

Histologia

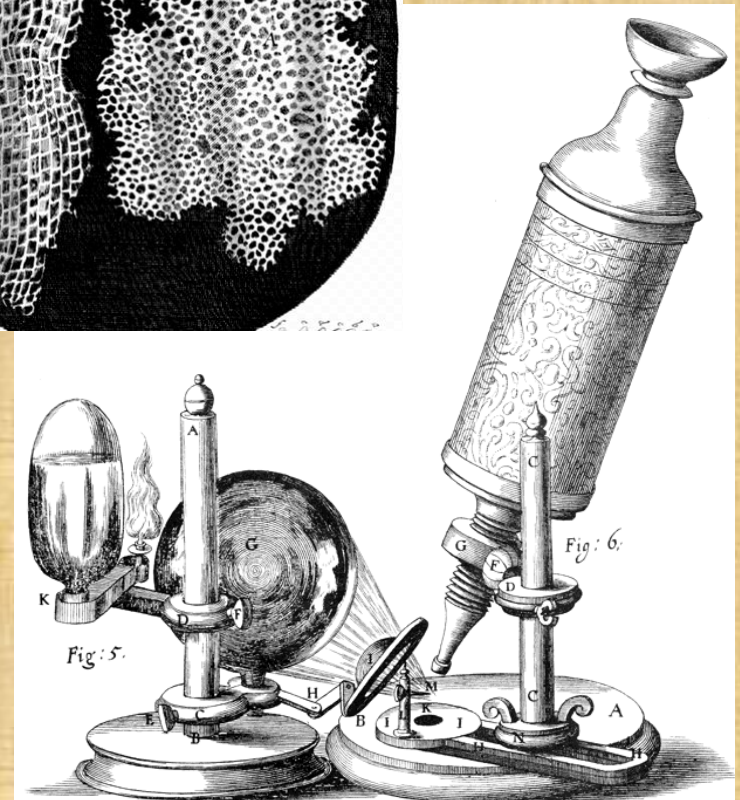
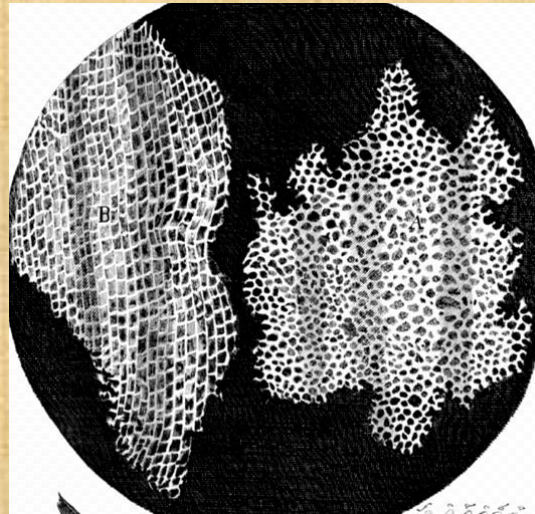
*Mikroskopowa budowa narządów,
tkanek i komórek*

*Budowa i funkcjonowanie zespołów
komórek, czyli tkanek*

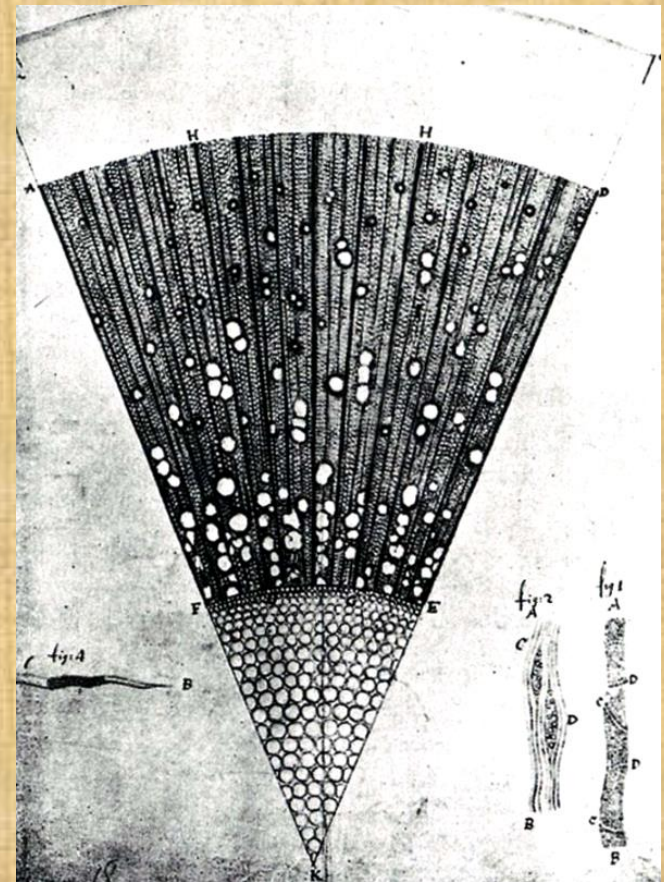
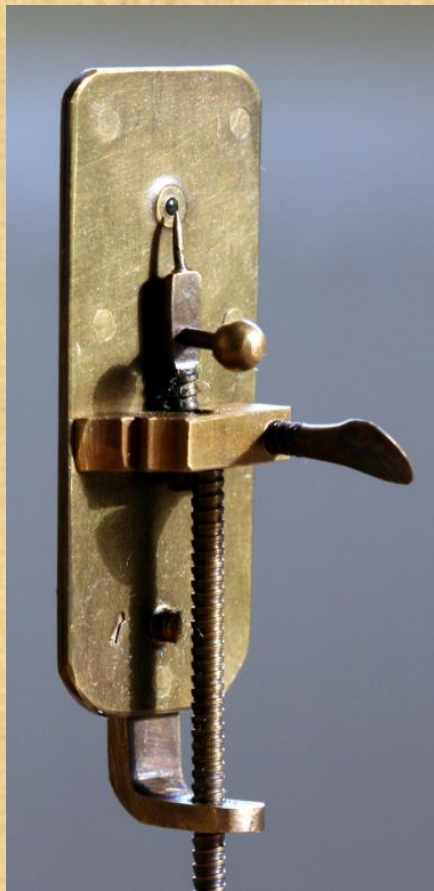
Główne zagadnienia

1. Budowa i podstawy działania mikroskopu optycznego
2. Podstawy i główne etapy techniki histologicznej
3. Wybrane przykłady kształtów komórek
4. Wybrane modyfikacje mikroskopu optycznego

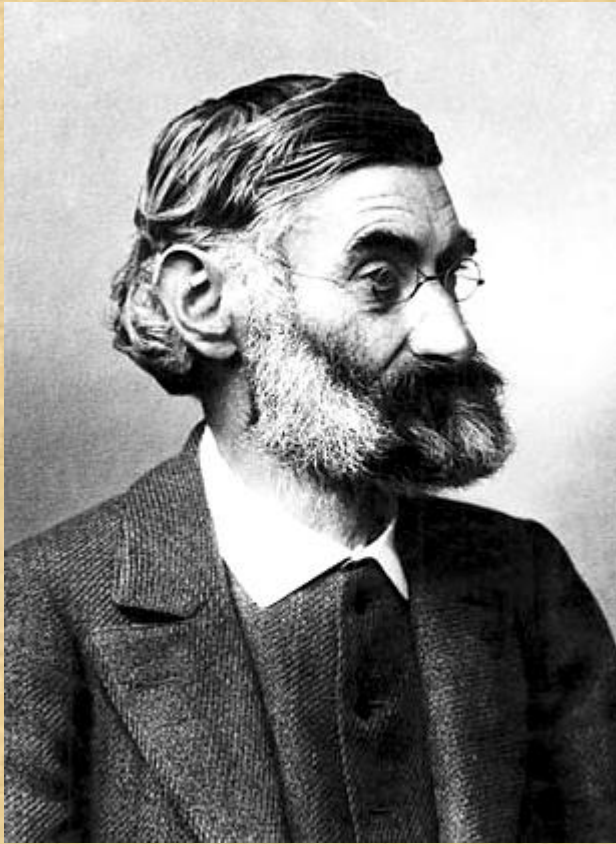
1665 - **Robert Hook** - budowa mikroskopu
wielosoczewkowego - pierwsze obserwacje
tkanek roślinnych (powiększenie ok. 50x)



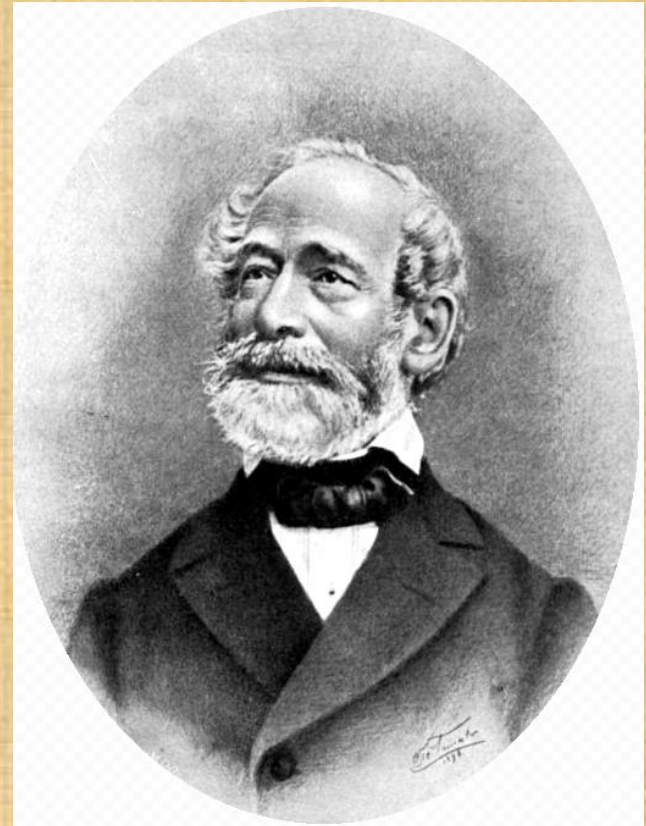
1677 - **Antoni van Leeuwenhoek** - budowa
mikroskopu jednosoczewkowego
(powiększenie ok. 270-300x)



1872 - **Ernst Abbe** - udoskonalenie budowy mikroskopu, opracowanie matematyczno-fizycznych zasad jego działania



Karl Zeiss



Mikroskop optyczny



Mikroskop optyczny

- główne elementy budowy



Obiektyw mikroskopu optycznego

- główne parametry

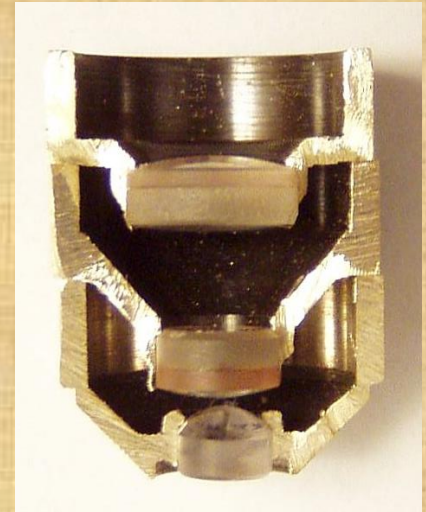


Powiększenie

10/0.25

160/0.17

Długość
tubusa



Apertura
numeryczna

Grubość
szkiełka
nakrywkowego

Mikroskop optyczny

- główne parametry

Powiększenie

$$P = P_{ok} * P_{ob}$$

**Zdolność
rozdzielcza**

$$\alpha = \lambda / 2A$$

**Apertura
numeryczna**

$$A = n * \sin\varphi$$



**Zdolność
rozdzielcza**

$$\alpha = \lambda / 2A$$

**Apertura
numeryczna**

$$A = n * \sin \varphi$$

$$\alpha = \frac{\lambda}{2(n * \sin \varphi)}$$

Powietrze - $n = 1,00$

Woda dest. - $n = 1,33$

Olej parafinowy - $n = 1,48$

Olejek cedrowy - $n = 1,52$

Mikroskop optyczny

- podstawowe parametry

**Zdolność
rozdzielcza**
 $\alpha = \lambda / 2A$

$\lambda = 500 \text{ nm}$



360 nm

720 nm

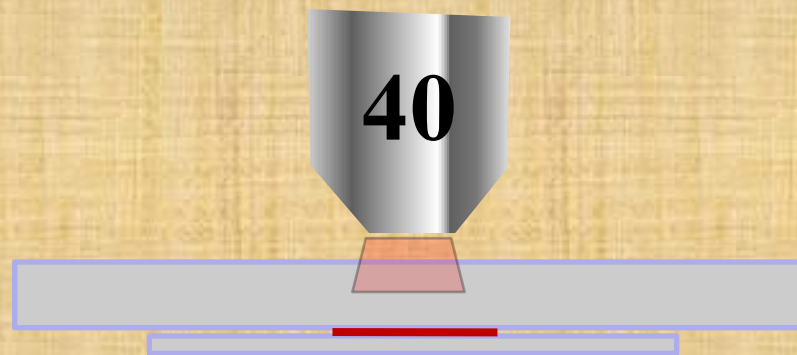
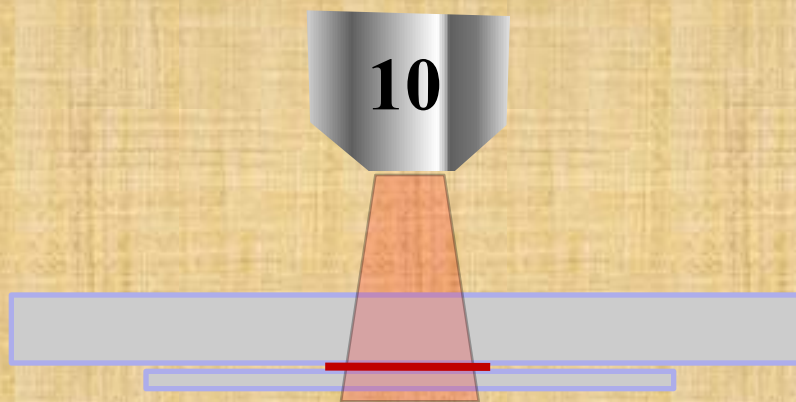
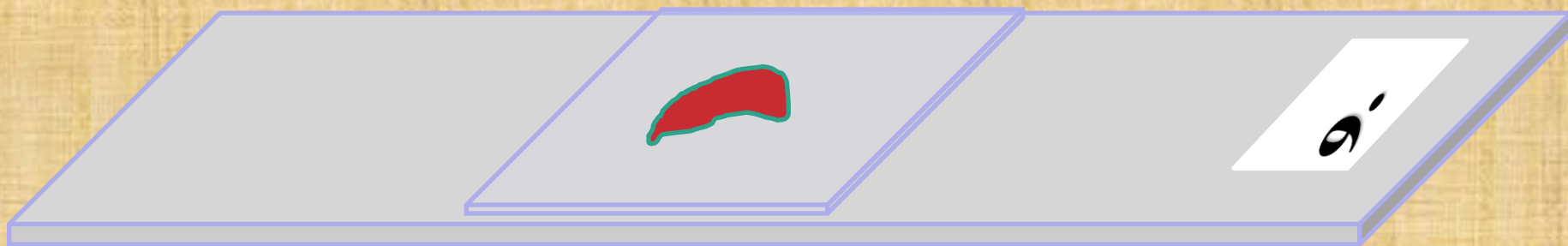
10x - $A=0,25$; $\alpha=1000 \text{ nm}$
40x - $A=0,65$; $\alpha=385 \text{ nm}$
100x - $A=1,25$; $\alpha=200 \text{ nm}$



Warto zapamiętać:

1. Im większe powiększenie, tym ciemniejszy obraz - otwórz przestonę i/lub podnieś kondensor !!!
2. Im większe powiększenie, tym mniejsza odległość robocza - uważaj, żeby nie uszkodzić preparatu !!!
3. Im większe powiększenie, tym mniejsza głębina ostrości - sprawdź orientację preparatu !!!

Częsta przyczyna problemu z ostrością obrazu...



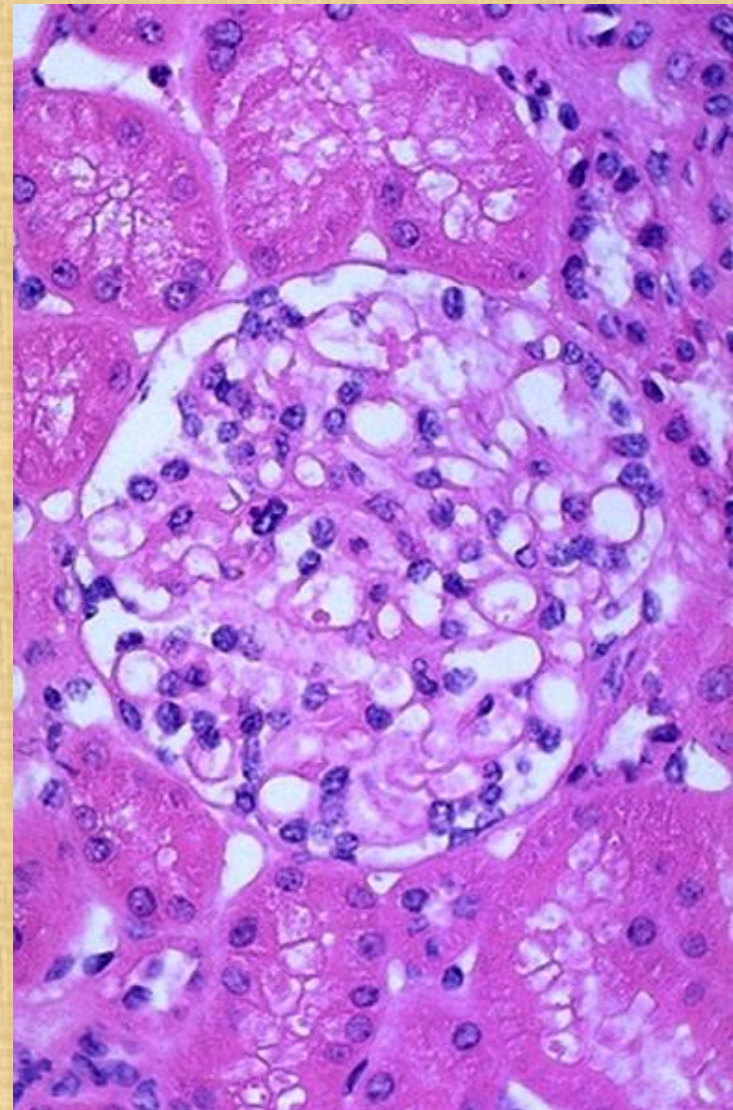
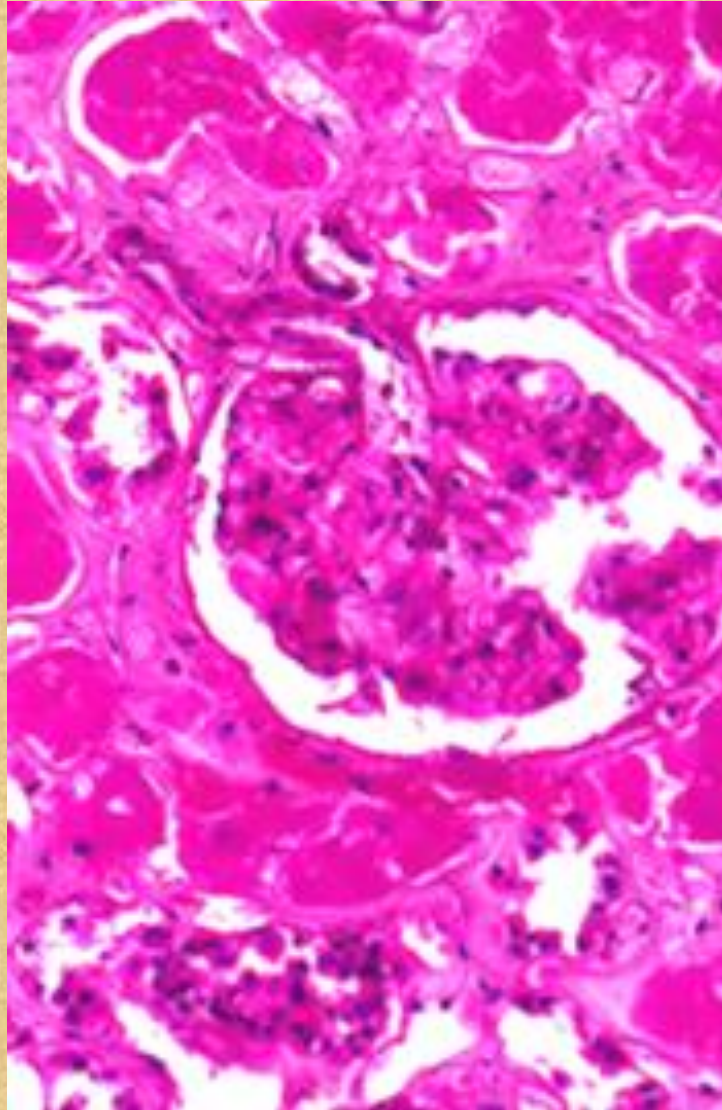
Podstawy techniki histologicznej

Preparat do mikroskopu świetlnego:

1. powinien być przezierny dla światła - jednorodnej grubości i wystarczająco **cienki** (skrawek $< 20 \mu\text{m}$ lub rozmaz)
2. powinien być odpowiednio **zkontrastowany** (rutynowe barwienie histologiczne HE, techniki specjalne - immunofluorescencja, immunohistochemia)
3. powinien być zabezpieczony przed zniszczeniem - **utrwalony** (procesy gnilne, uszkodzenie mechaniczne)

Podstawy techniki histologicznej

Po co utrwalamy preparat?



Utrwalanie

Metody fizyczne

- ogrzewanie (mikrofale)
- mrożenie (ciekły azot, suchy lód)

Metody chemiczne

- aldehyd mrówkowy (formaldehyd/formalina)
- aldehyd glutarowy
- alkohol etylowy
- sole metali ciężkich

Główne etapy przygotowania preparatu

Rozmaz (płyn, wymaz, BAC)

1. Naniesienie na szkiełko
2. Utrwalenie
3. Barwienie

Materiał mrożony (wycinek, bioptat)

1. Mrożenie
2. Krojenie na kriostacie
3. Naniesienie na szkiełko
4. Barwienie

Materiał tkankowy lity (wycinek, bioptat)

1. Utrwalenie
2. Odwodnienie
3. Zatopienie w parafinie
4. Krojenie na mikrotomie
5. Naniesienie na szkiełko
6. Odparafinowanie/uwodnienie
7. Barwienie

Formaldehyd

Woda

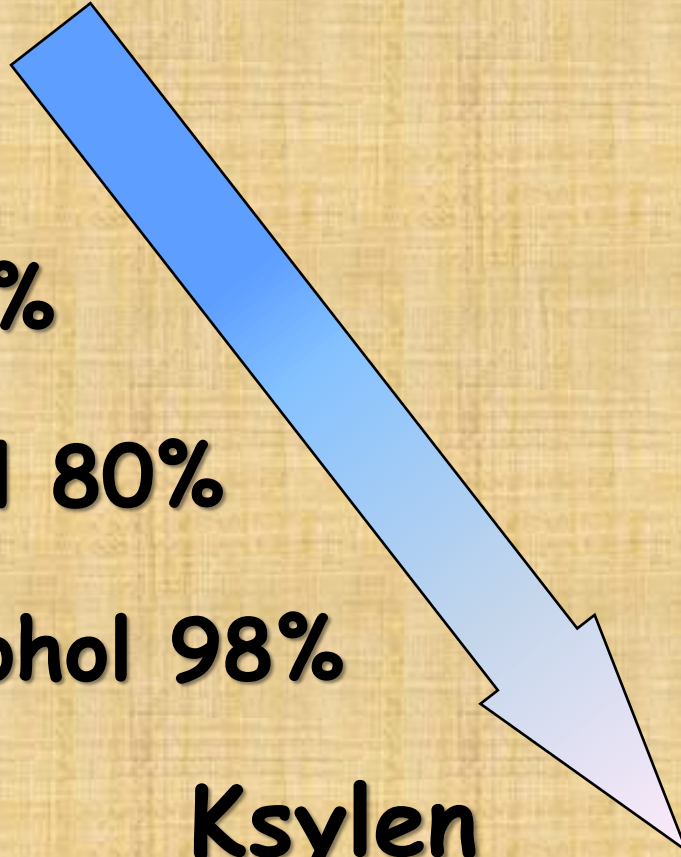
Alkohol 70%

Alkohol 80%

Alkohol 98%

Ksylen

Parafina



Główne etapy przygotowania preparatu



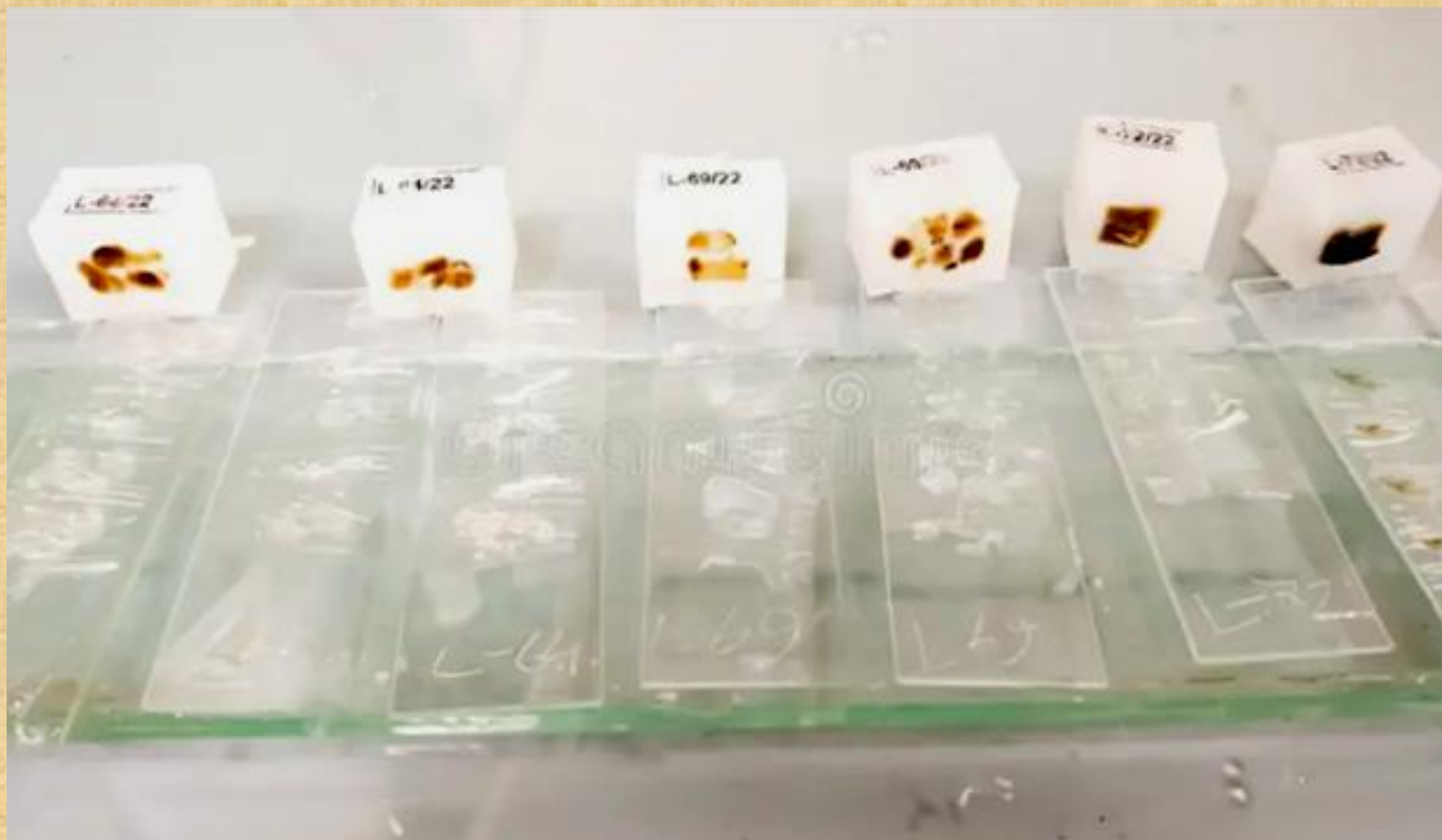
Przygotowanie bloczków parafinowych

Główne etapy przygotowania preparatu



Krojenie bloczków na mikrotomie

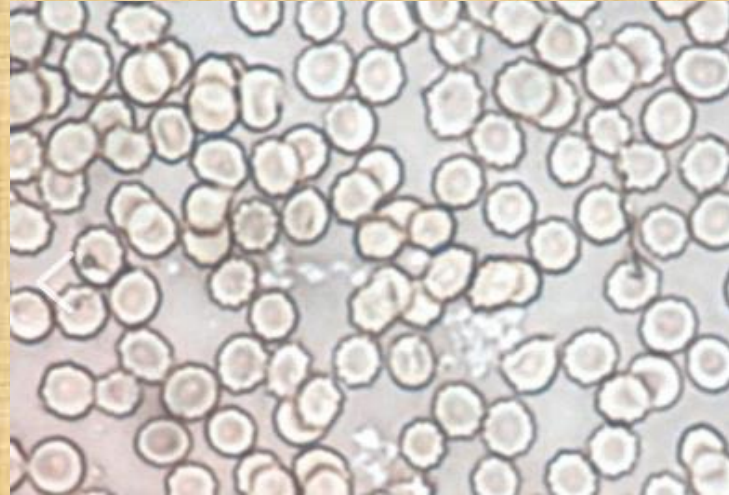
Główne etapy przygotowania preparatu



Nałożenie skrawków na szkiełko podstawowe

Podstawy techniki histologicznej

Po co barwimy preparat?



Barwniki

Woda

Alkohol 70%

Alkohol 80%

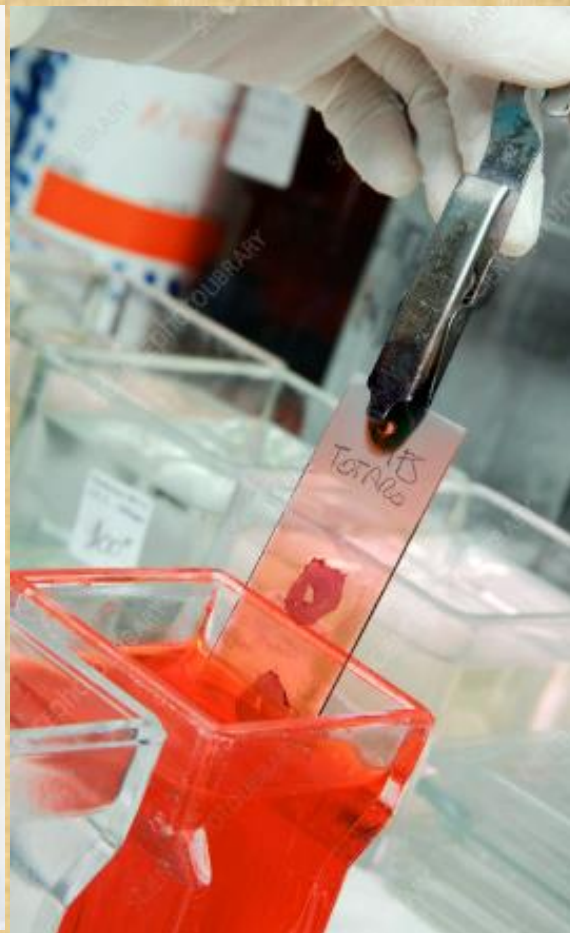
Alkohol 98%

Ksylen

Parafina



Główne etapy przygotowania preparatu



Barwienie skrawków

Hematoksylina
Eozyna

Czerwień jądrowa

Orceina

Oranż akrydyny

Leukofuksyna

Fiolet krystaliczny

Błękit trypanu

Błękit toluidyny

Fluoresceina

Fikoerytryna

Fikocjanina

Hematoksylina (Zasada)



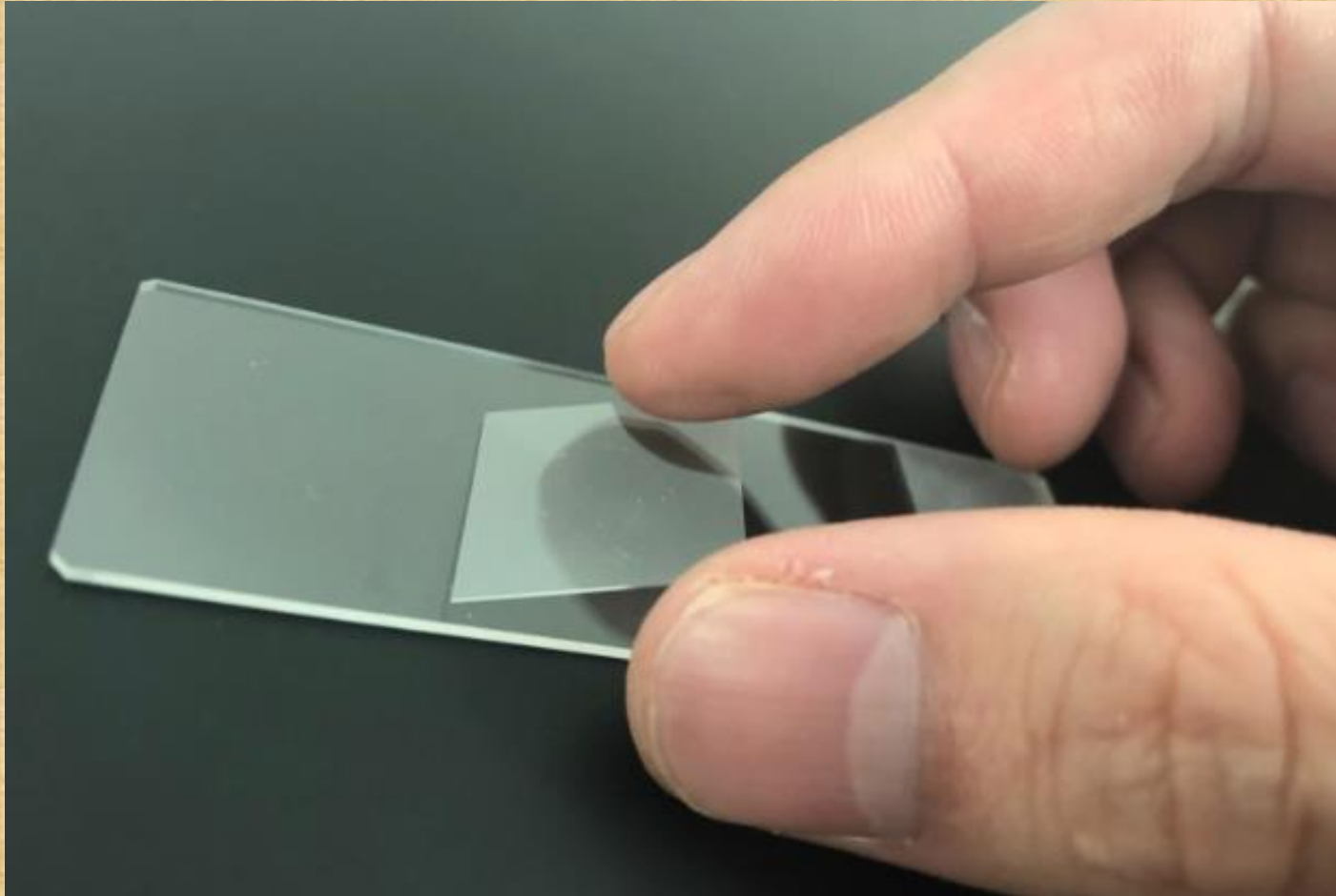
Kwaśny substrat
komórkowy (np. DNA) (Zasadochłonny
= bazofilny)

Eozyna (Kwas)



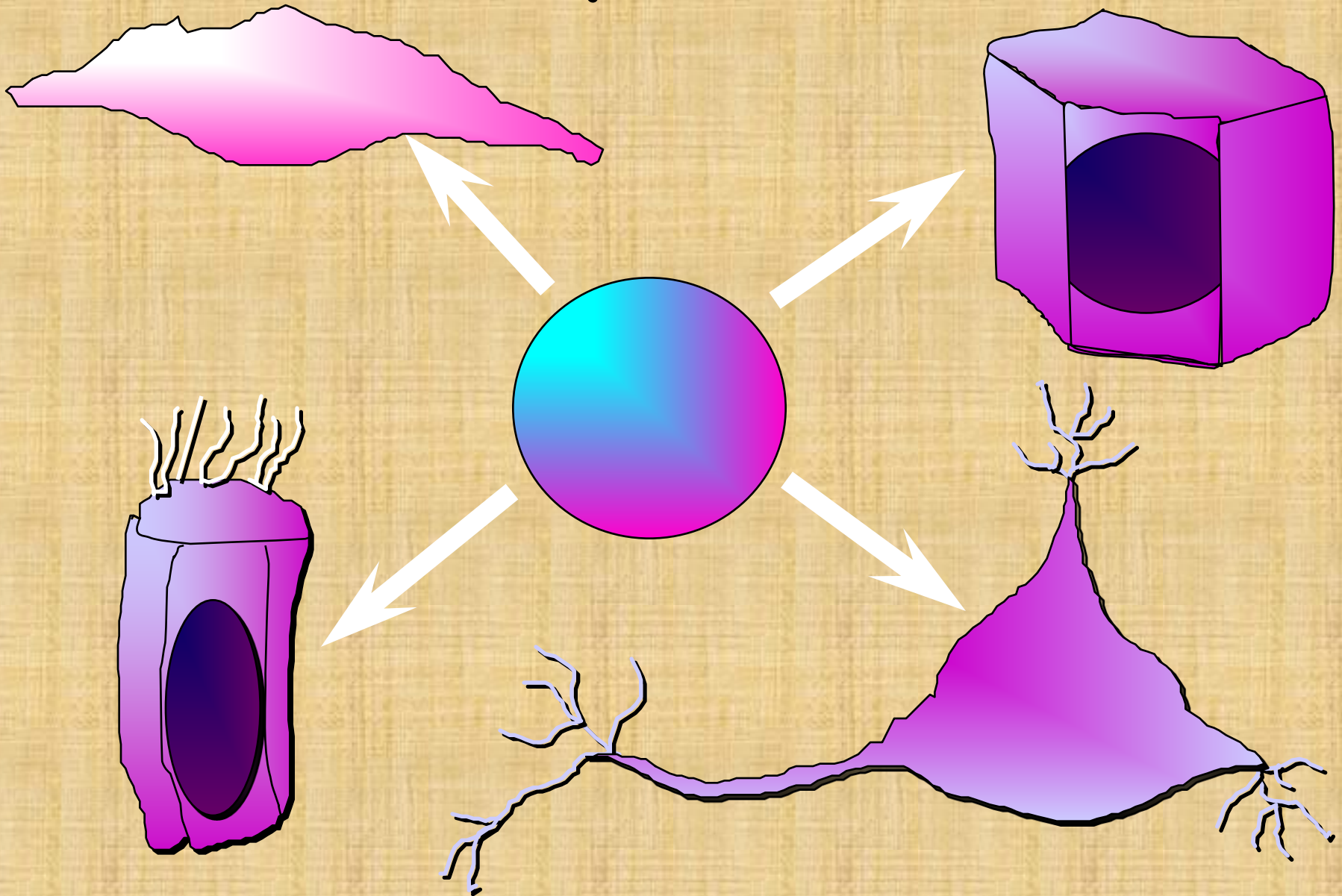
Zasadowy substrat
komórkowy (np. białka cytoplazmy) (Kwasochłonny
= eozynofilny)

Główne etapy przygotowania preparatu

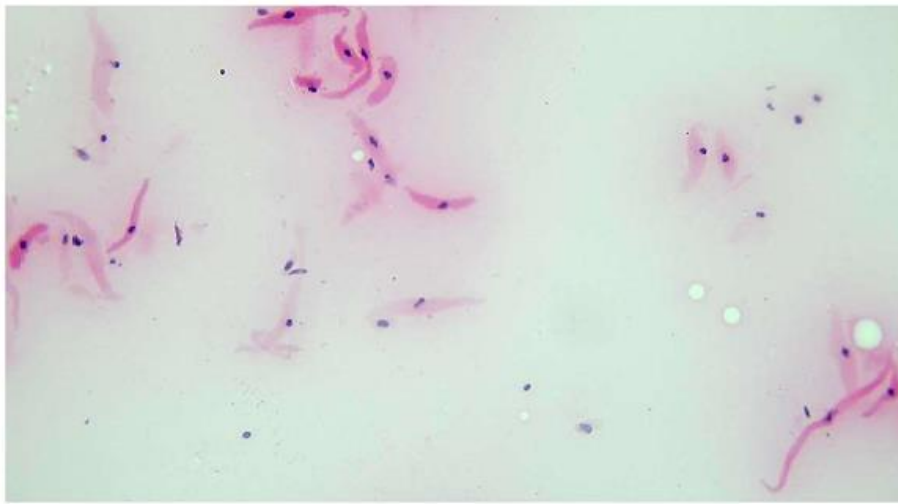
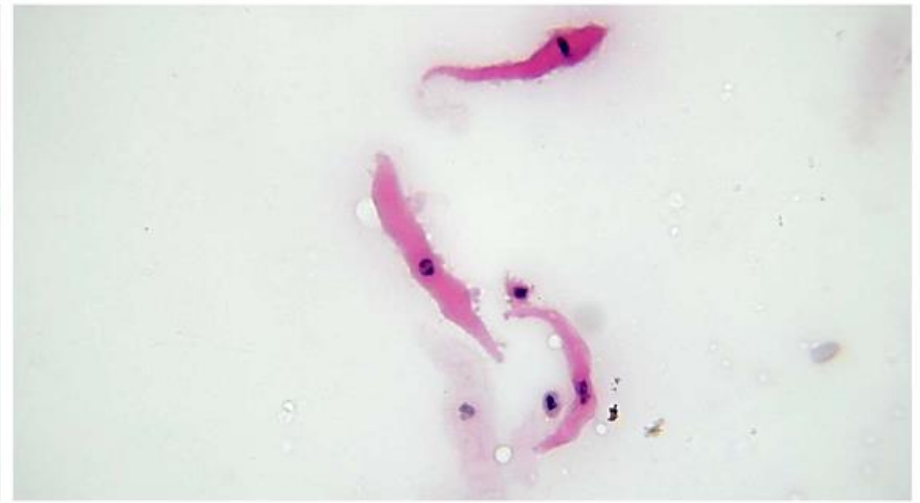
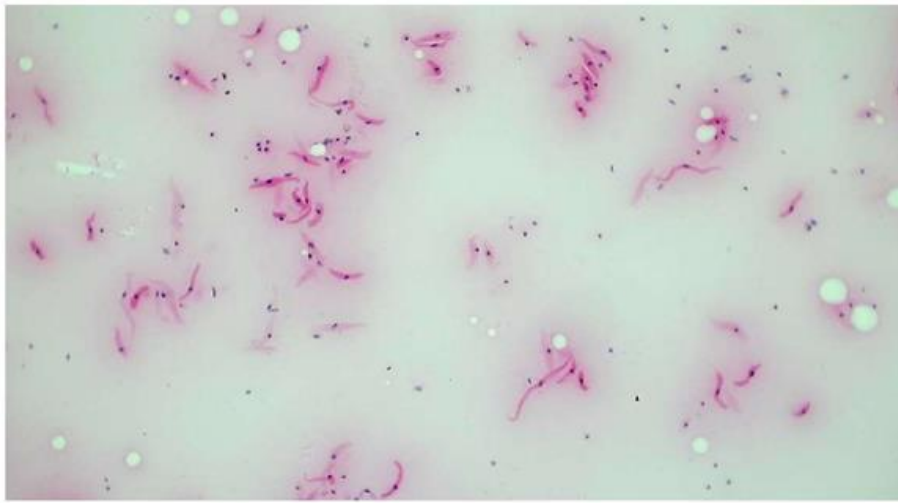


Zamykanie preparatu szkiełkiem nakrywkowym

Kształty komórek

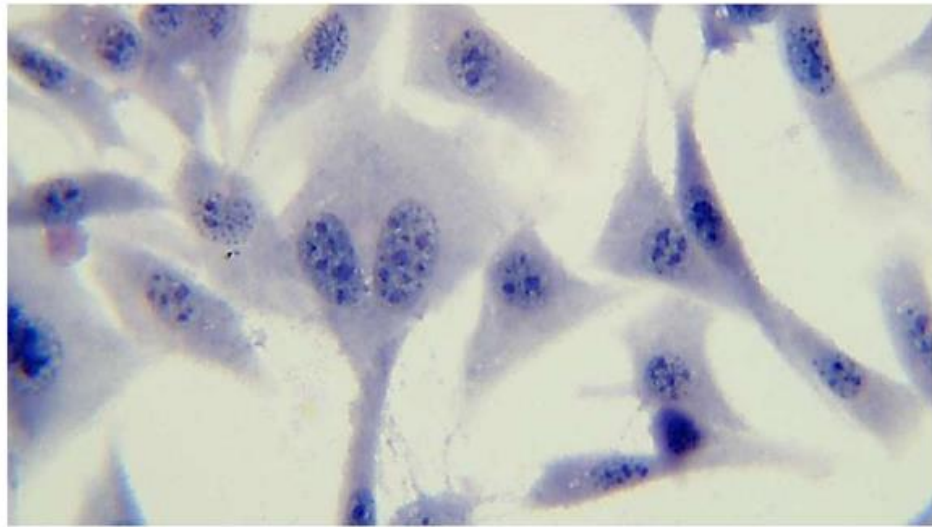
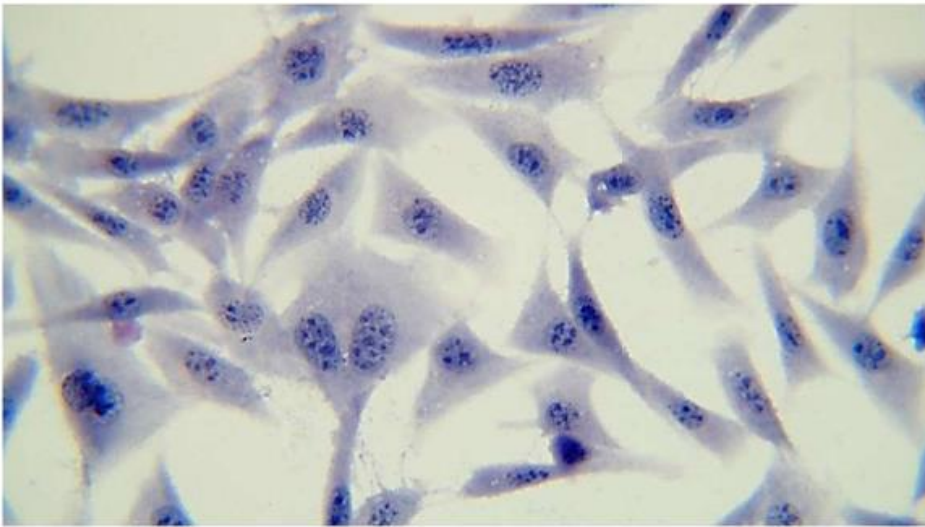
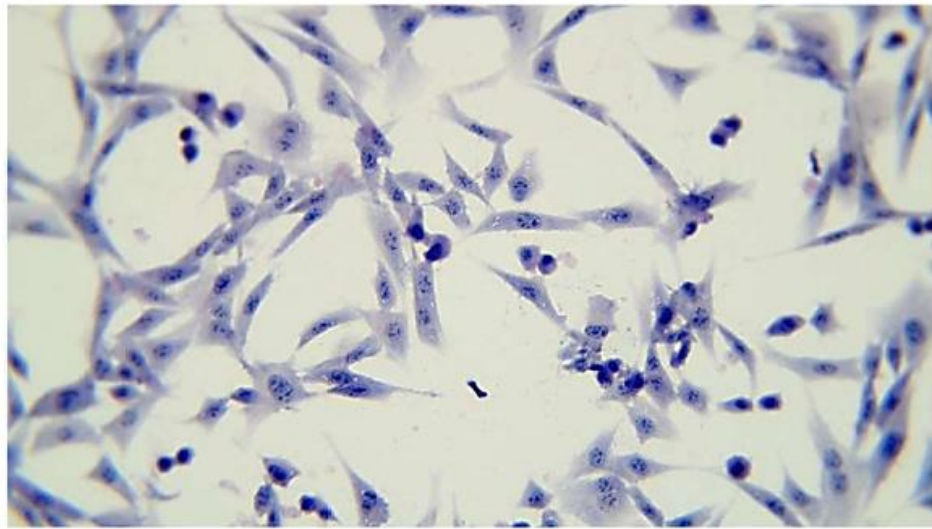
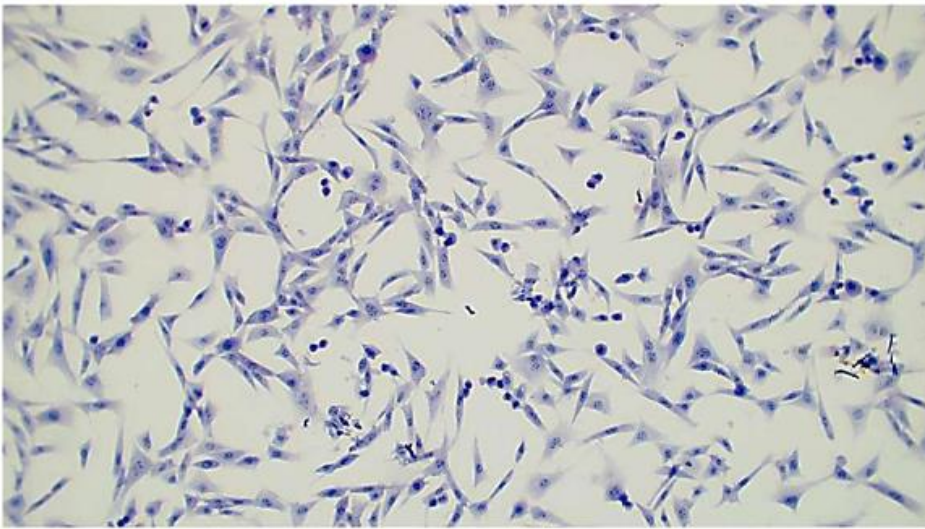


Izolowane miocyty mięśniówki gładkiej



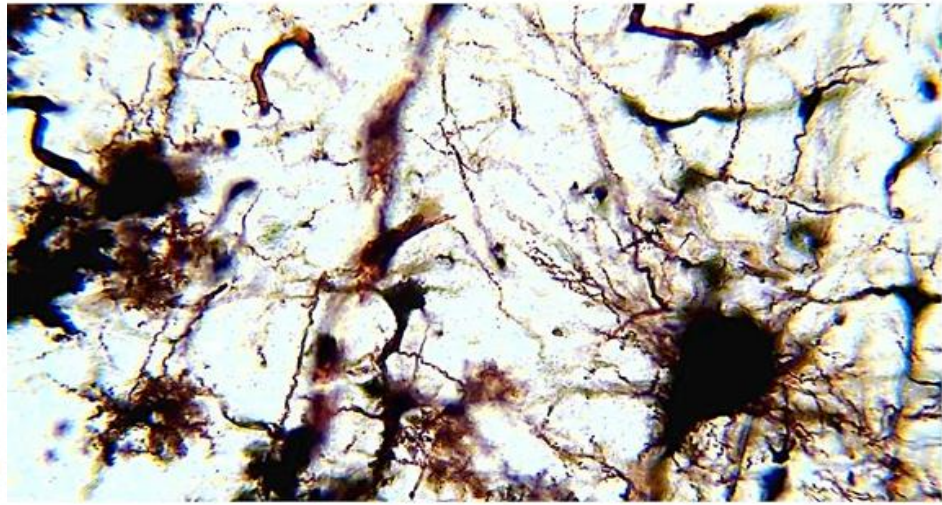
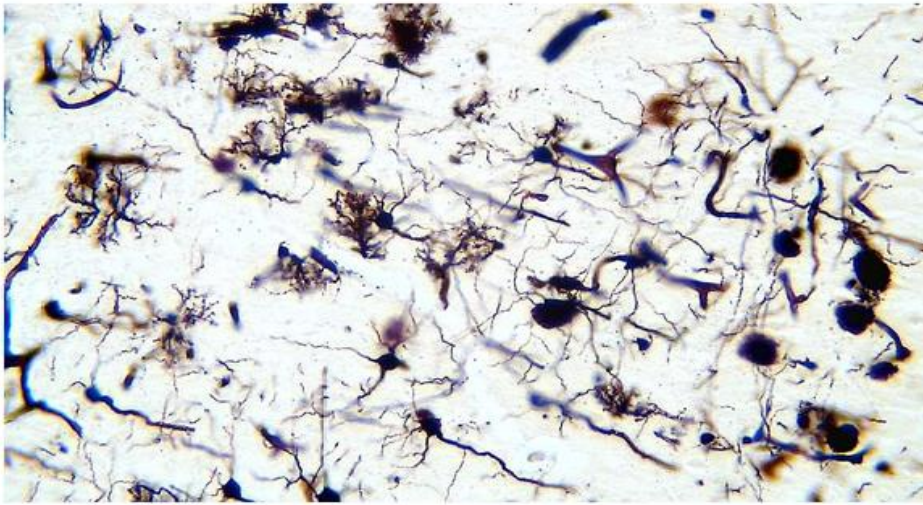
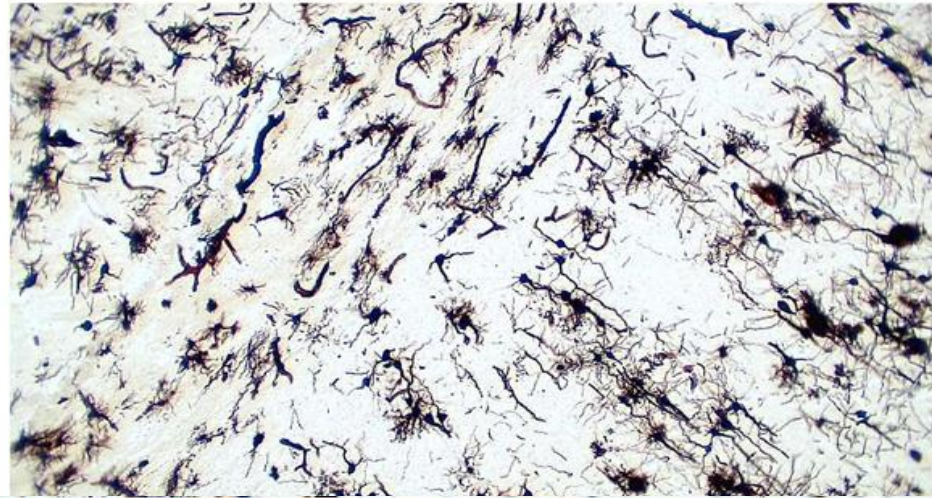
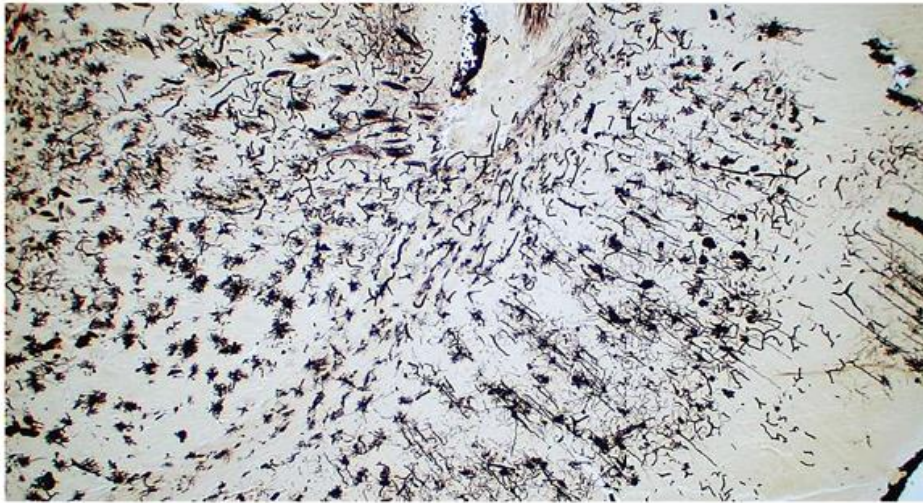
Rozmaz, barwienie HE

Fibroblasty z hodowli *in vitro*



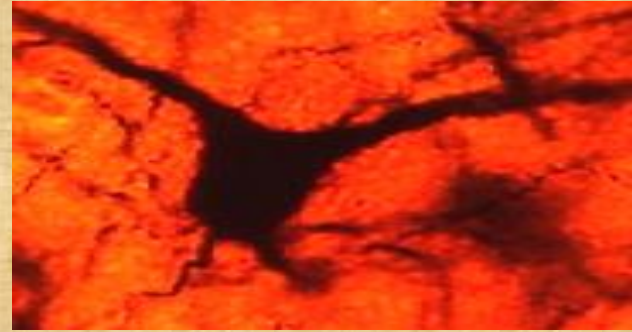
Hodowla na szkiełku, barwienie HE

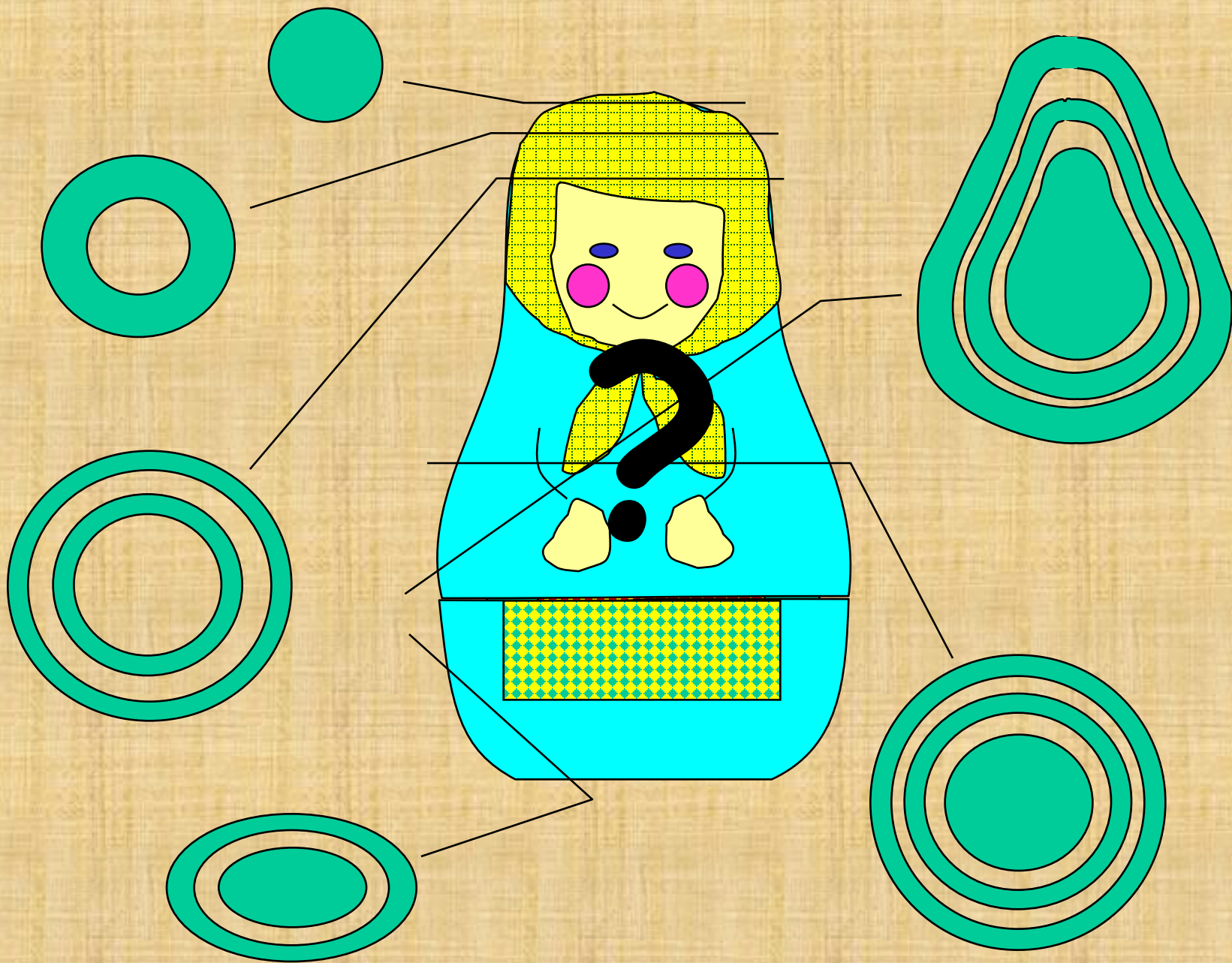
Neurony w korze mózgowej



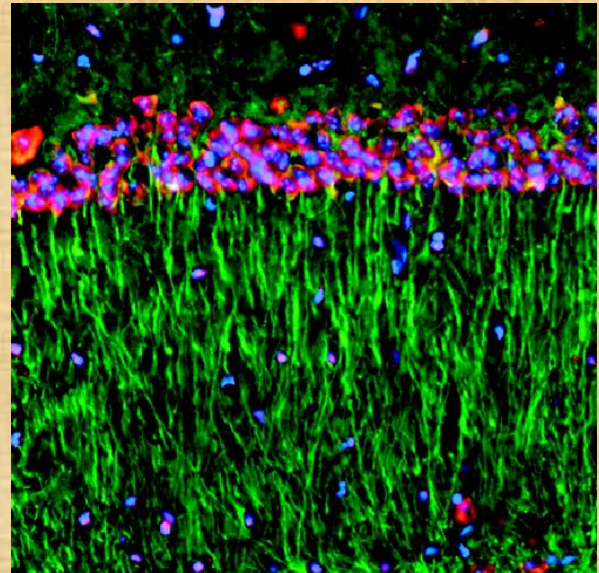
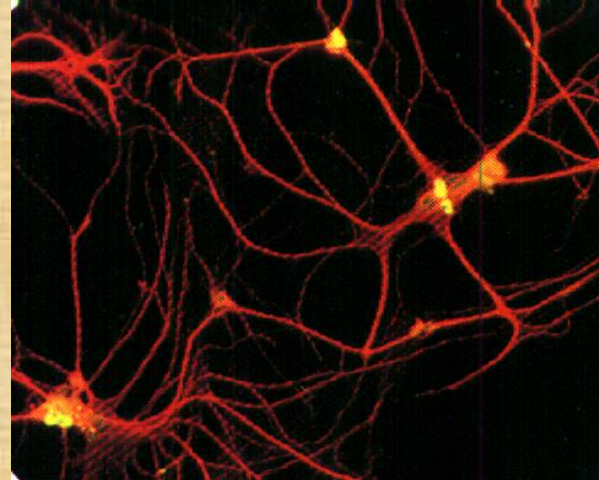
Skrawek histologiczny, barwienie solami srebra

Neurony w preparacie mózgowia - schemat

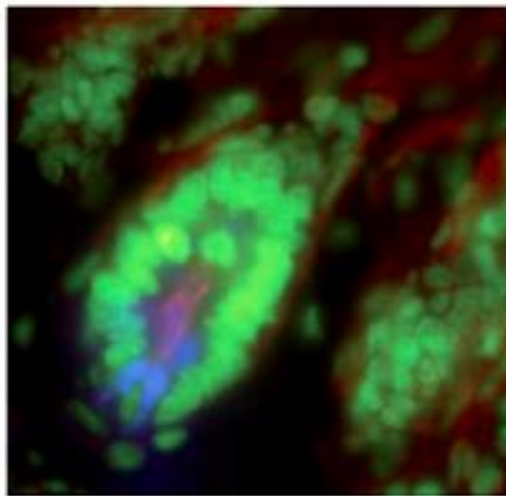




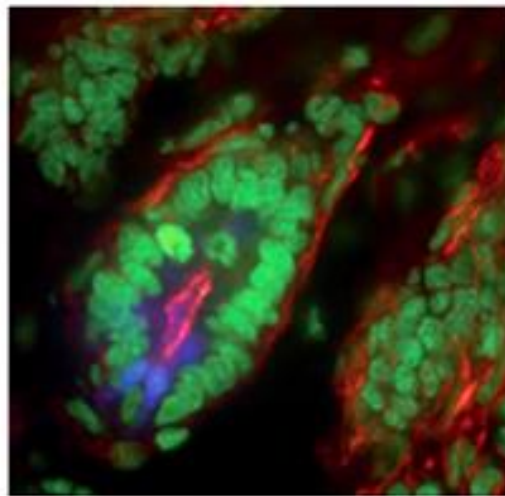
Mikroskop fluorescencyjny



Laserowy mikroskop konfokalny

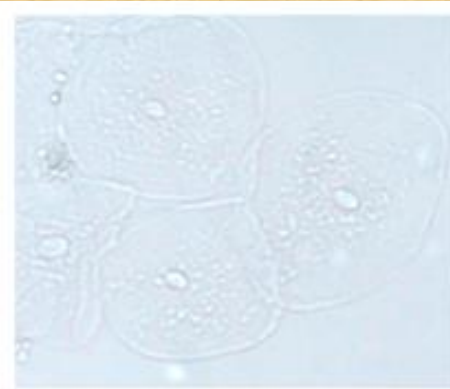


IF



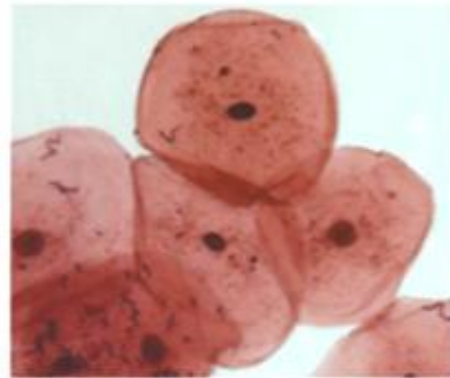
CLM

Mikroskop kontrastowo-fazowy

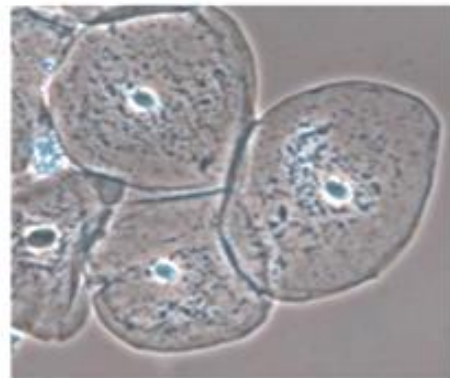


Komórki nabłonkowe
- wymaz cytologiczny

Jasne pole



Barw. Papanicolau



Kontrast fazowy

Mikroskop kontrastowo-fazowy (z zestawem do mikromanipulacji)

