**Вопросы к зачёту по спецкурсу «Современные клеточные технологии»**

ФИО студента: Токаева Александра Александровна

Кафедра и № группы: кафедра теории вероятности, 509 группа

1. Когда больше повреждаются клетки в современных технологиях витрификации – при заморозке или при разморозке? Почему?

Клетки в современных технологиях витрификации больше повреждаются при разморозке. Это связано с особенностями формирования кристаллов льда на стадиях заморозки и разморозки. Для образования кристаллов важны два фактора: наличие центров кристаллизации и скорость роста кристаллов. Формирование центров кристаллизации наиболее активно происходит при -40, а рост кристаллов — при -2…-10. Поэтому при заморозке во время охлаждения объекта при проходе стадии рост кристаллов у нас еще нет центров кристаллизации, а при проходе стадии формирования центров кристаллизации уже не происходит активный рост кристаллов, в результате чего мы получаем аморфный (без кристаллов, как янтарь) лед. При разморозке же мы, наоборот, сначала проходим фазу активного формирования центров кристаллизации, а потом — фазу активного роста кристаллов, в результате получаем большие кристаллы льда, то есть аморфный лед превратился в кристаллический. В результате происходит сильнейшее повреждение клеток внутриклеточным льдом, и клетка погибает. Этого можно попытаться избежать путем максимально быстрого размораживания (для предотвращения роста льда).

2. От чего и по какому закону зависит вероятность образования аморфного льда при витрификации?

Вероятность образования аморфного льда при витрификации зависит от трех факторов: она прямо пропорциональна скорости заморозки и вязкости жидкости, и обратно пропорциональна линейному размеру клетки. То есть чем быстрее мы проводим заморозку, чем более вязкая жидкость, и чем меньший размер клетки — тем больше вероятность успешного образования безкристаллического льда.

3. Опишите, какие процессы и в какой последовательности происходят внутри и снаружи клетки при её заморозке и разморозке.

При заморозке:

* Образование льда снаружи клеток, так как снаружи клеток концентрация биомакромолекул и ионов меньше, чем внутри.
* Повышение осмомолярности снаружи клеток в результате вытеснения растворенных ионов и молекул из внеклеточного льда.
* Обезвоживание клеток вследствие гипертонического окружения, съёживание клетки и достижение ею критического минимального объёма, критическое повышение концентрации солей внутри клетки.
* Изменение трансмембранного потенциала и электрический пробой клеточных мембран.

При разморозке:

* Аморфный лёд переходит в кристаллический при приближении к точке кристаллизации (около -20), так как аморфный лёд метастабильный.
* Запуск апоптоза (гибели) поврежденных клеток
* При недостаточно медленной разморозке вода не выходит из клеток в достаточном количестве, и происходит рост кристаллов воды внутри клеток, что приводит к сильнейшему повреждению клеток внутриклеточными кристаллами воды и сопровождается разрывами мембран

4. Какие криопротекторы Вы знаете? Их классификация.

Криопротекторы бывают двух типов: мембранопронепроникающие (защищают от возникновения внеклеточного льда) и мембранопроникающие (проникают внутрь клетки и защищают от образования внутриклеточного льда). К классу мембранопронепроникающих криопротекторов относятся сахара, полимеры, например, сукроза, трегалоза, поливинилалкоголь. К классу мембранопроникающих криопротекторов относятся производные полиолов (диолов, глицерина), амидов, сульфоксидов.

5. Чему равна температура жидкого азота?

Жидкий азот имеет точку кипения 77,4 K (−195,75 °C), то есть если мы хотим, чтобы азот находился в жидком агрегатном состоянии — его температура должна быть ниже температуры кипения.

6. Какие клетки лучше выживают при заморозке/разморозке – большие или маленькие? Почему?

При заморозке/разморозке лучше вызывают маленькие клетки, потому что в соответствии с вышепреведенной формулой для вероятности образования аморфного льда, эта вероятность тем выше, чем меньше объем, то есть у маленьких клеток больше шансов избежать образования льда и, соответственно, не повредиться.

7. Какие методы контраста в микроскопии Вы знаете?

В микроскопии применяются следующие методы контраста:

* Bright field (светлый фон)
* Dark field (темный фон)
* Phase contrast (при этом методе сдвиг фаз электромагнитной волны трансформируется в контраст интенсивности)
* Hoffman Modulation Contrast
* Differential interference contrast (ДИК) (тоже основан на интерференции)

8. У какого объектива больше рабочее расстояние: 20х/1.40 или 20х/0.44 ?

Рабочее расстояние больше у 20х/0.44, потому что у него числовая апертура меньше, а увеличение такое же, как у 20х/1.40

9. Как должны соотноситься между собой апертура освещения и апертура наблюдения?

Они должны быть равны.

10. Чему равна толщина покровного стёклышка?

0.13-0.17мм

11. У какого объектива больше разрешающая способность: 20х/1.40 или 20х/0.44 ?

Разрешающая способность больше у 20х/1.40, потому что у него числовая апертура больше, а увеличение такое же, как у 20х/0.44

12. Для каких наблюдений используются инвертированные, прямые и стереомикроскопы?

Стереомикроскоп предназначен для наблюдения образцов в 3D при небольшом увеличении.

Прямой микроскоп позволяет исследовать тонкий плоский с обеих сторон образец.

Инвертированный микроскоп позволяет исследовать **габаритные объекты** или объекты, **расположенные в специальной посуде** (чашках Петри, колбах).

13. Какие чашки Петри надо использовать при наблюдении объекта в поляризованном свете?

Стеклянные

14. В какой части оптического пути находится поляризатор?

Поляризатор расположен перед конденсором, то есть ниже предмета (поляризатор поляризует свет, поступающий на исследуемый объект)

15. В какой части оптического пути находится анализатор?

Анализатор расположен в тубусе микроскопа, посередине между объективом и окуляром

16. Для чего используется линза Бертрана («телескоп»)?

Линза Бертрана применяется в поляризационной микроскопии для наблюдения коноскопической фигуры в увеличенном виде.