

Тамбов 2022

Содержание	
Введение	3
1. Световая микроскопия и ее возможности	
1.1. Обычная оптическая микроскопия	
4	
1.2. Флуоресцентная микроскопия	5
1.3. Электронная микроскопия	6
1.4. Рентгеноскопия	8
2. Использование ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для определения химических условий в живых клетках	
9	
2.1. Использование внутриклеточных электродов	
11	
2.2. Использование светоизлучающих индикаторов	12
3. Фракционирование клеточного содержимого	13
4. Домикроскопический период	17
5. Микроскопический период	20
8. Развитие гистологии и эмбриологии в России	24
Заключение	30
Список используемой литературы	32

Введение

Клетки достаточно малы по размеру и сложно устроены: трудно рассмотреть их структуру, определить молекулярный состав и еще сложнее установить, как функционируют их отдельные элементы. Успехи в изучении биологии клетки, включая наиболее удивительные достижения последних лет, связаны с применением новых методических подходов. И, для понимания клеточной биологии необходимо иметь некоторое представление о соответствующих экспериментальных методах.

Главнейшими группами тканей, из которых построены вегетативные (непосредственно не связанные с размножением) органы высшего растения, являются следующие: покровные, основные, механические, проводящие, выделительные, меристематические. В каждую группу обычно входит несколько тканей, имеющих похожую специализацию, но построенных по-своему из определенного вида клеток. Ткани в органах не изолированы друг от друга, а составляют системы тканей, где элементы отдельных тканей чередуются.

Гистоло́гия (от греч. ἵστίον — ткань и греч. λόγος — знание, слово, наука) — раздел биологии, изучающий строение тканей живых организмов. Обычно это делается рассечением тканей на тонкие слои и с помощью микротомы. Гистология – наука о строении, развитии и жизнедеятельности тканей живых организмов. А значит, гистология изучает один из уровней организации живой материи – тканевый.

В гистологии имеется несколько разделов, изучающих определенные уровни организации живой материи, начиная с клеточного и заканчивая

органным и системным, составляющим организм. Организм человека и животных представляет собой целостную систему, в которой можно выделить ряд иерархических уровней организации живой материи: клетки — ткани — морфофункциональные единицы органов — органы — системы органов. Каждый уровень структурной организации имеет морфофункциональные особенности, отличающие его от других уровней.

1. Световая микроскопия и ее возможности

1.1 Обычная оптическая микроскопия

В случае излучение данной длины волны может быть использовано для изучения только таких структур, минимальные размеры которых еще сопоставимы с длиной волны самого излучения. Этот принцип ограничивает возможности любого микроскопа. Предел разрешения светового микроскопа задается длиной световой волны, которая для видимого света лежит в пределах от 0,4 мкм (фиолетовый) до 0,7 мкм (темно-красный). Из этого следует, что самыми маленькими объектами, которые еще можно наблюдать в световой микроскоп, являются бактерии и митохондрии (их ширина $\sim 0,5$ мкм). Более мелкие элементы клетки искажаются эффектами, вызванными волновой природой света.

После фиксации ткани обычно режут на очень тонкие "ломтики" (срезы) на микротоме. Срезы толщиной от 1 до 10 мкм помещают на поверхность предметного стекла. В качестве заключающих сред используют парафин или специальную смолу. В жидком виде эти среды пропитывают и окружают фиксированную ткань: затем они затвердевают при охлаждении или за счет полимеризации, образуя твердый блок, который удобно резать на микротоме.

Присутствует опасность того, что процедуры фиксации или заключения могут повредить структуру клеток или клеточных макромолекул. Вот почему предложен другой метод приготовления срезов - быстрое замораживание. Замороженную ткань режут на криостате в специальном микротоме, установленном в холодной камере.

В содержимом большинства клеток, состоящих, как правило, на 70% из воды, практически отсутствуют компоненты, способные помешать прохождению световых лучей. Поэтому в естественном состоянии большинство клеток даже после фиксации и приготовления срезов практически невидимы в обычном световом микроскопе. Одна из возможностей их увидеть состоит в окраске клеток красителями.

1.2 Флуоресцентная микроскопия

Поскольку большинство макромолекул представлены в клетках относительно небольшим числом копий, одна или две молекулы красителя, связанные с макромолекулой, могут оставаться незамеченными. Альтернативный подход к проблеме чувствительности состоит в использовании флуоресценции.

Флуоресцирующие красители поглощают свет одной длины волны и излучают свет другой длины волны, более длинной. Если, такое вещество облучить светом, длина волны которого совпадает с длиной волны света, поглощаемого красителем, и затем для анализа использовать фильтр, пропускающий свет с длиной волны, соответствующей свету, излучаемому красителем, флуоресцирующую молекулу можно выявить по свечению на темном поле. Высокая интенсивность излучаемого света является характерной особенностью таких молекул.

Применение флуоресцирующих красителей для окраски клеток предполагает использование специального флуоресцентного микроскопа. Флуоресцентная микроскопия часто используется для выявления специфических белков или других молекул, которые становятся флуоресцирующими после ковалентного связывания с флуоресцирующими красителями. К примеру, флуоресцирующие красители могут быть связаны с молекулами антител, что сразу же превращает их в высокоспецифические и удобные красящие реагенты, селективно связывающиеся со специфическими макромолекулами на поверхности живой, либо внутри фиксированной клетки. Для этой цели обычно используют два красителя -

флуоресцеин, который дает интенсивную желто-зеленую флуоресценцию после возбуждения светло-голубым светом, и родамин, обуславливающий темно-красную флуоресценцию после возбуждения желто-зеленым светом.

1.3. Электронная микроскопия

Взаимосвязь длины волны света и предела разрешения сохраняется для любой формы излучения, как для световых лучей, так и для электронов. Однако в последнем случае предел разрешения существенно ниже. Длина волны электрона уменьшается с увеличением его скорости. В электронном микроскопе с напряжением 100000 В длина волны электрона равна 0.004 нм, а согласно теории, разрешение такого микроскопа составляет 0,002 нм.

Источник излучения - нить катода, испускающая электроны с вершины цилиндрической колонны высотой около двух метров. Поскольку при столкновении с молекулами воздуха электроны рассеиваются, в колонне должен быть создан вакуум. Электроны, излучаемые катодной нитью, ускоряются ближайшим анодом и проникают через крошечное отверстие, формируя электронный луч, проходящий в нижнюю часть колонны. Вдоль колонны на некотором расстоянии расположены кольцевые магниты, фокусирующие электронный луч, подобно стеклянным линзам, фокусирующим луч света в световом микроскопе. Образец через воздушный шлюз помещают в вакуум колонны, на пути электронного пучка. Часть электронов в момент прохождения через образец рассеивается согласно плотности вещества в данном участке, остаток электронов фокусируется и образует изображение на фотопластинке или на фосфоресцирующем экране.

В электронном микроскопе нельзя наблюдать живые объекты. Поэтому ткани фиксируют, сшивая клетки и клеточные структуры глутаральдегидом, а затем обрабатывают осмиевой кислотой. Образцы

обезвоживают, фиксируют смолами и нарезают тонким стеклянным или алмазным ножом.

Тонкие срезы практически являются двумерными срезами ткани и не позволяют судить о трехмерной структуре клеточных компонентов. Трехмерное изображение можно получить, после реконструкции сотен серийных срезов. Один из них состоит в изучении образца под сканирующим электронным микроскопом. В этом случае, образец должен быть зафиксирован, высушен и покрыт тонкой пленкой тяжелого металла. После чего, образец сканируется очень узким пучком электронов. И происходит формирование единого, цельного и значительно увеличенного изображения.

Метод сканирующей электронной микроскопии обеспечивает значительную глубину фокусировки; и поскольку масштабы рассеивания электронов определяются углом поверхности по отношению к лучу, на изображении возникают чередующиеся светлые и темные участки, создающие впечатление трехмерности. Но этот метод применим только для изучения поверхности и его разрешение сравнительно невелико (около 10 нм с эффективным увеличением примерно 20 тыс. раз). Данный метод используется только для изучения целых клеток и тканей.

Просвечивающий электронный микроскоп можно использовать для изучения поверхности образца с очень большим увеличением, наблюдая отдельные макромолекулы. Как и при сканирующей электронной микроскопии, на высушенный образец напыляется тонкая пленка тяжелого металла. Металл напыляется под определенным углом, так что отложения напыленной пленки в некоторых местах толще, чем в других. Этот процесс известен как оттенение - здесь возникает эффект тени, создающий впечатление трехмерности изображения.

В клеточной биологии особенно успешно используются два метода, основанные на получении механических реплик. Один из них - метод электронной микроскопии "замораживание-скалывание" - дает

возможность изучать внутреннее строение клеточных мембран. Клетки замораживают при температуре жидкого азота (-196°C). Замороженный блок затем раскалывают лезвием ножа. Скол часто проходит через гидрофобную середину двойного слоя липидов, обнажая внутреннюю поверхность клеточных мембран. Образующуюся поверхность скола оттеняют платиной, органический материал удаляют и изучают полученные реплики в электронном микроскопе.

Метод "замораживания - травления" используется для изучения внешней поверхности клеток и мембран. В данном случае клетки замораживают при очень низкой температуре и замороженный блок раскалывают лезвием ножа. Содержание льда вокруг клеток (и в меньшей степени внутри клеток) понижают возгонкой воды в вакууме при повышении температуры (процесс называют вакуумной сушкой). Участки клетки, подвергнутые такому травлению, затем оттеняют для приготовления платиновой реплики.

В настоящее время можно наблюдать с высоким разрешением даже внутренние детали трехмерных структур, таких, как вирусы. Для этого используют метод криоэлектронной микроскопии, где очень тонкий (примерно 100 нм), быстро замороженный слой влажного образца помещают на микроскопическую решетку. С помощью специального приспособления гидратированный образец удерживают при -160°C в вакууме микроскопа. Таким способом можно наблюдать материал практически непосредственно: без фиксации, окраски и сушки.

1.4. Рентгеноскопия

Рентгеновские лучи, подобно свету, являются одной из форм электромагнитного излучения, но, длина волны рентгеновских лучей значительно короче, их применение позволяет разрешить значительно более мелкие детали. В отличие, от видимого света или потока электронов,

рентгеновские лучи нельзя сфокусировать и после их прохождения через образец получить обычное изображение. Но структуру можно выявить - используя метод дифракции рентгеновских лучей.

Рассеянное излучение можно рассматривать как набор перекрывающихся волн, каждая из которых отражается разными участками объекта. Если волны перекрываются, они подвергаются интерференции и возникает распределение излучения, известное как дифракционная картина. Дифракционная картина может быть зарегистрирована на фотопластинке, помещенной на некотором расстоянии от предмета, или представлена с помощью количества рассеянного излучения, отраженного объектом в разных направлениях. Форма дифракционной картины определяется структурой объекта. С другой стороны, исходя из полного описания дифракционной картины, можно теоретически рассчитать структуру данного объекта

Полная дифракционная картина кристаллической решетки будет состоять из множества ярких пятен различной интенсивности. Относительная интенсивность различных пятен в дифракционной картине зависит от способности различных объектов в решетке рассеивать излучение. В действительности интенсивность данного пятна пропорциональна интенсивности излучения, которое будет отражаться в данном направлении от характерного одиночного объекта.

Для того, что бы достичь высокого разрешения, нужно иметь кристаллы с высокой степенью упорядоченности. По мере прохождения через образец рентгеновские лучи рассеиваются электронами атомов, составляющими образец. Поэтому большие атомы с большим количеством электронов рассеивают рентгеновские лучи более эффективно, чем небольшие атомы, так что атомы С, N, О, Р регистрируются гораздо более надежно, чем атомы Н.

2. Использование ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для определения химических условий в живых клетках

Ядра многих атомов характеризуются магнитным моментом: они обладают внутренним магнетизмом. Магнитные характеристики этих атомов подвержены влиянию со стороны окружающих атомов. Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР), являющийся безвредным для живых клеток, позволяет определить химическую природу вещества. Если ядра атомов, обладающие магнитным моментом, поместить в магнитное поле, они принимают одну из возможных ориентации. Каждая из ориентации характеризуется энергией, определяемой силой поля и химическим окружением. При облучении радиоволнами набора атомов в идентичном химическом окружении, энергия этих волн будет в значительной степени поглощаться, если волны обладают строго определенной частотой, соответствующей разности энергетических состояний двух возможных ориентации ядер в магнитном поле. Это так называемая резонансная частота. Образец ткани содержит атомы в различных молекулах, в различном окружении, поэтому он будет поглощать энергию на различных резонансных частотах. Диаграмма поглощения на резонансных частотах для данного образца составит его спектр ЯМР. Такой спектр отражает структуру и относительное содержание каждого типа молекул, содержащих магнитные ядра.

Для изучения макромолекул, содержащихся внутри живой клетки, обычно используют широко распространенные изотопы ^1H , ^{13}Na , ^{31}P , ^{39}K и редкие изотопы ^{13}C и ^{15}N . Ввиду важной роли соединений фосфора, которую они играют в метаболизме, эффективным оказывается определение ЯМР ^{31}P . Этот изотоп в норме присутствует в фосфорсодержащих веществах клеток. Сигналы, создаваемые им, можно использовать для слежения за изменением внутриклеточной концентрации в процессе мышечного сокращения таких соединений, как АТФ и неорганический фосфат.

Редкие изотопы ^{13}C и ^{15}N в норме не содержатся в клетках в достаточных количествах, однако их можно вводить в специфические макромолекулы, имеющие биологическое значение. С помощью ЯМР удастся следить впоследствии за их химической трансформацией. Если, например, выращивать клетки на среде с глюкозой ^{13}C , то, измеряя в течение некоторого времени спектр ЯМР образца, можно определять скорость многих реакций, в которых участвует глюкоза.

Главным ограничением метода ЯМР является его низкая чувствительность. Например, для определения содержания какого-либо соединения с использованием современных модификаций метода ^{31}P -ЯМР, в грамме живой ткани должно содержаться не менее 0,2 мМ исследуемого соединения. Однако многие метаболиты присутствуют в живых тканях в более низких концентрациях. Более того, поскольку для снятия одного спектра ЯМР требуется, как правило, несколько минут, можно не уловить быстрые изменения цитохимических характеристик. С другой стороны, значительное преимущество ЯМР состоит в его безвредности для живых клеток, и это обстоятельство делает данный метод весьма перспективным для клеточной биологии.

2.1. Использование внутриклеточных электродов

Для изучения отдельных клеток необходимо использовать методы более чувствительные, чем ЯМР. Один из них основан на подходе, разработанном электрофизиологами для изучения разности потенциалов и тока на плазматической мембране. С этой целью готовят внутриклеточные микроэлектроды. Они состоят из тонких стеклянных трубок, диаметр конца которых измеряется долями микрона; такие трубочки заполняют электропроводным раствором (обычно это раствор соли KCl в воде). Кончик микроэлектрода вводят в цитоплазму через плазматическую мембрану, которая смыкается вокруг капилляра, плотно прилегая к стеклу, так что клетка остается относительно неповрежденной.

В исследовании клеточного содержимого микроэлектроды используют двойко: с их помощью можно измерять внутриклеточную концентрацию обычных ионов, таких, как ионы H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} и Mg^{2+} . Они могут быть использованы и для инъекции молекул в клетки.

Микроэлектродную технику используют для изучения транспорта ионов через специализированные белковые каналы (именуемые также ионными каналами), содержащиеся в небольших участках плазматической мембраны. В этом случае необходим стеклянный микроэлектрод с несколько более толстым кончиком. Его не вводят в плазматическую мембрану, а плотно и мягко прижимают к ней. Что позволяет регистрировать электрические характеристики небольшого участка мембраны, прилегающего к кончику микроэлектрода, который, в свою очередь, прикасается к клетке или находится на небольшом расстоянии от нее. Данный метод известен как "пэтч-регистрация" (регистрация в данном участке). Его применение произвело настоящую революцию в исследовании ионных каналов. Это единственный метод клеточной биологии, который дает возможность изучать функцию одиночной белковой молекулы в реальном времени.

2.2 Использование светоизлучающих индикаторов

Электроды, чувствительные к определенным ионам, позволяют измерять их концентрацию только в одной точке на клеточной поверхности. Если же ионы представлены в клетках в низкой концентрации, показания таких электродов зачастую оказываются ошибочными. Поэтому в таких случаях для регистрации используют внутриклеточные индикаторы, излучающие свет. Такими являются люминесцентные и флуоресцентные вещества, например, белок акварин или синтетические. Этим способом измеряют концентрацию ионов кальция и водородных ионов.

Для введения в клетки молекул, не проникающих через мембрану (это могут быть светоизлучающие индикаторы, клеточные белки,

связанные с флуоресцентной меткой) используют микроинъекции молекул в клетки с помощью стеклянной микропипетки. Используя соответствующий микроскоп, исследователь получает возможность следить за поведением такого белка в процессе роста и деления клеток.

Микроинъекции - весьма эффективный и достаточно широко используемый метод, однако важно помнить, что в данном случае процедуре микроинъекции подвергается каждая клетка отдельно, поэтому количество клеток ограничено. Для повышения проницаемости клеточных мембран применяют сильный электрический разряд или химическое воздействие. Электрический разряд создает большие поры в плазматической мембране, не повреждая внутриклеточные мембраны. В зависимости от типа клеток и интенсивности электрической стимуляции эти поры остаются открытыми в течение нескольких минут или даже часов. Через эти поры макромолекулы могут быстро входить в цитозоль или выходить из него. При ограниченном воздействии мембрана многих клеток восстанавливается и клетки выживают. Третий способ введения больших молекул в клетки — путем слияния окруженных мембраной частиц, содержащих необходимые молекулы, с плазматической мембраной клетки.

3. Фракционирование клеточного содержимого

Такая обработка делит клеточные компоненты по их размеру: более крупные частицы при центрифугировании движутся быстрее. Крупные компоненты экстракта, в том числе ядра или неразрушенные клетки, быстро оседают при относительно низких скоростях и образуют осадок на дне центрифужной пробирки.

Ультрацентрифуга разделяет клеточные компоненты не только по массе, но и по плавучей плотности, в этом случае образец седиментирует в круговом градиенте, образованном высококонцентрированным раствором сахарозы или хлористого цезия. Компоненты клеток опускаются по градиенту до тех пор, пока не достигнут участка, плотность раствора в

котором равна собственной плотности компонентов. Дальнейшей седиментации компонентов не происходит и они "застревают" на этом уровне. И, в центрифужной пробирке возникает набор различных полос, причем полосы прилежащие ко дну пробирки, содержат компоненты максимально плавающей плотности. Этот метод очень чувствителен, с его помощью можно отделять немеченые макромолекулы от макромолекул, содержащих тяжелые изотопы (^{13}C или ^{15}N).

Фракционированные клеточные экстракты, называемые также бесклеточными системами, широко используются для изучения внутриклеточных процессов. Только работая с бесклеточными экстрактами можно установить молекулярный механизм биологических процессов, поскольку лишь в этом случае исследуемый механизм может быть изучен в чистом виде без помех, создаваемых происходящими в клетке побочными реакциями. Использование бесклеточных систем принесло первый триумфальный успех при изучении механизмов биосинтеза белка. Отправной точкой в данном случае послужил неочищенный клеточный экстракт, способный транслировать молекулы РНК в белок. После многократного фракционирования этого экстракта были получены рибосомы, РНК и различные ферменты, составляющие в совокупности аппарат биосинтеза белка. После получения отдельных компонентов в чистом виде их можно было добавлять в систему и исключать из нее и таким образом уточнять роль каждого компонента в процессе биосинтеза белка.

Белки обычно разделяют методом хроматографии на колонках. Так смесь молекул в растворе пропускают через колонку, содержащую твердый пористый матрикс. Во взаимодействии с матриксом различные белки проходят через колонку с различной скоростью. Как разные белки достигнут в определенной последовательности дна колонки, их собирают отдельными фракциями. В настоящее время разработано и применяется множество матриксов различных типов, используя, которые можно делить

белки согласно их заряду (ионообменная хроматография), гидрофобности (гидрофобная хроматография), размеру (хроматография гель-фильтрацией) или способности связываться различными химическими группами (аффинная хроматография).

На каждом, этапе колоночной хроматографии содержание белка в смеси увеличивается не более чем в 20 раз, и поэтому выделить из сложной смеси белков отдельный белок за один цикл практически невозможно. На долю каждого белка, как правило, приходится менее 1/1000 всего белка клетки, и для его очистки требуется последовательное использование нескольких различных типов колонок.

Белки обычно несут суммарный положительный или отрицательный заряд, обусловленный наличием на их поверхности положительно или отрицательно заряженных групп аминокислот. Если белковые молекулы поместить в электрическое поле, они начинают перемещаться со скоростью, которая определяется их суммарным зарядом, а также формой и размерами. Этот феномен лежит в основе электрофореза - метода разделения смесей белков в свободных водных растворах и в твердом пористом матриксе.

Связываясь с гидрофобными участками белковой молекулы, этот детергент вызывает разворачивание белковых молекул в длинные вытянутые цепи. Развертываясь, отдельные белковые молекулы освобождаются из комплексов с белками или молекулами липидов и солюбилизируются в растворе детергента.

Каждая молекула белка связывает значительное количество негативно заряженных молекул детергента, общий заряд которых превосходит общий заряд белка. Белок после того, как будет приложено напряжение, начнет двигаться в направлении положительного электрода. Белки одного размера ведут себя сходным образом, поскольку, их природная структура полностью нарушена ДСН так, что их форма идентична, и они связывают одинаковое количество ДСН и приобретают

одинаковый, негативный заряд. Крупные белки, имеющие большой заряд, подвергаются действию значительных электрических сил, и даже существенному торможению. В обычных растворах эти эффекты взаимно погашаются, но в порах полиакриламидного геля, действующего как молекулярное сито, большие белки тормозятся значительно сильнее, чем малые белки. Вследствие этого сложная смесь белков делится на ряд полос, расположенных в соответствии с их молекулярной массой. Используя красители, можно выявить основные фракции полипептидов.

Антителами называют белки, продуцируемые позвоночными животными для защиты от инфекции. Каждая форма антител обладает определенными участками связывания, предназначенных для специфического узнавания молекул, стимулировавших синтез антител. Данные молекулы называют антигенами. Высокая специфичность антител в отношении антигена превращает их в мощный инструмент для исследования биологии клетки. После окрашивания антител флуоресцирующими красителями их можно использовать для определения внутриклеточной локализации специфических макромолекул с помощью флуоресцентной микроскопии. Мечение электроноплотными микрочастицами, например микросферами коллоидного золота, позволяет использовать антитела для локализации клеточных антигенов при помощи электронной микроскопии. При связывании антител с инертным матриксом получают аффинные колонки, пригодные для выделения и очистки специфических молекул из грубых клеточных экстрактов.

Антитела извлекают из сыворотки, обогащенной антителами, которую получают путем многократного введения антигена животным (например, кролику или козе). Эта антисыворотка содержит гетерогенную смесь антител, каждый тип которых был образован определенными клетками, синтезирующими антитела (В-лимфоцитами).

Так как, плазматическая мембрана клеток непроницаема для крупных молекул, белки, расположенные внутри живых клеток, не могут

взаимодействовать с антителами, добавляемыми извне. Если такие белки необходимо связать, в цитоплазму клеток эукариот можно ввести антитела и другие молекулы, инъецируя их тонкой стеклянной пипеткой через плазматическую мембрану. Прокалываемая плазматическая мембрана имеет способность "самозапаяться" спустя некоторое время после инъекции.

4. Домикроскопический период

Гистология человека — раздел медицины, изучающий строение тканей человека. Гистопатология — это раздел микроскопического изучения поражённой ткани, является важным инструментом патоморфологии (патологическая анатомия), так как точный диагноз рака и других заболеваний обычно требует гистопатологического исследования образцов.

Гистология зародилась задолго до изобретения микроскопа. Первые описания тканей встречаются в работах Аристотеля, Галена, Авиценны, Везалия.

В этот весьма продолжительный период (вплоть до XVIII в.) первые представления о тканях складывались на основании анатомических исследований трупов. В то же время именно в этот период зарождалась и создавалась микроскопическая техника (применение увеличительных стекол и создание первых микроскопов) и накапливались первые отрывочные сведения о микроскопическом строении отдельных клеток. Первый прибор из увеличительных стекол был сконструирован около 1590 г. Хансом и Захарием Янсенами в Нидерландах (Голландия). В 1609 г. Галилео Галилей, используя дошедшие до него сведения об изобретении увеличительной трубы, сконструировал свой оптический прибор, который имел 9-кратное увеличение. Его первая демонстрация в Венеции произвела громадное впечатление. Свою оптическую систему Галилей сначала применял для изучения строения различных предметов (1610-1614), а затем впервые обратил ее в ночное небо для рассмотрения небесных светил.

Термин микроскоп появился лишь в 1625 г. Первое его применение в естествознании связано с именем Роберта Гука, который в 1665 г. обнаружил и описал растительные клетки на срезе пробки, используя микроскоп собственной конструкции с увеличением в 30 раз.

Большое значение для становления гистологии, эмбриологии и ботаники имели работы Марчелло Мальпиги (Malpighi, Marcello, 1628-1694) - итальянского врача, анатома и натуралиста. Ему принадлежит открытие капилляров (1661), завершившее работы У. Гарвея, и описание форменных элементов крови (1665). Его именем названы почечные тельца и слой эпидермиса. Значительный вклад в развитие микроскопии внес голландский натуралист-самоучка Антони ван Левенгук (Leeuwenhoek, Antony van, 1632- 1723). Занимаясь шлифовкой оптических стекол, он достиг высокого совершенства в изготовлении короткофокусных линз, которые давали увеличение до 270 раз. Разрозненные наблюдения над клетками не сопровождались обобщениями и еще не привели к созданию науки. Первая попытка систематизации тканей организма (без применения микроскопа) была предпринята французским врачом Мари Франсуа Ксавье Биша), который считается основоположником гистологии как науки. Среди многообразия структур организма он выделил тканевую «систему» и подробно описал их в своих трудах «Трактат о мембранах и оболочках» и «Общая анатомия в приложении к физиологии и медицине». Наряду с хрящевой, костной и другими тканевыми «системами» он различал волосную, венозную, кровеносную, которые (как это известно сегодня) являются структурами органного характера, а не тканевого. После смерти Биша, Ж.- Н. Корвизар написал Наполеону: «Никто не сделал так много и так хорошо за такое короткое время».

В

XIX веке гистология была полноправной академической дисциплиной. В середине XIX века А. Кёлликер, Лейдинг и др. создали основы современного учения о тканях. Р. Вирхов положил начало развитию клеточной и тканевой патологии. Открытия в цитологии и создание

клеточной теории стимулировали развитие гистологии. Большое влияние на развитие науки оказали труды И. И. Мечникова и Л. Пастера, сформулировавших основные представления об иммунной системе.

Нобелевскую премию 1906 года в физиологии или медицине присудили двум гистологам, Камилло Гольджи и Сантьяго Рамон-и-Кахалю. Они имели взаимно-противоположные воззрения на нервную структуру головного мозга в различных рассмотренных одинаковых снимках.

В XX веке продолжалось совершенствование методологии, что привело к формированию гистологии в её нынешнем виде. Современная гистология тесно связана с цитологией, эмбриологией, медициной и другими науками. Гистология разрабатывает такие вопросы, как закономерности развития и дифференцировки клеток и тканей, адаптации на клеточном и тканевом уровнях, проблемы регенерации тканей и органов и др. Достижения патологической гистологии широко используются в медицине, позволяя понять механизм развития болезней и предложить способы их лечения.

Несмотря на крупные достижения в области современной биологии клетки, непреходящее значение для развития идей о клетке имеет клеточная теория.

В 1838 г. немецкий зоолог-исследователь Т. Шванн впервые указал на гомологичность, или сходство, клеток растительных и животных организмов. Позже он сформулировал клеточную теорию строения организмов. Поскольку при создании этой теории Т. Шванн широко использовал результаты наблюдений немецкого ботаника М. Шлейдена, последнего по праву считают соавтором клеточной теории. Стержнем теории Шванна-Шлейдена является тезис о том, что клетки представляют собой структурно-функциональную основу всех живых существ. Вопрос о пределе делимости материи издавна волновал человечество. Еще древнегреческий натурфилософ Демокрит (460-370 гг. до н. э.) предсказал существование атомов – частиц, неделимых без потери качества. Во второй

половине XVII в. немецкий философ Готфрид Вильгельм Лейбниц создал учение о монадах. Монада – это мельчайшая частица, отражающая все свойства целого. Таким образом, Лейбниц предсказал существование элементарной биологической системы, обладающей всеми свойствами жизни. В настоящее время бурно развивается концепция фракталов (Бенуа Мандельброт, 1982). Фракталы – это самоподобные структуры, состоящие из элементов, подобных целому. Открытие и дальнейшее изучение клетки стало возможным только после изобретения микроскопа. Это связано с тем, что человеческий глаз не способен различать объекты с размерами менее 0,1 мм, что составляет 100 микрометров (сокращ. микрон или мкм). Размеры же клеток (а тем более, внутриклеточных структур) существенно меньше. Например, диаметр животной клетки обычно не превышает 20 мкм, растительной – 50 мкм, а длина хлоропласта цветкового растения – не более 10 мкм. С помощью светового микроскопа можно различать объекты диаметром в десятые доли микрона. Поэтому световая микроскопия является основным, специфическим методом изучения клеток.

5. Микроскопический период

Период систематических микроскопических исследований тканей открывается одним из крупнейших обобщений естествознания XIX в. – клеточной теорией строения организмов. В основных своих чертах клеточная теория была сформулирована в трудах немецких ученых – ботаника Матиаса Шлейдена, и зоолога Теодора Шванна. Их предшественниками были Р. Тук, М. Мальпиги, А. ван Левенгук, Ж. Ламарк. В 1838 г. М. Шлейден в своей статье «Материалы к филогенезу» показал, что каждая растительная клетка имеет ядро, и определил его роль в развитии и делении клеток. В 1839 г. был опубликован основополагающий труд Т. Шванна «Микроскопическое исследование о соответствии в строении и росте животных и растений», в котором он определил клетку как универсальную структурную единицу растительного

и животного мира, показал, что растительные и животные клетки гомологичны по своей структуре, аналогичны по функции, и дал основные характеристики их образования, роста, развития и дифференцировки.

Одним из основоположников учения о клеточном строении был Ян Эвангелист Пуркине - чешский естествоиспытатель и общественный деятель, основатель пражской гистологической школы, почетный член многих зарубежных академий наук и научных обществ (в том числе в Петербурге и Харькове). Пуркине первым увидел нервные клетки в сером веществе головного мозга (1837), описал элементы нейроглии, выделил в сером веществе коры мозжечка крупные клетки, названные впоследствии его именем, открыл волокна проводящей системы сердца (волокна Пуркине). Он первым применил термин протоплазма (1839). В его лаборатории создан один из первых микротомов. Я- Э. Пуркине был организатором чешского Научного общества врачей, которое ныне носит его имя. Клеточная теория дала ключ к изучению законов строения и развития различных органов и тканей. На этой основе в XIX в. была создана микроскопическая анатомия как новый раздел анатомии. К концу XIX в. в связи с успехами в изучении тонкого строения клетки были заложены основы цитологии. Успехи гистологии как науки о строении и происхождении тканей и их компонентов прежде всего связаны с развитием техники, оптики и методов микроскопирования. Микроскопические исследования позволили накопить данные о строении клеток и тканей организма и на этом основании сделать теоретические обобщения. Первые микроскопы были созданы в начале XVII в. Одно из самых ранних научных исследований с помощью микроскопа собственной конструкции провел английский ученый Роберт Гук (1635-1703). Он изучал микроскопическое строение многих предметов, среди которых были острие иглы, батист, песок в моче, семена мака, муравьи, древесина и многие другие. Все изученные объекты Р. Гук описал в книге «Микрография или некоторые физиологические описания мельчайших тел, выполненные при

посредстве увеличительных стекол...», изданной в 1665 г. Из своих наблюдений Р. Гук сделал вывод о широком распространении пузырьковидных ячеек в растительных объектах и впервые предложил термин «клетка». В 1671 г. английский ученый Н. Грю (1641-1712) в своей книге «Анатомия растений» писал о клеточном строении как о всеобщем принципе организации растительных организмов. Н. Грю впервые ввел в употребление термин «ткань» для обозначения растительной массы, поскольку последняя напоминала по своей микроскопической конструкции ткани одежды. В том же году итальянец Дж. Мальпиги (1628-1694) дал систематическое и детальное описание ячеистого (клеточного) строения различных растений. В дальнейшем постепенно накапливались факты, свидетельствующие о том, что не только растительные, но и животные организмы состоят из клеток.

Во второй половине XVII в. оптик-любитель А. Левенгук (1632-1723) открыл мир микроскопических животных и впервые описал красные кровяные тельца и мужские половые клетки. Каждое исследование по существу являлось открытием, которое плохо уживалось с метафизическим взглядом на природу, складывавшимся веками. Случайный характер открытий, несовершенство микроскопов, метафизическое мировоззрение не позволили в течение 100 лет (с середины XVII до середины XVIII в.) сделать существенные шаги вперед в познании закономерностей строения животных и растений. Большое значение для развития знаний о микроскопическом строении организмов имело дальнейшее усовершенствование микроскопов.

В XVIII в. микроскопы производились уже в большом количестве. В Россию они впервые были привезены из Голландии Петром I. Позднее при Академии наук в Петербурге была организована мастерская по изготовлению микроскопов. Для развития микроскопии в России многое сделал М. В. Ломоносов, предложивший ряд технических

усовершенствований конструкции микроскопа и его оптической системы. Так, в конце XVIII - начале XIX в. трудами многих отечественных (петербургских), а также голландских ученых и мастеров были созданы ахроматические микроскопы, которые сделали более достоверными микроскопические наблюдения и позволили перейти к систематическому изучению структурных элементов самых разнообразных животных и растительных организмов. В XIX в. большое влияние на развитие учения о клетке и тканях оказали работы Я. Пуркинье (1787-1869), М. Шлейдена (1804-1881), Ф. Лейдига (1821- 1908), И. Мюллера (1801-1858), Т. Шванна (1810-1882), Р. Вирхова (1821-1902), Р. Келликера (1817-1905), В. Вальдейера (1836-1921) и др. Хотя многие исследователи высказывали предположение о клеточном строении организмов, только Т. Шванн в своей монографии «Микроскопическое исследование о соответствии в структуре и росте животных и растений» (1839) ясно сформулировал основные положения так называемой клеточной теории. Важнейший вывод данной теории состоял в том, что клетки представляют собой элементарные универсальные структурные единицы всех растений и животных. Вскоре после опубликования книги Т. Шванна австрийский гистолог А. Келликер распространил положения клеточной теории на ранние стадии эмбрионального развития организма. В 1841-1844 гг. он показал, что сперматозоид и яйцо являются клетками. Из клеток состоит и организм (зародыш), возникающий в ходе дробления оплодотворенной женской половой клетки. Параллельно с развитием клеточной теории складывались представления о том, что клетки в составе организма образуют системы более высокого порядка - ткани. В 1801 г. французский анатом М. Ф. К. Биша (1771-1802) на основе микроскопических исследований предложил первую классификацию тканей. Его ученик К. Майер ввел термин «гистология» в изданном в 1819 г. труде «О гистологии и новом подразделении тканей человеческого тела». Создание клеточной теории оказало огромное прогрессивное влияние на развитие

биологии и медицины. В середине XIX в. начался период бурного развития описательной гистологии. На основе клеточной теории были изучены состав различных органов и тканей, их развитие, что позволило уже тогда создать в основных чертах микроскопическую анатомию и уточнить классификацию тканей с учетом их микроскопического строения (А. Кёлликер и др.). Однако научная мысль во второй половине XIX в. не могла плодотворно развиваться без дальнейших успехов гистологической техники и методов микроскопического исследования.

Благодаря успехам в области изучения строения клетки в конце XIX в. были заложены основы цитологии, но микроскопирование фиксированных клеток не позволяло судить о процессах жизнедеятельности в них. Поэтому внимание ученых привлекли методы культивирования клеток и тканей (И. П. Скворцов, Р. Гаррисон, А. Каррель и др.).

6. Развитие гистологии и эмбриологии в России

Отечественная гистология за годы своего существования развивалась по нескольким направлениям. Большое внимание было уделено вопросам нейрогистологии, особенно в связи с разработкой учения И. П. Павлова. Казанской нейрогистологической школой был собран богатейший материал по морфологии нервных волокон и нервных узлов в различных органах и тканях (в пищеварительном тракте, мускулатуре, эпителии, железах и др.). А. Н. Миславский подготовил плеяду талантливых нейрогистологов (Б. И. Лаврентьев, И. Ф. Иванов и др.). Из них особое значение имела деятельность Б. И. Лаврентьева. Б. И. Лаврентьев (1892-1944) и его сотрудники (Е. К. Плечкова и др.) разрабатывали вопросы гистофизиологии автономной (вегетативной) нервной системы, интернейрональных синапсов, различных рецепторов, антагонистической иннервации. Под руководством Б. И. Лаврентьева было создано экспериментальное гистофизиологическое направление в отечественной нейрогистологии. Исследуя живые нервные клетки, Б. И. Лаврентьев наблюдал изменения

синапсов при раздражении нервов. Примененный им метод перерезки нервов нашел широкое применение при изучении источников иннервации органов и тканей. Пользуясь этим методом, Б. И. Лаврентьев доказал несостоятельность теории фибриллярной непрерывности и подтвердил нейронную теорию. Применение современных методов исследования (люминесцентной, электронной микроскопии, гистохимии и др.) позволило раскрыть механизмы функции и реактивные изменения тканевых элементов нервной системы в условиях экспериментальных и патологических воздействий на организм. Отечественные гистологи уделяют особое внимание вопросам связи нервной системы с органами, а также проблеме корреляции нервной и эндокринной систем в жизнедеятельности организма. В 30-е гг. XX столетия А. А. Заварзин на основе глубокого сравнительно-гистологического изучения нервной системы сформулировал принцип параллелизма тканевых структур, переработанный позднее в теорию тканевой эволюции. Он дал определение ткани. Ткань есть филогенетически обусловленная система элементов, объединенных общей структурой, функцией и камбиальностью, или развитием. Обнаружив у членистоногих и позвоночных сходство в строении нервной системы и других тканей, он сделал вывод, что все животные имеют общий принцип тканевой организации и состоят из четырех тканевых систем. Это связано с тем, что всякий организм находится в одинаковых условиях взаимодействия с окружающей средой и выполняет четыре наиболее общие функции - защитную, внутреннего обмена и постоянства внутренней среды, движения, реактивности.

А. А. Заварзин обосновал морфофункциональную классификацию тканей. Теория А. А. Заварзина называется теорией параллельных рядов тканевой эволюции. Она изложена в монографиях «Очерки эволюционной гистологии нервной системы» (1941); «Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани» (1945). К своей монографии о крови и

соединительной ткани, которую А. А. Заварзин закончил в октябре 1942 г., он сделал такое посвящение: «Великой победе над варварством и мракобесием, светлой памяти погибших в борьбе за это святое дело своей великой и чудесной Родине эту книгу посвящает автор».

Большой вклад сделан советскими гистологами в разработку функциональной гистологии эндокринной системы (А. В. Немилов, А. В. Румянцев, Б. В. Алешин и др.). Начатое еще А. А. Максимовым изучение соединительной ткани приобрело широкий размах в XX в. Изучение ведется в основном по двум направлениям. Первое направление выражается в широких сравнительно-гистологических исследованиях соединительной ткани и крови (С. В. Мясоедов, А. А. Заварзин, Ф. М. Лазаренко, Е. С. Данини, Г. В. Ясвоин, Г. К. Хрущев и др.).

Второе направление - изучение гистофизиологии соединительной ткани различных органов и систем, а также ее изменений под влиянием нервных и эндокринных факторов - разрабатывали В. Г. Елисеев, Т. А. Григорьева, Ю. И. Афанасьев, Н. А. Юрина и др. С этими направлениями логически связано изучение гистогенеза соединительной ткани. Большие успехи достигнуты в разработке гистофизиологии мышечной ткани, в изучении гистогенеза и регенеративных возможностей органов. Отечественные гистологи опровергли теории о неспособности тканей высокоорганизованных животных к регенерации (Л. Д. Лиознер, М. А. Воронцова и их последователи). На примере восстановительных процессов поперечнополосатой мышечной ткани убедительно показаны пути и способы их осуществления (А. Н. Студитский, А. А. Клишов и др.). В 40-е гг. XX в. были внесены существенные коррективы и в научные направления в области цитологии.

Основным в отечественной школе цитологов стало изучение функционального значения органелл, включений, их цитотопографии при различных физиологических состояниях клетки, а также вопросы

цитохимии, механизма деления клеток, вопросы клеточной адаптации (Д. Н. Насонов, В. Я. Александров, И. К. Кольцов, П. В. Макаров, Г. Гурвич, Б. В. Кедровский, Г. И. Роскин, В. Я. Рубашкин, Л. Б. Левинсон и др.). Ценными для развития цитофизиологии явились работы Д. Н. Насонова, Я. Александрова по прижизненному изучению клеток, окрашенных нейтральным красным. На основании этих опытов Д. Н. Насоновым и В. Я. Александровым была создана теория паранекроза. В области эмбриологии нашли отражение экспериментальные методы, позволяющие уточнить представления об организаторах зародышевого развития, нейрогуморальной регуляции и влиянии факторов внешней среды на процессы эмбриогенеза. В 1930-1940-е гг. успешно разрабатывались вопросы эволюционной эмбриологии большим отрядом отечественных эмбриологов во главе с академиком А. Н. Северцовым (1866-1936). Отклонения в темпах последовательного индивидуального развития органов по сравнению с очередностью эволюционного развития, по мнению академика П. К. Анохина, обусловлено развитием функциональных систем организма первоочередной важности, обеспечивающих кровообращение, акт приема пищи и др. Большое значение в развитии эмбриологии сыграли работы Д. П. Филатова (1876-1943) и П. П. Иванова (1872-1942).

Д. П. Филатов изучал характер формообразовательных влияний одних частей зародыша на другие. Совокупность непосредственно взаимодействующих частей, участвующих в создании целостного органа или системы, Д. П. Филатов называл формообразовательным аппаратом. Такими аппаратами являются, например, хордомезодерма и спинная эктодерма, дающие у позвоночных начало всем осевым органам зародыша. П. П. Иванов внес вклад в разработку ряда важнейших эмбриологических проблем, таких как взаимодействие эмбрионального развития и регенерации, влияние факторов среды на дифференцировку тканевых

зачатков. Он показал наличие двух организаторов, стимулирующих органогенез зародыша, - головного и туловищного, создал теорию развития сегментированных животных. Эти и другие положения нашли отражение в его фундаментальном учебнике по общей и сравнительной эмбриологии (1937, 1945). П. Г. Светлов (1892-1974) - ученик и последователь П. П. Иванова, уделил внимание изучению роли ряда экологических факторов (температура, голодание, ионизирующая радиация и др.) в ходе эмбриогенеза. Им установлены критические периоды развития у всех животных (включая млекопитающих), во время которых зародыши оказываются легкоранимыми. Теория критических периодов, разработанная П. Г. Светловым, имеет большое значение для биологии и медицины, так как позволяет прогнозировать возможность возникновения патологии развития и уродств.

Отечественный эмбриолог А. Г. Кнорре (1914-1981) внес ценный вклад в учение о эмбриональных гистогенезах, изложенное в одноименной монографии и в книге по эмбриологии человека. Под редакцией А. Г. Кнорре в середине 70-х гг. XX в. вышел атлас по эмбриологии, подготовленный Л. И. Фалиным и содержащий более 1000 иллюстраций разных стадий развития человека. Вопросы гистогенеза в эмбрионе и внезародышевых органах (плацента, амнион и др.), выяснение роли трофобласта плаценты человека и животных успешно разрабатывались в Новосибирске (М. Я. Субботин, П. В. Дунаев, В. Д. Новиков). Современный период Современный период развития гистологии, цитологии и эмбриологии характеризуется широким и комплексным использованием многих методов исследования. Научно-технический прогресс, успехи развития методов исследования позволили прийти до анализа макромолекулярного уровня организации клеток и неклеточных структур, уточнить представления о процессах дифференцировки, регенерации, молекулярной организации хромосом, расшифровать

генетический код и др. Благодаря этому были созданы основы ультрамикроскопической цитологии и гистологии и разрабатываются проблемы молекулярной биологии.

Заключение

Многоклеточные организмы представляют собой огромное количество клеточных систем, которые связываются с системами тканей и органов, связанных между собой гуморальными и нейрогенными химическими факторами. Количество и выражение отдельных положений современной клеточной теории может варьироваться от одного источника к другому.

Набор функциональных методов очень богат и не полностью освещен в данной работе, поскольку невозможно описать все их разнообразие в таком формате. Современная клеточная биология оперирует множеством методов, позволяющих исследовать клетку не только в ее статическом проявлении, но и разобраться в ее функционировании на молекулярном уровне.

Основная тенденция современной Гистология — переход от описательных исследований к экспериментальным. Главной задачей ставится познание тканевых механизмов развития, деятельности и патологии организмов. Отсюда закономерна направленность многих гистологических работ по пути познания субмикроскопической структуры ткани и специализированных клеток, качественных и количественных особенностей их метаболизма при различных функциональных состояниях. Цель работ — синтез сведений разного уровня исследований (клетка, ткань, тканевые комплексы, орган) применительно к свойствам целостного организма. Значение клеточной теории в развитии науки состоит в том, что благодаря ей стало понятно, что клетка – это важнейшая составляющая часть всех живых организмов. Клеточная теория позволила прийти к выводу о сходстве химического состава всех клеток и ещё раз подтвердила единство всего органического мира. Развитие гистологии позволило ускорить рост развития таких наук как, цитология и эмбриология. Эти науки тесно взаимосвязаны друг с другом, они позволяют изучить клеточное строение организма его тканей и клеток. А также изучить развитие организма в онтогенезе, то есть с начала рождения до смерти. По

сей день эти науки ускоряют свой рост, открываются новые теории и разработки в этих сферах изучения

Список использованной литературы:

1. Гистология цитология эмбриология Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н.
2. Гистология, цитология и эмбриология: Учеб. для мед. Вузов М.:Медицинское информационное агентство, 2007. - 600 с. ù2. Улумбеков Э.Г., Челышев Ю.А.
- 3.Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология. В 3-х т. М.: Мир, 1982.
4. <https://foxford.ru/wiki/biologiya/metody-izucheniya-kletki>
5. <https://labcentrifuge.ru/information/articles/553/>
- 6.<https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B8%D1%81%D1%82%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%8F>
7. <https://studfile.net/preview/1577711/>