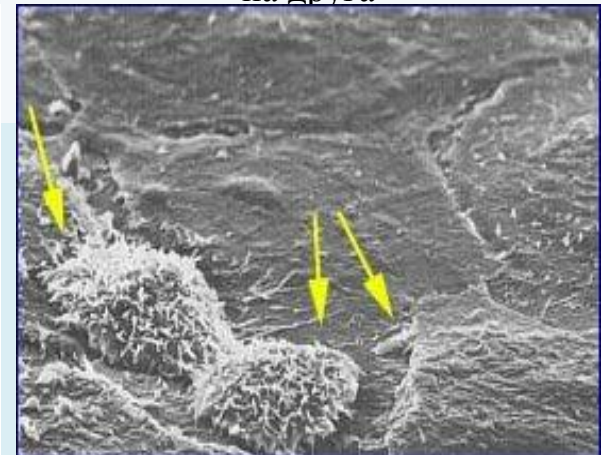
Другая особенность раковых клеток – **отсутствие контактного торможения**. Они не прекращают делиться, заполняя всю поверхность сосуда. Клетки наползают друг на друга, могут образовывать второй и третий слой.

Ослабленным контактным торможением характеризуются раковые клетки

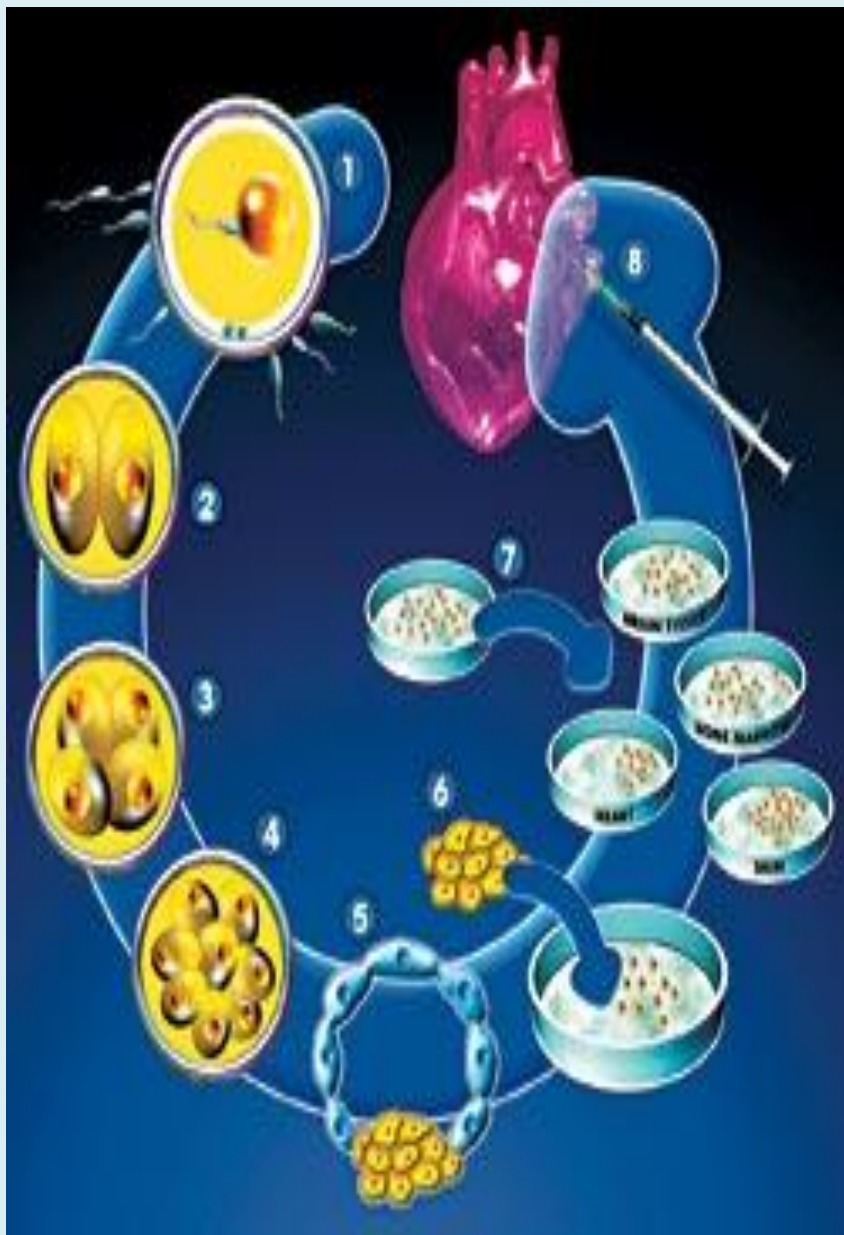
Раковые клетки продолжают расти и после того, как заполнят всю поверхность субстрата, образуя мультислой.



Микрофотография (сканирующий электронный микроскоп) клеток линии A431: эпидермальная карцинома человека. Стрелками показаны места "наползания" клеток друг на друга



Нетрансформированные **нормальные** клетки могут делиться **ограниченное** количество раз.



Клеточная терапия болезней миокарда

1. Оплодотворенная яйцеклетка (зигота)
2. Зигота делится надвое
- 3—4. Митотическое деление продолжается
5. Через 5 дней образуется бластоциста — шарик из клеток, наружный слой которого должен дать начало плаценте, а внутренний — всем тканям нового организма
6. Внутреннюю часть бластоцисты помещают на питательную среду
7. Используя разные химические сигналы, стволовые клетки превращают в клетки разных тканей: мышечные, эпителиальные, костного мозга и другие
8. Клетки — предшественники миоцитов (клеток сердечной мышцы) впрыскивают вблизи очага поражения, чтобы они устранили дефект

Культуры *in vitro* тканей растений

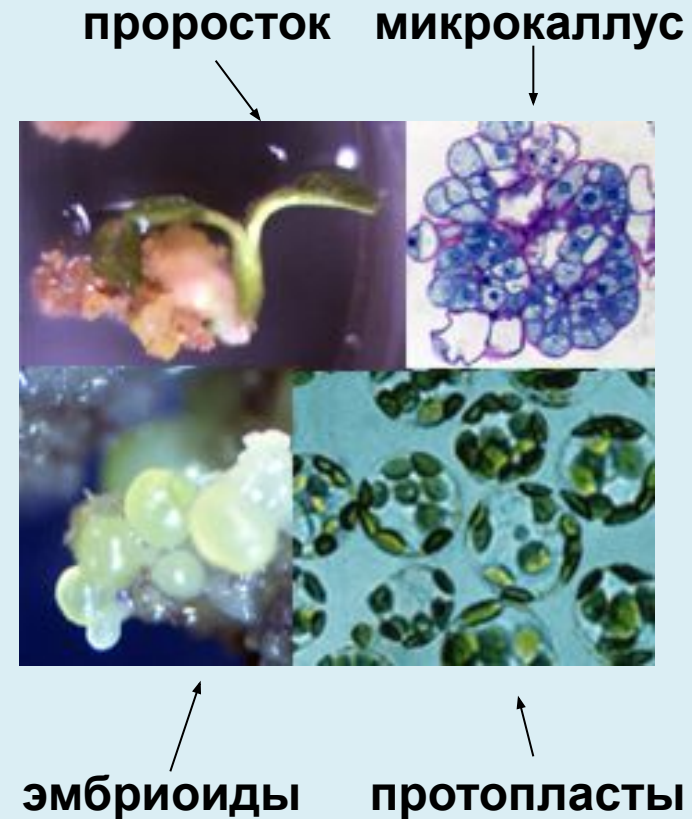
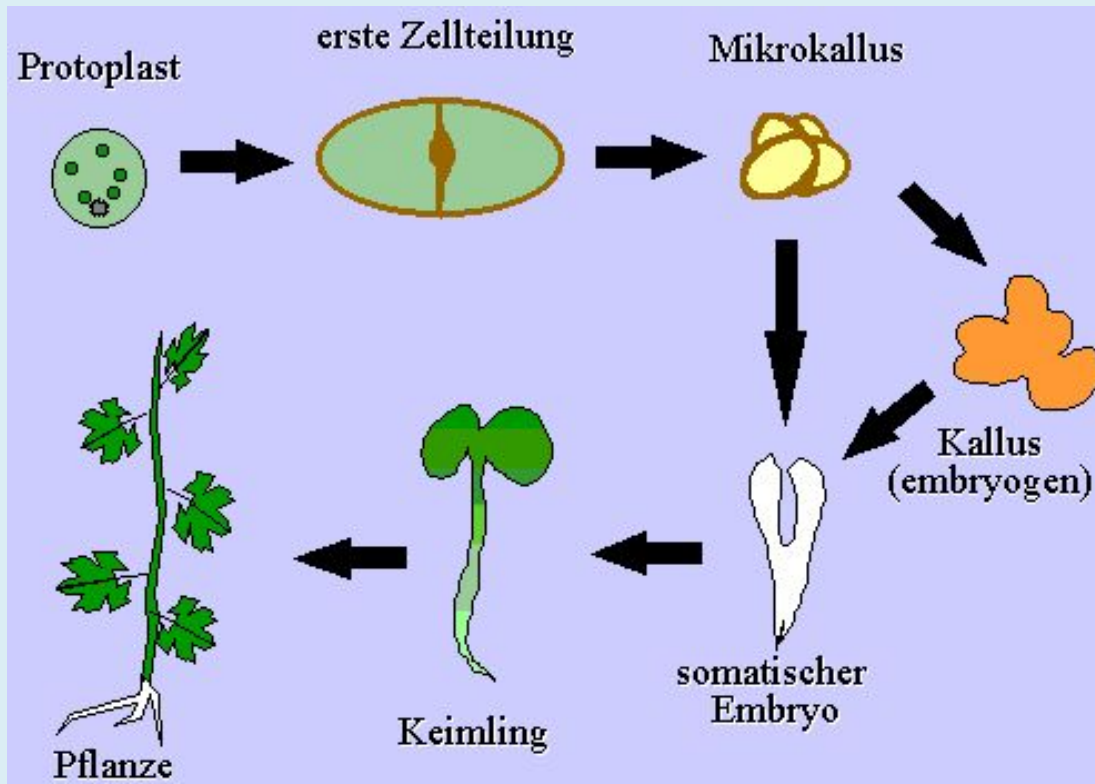
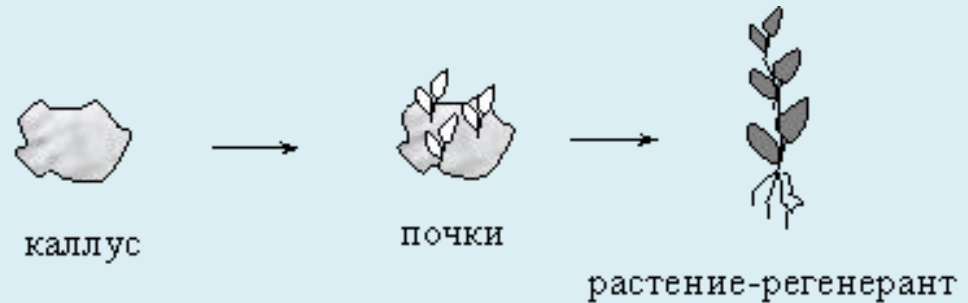


Схема (слева) фото (справа) получения регенерантов из протопластов
протопласт → первое клеточное деление → микрокаллус → эмбриогенный
каллус → соматический эмбрионид → проросток → растение

Дифференциация адвентивных почек в каллусной ткани



Растение-регенерант твердой пшеницы



Через каллусную культуру успешно размножаются сахарная свекла, злаковые, капустные, подсолнечник и другие культуры.

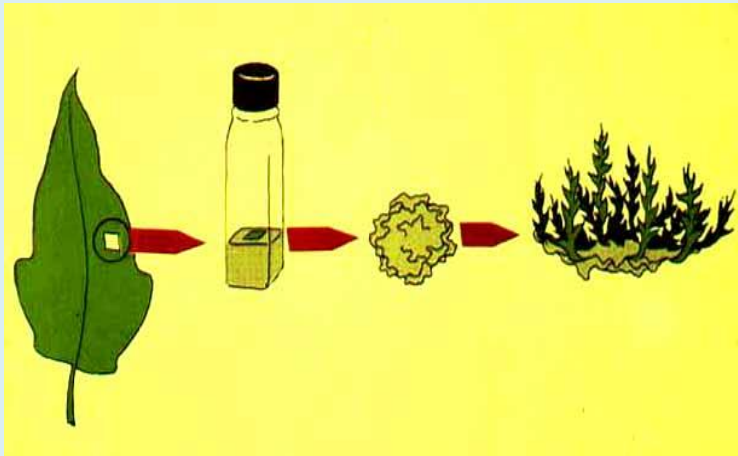
Каллус - особая ткань, состоящая из недифференцированных клеток



Каллус на питательной среде

Культуры *in vitro* тканей растений органогенез

Дифференциация побегов из каллуса



лен



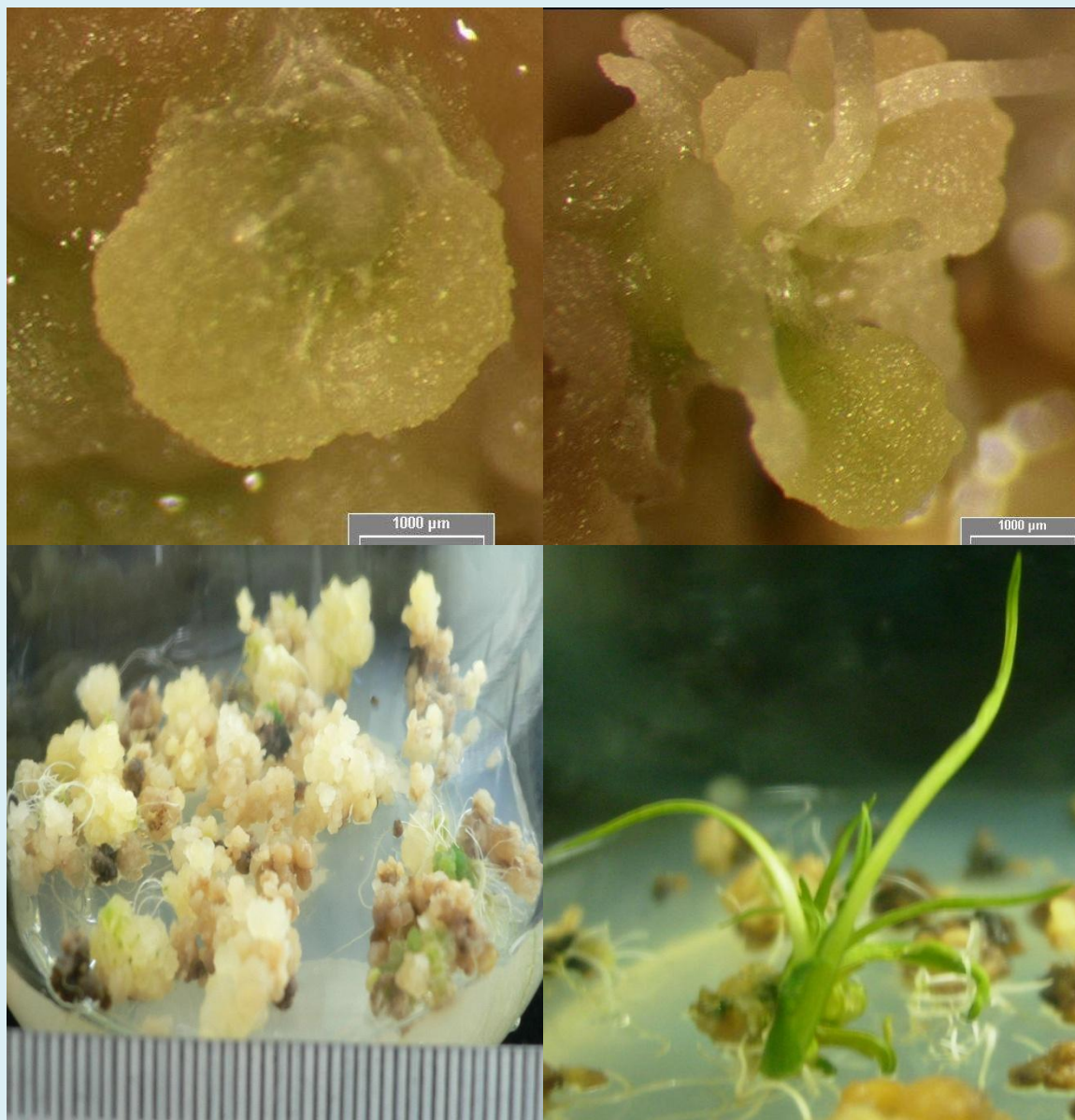
яблоня

Микроклональное размножение - размножение растений *in vitro*, «в пробирке».

Его преимущество перед другими способами

получение генетически однородного посадочного материала;

- освобождение растений от вирусов; высокий коэффициент размножения (от 10^4 для хвойных до 10^6 - для травянистых растений);
- сокращение продолжительности селекционного процесса; ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение всего года;
- возможность автоматизации процесса выращивания.



Регенерация риса cv. Fujisaka 5

Культуры *in vitro* тканей растений



Виды эксплантов:
Эксплантами для культивирования *in vitro* в зависимости от задач исследования могут быть все части растения: верхушки побегов, листья, пазушные почки, стебли, корни



Эрнст Аббе (Ernst Abbe, 1840 - 1905)

Разработал дифракционную теорию микроскопа

Обосновал представления о дифракционном пределе разрешения микроскопа

Стефан Хель (Stefan W. Hell, 1962 -)

Разработал метод управления разрешением светового микроскопа, позволяющий преодолеть предел Аббе

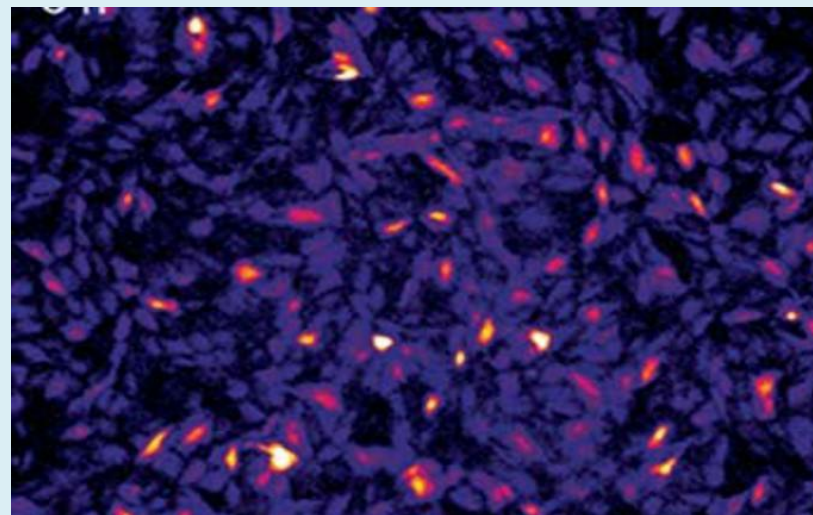
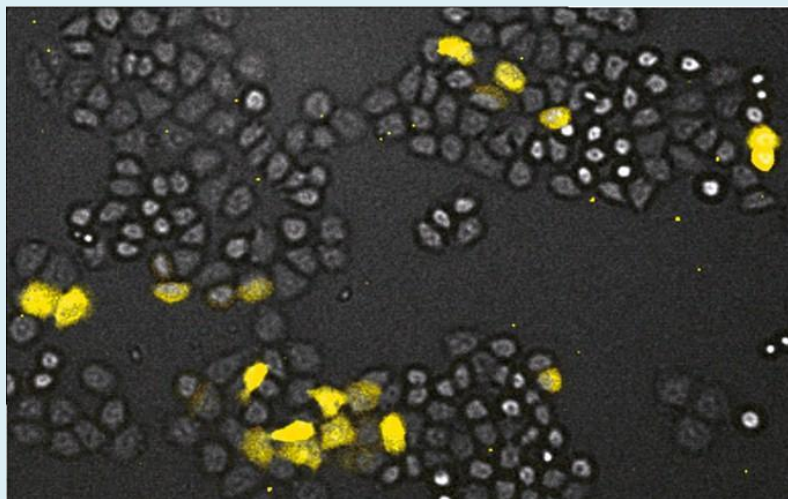


Конфокальная микроскопия

Основное достоинство конфокального микроскопа – не увеличение разрешающей способности, а существенное увеличение контрастности изображения.

Конфокальный микроскоп дает две неоценимые возможности: он позволяет исследовать ткани на клеточном уровне **в состоянии физиологической жизнедеятельности**, а так же оценивать результаты исследований в четырех измерениях: **высота, ширина, глубина и время**.

В таком микроскопе используются принципы иммуноцитохимии с применением специальных люминисцентных красителей для конфокальных микроскопов.



Конфокальная микроскопия

Использование конфокального микроскопа позволило

локализовать отдельные гены в структуре интерфазного ядра, изучать одновременно два или более белков, помеченных разными антителами, чтобы понять существует ли функциональная связь между ними, исследовать динамические процессы в клетке, в том числе и транспорт веществ через мембраны.

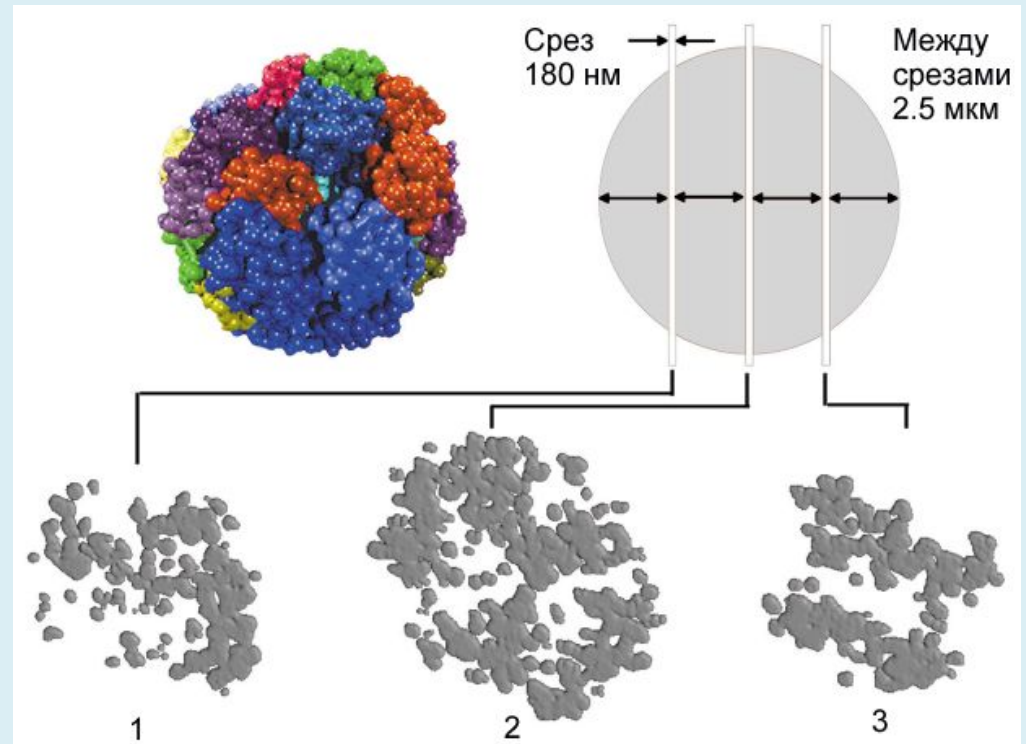
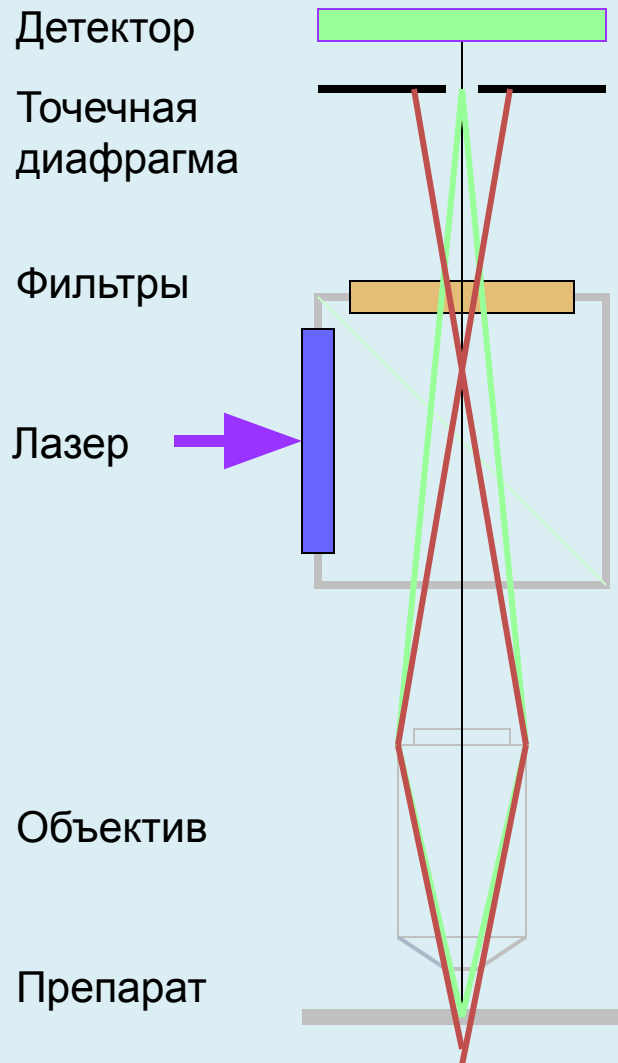
Благодаря использованию научно-технических достижений XX и XXI веков, в цитологии были разработаны новые методы, позволившие перейти на новый молекулярный уровень исследований с возможностью изучения не только структур клетки, но и молекул, выполняющих разнообразные функции.



Конфокальная микроскопия



Конфокальная микроскопия



Трехмерная реконструкция клеточного ядра, на которой видно, что каждая хромосома занимает свою территорию (G.Kreth et al., 2000)

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



**До новых
встреч!**