

Міністерство охорони здоров'я України
Українська медична стоматологічна академія

«Затверджено»
на засіданні кафедри
медичної інформатики,
медичної і біологічної фізики
«27» серпня 2020 р.
протокол №1 від «27» серпня 2020 р.
Зав. кафедри _____ доцент Сілкова О.В.



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ДЛЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ
ПІД ЧАС ПІДГОТОВКИ ДО ПРАКТИЧНОГО ЗАНЯТТЯ

Навчальна дисципліна	Медична і біологічна фізика
Модуль №2	Основи медичної фізики
Змістовний модуль №3	Основи медичної фізики
Тема заняття	Оптична мікроскопія. Прийоми мікроскопії
Курс	I, II
Факультет	Медичний № 1,2, стоматологічний

1. Актуальність теми:

Як показує історія, найбільші досягнення в біологічних дослідженнях, а втім, і в усіх інших галузях природознавства, пов'язані з застосуванням нових фізичних методів. У цьому ряду поява оптичного мікроскопа дала таку вражаючу низку відкриттів, що його значення для науки важко переоцінити. Зокрема в біології, відразу ж після появи в XVII столітті мікроскопа, була з'ясована клітинна будова живих тканин, виявлені мікроорганізми, форменні елементи крові і т.д.

Разом з тим, до теперішнього часу, оптична мікроскопія є однією з найголовніших складових біофізичного експерименту.

2. Конкретні цілі:

Аналізувати зображення, які дає лінза, об'єктив, окуляр, мікроскоп. Пояснювати, що називається кратністю об'єктива та окуляра, загальним збільшенням мікроскопа. Тракувати основні характеристики мікроскопа: збільшення, розділювальна здатність. Малювати хід променів у тонких лінзах, оптичному мікроскопі. Проаналізувати деякі спеціальні методи оптичної мікроскопії.

3. Базові знання, вміння, навички, необхідні для вивчення теми (міждисциплінарна інтеграція):

Назви попередніх дисциплін	Отримані навички
1. Біологія	Називати методи вивчення клітин, зокрема світлову мікроскопію; порівнювати будову різних клітин; розрізняти тканини багатоклітинних організмів; дотримуватися правил виготовлення мікропрепаратів.
2. Фізика	Називати основні етапи розвитку оптики як науки, значення швидкості поширення світла у вакуумі, повітрі, воді й різних розчинах, наводити приклади застосування оптичних явищ у техніці й виробництві, види джерел світла; розрізняє хвильові й квантові властивості світла; формулює закони заломлення світла, демонструвати знання понять: світлового променя, точкового джерела світла, тонкої лінзи, фокусної відстані, оптичної сили лінзи, показника заломлення світла, дисперсії світла, значення швидкості поширення світла у вакуумі, сили світла і освітленості; закони прямолінійного поширення, відбивання і заломлення світла; формулу тонкої лінзи, принцип дії найпростіших оптичних приладів; одиниці оптичної сили та фокусної відстані лінзи, спектральний склад природного світла; характеризувати суть оптичних явищ: поширення світла в різних середовищах, розсіювання й поглинання світла, інтерференцію й дифракцію світлових хвиль, поляризацію й дисперсію світла; застосовувати набуті знання в процесі розв'язування фізичних задач, виконання лабораторних робіт; будувати хід променів при побудові зображень, отриманих за допомогою тонкої лінзи, вимірювати фокусну відстань та визначати оптичну силу лінзи; користуватися лінзами; складати найпростіші оптичні прилади.
2. Математика	Застосовувати знання тригонометричних функцій; проводити розрахунки, застосовуючи властивості дробу та степеню, тотожні перетворення виразів, будувати промінь, відрізок, кут.

4. Завдання для самостійної роботи під час підготовки до заняття.

4.1. Перелік основних термінів, параметрів, характеристик, які повинен засвоїти студент при підготовці до заняття:

№ п/п	Термін	Визначення
1	Лінза	найпростіший оптичний елемент, виготовлений із прозорого матеріалу, обмежений двома заломлюючими поверхнями, які мають спільну вісь, або взаємно перпендикулярні площини симетрії.
2	Оптична сила	характеристика здатності оптичної системи фокусувати світло.
3	Оптична система	сукупність оптичних деталей, встановлених у положення, задане розрахунком і конструкцією.
4	Фокусна відстань (фокальна відстань)	характеристика оптичної системи, відстань від центра оптичної системи до її головного фокуса.
5	Мікроскоп	прилад для розглядання дрібних, невидимих для неозброєного ока, предметів у збільшеному зображенні.
6	Оптичний мікроскоп	мікроскоп, в конструкції якого використовується набір лінз, які при перегляді збільшують зображення дрібних об'єктів.
7	Окуляр	повернена до ока частина оптичної системи мікроскопа, за допомогою якої розглядається дійсне зображення, яке формує об'єктив.
8	Об'єктив	оптична система, призначена для створення дійсного оптичного зображення на приймачі світлової енергії.
9	Роздільна здатність мікроскопа	здатність мікроскопа давати роздільні зображення двох поруч розташованих точок досліджуваного об'єкта.
10	Границя роздільності мікроскопа	найменша відстань між двома точками, на якій вони спостерігаються в мікроскопі роздільно
11	Імерсія	рідина, якою заповнюють простір між об'єктом і об'єктивом, для збільшення показника заломлення, що збільшує роздільну здатність мікроскопа.
12	Апертурний кут	кут, який утворений крайніми променями конусного світлового пучка, що входить в об'єктив.
13	Корисне збільшення мікроскопа	відношення границі роздільності ока до границі роздільності мікроскопа.
14	Збільшення мікроскопа	відношення кута зору, під яким видно зображення предмета в окулярі, до кута зору, під яким предмет видно «неозброєним» оком з відстані найкращого зору.

4.2. Теоретичні питання до заняття:

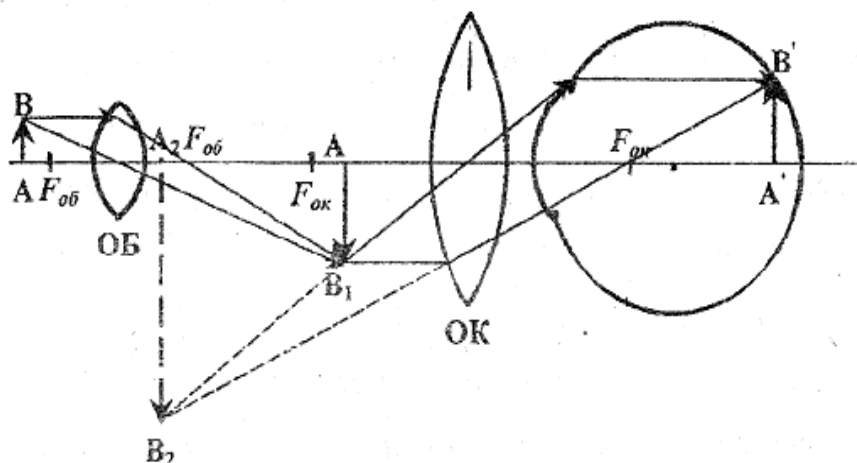
1. Оптична система та будова біологічного мікроскопа.
2. Типи лінз та побудова зображення в них.
3. Хід променів у оптичному мікроскопі.
4. Кількісні характеристики мікроскопа (збільшення об'єктива; збільшення окуляра; загальне збільшення мікроскопа; числова апертура).
5. Роздільна здатність оптичних систем.
6. Спеціальні методи мікроскопії (ультрафіолетова; імерсійна; флуоресцентна; фазово-контрастна; мікропроекція і мікрофоторграфія; визначення величини предмета; метод темного поля; капіляроскопія).
7. Що таке мікроскоп, для чого він використовується в медико-біологічних дослідженнях?
8. Як визначається збільшення мікроскопа від чого воно залежить?
9. Що таке роздільна здатність мікроскопа? Її максимальне значення.
10. Що таке числова апертура?
11. Які є спеціальні методи мікроскопії?

4.3. Практичні роботи (завдання), які виконуються на занятті:

1. Оволодіти технікою розв'язування типових та ситуаційних задач;
2. Набути навичок роботи з мікроскопом;
3. Навчитися вимірювати мікрооб'єкти за допомогою оптичного мікроскопа.
4. Графічно будувати зображення предмета, хід променів у мікроскопі; пояснювати методи спеціальної мікроскопії.

5. Зміст теми:

Мікроскоп – це оптичний прилад для отримання збільшених зображень об'єктів (або деталей їх структури), які невидимі неозброєним оком. Типова оптична схема мікроскопа, яка показує принцип одержання збільшеного зображення, приведена на малюнку 1.



Малюнок 1

Мікроскоп складається з двох збірних лінзових систем: об'єктива з фокусною відстанню f , яка дорівнює декільком міліметрам, та окуляра з фокусною відстанню f_1 , яка дорівнює декільком сантиметрам. Об'єкт A розміщується безпосередньо перед фокусом F об'єктива, а його зображення A_1 виникає на відстані, більшій ніж $2f$. Окуляр розташований так, щоб це зображення знаходилось безпосередньо за фокусом F окуляра.

Кінцеве зображення A_2 , яке виникає перед окуляром буде збільшеним, уявним та перевернутим. Із суто геометричних міркувань можна показати, що загальне збільшення мікроскопа V дорівнює добутку окремих збільшень об'єктива V_1 та окуляра V_2 , або

$$V = V_1 \cdot V_2 = \frac{S \cdot l}{ff_1}, \quad (1)$$

де l – оптична довжина тубуса (відстань між фокальними точками F і F_1), f і f_1 – фокусні відстані об'єктива та окуляра відповідно, S – відстань найкращого зору (25 см для нормального ока). Із формули (1) можна зробити висновок, що збільшення V в оптичному мікроскопі може бути скільки завгодно великим, а межа розподілу d – найменша відстань між двома точками об'єкту, які сприймаються в мікроскопі розподілено – скільки завгодно малою. Але урахування хвильової природи світла, зокрема дифракції, накладає на ці висновки суттєві обмеження.

Так, зазначена межа розподілу d дорівнює:

$$d = \frac{0,6\lambda}{n \sin \alpha}, \quad (2)$$

де λ – довжина світлової хвилі, n – показник заломлення середовища між об'єктом та об'єктивом, α – кут між крайніми променями світлового пучка, які виходять з точки об'єкта й попадають в об'єктив. Межа розподілу, як видно із формули (2), лімітується усіма трьома параметрами правої частини. Тут і суто тригонометричні обмеження на величину синусу, і неможливість, навіть при застосуванні між об'єктом та об'єктивом

спеціальних середовищ з більшим показником заломлення, суттєво підвищити n і, зрештою, неможливість зменшення довжини хвилі за межі видимого світла. Всі ці обмеження призводять до того, що d не може бути менше, ніж приблизно 0,2 мкм, що відповідає максимальному можливому збільшенню приблизно в 1500 раз.

Подальше збільшення роздільної здатності мікроскопії можливе лише за рахунок зменшення довжини хвилі, наприклад, у приладах з кварцевою оптикою при використанні ультрафіолетового випромінювання й фотографуванні збільшених об'єктів або в електронних мікроскопах, у яких використовуються хвильові властивості прискорених електронів.

Методи оптичної мікроскопії:

- Світлопольова – різновид оптичної (світлової) мікроскопії, де візуалізація досліджуваного об'єкта ґрунтується на вибіркового поглинанні ним або елементами його структури світла з різною довжиною хвилі.
- Темнопольова – заснована на розсіюванні світла мікроскопічними об'єктами. При темнопольовій мікроскопії в об'єктив попадають тільки промені світла, розсіяного об'єктами при бічному висвітленні. Прямі промені від освітлювача в об'єктив не попадають. Застосовується темнопольова мікроскопія переважно для вивчення спірохет і виявлення (але не вивчення морфології) великих вірусів.
- Фазово-контрастна – заснована на інтерференції світла: прозорі об'єкти, що відрізняються за показником заломлення від навколишнього середовища, відображаються як темні на світлому тлі (позитивний контраст), або як світлі на темному тлі (негативний контраст). Фазово-контрастна мікроскопія застосовується для вивчення живих мікроорганізмів і клітин у культурі тканини.
- Люмінесцентна – в основі лежить явище люмінесценції, тобто здатності деяких речовин світитися при опроміненні їх короткохвильовою (синьо-фіолетовою) частиною видимого світла або ультрафіолетових променів з довжиною хвилі, близької до видимого світла. Люмінесцентна мікроскопія використовується в діагностичних цілях для спостереження живих чи фіксованих мікроорганізмів, пофарбованих люмінесцентними барвниками у дуже великих розведеннях, а також при виявленні різних антигенів і антитіл за допомогою імунофлюоресцентного методу.
- Поляризаційна – заснована на явищі поляризації світла і призначена для виявлення об'єктів, що обертають площину поляризації. Застосовується в основному для вивчення мітозу.
- Ультрафіолетова – в основі лежить здатність деяких речовин (ДНК, РНК) поглинати ультрафіолетові промені. Вона дає можливість спостерігати і кількісно встановлювати розподіл цих речовин у клітині без спеціальних методів фарбування.

Лабораторна робота

Тема: Вимірювання мікрооб'єктів за допомогою оптичного мікроскопа.

Мета: вивчити оптичну схему мікроскопа, оволодіти методикою вимірювання розмірів малих об'єктів.

Обладнання: оптичний мікроскоп, об'єкт-мікромір, шліф кістки, шліф зуба, волосина.

Порядок виконання роботи:

1. Вивчити будову та принцип дії оптичного мікроскопа.
2. Встановити за допомогою револьверного механізму об'єктив 8-кратного збільшення.
3. Шляхом повороту дзеркала і переміщення конденсора, максимально освітити поле зору мікроскопа.
4. Розмістити на предметному столику пластинку з об'єкт-мікроміром, який має ціну поділки 1 мм.

5. Обертаючи кремальєра грубого наведення на чіткість, максимально наблизьте об'єктів до поверхні пластинки, спостерігаючи за об'єктивом.
6. Обертаючи кремальєра спочатку грубого, а потім тонкого наведення на чіткість, при піднятті тубуса мікроскопа, отримати чітке зображення об'єкт-мікрометра в полі зору мікроскопа.
7. Переміщуючи об'єкт-мікрометр і обертаючи окуляр, досягти паралельності окулярної і мікрометричної шкали.
8. Порахувати кількість поділок окулярної шкали, які вкладаються в одну поділку об'єкт-мікрометра.
9. Розрахувати ціну поділки при даному збільшенні мікроскопа, розділивши 1мм на кількість полічених поділок.
10. Розрахувати ціну поділки окулярного мікрометра для інших збільшень мікроскопа по співвідношенню збільшень об'єктивів.
11. Розмістити на столику предметне скло з волосинкою.
12. Обертаючи кремальєра грубого і тонкого наведення на чіткість, отримати чітке зображення волосинки в полі зору мікроскопа.
13. Переміщуючи об'єкт і обертаючи окуляр, розташувати зображення поперек окулярної шкали.
14. Оцінити кількість поділок шкали, що укладаються в зображенні об'єкта.
15. Розрахувати діаметр волосинки, скориставшись ціною поділки при даному збільшенні мікроскопа.
16. Встановлюючи за допомогою револьверного механізму інші об'єктиви (змінюючи збільшення мікроскопа), визначити діаметр волосинки при великих збільшеннях.
17. Результати записати в таблицю 1.
18. Зробити висновки.

Таблиця 1.

№ п/п	Збільшення мікроскопа	Ціна поділки окулярного мікрометра, в мм	Діаметр волосини, в поділках шкали	Діаметр волосини, в мм
1.				
2.				
3.				

6. Матеріали для самоконтролю:

А. Завдання для самоконтролю:

1. Якщо предмет знаходиться ближче фокусної відстані від двоопуклої лінзи, то вона дає ... зображення.
 - А) зменшене;
 - В) збільшене;
 - С) уявне;
 - Д) дійсне;
 - Е) пряме.
2. В оптичній мікроскопії об'єкт-мікрометр використовується для:
 - А) визначення збільшення;
 - В) визначення довжини хвилі;
 - С) визначення частоти хвилі;
 - Д) визначення ціни поділки окулярного мікрометра;
 - Е) безпосереднього вимірювання мікрооб'єктів.
3. Роздільна здатність мікроскопа залежить від:
 - А) довжини тубуса;
 - В) довжини світлової хвилі;

- С) апертури об'єктива;
- Д) показника заломлення середовища між об'єктивом і предметом;
- Е) збільшення окуляра.

4. Коли проміжне зображення, створене об'єктивом мікроскопа, знаходиться в передній фокальній площині окуляра, око людини, яка працює з мікроскопом, ...

- А) погано розрізняє деталі зображення;
- В) акомодоване на нескінченність;
- С) адаптоване до максимальної освітленості;
- Д) максимально напружене;
- Е) знаходиться в ненапруженому стані.

5. Збільшення мікроскопа дає можливість оку

- А) працювати без напруги;
- В) працювати з мінімальною напругою;
- С) бачити всі деталі, дозволені окуляром;
- Д) бачити всі деталі, дозволені об'єктивом;
- Е) бачити всі деталі об'єкту.

6. Числова апертура – $A = n \sin \alpha$, де α – це ...

- А) половина повного кута, під яким світло потрапляє в об'єктив мікроскопа;
- В) граничний кут повного внутрішнього відбивання;
- С) повний кут, під яким світло потрапляє в об'єктив мікроскопа;
- Д) кут дифракції світла на препараті;
- Е) максимальний кут розсіювання світла на препараті.

7. Чи можна відповідним підбором окуляра збільшити роздільну здатність мікроскопа, не замінюючи об'єктив мікроскопа?

- А) У одних випадках можливо, а в інших ні.;
- В) Так, якщо око адаптоване до мінімальної освітленості;
- С) Так, якщо використовувати окуляр Гюйгенса.
- Д) Ні.
- Е) Так, якщо око акомодоване на нескінченність.

8. З метою просвітлення оптики окуляра мікроскопа його фронтальну лінзу ...

- А) промивають ефіром;
- В) промивають водою;
- С) промивають спиртом;
- Д) покривають шаром діелектрика, показник заломлення якого більший показника заломлення скла;
- Е) покривають шаром діелектрика, показник заломлення якого менший показника заломлення скла.

9. Капіляроскопія є одним із допоміжних діагностичних методів дослідження, що дає змогу ...

- А) спостерігати функціонування периферичного відділу серцево-судинної системи людини в шкірних покриттях;
- В) спостерігати функціонування периферичного відділу серцево-судинної системи людини в слизових покриттях;
- С) визначити частоту пульсової хвилі;
- Д) визначити розміри капілярів;
- Е) спостерігати капіляри.

Б. Задачі для самоконтролю:

1. Визначити найбільше збільшення біологічного мікроскопа та знайти роздільну здатність при цьому збільшенні (використати мікроскоп).

2. Фокусна відстань об'єктива мікроскопа становить 0,3 см, фокусна відстань окуляра – 2 см. Відстань між заднім фокусом об'єктива і переднім фокусом окуляра дорівнює 25 см. Визначити збільшення мікроскопа.

7. Література:

Основна:

1. Іщейкіна Ю. О. Медична і біологічна фізика : навч. посібник / Іщейкіна Ю. О., Макаренко В. І., Тронь Н. В. – 2-ге видання. – Полтава : Шевченко Р. В., 2014. – 352 с.
2. Медична і біологічна фізика : підруч. для студ. вищ. мед. заклад. III-IV р. акред. / Під заг. ред. О. В. Чалого. – 2-ге вид., переробл. і доп. – К. : Книга плюс, 2005. – 760 с.
3. Медична та біологічна фізика : нац. підруч. для студ. вищ. мед. навч. закладів III-IV рівнів акредитації / О. В. Чалий, Я. В. Цехмістер, Б. Т. Агапов та ін. ; за ред. О. В. Чалого. – Вінниця : Нова книга, 2013. – 528 с.
4. Медична та біологічна фізика : нац. підручник для студ. вищ. мед. (фарм.) навч. заклад. III-IV р. акред. / за ред. О. В. Чалого. – 2-ге вид. – Вінниця : Нова Книга, 2017. – 528 с.
5. Медична та біологічна фізика: підручник для студентів медичних ВНЗ / О. І. Антюфєєва, Л. В. Батюк, М. А. Бондаренко та ін.; за ред. В. Г. Книгавка. – Харків : ХНМУ, 2010. – 370 с.

Додаткова:

1. Владимиров Ю. А. Биофизика / Владимиров Ю. А., Рошупкин Д. И., Потапенко А. Я., Деев А. И. / Под ред. Ю. А. Владимирова. – М. : Медицина, 1983. – 272 с.
2. Вольккенштейн М. В. Биофизика. / Вольккенштейн М. В. – М. : Высшая школа, 1981. – 575 с.
3. Ємчик Л. Ф. Медична і біологічна фізика : Підручник / Л. Ф. Ємчик, Я. М. Кміт. – Львів : Світ, 2003. – 592 с.
4. Зима В. Л. Біофізика. Збірник задач / Зима В. Л. – К. : Вища шк., 2001. – 124 с.
5. Кучерук І. М. Загальний курс фізики. Т. 3. Оптика. Квантова фізика / Кучерук І. М., Горбачук І. Т., Луцик П. П. – К. : Техніка, 1999. – 520 с.
6. Лопушанський Я. Й. Збірник задач і запитань з медичної і біологічної фізики : навч. посібн. для студ. вищ. мед. навч. закл. III-IV рівн. акр. / Я. Й. Лопушанський. – 3-є вид., доповн. і випр. – Вінниця : Нова книга, 2010. – 584 с.
7. Медична і біологічна фізика. / О. В. Чалий, Я. В. Цехмістер, Б. Т. Агапов та ін. / За ред. О. В. Чалого. – К. : Книга плюс, 2004. – 751 с.
8. Медична і біологічна фізика: Практикум : навч.-метод. посіб. для вищ. мед. навч. закл. / за ред. О. В. Чалого. – К. : Книга плюс, 2003. – 217 с.
9. Ремизов А. Н. Медицинская и биологическая физика. / Ремизов А. Н. – М. : Высш. шк., 1992. – 560 с.
10. Ремизов А. Н., Исакова Н. Х., Максина Л. Г. Сборник задач по медицинской и биологической физике. – М: Высш. шк., 1978. – 238 с.
11. Рубин А. Б. Биофизика: учебник / А. Б. Рубин. – М. : КНОРУС, 2016. – 192 с.
12. Русяев В. Ф. Медицинская физика (Сборник вопросов и задач) / Русяев В. Ф., Мищенко С. В., Пронина Н. В. – Полтава, АСМИ, 2001. – 158 с.
13. Тиманюк В. А. Биофизика. / Тиманюк В. А., Животова Е. Н. – Харьков : Изд. НФАУ, 2003. – 704 с.

14. Федішин Я. І. Фізика з основами біофізики. / Федішин Я. І. – Львів : Світ, 2005. – 400 с.
15. Шевченко А. Ф. Основи медичної і біологічної фізики. / Шевченко А. Ф. – К. : Медицина, 2008. – 656 с.

Розробник:

Макаренко О.В. – старший викладач, кандидат педагогічних наук.