**ЛЕКЦИЯ 2**

**Достижения цитологии и гистологии в ХХ и ХХI веках**

*Микроскопические методы исследования. Оптическая микроскопия. Электронная микроскопия. Атомно-силовая и туннельная микроскопия. Другие виды микроскопии. Витальное изучение клеток.*

**Микроскопия** – общее название методов получения сильно увеличенных изображений объектов, не различимых глазом человека. По признаку физической природы сигнала, с помощью которого осуществляют визуализацию малых объектов, различают. Наименьшее расстояние между двумя точками, начиная с которого их изображение сливаются, называют *пределом разрешения*. В табл. 1 приведены пределы разрешения приборов, реализующих разные типы микроскопии. В оптическом микроскопе реализовано свойство линзы или системы из двух линз давать увеличенные изображения предметов.

Таблица 1. Пределы разрешения микроскопов

|  |  |
| --- | --- |
| **Прибор** | **Предел разрешения (δ)** |
| Глаз человека | 0,1 мм |
| Микроскопы:– акустический– оптический– рентгеновский– электронный– ионный– сканирующий– атомно-силовой– сканирующий – туннельный | 0,5 мкм0,2 мкм50 нм0,15–0,3 нм0,2 нм0,1 нм0,001 нм |

**Оптическая микроскопия.** В оптическом микроскопе реализовано свойство линзы или системы из двух линз давать увеличенные изображения предметов. ***Методы световой микроскопии*** (освещения и наблюдения). Световая микроскопия обеспечивает увеличение до 2-3 тысяч раз, цветное и подвижное изображение живого объекта, возможность микрокиносъемки и длительного наблюдения одного и того же объекта, оценку его динамики и химизма.

Простой однолинзовый микроскоп (лупа с сильным увеличением) был известен в середине 15 в. Голландский ученый А. Левенгук (A. Leeuwenhoek) довел (1670-е годы) увеличение простого микроскопа до 300 крат и с его помощью открыл мир микроорганизмов. Изобретение более сложного микроскопа, состоящего из двух собирающих линз (1600 г.), связывают с именем голландца Г. Янсена (H. Janssen), а микроскопа, состоящего из собирательного объектива и рассеивающего окуляра (1610 г.) – Г. Галилея (G. Galilei). Разработка (1873 г.) немецким физиком Э. Аббе (E. Abbe) дифракционной теории образования изображений несамосветящихся объектов способствовала развитию микроскопических исследований.

Современные оптические микроскопы предназначены для рассматривания, изучения и измерения микроструктуры клеток, бактерий, срезов тканей, микрокристаллов, волокон, минералов, микросхем и других объектов, размеры которых (менее 0,1 мм) не позволяют наблюдать их невооруженным глазом. Микроскоп дает возможность различать структуры с расстоянием между элементами до 0,2 мкм. Обычно микроскоп имеет двухступенчатую систему увеличения, образованную объективом и окуляром, которая обеспечивает увеличение до 1500 крат. В оптическую схему микроскопа входит также узел освещения объекта.

*Принцип действия микроскопа* поясняет рис. 1, на котором представлена схема типичного микроскопа проходящего света. Объект *1* расположен на предметном столике *2* и освещен светом от лампы *3* и линзы-коллектора *4* (осветитель), направляемым на объект с помощью зеркала *5* и конденсора *6*. Полевая *7* (ограничивающая распространение света от лампы) и апертурная *8* диафрагмы (апертура – действующее отверстие оптического прибора, определяемое параметрами диафрагмы) служат для ограничения светового пучка и уменьшения рассеянного света.



**Рисунок 2.1 – Принципиальная оптическая схема микроскопа**

Изображение объекта увеличивается с помощью объектива *9* и окуляра *10*. Объектив создает действительное перевернутое и увеличенное изображение *1*′ объекта. Окуляр образует вторично увеличенное мнимое изображение *2*′′ объекта обычно на расстоянии *D* = 250 мм от глаза наблюдателя – так называемом расстоянии наилучшего видения. Окуляр можно сдвинуть так, чтобы изображение *1*′оказалось в фокальной плоскости – перед передним фокусом *F*ок окуляра. Тогда действительное изображение, даваемое окуляром, можно воспроизвести на экране или фотопленке. Способ получения такого изображения называют *микропроекцией*.

Основные характеристики микроскопа – увеличение, разрешающая способность и светосила.

*Увеличение объектива*, где Δ – расстояние между задним фокусом объектива (на рисунке не показан) и передним фокусом *F*ок окуляра (оптическая длина тубуса микроскопа), *f*об – фокусное расстояние объектива. Увеличение окуляра *Г*ок = 250/*f*ок, где *f*ок – фокусное расстояние окуляра. Общее увеличение оптического микроскопа .

*Увеличение микроскопа* определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. У типичных исследовательских микроскопов увеличение окуляра равно 10, а увеличение объективов – 10, 45 и 100. Соответственно, увеличение такого микроскопа составляет от 100 до 1000. Некоторые из микроскопов имеют увеличение до 2000. Еще более высокое увеличение не имеет смысла, так как при этом разрешающая способность не улучшается. Напротив, качество изображения ухудшается.

*Разрешающая способность* – величина, обратная предельному разрешению – наименьшему расстоянию, на котором два соседних элемента объекта могут быть видимы раздельно. Разрешающая способность оптического микроскопа ограничена дифракцией света. Для повышения разрешающей способности зазор между объектом *1* и объективом *9* заполняют жидкостью с большим показателем преломления – *иммерсионной жидкостью*. В качестве последней применяют воду (показатель преломления *n* = 1,33), водный раствор глицерина (*n* = 1,44), минеральное масло (*n* = 1,52), йодистый метилен (*n* = 1,74). Оптическая характеристика объектива – числовая *апертура*, где α – угол между крайними лучами конического пучка света, выходящего из точки объекта и попадающего в объектив (апертурный угол). Для несамосветящихся объектов предельное разрешение , где λ – длина волны света,  – числовая апертура конденсора *6*.

*Разрешающая способность* – это минимальное расстояние, на котором находятся две точки, демонстрируемые микроскопом раздельно. Разрешение человеческого глаза в режиме наилучшего видения равно 0.2 мм.

*Контраст изображения* – это различие яркостей изображения и фона. Если это различие составляет менее 3 - 4 %, то его невозможно уловить ни глазом, ни фотопластинкой; тогда изображение останется невидимым, даже если микроскоп разрешает его детали. На контраст влияют как свойства объекта, которые изменяют световой поток по сравнению с фоном, так и способности оптики уловить возникающие различия в свойствах луча.

*Светосила* – отношение освещенности изображения, создаваемого оптической системой, к яркости изображаемого объекта. Без учета потерь световой энергии на поглощение и отражение в оптической системе так называемая геометрическая светосила равна *С*=(*D*/*f*)2, где *D* – диаметр входного зрачка в полевой диафрагме *7*, *f* – фокусное расстояние микроскопа. Светосила пропорциональна квадрату синуса апертурного угла объектива оптической системы.

*Числовая апертура* используется для выражения разрешающей способности оптической системы или светосилы объектива.

*Светосила объектива* – интенсивность света, приходящаяся на единицу площади изображения, приблизительно равна квадрату NA. Величина NA составляет примерно 0,95 для хорошего объектива. Микроскоп обычно рассчитывают таким образом, чтобы его полное увеличение составляло около 1000 NA. Если между объективом и образцом ввести жидкость (масло, дистиллированную воду), то получится «иммерсионный» объектив с величиной NA, достигающей 1,4, и с соответствующим улучшением разрешения.

Возможности светового микроскопа ограничены волновой природой света. Физические свойства света – цвет (длина волны), яркость (амплитуда волны), фаза, плотность и направление распространения волны изменяются в зависимости от свойств объекта. Эти различия и используются в современных микроскопах для создания контраста.

**Электронная микроскопия.** Физические основы электронно-оптических приборов были заложены почти за сто лет до появления электронного микроскопа, в 1820-е годы ирландским математиком У. Гамильтоном (W. Gamilton). Он установил аналогию между прохождением световых лучей в оптически неоднородных средах и траекториями частиц в силовых полях. Технические предпосылки для разработки электронного микроскопа создал немецкий физик Х. Буш (H. Busch), исследовавший (1926 г.) фокусирующие свойства ассиметричных полей и разработавший магнитную электронную линзу. В 1928 г. немецкие физики М. Кнолль (M. Knoll) и Э. Руска (E. Ruska) приступили к созданию *магнитного просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ)* и через три года получили изображение микрообъекта, сформированное пучками электронов. Первые *растровые электронные микроскопы (РЭМ)* были построены в Германии (1938 г.) М. фон Арденне (M. von Ardenne) и в США (1942 г.) В.К. Зворыкиным.

РЭМ работают по принципу *сканирования* – управляемого (по определенному закону) пространственного перемещения пучка электронов (зонда) по объекту. Изображение последнего воссоздается по точкам в виде *растра* – совокупности однотипных элементов экрана, различным образом отражающих и поглощающих (или рассеивающих) излучение. К середине 1960-х годов РЭМ достигли высокого технического совершенства и с тех пор широко применяются в науке и технике. В 1980-х годах были разработаны модификации РЭМ – ***туннельный и атомно-силовой микроскопы***, сыгравшие решающую роль в развитии нанотехнологии.

***Методы электронной микроскопии*** соответствуют объектам исследования.

*Электронный микроскоп* – прибор, в котором для наблюдения и фотографирования многократно (до 106 раз) увеличенного изображения объекта вместо световых лучей используются пучки электронов, ускоренных до больших энергий (30–1000 кэВ) в условиях глубокого вакуума (давление до 10-5 Па).

В ПЭМ электроны с энергиями от 1 кэВ до 5 МэВ проходят сквозь объекты, имеющие вид тонких пленок, фольги, срезов толщиной
от 1 нм до 10 мкм, в том числе, пленок с нанесенными частицами (порошки, микрокристаллы, аэрозоли).

Структуру поверхностного слоя массивных образцов (толщина больше 1 мкм) изучают с помощью отражательных и зеркальных РЭМ. Для изучения поверхностей часто применяют ***метод реплик*:** с поверхности образца снимают копию-отпечаток в виде тонкой пленки углерода, коллодия (раствор пихтовой смолы) и др., которую рассматривают в ПЭМ вместо самого объекта. ***Метод* *декорирования*** состоит в напылении на поверхность образца тонкого слоя декорирующих частиц (атомы тяжелого металла с большим коэффициентом поверхностной диффузии, молекулы полупроводников или диэлектриков). Они осаждаются преимущественно на участках сосредоточения микрополей. Затем снимают реплику с включениями декорирующих частиц. Ее рассмотрение с помощью электронного микроскопа позволяет зарегистрировать дислокации, скопления точечных дефектов, ступени роста кристаллических граней, доменную структуру.

Самым распространенным типом приборов в электронной микроскопии является *РЭМ с термоэмиссионной пушкой.* Линейное разрешение РЭМ зависит от электронной яркости пушки и составляет 1–5 нм. При помощи нескольких электронных линз на поверхность образца фокусируют узкий электронный зонд. Магнитные отклоняющие катушки обусловливают сканирование зонда по заданной площади на объекте. При взаимодействии зонда и объекта возникает несколько видов излучения. Любое из них, а также потоки электронов, прошедших сквозь объект и поглощенных им, или напряжение, наведенное на объекте, можно регистрировать и с помощью соответствующих детекторов преобразовывать в электрические сигналы. Последние после усиления подают на электронно-лучевую трубку и развертывают ее электронный пучок синхронно с разверткой электронного зонда в РЭМ, получая на экране трубки увеличенное изображение объекта. С помощью РЭМ, оснащенного рентгеновскими спектрометрами, можно проводить локальный количественный химический анализ объекта.

*Растровый оже-электронный* микроскоп позволяет при сканировании электронного зонда детектировать оже-электроны из поверхностного слоя (0,1–2,0 нм) объекта. Прибор работает при сверхвысоком вакууме (10-7–10-8 Па). Для исследования глубинной структуры объекта он оснащен ионной пушкой, с помощью которой верхние слои объекта удаляют методом ионно-лучевого травления.

*Эмиссионный* электронный микроскоп создает изображение объекта электронами, которые эмитируются из него при нагревании, бомбардировке первичным пучком электронов, при воздействии электромагнитного излучения или сильного электрического поля. Этот микроскоп имеет узкое целевое назначение.

*Зеркальный* электронный микроскоп разработан для визуализации электростатических «потенциальных рельефов» и магнитных микрополей на поверхности объекта. Основным элементом прибора является *электронное зеркало* – электрическая или магнитная система, отражающая пучки электронов с целью изменения направления их движения и получения электронно-оптического изображения объекта «в отраженных лучах».

Наибольшего увеличения и разрешения на сегодняшний день можно добиться с помощью технологии ***трансмиссивной, или просвечивающей электронной микроскопии (ТЭМ) высокого разрешения***. Она заключается в пропускании сфокусированного электронного пучка сквозь тонкий образец (наноразмерный кристаллит неорганического вещества, углеродные нанотрубки, фуллерены и т.д.). С помощью просвечивающего микроскопа и математического аппарата преобразования сигнала можно видеть отдельные атомы, образующие кристаллическую решетку просвечиваемого твердого тела и рассчитывать его параметры.

ТЭМ позволяет наблюдать простые и сложные органические молекулы напрямую с помощью микроскопа, не используя более сложные методы ядерного магнитного резонанса и рентгеновской дифракции. Кроме того**,** взаимодействие этих молекул на поверхности и с поверхностью можно наблюдать в динамике.

Жидкие и влажные биологические объекты, неустойчивые к действию высокого вакуума, изучают с помощью так называемых газовых микрокамер – приставок к ПЭМ и РЭМ.

**Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ).** Первыми устройствами, с помощью которых стало возможным наблюдать за нанообъектами и передвигать их, стали ***сканирующие зондовые микроскопы*** *–* ***атомно-силовой микроскоп*** и работающий по аналогичному принципу ***сканирующий туннельный микроскоп.***

Сканирующий зондовый микроскоп – это инструмент со множеством возможностей. С его помощью можно строить реальные трехмерные изображения с широким динамическим диапазоном, охватывающим традиционные «сферы деятельности» оптических и электронных микроскопов Основой атомно-силового микроскопа (АСМ) служит зонд, обычно сделанный из кремния и представляющий собой тонкую пластинку-консоль (ее называют *кантилевером*, от английского слова *«cantilever»* - консоль, балка). На конце кантилевера (длина ≈ 500 мкм, ширина ≈ 50 мкм, толщина ≈ 1 мкм) расположен очень острый шип (длина ≈ 10 мкм, радиус закругления от 1 до 10 нм), оканчивающийся группой из одного или нескольких атомов. При перемещении микрозонда вдоль поверхности образца острие шипа приподнимается и опускается, очерчивая микрорельеф поверхности, подобно тому, как скользит по грампластинке патефонная игла. На выступающем конце кантилевера расположена зеркальная площадка, на которую падает и от которой отражается луч лазера. Когда шип опускается и поднимается на неровностях поверхности, отраженный луч отклоняется, и это отклонение регистрируется фотодетектором, а сила, с которой шип притягивается к близлежащим атомам – пьезодатчиком. Данные фотодетектора и пьезодатчика используются в системе обратной связи, которая может обеспечивать, например, постоянную величину силу взаимодействия между микрозондом и поверхностью образца. В результате, можно строить объёмный рельеф поверхности образца в режиме реального времени. Разрешающая способность АСМ метода составляет примерно 0,1–1 нм по горизонтали и 0,01 нм по вертикали.

Сканирующий туннельный микроскоп (СТМ) изобрели (1982 г.) Нобелевские лауреаты (1986 г.) немецкий физик Г. Биннинг (G. Binning) и швейцарский – Х. Рорер (H. Rohrer). СТМ предназначен для изучения поверхности твердых электропроводящих тел путем сканирования острия металлической иглы над поверхностью образца на расстоянии 0,5–1,0 нм. Между иглой и образцом создают разность потенциалов *V* (от мВ до В), что обусловливает туннелирование электронов и протекание через зазор туннельного тока (*i* ≈ 1–10 нА). Прибор оснащен системой обратной связи, которая поддерживает ток постоянным путем регулирования величины зазора. Синхронная со сканированием запись сигнала обратной связи позволяет воспроизвести увеличенное объемное изображение профиля поверхности, если работа выхода электронов одинакова по всей поверхности образца. Система с обратной связью позволяет регистрировать также распределение работы выхода по площади участка сканирования (рисунок 2).



**Рисунок 2.2 – Схема работы сканирующего туннельного микроскопа**

СТМ можно использовать и для перемещения какого-либо атома в точку, выбранную оператором и таким образом манипулировать атомами и создавать наноструктуры. СТМ применяют для изучения атомного строения металлов, полупроводников и сверхпроводящих структур, явлений адсорбции и химических процессов, протекающих на поверхности конденсированных тел, структуры молекул, строения биологических объектов, для контроля технологических процессов микроэлектроники, нанесения тонких покрытий и обработки поверхностей.

Принципиальным отличием сканирующего атомно-силового от сканирующего туннельного микроскопа является то, что в первом стабилизируется деформация чувствительного элемента, а не туннельный ток между иглой и образцом. В отличие от туннельного атомно-силовой микроскоп позволяет изучать (с атомным разрешением) поверхности не только проводящих, но и диэлектрических твердых тел. Технология АСМ и СТМ известны как ***нанолитография.***

С помощью ***сканирующей термальной микроскопии*** *(****СТерМ)*** можно визуализировать локальные вариации теплофизических параметров поверхностей. Данная методика реализуется за счет использования терморезистивного зонда, работающего в одном из двух режимов – постоянного тока или постоянной температуры.

***Близкопольная сканирующая оптическая микроскопия******(БСОМ)*** является особой разновидностью сканирующей зондовой технологии, в которой используется видимый свет. Традиционно разрешение оптических микроскопов ограничено длиной волны света – примерно половиной микрона. БСОМ улучшает разрешение оптического микроскопа на порядок.

Зондом в БСОМ является «световая воронка», которой сканируют образец. Видимый свет исходит из узкого конца световой воронки диаметром 10–30 нм и попадает на детектор либо после отражения от образца, либо пройдя сквозь него. Интенсивность оптического сигнала регистрируется детектором в каждой точке измерений, а набор данных, считанных со всей сканируемой поверхности, составляет БСОМ-образ. С помощью БСОМ можно формировать изображение поверхности в видимом свете с разрешением около 15 нм при условии, что расстояние между источником света и образцом очень мало ≈ 5 нм.

Одним из перспективных направлений развития СЗМ методик является их адаптация к получению информации о одповерхностном наностроении материалов. В случае, когда многократно повторяемое сканирование сочетается с послойным удалением материала в зоне измерения и последующим восстановлением пространственной картины структуры материала, речь идет о методе разрушающей ***СЗМ нанотомографии*.**

В настоящее время методы сканирующей зондовой микроскопии начинают применяться для создания абсолютно новых носителей информации.

**Другие методы микроскопии.** Все микроскопы аналогичны по принципу действия, заключающемуся в направлении пучка излучения на объект, регистрации сигнала, возникшего при их взаимодействии, и его обработке с целью получения увеличенного изображения объекта. Разные типы микроскопов принципиально отличаются по физической природе применяемого излучения. Кроме самых распространенных оптических и электронных микроскопов, для изучения конденсированных тел применяют ионные и акустические микроскопы, а также рентгеновские.

*Ионный микроскоп* – ионно-оптический прибор, в котором для получения изображений используется *ионный пучок*, движущийся со скоростью, значительно превышающей скорости хаотического движения ионов.

*Акустическая микроскопия* – совокупность методов визуализации микроструктуры твердых тел и формы малых объектов с помощью УЗ- и гиперзвуковых волн. УЗ-волны, прошедшие через объект, отраженные от него или рассеянные отдельными его участками, изменяют свои параметры (амплитуду, фазу, частоту) в зависимости от вязкоупругих свойств разных участков образца. С помощью методов *визуализации звуковых полей*, т.е. методов получения видимой картины распределения параметров звукового поля, воспроизводят изображение образца на экране дисплея. По этому признаку различают лазерную и растровую акустическую микроскопию.

*Сканирующая лазерная акустическая микроскопия* представляет собой разновидность *акустической голографии* – интерференционного метода записи, воспроизведения и преобразования звуковых полей. Объект помещают в жидкость и облучают плоской УЗ-волной.

В *сканирующем растровом акустическом микроскопе* сфокусированный УЗ-пучок перемещают по объекту, изображение которого воссоздается по точкам в виде растра. Сфокусированная волна, падая на объект, частично отражается от него, поглощается и рассеивается в нем, а частично проходит через объект.

*Рентгеновская микроскопия* — совокупность методов исследования микроскопического строения вещества с помощью рентгеновского излучения. В рентгеновской микроскопии используют специальные приборы ­ рентгеновские микроскопы. Разрешающая способность достигает 100 нм, что в 2 раза выше, чем у оптических микроскопов (200нм).

**Витальное изучение клеток.** Световой микроскоп позволяет видеть живые клетки. Для изучения же живых клеток, органов, тканей используют ряд методов.

Метод культуры тканей был разработан Гаррисоном, Каррелем, Берроузом, А.А. Максимовым. Суть метода: в камеру, наполненную питательной средой, помещают небольшой кусочек живой ткани. Через некоторое время на периферии такого кусочка начинается деление и рост клеток. В другом случае – вырезанный кусочек ткани обрабатывают раствором фермента, что приводит к полному разобщению клеток друг от друга. Затем взвесь отмытых клеток помещают в сосуд с питательной средой, где они опускаются на дно, прикрепляются к стеклу, начинают размножаться, образуя сначала колонию, а затем сплошной клеточный пласт.

Микрохирургия позволяет с помощью специальных микроманипуляторов выполнять различные операции на клетке и ее органоидах. С помощью микроманипулятора клетки разрезают, извлекают из них части, вводят вещества (микроинъекции) и т.д. Микроманипулятор совмещают с обычным микроскопом, в который наблюдают за ходом операции. При микроманипуляциях клетки помещают в специальные камеры, в которых и делается операция. Широко применяют микропучки УФ-света или лазерные микропучки.

 Прижизненное окрашивание – окрашивание живых клеток витальными красителями в диапазоне концентраций, не вызывающих токсического эффекта, широко используется в цитологии и гистологии. По своему химическому строению витальные красители относятся к органическим соединениям ароматического ряда. Они представляют собой электролиты, которые могут быть разделены на кислотные и основные. Большинство из них являются индикаторными. На этом основано их применение для определения концентрации водородных ионов. Многие витальные красители могут легко переходить из окисленной формы в восстановленную и обратно. Это используют для определения уровня окислительно-восстановительных процессов в клетке. При окрашивании клеток витальными красителями последние проникают в клетку, собираются в цитоплазме в виде гранул, ядро не окрашивается. Большая часть сведений о клетке была получена на стабильном фиксированном материале.

 Задачи фиксации – убить клетку, прекратить активность внутриклеточных ферментов, предотвратить распад клеточных компонентов, избежать потери структур и веществ, препятствовать появлению артефактных структур. Химическая фиксация заключается в быстрой обработке ткани растворами с целью убить клетки, сохранив их структуру по возможности неизменными. Леофилизация ткани, при которой происходит быстрое замораживание ткани при температуре жидкого азота, затем высушивание в вакууме, позволяет избежать многих недостатков химической фиксации, обеспечивает мгновенную остановку всех процессов жизнедеятельности. Окрашивание позволяет выявить большинство клеточных органоидов и структур. Применяют натуральные и синтетические красители. Натуральные красители употребляют в сочетании с протравами (окислы различных металлов), с которыми они образуют комплексные соединения. Синтетические красители бывают кислые и основные. В зависимости от этого они могут окрашивать различные участки клеток в разные цвета и тем самым повышать контрастность клеточных и внеклеточных компонентов.

Имеется ряд специфических приемов окрашивания, с помощью которых можно определить специфические химические вещества: белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липиды, аминокислоты и т.д. Это цитохимические методы. Существует целая группа цитохимических реакций, связанная с обнаружением ферментов.

 ***Цитофотометрия*** позволяет определить количество вещества в клетке и их составных элементов по поглощению ими световых лучей определенной длины волны. Этот метод дает возможность измерять или собственное поглощение лучей химическими компонентами клетки, или количество красителя, образовавшегося в ходе цитохимической реакции в данном месте клетки. Важно, чтобы данная реакция носила количественный характер, т.е. количество окрашиваемого продукта было бы пропорционально количеству определяемого вещества.

*D* = lg*T*0 / *T*,

где *D* – оптическая плотность структуры; *T*0 – количество света, прошедшего через пустое место препарата; *T* – количество света, прошедшего через поглощающую структуру.

 Для определения концентрации вещества используют микроскопы-цитофотометры; для определения нуклеиновых кислот и белков – ультрафиолетовуюцитометрию; применяют также иммунохимические реакции с использованием флуоресцирующих антител.

 ***Авторадиография – регистрация веществ, меченых изотопами****.* Используется фотографическая регистрация излучения изотопов. С помощью этого метода можно проследить динамику различных биосинтезов в конкретных морфологических структурах, определить длительность существования веществ цитоплазмы в неизменном виде, он используется для определения расположения определенных типов нуклеиновых кислот или отдельных нуклеотидных последовательностей в составе клеточных ядер или хромосом. Суть метода – обнаружение маркированных искусственным изотопом молекул с помощью фотоэмульсии, которой покрываются срезы клеток и тканей, фиксированных в разные сроки после введения меченого предшественника. Контрастирование корпускулярных объектов широко применяется для контрастирования вирусов, рибосом, молекул нуклеиновых кислот. Одним из распространенных методов является оттенение металлами. Для контрастирования оттенением используются платина, палладий, их сплавы, уран. При негативном контрастировании объектов растворами солей тяжелых металлов применяют молибденовокислый аммоний, уранилацетат, фосфорно-вольфрамовую кислоту. Соли тяжелых металлов используют при позитивном контрастировании.

 ***Ультрамикротомия*** позволяет получать ультратонкие срезы (0,05 – 0,10 мкм).

 ***Специальные методы электронной микроскопии биологических объектов****.* Одним из распространенных, ставшим классическим методом, применяемом при структурно-биохимических исследованиях, является метод электронной микроскопии в различных его модификациях. Эти модификации обусловлены как различными подходами к анализу изучаемых структур, так и особенностями подготовки клеток для ультраструктурных исследований.

Трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия позволяет анализировать не только все органоиды ядерного и цитоплазматического аппаратов, но и некоторые структуры, находящиеся на надмолекулярном уровне организации, например: опорные и сократительные микрофибриллы, микротрубочки и т.д.

 ***Метод высоковольтной электронной*** микроскопии применяют на системном и субсистемном уровнях организации. Данный метод позволяет изучать «толстые» срезы или даже целые распластанные клетки, что дает возможность анализировать в целом сложную систему субмембранных фибрилл поверхностного аппарата клетки.

 ***Метод сканирующей электронной*** микроскопии используется в исследовании функции поверхностного аппарата клетки, взаимосвязи отдельных субсистем поверхностного аппарата ядра и ряда других вопросов общей цитологии. Этот метод дает возможность объемного изучения поверхности объекта. Большое значение в цитологических исследованиях имеет *метод замораживания* – скалывания. Это щадящий метод подготовки биологических объектов для ультраструктурного анализа. Суть метода: объект помещают в атмосферу жидкого азота. Моментально прекращаются все метаболические процессы. С замороженного объекта делают сколы. С поверхности сколов получают реплики путем нанесения на них металлической пленки. Эти пленки в дальнейшем исследуют под микроскопом.

**Вопросы для самоконтроля**

1. Какова разрешающая способность современных микроскопов?

2. Какой принцип действия микроскопа? 3. С помощью какого метода исследования можно строить реальные трехмерные изображения с широким динамическим диапазоном? 4. Какие методы изучения клетки относят в витальным? 5. Какой методпозволяет определить количество вещества в клетке и их составных элементов по поглощению ими световых лучей определенной длины волны? 6. В чем суть метода авторадиографии? 7. В каких случаях используют методы высоковольтной и сканирующей электронной микроскопии ?