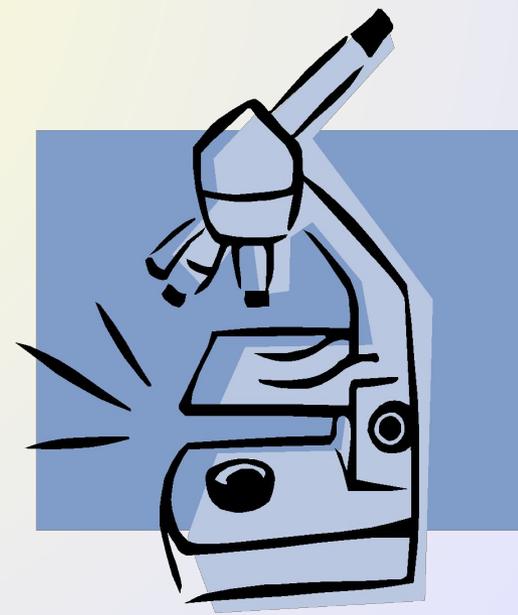




МИКРОСКОП В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Врач КДЛ, к.м.н. Шатохина
Ирина Сергеевна



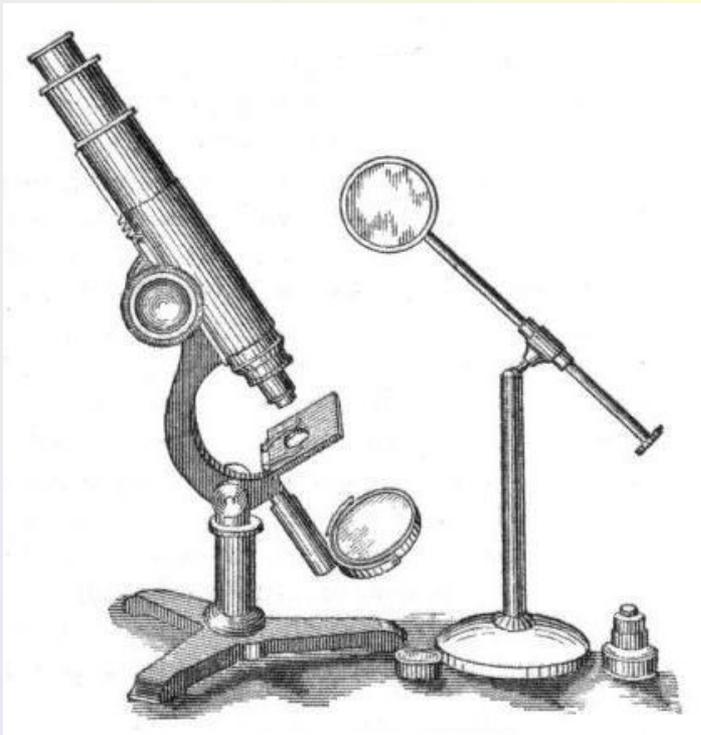
Микроскоп (от лат. micros – малый и scorein – рассматривать, наблюдать) – прибор, позволяющий получать увеличенное изображение объектов и структур, недоступных глазу человека.



Историческая справка

Способность систем из двух линз увеличивать изображение предметов была известна мастерам из Нидерландов и Сев. Италии 16 века, которые изготавливали очки.

Сначала появились простые микроскопы, состоящие из одного объектива, а затем были сконструированы более сложные, имеющие кроме объектива и окуляр.



Микроскоп, 1876 г.

Галилей в 1609-1610 гг., совершенствуя сконструированную им зрительную трубу, стал использовать ее как своеобразный микроскоп.

В 1625 г. членом Римской «Академии зорких» И. Фабером был предложен термин **«микроскоп»**.



15 *Microscope composé,
forme Passement, vers 1750*
Inv. 22314
*Compound microscope,
Passement form, circa 1750*

14 *Microscope composé, vers 1751*
Rédité par Magny
Provenant du cabinet du duc de Chaulnes
Inv. 7453
Compound microscope, circa 1751

12 *Microscope composé type
Culpeper, milieu XVIII^e siècle*
Construit par Dollond
Inv. 1810-11
*Culpeper-type compound microscope,
mid-18th century*

Микроскопы 18 века

Первые успехи, связанные с применением микроскопа в биологических исследованиях были достигнуты **Гуком (R.Hooke)**, который первым (около 1665 г.) описал растительную клетку.

А. Левенгук первым открыл эритроциты, описал бактерии, дрожжи, простейших, волокна хрусталика, чешуйки эпидермиса кожи, зарисовал сперматозоиды, строение глаз насекомых и мышечных волокон (1673-1677 гг).



Микроскоп Левенгука



Антоний ван Левенгук (1632-1723)

В начале 18 в. микроскопы появились в
России.

Большой вклад в разработку проблем
теоретической и прикладной оптики,
усовершенствование оптических систем
микроскопа внесли **М.В. Ломоносов, И.
П. Кулибин, С.И. Вавилов** другие.

В практике биологических и медицинских исследований применяются методы световой и электронной микроскопии.

Световые микроскопы могут увеличивать объект более чем в 1500 раз, а электронные микроскопы – более чем в 20 000 раз.

Микроскопические объекты

- Прозрачные
- Почти все биологические объекты, некоторые минералы и кристаллы, фотоэмульсионные препараты
- Непрозрачные
- Руды, угли, минералы, металлы и др.

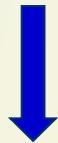
МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ



амплитудные



фазные



изотропные



анизотропные



люминесцирующие



нелюминесцирующие

Микроскопы

Классификация по объекту исследования

**Микроскопы
плоского поля**

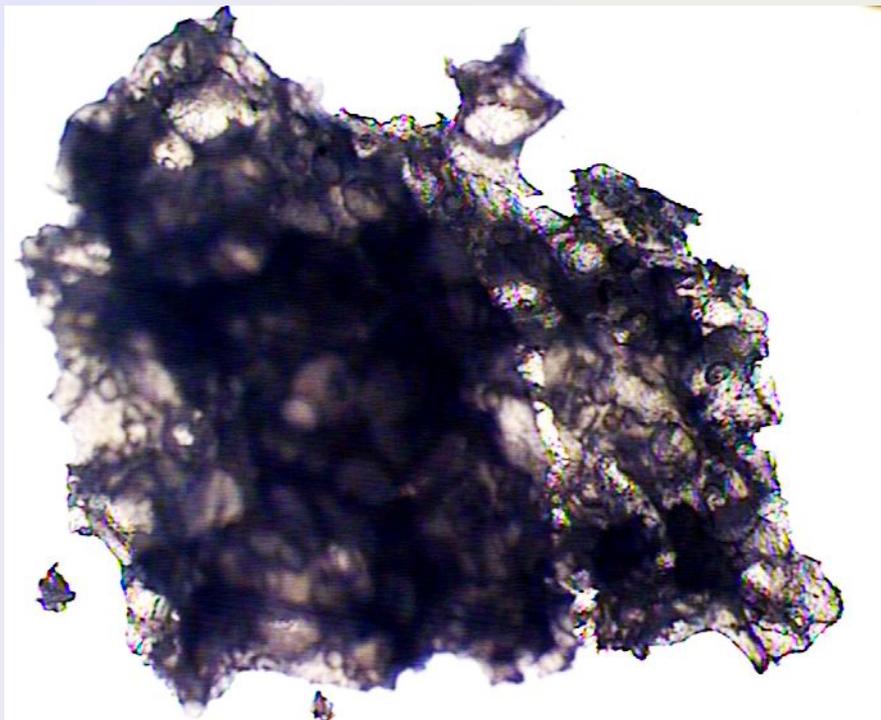
**Стереоскопические
микроскопы**

Микроскопы плоского поля – это микроскопы, оптическая схема которых обеспечивает воспроизведение объекта в двумерном пространстве. Объекты исследования – тонкие, в среднем, толщиной от 10 мкм до 0,1 мм, просматриваемый слой от 1 мм до 0,001 мм.

Стереоскопические микроскопы – это микроскопы, оптическая схема которых обеспечивает воспроизведение объекта в трехмерном пространстве – объемное, трехмерное изображение. Объекты исследования – габаритные, в среднем, толщиной от 100 мкм до 1 мм, просматриваемый слой по высоте/глубине – от 50 мм до 0,5 мм. В этих микроскопах можно наблюдать и плоские объекты.

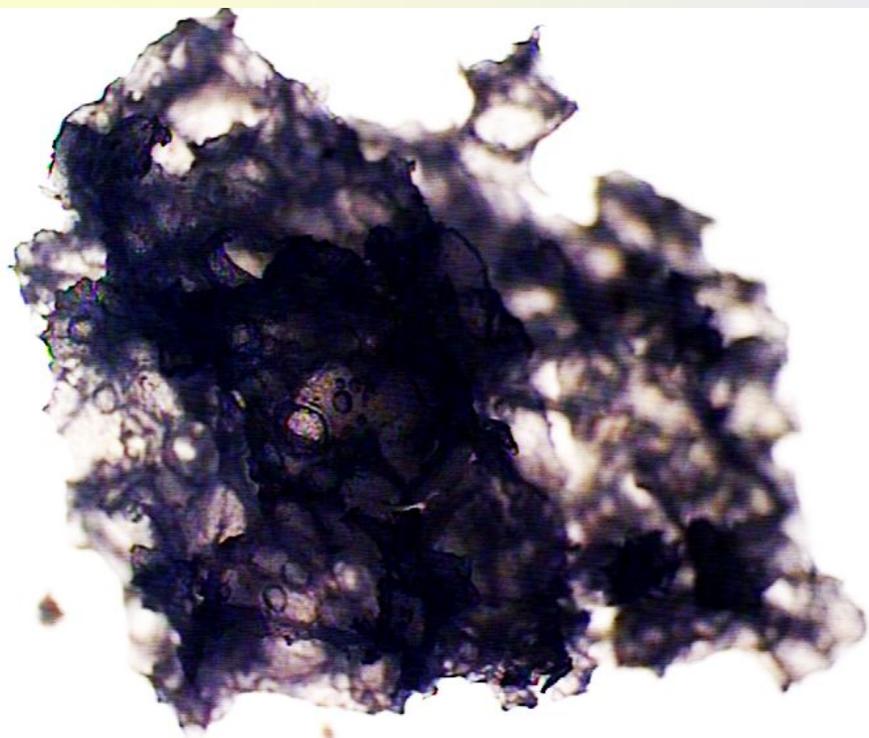


Стереомикроскоп MZ12 фирмы Leica с видеокамерой и передачей изображения на экран монитора



Изображение объекта в стереомикроскопе

*(разный уровень
фокусировки объекта)*



**Применение в микрохирургии и других
биологических исследованиях**

Микроскопы

Классификация по конструкции

Прямые микроскопы

Инвертированные микроскопы

Микроскопы проходящего света

Микроскопы отраженного света



Прямые микроскопы
(классическое построение
схемы микроскопа)
сконструированы таким
образом, что
наблюдательная часть
микроскопа (бинокулярная
насадка с окулярами)
расположена сверху
объекта.



**Инвертированные
микроскопы**
(перевернутое
построение схемы
микроскопа) –
сконструированы таким
образом, что
наблюдательная часть
микроскопа
(бинокулярная насадка с
окулярами) расположена
снизу объекта.

Микроскопы проходящего света (классические микроскопы для биолого-медицинских исследований), основной принцип освещения в которых связан с тем, что свет проходит через объект. С помощью микроскопов проходящего света плоского поля можно рассматривать прозрачные и полупрозрачные объекты.

Микроскопы отраженного света (металлографические микроскопы), основной принцип освещения, в которых связан с тем, что свет падает на объект и отражается от него. На микроскопах отраженного света плоского поля исследуются объекты непрозрачные, с различной степенью отражающей способности, и полупрозрачные.



Металлографический микроскоп Альтами МЕТ 3М

Растровый электронный микроскоп в составе рентгеновского микроанализатора «Суперзонд-8100» фирмы «Jeol» (Япония), который оснащен тремя кристалл-дифракционными спектрометрами. Позволяет проводить количественный анализ состава химических элементов с металлических поверхностей в несколько кубических микрон. Разрешение прибора в режиме растрового электронного микроскопа составляет 7×10^{-3} мкм.



Микроскопы отраженного света
(металлографические микроскопы)



Вид объекта при микроскопии в отраженном свете
(металлографический микроскоп)

Методы наблюдения при микроскопии



Метод светлого поля

Метод косого освещения

Метод темного поля

Метод фазового контраста

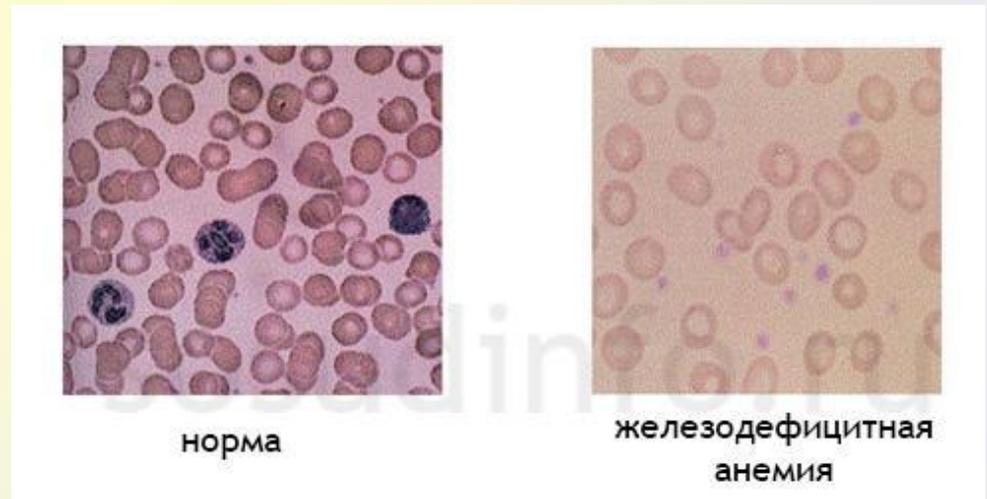
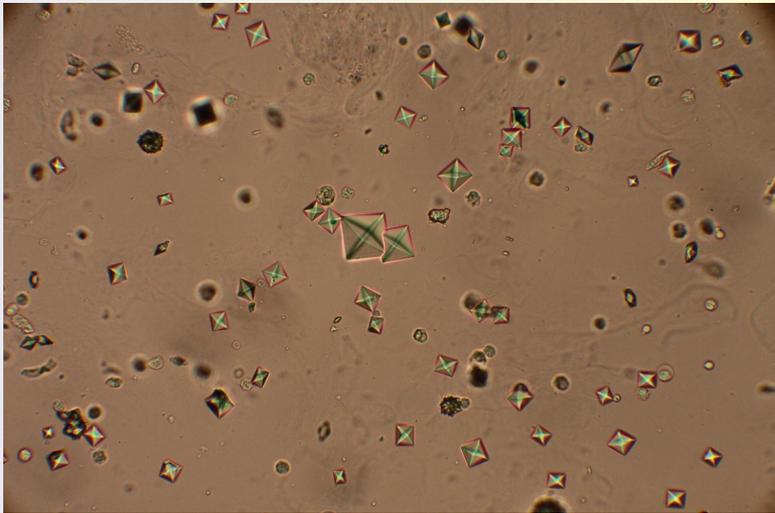
Люминесценция

Поляризация

МЕТОД СВЕТЛОГО ПОЛЯ

обеспечивает следующую картину – на светлом фоне более темное изображение объекта. Основные условия освещения: это обычный прямо проходящий свет.

Применяется при исследовании прозрачных, неокрашенных препаратов (у которых различные участки структуры по-разному поглощают и отклоняют падающий на них свет, что и обуславливает появление изображения), и окрашенных препаратов (мазки крови, препараты КМ, осадки мочи, клеточные концентраты и др.)

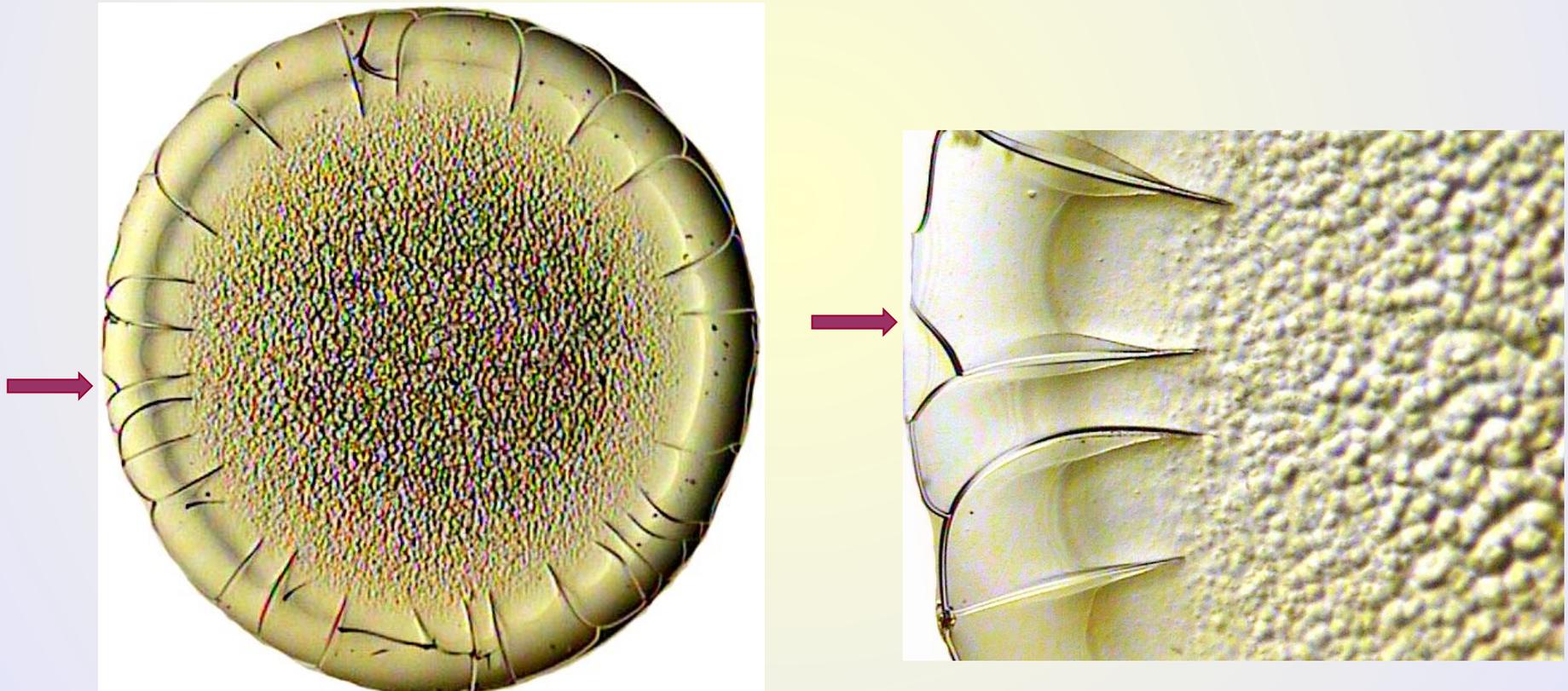


Микроскопия осадка мочи в проходящем свете.

Кристаллы оксалата кальция в виде «конвертов»

МЕТОД КОСОГО ОСВЕЩЕНИЯ обеспечивает следующую картину – на сером фоне можно наблюдать контрастное изображение объекта с неровным по толщине контуром.

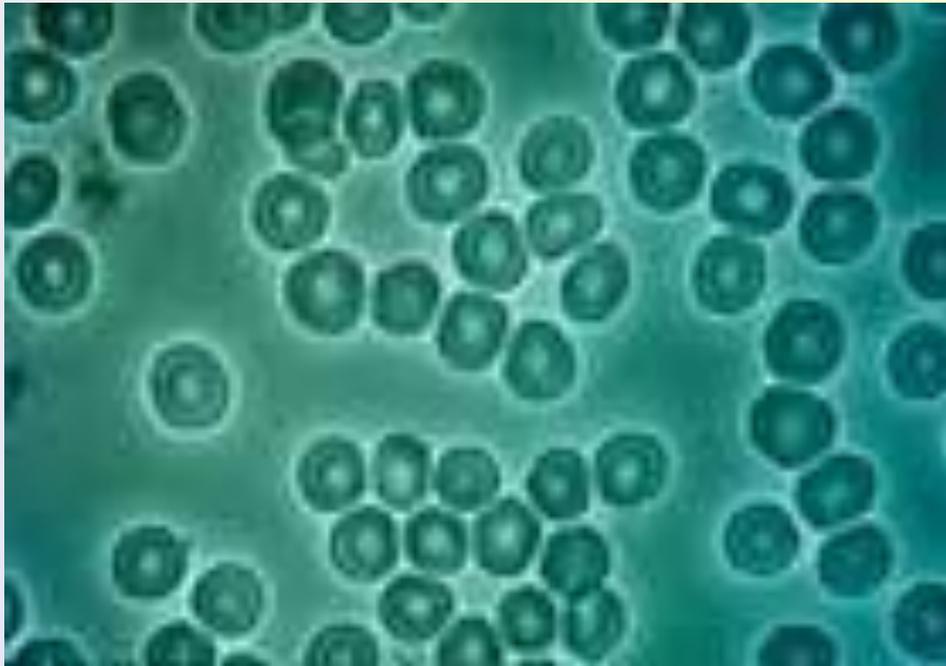
Это разновидность метода светлого поля. Разница между ними состоит в том, что свет на объект направляют под большим углом и создают «рельефность объекта»



МЕТОД ТЕМНОГО ПОЛЯ – на темном фоне можно наблюдать более светлое изображение объекта или ярко блестящий контур объекта.

В основном используется для изучения в проходящем свете прозрачных неабсорбирующих объектов (бактерии, простейшие, шлифы металлов), которые невозможно наблюдать методом светлого поля.

Принцип работы: Свет от осветителя проходит через специальный конденсор темного поля, формирует пучок лучей в виде полого конуса и направляет его на исследуемый препарат



МЕТОД ФАЗОВОГО КОНТРАСТА дает возможность с максимальной степенью визуализации и детальности наблюдать на сером поле «объемное» изображение объекта, окруженное по контуру светлой полосой.

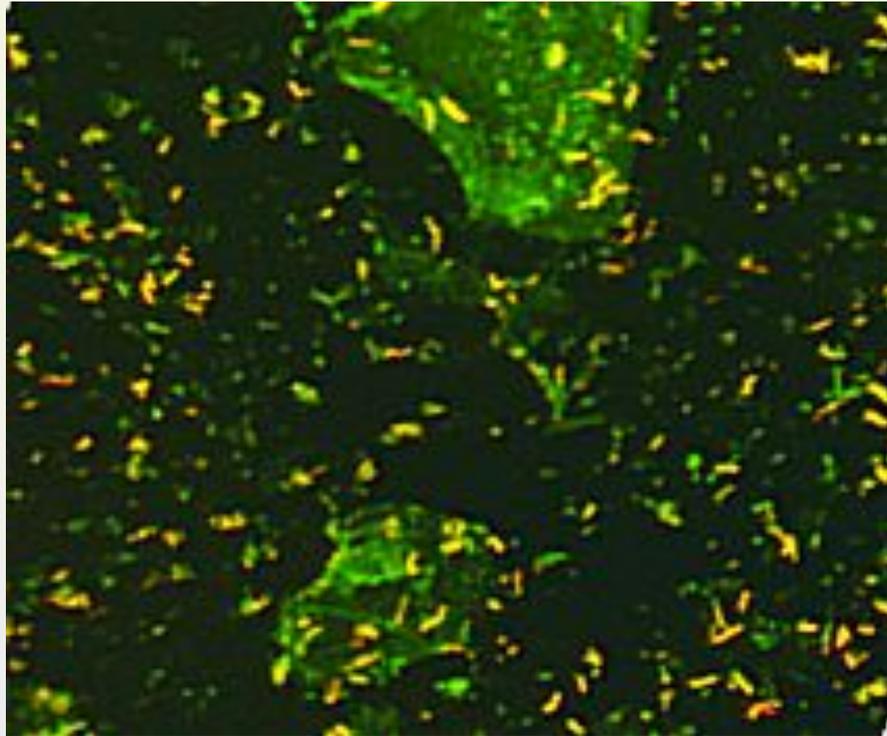
Фазово-контрастная микроскопия, основана на превращении невидимых фазовых изменений в амплитудные, различимые глазом. (ФК устройство может быть установлено на любом световом микроскопе и состоит из: набора объективов с фазовыми пластинками, конденсора с поворачивающимся диском, телескопом для настройки фазового контраста

Метод широко применяется в микробиологии и при исследовании биологических объектов, не требует предварительного окрашивания клетки, из-за которого та может погибнуть



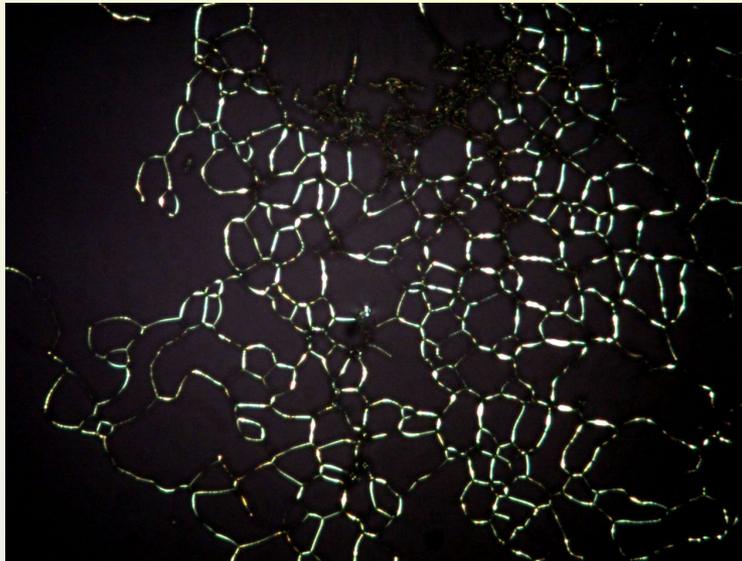
Люминесцентная микроскопия — основана на способности некоторых веществ люминесцировать, т.е. светится при освещении невидимым УФ или синим светом. Объекты окрашиваются специальными красителями (флюорохромами), испускающими свечение при воздействии ультрафиолетовыми лучами. Флюорохромы, как правило, флюоресцируют по-разному в зависимости от химического состава структур, с которыми они взаимодействуют. Некоторые микрообъекты не требуют предварительной окраски флюорохромами и изучаются с помощью люминесцентной микроскопии без окраски

Устройство люминесцентного микроскопа (источник света излучающий УФ или синий спектр и наличие системы светофильтров)



ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЕ МИКРОСКОПЫ обеспечивают наблюдение на сером или темном фоне разноцветного, четкого или контрастного изображения. Метод исследования в поляризованных лучах применяется в проходящем или отраженном свете для анизотропных объектах, обладающих двойным лучепреломлением или отражением (кристаллы, минералы, угли, некоторые животные и растительные ткани и клетки, искусственные и естественные волокна)

При исследовании анизотропных препаратов к обычной схеме микроскопа перед осветительной системой добавляют поляризатор, а после объектива анализатор, находящиеся в скрещенном либо параллельном положении относительно друг друга



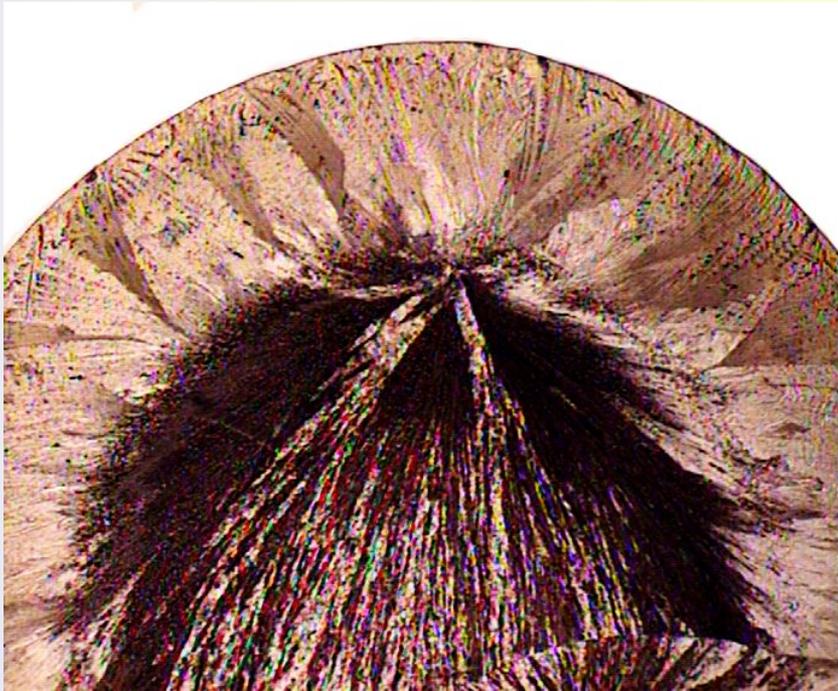
«Миелиновые бороздки» сыворотки крови, в тканевых срезах, впервые описанные Р. Вирховым



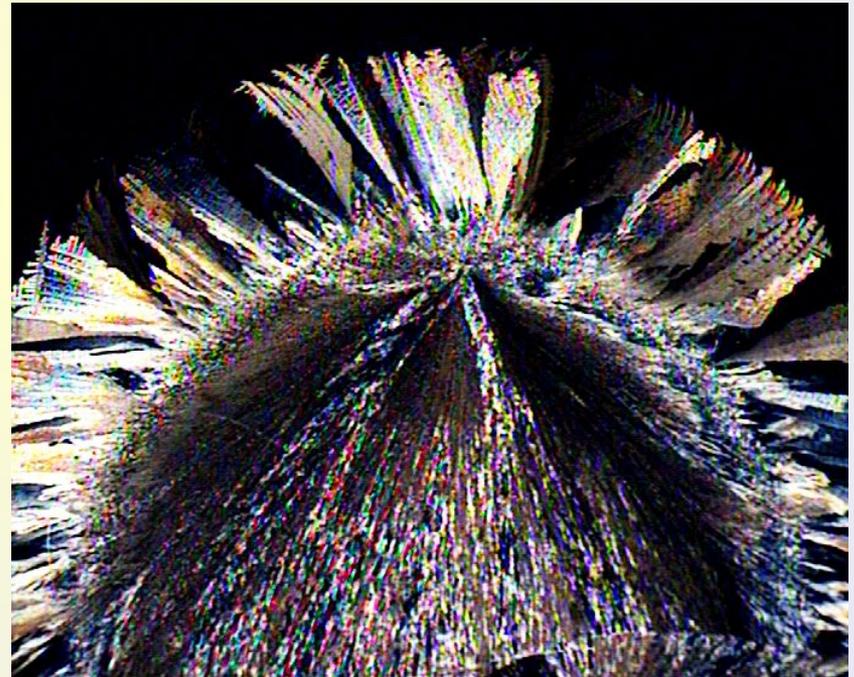
Поляризационный микроскоп DM2500 фирмы Leica с видеокамерой и передачей изображения на экран монитора

Высушенная капля мочи

при обычной микроскопии



в поляризованном свете

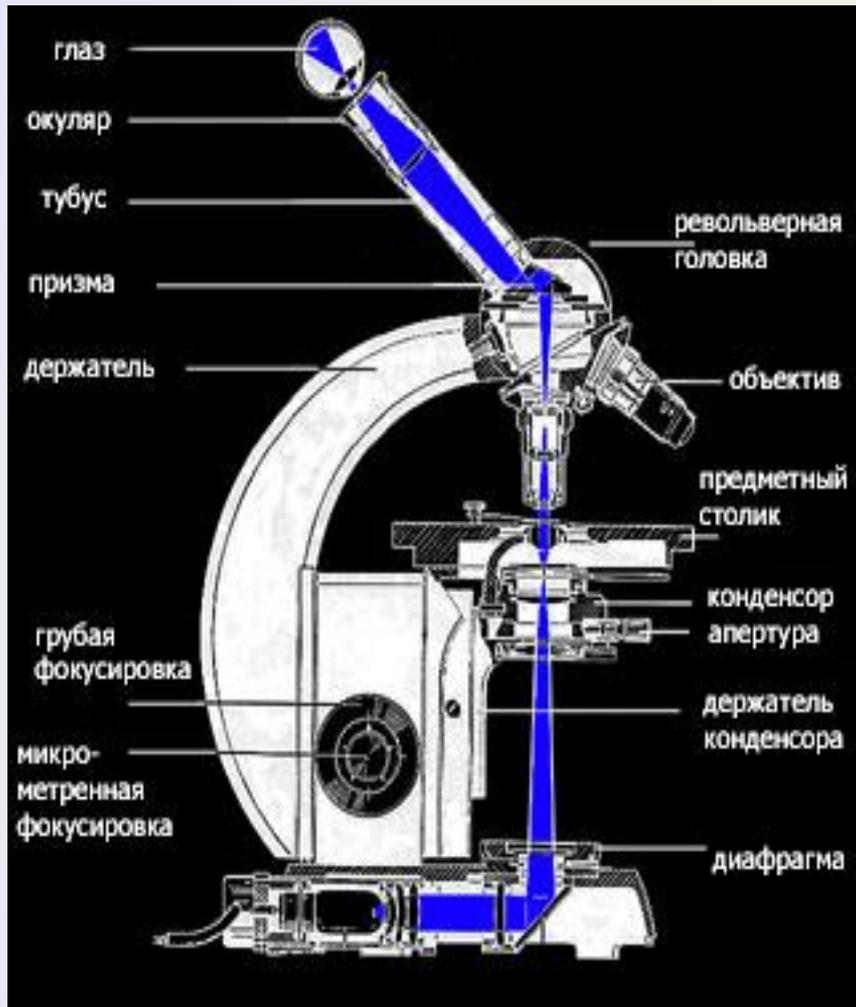


Наиболее распространенными в медико-биологической практике являются **МИКРОСКОПЫ ПРОХОДЯЩЕГО СВЕТА СВЕТЛОГО ПОЛЯ.**

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МИКРОСКОП предназначен для наблюдения в проходящем свете в светлом поле окрашенных и неокрашенных мазков крови, препаратов костного мозга, осадков мочи, клеточных концентратов, гистологических срезов в специальных камерах и др.

Устройство и основные части микроскопа

- Микроскоп включает в себя три основные функциональные части:
 - осветительная часть
 - воспроизводящая часть
 - визуализирующая часть
- С конструктивно-технологической точки зрения микроскоп состоит:
 - механической части
 - оптической части
 - электрической



Механическая часть микроскопа

Штатив основной конструктивно-механический блок микроскопа, включает в себя:

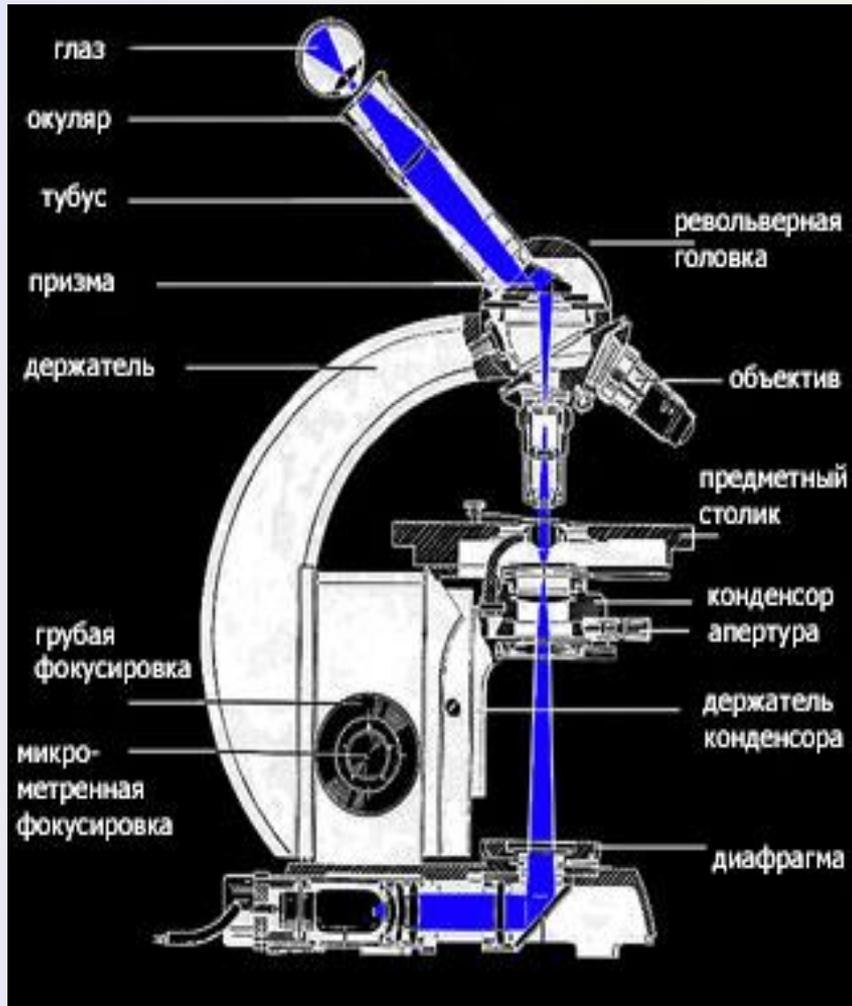
Основание

Тубусодержатель

Основание представляет собой блок на котором крепится весь микроскоп, в основание встроена осветительная система (источники освещения – лампы накаливания, галогеновые)

Разновидности оснований микроскопа:

1. С осветительным зеркалом
2. «критическое» или упрощенное освещение
3. Освещение по Келеру

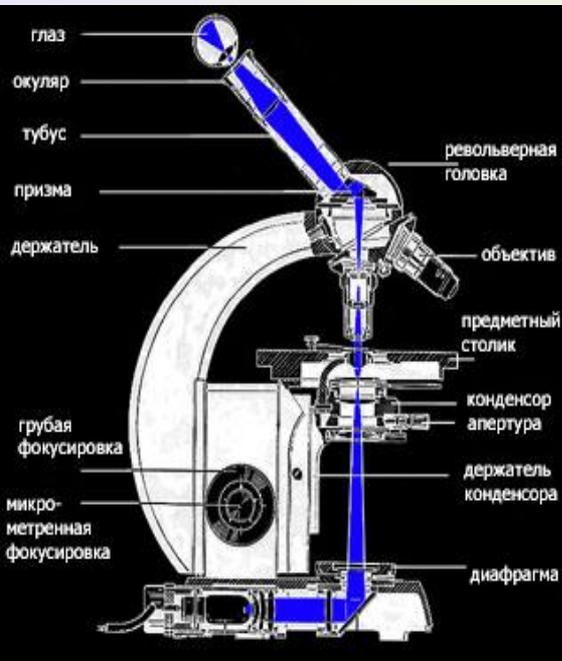


Механическая часть микроскопа

- Тубусодержатель** – часть конструкции микроскопа на котором закреплены:
- Бинокулярные насадки
 - Револьверное устройство (смена объективов) с объективами
 - Предметный столик (с препаратодержателем и препаратоводителем)
 - Фокусировочный механизм грубой и точной настройки микроскопа на резкость (макровинт и микровинт)
 - Конденсор с апертурной диафрагмой

ОСВЕТИТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ

предназначена для создания светового потока, который позволяет осветить объект таким образом, чтобы последующие части микроскопа предельно точно выполняли свои функции.



Источник света – лампа или электрический блок питания
Оптико-механическую систему – коллектор, конденсор, полевая и апертурная диафрагма

Коллектор – расположен вблизи источника света в основании микроскопа и предназначен для увеличения размера светящегося объекта

Конденсор – расположен между объектом (предметным столиком) и осветителем(источником света). При конденсоре всегда находится апертурная ирисовая диафрагма

Оптическая система конденсора предназначена для увеличения количества света, поступающего в микроскоп.

Так же конденсор обеспечивает работу микроскопа по различным методам освещения и контрастирования (косое освещение, темное поле, фазовый контраст)

Апертурная диафрагма – непрозрачная перегородка, работает непосредственно со световым пучком полностью или частично перекрывая его.

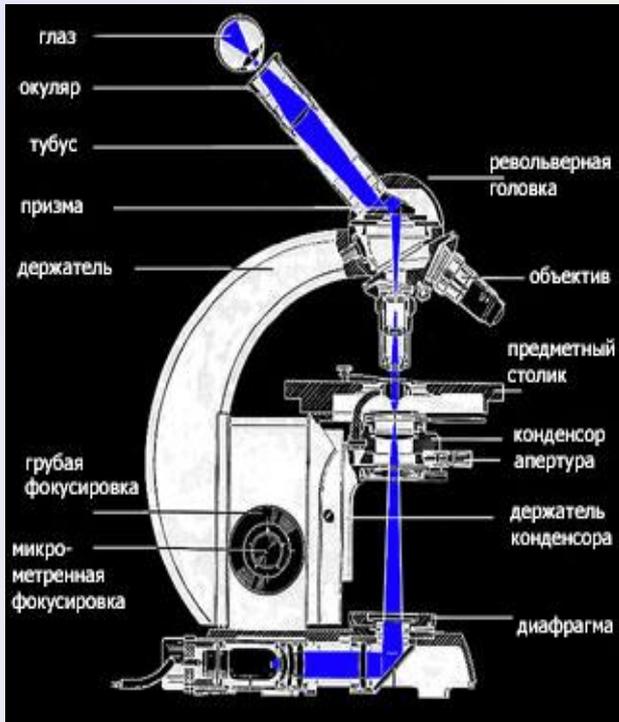
Полевая диафрагма – также влияет на освещенность образца ограничивая или расширяя поле зрения

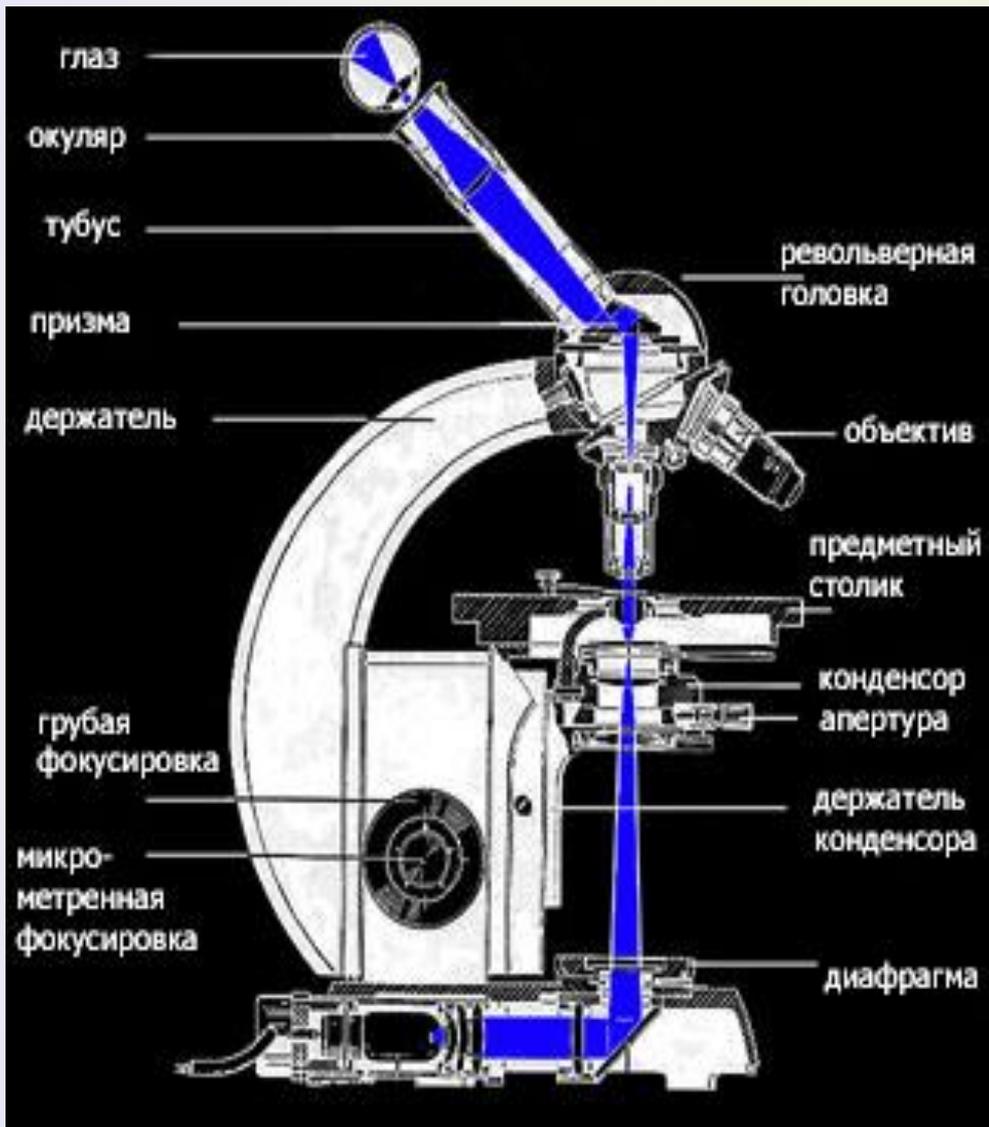
ВОСПРОИЗВОДЯЩАЯ ЧАСТЬ

предназначена для воспроизведения объекта в плоскости изображения с требуемым для исследования качеством изображения и увеличением.

Объективы микроскопа – представляют собой оптические системы, предназначенные для построения микроскопического изображения в плоскости с соответствующим увеличением, ризображения азрешением элементов, точностью воспроизведения по форме и цвету объекта исследования. Объективы имеют сложную оптико-механическую конструкцию, которая включает несколько одиночных линз и компонентов склеенных из 2-х или 3-х линз.

Объективы (x10 – малое увеличение; x40 – большое увеличение; x100 – иммерсионные объективы).





ВИЗУАЛИЗИРУЮЩАЯ ЧАСТЬ предназначена для получения реального изображения объекта на сетчатке глаза.

Визуализирующая часть включает:

монокулярную, бинокулярную или тринокулярную визуальную насадку с наблюдательной системой – окулярами

ОСНОВНЫЕ ПРИЕМЫ НАСТРОЙКИ МИКРОСКОПА ЭТАП 1: ПОЛОЖЕНИЕ



Спина должна быть прямая.

Голова находится на уровне окулярных трубок визуальной насадки.
Пальцы рук удобно охватывают рукоятки грубой и точной фокусировки.
Не должны использоваться для «удобства» книги, журналы и прочее.

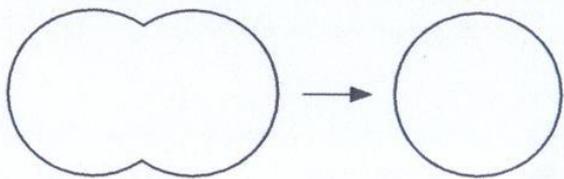
ЭТАП 2: НАСТРОЙКА БИНОКУЛЯРНОЙ НАСАДКИ

Функцией бинокулярной насадки является снижение утомляемости при работе на микроскопе.



Получаем резкое изображение объекта. Устанавливаем окулярные трубки таким образом, чтобы совместить видимое поле от каждого окуляра в единое. Для этого выставляем бинокулярные трубки по горизонтали.

Наблюдая в бинокляр, медленно сводим бинокулярные трубки таким образом, чтобы из двух полей мы получили одно (объединенное) изображение объекта. Не останавливаясь, продолжаем сводить бинокулярные трубки дальше (мы увидим опять два поля), затем начинаем обратное движение и повторно получаем одно поле изображения. Вот теперь мы выставили окулярные трубки по своей глазной базе.

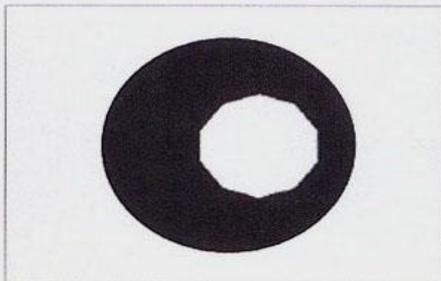


Ровное круглое поле зрения

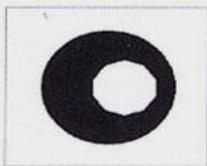
ЭТАП 3: НАСТРОЙКА СИСТЕМЫ ОСВЕЩЕНИЯ

Настройка освещения по Келлеру – процедура для получения наилучшего возможного сочетания контраста и разрешения.

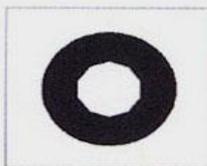
- Включите осветитель микроскопа и поместите на столик микроскопа стекло с препаратом. Установите объектив 10X и настройте фокусировку.
- Поднимите конденсор под столиком в верхнее положение при помощи регулятора фокусировки.
- Убедитесь, что полевая диафрагма (на коллекторе) и апертурная диафрагма (в конденсоре) полностью открыты.
- Удалите препарат со столика.
- Максимально закрываем полевую диафрагму.
- При помощи регулятора фокусировки, поднимите или опустите конденсор так, чтобы край полевой диафрагмы оказался в фокусе.



- Если изображение полевой диафрагмы находится не в центре вашего поля зрения, поворачивайте центрирующие винты, пока изображение полевой диафрагмы не попадет в центр поля зрения.
- Открываем полевую диафрагму.



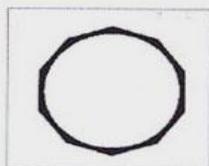
Поле зрения перед выравниванием конденсора



Поле зрения после выравнивания конденсора



Частично открытая полевая диафрагма



Полностью открытая полевая диафрагма

ЭТАП 3: НАСТРОЙКА СИСТЕМЫ ОСВЕЩЕНИЯ

Настройка освещения по Келлеру – процедура для получения наилучшего возможного сочетания контраста и разрешения.

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА ХРАНЕНИЯ МИКРОСКОПА И УХОДА ЗА НИМ

- 1. Микроскоп от проникновения внутрь пыли должен быть покрыт чехлом, лучше полиэтиленовым.**
- 2. Вынимая прибор из ящика, снимая с полки, а также при переносе с места на место микроскоп необходимо держать за штатив и поддерживать за основание.**
- 3. Необходимо оберегать микроскоп от механических ударов.**
- 4. Каждый объектив должен быть ввинчен до конца в гнездо револьверного устройства, и четко зафиксирован в ходе лучей в рабочем состоянии микроскопа.**
- 5. Необходимо предохранять фронтальные линзы объективов и конденсора, а также глазные линзы окуляров от соприкосновения с различными реактивами.**
- 6. Нельзя без необходимости снимать бинокулярную насадку и прикасаться к поверхности тубусной линзы.**
- 7. Нельзя касаться любой стеклянной поверхности пальцами рук, поскольку на поверхности остаются жирные следы. Это потребует проведения внеплановой чистки оптики, которая может повлечь за собой повреждение просветляющих поверхностей.**

8. Категорически запрещается снимать «рубашку» (металлический корпус) объектива и заниматься его разборкой.
9. Во внерабочем состоянии микроскопа **объективы должны быть опущены (причем в ход лучей должен быть установлен объектив малого увеличения). При этом объектив не должен касаться предметного столика.**
10. Для предохранения попадания пыли внутрь микроскопа (если отсутствует чехол) окуляры должны быть вставлены в окулярные трубки, а объективы ввинчены в гнезда револьверного устройства. Если окуляры отсутствуют, то на окулярные трубки необходимо сделать бумажный чехол, а там где нет объективов – необходимо в оставшееся гнездо вставить заглушку или заклеить его широким скотчем.
11. **Рекомендуется перед началом или в конце работы оценить чистоту основных оптических поверхностей объектива, окуляров и конденсора микроскопа и в случае загрязнения немедленно подвергнуть их чистке.**
12. **Для продления срока службы ламп в осветителях рекомендуется не подвергать их резким перепадам напряжения и перед включением и выключением переводить регулятор накала нити лампы (реостат) в минимальное положение.** Осветители, в которых отсутствует реостат, для продления срока службы лампы рекомендуется реже выключать.
13. Раз в полгода необходимо проводить профилактическую чистку и смазку микроскопа представителями сервисной технической службы.

Объективы x10 и x40
не предназначены
для работы с
иммерсионной
средой!

ПРАВИЛА МИКРОСКОПИИ НАТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Нативные препараты - моча, мокрота, кал и другие

1. Приготовленный препарат поместить на столик микроскопа.
2. Установить объектив x10 (малое увеличение).
3. Конденсор **ОПУЩЕН** (или диафрагма максимально **ЗАКРЫТА**).
4. С помощью рукоятки **макрвинта** (грубая фокусировка) добиться резкости изображения.
5. С помощью препаратоводителя препарат перемещается в любом направлении.

В таком режиме микроскопии препарат подвергается общему обзору: оценивается количество элементов и их распределение в препарате.

6. **ПЕРЕВОДИМ** объектив x40 (большое увеличение).
7. С помощью рукоятки **микровинта** (точная фокусировка) добиться резкости изображения.

Этот режим позволяет детально изучить элементы объекта.

ПРАВИЛА РАБОТЫ С ИММЕРСИОННОЙ СИСТЕМОЙ (подсчет лейкоцитарной формулы)

Иммерсионная система — это оптическая система, в которой пространство между первой линзой и предметом заполнено жидкостью (иммерсионное масло, дистиллированная вода, глицерин).

1. Препарат поместить на столик микроскопа, чтобы световой поток падал на тонкий край мазка – «щеточку».
2. Установить объектив x10 (малое увеличение)
3. Конденсор **поднят** (или диафрагма **открыта**).
4. С помощью рукоятки **макрвинта** (грубая фокусировка) добиться резкости изображения.
3. На предметное стекло (без покровного стекла) поместить каплю иммерсионного масла.
4. **ПЕРЕВЕСТИ** объектив x100.
5. С помощью рукоятки **микровинта** (точная фокусировка), добиться резкости изображения, увеличить освещенность.
6. Перемещать препарат (с помощью препаратоводителя) **ШАГОВЫМ МЕТОДОМ**:
 - а) вверх на (3-5-7) полей зрения до верхнего края мазка, в каждом из них подсчитываются клетки крови;
 - б) шаг в сторону от «щеточки» (на 2-3 поля зрения) по направлению к середине мазка;
 - в) шаг вниз до нижнего края мазка;
 - г) шаг в сторону и т.д. до тех пор, пока не будет сосчитано 200 клеток.



БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ