Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей.
Книга 3. Микроскопия прозрачных объектов. Методы контрастирования в микроскопии.

Авторы:
Краевой Сергей Александрович
Колтовой Николай Алексеевич

Москва
2013

Аннотация.
При изучении структуры и процессов, происходящих в тонких непрозрачных объектах (пленки жидкости, тонкая капля жидкости) необходимо применение различных специальных методов микроскопии. В книге рассматриваются особенности микроскопии прозрачных объектов.

Глава 1.Особенности наблюдения оптически неоднородных объектов.

1.0. Интерференционные полосы.

1.1. Вставки (диафрагмы).

1.2. Центральное (симметричное) освещение.
- 1.2.1 Светлопольное освещение - Полоска Бекке.
- 1.2.2 Кольцевое экранирование.
- 1.2.3 Темнопольное освещение.
- 1.2.4 Кольцевая вставка.
- 1.2.5 Двойное симметричное диафрагмирование.
- 1.2.6 Темнопольное двойное диафрагмирование.
- 1.2.7 Компьютерный метод косого симметричного освещения.

1.3. Косое (несимметричное) освещение.
- 1.3.1 Косое освещение - полуплоскость.
- 1.3.2 Косое освещение - азимутальное.
- 1.3.3 Двойное несимметричное диафрагмирование.
- 1.3.4 Компьютерный метод косого несимметричного освещения.
- 1.3.5 Теневой метод.

1.4. Проблемы фокусировки для неоднородных сред.

1.5. Изменение изображения объектов при смещении столика микроскопа.
- 1.5.1 Изображение светящейся точки.
- 1.5.2 Изображения различных объектов при смещении столика микроскопа.

Глава 2. Оптические методы контрастирования.

2.1 Светлое поле .
2.2 Поляризационный метод.
2.3. Темнопольный метод.
- 2.3.1 Стандартный темнопольный метод.
- 2.3.2 Полихроматический контраст (цветовой контраст).
- 2.3.3 Ультрамикроскопия.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

2.4. Метод фазового контраста.
2.4.1 Стандартный метод фазового контраста.
2.4.2 Цветной фазовый контраст.
2.4.3 Аподизированный фазовый контраст (Nikon).
2.4.4 Варел контраст (Zeiss).
2.4.5 Компьютерный метод фазового контраста.
2.5. Аноптральный метод.
2.6. Хоффмановский модуляционный контраст.
2.7. Дифференциальный интерференционный контраст.
2.8. Флуоресцентный метод.
2.9. Конфокальная микроскопия.
2.10. Окраска препаратов.
2.11. Структурное освещение.
2.12. Интерференционная микроскопия.
2.13. Метод зеркального освещения.

Глава 3. Компьютерные методы контрастирования.

3.1 Контрастирование на этапе регистрации изображений.
3.1.1 Оптическое контрастирование в микроскопе.
3.1.2 Аппаратное контрастирование в цифровой камере.
3.1.3 Фотографическое цветоделение.

3.2 Контрастирование при обработки отдельного изображения.
3.2.1 Программное контрастирование.
3.2.2 Псевдорельеф.
3.2.3 Выделение контуров.

3.3 Контрастирование при совместной обработке нескольких изображений.
3.3.1 Компьютерный метод косого симметричного освещения.
3.3.2 Компьютерный метод фазового контраста.
3.3.3 Расфокусировка.
3.3.4 Псевдорельеф.
3.3.5 Мультиспектральная обработка изображений.

3.4 Контрастирование при отображении изображения.
3.4.1 Аппаратное контрастирование при отображении.
3.4.2 Псевдоцвет (pseudocolor), цветовое кодирование.
3.4.3 Метод цифровой трансформации.

Глава 4. Спектральные методы контрастирования.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Глава 1. Особенности наблюдения оптически неоднородных объектов.

При наблюдении в микроскоп тонких прозрачных неоднородных пленок возникают различные эффекты, связанные с существованием оптического рельефа пленок. Неоднородный оптический рельеф может вызываться переменной толщиной пленки, или неоднородным составом, и связанным с этим различным показателем преломления в различных местах пленки. Иногда имеет место и переменная толщина и переменный показатель преломления. Рассмотрим различные способы анализа неоднородных пленок с помощью микроскопа. Основную роль играет эффект поведения света на границе двух сред с различным показателем преломления. На границе между двумя различно преломляющими свет средами свет преломляется, отражается и дифрагирует. Видимость границы двух сред в основном определяется явлением дифракции. Лучше всего наблюдать дифракцию при освещении параллельным пучком света, т.е. когда апертурная диафрагма максимально закрыта. Дифракция света на пограничном слое вместе с дифракцией света у отверстия диафрагмы объектива при фокусировке на границе формирует систему интерференционных полос. Интерференционные полосы имеют максимумы и минимумы по обе стороны границы. По мере того, как падающий свет перестает быть параллельным (при увеличении апертуры конденсора), внешние максимумы все более исчезают. И наконец остается только один светлый максимум (полоска Бекке). При полном открывании апертуры конденсора исчезает и этот максимум.

Обычно эффект размывания границ и возникновение темных и светлых контуров вокруг объектов в микроскопии рассматривается как нежелательный эффект. Однако, при правильное интерпретации искаженные изображения содержат много дополнительной информации. При исследовании прозрачных объектов граничные оптические эффекты, вызванные неоднородностями показателя преломления, являются очень информативными. И задача состоит в том чтобы восстановить оптический рельеф препарата - зависимость толщины или показателя преломления (при постоянной толщине) препарата. Задача восстановления рельефа решается на основании обработки исходного изображения со сложной оптической структурой границы и серии изображений, снятых при различных положениях предметного столика по высоте.

Как показак Spangenberg, дифракционные спектры - полоски по обе стороны границы раздела, более интенсивные со стороны более преломляющего вещества, наблюдаются, как это и следовало ожидать, очень резко только в том случае, если толщина слоя жидкости приближается к длине волны того монохроматического света, в котором ведется наблюдение.

Большое применение и развитие получили методы изучения сред с неоднородным показателем преломления в минералогии. Для исследования показателя преломления микрокристаллов под микроскопом применяется иммерсионный метод исследования. В этом случае микрокристалл помещается в иммерсионную жидкость и анализируется картина распространения света.

1.0.Интерференционные полосы.

В тонких пленках возможно наблюдение интерференционных полос. Интерференционные полосы возникают в результате интерференции световых лучей, прошедших через различные участки пленки. Если пленка имеет постоянную толщину, то интерференционных полос не возникает. Интерференционные полосы возникают из-за различной толщины пленки в разных местах. Пример интерференции в тонких пленках - интерференция в пленке бензина, разлитом на поверхность воды. Так как бензин не растворяется в воде, то он растекается по поверхности воды в виде тонкий пленки переменной толщины. В связи с этим возникает интерференция лучей света.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

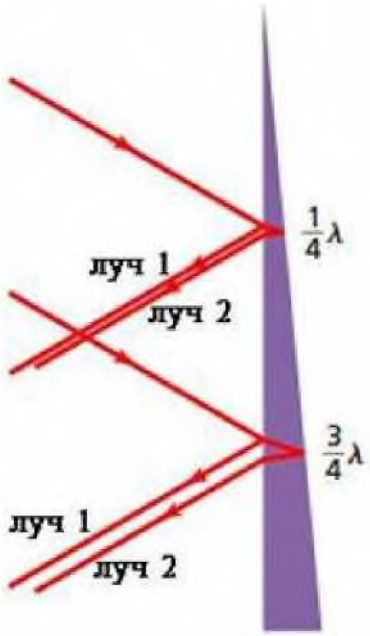


Рис. 3-1. Возникновение интерференции в пленке разной толщины.

При наблюдении препаратов высохшей капли сыворотки крови полученной методом открытой капли интерференционная картина наблюдается в области ядер. При наблюдении препаратов высохшей капли сыворотки крови полученной методом закрытой капли интерференционная картина наблюдается в области воздушных пузырей.

1.1. Вставки (диафрагмы).

Большинство методов контрастирование основано на использовании различных вставок (диафрагм). Для различных методов контрастирования используются различные виды вставок (диафрагм) - ирисовая, кольцевая, полуплоскость, сектор.

Для диафрагм существенное значение имеют следующие параметры - место установки, форма и оптические свойства.

1- Место установки диафрагмы. Существует две плоскости, в которых располагаются диафрагмы: плоскость апертурной диафрагмы конденсора микроскопа, и верхняя фокальная плоскость объектива микроскопа (выходной зрачок объектива). Эти две плоскости являются оптически сопряженными. В верхней фокальной плоскости объектива формируется изображение диафрагмы, расположенной в плоскости апертурной диафрагмы конденсора.

На самом деле имеет еще третье место для размещения диафрагмы - плоскость полевой диафрагмы осветителя. Если в этой плоскости разместить диафрагму с прямолинейным краем, то в плоскости препарата будет изображение резкого края, и реализуется теневой метод освещения, который так же позволяет выявлять оптические неоднородности.

Если какой-то метод контрастирования реализуется с помощью установки специальной диафрагмы в области апертуры конденсора, то тот же самый метод контрастирования можно реализовать путем установки аналогичной диафрагмы в верхней фокальной плоскости объектива микроскопа.

Метод двойного контрастирования состоит в том, что устанавливается сразу две диафрагмы. Форма диафрагмы в области верхней фокальной плоскости объектива является дополнительной для диафрагмы, установленной а плоскости апертурной диафрагмы конденсора. Дополнительная форма означает, что если совместить две диафрагмы, то они перекроют весь световой поток.

2- Форма диафрагмы. Можно выделить два основных случая:

а- симметричная форма. Симметричная форма диафрагмы позволяет выделять сразу все

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

границы с различной ориентацией, например, кольцевые диафрагмы.
b- несимметричная форма. Несимметричная форма диафрагмы позволяет выделять границы объектов с определенной ориентацией. Например, косое освещение с помощью диафрагмы с ровным краем (полуплоскость) позволяет выделять границы, параллельные ориентации диафрагмы.

Можно так же выделить следующие два типа диафрагм:
-фиксированные диафрагмы (кольцевые диафрагмы),
-регулируемые диафрагмы, которые допускают некоторую регулировку. Примером таких диафрагм являются ирисовые диафрагмы, у которых регулируется диаметр отверстия. Так же бывают диафрагмы в виде полуплоскости для создания косого освещения, которые можно поворачивать относительно оптической оси. Это позволяет регулировать угол, под которым производится косое освещение.

3- Оптические свойства диафрагмы. Можно выделить следующие случаи:
a- оптически непрозрачные диафрагмы. Не прозрачные диафрагмы не пропускают свет и полностью перекрывают световой поток. Примеры непрозрачных диафрагм: ирисовые диафрагмы конденсора и объектива, кольцевая диафрагма конденсора для режима темного поля и косого освещения.
b- цветные диафрагмы. Если вместо непрозрачной диафрагмы использовать цветную диафрагму такой же формы, то получится цветная модификация соответствующего метода контрастирования. Примеры цветных диафрагм: цветные диафрагмы для режима темного поля (полихроматический контраст, освещение по Рейнбергу).
c- полупрозрачные вставки. Полупрозрачные вставки используются для фазового метода контраста.
d- цветные полупрозрачные вставки. Цветные полупрозрачные вставки используются для цветовой модификации метода фазового контраста.

1.2 Центральное (симметричное) освещение.

1.2.1 Полоска Бекке.

Полоской Бекке называется тонкая каемка, немного более светлая или темная (в зависимости от фокусировки), чем окружающий фон, которая возникает на границе двух сред с разным показателем преломления. При точной фокусировке на границе полоска Бекке находится прямо на границе.

Это явление было впервые описано Машке (Maschke O.) в 1880 году. Повторно это явление открыл и ввел в практику минералогических исследований Бекке (Friedrich Johann Karl Backe (1855-1931)) в 1892 году. В честь него и названа эта полоска.

Основное правило: при опускании столика полоска Бекке перемещается в сторону среды с более высоким показателем преломления. И наоборот, при поднимании столика полоска Бекке перемещается в сторону среды с более низким показателем преломления.

Условия для оптимального наблюдения полоски Бекке:
1- Объект должен быть освещен симметричным пучком света. Это достигается при правильной настройке конденсора.
2- Апертурная диафрагма конденсора должна быть прикрыта, чтобы убрать наиболее косые лучи. Эти лучи уменьшают контрастность полоски Бекке, или даже делают ее незаметной. При слишком сильно закрытой апертурной диафрагме иногда появляются дифракционные полосы, которые маскируют полоску Бекке. Оптимальное положение апертурной диафрагмы подбирается экспериментально.

3- Полоска Бекке сильнее проявляется при использовании объективов с большим увеличением.
4- Конденсор желательно опустить как можно ниже.
5- Наиболее четко полоска Бекке проявляется при использовании монохроматического света.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

6- полоски Бекке тем более контрастны, чем тоньше слой жидкости, в которой проводится наблюдение.

Один из эффектов, благодаря которому возникает полоска Бекке состоит в том, что на границе двух сред происходит полное внутреннее отражение лучей со стороны более плотной среды. Это вызывает увеличение яркости со стороны более плотной среды.

Минимальный размер зерен, при котором видна полоска Беке, составляет 1мкм. С помощью полоски Бекке можно улавливать разницу между показателями преломления двух сред порядка 0,001.

Необходимо отметить, что показатель преломления жидкости зависит от температуры. При изменении температуры на 1 градус показатель преломления обычно изменяется на 0,001.

Объяснение возникновения полоски Бекке.

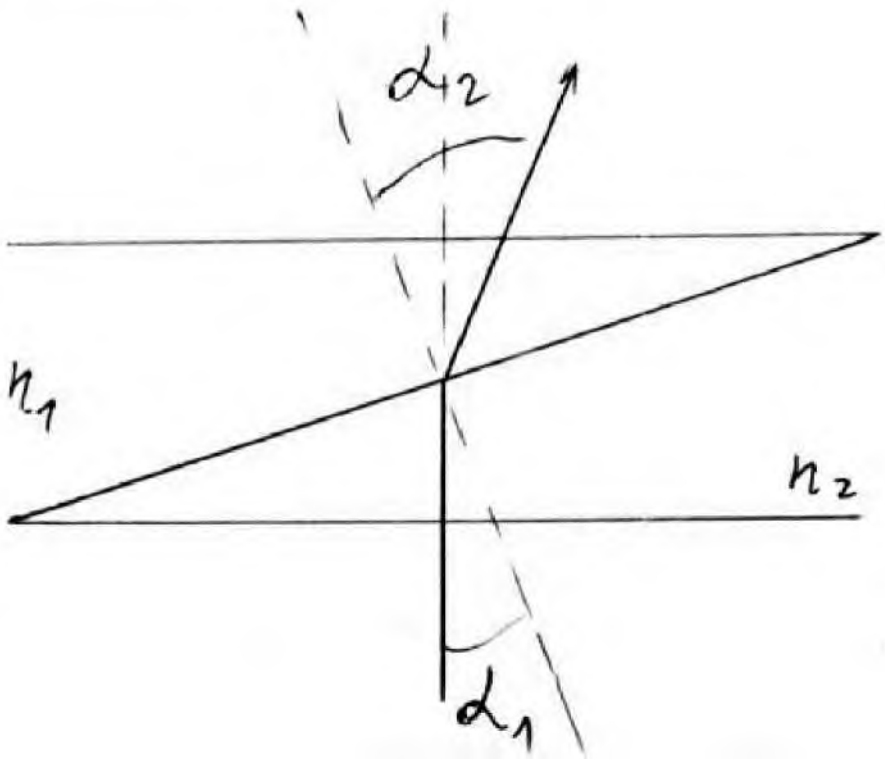


Рис. 3-2. Ход лучей на границе двух сред с разным показателем преломления, n1<n2.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

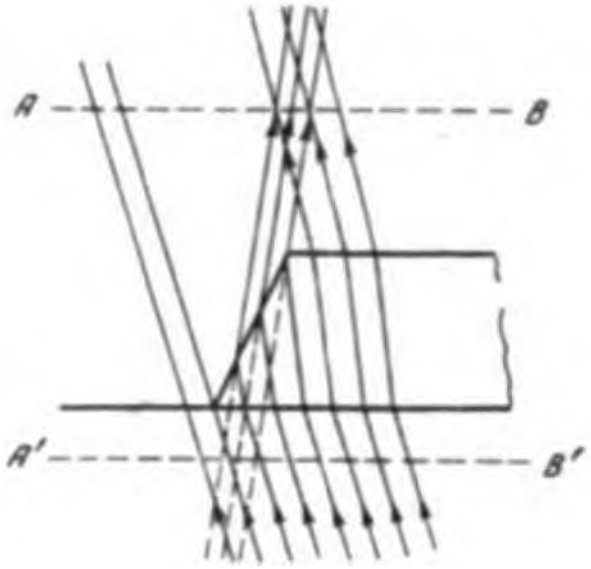


Рис. 3-3. Возникновение полоски Бекке.

При переходе в менее плотную среду луч света отклоняется от нормали. Поток света отклоняется в сторону среды с более высоким показателем преломления.

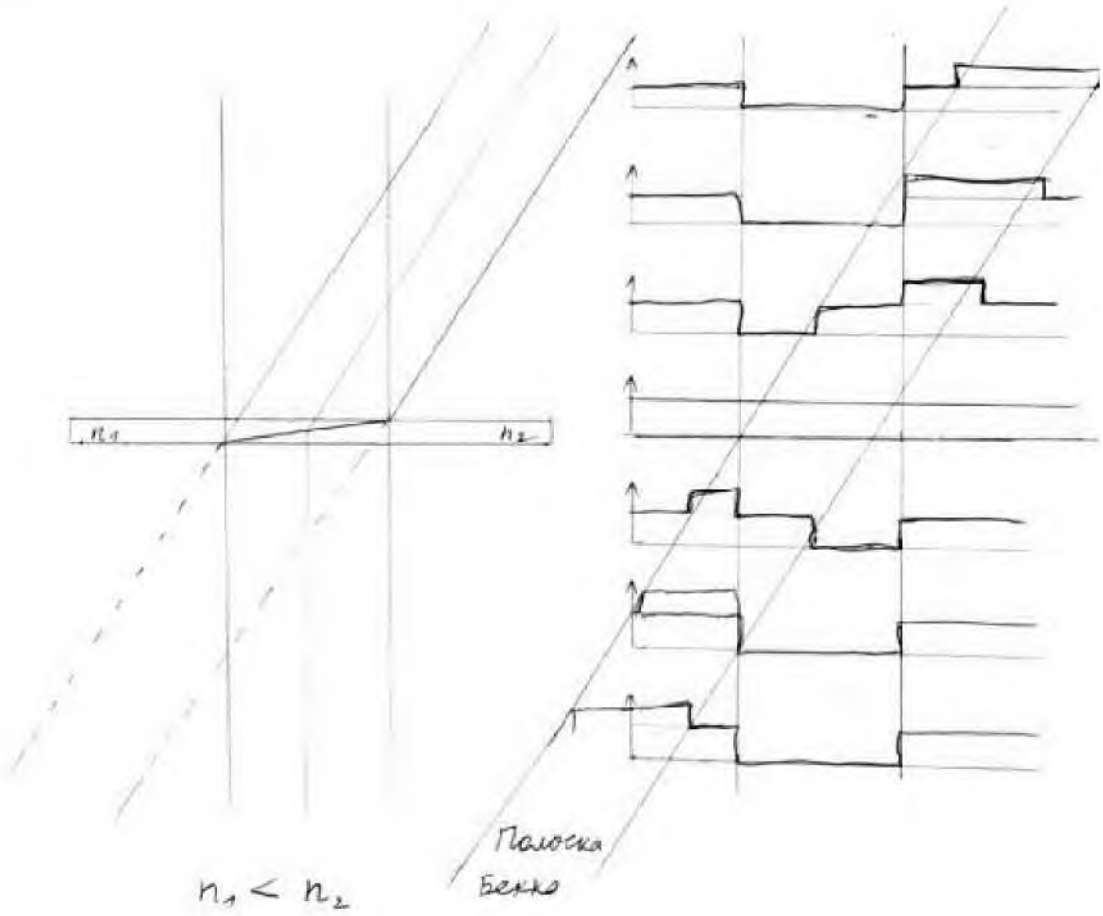


Рис.3-4. Изображения границы двух сред с различным показателем преломления. Полоска Бекке.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Если размер объекта незначительно превышает ширину границы перехода между средами, то можно наблюдать эффект пропадания границы объекта два раза - при точной фокусировке на границе, и в сопряженном положении столика.
Этот эффект можно наблюдать для капель и для волокон в жидкой среде.

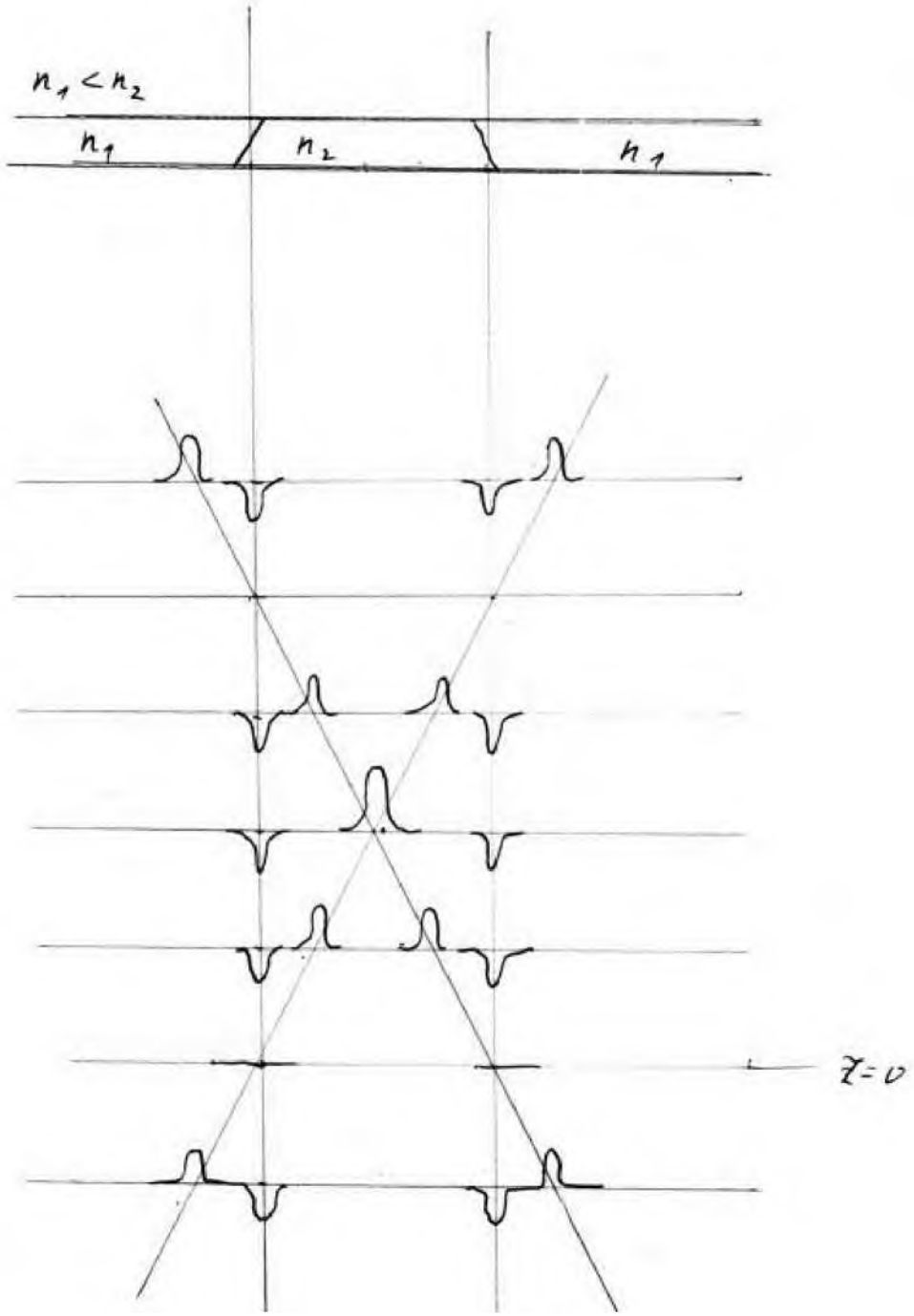


Рис. 3-5. Изображения полоски Бекке для объекта малого размера.

Как видно из рисунка, ширина полоски Бекке пропорциональна ширине переходной границы между двумя средами с разным показателем преломления. Изображение переходной границы между средами всегда черное. При смещении столика темная граница всегда стоит на месте, а светлая полоска Бекке двигается. Смещение полоски Бекке пропорционально смещению столика микроскопа. При опускании столика полоска Бекке смещается в сторону среды с более высоким показателем преломления. При точной фокусировке на границу двух сред полоска Бекке пропадает, и границу двух сред не видно. Однако, пропадание видимости границы возможно только в случае идеального очень тонкого препарата. В реальном препарате с конечной толщиной в формирование изображения вносят вклад более высоко и низко лежащие слои. В связи с этим изображение границы не пропадает полностью, а частично остается видимой.

Изображение полоски Бекке является более четким, если граница перехода между двумя

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

областями с разным показателем преломления является более четкой (а не размытой).

Два важных случая наблюдения полоски Бекке - капля и волокно в жидкости.

1- Капля в жидкости (сферический объект). Пусть в жидкости 1 с показатель преломления n1 находится капля другой жидкости 2 с показателем преломления n2.

Случай n1<n2 соответствует выпуклой линзе, или пузырьку масла в воде.

Если n1<n2, то при опускании столика полоска Бекке двигается к центру капли и в некоторый момент сливаются в центре в яркую точку. Капля становится яркой при опускании столика.

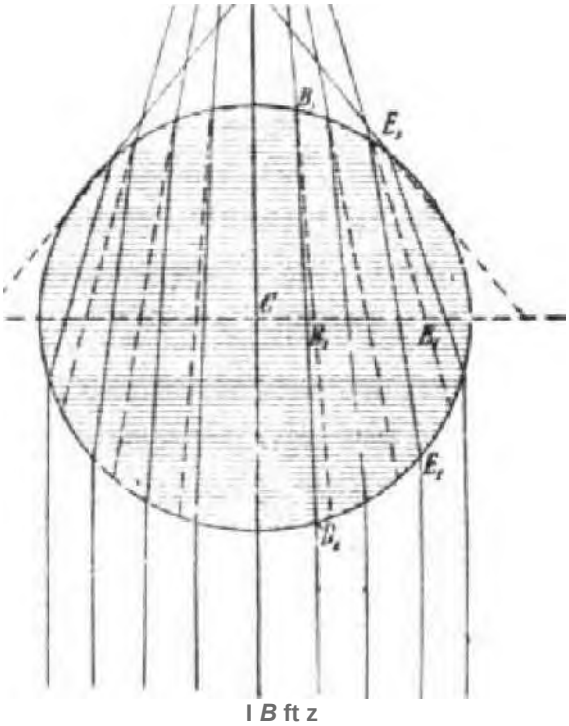
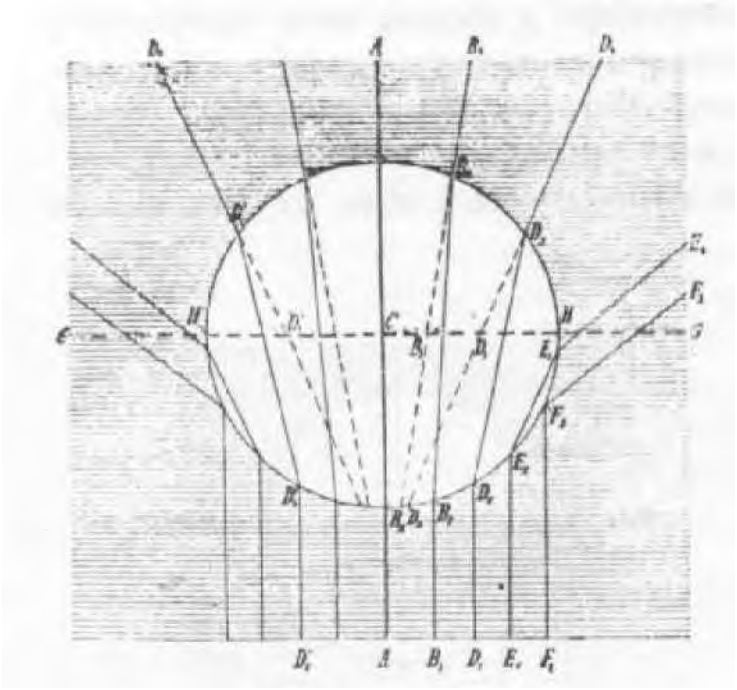


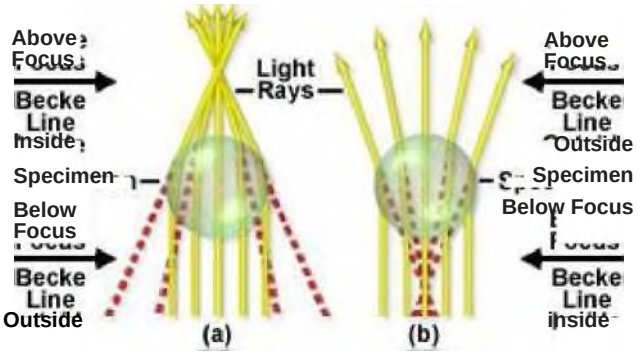
Рис. 3-6. Ход лучей для капли масла в воде.

Случай n1>n2 соответствует вогнутой линзе, или пузырьку воздуха в воде. Если n1>n2, то капля становится яркой при поднятии столика микроскопа.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com



Formation of Becка Lines



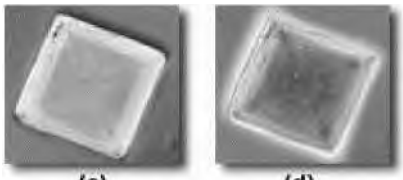


Рис. 3-8. Ход лучей в среде с неоднородностью. а-показатель преломления капли больше показатель преломления среды, b- показатель преломления капли меньше показатель преломления среды.

2- Волокно в жидкости (цилиндрический объект). Пусть в жидкости с показателем преломления n1 находится волокно с показателем преломления n2. Если n1<n2, то при опускании столика полоска Бекке двигается от краев волокна к центру и в некоторый момент в центре волокна образуется очень яркая полоска. Если n1>n2, то в центре волокна образуется яркая полоска при поднимании столика микроскопа.

Если показатель преломления волокна больше показателя преломления среды, то при опускании столика будет виден центр волокна светлым, а края темными, а затем наоборот, центр волокна темным, а края светлыми.

Показатели преломления различных сред: вода - 1,0, сыворотка - 1,03, масло подсолнечное-1,48, иммерсионное масло -1,515, стекло-1,5

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Цветные полоски.

Если дисперсии показателей преломления объекта и жидкости различны (у жидкости больше чем у объекта), то на их границе возникают цветные полоски. Если показатель преломления объекта и жидкости для света какой-либо длины волны равны между собой, то для более коротких волн показатель преломления выше, чем у объекта. Для более длинных волн показатель преломления объекта выше, чем показатель преломления жидкости. Поэтому вместо белой полоски возникают две цветные полоски. Голубая полоска при опускании столика перемещается в сторону жидкости, а розовая перемещается в сторону объекта.

1.2.2 Кольцевое экранирование.

Для реализации метода кольцевого экранирования необходимо использовать объектив с ирисовой диафрагмой, расположенной в верхней фокальной плоскости объектива. Если освещать объект светом, параллельном оси микроскопа (удаленный источник света, плоское зеркало, удаленный конденсор, прикрытая апертурная диафрагма), то около краев объекта сохранят свое вертикальное направление только те лучи, для которых показатель преломления объекта и жидкости равны. Лучи света с большей длиной волны отклонятся в сторону объекта, а лучи света с меньшей длиной волны отклоняться в сторону жидкости.

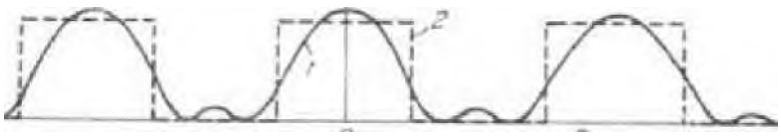
Если теперь прикрыть диафрагму объектива, то исключаются косые лучи. При этом край объекта будет иметь интенсивную окраску, отвечающую той части спектра, в которой совпадают показатели преломления объекта и жидкости.

Метод кольцевого экранирования был предложен Черкасовым Ю.А. в 1957 году. Он предложил целую серию методов, названных им методами фокального экранирования.

Рассмотрим изображения решетки при различных значениях апертуры ирисовой диафрагмы в фокальной плоскости объектива.

1- Если ирисовая диафрагма закрыта настолько, что проходит только нулевое дифракционное изображение. В этом случае поле зрения будет равномерно освещено.

2- Проходят три дифракционных максимума.



077 ocu

Рис. 3-9. Через диафрагму объектива проходят три дифракционных максимума.

3- Проходят пять дифракционных максимуму.

Г/ fsccmsffwt om oct/

Рис. 3-10. Через диафрагму объектива проходят пять дифракционных максимумов.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

1.2.3 Темнопольное освещение.

При темнопольном освещении блокируется центральный световой поток и оставляется боковой конус света. Для темнопольного освещения используется вставка в конденсор в виде диска. Темнопольное освещение в модификации цветовое контрастирование позволяет выявлять оптические неоднородности.

1.2.4 Кольцевая вставка.

Если использовать обычный объектив и кольцевую вставку в конденсоре (вставку для фазового конденсора), то будет реализован дополнительный метод симметричного освещения для выявления неоднородных объектов. Кольцевая вставка в конденсор может быть двух типов: светлая (светлое кольцо и темные середина и край) и темная (темное кольцо и светлые середина и край).

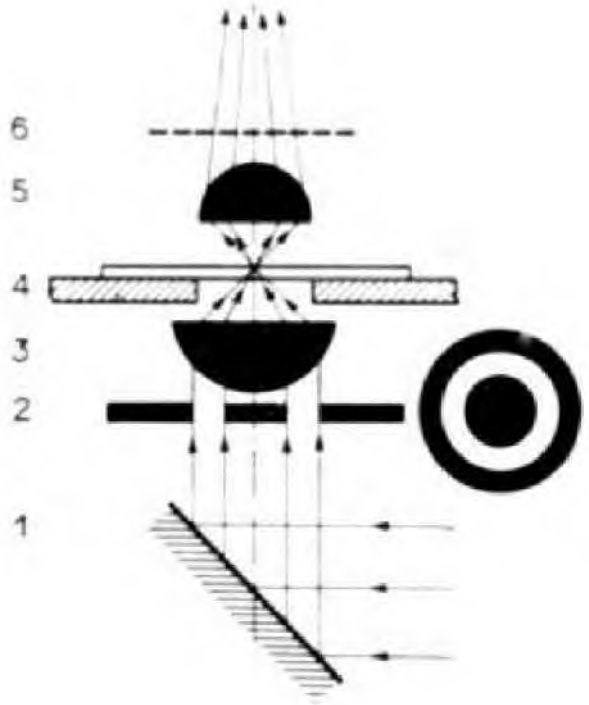


Рис. 3-11. Симметричное освещение с помощью кольцевой вставки в конденсор.
1-зеркало
2-кольцевая вставка
3-конденсор
4-плоскость объекта
5-объектив
6-задняя фокальная плоскость объектива.

Для получения симметричного косого освещения можно использовать кольцевую вставку в объектив. Например, можно использовать фазовый объектив без фазового конденсора.

1.2.5 Двойное симметричное диафрагмирование.

Суть метода двойного диафрагмирования состоит в том, что диафрагмирование осуществляется с помощью двух взаимно дополняющих диафрагм. Две диафрагмы имеют взаимно дополняющую форму - вместе они перекрывают все поле зрения, весь поток света. Если их разместить в одном месте светового потока, то в поле зрения будет только темное

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

поле. Поэтому две дополняющие диафрагмы необходимо разместить в двух оптически сопряженных плоскостях: плоскости апертурной диафрагмы конденсора и задней фокальной плоскости объектива. В этом случае в плоскости формирования изображения формируется изображения границ с перепадом оптической плотности.

В зависимости от симметрии формы диафрагм возможны два случая:

1-симметричная форма диафрагм. Например, кольцевые диафрагмы, которые применяются для фазового метода контраста. Если кольцевые диафрагмы полупрозрачны - то реализуется метод фазового контраста. Если кольцевые диафрагмы не прозрачны - то реализуется метод двойного симметричного диафрагмирования. Другой пример симметричного диафрагмирования - темнопольное освещение с ирисовой диафрагмой в задней фокальной плоскости объектива.

2-несимметричная форма диафрагм. Например, две дополняющие полуплоскости, сектор и дополнительный сектор. В этом случае реализуется метод косого освещения.

Метод двойного диафрагмирования дает более четкое изображение при плавной (а не резкой) границе между двумя областями с разным показателем преломления.

1.2.6 Темнопольное двойное диафрагмирование.

Темнопольное двойное диафрагмирование реализуется в режим темного поля с ирисовой диафрагмой в объективе. Для режима темнопольного освещения необходимо, чтобы апертура конденсора была больше апертуры объектива, и чтобы кольцевая вставка перекрывала апертуру объектива. Существуют объективы с ирисовой диафрагмой. В этом случае ирисовую диафрагму необходимо закрывать до тех пор, пока ее размер не будет соответствовать диаметру кольцевой вставки.

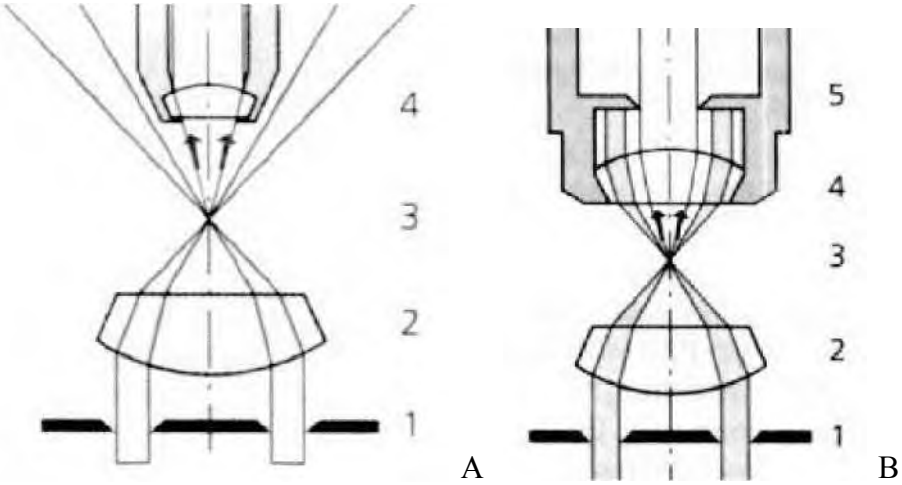


Рис. 3-12. Темнопольный конденсор А и темнопольный конденсор с ирисовой диафрагмой в объективе. 1-апертурная диафрагма конденсора, 2-конденсор, 3-препарат, 4-объектив, 5-ирисовая диафрагма объектива.

Режим темного поля с ирисовой диафрагмой в объективе имеет принципиальное отличие от режима темного поля только за счет конденсора. Пусть темнопольных конденсор имеет апертуру меньше чем апертура объектива, а у объектива имеется ирисовая диафрагма. Тогда путем закрывания ирисовой диафрагмы в объективе можно достигнуть совпадения апертуры темнопольного конденсора и апертуры объектива. Будет реализован режим темного поля. Но так же будет реализован метод двойного симметричного контрастирования - апертуры конденсора и объектива имеют дополняющую форму. В этом случае на изображении объекта появится окантовка границ областей с разным показателем преломления. Этого эффекта нет при использовании стандартного метода темного поля, при котором от осветителя к объекту доходят только косые лучи.

Реализацию принципа темного поля с затемнением в объективе описал Н.М. Гайдуков в 1916 году. (Гайдуков Н., Микроскоп и ультрамикроскоп. Глава в книге—С. Златогоров. Учение о микроорганизмах, ч. 2,П., 1916).

Предположим, что ирисовая диафрагма объектива изменяет апертуру объектива в диапазоне

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

от А-об1 до А-об2. Апертура конденсора А-к1. Апертура темнопольной вставки (диска) - А-к2. Пусть выполняется условие:
А-об2 < А-к1 < А-об2 < А-к2. Тогда в зависимости от степени закрытия ирисовой диафрагмы объектива имеем следующие режимы освещения:
1- А-к1 < А < А-об2 - режим косого симметричного освещения.
2- А = А-к1 - режим темнопольного двойного диафрагмирования.
3- А-об1 < А < А-к1 - режим темнопольного освещения.

Таким образом получаем, что при закрывании ирисовой диафрагмы объектива вначале реализуется метод косого симметричного освещения, затем метод темнопольного двойного диафрагмирования, и затем метод темнопольного освещения. В режиме темнопольного двойного освещения при малых отклонениях ирисовой диафрагмы регулируется яркость фона (светлый или темный) и регулируется степень выделения границ оптических неоднородностей.

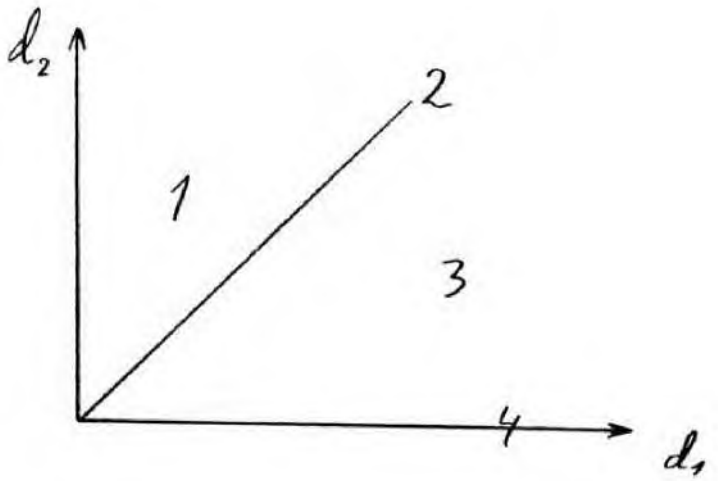


Рис. 3-13. Различные режима контрастирования.
D1 - апертура ирисовой диафрагмы объектива
D2 - апертура вставки-диска в конденсоре
1- (D1<D2) - режим темного поля
2- (D1=D2) - режим темнопольного двойного диафрагмирования
3- (D1>D2) - режим косого симметричного контрастирования
4- (D1=0) - режим светлого поля

Для примера, апертура темнопольного конденсора КФ-4 равна 1.2.

Таблица. 3-1. Апертуры некоторых объективов.

Объектив	1x	2x	4x	10x	20x	40x	60x	100x Oil
Апертура	0,04	0,06	0,1	0,25	0,4	0,55	0,8	0,5-1.25

1.2.7 Компьютерный метод косого симметричного освещения.

Применение компьютеров позволяет создавать и реализовывать новые методы контрастирования. Можно на компьютере ввести изображения, полученные при различных ориентациях несимметричной вставки для любого из методов косого освещения. Полученные изображения можно просуммировать на компьютере. На результирующем изображении будут четко выделены все границы объекта, независимо от ориентации.

1.3. Косое (несимметричное) освещение.

1.3.1 Косое освещение- полуплоскость.

Метод косого освещения применяется для исследования образцов с очень низким контрастом, например, оптических неоднородностях, прозрачных живых клеток. Косое освещение позволяет выявлять прозрачные области с различным значением показателя преломления. Проходящий свет подают на образец не снизу, а немного сбоку, благодаря чему становятся заметны тени, которые

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

образуют плотные включения (метод косого освещения). С помощью метода косого освещения наблюдается следующая картина — на сером фоне можно наблюдать контрастное изображение объекта с неровным по толщине контуром.

Эффект косого освещения в применении к целям иммерсионного метода описывал Машке в 1872 и 1880 году. В 1885 году Экснер применил аналогичный метод при микроскопическом изучении различных тканей организма. Заново открыл этот метод Шредер Ван дер Кольк, с именем которого связывают начало применения иммерсионного метода.

Эффект косого освещения наблюдается на крупных объектах при малых увеличениях 10х. При увеличении 20х эффект заметен слабо, а при увеличении 40х практически не виден. Если на пути лучей в осветительной системе поместить диафрагму, перекрывающую половину света, то нарушается симметрия освещения объектов и объекты будут освещены неравномерно, возникает тень.

Результирующая картина определяется следующими параметрами:

1-соотношение показателей преломления объекта и жидкости,

2-положением и ориентацией затеняющей пластинки.

Основное правило: Если показатель преломления объекта выше, чем жидкости, то его край, обращенный к диафрагме, будет темнее, чем противоположный. И наоборот, если показатель преломления объекта ниже, чем жидкости, то его край, обращенный к диафрагме, будет светлее, а тень будет на противоположном краю.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Рис. 3-14. Распространение света при косом освещении.

При косом освещении свет отклоняется в сторону среды с более высоким коэффициентом преломления.

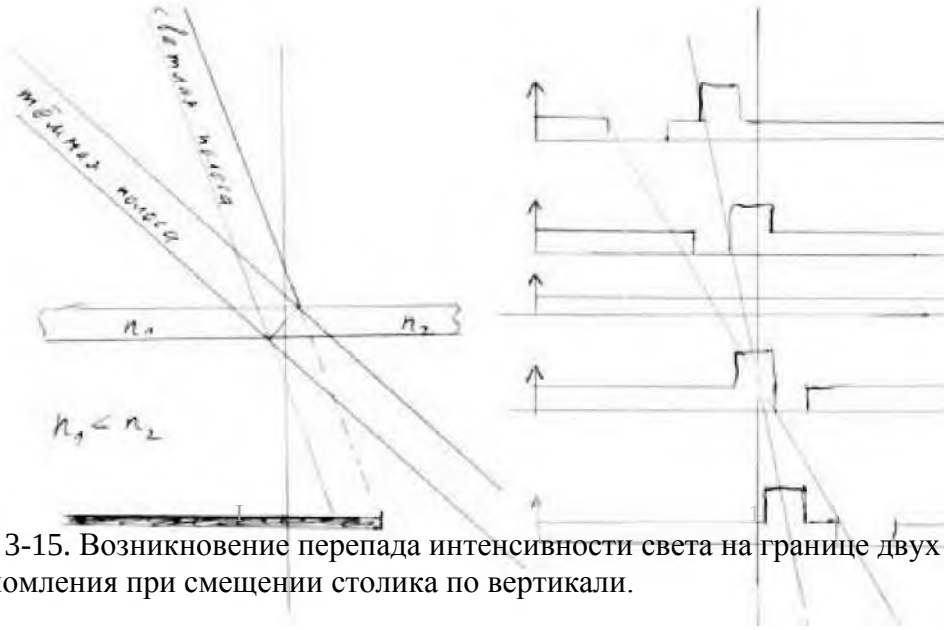


Рис. 3-15. Возникновение перепада интенсивности света на границе двух сред с разным показателем преломления при смещении столика по вертикали.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

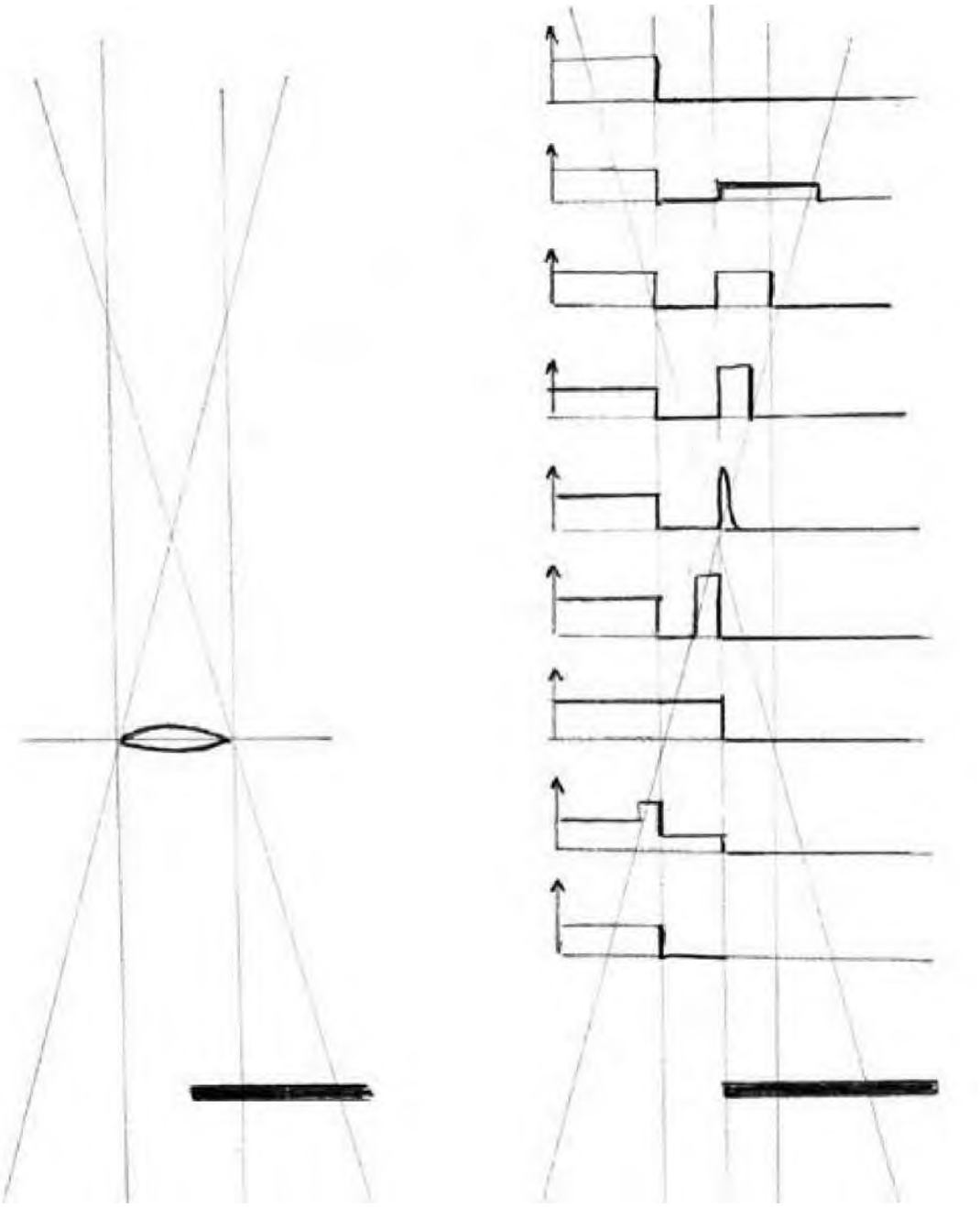


Рис. 3-16. Изображения выпуклой линзы при косом освещении.

При установке прямолинейной диафрагмы в конденсор возможны два регулируемых параметра: смещение диафрагмы относительно оптической оси микроскопа и угол поворота диафрагмы относительно оптической оси микроскопа.

При смещении диафрагмы относительно оптической оси изменяется сила оптического контраста. Последовательно наблюдаются три режима:

а- исходное состояние конденсора - режим светлого поля, фон - светлый.

в- немного сдвинутый конденсор - режим косого освещения, фон - серый. с- сильно сдвинутый конденсор - режим темного поля, фон - черный.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

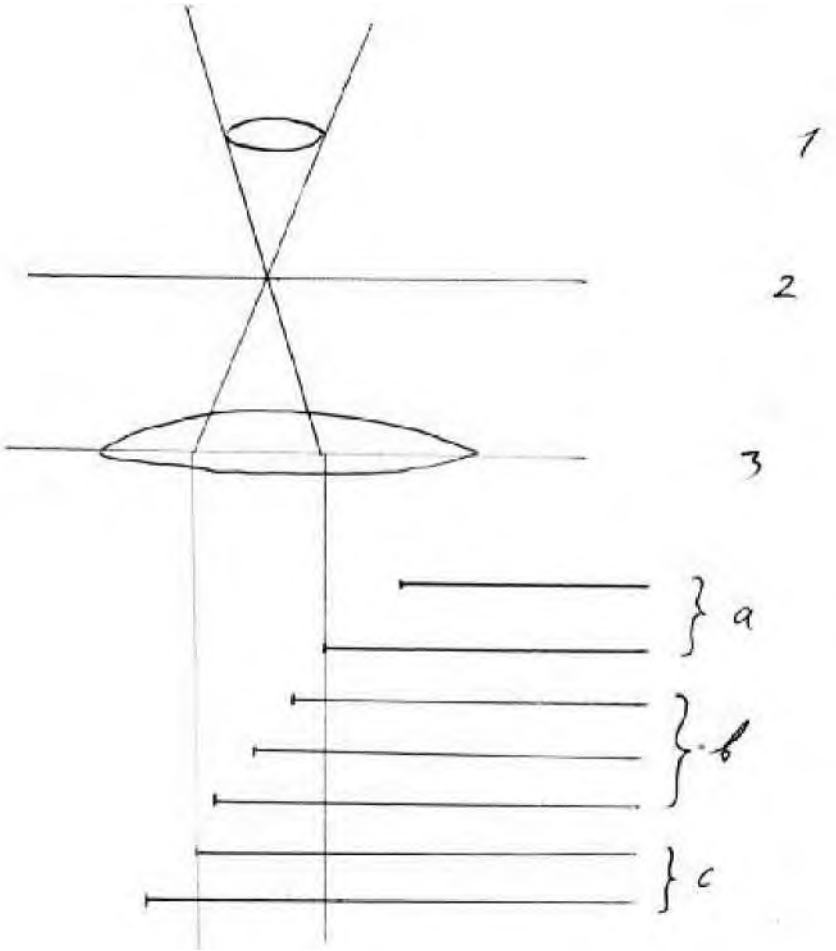


Рис. 3-17. Различные режимы освещения при различном положении диафрагмы в конденсоре: а-светлое поле, в - косое освещение, с - темное поле.
1-объектив, 2-препарат, 3-конденсор.

При повороте диафрагмы на различные углы относительно оси микроскопа происходит освещение под разными углами. Особо отчетливо выделяются те границы объекта, которые ориентированы параллельно ориентации диафрагмы.

Можно на компьютере ввести и просуммировать все изображения, полученные при различных ориентациях диафрагмы. На результирующем изображении будут четко выделены все границы объекта, независимо от ориентации.

В случае близости показателей преломления объекта и жидкости при наблюдении в белом свете появляется окраска. Край объекта, обращенный к диафрагме, окрашивается в синий цвет, а противоположный - в красный.

Применение косого освещения повышает разрешающую способность микроскопа примерно в два раза.

Косое освещение можно создавать различными методами:
1-С помощью специального темнопольного конденсора. Фирмой ЛОМО выпускался специальный апланатический конденсор прямого и косого освещения ОИ-14 с апертурой 1,4 и 0,4. Конструкция конденсора позволяла с помощью реечного механизма отклонять положение диафрагмы на 10 мм вправо или влево от оптической оси микроскопа.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

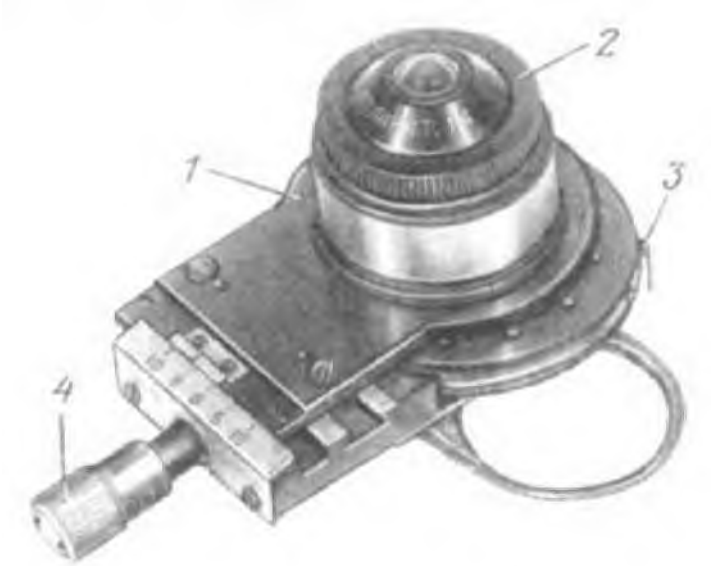


Рис. 3-18. Конденсор косого освещения ОИ-14 фирмы ЛОМО. 1-корпус конденсора
2-сменная оправа с линзой
3-апертурная диафрагма
4-рукоятка для перемещения диафрагмы.

2- Косое освещение создается путем перекрывания половины светового потока с помощью непрозрачной пластины. Пластина размещается между источником света и конденсором.
3 - Косое освещение можно создать путем эксцентричного смещения ирисовой вставки конденсора, если это позволяет конструкция конденсора.
4 - Косое освещение можно создавать путем смещения конденсора . Смещение конденсора достигается путем ослабления крепежных винтов и небольшим выдвижением конденсора.
5 - Косое освещение можно создавать путем смещения вставки в конденсоре, если конденсор имеет револьверную конструкцию вставок. При этом апертурная диафрагма конденсора устанавливается в максимальное значение.
6-Вставку можно помещать в верхней фокальной плоскости объектива. Такие вставки предусмотрены в конструкции поляризационных микроскопов.
7 - Косое освещение можно создать с помощью внешнего источника света (светодиодного фонарика или настольной лампы) если освещать препарат сбоку сверху или снизу, и дополнительно освещать препарат снизу обычным источником света.
8 - В старых микроскопах освещение препаратов осуществлялось с помощью зеркала. Обычно зеркало крепилось на корпусе объектива. Для реализации косого освещения зеркало крепилось на кронштейне. Кронштейн позволял отклонять зеркало от вертикального положения и освещать препарат под углом.

Оптимальный режим создания косого освещения состоит в следующем: -выбираемся объектив с малым увеличением (4х, 10х),
-апертурная диафрагма конденсора максимально открывается, и конденсор смещается.

1.3.2 Косое освещение - азимутальное.

При азимутальном освещении объект освещается не полуплоскостью, а с помощью сектора пучка света. Диафрагма для азимутального освещения может быть либо круглая эксцентрическая, либо в виде сектора.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

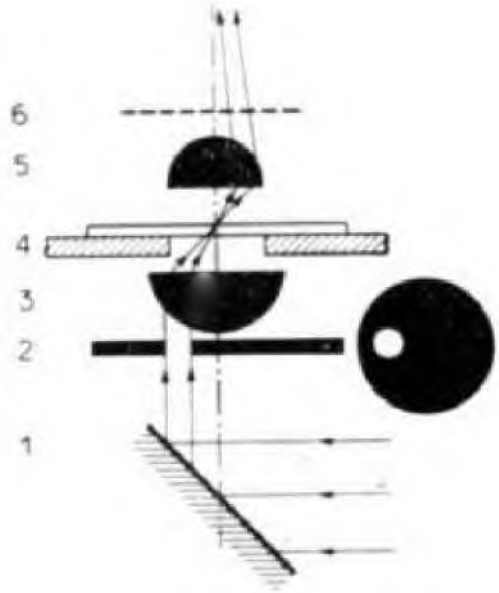


Рис. 3-19. Косое освещение с помощью эксцентрической диафрагмы. 1-зеркало
2-эксцентрическая диафрагма
3-конденсор
4-плоскость объекта
5-объектив

6-задняя фокальная плоскость объектива

Существует регулируемая азимутальная диафрагма в виде сектора. Она состоит из двух совмещенных

Металл

Открытая часть"х

диафрагм в виде полуплоскости, которые могут вращаться вокруг центральной оси.

1.3.3 Двойное несимметричное диафрагмирование.

Метод двойного диафрагмирования был предложен Сейлором в 1935 году. Метод двойного диафрагмирования реализуется с помощью двух диафрагм с прямолинейным краем. Диафрагмы располагаются в двух оптически сопряженных плоскостях - одна диафрагма располагается в плоскости

Рис. 3-20. Азимутальная диафрагма в виде сектора.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

апертурной диафрагмы конденсора микроскопа, а вторая диафрагма располагается в верхней фокальной плоскости объектива. Изображение первой диафрагмы формируется радом с положением второй диафрагмы. В этом случае поле зрения микроскопа становится слабо освещенным, так как проходят только лучи, прошедшие через узкую щель между краем верхней диафрагмы и краем изображения нижней диафрагмы. Если в поле зрения находится объект с высоким показателем преломления, то лучи, проходящие через границу объекта, отклоняются. Противоположные края отклоняются в противоположные стороны. Лучи, отклоненные в сторону верхней диафрагмы, задерживаются ею, и поэтому отклонившие границы наблюдаются темными. Лучи, отклоненные противоположной границей в противоположную сторону, свободно проходят через микроскоп. Поэтому эти границы наблюдаются светлыми. Таким образом область с высоким показателем преломления кажется односторонне освещенной, и возникает рельефное выделение данной области на фоне слабо освещенного поля зрения. При правильной установки диафрагм объект будет иметь тень с одной стороны (подобно эффекту косого освещения). В отличие от метода косого освещения, метод двойного диафрагмирования может применяться и при сильных объективах.

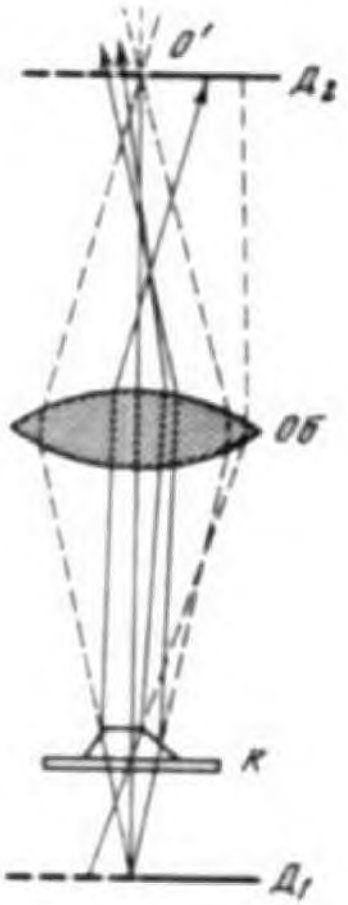


Рис. 3-21. Схема метода двойного диафрагмирования. Об - Объектив, К - препарат, Д1 и Д2 - диафрагмы в виде полуплоскостей, расположенные в оптически сопряженных плоскостях.

Таблица 3-2. Различные методы использования вставок для контрастирования.

	Нет вста вок	Вставка в конденсор	Вставка в объектив	Вставка в конденсор и в объектив
Светлое поле	+	ирисовая	ирисовая	ирисовая
Темное поле		-обычное	Г айдуков-	Кольцевое экранирование
		-цветовой контраст	1916	Черкасов-1957
Косое освещение		-полуплоскость - азимутальное	+	Двойное диафрагмирование Сейлор-1935

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Фазовый контраст	Компьютерный метод			-Цернике-1934 -цветовой фазовый контраст
Аноптральный метод				Вильска-1953 Пешков-1955 Стефанов-1960

1.3.4 Компьютерный метод косого несимметричного освещения.

Применение компьютеров позволяет создавать и реализовывать новые методы контрастирования. Вводится изображение исходного объекта, и объекта, смещенного в некотором направлении на малую величину. Вычисляется разность между двумя изображениями. На результирующем изображении будет четко выделена граница объекта в направлении смещения.

1.3.5 Теневой метод (проекционный метод, метод осевого сечения).

При теневом методе изображение источника света проектируется на острый край полевой диафрагмы. Диафрагма имеет вид полуплоскости. Изображение полевой диафрагмы проектируется на плоскость препарата. Таким образом на объект проектируется резкий световой край. Теневой метод был предложен французом Л.Фуко. Используемую диафрагму называют нож Фуко.

1.4.Проблемы фокусировки для неоднородных сред.

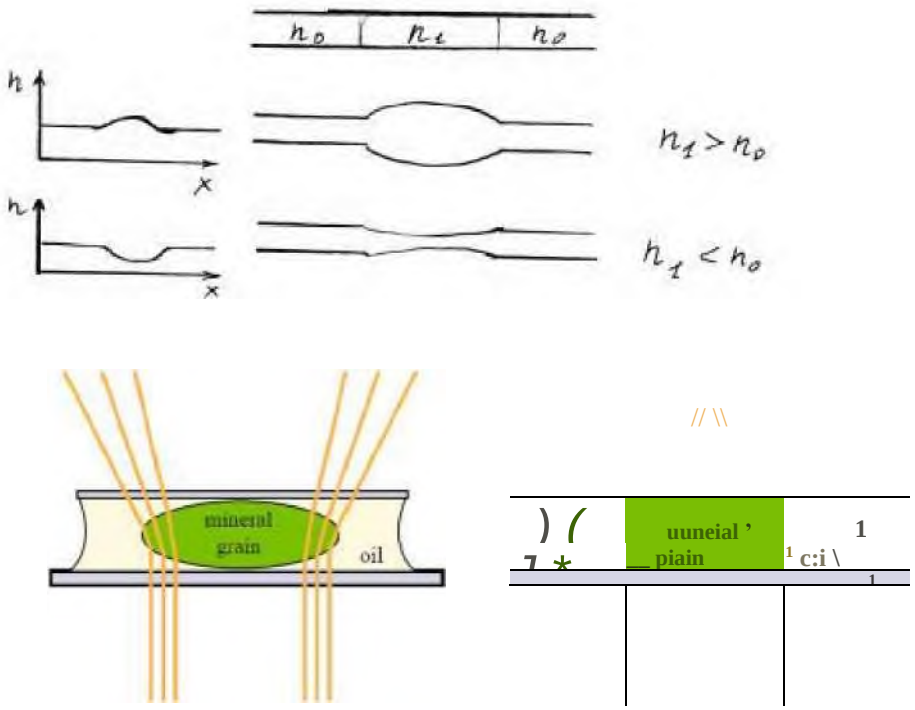
При наблюдении тонких плоских объектов трудностей с наводкой на резкость не возникает. Изображение оказывается четко сфокусированным при одном положении предметного столика по вертикали. При смещении столика вверх или вниз фокусировка пропадает. В современных программах для ввода изображений с микроскопа с помощью цифровой камеры существует специальная индикация (в виде числа и в виде шкалы) степени фокусировки. При фокусировке на плоский объект степень фокусировки имеет унимодальное распределение и максимальное значение достигается в одном положении столика микроскопа.

При наблюдении трехмерных оптически неоднородных объектов ситуация изменяется. Такими объектами являются капли жира в воде, прозрачные пленки переменной толщины. Данные объекты при наблюдении играют роль линз, и это изменяет условия фокусировки. При наблюдении таких объектов зависимость степени фокусировки от высоты столика является не унимодальной функцией, а бимодальной функцией. Максимум фокусировки достигается при двух положениях столика по высоте.

При движении столика сверху вниз объект вначале фокусируется как темный объект на светлом фоне, фокусировка максимальна. При дальнейшем движении объект и фон сливаются, фокусировка пропадает. При дальнейшем движении вниз объект снова появляется, но как светлый объект на темном фоне. Фокусировка снова максимально. При дальнейшем движении вниз фокусировка пропадает.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

В оптически неоднородной среде область с повышенным показателем преломления эквивалентна собирающей линзе, а область с пониженным показателем преломления эквивалентна рассеивающей линзе.



'' ^mineral ^mineral > ^oil

Рис. 3-22. Неоднородная оптическая среда.

1.5. Изменение изображения объектов при смещении столика микроскопа.

1.5.1 Изображение светящейся точки.

В идеальной оптической системе светящаяся точка в плоскости объекта изображается точкой в пространстве изображения. В реальной оптической системе из-за явления дифракции точка преобразуется в некоторую область трехмерного пространства. Поперечный размер этой области Dx = Dy = L/A, где L - длина волны света, A - апертура объектива. Продольный размер области Dz = 4L/A2. Таким образом получаем, что при уменьшении апертуры объектива точка преобразуется в сигарообразную область. Длина сигары обратно-пропорциональна квадрату апертуры. Этим в частности объясняется увеличение глубины резкости при уменьшении диафрагмы (апертуры).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

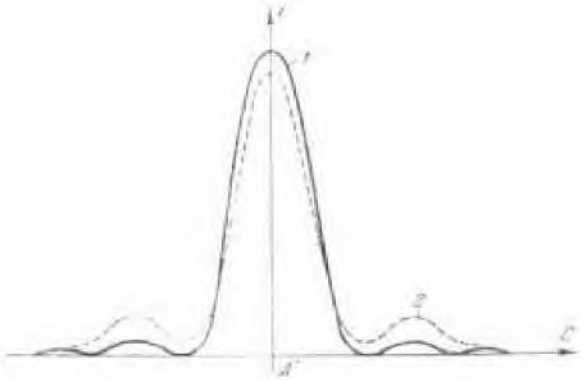


Рис. 3-23. Изображение светящейся точки. 1-при фокусировке на точку, 2- при малом смещении столика.

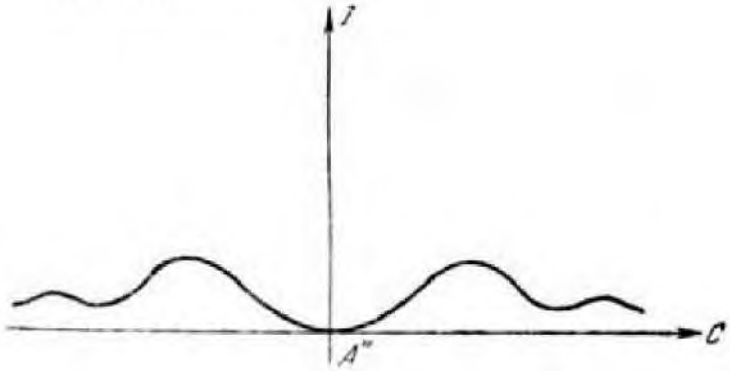


Рис. 3-24. Изображение светящейся точки при большом смещении столика.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

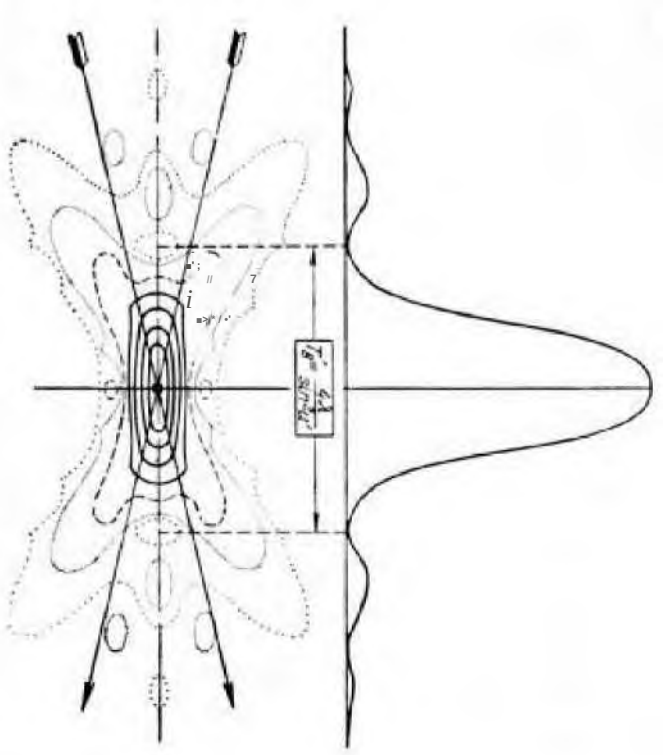


Рис. 3-25. Изображение дифракционной картины светящейся точки вдоль оптической оси микроскопа.

Как видно из рисунка, при смещении столика на изображении светящейся точки постепенно уменьшается яркость точки. Затем точки становится черной. Затем точка снова становится светлой. Видны дифракционные круги вокруг точки.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

1.5.2 Изображения различных объектов при смещении столика микроскопа.
1.5.2.1 Самосветящаяся точка.

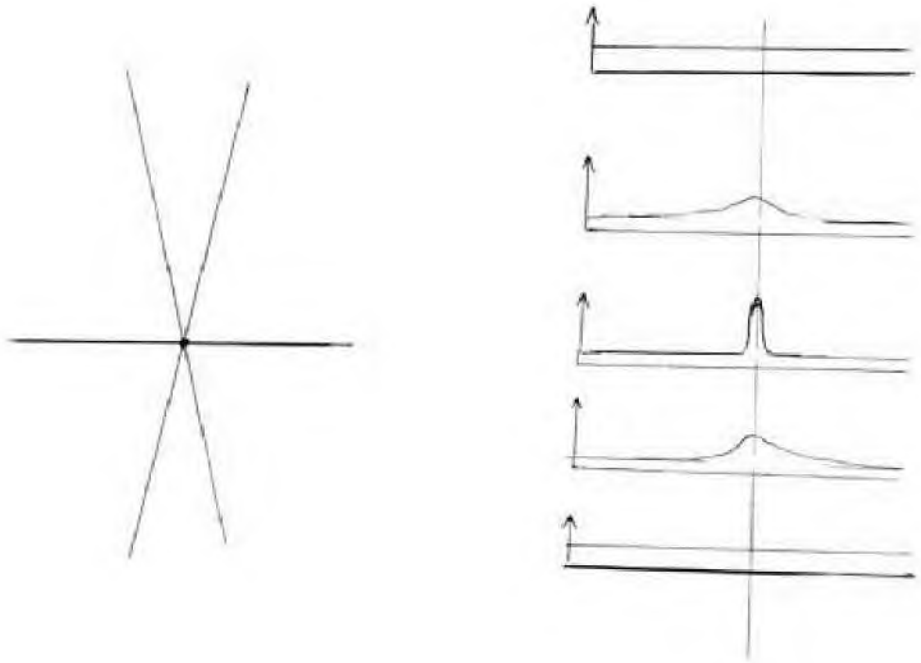


Рис. 3-26. Изображения светлой точки на сером фоне.

1.5.2.2 Черная точка.

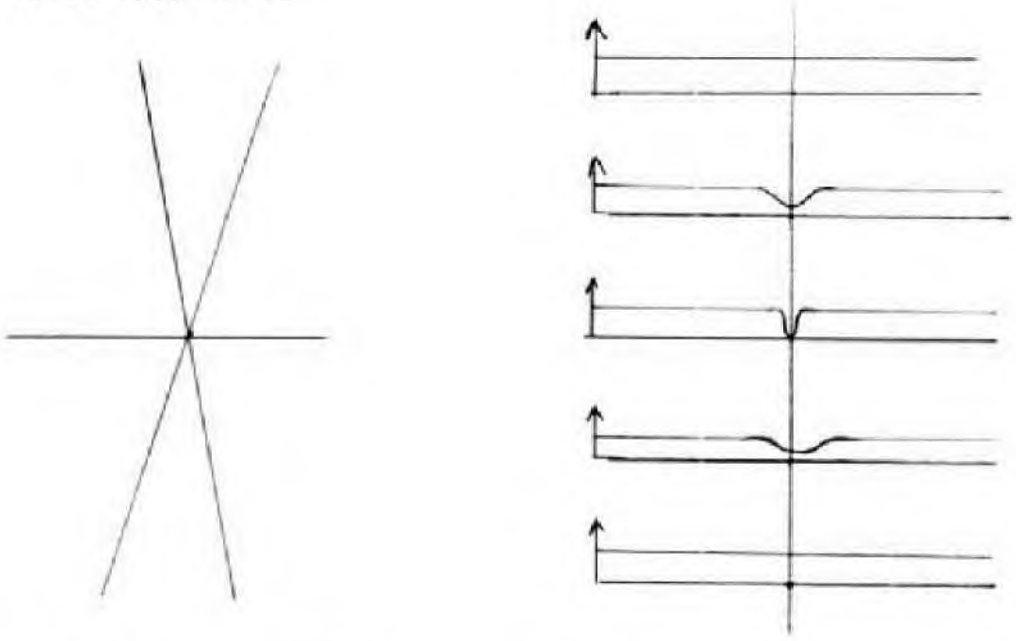


Рис. 3-27. Изображения черной точки на сером фоне.

1.5.2.3 Светлый диск.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

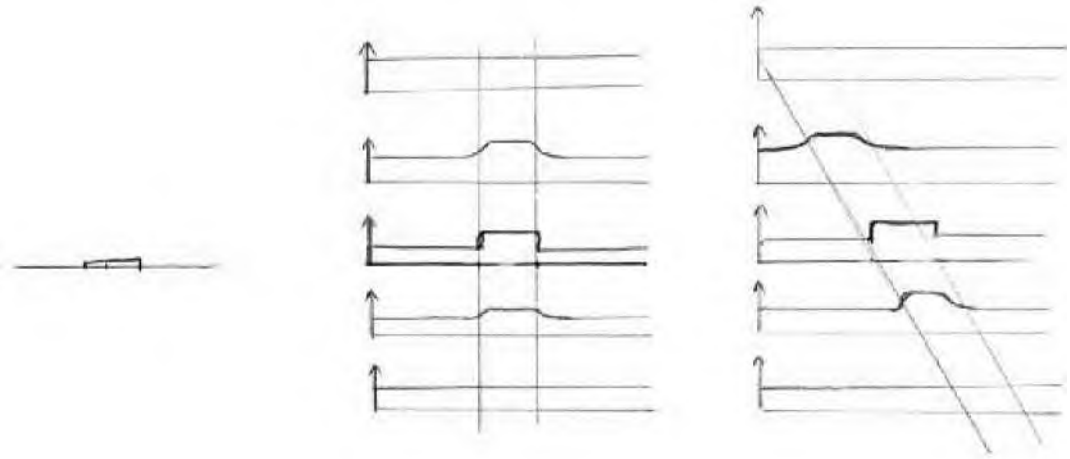


Рис. 3-28. Изображения светлого круга на сером фоне в режиме светлого поля (А) и косого освещения (В).

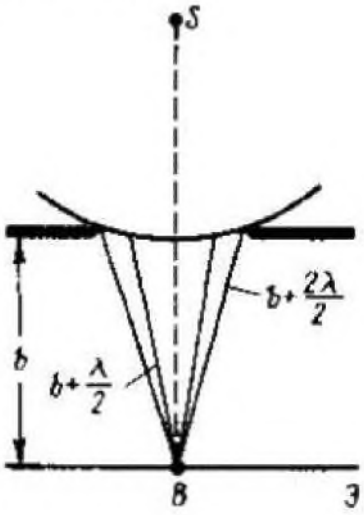


Рис. 3-29. Дифракция Френеля на круглом отверстии от точечного источника. S- точечный источник света. Э - экран.

Если отверстие открывает нечетное число зон Френеля , то в центре (в точке В) будет светлое кольцо. Если отверстие открывает четное число зон Френеля, то в центре (в точке В) будет темное кольцо. Центральное кольцо окружено чередующимися светлыми и темными кольцами. Интенсивность колец убывает при удалении от центра.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

1.5.2.4 Черный диск.

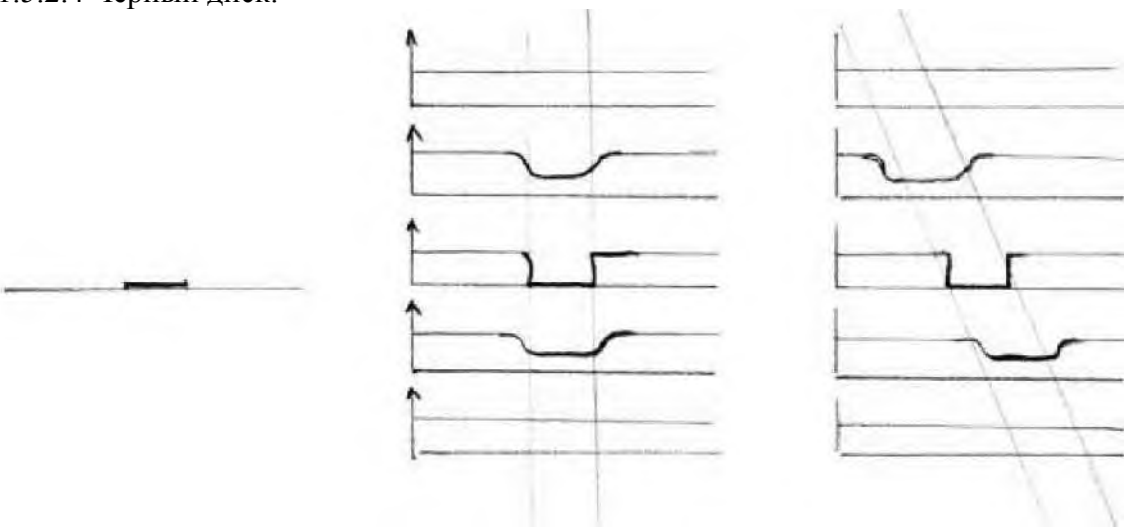


Рис. 3-40. Изображение черного круга на сером фоне в режиме светлого поля (А) и косого освещения (В).

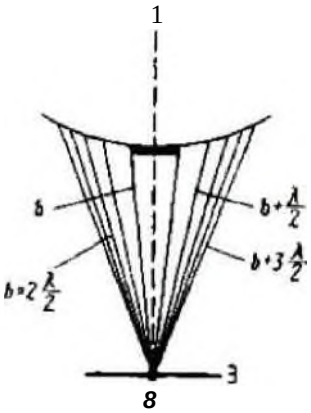


Рис. 3-41. Дифракция Френеля на черном диске от точечного источника света. S-точечный источник света. Э - экран.

При дифракции на черном диске от точечного источника света в центре изображения черного диска (точка В на рисунке) всегда будет наблюдаться интерференционный максимум (светлое пятно). Центральный максимум окружен темными и светлыми кольцами, а интенсивность колец убывает с удалением от центра.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

1.5.2.5 Собирающая линза.

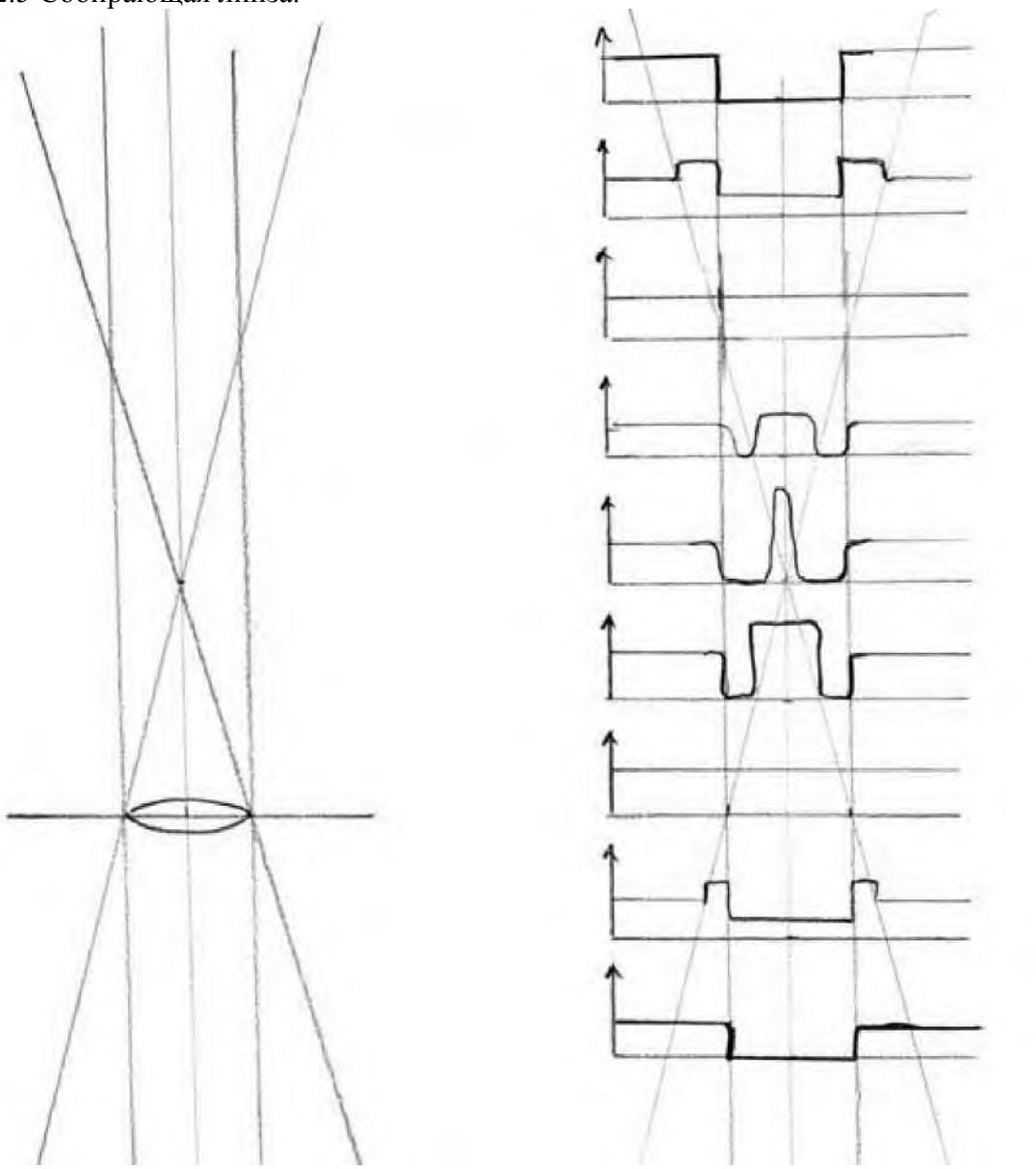


Рис. 3-42. Изображения собирающей линзы при использовании модели геометрической оптики.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

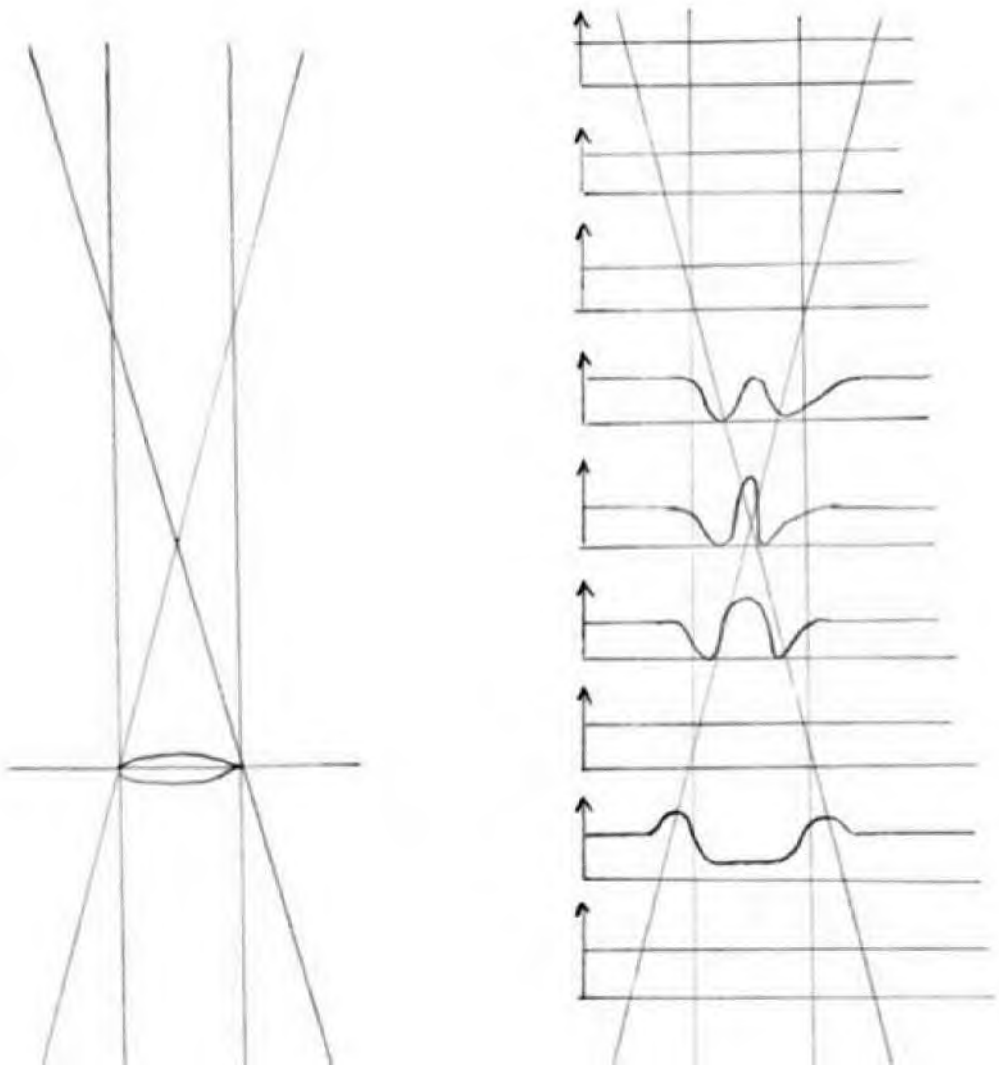


Рис. 3-43. Изображения собирающей линзы с учетом расфокусировки.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

1.5.2.6 Рассеивающая линза.

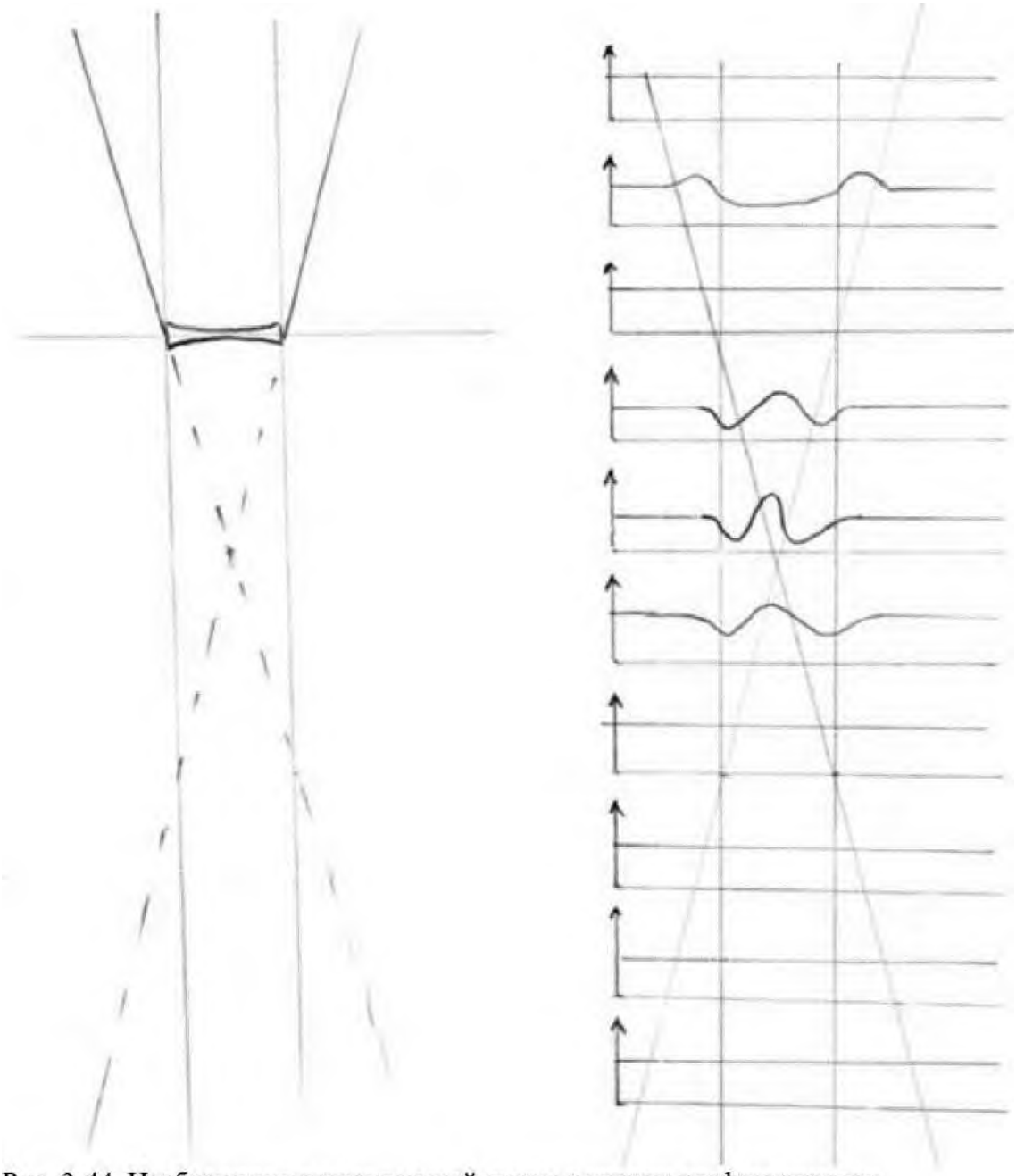


Рис. 3-44. Изображения рассеивающей линзы с учетом расфокусировки.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Глава 2. Оптические методы контрастирования.

В настоящее время существуют различные методы наблюдения (методы оптического контрастирования) в проходящем свете, применяемые в микроскопии.

Таблица 3-3. Различные методы оптического контрастирования, применяемые в микроскопии.

№	Метод	Спец. объектив	Спец. конденсор	Фон	Год	Автор	Страна
1	Светлое поле	Нет	Нет	светлый			
2	Поляризационный метод -линейная поляризация -циркулярная поляризация	Нет	Нет	темный	1830	Soleil	Франция
3	Темнопольный метод -метод Рейнберга -темнопольное двойное диафрагмирование	Нет -нет -да	Да -да	темный	1903	Zsigmondy Rheinberg	Австрия
	Ультрамикроскопия -проточная ультрамикроскопия	Нет Нет	Да Да	темный	1903 1953	Zsigmondy Дерягин	Австрия Россия
	Косое освещение	Нет	Да	серый			
4	Метод фазового контраста (PCM - Phase Contrast Microscory): -положительный фазовый контраст -отрицательный фазовый контраст -внутренний фазовый контраст -внутренний фазовый контраст -Apodized Phase Contrast (Nikon) -VARIEL Contrast -Relief Phase Contrast	Да	Да	-св. - тем.	1934	Zernike	Нидерланды
5	Аноптральный метод (амплитудно-контрастный метод)	Да	Да		1953	Wilska	Финлянд ия
6	HMC - Hoffman Modulation Contrast (Хоффмановский модуляционный контраст) -IMC-Integrated Modulation Contrast -RC - Relief contrast -NAMC - Nikon advanced modulation contrast	Да	Да		1975	-Hoffman -Leica - Olympus - Nikon	-США Германия - Япония - Япония
7	DIC - Дифференциальный интерференционный контраст (Differential Interference Contrast), -PlasDIC (Zeiss) -C-DIC (Zeiss)	Да Да	Да Да	-св.	1953 2003	Nomarsky Zeiss	Германия
	RCM - Reflection Contrast Microscopy	Да	Да		1964	Curtis	
	RICM - Reflection Interference Contrast Microscopy IRM - Interference Reflecting Microscopy	Да	Да		2010		
8	Флуоресцентный метод	Нет	Нет				

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

	-собственная флуоресценция -окраска флуорохромами						
	FLIC - Fluorescence Interference Contrast Microscopy	Да	Да			Armin Lambacher	
9	Конфокальная микроскопия	Нет	Да		1957	Minsky	
10	Окраска препаратов	Нет	Нет				
11	Структурное освещение	Нет	Да		1930	Линник	Россия
12	Интерференционная микроскопия						
13	Зеркальное освещение						

Часто очень эффективным оказывается совместное применение нескольких методов контрастирования одновременно. Например, одновременное применение проходящего освещения (при малом накале лампы) и флуоресцентного метода позволяют наблюдать светящиеся объекты, и видеть расположение светящихся объектов в клетке. Одновременное применение поляризационного метода и слабого проходящего света позволяет и структуру препарата, и локализацию оптически неоднородных компонент.

2.1- Светлое поле.

Режим освещения светлое поле (проходящий свет) является основным при наблюдении объектов под микроскопом. При этом используются стандартные объективы и конденсоры. Метод основан на выявлении объектов, которые поглощают свет. Эти объекты видны темными на светлом фоне.

Возможны два варианта освещения объекта проходящим светом: параллельный световой поток (освещение плоским зеркалом) и сходящийся световой поток (освещение вогнутым зеркалом). Разрешение зависит от длины волны света. Чем меньше длина волны - тем выше разрешение. Поэтому максимальное разрешение достигается при наблюдении объекта в синем свете.
Глубина резкости зависит от увеличения объектива и от апертурной диафрагмы. Чем меньше увеличение объектива - тем больше глубина резкости. Чем сильнее закрыта апертурная диафрагма - тем больше глубина резкости. Для достижения максимальной четкости рекомендуется устанавливать освещение в максимум, и регулировать четкость положением апертурной диафрагмы.

2.2- Поляризационный метод (PLM - polarized light microdcopy).

Поляризационный метод реализуется путем размещения в оптическом пути микроскопа двух поляризационных фильтров - поляризатора и анализатора. Поляризатор размещается между источником света и препаратом, он создает поляризованный свет для освещения препарата. Анализатор размещается между препаратом и окуляром. С помощью анализатора определяется степень поляризации прошедшего через препарат света.

В зависимости от того, какие поляризационные фильтры используются, можно выделить два основных случая: линейные и циркулярный поляризаторы. На практике обычно используют линейные поляризаторы. Но принципиально другую картину можно получить путем использования циркулярных поляризаторов.

Метод связан с визуализацией объекта или его элементов в поляризованном свете в результате изменения направления поляризации света и проявления анизотропных свойств объекта. Особенностью микроскопа является наличие в оптической схеме поляризационных фильтров: в осветительной части - поляризатора, а в промежутке между объективом и окуляром - анализатора. Наблюдение производится тогда, когда оба поляризационных

фильтра повернуты друг относительно друга и при этом в выходном зрачке микрообъектива наблюдается максимальное затемнение.

Для работы с поляризационным методом разработаны специальные поляризационные микроскопы. Однако в простейшем варианте поляризационный метод можно реализовать на обычном микроскопе и помощью двух поляризаторов. Один из поляризаторов помещается под конденсором между осветителем и препаратом. Второй поляризатор помещается между препаратом

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

и объективом.

Существуют два принципиально различных типа поляризаторов, которые можно использовать в поляризационной микроскопии - линейные и циркулярные.

Одним из первых исследовал поляризацию света французский физик Этьен Луи Малюс (1775-1812). Он же ввел понятие плоскость поляризации. Разработал теорию двулучепреломления света в кристаллах. Малюс сконструировал ряд поляризационных приборов.

Один из первых поляризационных микроскопов был создан в 1830 году французским оптиком Henry Soleil (Paris)(? -1879).

Рис. 3-45. Старинный поляризационный микроскоп Henry Soleil.

В 1939 году английский оптик Andrew Ross создал более совершенную модель поляризационного микроскопа. В качестве поляризатора в первых моделях поляризационных микроскопов использовалась призма Николя.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Andrew Ross Brass MpnqCulgr Polarised Light Microscope {circa 1839)

Рис. 3-46. Поляризационный микроскоп Росса.

Изображение сферолитов в скрещенных поляроидах (Мальтийский крест).

Плоский сферолит представляет из себя круг, в котором молекулы ориентированы вдоль радиусов. При наблюдении в скрещенных поляроидах сферолиты видны в виде характерной фигуры под названием Мальтийский крест. Рассмотрим причину этого явления. Интенсивность плоско поляризованного света, прошедшего через поляризатор, определяется

законом Малюса: ' ■' ' ' ' ■ - . Интенсивность прошедшего света пропорциональна квадрату косинуса угла между плоскость поляризатора и плоскостью поляризованного света. Диаграмма пропускания линейного поляризатора имеет вид восьмерки.
Так как второй поляризатор повернут на 90 градусов относительно первого, его диаграмма пропускания будет повернута на 90 градусов.

Таблица 3-4. Зависимость интенсивности прошедшего света от угла между анализатором и поляризатором:

Угол, град	0	45	90	135	180	225	270	315	360(0)
A	0	0,7	1	0,7	0	0,7	1	0,7	0
B	1	0,7	0	0,7	1	0,7	0	0,7	1
A*B	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0	0,5	0

Таким образом, получаем, что диаграмма пропускания скрещенных поляризаторов имеет вид восьмерки. Следовательно, сферолит будет светиться в виде креста. При этом лучи креста будут направлены под углом 45 градусов к скрещенным поляризаторам.

2.3- Темнопольная микроскопия.

2.3.1. Стандартный темнопольный метод.

Метод тёмного поля (dark-field microscopy) в проходящем свете применяется для получения изображений прозрачных неабсорбирующих объектов, невидимых при освещении по методу светлого поля. Свет от осветителя направляется на препарат конденсором специальной конструкции - конденсором тёмного поля. По выходе из конденсора основная часть лучей света, не изменившая своего направления при прохождении через прозрачный

препарат, образует пучок в виде полого конуса и не попадает в объектив (который находится внутри этого конуса). Изображение в микроскопе создаётся лишь небольшой частью лучей, рассеянных микрочастицами находящегося на предметном стекле препарата внутрь конуса и

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

прошедшими через объектив. В поле зрения на тёмном фоне видны светлые изображения элементов структуры препарата, отличающихся от окружающей среды показателем преломления. У крупных частиц видны только светлые края, рассеивающие лучи света. При этом методе по виду изображения нельзя определить, прозрачны частицы или непрозрачны, больший или меньший показатель преломления они имеют по сравнению с окружающей средой.

Метод темнопольной микроскопии можно реализовать на обычном микроскопе. Для этого необходимо заменить обычный конденсор на специальный темнопольный конденсор (конденсор темного поля).

Метод темного поля основан на эффекте, который достигается освещением объекта полым конусом света, внутренняя апертура которого должна превосходить числовую апертуру применяемого объектива. Таким образом, ни один прямой луч не попадает в объектив: при отсутствии объекта поле зрения микроскопа будет темным, а при его наличии - контрастный светлый объект будет виден на темном фоне в отраженном или рассеянном (диффузно отраженном) свете.

Режим освещения темное поле предназначен для выявления объектов, которые рассеивают свет. Эти объекты видны светлыми на темном фоне. Темнопольное освещение создается с помощью специального темнопольного конденсора. Темнопольный конденсор создает боковой световой поток и перекрывает основной поток света по оптической оси. Темнопольный конденсор имеет апертуру - величину перекрываемого телесного угла. Для реализации темнопольного освещения необходимо, чтобы апертура объектива была меньше, чем апертура темнопольного конденсора. В этом случае прямой свет не попадает в объектив.

Разновидность темнопольного освещения - ультрамикроскоп. Препарат освещается мощным потоком света с боку.

Основное преимущество темнопольного метода - возможность выявления мелких частиц, размер которых меньше длины волны света.

Для создания темного поля в биологическом микроскопе применяют различные методы:

1- щелевой метод;

2- упрощенный метод, связанный с одновременным диафрагмированием осветительной апертуры конденсора и выходной апертуры объектива, при этом объектив должен иметь ирисовую диафрагму или вкладыш, которые позволяют уменьшать выходное отверстие объектива, приближая его к осветительной апертуре оптимальной для получения эффекта темного поля;

3- применение специального конденсора темного поля.

4- темнопольное освещение можно создать с помощью внешнего источника света (светодиодного фонарика или настольной лампы) если освещать препарат сбоку сверху или снизу так, чтобы свет не попадал в объектив.

Конструкции темнопольных конденсоров.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

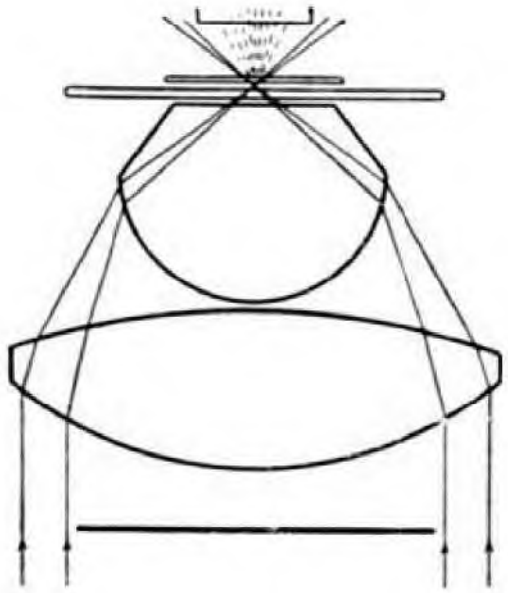


Рис. 3-47. Конденсор Аббе с темнопольной диафрагмой.

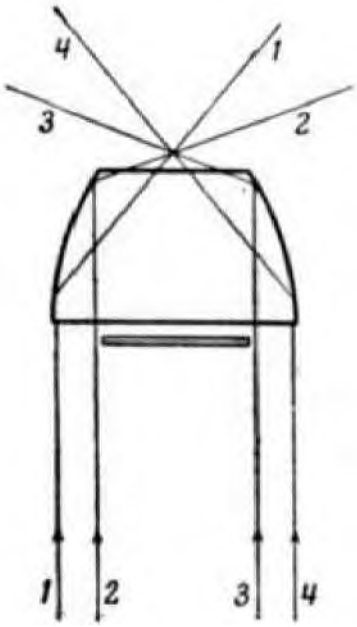


Рис. 3-48. Параболический темнопольный конденсор. Если точечный источник света находится в фокусе параболы, то из параболы исходит параллельный пучок света, и наоборот. Вершина параболоида срезана настолько, что фокус параболы совпадает с положением препарата.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

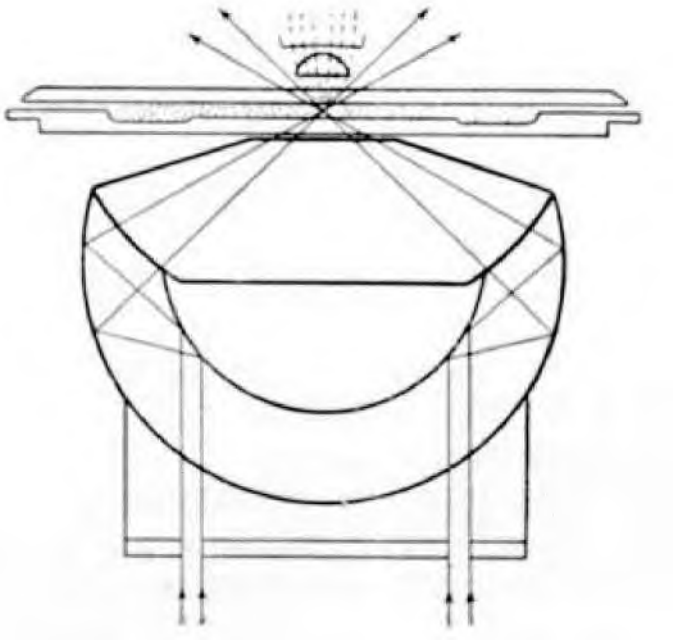


Рис.3-49. Кардиоидный темнопольный конденсор.

Фирмой ЛОМО выпускались специальные конденсоры для темнопольной микроскопии ОИ-13. По конструкции это кардиоид-конденсор с апертурой 1,2, состоящий из сферического зеркала и линзы-кардиоида.

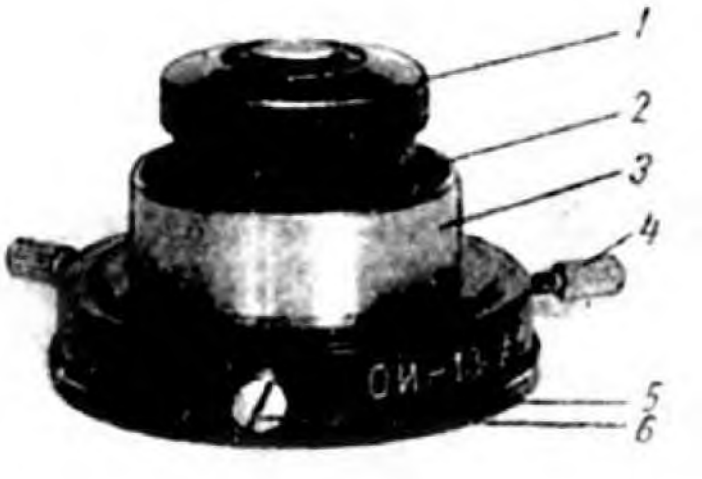
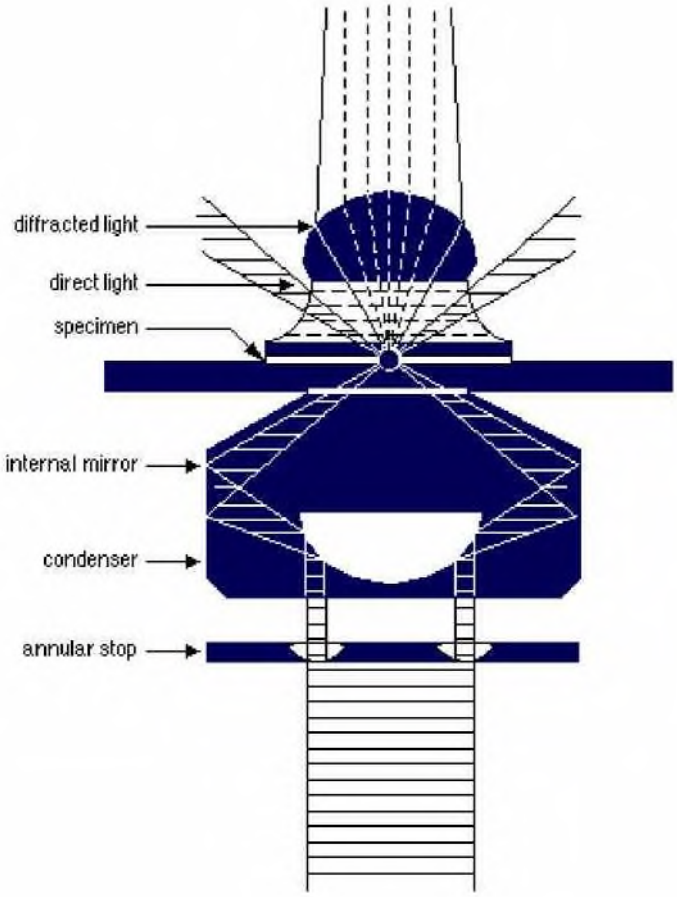


Рис. 3-50. Темнопольный конденсор ОИ-13 фирмы ЛОМО.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Рис. 3-51. Конденсор темного поля модель А с апертурой 1,36-1,25 для микроскопов Микромед 2.



PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

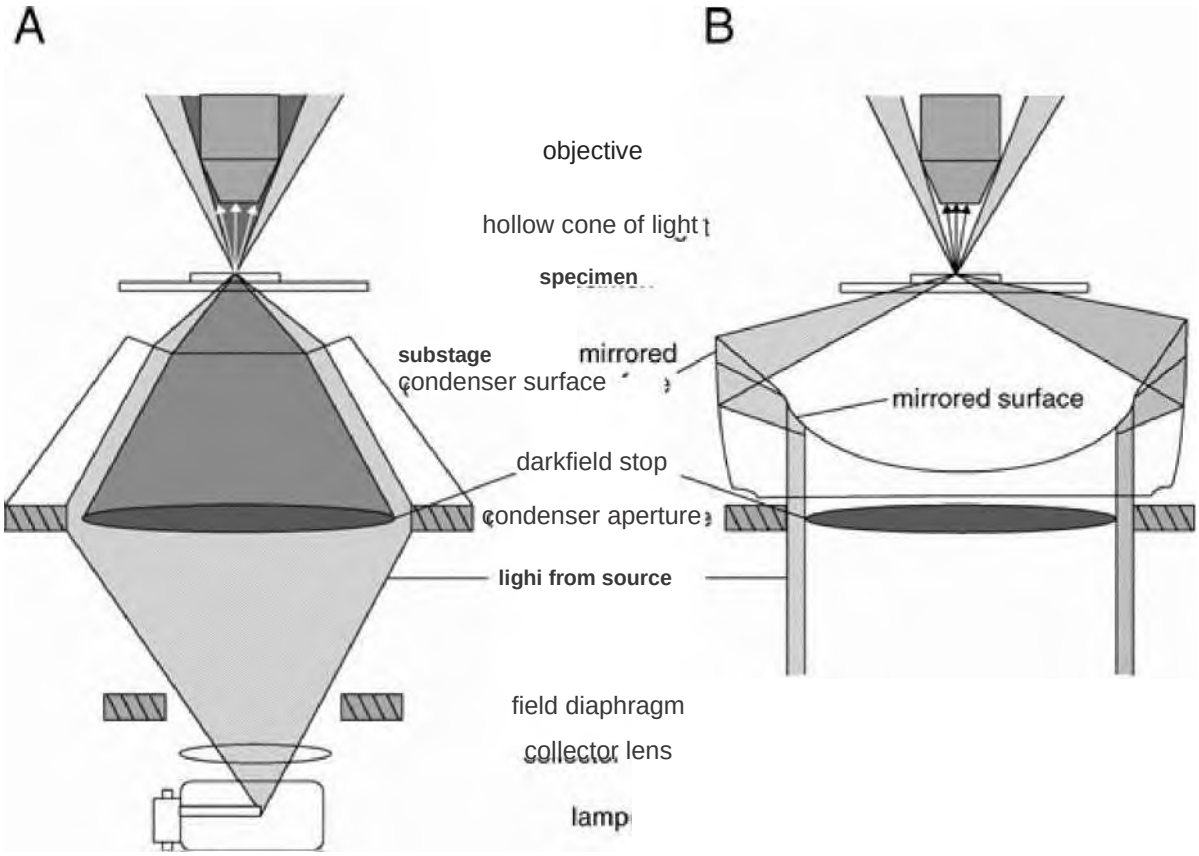


Рис. 3-52. Конструкции темнопольных конденсоров.

2.3.2 Полихроматический контраст (цветовой контраст).

Если вставку темнопольного конденсора сделать из прозрачного окрашенного диска (светофильтра), то фон изображения станет цветным в соответствии с цветом светофильтра.

Другая модификация темнопольной микроскопии - освещение по Рейнбергу (Rheinberg). В этом методе центральная вставка в конденсор делается из прозрачного окрашенного материала (дифференциальный светофильтр Раттэна-Рейнберга). Часто для сравнения используются дополнительные цвета центральной зоны и периферии. Например, голубая вставка и желтое поле или зеленая вставка и красное поле. Можно показать, что при указанных комбинациях цвет препарата будет дополнительным к цвету фона. Препарат приобретает цвет, соответствующий тому, который он рассеивал, тогда как фон сохраняет цвет центральной вставки. Неокрашенные живые объекты будут хорошо видны при использовании либо темного поля, либо освещения по Рейнбергу, которые дают интересный контраст.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

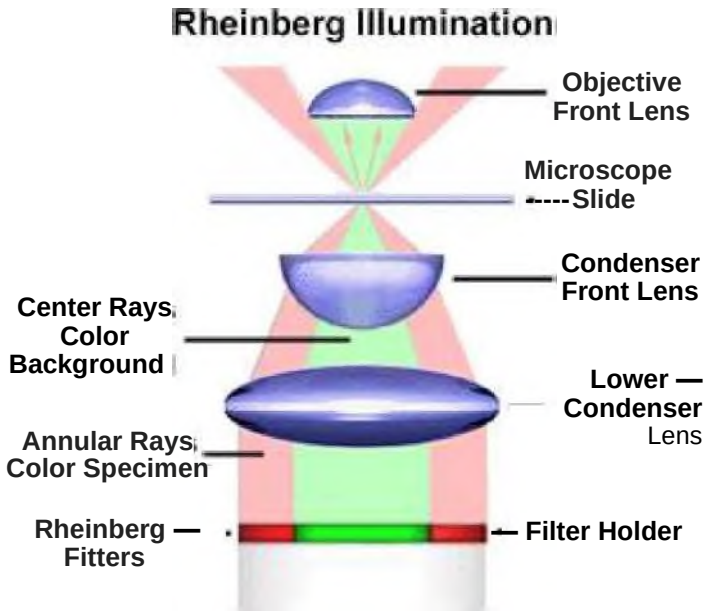


Рис. 3-53. Освещение по Рейнбергу.

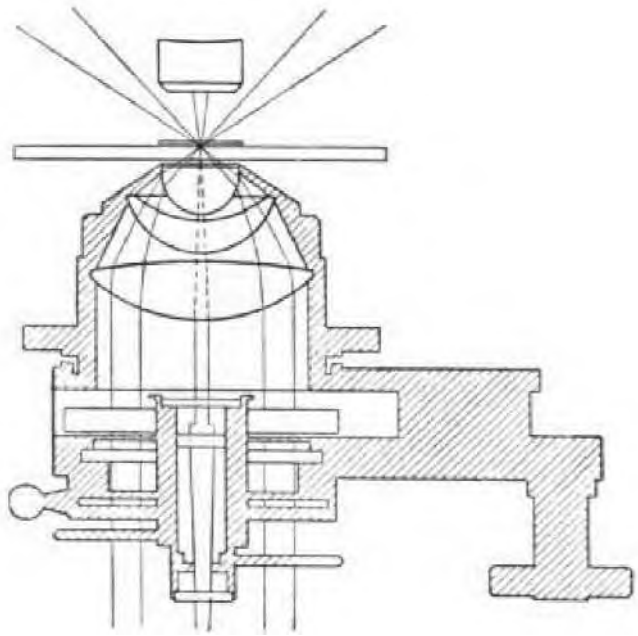


Рис. 3-54. Конденсор полихроматор фирмы Zeiss.

Конденсор содержит два светофильтра. При помощи синего светофильтра проходящий свет окрашивается в синий цвет. При помощи красного светофильтра косые лучи окрашиваются в красный цвет. Бесцветный объект становится красным на синем фоне.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

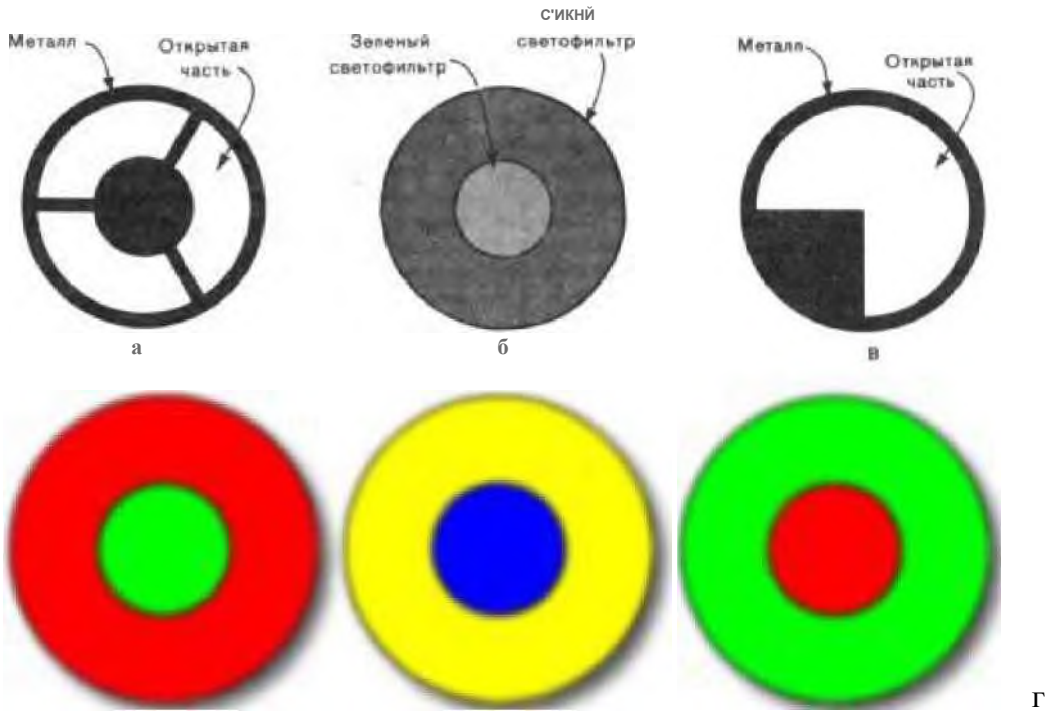


Рис. 3-55. Вставки в конденсор для различных режимов освещения, а-темнопольное освещение, б,г-освещение по Рейнбергу, в-косое азимутальное освещение.

2.3.3-Ультрамикроскопия.

Ультрамикроскоп (ultramicroscope) - оптический прибор для обнаружения частиц столь малых размеров (до 2 нм), что их нельзя наблюдать в обычные микроскопы. В ультрамикроскоп наблюдаются не сами частицы, а большие по размерам пятна дифракции света на них. Размеры и форму частиц в ультрамикроскоп установить нельзя, однако можно определить их концентрацию. Конструкцию ультрамикроскопа предложили в 1903 г. профессор Геттингенского университета, австрийский химик Р. Зигмонди (Zsigmondy Richard Adolph (1865-1929)) и немецкий физик Зидентопф (H. F.W. Siedentopf). С 1897 по 1907 год Зигмонди работал профессором в Йенском Университете, где вместе с оптиком Зидентопфом разработал ультрамикроскоп. Кювета, содержащая изучаемое вещество, освещается с помощью косого освещения.

В 1913 г. в целях повышения апертуры объектива микроскопа, Зигмонди предложил конструкцию щелевого иммерсионного ультрамикроскопа, в котором осветительный и наблюдательный объективы касались друг друга. При этом наблюдения производились без кюветы, а раствор помещался непосредственно между объективами. Объект освещается через узкую прямоугольную щель, расположенную сбоку. Изображение щели проектируется в зону наблюдения. В окуляр наблюдательного микроскопа видны светящиеся точки (дифракционные пятна) частиц, находящихся в плоскости изображения щели. Выше и ниже освещенной зоны присутствие частиц не обнаруживается.

В дальнейшем было обнаружено, что наблюдения по методу темного поля можно проводить и с обычным микроскопом, снабженным специальным конденсором (темнопольный метод).

Зигмонти предложил классификацию коллоидных частиц по их видимости в ультрамикроскоп и по их взаимодействию со средой.

Конструкцию проточного ультрамикроскопа предложили в 1953 году советские ученые Дерягин Борис Владимирович и Власенко Г.Я.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

-Дерягин Б.В. Власенко Г.Я. Проточный ультрамикроскоп ВДК-4 Коллоидный журнал. 1951. № 4. -249 с.

-Дерягин Б.В., Власенко Г.Я. Проточная ультрамикроскопия, «Природа», 1953, №11.

Поток жидкости с частицами направляется по трубке навстречу глазу наблюдателя. Частицы, пересекая зону освещения, регистрируются как яркие вспышки визуально или с помощью фотометрического устройства. Регулируя яркость светового потока подвижным клином фотометрическим, можно выделять для регистрации частицы, размер которых превышает заданный предел. С помощью поточного ультрамикроскопа удаётся определять частичные концентрации золей вплоть до 1010 частиц в 1 см3.

В ЛОМО в 1961 году выпускался поточный ультрамикроскоп ВДК-4, предназначенный для определения концентраций аэрозолей, гидрозолей и других коллоидно-дисперсных систем. Принцип действия данного прибора основан на регистрации числа коротких вспышек, возникающих в момент просасывания аэрозоля через кювету, ярко освещенную светом.

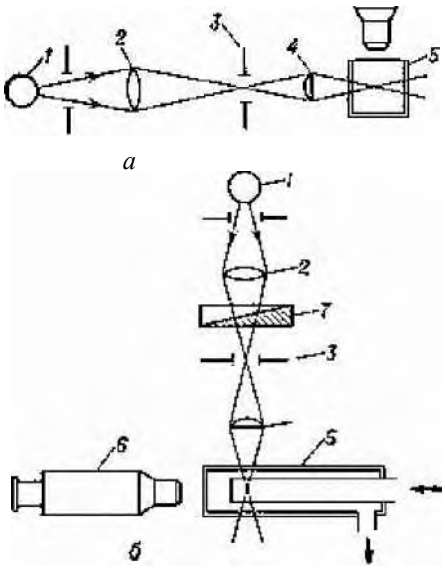
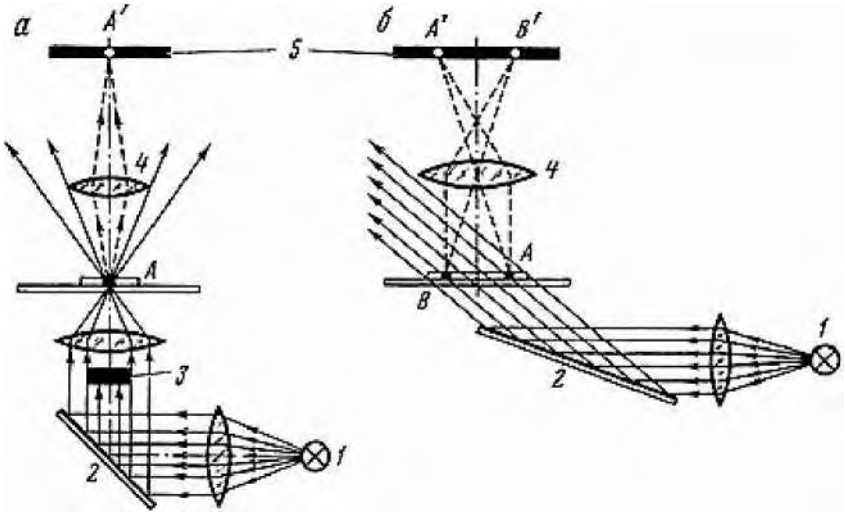


Рис. 3-56. Принципиальные схемы щелевого (а) и поточного (б) ультрамикроскопов: 1 — источник света; 2 — конденсатор; 3 — оптическая щель; 4 — осветительный объектив; 5 — кювета; 6 — наблюдательный микроскоп; 7 — фотометрический клин.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com



Рис, С, Схема щелевого ультрамикроскопа
Р. Зидеитонфа и Р. Зигмонди (19()3 г.)

Образование темнопольпого нзоСражеЕшл: о — при прямом, О—при косом освещении объекта; ɜ— осветитель; 2 — зеркало; J — затемняющая пластины; 4 — объектив; 5—темное иоле

Рис. 3-57. Щелевой ультрамикроскоп.

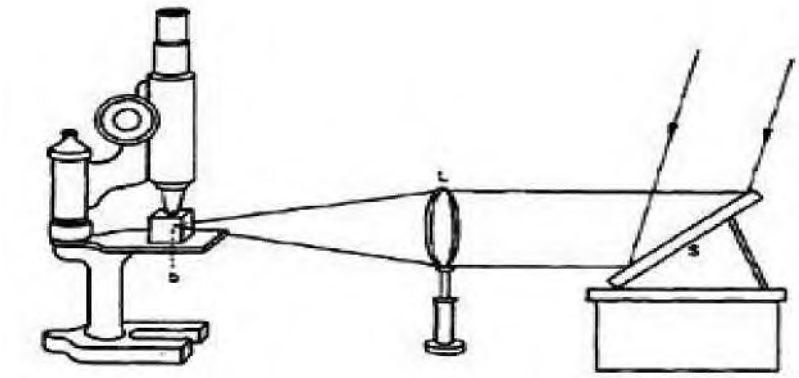


Рис. 3-58. Освещение в щелевом ультрамикроскопе.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

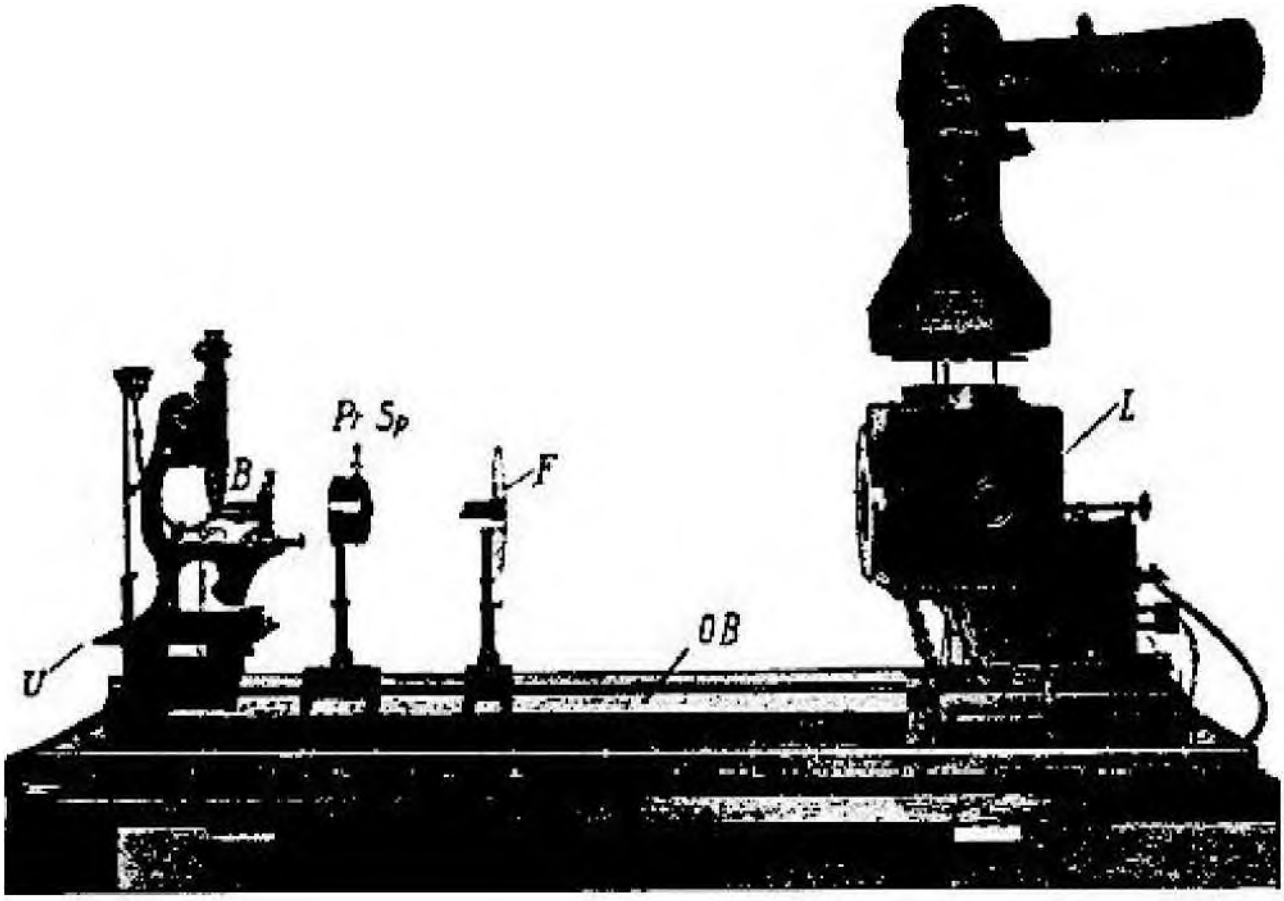


Fig. 2. Immersion ultramicroscope.

L = Light source; r = Telescope objective which gives a picture of the light source on the precision slit PrSjb; The condenser S forms an image of the precision slit in tire colloidal solution,, which is in a small dish.

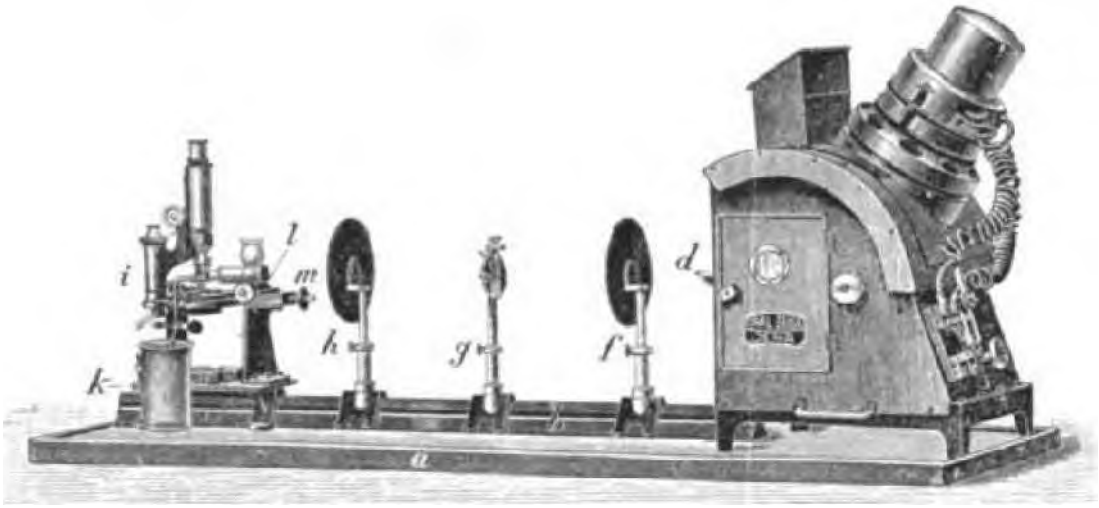


Рис. 3-59. Ультрамикроскоп по Жигмонди и Зидентопфа.
a-основа микроскопа
b-оптическая скамью d-отверстие f-проекционный объектив g-щель h-проекционный объектив i-микроскоп k-подставка для микроскопа
l- салазки для перемещения объектива

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Рис. 3-60. Ультрамикроскоп фирмы Baush&Lomb.

Метод ультрамикроскопии позволяет обнаружить чрезвычайно мелкие частицы, размеры которых лежат далеко за пределами разрешающей способности наиболее сильных микроскопов. С помощью иммерсионных ультрамикроскопов удаётся зарегистрировать присутствие в препарате частиц размером до 2*10-9 м. Однако определить форму и точные размеры таких частиц с помощью этого метода невозможно: их изображения представляются наблюдателю в виде дифракционных пятен, размеры которых зависят не от размеров и формы самих частиц а от апертуры объектива и увеличения микроскопа. Т. к. подобные частицы рассеивают очень мало света, то для их освещения требуются чрезвычайно сильные источники света, например угольная электрическая дуга. Ультрамикроскопы применяются главным образом в коллоидной химии для изучения мелких частиц в растворах. Ультрамикроскоп позволяет считать количество коллоидных частиц и изучать их движение. С помощью ультрамикроскопа можно регистрировать частицы размером от 2 нм.

2.4- Метод фазового контраста.

2.4.1 Стандартный метод фазового контраста.

Для реализации метода фазового контраста необходим специальный фазовый конденсор (с кольцевой вставкой) и специальный объектив (с кольцевой вставкой). Иногда используют универсальный конденсор, в который вставляются различные кольцевые вставки для различных увеличений. Размер кольцевой вставки в конденсоре должен соответствовать размеру кольцевой вставки в объективе.

Метод связан с изменением условий освещения при наблюдении слабоконтрастных биологических объектов (микроорганизмов, растительных клеток) в неокрашенном состоянии с целью их визуализации (контрастирования).

В отличие от метода темного поля, выявляющего лишь контуры объекта, метод фазового контраста позволяет увидеть элементы внутренней структуры рассматриваемого прозрачного объекта. Устройство дает возможность преобразовывать фазовые изменения световых волн, проходящих через объект, в амплитудные, в результате чего прозрачные микроорганизмы становятся видимыми.

Метод фазового контраста был создан нидерландским физиком Фриц Цернике (Frits Zernike(1888-1966)) в 1934 году. За эту работу он удостоен Нобелевской премии 1953 г. в области физики: «За обоснование фазово-контрастного метода, особенно за изобретение фазово-контрастного микроскопа».

В зависимости от размера фазовых колец и способа их получения различают:

- положительный фазовый контраст, когда фазовое кольцо в объективе технологически получается путем травления, что вносит «опережение» в прямо прошедший свет, при этом изображение объекта с показателем преломления большим, чем у среды, получается темнее на более светлом фоне;
- отрицательный фазовый контраст, когда фазовое кольцо в объективе технологически получается путем нанесения на поверхность стекла тонкой пленки, что вносит «запаздывание» в прямо

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

прошедший свет, при этом изображение объекта с показателем преломления большим, чем у среды, выглядит светлее окружающего темного фона.

Метод может быть реализован двумя способами:

-внутренний - расположение фазовых колец внутри оптических систем объектива и конденсора,

-внешний - расположение фазовых колец вне объектива и конденсора.

Внутренний способ реализуется с помощью фазово-контрастных устройств, содержащих фазовые объективы и специальный конденсор с набором световых колец (встроенных в конденсор или выполненных в виде вкладышей). Приобретаются отдельно от микроскопа.

Внешний способ реализуется с помощью соответствующих колец, которые устанавливаются в плоскости апертурной диафрагмы конденсора и в вынесенную с помощью дополнительных линзовых элементов плоскость выходного зрачка объектива. При этом и конденсор, и объектив — обычные. Чаще всего этот способ реализуется в современных инвертированных микроскопах.

Фазовые объективы.

Внутри имеют фазовый элемент (линза или пластина) с нанесенным кольцом, которое изменяет фазу и уменьшает амплитуду световой волны. Середина кольца в среднем составляет 1/2—2/3 от диаметра выходного зрачка объектива при этом светопропускание кольца — 10—30% в зависимости от типа фазового контраста.

Фазовый конденсор.

В плоскости апертурной диафрагмы имеет пластину с прозрачным световым кольцом. Размер светового кольца, вернее его изображение, подбирается таким образом, чтобы оно соответствовало (или даже было чуть меньше) размеру фазового кольца объектива. В современных микроскопах существует два способа установки световых пластин в конденсор: в плоскость апертурной диафрагмы конденсора устанавливается съемный вкладыш для соответствующего объектива (обычно вкладыш представляет собой черную пластмассовую деталь с прорезанным световым кольцом);

используется револьверное устройство, закрепленное на конденсоре; имеется несколько гнезд — одно пустое — для светлого поля и 3— 4 гнезда со стеклянными пластинами, на которых с помощью маски получено световое кольцо.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Фазовое кольцо в объективе.

Рис. 3-61. Фазовые кольца в объективе.

Рис. 3-62. Фазовый конденсор КФ-4, выпускаемый фирмой ЛОМО.

Разновидности и модификации метода фазового контраста.

2.4.2 Цветной фазовый контраст.

Голландский физик Цернике (изобретатель метода фазового контраста) первым начал изучать возможности цветного фазового контраста. Для реализации цветного фазового контраста на одну из линз наносится как обычно кольцевая фазовая пластинка. Поверхность, не занятая кольцом, покрывается тонким слоем другого вещества. Эти два вещества должны иметь одинаковый показатель преломления в оптической части спектра, но дисперсии этих веществ должны быть различны. Показатель преломления фазового кольца много меньше показателя преломления окружающего слоя в фиолетовой области спектра, и много больше в красной. Для одного и того же объекта получается положительный или отрицательный фазовый контраст, в зависимости от длины волны освещающего света. Например, объект с показателем преломления, большим чем показатель преломления окружающей среды. В красном свете он будет более ярким, чем окружающее поле, а в синем свете - более темным. В белом свете объект будет окрашен в желто-оранжевый цвет с сине-фиолетовой каймой.

2.4.3 Аподизированный фазовый контраст (Nikon).

Фирмой Nikon разработан усовершенствованный метод фазового контраста ADL - Apodized Phase Contrast. Суть метода состоит в том, что вместо одного фазового кольца в конденсоре используются три дополнительных кольца в виде нейтральных фильтров. Центральное оптически менее плотное (25%) и по краям два кольца оптически более плотные (50%).

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

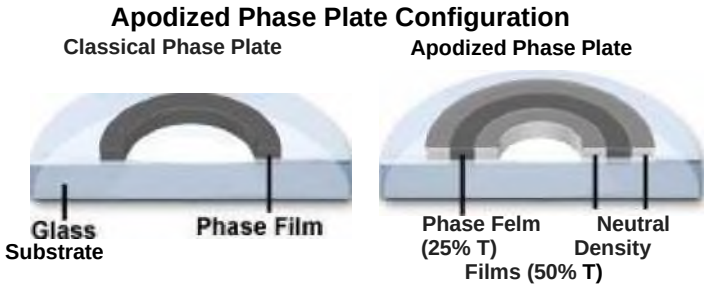


Figure 2

Рис. 3-63. Фазовая вставка в объектив для аподизированного фазового контраста.

При обычной фазово-контрастной микроскопии при наблюдении фазовых объектов возникает гало эффект - появление светящегося ореола по контуру изображения объекта. Введение двух дополнительных колец с поглощением 50% по бокам обычного фазового кольца позволяет уменьшить эффект гало и повысить контраст даже для мелких объектов.

2.4.4 Варел контраст (Zeiss).

Фирма Zeiss был создан метод контрастирования под названием Варел контраст (VAREL contrast). При этом методе контрастирования вставка сделана не в виде кольца (как при фазовом методе) а виде сегмента.

Фирма Olympus разработала похожий метод под название рельефный контраст (Relief Phase Contrast - RPC).

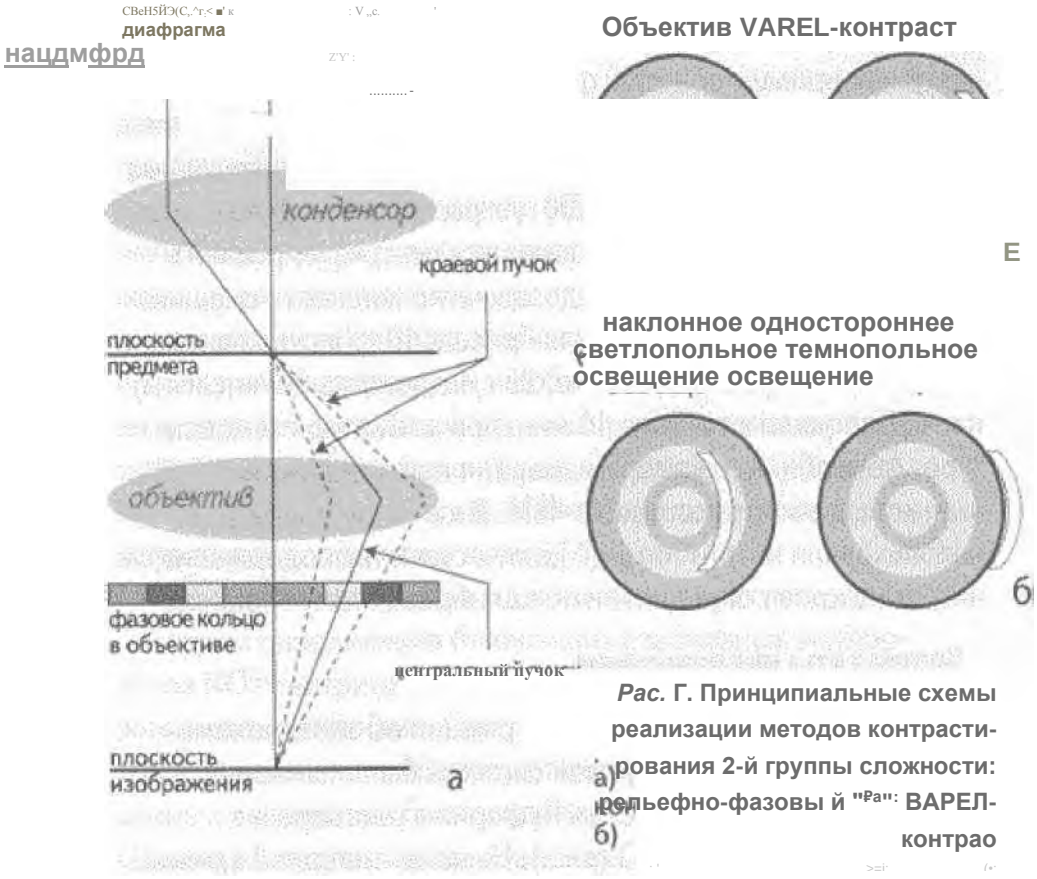


Рис. Г. Принципиальные схемы реализации методов контрастирования 2-й группы сложности: рельефно-фазовы й "Ра": ВАРЕЛ-контрао

Рис. 3-64. Варел контраст.

2.4.5 Компьютерный метод фазового контраста.

Оказывается, что фазовый контраст можно реализовать на обычном микроскопе без всяких вставок с помощью компьютера. Для этого в компьютер вводятся два изображения объекта. Первое изображение вводится при слабой расфокусировке объекта при малом смещении

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

столика микроскопа вниз. Второе изображение вводится при слабой расфокусировке объекта при малом смещении столика микроскопа вниз. При вычитании одного изображения из другого в результате получаем фазовое изображение объекта. Суть метода состоит в том, что при смещении столика в разных направлениях происходит разное изменение фаз.

Введем следующие обозначения:

I1- изображение объекта, смещенное по оси Z немного вниз,
12 - изображение объекта в плоскости фокусировки,
13 - изображение объекта, смещенное по оси Z немного вверх,
14 - результирующе изображение.

Тогда I4 = (I3 - I1) = (I3 - I2 + I2 - I1) = (I3-I2) + (I2-I1).

Получается, что разность двух расфокусированных изображений равна сумме изображений, расфокусированных вверх и вниз. В результирующем изображении происходит выделение границ объектов.

2.5- Аноптральный метод (амплитудно-контрастный метод, фазово-темнопольный метод).

Новый метод световой микроскопии предложил финский физиолог Alvar Wilska (1911-1987) в 1953 году. (Wilska A. A new method of light microscopy. Nature 171, 353 (1953)).

Вильска предложил объектив, аналогичный фазовоконтрастному, но с плотным кольцом из сажи, нанесенном на одну из линз. В обычном фазовом объективе кольцо прозрачное. Установив в конденсоре кольцевидную диафрагму соответствующей апертуры, Вильска сконструировал микроскоп, дающий эффект, подобный наблюдаемому при отрицательном фазовом контрасте. При этом получаются чрезвычайно контрастные изображения, и более высокая разрешающая способность по сравнению с фазовым методом.

Идеи Вильска были раелизованы фирмой Reichert, выпустившей в 1954 году микроскоп под названием аноптральный.

Фирмой ЛОМО в 1956 году выпускался фазовотемнопольный объектив типа Вильска, который входил в специальный комплект микроскопа МФА-2.

Пешков М.А.(Москва, 1955), создал свою конструкцию аноптрального микроскопа. Он увеличил ширину кольца из копоти в объективе и довел ее до границ оправы линзы. По его конструкции кольцевая диафрагма в конденсоре была заменена центральной диафрагмой. Поглощающий слой объективов — люков, изготавливаемый из копоти или меди, пропускает не более 10% света, и только в этих условиях обеспечивается максимальный контраст. Данную конструкцию объективов автор назвал объектив-люк. По сравнению с фазовоконтрастным устройством он дает более контрастное и ясное изображение объекта. -Пешков М. А. Аноптральный микроскоп — новый оптический прибор для исследования малоконтрастных объектов, Успехи современной биологии, 1955, т. 39, в. 2.с.253 -Пешков М.А. Новый тип объективов для аноптральной микроскопии, работающих по типу люка, и краткий анализ принципа ихь действия. Успехи современной биологии. 1955, т.40. в.3 -Пешков М.А. Микроскоп и основные методы работы с ним. В кн. "Лабораторные методы исследования патогенных простейших" под ред Засухина Д.Н. М., 1957, стр. 7-51.

Третий вариант аноптрального микроскопа был предложен Стефановым С.Б. в 1960 году. Во-первых, автор показал, что сажу можно заменить тонкой полупрозрачной пленкой из любого металла. Такая пленка легко наносится на поверхность линзы напылением меди, серебра или золота в вакууме. Во-вторых, использование принципа темного поля с затемнением в объективе, описанного Н.М. Гайдуковым в 1916 году, значительно упростило настройку микроскопа. В отличие от общепринятого кольца в фазовоконтрастном

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

микроскопе и объективах Вильска и Пешкова, Стефанов оставил полупрозрачную металлическую пленку на одной из линз объектива лишь в центральной части.

-Стефанов С.Б. Объектив с центральным диском для микроскопии живых биологических объектов. Журнал общей биологии. 1960, 21, 3.

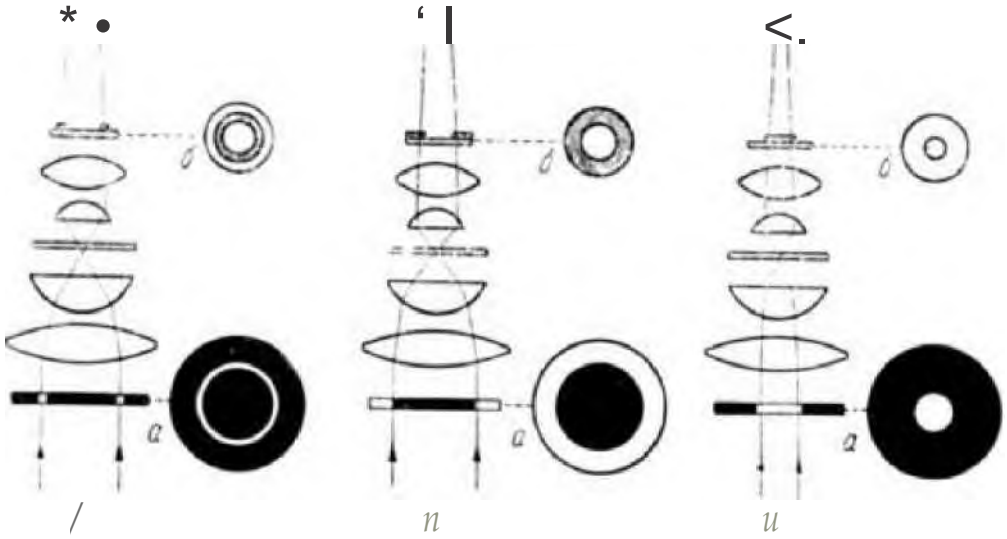


Рис. 3-65. Ход лучей при аноптральном методе различных авторов:
I- Вильска
II- Пешков
III- Стефанов

2.6- Хоффмановский контраст (Хоффмана модуляционный контраст).

Хофмановский контраст (Hoffman modulation contrast) - это метод косого освещения, повышающий контраст в неокрашенных препаратах за счет образования градиента оптических фаз. Хоффмановский метод был создан Хоффманом (Robert Hoffman, США) в 1975 году.

-Robert Hoffman and Leo Gross, "Modulation Contrast Microscope," Appl. Opt. 14, 11691176 (1975)

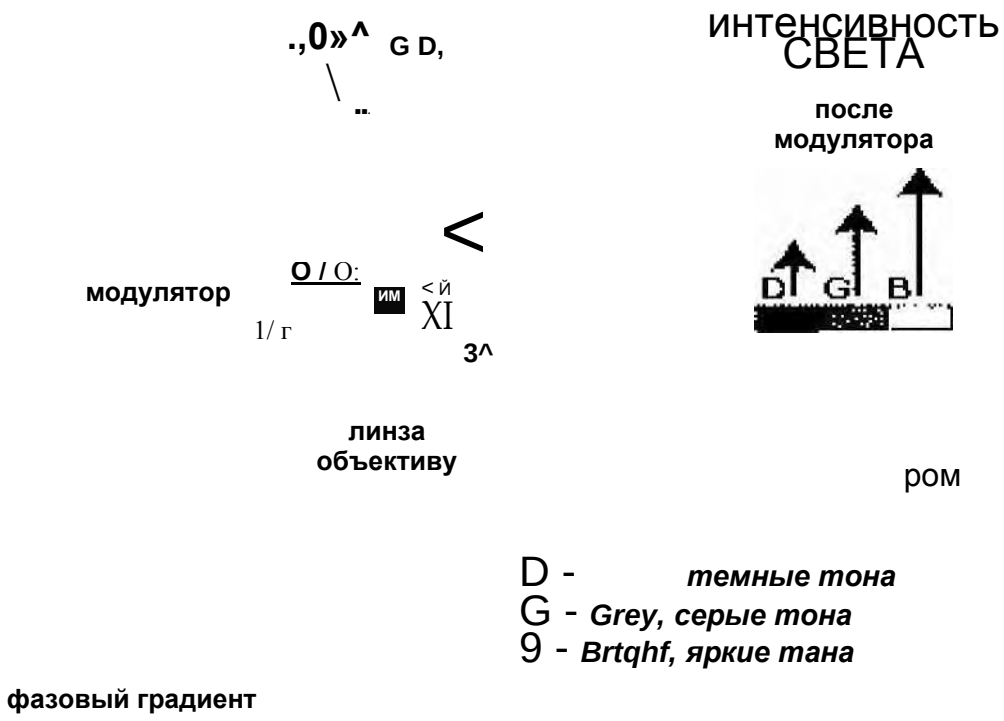
-Hoffman R. The modulation contrast microscope: principles and performance. Journal of microscopy. 1977. V. 110, Pt. 3. P. 205-222.

-Hoffman R. patent US 4200353, Modulation contrast microscope with three regions, 1980

Хоффмановский метод контрастирования в отличие от фазового метода контрастирования не приводит к возникновению светящегося ореола вокруг границ объектов.

Хоффмановский контраст представляет собой метод косого освещения, повышающий контраст в окрашенных и неокрашенных препаратах за счет образования градиента оптических фаз. Хофмановский контраст позволяет наблюдать рельефное изображение живых образцов в пластиковых чашках с высокой четкостью. Метод позволяет использовть большиие рабочие расстояния и вытокие числовые апертуры.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com



Принципиальная схема реализации Ьфман-контрасга

Рис. 3-66. Метод контрастирования по Хоффману.

Различные фирмы разработали различные модификации хоффмановского модуляционного контраста:

1- Nikon - NAMC - Nikon advanced modulation contrast
2- Olympus - RC - Relief contrast
3- Leica - IMC - Integrated modulation contrast

2.7- DIC - Дифференциально-интерференционный контраст (ДИК).

Дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия (интерференционно-контрастная микроскопия или микроскопия Номарского) — световая оптическая микроскопия, используемая для создания контраста в неокрашенных прозрачных образцах. ДИК микроскоп позволяет определить оптическую плотность исследуемого объекта на основе принципа интерференции и таким образом увидеть недоступные глазу детали. Относительно сложная оптическая система позволяет создать чёрно-белую картину образца на сером фоне. Это изображение подобно тому, которое можно получить с помощью фазово-контрастного микроскопа, но в нём отсутствует дифракционное гало.

В ДИК микроскопе поляризованный луч из источника света разделяется на два луча, которые проходят через образец разными оптическими путями. Длина этих оптических путей (т. е. произведение показателя преломления и геометрической длины пути) различна. Впоследствии эти лучи интерферируют при слиянии. Это позволяет создать объемное рельефное изображение, соответствующее изменению оптической плотности образца, акцентируя линии и границы.

Интерференционный контраст - это дальнейшее развитие фазового контраста. При интерференционном контрасте пучок света разделен таким образом, что контрольный пучок отклоняется на небольшое расстояние, обычно меньшее, чем диаметр дифракционного кружка. При таком методе получаются окрашенные изображения, дающие очень ценную информацию при исследовании живого материала.

Так как при данном методе контрастирования используется поляризованный свет, то метод

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

работает только со стеклянной посудой (чашками Петри). Пластиковую посуду использовать нельзя, так как пластиковая посуда искажает поляризованный свет и метод не работает.

Дифференциально-интереференционный контраст (контраст по Номарскому) был создан Намарским (Nomarsky) в 1953 году.

Основные условия освещения:

-обычный осветитель

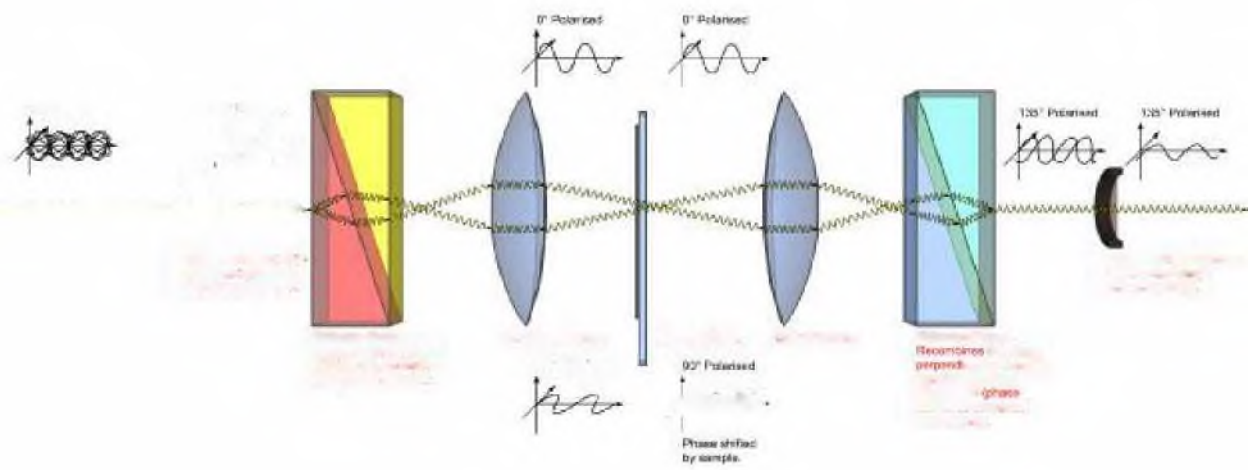
- линейный поляризатор (угол 45 градусов) превращает свет в линейно-поляризованный, -призма Волластона разлагает линейно поляризованный свет на два линейно поляризованных луча, плоскости поляризации который перпендикулярны,

-два луча проходят через объект исследования,

-в анализирующей призма Волластона происходит интерференция двух лучей,

- после линейный поляризатора (угол наклона 135 градусов) происходит создание объемного (в пределах глубины резкости объектива) цветного контрастного изображения независимо от того, является ли объект анизотропным или нет.

Эта группа микроскопов существует как самостоятельно, так и в виде модуля (дополнительных



принадлежностей — специальных призм, которые устанавливаются для объективов и конденсоров).

Фирмой Zeiss разработаны две модификации метода дифференциального контраста: - PlasDIC, - C-DIC.

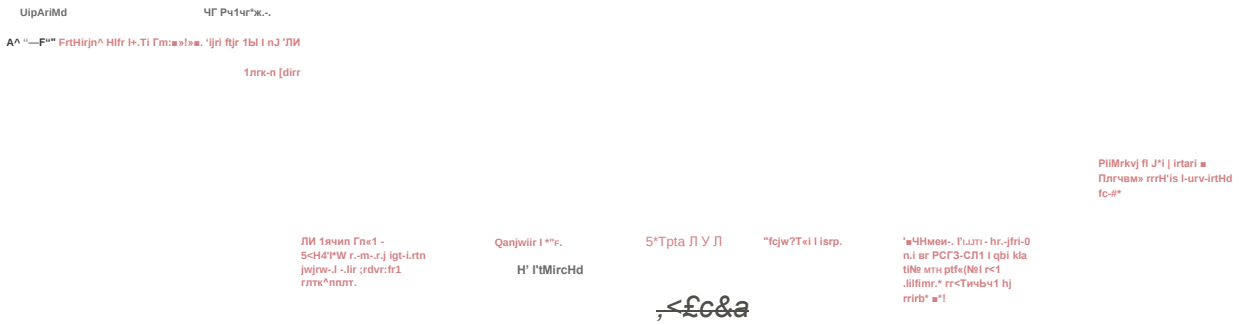
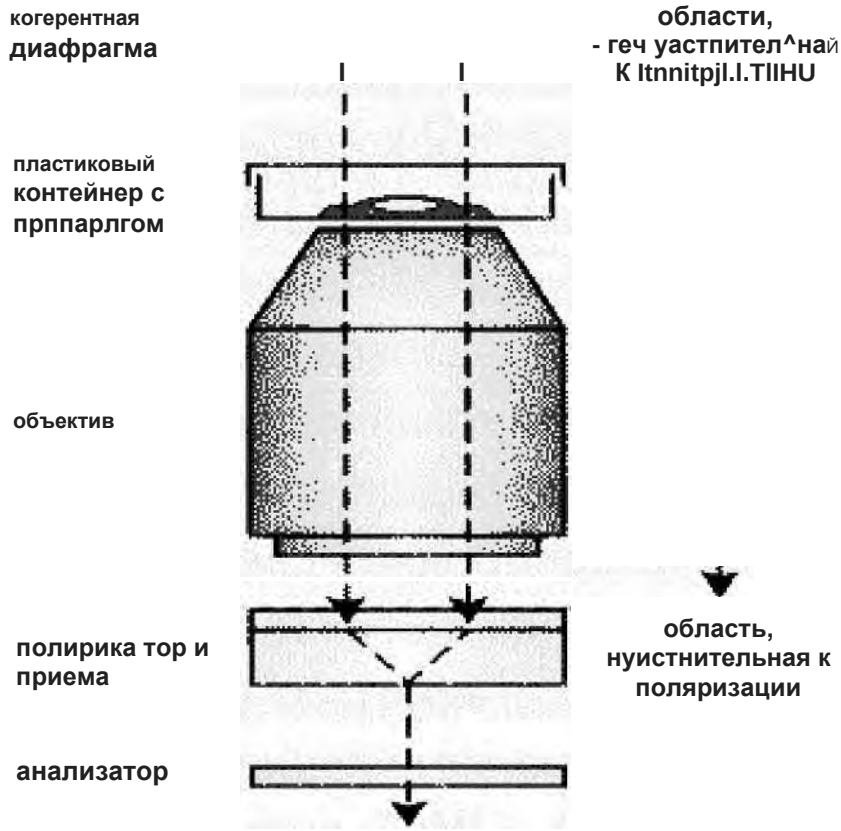


Рис. 3-67. Схема DIC контраста.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com



Принципиальная схема реализации метода Плас ДИК

Рис. 2-68. Схема PlasDIC контраста.

2.8- Флуоресцентный метод.

Флуоресцентный метод состоит в наблюдении флуоресценции препарата при возбуждении его ультрафиолетовым светом. Основной вклад во флуоресценцию вносят белки, которые светятся голубым светом.

В абсорбционных спектральных методах изучаются спектры поглощения веществ на различных длинах волн. При флуоресцентной спектроскопии изучают спектр свечения (флуоресценции), возбуждаемый возбуждаемым светом. При флуоресценции длина волны излучаемого света всегда больше длины волны поглощаемого света.

Условно можно выделить следующие типы собственной флуоресценции:

1 - Возбуждение - ультрафиолетовый свет, свечение - видимый свет.

2- Возбуждение - видимый свет, свечение - инфракрасный свет.

Изучается спектр флуоресценции различных веществ, входящих в состав сыворотки крови. При различных заболеваниях в составе сыворотки крови могут появляться компоненты, обладающие сильной флуоресценцией. Таким образом, флуоресцентный метод может помочь при диагностике различных заболеваний.

В 1956 году Владимиров Ю.А. и Конев С.В. обнаружили явление флуоресценции белков плазмы крови. Таким образом, содержание белка можно определять и флуоресцентным методом. Белки имеют максимум поглощения на длине волн 280нм. Нуклеиновые кислоты имеют полосу поглощения в районе 260 нм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Наблюдалось свечение альбумина на длине волны 450 нм при возбуждении светом с длиной волны 380 нм.

Природными флуорофорами белков являются аминокислоты триптофан, тирозин, фнилаланин. Наиболее информативна триптофановая флуоресценция. Флуоресценцию белков обычно возбуждают в максимуме поглощения при 280 нм или больших длинах волн.

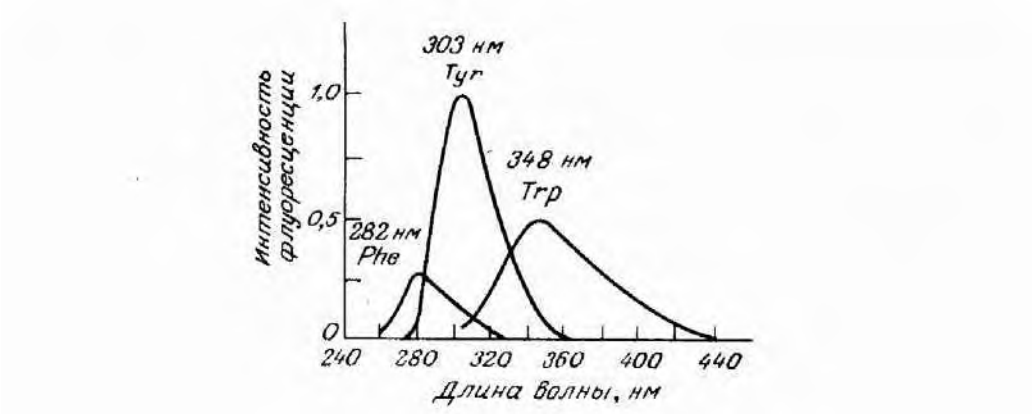


Рис. 3-70. Флуоресцентные спектры испускания ароматических аминокислот.
282 нм - Phe - фенилаланин
303 нм - Tyr - тирозин
348 нм - Try - триптофан

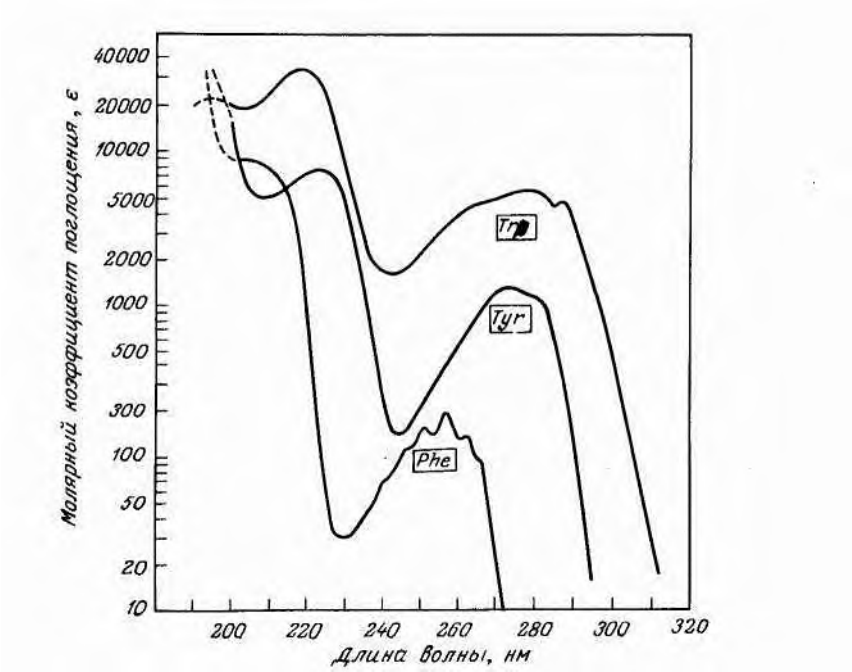


Рис. 3-69. Спектры поглощения ароматических аминокислот.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

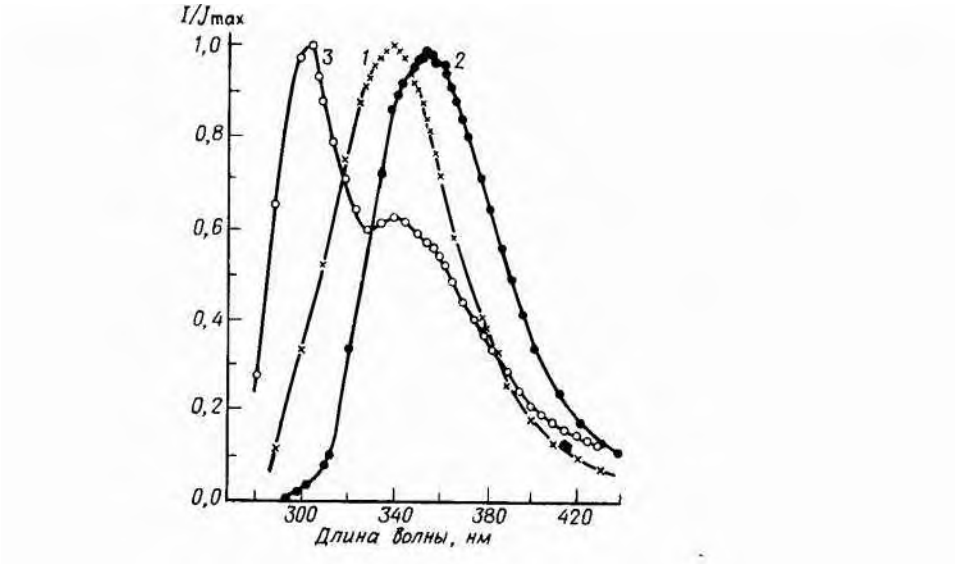


Рис. 3-71. Спектр флуоресценции человеческого сывороточного альбумина HSA и ароматических аминокислот: 1-спектр испускания HSA, 2 - триптофана; 3 - смеси тирозина и триптофана, эквивалентной той, которая найдена для HSA.

Изучались спектры собственной флуоресценции сыворотки крови больных распространенным гнойным перитонитом. Наблюдались достоверные различия между показателями интенсивности флуоресценции сыворотки крови у таких пациентов по сравнению с контрольной группой, причем при гнойном перитоните с развитием процесса собственная флуоресценция сыворотки крови возрастала. Более детальное исследование спектров флуоресценции сыворотки крови больных перитонитом показало, что высокие показатели интенсивности флуоресценции (по сравнению с контрольной группой) достоверно изменяются в динамике заболевания, отражая, таким образом, степень его тяжести (реактивная, токсическая стадии и стадия полиорганной недостаточности).

При ревматоидном артрите степень собственной флуоресценции сыворотки крови уменьшалась по сравнению с флуоресценцией у лиц контрольной группы.

Анализ параметров собственной флуоресценции триптофана позволяет исследовать конформационные изменения в третичной структуре молекулы различных соединений: например, конформационные изменения миоглобина и миоглобинподобных молекул - апомиоглобина и комплекса апомиоглобина с протопорфирином I. Изучали также собственную флуоресценцию ЛПНП, модифицированных в результате аутоокисления. Выявлены увеличение доступности триптофанилов для тушителей флуоресценции (ионы цезия) и индуктивно-резонансный перенос энергии с триптофанилов на продукты, образующиеся при реакции апобелков с продуктами перекисного окисления липидов.

Таблица3-5. Сфетофильтры для флуоресцентной микроскопии.

	с пеетралышЕ ЭДйЕКрИСТЯКВ светод сопельной **ILIAC** і ины. нм		Рекомендуем ЫЕ светофшырьг		
Т1ЭП ВС7Л1ВКЕЕ	**Отражение** >Р0%	Пропускание	Возбуждаю ЦЕ1!Й	Огрезаюший	Пример ф.туо р О кр fl м о в
«гЛстлшяы	400- 440	500 - **700**	ФС1’5 ФС1-2 ФС1-4 ФС1-6 ФГ1-8	ЖС1Е-2 + ЖЗС 10 ЖС18 & - жзс»	Акридиновый ОДОНЖЭДЫЙ. рлвлсшкцни. Аурамин -SO2 Qiuiiflcniie mublacd ■ ОМ .
	450-450	520-700	>.=4*0-180 **нм** ССЛ5-3 С С 15-5 **СС15-Й**	ОС 11-2 л = 520-5<50 **нм**	ФИТЦ

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

	520 - 550	630- "00	**л ■ 544 км** 3GI 1-2 3CII-J	КС 11-2 ком КС] 3-2 ОС 14-2 ОС'14-4	Родамин. Генаюпорфпрнн ХЛОрофНЛЗч Thus Red
	340-370	**425 - 500**	УФС6-5 УФСб-3 УГФ0-8	ЖСЭ ECS	DARK Hoechst Нятехышынн

Метод основан на наблюдении микроскопических объектов с использованием их способности к свечению. По сравнению с методами обычной микроскопии исследование в свете люминесценции обладает рядом преимуществ: цветное свечение, высокая степень контрастности светящихся объектов на темном фоне, возможность исследования как прозрачных, так и непрозрачных живых объектов, а также различных функциональных процессов в клетках и тканях в динамике. При помощи люминесцентной микроскопии возможно обнаруживать и устанавливать локализацию отдельных микроорганизмов и вирусов.

Например, в медицинской микробиологии применяют два метода люминесцентной микроскопии: метод с использованием флуорохромирования и метод меченных флуорохромами антител. Метод флуорохромирования почти не отличается от общеизвестных методов окрашивания стандартными красителями, и требует меньше времени (доли минуты). В бактериологии этот метод применяется как метод люминесцентного выявления возбудителя туберкулеза, для диагностики таких инфекционных заболеваний, как дифтерия, гонорея, возвратный тиф и др.

Фотолюминесценция представляет собой явление свечения объектов, которое возникает в результате поглощения объектом энергии света. Вследствие некоторых причин свет люминесценции обладает большей длиной волны, чем поглощенный (правило Стокса). Поэтому люминесценцию выгодно возбуждать либо ультрафиолетовыми лучами (300-400 нм), либо сине-фиолетовыми, чтобы наблюдать свечение в диапазоне видимого спектра. Этот вид люминесценции носит название вторичной (наведенной) в отличие от первичной - собственной флюоресценции, которой обладают некоторые витамины, многие пигменты, некоторые жировые вещества и антибиотики, встречающиеся в живых организмах, ряд продуктов нормального и патологического обмена.

Флуорохромы - красители, флуоресцирующие при облучении ультрафиолетовыми лучами. Из синтетических флюорохромов наилучшие результаты дают акридиновый оранжевый, корифосфин, примулин, родамин, ФИТЦ (флюоресцеинизотиоцианат), которые обычно применяют в виде слабых водных растворов.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

2.9- Конфокальная микроскопия.

Метод конфокальной микроскопии основан на трехмерном сканировании препарата с помощью лазерного луча. Лазерным лучом возбуждается флуоресценция объекта, которая регистрируется точечным детектором. Впервые концепция конфокальной микроскопии была разработана в 1956 году аспирантом Гарвардского университета Марвином Мински (Marvin Minsky). В Гарварде он так же построил первый конфокальный сканирующий микроскоп. В 1961 году он получил патент на конфокальный сканирующий микроскоп. Широкое применение конфокальной микроскопии началось лишь в 1980-х гг., благодаря бурному развитию компьютерной и лазерной технологий. Сегодня конфокальная микроскопия является незаменимым инструментом для широкого спектра исследований.

2.10- Окраска препаратов.

Окраска препаратов является основным и стандартным методом повышения контраста изображений в микроскопе. Существуют методы окраски фиксированных и живых клеток. Методы окраски бывают двух типов - обычные и флуоресцентные, для флуоресцентных методов наблюдения.

2.11- Структурное освещение.

Структурный свет применяется для выявления рельефа поверхности. Этот метод иногда называют методом светового сечения или методом теневого сечения. Этот метод можно использовать для изучения профиля формы высохшей капли.

Советский оптик Линник Владимир Павлович (1889-1984) разработал в 1929 году в ГОИ микроскоп, который называется двойным микроскопом Линника.

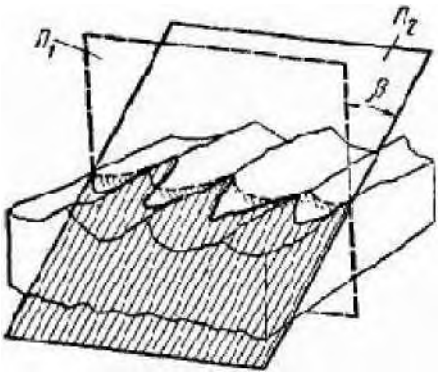
-Затем этот микроскоп стал выпускаться серийно и назывался модель МИС-11. -Затем стали выпускать прибор светового сечения модели ПСС-2.

-Затем стали выпускать прибор теневого сечения модели ПТС-1.

Микроскоп двойной типа МИС-11 снабжен двумя тубусами-осветительным и визуальным, расположенными под углом 90° друг к другу. Тубусы и предметный столик монтированы на удобном устойчивом штативе, обеспечивающем жесткость системы и удобством работы.

Луч света от источника 1, проходя через линзы тубуса и щель диафрагмы, падает на оцениваемую поверхность под углом 45° и создает световое сечение профиля, наблюдаемое через объектив 2 и окуляр в виде светящейся линии.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com



с/ *(куму-*

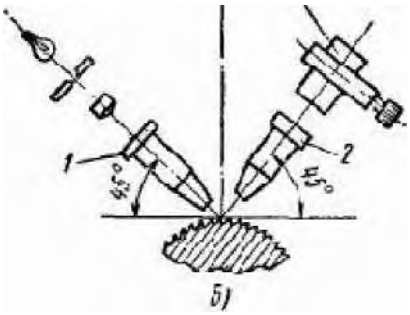


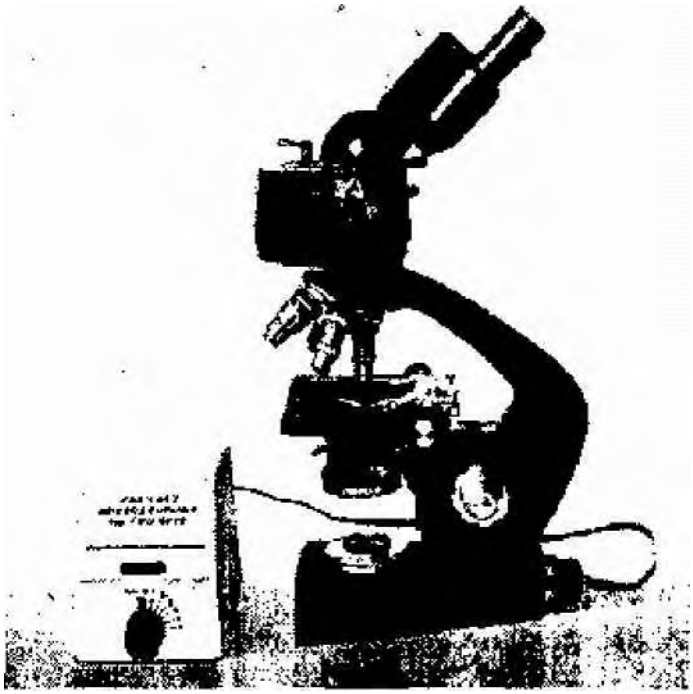
Рис. 2-72. Схема микроскопа Линника.

Прибор светового сечения ПСС-2 имеет поле зрения 10 мм с объективом с апертурой 0,03. Измерение высоты рельефа до 320 мкм.

2.12- Интерференционная микроскопия.

Конструкция интерференционного микроскопа предусматривает раздвоение входящего луча, пропускание одного из полученных лучей через объект, а другого — мимо него, воссоединение и интерференцию их между собой. Разность хода лучей в микроскопе измеряется компенсатором. Разделение и соединение интерферирующих световых пучков обычно производится одним из следующих трех методов: с помощью оптических элементов из двоякопреломляющих кристаллов, зеркальной системы или дифракционным методом. Первый способ получил наибольшее применение. Одним из первых создал поляризационный интерферометр Лебедев А.А. в 1931 году.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com



Рис, 5, Интерференционно-поляризационный микроскоп МРГ5,
Рис. 3-73. Интерференционный микроскоп.

13- метод зеркального освещения.

Метод зеркального освещения состоит в наблюдении препарата под углом отражения, равном углу падения светового потока. Метод удобно использовать при визуальном наблюдении препарата глазом под углом 45 градусов, и при освещении препарата сверху под углом 45 градусов.

Глава 3. Компьютерные методы контрастирования.

3.1- Контрастирование на этапе регистрации изображений.

3.1.1 Оптическое контрастирование в микроскопе.

Оптические методы контрастирования применяются на первом этапе регистрации изображений и были рассмотрены ранее.

3.1.2 Аппаратное контрастирование в цифровой камере.

При вводе изображений с микроскопа в компьютер применяются видеокамеры или цифровые камеры. Путем оптимального выбора яркости и контрастности добиваются максимального качества изображения. При регулировке яркости и контрастности происходит управление динамическим диапазоном регистрируемого изображения. При регулировке яркости происходит усиление величины сигнала в камере. При регулировке контрастности происходит смещение величины сигнала в камере. Возможна так же регулировка следующих параметров: уровень белого, уровень черного, коэффициент усиления. Суть метода состоит в изменении динамического диапазона сигнала, и отображении наиболее информативной части динамического диапазона. Этот метод при использовании телевизионных камер получил название VEC (Video Enhanced Contrast).

Контрастирование с помощью устройств ввода особенно актуально при регистрации слабых сигналов, например, флуоресцентных изображений. Обычно флуоресценция объектов очень слабая, и для ее регистрации применяют особые высокочувствительные камеры, которые способны работать в режиме накопления сигнала.

3.1.3 Фотографическое цветоделение.

При фотографировании на фотопленку существует интересный метод повышения контраста. Этот метод был впервые разработан русским ученым, одним из основателей научной и судебной фотографии Буринским Евгением Федоровичем (1849-1912) в Санкт-Петербурге. Он назвал этот метод фотографическим цветоделением. В 1898 году Буринский

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

был удостоен Академией Наук премии имени М.В. Ломоносова «за метод исследования, равный значению микроскопа». Метод позволяет увеличивать контраст слабоконтрастных снимков. Суть метода состоит в том, что если сложить два одинаковых негатива и сделать новый снимок, то он получится более контрастным. Это связано с тем, что оптической плотности негатива связана логарифмической зависимостью с количеством прошедшего света. В 1889 г. работая в качестве судебного эксперта, Буринский этим способом восстановил текст, находившийся под чернильным пятном. Этой экспертизой датируется возникновение судебной фотографии. В 1892 году благодаря его работам, судебным ведомством России была организована лаборатория судебной фотографии.
В 1894 г. ему удалось восстановить тексты на истлевших кожаных документах, обнаруженных при строительных работах в Московском Кремле.
-Буринский Е.Ф.Судебная экспертиза документов, производство ее и пользование ею. СПб, 1903.
-Буринский Е.Ф.Записка об усовершенствованиях, достигнутых в фотографии, Известия Академии Наук, 1896, т.4, №3.

3.2- Контрастирование путем обработки отдельного изображения

3.2.1 Программное контрастирование.

Программное контрастирование - это улучшения контраста изображения с помощью программного обеспечения в компьютере. Обычно вместе с цифровой камерой для микроскопа поставляется специальное программное обеспечения для управления камерой, ввода и обработки изображений. Улучшения контраста изображения можно путем обработки

изображений с помощью широко известной программы Adobe Photoshop. Улучшение изображения состоит в оптимальной регулировке яркости и контрастности изображения при корректировке гистограммы изображения. Необходимо отметить, что регулируемые параметры аналогичны параметрам, устанавливаемым в цифровой камере при регистрации изображений. Однако существенным моментом является то, что при управлении параметрами цифровой камеры мы реально выделяет необходимую информацию из большого потока информации, который попадает на цифровую камеру. При изменении параметров изображения с помощью программы мы не увеличиваем количество информации на изображении, а только преобразуем его. Отсюда следует ввод, что прежде всего необходимо получить максимальное количество информации с микроскопа (оптическое контрастирование), затем максимально эффективно установить параметры цифровой камеры (аппаратное контрастирование), и только потом произвести программное контрастирование.

Суть программного контрастирования состоит в изменение динамического диапазона. При отображении изображений на экране монитора отображается весь динамический диапазон зарегистрированного изображении. Обычно это 8 бит на цвет, или 256 градаций яркости по каждой из трех компонент цвета (всего 24 бита на один элемент изображения). Существуют специализированные камеры, в которых используется АЦП с 10 битами. Таким образом, можно получать изображение с 1024 градациями серого. Однако для отображения и обработки таких изображений необходимо специальное программное обеспечение. Программа Photoshop поддерживает два основных формата изображений - 8 бит на канал и 16 бит на канал. Но для формата 16 бит на канал работают не все функции. Для обработки слабоконтрастных документов более целесообразно использовать специальные цифровые камеры, динамический диапазон которых составляет 16 бит (65 536 градаций серого). После того как мы получили изображение с большим динамическим диапазоном, его необходимо правильно отобразить. При изучении затертых текстов необходимо отображать верхнюю часть динамического диапазона (светлые буквы на светлом фоне). При изучении залитых текстов необходимо отображать нижнюю часть динамического диапазона (темные буквы на темном фоне). В программе Photoshop это можно сделать с помощью функции Изображение - Регулировка - Кривые.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

3.2.2 Псевдорельеф.

Раньше, при печатании фотоснимков на фотобумаге, фоторельеф создавался на этапе печати фотоснимка. На негатив накладывается позитив, немного сдвигается и помещается в рамку фотоувеличителя. Печатается изображение. Изображение получается рельефным. Чем больше сдвиг - тем сильнее рельеф.

При компьютерной обработке изображений псевдорельеф создается с помощью специальной обработки изображения. Этого же эффекта можно добиться с помощью программы Adobe Photoshop. При этом имеется два варианта. Первый вариант состоит в цифровой реализации описанной выше процедуры печатания фотоснимка. Из исходного изображения делается второй снимок - негатив, и немного сдвигается. Затем из первого снимка вычитается второй снимок. В результате получается рельефный снимок.

Второй вариант состоит просто в выборе специальной функции встроенной в программу Adobe Photoshop.В меню выбирается функция стилизации и затем выбирается режим выпуклого рисунка. Функция: Фильтр - Стилизация - Выпуклый рисунок. Для этой функции можно задавать направление и величину сдвига. Это удобно для выбора оптимального режима отображения.

3.2.3 Выделение контуров.

В современных программах обработки изображений содержится много различных функций для выделения контуров на слабоконтрастных изображений. Например, в программе Adobe Photoshop имеются встроенные фильтры повышения резкости: нечеткая маска, резкие границы, сделать четче, специальное обострение.

3.3- Контрастирование при совместной обработке нескольких изображений

3.3.1 Компьютерный метод косого симметричного освещения.

Применение компьютеров позволяет создавать и реализовывать новые методы контрастирования. Можно на компьютере ввести изображения, полученные при различных ориентациях несимметричной вставки для любого из методов косого освещения. Полученные изображения можно просуммировать на компьютере. На результирующем изображении будут четко выделены все границы объекта, независимо от ориентации.

3.3.2 Компьютерный метод фазового контраста.

Оказывается, что фазовый контраст можно реализовать на обычном микроскопе без всяких вставок с помощью компьютера. Для этого в компьютер вводятся два изображения объекта. Первое изображение вводится при слабой расфокусировке объекта при малом смещении столика микроскопа вниз. Второе изображение вводится при слабой расфокусировке объекта при малом смещении столика микроскопа вниз. При вычитании одного изображения из другого в результате получаем фазовое изображение объекта. Суть метода состоит в том, что при смещении столика в разных направлениях происходит разное изменение фаз.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

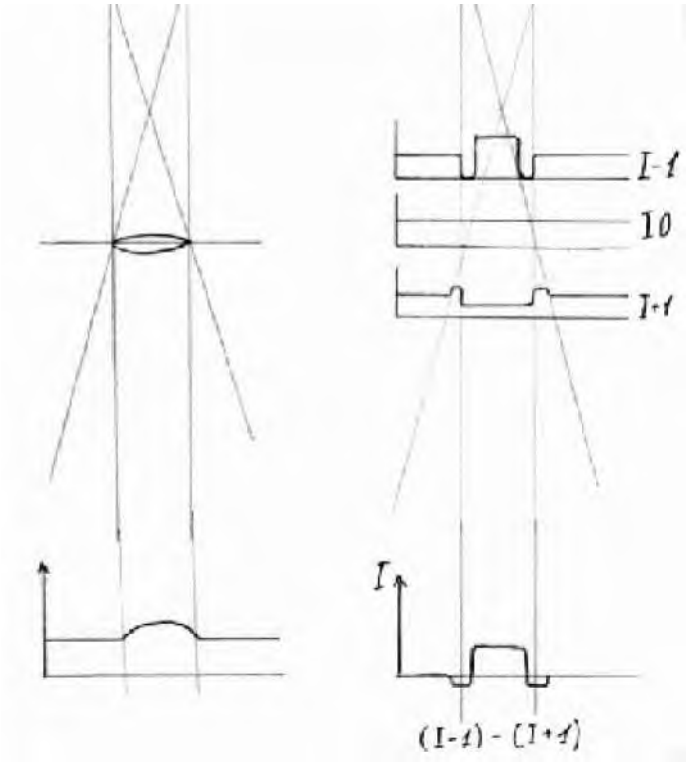


Рис. 3-74. Компьютерная реализация метода фазового контраста. Вычисление оптического рельефа как разницы двух расфокусированых изображений.

Как видно из рисунка, принципиальным является не величина смещения столика при расфокусировке, а совпадение величины смещения вверх и вниз. Оптимальное смещение для расфокусирови составляет % от размера исследуемого объекта.

На границе фазовых областей возникают темные окантовки как и при оптическом методе фазового контраста.

3.3.3 Расфокусировка.

Можно применить метод выделения границ, применяемый в фотографии.
С помощью микроскопа вводится вначале исходное изображение объекта, а затем вводится слегка расфокусированное изображение объекта. Затем с помощью программы из исходного изображения вычитают расфокусированное изображение. На результирующем изображении более четко проявятся границы объектов.

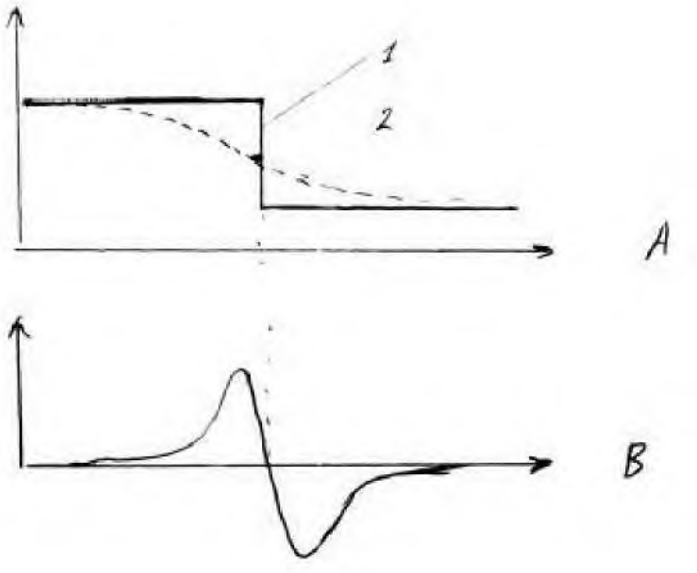


Рис. 3-75. Яркостный профиль границы на изображении.
А-исходной изображение -1, и расфокусированное изображение-2, В-разница между имходным и

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

расфокусированным изображениемю

3.3.4 Псевдорельеф.

Вначале вводят исходное изображение объекта. Затем немного сдвигают столик микроскопа, и вводят изображение сдвинутого объекта. При вычитании сдвинутого изображения из исходного возникает псевдорельефное изображение. В зависимости от того, в каком направлении был сдвинут столик, будут подчеркиваться границы с определенной ориентацией.

3.3.5 Мультиспектральная обработка изображений.

На предварительном этапе производится ввод изображения объекта в различных спектральных диапазонах. Затем на основе совместной обработки этих изображений синтезируется результирующее высококонтрастное изображение объекта. Для обработки мультиспектральных изображений необходимы специальные методы обработки мультиспектральных изображений. Ранее такие методы применялись при обработке мультиспектральных космических снимков. Промоделировать обработку мультиспектральных данных можно с помощью программы Photoshop, которая может работать с тремя каналами. Каждое цветное изображение состоит из трех монохромных изображений (каналов) - красный, зеленый, синий. При обработке изображений операции применяются одновременно ко всем трем каналам. Но с помощью функции Изображение - Регулировка - Уровни можно корректировать каждый канал независимо. Отдельно каналы можно просмотреть с помощью функции Окно - Каналы. Можно каждый канал скопировать в отдельное изображение и обрабатывать независимо от других каналов.
Один из методов обработки состоит в вычисления разности между изображениями, полученными в различных спектральных диапазонах. В программе Photoshop получить разностное изображение между каналами можно с помощью функции Изображение - Вычисления.

Заметим, что объекта может быть не видно ни на одном из мультиспектральных снимков. Но так как объект и среда имеют различные спектры поглощения, то при работе с разностными изображениями можно получить высокий контраст объекта.

3.4- Контрастирование при отображения полученных изображений

3.4.1 Аппаратное контрастирование при отображении.

Аппаратное контрастирование при отображении осуществляется регулировкой яркости и контрастности в устройстве отображения - в дисплее компьютера.

3.4.2 Псевдоцвет (pseudocolor), цветовое кодирование.

Одним из методов для выявления слабоконтрастных областей на черно-белом изображении является метод цветового кодирования. Суть метода состоит в том, что в исходном черно-белом изображении различные уровни яркости отображаются различными цветами. Данный метод позволяет выявлять слабоконтрастные области, и таким образом, увеличивает контраст. Данный метод широко применяется в тепловизорах, при регистрации изображений в ИК лучах. Так же метод применяется при обработке рентгенограмм космических снимков. В России с 1985 по 1991 г. выпускалась установка УАР-2 (Установка для Анализа Рентгенограмм-2). Рентгенограммы или негативы (позитивы) размещались на столе с нижней подсветкой, и с помощью видеокамеры изображения обрабатывались специальным блоком обработки и отображались на мониторе. В этом устройстве было реализовано цветовое кодирование.

3.4.3 Метод цифровой трансформации.

Брумберг Евгений Михайлович (ГОИ, Санкт Петербург). в 1939 г. предложил оригинальный метод цветовой трансформации, который позволяет преобразовать ультрафиолетовой изображение микроскопа в видимое изображение в условных цветах. Суть метода состоит в том, что с помощью специальных светофильтров фотографируется микропрепарат для трех

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

длин волн в ультрафиолетовой части спектра. Затем три полученных негатива проектируются на экран через три светофильтра - красный, зеленый и синий. На экране получается высококонтрастное изображение в псевдоцветах.

Глава 4. Спектральные методы контрастирования.

Спектральный метод: -микроскопы-спектрофотометры -УФ микроскопия -ИК микроскопия - Рамановская микроскопия -Обработка мультиспектральных данных

Спектральные методов находят все более широкое применение в микроскопии. Преимуществом спектральных методов является простота применения, оперативность, достоверность, воспроизводимость, информативность. Большим преимуществом является возможность получения новых результатов путем небольшого дооснащения существующих микроскопов. Особо информативными являются методы получения и анализа мультиспектральных изображений - изображений исследуемых объектов в различных спектральных диапазонах. Регистрируются двумерные изображения в различных спектральных диапазонах. Одним из примеров такого подхода являются спектрозональные методы, которые применяются в космических исследованиях. Снимки Земной поверхности из космоса выполняют в различных спектральных диапазонах, и на основе этого получают информацию о свойствах Земной поверхности. Эта же методика применима и в микроскопии.

Спектральные диапазоны.

Наиболее часто рассматриваются ультрафиолетовый, видимый и инфракрасный диапазоны. Условно используемый спектральный диапазон можно разделить на следующие области:

100-290 нм - (UV-C) УФ С - ультрафиолет короткие волны
290-320 нм - (UV-B) УФ В - ультрафиолет средние волны 320-400 нм - (UV-A) УФ А - ультрафиолет длинные волны 400-780 нм - видимый диапазон 780-1400 нм - (IR-A, Near-IR, NWIR) ближний инфракрасный (ИК) диапазон 1400-3000 нм - (IR-B, Mid-IR, SWIR) средний инфракрасный (ИК) диапазон 3000-10000 нм - (IR-C, Far-IR, MWIR) дальний инфракрасный (ИК) диапазон

С помощью цифровых камер на базе CCD матриц можно регистрировать изображения в видимом и ближнем ИК диапазоне (от 400 до 1000 нм). Существуют специализированные камеры, у которых повышена чувствительность в УФ или ИК области. Обычно регистрируется спектр поглощения излучения объектом. Рассмотрим различные методы регистрации спектральной информации.

Регистрация спектральной информации с помощью светофильтров.

a- Регистрируется двумерная информация в одном спектральном диапазоне. Например, на цифровую камеру или на источник света устанавливается узкополосный светофильтр. Применяется при регистрации изображений в УФ и ИК диапазоне.

b- Регистрируется двумерное изображение в трех спектральных диапазонах. Например, ввод изображений с помощью цветной цифровой камеры. Это стандартный способ регистрации изображений.

c- Регистрация двумерных изображений для различных длин волн цифровой камерой через набор светофильтров. Количество спектральных диапазонов определяется количеством светофильтров. Светофильтры устанавливаются перед цифровой камерой или после источника света. Иногда используются револьверные держатели светофильтров, которые позволяют быстро переключать светофильтры. Револьверные держатели обычно имеют 6 или 8 позиций для светофильтров. Револьверные держатели бывают моторизованные или с ручным переключением светофильтров.

Регистрация спектральной информации с помощью монохроматора.

Регистрация двумерное изображение для различных длин волн монохромной камерой. Для выбора спектрального диапазона применяется монохроматор. Возможен произвольный

65

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

выбор длины волны для регистрации. Имеется два различных варианта установки монохроматора:
-монохроматор устанавливается между объектом и источником освещения. Таким образом, объект освещается излучением определенной длины волны. Преимущество данного метода состоит в том, что можно регистрировать не только величину поглощения на данной длине волны, но и отклик объекта на возбуждение данной длиной волны. Например, видимую и ИК флуоресценцию.
-монохроматор устанавливается на телекамеру. Существуют специальные монохроматоры для этих целей. Таким образом, из прошедшего через объект излучения выделяется излучение определенной длины волны.

Выбор источников освещения.

1- При работе в видимом диапазоне длин волн применимы стандартные источники и цифровые камеры.

2- При работе в УФ области спетра в качестве источников излучения возможно использование мощных ртутных ламп. Однако для спектральных исследований более целесообразно использование ксеноновых источников света, так как они имеют непрерывные спектр излучения в УФ области (ртутные лампы имеют только несколько пиков, и не дадут достаточный поток, если требуемая длина волны не совпадает с пиком излучения ртутной лампы - 248 нм, 365 нм, 405 нм, 436 нм). Для регистрации УФ излучения необходимо использовать специализированные видеокамеры, с повышенной чувствительностью в УФ области.

3- При работе в ИК области спектра в качестве источника можно использовать мощные лампы накаливания. Температура нити накала лампы накаливания равна примерно 2700 (в кельвинах). Поэтому спектр излучения имеет максимум в инфракрасной области на длине волны 1 мкм = 1000 нм. Спектральная чувствительность обычных цифровых камер ото 400 нм до 1.1 нм. При этом необходимо иметь в виду, что на многих камерах устанавливают специальный ИК фильтр, который не пропускает излучение с длиной волны больше 700 нм. Такие камеры не подойдут для регистрации ИК излучения. Выпускаются специальные черно-белые видеокамеры повышенной чувствительности, у которых такой фильтр специально не устанавливают. Такие камеры подойдут для регистрации изображений в ближней ИК области. Простой тест на чувствительность цифровой камеры в ИК области состоит в следующем - фотографируется светодиод пульта дистанционного управления для телевизора во время нажатия кнопок. Обычно в пультах дистанционного управления используют ИК излучающие светодиоды с длиной волны 940 нм. Если на фотографии видно изображение светодиода - значит камера чувствительна к данной длине волны.

Ультрафиолетовые микроскопы и инфракрасные микроскопы — освещение и наблюдение изображения объекта с помощью электронно-оптических преобразователей (ЭОПов) вне видимого спектрального диапазона: до 400 нм и свыше 700 нм.

Ультрафиолетовая микроскопия.

В ультрафиолетовом микроскопе используют более короткие ультрафиолетовые лучи с длиной волны около 0,2 мкм. Разрешаемое расстояние здесь составляет приблизительно 0,1 мкм. Полученное в ультрафиолетовых лучах невидимое глазом изображение преобразуется в видимое с помощью регистрации на фотопластинке или путем применения специальных устройств (т.к. люминесцентный экран, или электронно-оптический преобразователь). Первый ультрафиолетовый микроскоп был создан Kohler в 1924 году на фирме Zeiss (Jena). Келлером и доктором фон-Рором были рассчитаны и созданы специальные объективы монохроматы скорректированные для УФ света на длину волны 275 мкм. В микроскопе

вместо стеклянной использовалась кварцевая оптика. Регистрация УФ изображения осуществлялось на специальную фотопластинку, чувствительную к УФ лучам. В качестве

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

источника света использовался поток искр между кадмиевыми электродами (Лейденская банка). Препараты приготовлялись на пластинке из горного хрусталя, отшлифованной перпендикулярно оси кристалла, толщиной 0,5 мм. Покровное стекло изготовлялось из аморфного кварца. Препараты исследовались в вазелиновом масле или глицерине.

Задача исследователей состояла в том, чтобы в два раза увеличить разрешающую способность микроскопа. При переходе от видимого диапазона (500 мкм) к УФ диапазону (275 мкм) разрешение микроскопа увеличивается в два раза.

В 1946 году советский физик Е. М. Брумберг разработал микроскоп, в котором используются невидимые ультрафиолетовые лучи. Перед обычным микроскопом, в котором используются лучи видимого света, микроскоп Брумберга имеет ряд преимуществ. Главным из них является возможность наблюдать исследуемый объект в более контрастном виде, чем это можно сделать с помощью обычного микроскопа. Это преимущество микроскопа Брумберга имеет важное значение, так как оно открывает пути к успешному исследованию объектов, отдельные части которых при наблюдении в обычный микроскоп мало отличаются друг от друга по цвету и не имеют резко выраженных границ.

Другое достоинство микроскопа Брумберга состоит в том, что с его помощью можно наблюдать детали предмета, которые имеют размеры примерно вдвое меньше размеров тех деталей, которые можно видеть в обычный микроскоп, работающий в лучах видимого света. Это достоинство микроскопа Брумберга связано с природой ультрафиолетового света, о чём более подробно мы расскажем в главе, посвящённой вопросу о пределах увеличения микроскопа.

Ультрафиолетовая микроскопия основана на способности некоторых веществ избирательно поглощать ультрафиолетовые лучи с определенной длиной волны. Это позволяет наглядно демонстрировать и изучать, в том числе количественно, распределение веществ в живых клетках или фиксированных препаратах. Так, например, белки и нуклеиновые кислоты одинаково прозрачны для видимого света; рассматривая неокрашенную клетку в видимом свете, нельзя определить, где расположен белок или нуклеиновая кислота. Но ультрафиолетовые лучи определенной длины нуклеиновая кислота поглощает значительно сильнее, чем белок. Поэтому в ультрафиолетовом микроскопе участок, содержащий нуклеиновую кислоту, выглядит значительно темнее. Так как ультрафиолетовые лучи непосредственно глазом не воспринимаются, приходится применять специальные преобразователи света. Ультрафиолетовая микроскопия технически значительно сложнее обычной световой, ее аппаратура дороже и методика тоньше. Несмотря на это, применение ее оправдано, так как научная значимость быстрого топографического описания химического состава живой клетки весьма велика.

Микроскоп-спектрофотометр.

Микроскоп спектрофотометр состоит из микроскопа, на оптической оси которого установлен спектрометр.

Рамановская микроскопия.

Рамановский микроскоп состоит из микроскопа, у которого на оптический оси установлем Рамановский спектрометр. Рамановский спектрометр позволяет регистрировать Рамановский спектр точки, расположенной на оптической оси микроскопа. Получение двумерной спектральной картинки осуществляется с помощью картирования - с помощью автоматического перемещения столика микроскопа осуществляется регистрация спектров точка за точкой. В результате сканирования в компьютере формируется Рамановское изображение некоторой области препарата.

Обработка мультиспектральных данных.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Для обработки мультиспектральных изображений необходимо специальное программное обеспечение, и, что еще более важно, необходимы специальные методы обработки мультиспектральных изображений. Ранее такие методы применялись при обработке мультиспектральных космических снимков. Промоделировать обработку мультиспектральных данных можно с помощью программы Photoshop. Каждое цветное изображение состоит из трех монохромных изображений (каналов) - красный, зеленый, синий. При обработке изображений операции применяются одновременно ко всем трем каналам. Но с помощью функции Изображение - Регулировка - Уровни можно корректировать каждый канал независимо. Отдельно каналы можно просмотреть с помощью функции Окно - Каналы. Можно каждый канал скопировать в отдельное изображение и обрабатывать независимо от других каналов.

Один из методов обработки состоит в вычисления разности между изображениями, полученными в различных спектральных диапазонах. В программе Photoshop получить разностное изображение между каналами можно с помощью функции Изображение - Вычисления.

Задача сегментации многозональных изображений.

Одной из важных задач обработки мультиспектральных данных является задача сегментации (выделения объекта). Для сегментации необходимо сформировать критерий близости для двух точек изображения. Если мера близости меньше некоторого порога, то данные точки изображения относятся к одному объекту. F(x,y,L) - это интенсивность элемента изображения, расположенного в строке X и столбце Y и зарегистрированного на длине волны L.

Рассмотрим некоторые алгоритмы сегментации:

1 -Близость по одному изображению: Mod(F(x,y,l0)-F(x0,y0,l0))<c
2 -Близость по спектральным изображениям: Summ(L)(F(x,y,L)-F(x0,y0,L))<c

3 -Пороговый по одному изображению: F(x,y,l0)>c
4 - Пороговый по одному изображению: (Max(L)F(x,y,l))>c
5 - Пороговый по одному изображению: (Min(L)F(x,y,l))>c
6 - Пороговый по одному изображению: (Summ(L)F(x,y,l))>c

7 - Пороговый по двум изображениям: Mod(F(x,y,l1)-F(x,y,l2))>c
8 - Пороговый по двум изображениям: (F(x,y,l1)+F(x,y,l2))>c
9 - Пороговый по двум изображениям: Max(F(x,y,l1),F(x,y,l2))>c
10- Пороговый по двум изображениям: Min(F(x,y,l1),F(x,y,l2))>c

11- Пороговый по трем изображениям: (F(x,y,l1)+F(x,y,l2)+F(x,y,l3))>c
12- Пороговый по трем изображениям: Max(F(x,y,l1),F(x,y,l2),F(x,y,l3))>c

13- Пороговый по четырем изображениям: (F(x,y,l1)+F(x,y,l2)+F(x,y,l3)+F(x,y,l4))>c
14- Пороговый по четырем изображениям: Max(F(x,y,l1),F(x,y,l2),F(x,y,l3),F(x,y,l4))>c

15- Пороговый по двум изображениям: ((F(x,y,l1)-F(x0,y0,l1))- (F(x,y,l2)-F(x0,y0,l2)))>c

Для выбора параметров L0, L1, L2, L3 - существуют специальные алгоритмы.

Выделение границы на многозональном изображении.

Можно привести несколько определений границы на многозональном изображении. В каждой точке компонентного изображения вычисляется перепад яркости - разность между

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

значениями яркости в соседних точках.

1- На основе всех компонент многозонального изображения строится яркостное изображение. В яркостном изображении яркость каждой точки равна сумме яркостей всех изображений. Если в некоторой точке перепад яркости больше порога - то это граничная точка.

2- Каждый компонент многозонального изображения анализируется отдельно. Точка считается граничной, если перепад яркость в этой точке больше порога. В результирующем изображении точка считается граничной, если она является граничной хотя бы для одной компоненты.

3- Каждый компонент многозонального изображения анализируется отдельно. Точка считается граничной, если перепад яркость в этой точке больше порога. В результирующем изображении точка считается граничной, если она является граничной во всех компонентах.

4- Каждому элементу на многозональном изображении соответствует некоторая точка в многомерном признаковом пространстве. Значение признака Ni равняется значению яркости на компоненте i многозонального изображения. В данном многомерном пространстве вводится некоторая метрика. Некоторая точка на многозональном изображении является граничной, если расстояние до соседней точки больше порога. Например, для каждой точки перепад яркости вычисляется как корень квадратный из суммы квадратов перепадов яркости отдельных компонент. Если в некоторой точке перепад яркости больше порога - то это граничная точка.

Распознавание объектов по спектральным данным.

На первом этапе формируются так называемые эталонные спектры для каждого класса объектов. Один из методов формирования эталонного спектра состоит в том, что вводится несколько десятков спектров объектов заданного класса, и полученные спектры усредняются. После того, как сформированы эталоны, можно решать задачу идентификации микрообъектов. Для этого вводится метрика в пространстве спектров. При предъявлении неизвестного объекта он относится к тому класса, расстояние до спектра которого минимально. Таким образом, имеется возможность осуществлять поиск аналогичных образцов по составленной заранее базе данных эталонных спектров. Существуют и другие способы интерпретации спектров:

1- Распознавание по одной длине волны. Пусть заранее известно, что некоторое вещество поглощает излучение на определенной длине волны. Необходимо определить, имеется ли в поле зрения это вещество. Для этого достаточно по спектру определить, имеется ли на этой длине волны пик поглощения.

2- Распознавание по двум длинам волн. Измеряется отношение величин поглощения в спектре для двух фиксированных значений длин волн. В зависимости от величины этого отношения принимается решение об отнесении исследуемого объекта к одному из классов. Этот метод применяется при экспертизе твердых жиров. Измеряется коэффициент отражения для следующих длин волн - 410нм и 510нм.

3- Распознавание по трем длинам волн. Из всего спектра выбираются и сравниваются коэффициенты поглощения только для трех длин волн. Для этого спектральные данные отображаются в двухмерном признаковом пространстве. Пространство признаков двухмерно, так как три значения нормируются так, чтобы в сумме давать единицу. Другой вариант состоит в анализе двух отношений: отношения первых двух величин к третьей. Этот метод аналогичен трехкомпонентному представлению цветового зрения. Однако в этом случае в качестве базовых используются не красный (700нм), зеленый (500нм) и синий (400нм) длины волн, а наиболее информативные для распознавания длины волн. Это псевдоцвет. Но полученные данные так же можно отображать в псевдоцветах на экране монитора. Данный метод применяется для экспертизы мясной продукции. В этом случае измеряется коэффициент поглощения на следующих длинах волн - 545нм, 582нм, 650нм.

4- Распознавание по четырем длинам волн. Если для идентификации объектов не хватает информации, получаемой по трем длинам волн, то производится более тонкий анализ на основе коэффициентов поглощения для четырех длин волн.

Наращивание мощность метода можно проводить и дальше, увеличивая количество анализируемых длин волн. Важная задача состоит в том, как выбрать наиболее информативные длины волн, по которым происходит распознавание. Для этого существует специальная методика.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Как правильно указывать увеличение для фотографии с микроскопа.

Для каждой фотографии необходимо указывать размер поля зрения по горизонтали. На основе этого размера можно пересчитать размеры любых структур на изображении. Указывать увеличение объектива, с помощью которого была получена фотография - не совсем корректно. Можно получить два одинаковых изображения (одно и то же поле зрения 0,3 мм), например, при использовании объектива 20х и адаптера цифровой камера 2х, или объектива 40х и адаптера цифровой камеры 1х. В современных микроскопах можно использовать различные адаптеры для цифровых камер. Так же существуют адаптеры с переменным увеличением, которые позволяют более информативно сформировать изображение в цифровой камере.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com