



КАК РАБОТАТЬ СО СВЕТОВЫМ МИКРОСКОПОМ

Ф. М. КЭРРИЛ, С. А. БАБУШКИН

КАК РАБОТАТЬ СО СВЕТОВЫМ МИКРОСКОПОМ

Ф. М. Кэррил, С. А. Бабушкин



Только для профессионалов

УДК 616-076:681.723

ББК 5с

К 98

Компания MeijiTechno и ВестМедика благодарит за помощь
в издании данной книги на русском языке:

И. Я. Барского, М. М. Аптинова, А. Ю. Маслова, А. Е. Бабушкина,

Б. Ф. Фалкова, А. С. Березовскую, Е. И. Немченко

Ф. М. Кэррил, С. А. Бабушкин

К 98 Как работать со световым микроскопом / Ф. М. Кэррил; (перевод с английского и
под редакцией И. Я. Барского, М. М. Аптинова), С. А. Бабушкин. - Москва.: Вест Медика, 2010.—
112 с.

ISBN 987-5-903864-32-4

УДК 616-076:681.723
ББК 5с

ISBN 987-5-903864-32-4

© Meiji Techno Co. LTD., Япония, 2010
© Вест Медика, 2010
© Вест Медика, художественное оформление, 2010
© И. Я. Барский, М. М. Аптинов,
перевод на русский язык и редакция, 2010

Предисловие

Все написанное в книге относится (если специально не оговаривается) к биологическим микроскопам — бинокулярным или тринокулярным — с механическими предметными столиками и со встроенными осветителями с регуляторами яркости. Микроскопы предназначены для работы с препаратами, помещенными на предметных стеклах и обычно покрытыми покровными стеклами.

Книга содержит минимум сведений по физике и оптике. Размерности величин указаны в метрических единицах.

Цель настоящего издания — познакомить читателя с элементами современного микроскопа и соответствующей техникой, с тем чтобы подготовить его к работе на микроскопе.

В книге описаны различные модели существующих микроскопов и их применение в практике, однако охватить все без исключения разновидности выпускаемых приборов невозможно. Например, издатель данной книги фирма MEIJI TECHNO Co. LTD производит широкий ассортимент микроскопов — от простых студенческих до исследовательских моделей, которые могут несколько отличаться от рассмотренных здесь.

Книга содержит полезные сведения о теоретических и практических принципах работы с микроскопом.

При этом для получения исчерпывающей информации мы рекомендуем познакомиться с описаниями приборов, предоставленными фирмами-изготовителями микроскопов.

Оглавление

1. Препарат на предметном стекле.....	9
2. Компоненты микроскопа.....	10
3. Ежедневная проверка работы микроскопа.....	13
4. Манипуляции с конденсором.....	14
5. Широкий взгляд на микроскопию.....	15
6. Окуляры.....	16
7. Микрообъективы (объективы).....	18
8. Бинокулярные насадки.....	23
9. Предметный столик микроскопа.....	25
10. Конденсор.....	27
11. Светофильтры.....	30
12. Лампы и осветители.....	31
13. Парфокальность.....	34
14. Центрировка.....	35
15. Настройка освещения по Кёлеру.....	36
16. Применение стандартного препарата.....	42
17. Метод тёмного поля.....	46
18. Метод фазового контраста.....	48
19. Поляризационная микроскопия.....	50
20. Флуоресцентная микроскопия.....	56
21. Интерференционная микроскопия.....	60
22. Металлографические микроскопы.....	62
23. Инвертированные биологические микроскопы.....	64
24. Микроскопы с двумя насадками или мультнаблюдение.....	66

25. Полевые микроскопы.....	67
26. Кристаллография.....	68
27. Предметные и покровные стекла.....	69
28. Измерение.....	71
29. Окулярные сетки и шкалы.....	72
30. Винтовой окулярный микрометр.....	79
31. Сдвиг изображения.....	82
32. ССТV — система замкнутого телевидения.....	83
33. Микрофотография.....	84
34. Стереоскопические микроскопы (стереомикроскопы).....	90
35. Обслуживание микроскопов.....	97
36. Автоматизация микроскопических исследований.....	101
37. Программное обеспечение для микроскопии.....	105
38. Программное обеспечение для документации.....	107
39. Универсальное программное обеспечение.....	108
40. Специальное программное обеспечение.....	110
41. Программное обеспечение для моторизованных микроскопов.....	112

Различные типы биологических микроскопов

Рис. 1а. Студенческий микроскоп



Рис. 1б. Студенческий микроскоп



Рис. 1в. Лабораторный микроскоп



Рис. 1г. Лабораторный микроскоп



Рис. 1д. Флуоресцентный микроскоп



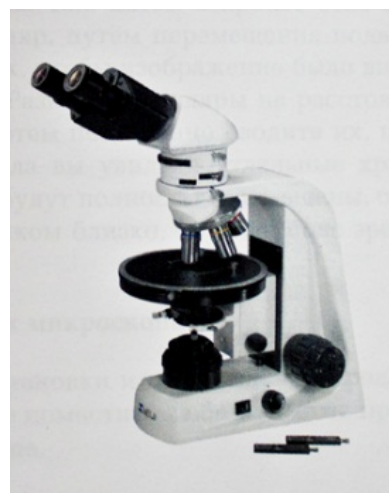
Рис. 1е. Инвертированный микроскоп



Рис. 1ж. Моторизованный микроскоп



Рис. 1з. Поляризационный микроскоп



Препарат на предметном стекле

Поместите предметное стекло с препаратом на предметный столик микроскопа покровным стеклом вверх, придерживая край покровного стекла большим пальцем. Рабочего расстояния объективов с увеличением 10х и ниже более чем достаточно для фокусировки на плоскость препарата даже через стекло толщиной 1 мм. Однако рабочее расстояние объективов 20х, 40х и т. д. до 100х составляет не более 0,5 мм, поэтому они позволяют смотреть только через покровное стекло меньшей толщины (обычно равной 0,17мм).

Покровные и предметные стекла подробнее описаны далее в соответствующем разделе.

Довольно неприятно поместить стекло на микроскоп и настроить фокусировку для объектива 10х, а потом установить объектив 40х и обнаружить, что препарат вообще не виден. Как правило, такое случается тогда, когда препарат помещён на столик предметным стеклом вверх и, соответственно, препаратом вниз.

Компоненты микроскопа

Рассмотрим основные компоненты микроскопа. На рис. 1 приведены различные типы биологических микроскопов, на рис. 2 — основные компоненты биологического микроскопа. Обсудим функции каждого из этих компонентов и их взаимосвязь.

Окуляры

Первая характеристика окуляров — увеличение, указанное сверху или сбоку окуляра: 10х, 15х и т. п. Вторая характеристика — вынос выходного зрачка, то есть расстояние от последней поверхности окуляра до плоскости изображения, которое появляется в микроскопе. Это расстояние обычно составляет величину от 15 до 24 мм. Последнее расстояние необходимо для исследователей, которые вследствие астигматизма постоянно носят очки. Для остальных наблюдателей это расстояние колеблется от 15 до 18 мм.

Биноккулярная насадка

Насадка позволяет настроить расстояние между её окулярами до величины межзрачкового расстояния наблюдателя. Биноккуляр обычно включает в себя один фиксированный и один подвижной (для настройки) тубусы. Некоторые фирмы выпускают биноккулярные насадки с двумя перемещаемыми тубусами.

Настройка расстояния между окулярами осуществляется следующим образом. Глядя в окуляр фиксированной окулярной трубки, при помощи винтов грубой и точной фокусировки сфокусируйтесь на объект при использовании объектива 10х. Затем закройте этот глаз и, глядя другим глазом во второй окуляр, путём перемещения подвижного тубуса настройте фокусировку так, чтобы изображение было видно столь же резко, как и первым глазом. Разведите окуляры на расстояние шире, чем между вашими глазами, а затем постепенно сводите их, пока не появится одно поле зрения. Сначала вы увидите отдельные круги, затем они начнут сливаться; когда они будут полностью совмещены, остановитесь. Если сдвинете окуляры слишком близко, то ваше поле зрения окажется ограниченным.

Предметный столик микроскопа

Представляет собой устройство для установки и перемещения предметного стекла с препаратом, позволяющее поместить любой участок препарата в плоскость поля зрения микроскопа.

Конденсор

Как показывает название этого компонента, он предназначен для сбора световых лучей от источника света и направления их на препарат. Конденсор всегда имеет ирисовую, регулируемую по размеру диафрагму, которая раскрывается в соответствии с численной апертурой объектива (подобно тому, как расширяется зрачок глаза при переходе человека от света к темноте). Кронштейн, в котором закрепляется конденсор, может перемещаться вверх или вниз, обеспечивая его фокусировку. Под конденсором обычно расположен держатель светофильтра.

Светофильтр

Светофильтры изготавливаются в основном из матового, нейтрального и различных цветных стёкол. Они вводятся в оптический ход лучей только в случае необходимости, так как при их введении уменьшается освещённость препарата.

Осветитель

Находится, как правило, в основании микроскопа и имеет коллекторную линзу, которая направляет свет на конденсор. Если в осветителе имеется ирисовая диафрагма, то она служит для настройки размера освещённого поля и называется полевой диафрагмой (см. далее описание освещения по Кёлеру). Лампа имеет низкое напряжение (менее 6 или 12 В, или напряжение в сети от настенной розетки), снабжена трансформатором с возможностью регулировки яркости; лампа 6 или 12 В имеет регулятор яркости или резистор для ограничения освещённости препарата. Распространённая ошибка в конструкции недорогих микроскопов — отсутствие регулятора яркости лампы 6 или 12 В и настройка интенсивности освещения при помощи ирисовой диафрагмы конденсора. Это неправильно! Ирисовая диафрагма регулирует лишь контраст изображения (существенное закрытие этой диафрагмы приводит, кроме того, к ухудшению разрешающей способности микроскопа). Таким образом, оптимальным вариантом изменения освещённости изображения является регулировка яркости источника света.

Механизмы фокусировки

На корпусе микроскопа находятся винты грубой и точной фокусировки. Они могут располагаться отдельно или соосно (коаксиально), при этом винт механизма грубой фокусировки больше по диаметру винта точной фокусировки и расположен ближе к штативу.

Микроскоп — прибор, с которым работают двумя руками: одной рукой настраивают винты фокусировки, второй — перемещают предметный столик с препаратом. Поэтому винты фокусировки расположены с двух сторон.

Рис. 2. Компоненты микроскопа



1. Окуляр
2. Диоптрийная подвижка
3. Револьвер
4. Микрообъективы
5. Предметный столик
6. Осветитель
7. Полевая диафрагма
8. Основание микроскопа
9. Бинокулярная насадка
10. Штатив микроскопа
11. Регулятор перемещения по высоте кронштейна конденсора
12. Механизм грубой фокусировки
13. Механизм точной фокусировки
14. Рукоятки перемещения предметного столика
15. Регулятор яркости
16. Конденсор
17. Винты конденсора
18. Рукоятка открытия апертурной диафрагмы
19. Держатель светофильтров



Ежедневная проверка работы микроскопа

Включите осветитель. Поместите предметное стекло с препаратом и покровным стеклом на предметный столик микроскопа. Для проверки микроскопа всегда используйте один и тот же препарат: вы хорошо запомните его особенности и любые несоответствия будут заметны сразу.

Установите в оптический путь объектив 10x и сфокусируйтесь на препарат; переместите конденсор вверх до упора и затем опустите примерно на 0,5 мм.

Установите приемлемый уровень яркости источника света.

Прикройте диафрагму конденсора так, чтобы видно было только изображение неярко освещённого препарата.

При фокусировке с использованием объектива 10x обычно сначала настраивают изображение винтом грубой фокусировки, а затем при помощи винта точной фокусировки добиваются полной резкости. Во время этой настройки препарат несколько раз оказывается в фокусе и вне фокуса. Если при этом не происходит горизонтального смещения препарата, значит, сбоя в работе микроскопа нет и он готов к использованию.

Предполагается, что препарат выглядит нормально. Правила работы со «стандартным» препаратом приведены ниже.

Горизонтальное смещение препарата при настройке обычно происходит по двум причинам. Первая — остатки иммерсионного масла или грязи на линзах объектива. Чтобы устранить эту проблему, очистите объектив. Другая причина — лампа не центрирована. Для проверки этого поместите матовый светофильтр или полупрозрачную бумажку под конденсор. Если смещение исчезнет, то причина именно в лампе. Для решения проблемы центрируйте лампу или введите в оптический ход освещения матовый светофильтр.

Манипуляции с конденсором

В этой главе продемонстрируем правильный и альтернативный (неправильный) методы использования ирисовой диафрагмы конденсора.

Поместите хорошо знакомый вам препарат на микроскоп и настройте фокусировку при использовании объектива 10х. Поднимите конденсор до упора и затем опустите его примерно на 0,5 мм.

Ирисовая диафрагма конденсора называется апертурной диафрагмой и предназначена, как отмечали ранее, для настройки контраста препарата. Заметим, что в осветителе находится полевая диафрагма.

Определите часть препарата, для детального исследования которой требуется более высокий контраст. Понаблюдайте за изменениями изображения препарата, открывая и закрывая апертурную диафрагму. При такой настройке существует предел, после которого препарат начнёт становиться темнее, но разрешающая способность изображения изменяться не будет. Если вытащить окуляр и посмотреть в тубус на положение диафрагмы, то она будет открыта примерно на 2/3. Тщательно проверьте фокусировку препарата с использованием объектива 10х.

Альтернативный способ изменения контраста изображения заключается в перемещении конденсора по высоте при полностью открытой апертурной диафрагме. Настройте положение диафрагмы и яркость освещения. Какой метод больше подходит для получения хорошего контраста?

Во втором случае контраст усилится, но разрешение снизится, детали будут размытыми, а края смазанными и нечёткими. При опускании конденсора плоскость, на которую фокусируется свет, окажется ниже, свет будет рассеиваться сильнее, проходя через детали препарата под разными углами, что приведёт к затемнению краёв. Таким образом, следует подчеркнуть, что при опускании конденсора теряется разрешение, чего не происходит при закрытии ирисовой диафрагмы до определённого размера (до 2/3), когда конденсор находится в правильном положении.

Более подробно настройка положения конденсора описана в разделе, посвящённом освещению по Кёлеру.

Широкий взгляд на микроскопию

Существуют два основных типа микроскопов — световые и электронные.

Каждый микроскоп, в свою очередь, разделяется на два класса: световые — на сложные и стереомикроскопы; электронные — проходящего и отражённого света (сканирующие).

Сложные микроскопы обычно работают в проходящем свете, но могут работать и в отражённом (см. флуоресцентный микроскоп). Стереомикроскопы чаще всего работают в отражённом свете, и лишь некоторые из них — в проходящем свете.

Диапазоны увеличения всех видов микроскопов отлично дополняют друг друга:

- световой сложный микроскоп — от 25х или 40х до 3000х;
- стереомикроскоп — от 1х или 2х до 100х (рутинный); и до 250х (исследовательский);
- электронный микроскоп проходящего света — от 3000х до 660000х;
- электронный сканирующий микроскоп — от 50х до 200000х.

Теперь, когда стало понятно, что такое микроскоп, более подробно рассмотрим его компоненты.

Окуляры

Как говорилось ранее, окуляры обладают увеличением, которое составляет часть общего увеличения микроскопа. Последнее же равно произведению увеличений окуляра и объектива. Таким образом, общее увеличение микроскопа при использовании 10-кратного объектива и 10-кратного окуляра равно $10 \times 10 = 100x$.

Биокулярная насадка или другое оптическое устройство, введённое в оптический ход микроскопа, могут вносить дополнительное увеличение. Так, при использовании биокулярной насадки с собственным увеличением 1,5x общее увеличение микроскопа в указанном выше примере будет равно $10 \times 10 \times 1,5 = 150x$.

Обычно в окулярах имеется посадочное место для установки в них сеток для измерений или других целей. Это приводит к уменьшению внутреннего диаметра окуляра и к соответствующему уменьшению поля зрения. Заметим, что именно окуляр (а не объектив) определяет размер поля зрения микроскопа. Более подробно это будет рассмотрено при описании объективов. Есть много разных окуляров, предназначенных для различных целей.

Окуляры Гюйгенса

В настоящее время используются редко, в основном на недорогих микроскопах с дешёвыми объективами. Окуляр состоит из двух одиночных линз; вторая по ходу лучей — глазная линза — имеет небольшой диаметр и маленькую заднюю апертуру для ограничения поля зрения. Эти окуляры не обеспечивают цветокоррекцию, то есть компенсацию хроматических аберраций (см. раздел, посвящённый поляризационным микроскопам).

Широкопольные окуляры

Получили сегодня широкое распространение. Окуляры отличаются большим диаметром первой линзы, удобны в работе; выпускаются с различными расстояниями от оправы окуляра до плоскости, в которой образуется изображение. Наружный диаметр тубуса, куда вставляется такой окуляр, составляет 25 мм (около 1 дюйма). Внутренний диаметр тубуса равен обычно 23,5 мм; наружный диаметр окуляра — 23 мм; внутренний диаметр окуляра — 21,5 мм. В окуляр на специальный круглый выступ с внутренним диаметром 18 мм часто помещается сетка диаметром 20 мм. Таким образом, рабочая модель биологического микроскопа с 10x

широкопольным окуляром обеспечивает поле зрения 18 мм, более совершенный микроскоп — 20 мм. Исследовательские микроскопы могут иметь поле зрения 20 или 25 мм, очень немногие микроскопы — 30 мм. Вероятно есть очень веские причины для использования такого широкого поля зрения, но автор не знает ни одной. Обычно интересующие исследователя структуры препарата перемещают в центр поля зрения при помощи предметного столика. Разумеется, бывают иные ситуации. Например, невропатолог предпочтёт целиком рассматривать всю структуру нервной клетки Пуркинье и её ветвей или любую другую клетку. Но для этого он воспользуется объективом с низким увеличением, чтобы увеличить площадь препарата, находящуюся в поле зрения.

Компенсационные окуляры

Востребованы не так часто. Раньше сложные объективы с высокими значениями числовой апертуры (см. дальше) давали различное увеличение для разных цветов — большее для фиолетового и синего и меньшее для красного. Из-за этого ближний конец поля изнутри светился синим, а дальний — красным. Для устранения такого эффекта устанавливали компенсационные окуляры, обеспечивающие противоположный эффект. Чтобы не возникало проблемы при работе с объективами низкого увеличения, их собирали сразу со встроенной ошибкой, поэтому при использовании компенсационных окуляров цвета соответствовали действительности. Сложно, не так ли?

Окуляры Кельнера

Окуляры с фокусированной верхней линзой. Предназначены для измерений при большом увеличении, позволяют настроить резкое изображение шкалы или сетки для всех пользователей. Однако для этого прекрасно подходят и обычные окуляры.

Рис. 2. Компоненты микроскопа



Микрообъективы (объективы)

Микрообъективы рассматриваются исходя из их характеристик.

Поясним термин «кривизна изображения». Представьте себе шар диаметром несколько миль. Посмотрите на него с точки зрения настройки окуляров/объективов. Если после того, как верх шара вошёл в фокус, мы продолжаем приближаться к его поверхности, то всё большая и большая его часть оказывается в фокусе. Этого выглядит так, будто поле зрения расширяется из центра. Когда примерно $2/3$ поля зрения оказывается в фокусе, центр начинает размываться, поскольку фокус переходит к периферии. Вот этот эффект и называется кривизной изображения.

Теперь рассмотрим наиболее важные характеристики микрообъектива, которые определяют: 1) кривизну, или плоскостность поля зрения (часть поля зрения, находящуюся в фокусе); 2) увеличение и разрешающую способность; и 3) цветокоррекцию.

Основные параметры микрообъективов устанавливаются общепризнанным стандартом DIN (Deutsche Industrial Normen). Этот стандарт определяет длину тубуса, равную 160 мм, высоту объектива 45 мм (расстояние от плоскости предмета до опорного торца объектива), стандартные диаметры окуляров, резьбу объективов, кодировку объективов в виде цветной полоски вокруг объектива (красной для увеличения 4х, жёлтой — 10х, белой — 100х и т. д.).

Тубус — это расстояние от верхней линзы окуляра до плоскости зрачка микрообъектива (примерно совпадающей с последней линзой объектива). Некоторые фирмы выпускают микрообъективы на тубус «бесконечность», что означает, что изображение, даваемое объективом, возникает в бесконечности, а окуляр приводит это изображение в определённую плоскость. Объективы на тубус 160 мм (или 170 мм) включают в себя стандартные ахроматические объективы, при использовании которых в фокусе оказывается около $2/3$ поля зрения; полупланобъективы — 80 % поля зрения в фокусе, а так же планобъективы — 100 % поля зрения в фокусе.

Следует внимательно изучать документацию производителя. Некоторые используют термин „flat field" для обозначения полуплоского, а „plan" — полностью плоского поля. Другие используют для этого же соответственно термины

„achromatic" и „plan". У одних производителей „microplan" обозначает полуплоское поле, у других — совершенно плоское. Поэтому внимательно читайте литературу!

Объектив одного стандартного DIN микроскопа можно установить на другой DIN микроскоп, при этом сохраняется парфокальность и центрировка (объяснение этих терминов приведено далее). Справедливо то, что объективы, рассчитанные на определённую длину тубуса, можно устанавливать на разные микроскопы «старого образца», правда при этом, как минимум, теряется парфокальность.

Цветокоррекция

По цветокоррекции (исправлению хроматической аберрации положения) объективы разделяются на ахроматические, полуахроматические (флюоритовые) и апохроматические.

У ахроматических объективов исправлен хроматизм положения для двух длин волн—красных и синих лучей, то есть фокус для этих лучей сводится в одну точку. Зелёные лучи имеют более короткий фокус. По этой причине контуры в изображении объекта имеют цветную кайму.

Самые используемые красители — гематоксилин и эозин (Н&Е), которые имеют соответственно красный и синий цвет. Не правда ли замечательно, что для окрашивания большинства ваших препаратов применяется Н&Е, а большинство ваших объективов — ахроматы?

Флюоритовые объективы используют флюоритовое стекло, которое сводит все области спектра ближе к одному фокусу. По исправлению хроматической аберрации положения эти объективы занимают промежуточную позицию между ахроматами и апохроматами.

Апохроматические объективы полностью выравнивают фокус трех основных цветов и сводят все остальные области спектра практически к одинаковому фокусу.

Чем выше качество объектива, тем выше его цена, достигаемое увеличение и необходимость критической фокусировки из-за снижения глубины резкости.

Рис. 4. Объективы



Увеличение и разрешающая способность

С ахроматическими объективами можно работать с увеличением микро-скопа до $1000\times$ N.A. (N.A. или A — числовая апертура объектива). Дальнейшее повышение увеличения не выявляет новые подробности в объекте и может привести только к ухудшению качества изображения. С флюоритовыми объективами можно работать без существенного ухудшения качества изображения до увеличения $1500A$; с апохроматами — до $2000A$.

Таким образом, при работе с апохроматом $100\times$ можно добиться увеличения $2000\times$, получив ту же разрешающую способность, что и при работе с ахроматом $100\times$ при увеличении $1000\times$. Вопрос к исследователю: стоит ли игра свеч?

Пример.

Ахроматический иммерсионный объектив $100\times$ с $A = 1,25$ можно использовать для получения увеличения до $1250\times$, флюоритовый объектив — до $1875\times$ и апохроматический — до $2500\times$.

Стоимость первого объектива составляет от 200 до 600 \$, второго — 1200- 1500 \$ и третьего — 2000-4000 \$.

Чем лучше микроскоп, тем сложнее работать с ним. Для этого необходима более высокая квалификация пользователя.

Снижение глубины резкости означает, что неопытный пользователь может пройти фокальную плоскость препарата, не заметив её. Поверьте, апохроматические объективы настолько же сложны в применении, насколько высока их стоимость.

Выше мы упомянули новый термин — числовая апертура (N.A.) микро-объектива (чаще в литературе числовая апертура называется просто апертурой и обозначается буквой A. — Прим. ред.). Числовая апертура микрообъектива определяет разрешающую способность микроскопа, то есть способность давать раздельное изображение двух соседних элементов препарата.

Для каждого препарата существует увеличение, при котором его видно лучше всего, и это, как правило, не самое высокое увеличение микроскопа. Однако при максимальном увеличении все три класса упомянутых выше объективов должны давать одинаковое разрешение. Чем меньше детали, которые вам нужно исследовать, тем лучше должен быть объектив, то есть тем выше должна быть его разрешающая способность.

Давайте представим себе самый мелкий объект, который можно исследовать (то есть увидеть его полностью и с хорошим разрешением). Сделаем не совсем верное, но полезное предположение, что длина волны света — 0,2 микрона. Один дюйм равен 25,4 мм, в каждом миллиметре 1000 микронов, так что мы говорим о 0,2-тысячной доле миллиметра; или об V_s от 25 400-й доли дюйма. Поскольку длина волны света должна быть меньше, чем рассматриваемый объект (свет должен проходить от центра через все края), то мы вправе считать, что самая мелкая деталь, которую можно исследовать под оптическим микроскопом, имеет размер 0,25 микрона. При этом микроскоп должен быть чистым, правильно настроенным и находиться в отличном рабочем состоянии.

Существует устройство, которое используется для измерения при помощи микроскопа и точность которого, как утверждается, равна $1/8$ (0,125) микрона. Мы обсудим его в разделе, посвящённом измерению.

Защита фронтальной линзы объектива

Обычно объективы (чаще всего 100x, реже 40x и 20x) выполняются в пружинящей оправе, предохраняющей повреждение фронтальной линзы объектива при давлении на предметное стекло. При неисправности этой оправы объектив может оказаться ниже своей оптимальной высоты и не достичь положения фокусировки. Точно так же иммерсионное масло типа Б может препятствовать установке объектива на достаточно близкое расстояние от препарата до момента срабатывания пружинящей оправы.

Блокировка фокусировки

Чтобы предотвратить повреждение микрообъектива, в некоторых микроскопах предусмотрено устройство блокировки, ограничивающее движение предметного столика вверх. Проблема, однако, в том, что если при настройке использовалось толстое предметное стекло, то может оказаться, что потом настроить фокусировку при работе с тонким стеклом невозможно.

Одна из фирм изготавливает микроскопы, которые обеспечивают фокусировку препарата перемещением по вертикали микрообъективов вместо предметного столика; в этом случае микрообъектив имеет ограничитель перемещения.

Длина тубуса

Большинство производителей изготавливают все объективы с расчетом на одну длину тубуса и для биологических микроскопов проходящего света, и для

металлографических микроскопов падающего света. Однако некоторые фирмы выпускают объективы для тубусов длиной 160 мм, другие — объективы «на бесконечность» для специальных моделей. На одном и том же микроскопе их использовать невозможно. Есть также фирма, изготавливающая микрообъективы на тубус 160 мм для микроскопов проходящего света и на тубус 215 мм для микроскопов отражённого света.

Биноккулярные насадки

Тринокулярные насадки могут отличаться лишь способом направления света в биноккуляр и вертикальный тубус для микрофотографирования или проекции, а также вариантом направления света в различные каналы (полное или частичное).

Возможные комбинации: 100 % света для просмотра препарата; 20 % света для просмотра препарата и 80 % для микрофотографии; 100 % света для микрофотографии и другие.

Существует большое количество различных биноккулярных насадок. В них должна быть предусмотрена возможность регулировки межзрачкового расстояния (расстояния между окулярами насадки, МР), так как разные наблюдатели имеют различную глазную базу (расстояние между зрачками глаз). Возникает вопрос: приводит ли регулировка МР к изменению длины тубуса микроскопа и, соответственно, к изменению увеличения?

Если окулярные тубусы расходятся из общего центра, то это биноккуляр типа Seidentopf, у которого длина тубуса и увеличение не меняются при настройке МР. Если окуляры раздвигаются и при этом длина тубуса автоматически уменьшается или увеличивается, то это также насадка с постоянным увеличением.

Если окулярные тубусы раздвигаются без изменения длины, но на них имеется шкала, которая ставится в соответствии с МР, то перед нами вновь насадка с постоянным увеличением. Тогда при уменьшении МР длину тубуса необходимо увеличить и наоборот. Такие насадки выпускает фирма С. Zeiss.

Если окуляры раздвигаются, но нет подстройки длины тубусов, то увеличение меняется при каждой настройке МР. Это не позволяет разным людям проводить измерения с помощью одного микроскопа. Однако калибровка становится проще — можно увеличить или уменьшить расстояние между окулярными трубками в соответствии с делениями объект микрометра.

Главное, вы должны знать, что есть разные бинокюляры, уметь различать их и использовать правильно (см. раздел «Измерение»).

Если на насадке нет маркировки, то по умолчанию принято, что ее увеличение равно 1,0х. Если насадка влияет на увеличение, то сбоку должна находиться маркировка. Так, на одной из известных автору тринокулярных насадок указано:

Photo 1,0x, Viewing 1,6x, то есть для фотографии увеличение насадки равно 1,0, для визуального наблюдения — 1,6.

Только один производитель выпускает микроскопы со сходящимися окулярными тубусами на бинокуляре. У всех остальных тубусы параллельны. При использовании параллельных тубусов вы как бы смотрите в бесконечность на горизонт, поэтому глаза напрягаются меньше. При работе со сходящимися тубусами вы смотрите на точку на расстоянии 15 дюймов, и хотя большинство людей способны работать с любым видом бинокля, значительное количество пользователей (20 %) после работы со сходящимися тубусами не могут приспособиться к параллельным тубусам.

Рис. 5. Насадки



а - бинокулярная насадка



б - триокулярная насадка

Предметный столик микроскопа

Предметный столик микроскопа представляет собой механическое устройство для закрепления на нем предметных стёкол размером 1" x 3" или 2" x 3", снабжённое рукоятками (с накаткой) для перемещения их вперед - назад (север - юг) и справа - налево (восток - запад). Эти рукоятки могут располагаться на одной оси (коаксиально) или раздельно; они могут находиться справа или слева — здесь нет единого стандарта для всех производителей. Поэтому для выбора подходящего столика нужно обратиться к поставщику.

Однако поскольку микроскоп — прибор, предназначенный для работы двумя руками, и бинокляр, как правило, поворачивается на 360°, то можно повернуть биноклярную насадку, чтобы перемещать столик другой рукой.

Очевидно, что при выборе участка препарата предметный столик должен перемещаться строго под углом 90° к оптической оси микроскопа. Тогда при перемещении препарата последний будет оставаться в фокусе.

Только один производитель выпускает микроскопы с фокусировкой с помощью объективов (которая ещё встречается у недорогих учебных микроскопов), у всех остальных микроскопов фокусировка осуществляется при перемещении столика вверх или вниз. Сторонники фокусировки с помощью столика утверждают, что перемещение столика более стабильно. Та компания, которая для фокусировки использует объективы (исходящиеся окулярные трубки), напротив, считает именно этот способ более лёгким и более точным; кроме того, фиксированный столик позволяет использовать микроманипуляторы и другие устройства, работающие только с неподвижным столиком.

У всех инвертированных микроскопов столики фиксированы, а фокусировка проводится с помощью объективов.

Разнообразие предметных столиков трудно представить:

1) для инвертированных микроскопов для изучения тканевых культур при установке чашек Петри и флаконов;

2) для микроскопов отражённого света при исследовании чипов интегральных схем размером до 4" x 4" или 6" x 6";

3) для микроскопов отражённого света, у которых верхняя поверхность столика перемещается во всех направлениях;

4) столики с увеличенными размерами рукояток перемещения и с головками микрометра для измерений и т. д.

Выше мы упомянули поперечное (север - юг) и продольное (восток - запад) направления перемещения предметного столика с препаратом. Север и юг всегда расположены одинаково: север — когда вы сидите спереди микроскопа, юг — когда вы сидите сзади. Эти термины из прошлого микроскопии, когда в микроскопах использовались зеркала и не было встроенных осветителей и даже настольных ламп. Зеркало направляли на северное окно, где освещение оставалось более или менее постоянным в течение дня.

При наличии встроенного осветителя нет разницы, с какой стороны сидеть. Пользователи руководствуются индивидуальными предпочтениями или тем, какая рука у них ведущая. Автор обычно сидит за микроскопом с южной стороны при работе с нормальным бинокулярным микроскопом и с северной — при работе с исследовательским микроскопом.

Рис. 6. Предметный столик



Конденсор

Это единственный компонент микроскопа, кроме объектива, имеющий числовую апертуру. Её мы рассмотрим позже. В книге вы встречали фразу: «Поднимите конденсор до верхней точки и затем опустите примерно на 0,5 мм». Это означает, что большинство конденсоров перемещаются при помощи реечного механизма фокусировки. (Более подробно мы рассмотрим этот пункт в разделе, посвящённом освещению по Кёлеру.)

Изначально препарат определяет точное положение конденсора; для большинства препаратов подходит положение конденсора, при котором тот находится на 0,5 мм ниже предметного стекла. Поэкспериментируйте с положением конденсора (при этом препарат должен быть в фокусе объектива 10x), чтобы увидеть, как меняется интенсивность освещения при минимальном перемещении конденсора по высоте.

Ранее утверждалось, что конденсор предназначен для фокусировки света в точку или небольшой круг на препарате. Здесь мы сталкиваемся с проблемой, если круг будет достаточно широким для того, чтобы осветить поле зрения объектива 2,5x, то это не позволит нормально работать с объективом 100x (освещённость изображения будет мала).

Большинство недорогих конденсоров представляют собой компромиссный вариант, поскольку не совсем безупречно подходят для работы как при высоком, так и при самом низком увеличении. Но они удовлетворяют основным требованиям.

Для решения этой проблемы в оптический ход лучей вводится линза, либо над конденсором, либо под ним. Если вспомогательная линза находится сверху, то она предназначена для работы с объективами высокого увеличения, 100x. Если линза размещена под конденсором, то её используют при работе с объективами низкого увеличения — 10x и ниже. Обычно при использовании объектива 10x не видно разницы при установленной вспомогательной линзе или без нее.

Ирисовая диафрагма под конденсором обеспечивает контраст и называется апертурной диафрагмой. Подробнее о ней будет рассказано в разделе «Настройка».

К конденсору прикреплен держатель светофильтра, который вводится в оптический ход лучей. В держатель можно установить цветной или белый,

прозрачный или матовый светофильтр. Матовые светофильтры можно использовать вместо вспомогательной линзы под конденсором, чтобы осветить всё поле зрения объектива с низким увеличением.

При использовании объективов 2,5x или 4x с не полностью освещенным полем зрения будет ярко виден участок препарата и тёмная или слабо освещенная область вокруг с едва заметными деталями.

Простой конденсор часто называют конденсором Аббе. К другим видам конденсоров относятся ахроматический и апланатический конденсоры; все они могут быть использованы со вспомогательными линзами; у всех есть апертурные диафрагмы и, как правило, держатели светофильтров.

Чем сложнее конденсор, тем выше его цена, тем он полезнее и тем труднее с ним работать. Конденсор Аббе с двумя линзами гораздо проще в применении, чем ахроматический конденсор с тремя линзами (с превосходной коррекцией цвета) или апланатический с четырьмя.

Вернёмся теперь к численной апертуре, закону Аббе и правилу полезного увеличения.

Закон Аббе утверждает, что численная апертура конденсора должна быть не менее числовой апертуры объектива с самым высоким увеличением. Если объектив 40 x 0,65 имеет самое высокое увеличение из используемых объективов, то апертура конденсора должна равняться 0,65. Однако если в микроскоп установлен иммерсионный объектив 100x с $A = 1,25$, то апертура конденсора должна равняться также 1,25.

Теперь рассмотрим правило ахроматов, или правило полезного увеличения. Ранее утверждалось, что для достижения верхней границы полезного увеличения микроскопа увеличение ахроматического объектива может превышать его апертуру в тысячу раз.

Рис. 7. Конденсор



Итак, возьмём микроскоп с конденсором с $A = 0,65$ и сухим объективом $40 \times 0,65$. Верхний предел полезного увеличения будет равен $650\times$. При использовании окуляра $10\times$ получим общее увеличение микроскопа $400\times$, при использовании окуляра $15\times$ — $600\times$, все ещё в пределах полезного увеличения. Предположим, мы установим окуляры $20\times$ и получим увеличение $800\times$. Что произойдёт? Увидим ли мы изображение с хорошим разрешением? Ответ: да! Теперь усложним эксперимент. Установим объектив $100\times$ с $A = 1,25$ на микроскоп с конденсором с $A=0,65$. Объектив необходимо использовать с иммерсионным маслом. Увидим ли мы изображение? Ответ: да!

Причина такого эффекта требует сложных объяснений, но для его получения необходимы абсолютно чистые конденсор и объектив, правильная центровка конденсора и оптимальное освещение.

Замечание: большинство недорогих микроскопов не обеспечивают достаточно света и только немногие имеют возможность центровки конденсора. Хотя вы и можете обойти закон Аббе и правило увеличений, однако делать это следует только в ситуации крайней необходимости. Отступать от обычных правил работы нужно как можно реже, при этом вы должны ясно и до конца понимать, что вы делаете и почему.

Светофильтры

Как уже говорилось ранее, светофильтр обычно устанавливается в выдвижной держатель под конденсором или иногда после коллекторной линзы осветителя.

В микроскопии применяются стеклянные цветные, нейтральные и матовые светофильтры (диффузоры). Синие светофильтры используются с вольфрамовыми лампами для получения эффекта дневного света, который приятнее для глаз, чем нескорректированный жёлтый свет. Галогеновые лампы дают свет ближе к белому, поэтому с ними можно использовать более тонкие синие светофильтры. Для фазового контраста предназначен зелёный светофильтр, однако, согласно недавним исследованиям, могут быть полезны и светофильтры других цветов. О применении цветных светофильтров в микрофотографии будет рассказано позднее.

Помните от светофильтров должна быть реальная польза. Если же ее нет — устанавливать их не нужно. Любой дополнительный элемент в оптическом ходе лучей поглощает свет, а недостаток освещения всегда создаёт проблемы при работе с микроскопом.

Лампы и осветители

Сейчас сложно найти микроскоп без встроенного осветителя. Поэтому мы даже не будем обсуждать, как выровнять зеркало по отношению к настольной лампе (см. примечания о стереомикроскопах).

В лампах 6 и 12 В обычно есть нить накала, которая проходит через всю лампу. Иногда нить имеет форму «V», что более эффективно для работы с микроскопом. Но при использовании любой из нитей необходим матовый светофильтр, чтобы свет, проходящий через конденсор, ровно освещал все поле зрения.

Для лампы низкого напряжения, 6 и 12 В, требуется трансформатор для снижения напряжения в сети и регулировки напряжения с целью изменения интенсивности освещения.

Светящееся тело лампы накаливания представляет собой тонкую ленту или плотно навитую спираль из тонкой проволоки. В большинстве случаев эти лампы дают неравномерное освещение и часто требуют применения матового стекла. Это стекло может быть выведено из хода лучей при использовании 40-кратных объективов и выше, что позволяет посылать в конденсор больше света. Иногда при использовании 40-кратного объектива в поле зрения микроскопа наряду с изображением препарата видны нити накала лампы. В этом случае также целесообразно применять матовое стекло.

В лампах накаливания светящимся телом обычно является вольфрамовая нить, находящаяся в вакуумной стеклянной колбе. При работе в результате нагревания нить выделяет пары металла — вольфрама, которые осаждаются на внутренних стенках колбы, приводя к уменьшению светового потока.

Большинство ламп низкого напряжения — галогеновые лампы. Они имеют такую же вольфрамовую нить, выделяющую пары металла, которые взаимодействуют с парами йода и оседают на нити. Благодаря этому внутренняя поверхность лампы остаётся чистой, а яркость — постоянной на всем протяжении срока эксплуатации лампы. Однако взаимодействие паров увеличивает давление внутри лампы, поэтому лампа изготовлена из кварцевого стекла.

При замене лампы её необходимо очистить перед включением и нагревом. Связано с тем, что пальцы оставляют следы на кварцевом стекле, тем самым снижая количество света, который проходит через конденсор.

Как узнать, достаточно ли освещения для работы с микроскопом? Включите весь свет. Если после этого вам придётся уменьшить яркость, то его достаточно!

Всем лампам низкого напряжения необходим нагрев в течение двух-трех минут. Обычно, если вы включаете осветитель при самом низком напряжении, свет виден. Затем выберите или подготовьте препарат, поместите его на столик и настройте фокусировку для объектива 10x — за это время лампа достаточно нагреется, чтобы можно было повысить напряжение до необходимого значения.

Не поднимайте напряжение выше необходимого. Это продлит срок службы лампы, что верно и для галогеновых ламп 6 В, 12 Вт стоимостью 10 или 12 \$, и для ламп 12 В.

Хорошее правило для продления срока эксплуатации осветителя микроскопа: если вы отходите от микроскопа на достаточное время, чтобы лампа могла остыть, выключите осветитель. Если времени для полного охлаждения лампы не хватит, снизьте напряжение до минимального, но не выключайте её.

Во время включения лампы, в первый момент, ток может в три раза превысить рабочий ток, то есть лампа 20 Вт может получить нагрузку 60 Вт, которая затем снизится до 20 Вт. Вы не можете отказаться от осветителя, однако избегайте включения и выключения его без необходимости.

Рассказывая об освещении, нельзя не упомянуть об освещении в отражённом или падающем свете. Такое освещение осуществляется от блока, помещённого между штативом микроскопа и бинокулярной насадкой и имеющего свой осветитель с низковольтной лампой и трансформатором, две ирисовые диафрагмы — полевую и апертурную, держатели светофильтров, дихроичное (светоделительное) зеркало. Свет горизонтально падает на дихроичное (обычно полупрозрачное) зеркало, которое отражает его вниз через объектив (служащий одновременно и конденсором) на препарат, отражается от него и идет обратно вверх через объектив и зеркало на призмы, направляющие свет в бинокулярную насадку и окуляры.

С учётом характеристик микроскопа, описанных в предисловии, освещение необходимо в современном флуоресцентном микроскопе, о котором еще предстоит рассказать.

Конечно, падающий свет используется также в металлографических и промышленных микроскопах для исследования чипов интегральных схем, в минералогических поляризационных микроскопах и др. все они будут кратко описаны далее.

Осталось обсудить два понятия перед тем, как мы перейдём к освещению по Кёлеру.

Парфокальность

Этот термин означает сохранение препарата резким при переходе от одного объектива к другому.

Истинная парфокальность определяется как необходимость поворота винта точной фокусировки не более чем на $1/4$ полного оборота при постепенном снижении увеличения — от сухого объектива 100x (очень осторожно сфокусированного без применения иммерсионного масла) к 40x, затем к 10x и 4x.

Причина перехода от объективов с высоким увеличением к объективам с низким часто заключается в различии глубины резкости. Объектив 100x дает очень маленькую глубину резкости и фокусируется на самой поверхности препарата. Глубина резкости объектива 40x превышает её более чем в два раза. Глубина резкости объектива 10x — более чем в 4 раза выше и т. д.

Если для фокусировки при переходе от одного объектива к другому необходимо более $1/4$ поворота винта точной фокусировки, то или вы используете обычный недорогой микроскоп, или он неправильно настроен.

Для настройки парфокальности можно использовать вкладыши для удлинения объективов. Однако правильнее это делается путём подрезки объективов (плоскости посадки) так, чтобы после этой процедуры получилась оптимальная парфокальность. Для этой и других целей у хорошего поставщика микроскопов должен быть токарный станок (например, для изготовления детали, которая больше не предоставляется производителем).

Центрировка

Термин означает сохранение клетки или другой детали препарата в центре поля зрения микроскопа при повышении увеличения после центрирования при низком увеличении.

Мы ранее утверждали, что можно установить объектив, изготовленный по стандарту DIN, от одного микроскопа на другой DIN микроскоп, при этом они будут парфокальны и центрированы.

Разумеется, надо учитывать и цену. При установке объектива с микроскопа Nikon на Olympus или наоборот парфокальность и центрировка будут превосходными, при установке на Zeiss или Leitz — очень хорошими.

Автор все ещё помнит объективы без пружинящих оправ, наборы объективов с разницей фокальной длины в 5-6 мм и очень плохой центрировкой. Современный микроскоп со всеми своими недостатками и несоответствиями, значительно проще в применении, чем микроскопы, которые были 25 лет назад, и часто значительно лучше.

До сих пор мы рассматривали только светлопольную микроскопию. Перед тем как перейти к обсуждению различных методов и специализированных микроскопов, нужно подробно изучить освещение по Кёлеру.

Настройка освещения по Кёлеру

Настройка освещения по Кёлеру — простая процедура настройки микроскопа и его компонентов для получения наилучшего возможного сочетания контраста и разрешения. У человека, знакомого с этой процедурой, длительность настройки составляет не более двух-трех минут. Её следует проводить каждый день.

Предположим, что осветитель включён, прогрет и бинокулярная насадка настроена, то есть расстояние между окулярами выставлено.

Поместите знакомый препарат на предметный столик и настройте фокусировку при использовании объектива 10x. Апертурная и полевая диафрагмы должны быть широко открыты, светофильтр и дополнительная линза выдвинуты из оптического пути, конденсор поднят до упора и затем опущен на расстояние примерно 0,5 мм.

Прикройте полевую диафрагму так, чтоб её было видно в поле зрения, и настройте фокусировку конденсора, чтобы в фокусе оказался внутренний край ирисовой диафрагмы в плоскости препарата. Когда она будет в фокусе, поставьте её изображение в центр поля зрения и откройте её так, чтобы наружный диаметр находился несколько за пределами поля зрения. Вытащите один окуляр, и глядя в пустой тубус, прикройте апертурную диафрагму, оставив открытыми 2/3 в центре наблюдаемого при этом поля. Верните на место окуляр. Настройка освещения по Кёлеру завершена.

Вы начали с объектива 10x. Препарат должен оставаться в фокусе при любом методе настройки и при любых регулировках.

Теперь обратимся к осветителю. Нить лампы должна находиться на расстоянии минимум 7" (предпочтительно 10") от апертурной диафрагмы. Осветитель располагается позади микроскопа. Среднюю позицию занимает полевая диафрагма, затем зеркало для отражения света под углом 90° на конденсор. Если нить находится на оптимальном расстоянии, то она будет в фокусе в плоскости апертурной диафрагмы; в противном случае её необходимо сфокусировать в этой плоскости путём передвижения по горизонтали коллекторной линзы осветителя. Закрыв полевую диафрагму, можно посмотреть, центрирована лампа или нет (если нет, её нужно центрировать).

Следует проверить настройку конденсора для данного препарата, фокусирует ли конденсор полевую диафрагму в поле зрения. Для этого, при закрытой полевой диафрагме перемещением конденсора по вертикали подкорректируйте её фокусировку в плоскости препарата. Затем полевая диафрагма раскрывается до краёв поля зрения. Следовательно, при применении разных объективов её раскрытие будет различным. Таким образом, название «полевая диафрагма» отражает её назначение.

Поясним выражение «настройка конденсора для данного препарата». Конденсор устанавливается в положении на 0,5 мм ниже столика по двум причинам: 1) если мы не сможем пройти фокальную точку, как мы узнаем, что мы её нашли?; 2) показатель преломления воздуха равен 1,0. Если мы оставим воздух между поверхностью конденсора и нижней поверхностью предметного стекла, то вся система освещения будет работать с $A = 1,0$. Однако апертура конденсора должна быть равна 1,25, как и A иммерсионного объектива 100x. Как сделать так, чтобы система работала с $A = 1,25$, а не с $A = 1,0$? Ответ: поместите на конденсор каплю иммерсионного масла и подведите его к нижней части предметного стекла. Тогда у вас будет достаточно места для капли масла и конденсор установится в правильном положении. Вы когда-нибудь наносили масло между конденсором и предметным стеклом? Скорее всего, нет. Почему? Потому что у вас не было в этом необходимости. Вы и без того видели всё, что нужно. Значит ли это, что иммерсионный объектив 100x с $A = 1,0$ или даже $A = 0,95$ в сочетании с конденсором с $A = 1,0$ даёт нормальный результат? Именно так.

Рассмотрим масляную иммерсию — как и почему она применяется. Все иммерсионные объективы, предусматривающие наличие масла, используют масло типа А. После фокусировки с объективом 40x поверните револьвер так, чтобы убрать объектив с оптического пути, и нанесите одну или две капли иммерсионного масла на участок покровного стекла, через который проходит свет. Затем установите объектив 100x.

Рис. 8. Освещение по Кёлеру



Поскольку микроскоп парфокален, нет опасности повредить покровное стекло. При необходимости подстройте фокусировку конденсора. Вы можете настроить фокусировку для объектива 100x без использования масла на конденсоре, а просто при помощи правильной настройки апертурной диафрагмы и яркости освещения.

В чем преимущество использования масла? Оно позволяет устранить рассеянный свет, вызванный освещением в комнате, что влияет на контраст изображения препарата. Второе и главное преимущество — обеспечивает лучший сбор лучей света, выходящих из конденсора, и соответствующее повышение яркости изображения.

Увеличивает ли использование масла разрешающую способность микроскопа? Вероятно нет, хотя благодаря устранению размытости мы видим препарат с надлежащим контрастом при правильном применении апертурной диафрагмы. (Это предположение автора неверно. Иммерсионное масло позволяет увеличить апертуру объектива, что, в свою очередь повышает разрешающую способность микроскопа. — Прим. ред.)

Другими словами, мы теперь используем апертурную диафрагму только для того, для чего она предназначена, — регулировки контраста.

Рабочее расстояние обычного объектива 100x составляет около 0,3 мм. Иммерсионное масло типа А хорошо подходит для данного расстояния и благодаря высокой вязкости легко счищается со стекла и объектива. Масло типа Б гуще и предназначено для конденсоров, потому что иногда расстояние между конденсором и стеклом должно составлять 0,5 мм или более. Оба типа масла высыхают медленно или не высыхают совсем за то время, пока вы используете их. Не забывайте очистить объектив перед тем, как закончить работу, даже если вы собираетесь отойти всего на 10 минут.

Теперь посмотрим, что зависит от того, левша вы или правша. При выводе объектива 100x из оптического пути для его чистки — 40x или с низким увеличением оказывается в оптическом ходе? Если это объектив 40x — то поменяйте порядок объективов: объектив 40x довольно длинный и задевает масло, однако его линза не предназначена для работы с ним.

Микроскоп позволяет поворачивать револьвер с объективами и по часовой стрелке, и в противоположном направлении. Поэтому, если вы единственный

пользователь микроскопа, выберите тот порядок, который вам удобен для очистки иммерсионного объектива.

Две самые большие проблемы при чистке микроскопа — масло и грязь на объективах 40x и 100x. Масла на объективе 40x не должно быть, но вы можете не обратить на это внимание; также вы можете не заметить масляную плёнку и грязь на объективе 100x, поскольку фронтальная линза очень маленькая.

Фронтальная линза иммерсионного объектива герметично закрыта с краев для предотвращения попадания масла в объектив и на внутреннюю поверхность самой линзы. Наличие масла внутри объектива исключает возможность нормальной работы, а очистка стоит дорого.

Теперь повторно обратимся к освещению по Кёлеру.

Поместите знакомый препарат на столик и настройте фокусировку при использовании объектива 10x. Апертурная и полевая диафрагмы должны быть широко открыты, светофильтр и вспомогательная линза выдвинуты из оптического пути, конденсор поднят до упора. Прикройте полевую диафрагму так, чтобы ее было видно, и настройте фокусировку конденсора, таким образом, чтобы в фокусе оказался внутренний край ирисовой диафрагмы на плоскости препарата. Когда она будет в резком фокусе, откройте её, так, чтобы край находился как раз за полем зрения. Вытащите один окуляр и, глядя в пустой тубус, прикройте апертурную диафрагму, оставив открытыми 2/3 в центре поле зрения. Верните на место окуляр.

Проверьте, чему равна апертура объектива 40x. Обычно она равна 0,65. Значение очень близко к 2/3 апертуры конденсора. Поэтому мы настраиваем микроскоп, используя объектив 10x, что подходит также и для работы с объективом 40x. Последний называют сухим объективом с высоким увеличением. Сейчас уже есть сухие объективы 60x, 80x и даже 100x, однако термин «сухой объектив» по-прежнему относится к объективу 40x. Причина использования объектива 10x для настройки в том, что у него самое низкое увеличение среди хорошо скорректированных объективов высокого качества. Объективы с увеличением меньше 10x хуже, вне зависимости от производителя.

Некоторые микроскопы имеют название «микроскоп типа Кёлера» или «полу-Кёлер». Если лампа находится прямо под конденсором и нет необходимого расстояния 7" - 10", такие приборы не относятся к микроскопам по Кёлеру. Если есть

полевая диафрагма, её можно использовать для ограничения освещённого поля, но не для настройки конденсора.

Можно ли провести настройку освещения по Кёлеру для такого микроскопа? не совсем, но попробуйте. Поместите знакомый препарат на предметный столик и настройте фокусировку при использовании объектива 10х. Апертурная диафрагма должна быть широко открыта, светофильтр и вспомогательная линза выдвинуты из оптического пути. Переместите конденсор до упора и опустите на 0,5 мм. Вытащите один окуляр и, глядя в пустой тубус, прикройте апертурную диафрагму, так, чтобы открыто было $2/3$ в центре поле зрения. Верните на место окуляр. Если есть полевая диафрагма, широко откройте её. После настройки закрывайте её до тех пор пока поле зрения не начнёт становиться тёмным. Теперь поднимите или опустите конденсор, чтобы проверить, подходит ли расстояние 0,5 мм для данного препарата. Очень велика вероятность, что вам редко, если вообще придется работать с микроскопом типа Кёлера. Поэтому научитесь настраивать микроскоп до компромиссного варианта, но так близко к идеалу, как только возможно.

Когда вы освоите работу с микроскопом и научитесь пользоваться всеми его компонентами, вам потребуется две—три минуты на настройку по Кёлеру или полу-Кёлеру. Вы сможете открывать апертурную диафрагму примерно на $2/3$, просто глядя на препарат.

Фокусировку конденсора следует выполнять для конкретного препарата, и это единственная причина для изменения положения конденсора после настройки освещения по Кёлеру или полу-Кёлеру (на 0,5 мм ниже стекла).

Представьте себе, что выбраны для работы объектив и окуляр, конденсор установлен в нормальное положение, которое редко требуется менять, и все компоненты чистые. Что вам остаётся делать? Вы настроили апертурную диафрагму для объектива 40х, но можете выбрать объектив 10х или даже с меньшим увеличением или, напротив, объектив 100х. Апертурная диафрагма — единственный регулируемый компонент микроскопа. Ваша компетенция при работе с микроскопом зависит исключительно от того, насколько хорошо вы умеете настраивать апертурную диафрагму. Отверстие в $2/3$ — это нормальное положение. Врач-лаборант при работе примерно каждые 4 минуты достаёт окуляр и проверяет положение диафрагмы.

Рутинное исследование и техническая подготовка препаратов ткани в лабораториях, больницах, клиниках проводятся препаратором. Он готовит препараты с клетками и растворы. Сложные препараты смотрит патолог (врач-лаборант со специализацией в области цитологии и гистологии). При исследовании препарата он должен понять, вызваны ли затруднения в работе: (1) неправильной фиксацией объекта в формальдегиде, (2) сжатием ткани микротомом, (3) разрыванием ткани ножом, (4) неправильным окрашиванием и т. д. или (5) неправильной работой микроскопа. Поэтому патолог часто проверяет правильность настройки микроскопа по Кёлеру, чтобы исключить неполадку микроскопа как причину проблемы.

Применение стандартного препарата

Позвольте внести некоторую объективность в область микроскопии и помочь вам в стандартизации при работе с микроскопом. Некоторые приборы для химических и биохимических операций ежедневно тестируются по стандартному образцу. Прибор или дает правильный ответ, или им не пользуются, пока не починят. При этом обеспечивается объективность, невозможная при микроскопии.

Работа микроскопа зависит от регулировки его компонентов и оптических элементов. Правильная работа зависит также от пользователя. Например, болезнь, усталость, снижение остроты зрения, раздражающее воздействие окружающей обстановки и персонала — всё оказывает влияние на того, кто смотрит в микроскоп, и на результаты работы.

Есть две основные причины, по которым рекомендуется использовать стандартный препарат: ежедневная проверка работы микроскопа и оценка микроскопов других марок и моделей.

Выберите интересующий вас препарат с различными характеристиками. Хорошим примером служит лёгочная ткань, но можно использовать и многие другие. Должна быть окрашена гематоксилином и эозином. Ежедневное использование одного и того же препарата для проверки микроскопа позволит вам хорошо запомнить его структуры и особенности в зависимости от положения ирисовой диафрагмы конденсора.

Ежедневная проверка

Используйте 10x объектив. Поднимите конденсор до конца (до соприкосновения с нижней поверхностью предметного стекла), затем опустите на 0,5 мм. Сфокусируйте препарат, настройте раскрытие полевой и апертурной диафрагм.

Горизонтальное смещение препарата

Во время фокусировки с объективом 10x следите за горизонтальным перемещением препарата в любом направлении. Изображение должно находиться чётко в фокусе (без расплывчатости и горизонтального смещения).

Устранение некоторых неполадок, которые могут вызвать горизонтальное смещение препарата, требует участия компетентного технического специалиста. При

хорошем обращении с микроскопом в 80 % случаев этот эффект возникает по одной из четырех основных причин и легко устраним.

1. Объектив. Убедитесь, что он надёжно закреплён в револьвере.

2. Лампа. Поместите матовое стекло или протирочную ткань в осветительную систему. Если горизонтальное смещение препарата исчезнет, то лампа не центрирована. Центрируйте её или продолжите работу, используя светофильтр или протирочную ткань, пока не появится время в течение дня для центровки лампы.

3. Центровка конденсора. Допустим, что апертурная диафрагма была центрирована в конденсоре производителем. Выньте из тубуса окуляр, открывайте и закрывайте ирисовую диафрагму для того, чтобы увидеть, центрирована ли она в поле зрения. Если диафрагма не центрирована, но есть винты центровки, отцентрируйте её. Если же нет винтов центровки (см. примечание далее), переходите к следующему шагу.

4. Состояние фронтальных линз. При обнаружении грязи или высохшего иммерсионного масла на фронтальных линзах объектива очистите их.

Эти шаги должны устранить горизонтальное смещение.

Если проблема заключалась в пункте (3), тогда надо отцентрировать конденсор, что возможно. Смещение могло быть связано с оправой, точнее, с неровным или неплотным креплением в ней конденсора. Понаблюдайте за техническим работником, исправляющим неполадки, чтобы в дальнейшем вы сами могли решить проблему, если она снова появится.

Если исправление любой из причин устраняет горизонтальное смещение, переходите к оценке разрешающей способности.

Разрешающая способность микроскопа

Убедитесь, что все характерные детали, которые вы обычно наблюдаете на стандартном препарате, присутствуют на нём. Удостоверьтесь, что вы правильно настроили ирисовую диафрагму конденсора. Также проверьте работу объективов 40x и 100x.

Если изображение затуманено или загрязнено, то причина может быть в масляной плёнке на фронтальной линзе, оставшейся после обработки ксилолом или другими растворителями на основе бензина. Спирты (метанол, этанол, изопропил) чистят так же, как и ксилол, но они менее резкие и не оставляют масляной плёнки. Можно использовать и другие растворители. Важно лишь помнить, что растворитель

следует наносить на протирочную бумагу, а не на саму линзу, используйте растворитель экономно.

Если вы чётко видите стандартный препарат со всеми характерными чертами, микроскоп готов к ежедневной работе.

Оценка микроскопа

Используйте стандартный препарат для сравнения и оценки других микроскопов. Делайте это на вашем рабочем месте или на выставках, на которых экспонируются микроскопы. Всегда посещайте такие мероприятия и сравнивайте микроскопы.

В тот момент, когда вы посмотрите через незнакомый микроскоп (перед тем, приступить к наблюдению за своим препаратом), вы должны учесть две вещи.

Если между бинокулярной насадкой и корпусом микроскопа есть устройство, убедитесь, что оно находится в положении исследования в светлом поле. Затем осмотрите конденсор на наличие дополнительных линз. Если есть линза под конденсором, то она предназначена для работы с объективами малого увеличения, включая объектив 10x. Если линза находится над конденсором, тогда она для объективов 40x и 100x. С того момента, как вы начнёте работу с объективом 10x, нижняя линза должна находиться в оптическом пути или верхняя линза должна быть убрана из оптического пути. Максимально поднимите конденсор, затем опустите его на 0,5 мм. Конденсоров, в которых присутствовали бы оба типа линз, не существует.

Обратитесь за разрешением на использование стандартного препарата вместо того, что уже установлен в микроскопе. Если при наблюдении вы не видите привычных деталей препарата, удостоверьтесь, что микроскоп исправен, и если это так, не тратьте на него время, но всё же запомните марку и модель на будущее. Напротив, если вы видите больше, чем раньше, с лучшим разрешением и контрастом, тогда перед вами более совершенная модель микроскопа, чем та которая есть у вас. Уточните, почему этот микроскоп лучше вашего. Спросите про объективы, конденсоры, окуляры, а так же о том, что может быть добавлено к нему (например, фазовый контраст, тёмное поле, интерференционный контраст, флуоресценция и т. д.). Даже если вы не собираетесь покупать новый микроскоп, вы можете накопить необходимую вам информацию, чтобы в дальнейшем совершить покупку нужной вам модели.

Микроскопы очень индивидуальны. Рассмотрите незнакомый вам микроскоп с позиции удобства в использовании. Комфортно ли вам за ним сидеть? Возможно, он великоват и требуется его уменьшить. Удобны и просты ли в работе винты фокусировки и рукоятки перемещения предметного столика? Подходит ли вам угол наклона окуляров?

И все же предпочтение отдавайте более совершенным микроскопам, даже если вам не очень комфортно за ними сидеть. Вы должны научиться в первую очередь оценивать преимущества в оптике, даже если вам это не слишком по вкусу.

Наконец, это убедит вас в необходимости приобретения и использования стандартного препарата. Кстати, если вы хотите проверить еще и плоскостность поля зрения, примените цитологический препарат, поместите его под покровное стекло для устойчивости препарата.

Для хранения одного, двух или более стандартных препаратов вполне подойдет обычная картонная коробочка.

До сих пор мы были сосредоточены на светлопольной микроскопии, чтобы сделать её для вас простой и понятной. С этого момента мы можем подумать о других методах.

Такие методы, как тёмное поле, флуоресценция, фазовый контраст, дифференциальный интерференционный контраст по Номарскому связаны с использованием светлопольного микроскопа, но для этого надо установить дополнительные принадлежности и проверить исправность микроскопа. Такая проверка осуществляется до перехода к работе другими методами.

Метод тёмного поля

Метод тёмного поля позволяет наблюдать светящиеся структуры препарата на тёмном фоне. Так, например, при изучении препарата с живыми бактериями или клеток слизистой щеки фон будет чёрным, а двигающиеся бактерии или клетки будут выглядеть светящимися, белыми и, следовательно, легко обнаруживаться.

На практике метод темного поля реализуется двумя способами.

При использовании объективов с низким увеличением (до 40x) центральная часть апертурной диафрагмы конденсора закрывается непрозрачным диском из стекла или металла так, что пучок лучей выходит из конденсора в виде полого конуса и непосредственно в объектив не попадает. Изображение объекта создается только рассеянными (дифрагированными) структурами препарата лучами.

При использовании объектива 100x необходимо уменьшить апертуру объектива до значения несколько ниже 1,0 (в противном случае препарат будет засвечен, и детали не будут видны). Это достигается с помощью ирисовой диафрагмы в объективе (наилучший вариант, так как её можно закрыть для тёмного поля и открыть для светлого) или тем, что в зрачок объектива (заднюю фокальную плоскость объектива) помещается тёмнополюсное кольцо, обеспечивающее апертуру объектива меньшую или равную 1,0.

Далее, мы должны использовать соответствующий тёмнополюсный конденсор. Раньше при использовании тёмнополюсных конденсоров только V4 часть поля зрения, центральная, была хорошо освещена, остальные участки были размыты. С современными тёмнополюсными конденсорами всё поле зрения освещено и находится в фокусе. Этот вид конденсоров требует, чтобы при использовании всех объективов, начиная с 20x, между верхней линзой конденсора и нижней поверхностью предметного стекла находилось иммерсионное масло типа Б. Когда применяется иммерсионный объектив, масло должно находиться также между препаратом и фронтальной линзой объектива.

Лучшим примером проделанной работы с использованием данного метода микроскопии являются исследования препаратов, полученных при венерических заболеваниях. Так, трихомонады в этих препаратах хорошо видны в тёмном поле. А поскольку мы теперь не красим наши препараты, то всё живое остаётся живым.

Темнопольный конденсор лёгок в использовании и хорошо центрирован средствами, поставляемыми производителем. Кроме того, и сам оператор должен иметь возможность центрировать конденсор в случае необходимости, для чего последний должен иметь соответствующие винты настройки.

Метод фазового контраста

Для того чтобы увидеть бесцветные — прозрачные или полупрозрачные — препараты, вы должны окрасить их соответствующими красителями. Фазовый контраст был разработан Цернике (Zernike) для наблюдения за живыми организмами без окрашивания и изучения деталей прозрачных и полупрозрачных препаратов.

Обычно при методе фазового контраста апертурная диафрагма широко открыта. В плоскость прямо под конденсором, непосредственно над апертурной диафрагмой помещается круглая стеклянная пластинка с непрозрачным центром, прозрачным кольцом и непрозрачной внешней частью. Свет проходит через прозрачное кольцо, как через пончик, затем через конденсор и препарат. В задней фокальной плоскости объектива имеется противоположный диск: прозрачный центр, непрозрачное кольцо и прозрачная внешняя часть.

С фазовым телескопом (визирная трубка, помещаемая вместо окуляра) наблюдатель может сфокусироваться и увидеть оба кольца одновременно: чёрное кольцо в объективе и изображение светлого кольца конденсора. Светлое кольцо может быть центрировано относительно чёрного. Центрирование внутри объектива слишком сложно, но зато можно центрировать прозрачное кольцо под конденсором, поскольку оно доступно для настройки. Полная концентричность не требуется, но требуется полное перекрытие колец: светлое кольцо должно находиться внутри тёмного.

Фазовое кольцо действует двояко. Во-первых, оно поглощает значительную часть прямо прошедшего через светлое кольцо света, для чего на него нанесена полупрозрачная плёнка металла. Во-вторых, оно сдвигает фазу световых колебаний примерно на $1/4$ длины волны. Это позволяет сделать прозрачные и полупрозрачные детали полностью видимыми, причём клетки остаются живыми, так как они не подвергаются окрашиванию. Теперь можно полностью рассмотреть детали эпителиальных клеток, их форму, размер, а также ядра и гранулы; живая бактерия обнаруживается сначала в тёмном поле, а затем изучается в фазовом контрасте.

Цернике спроектировал свою систему так, что в ней имелось одно кольцо, подобранное по размерам для 10х, одно кольцо для 20 и 40х и ещё одно для 100х с

четвёртой позицией для светлого поля. Все масляные объективы работают с кольцом 100х.

Большинство фазовоконтрастных систем, используемых сегодня, подобны друг другу. Только одна компания делает систему с одним кольцом для объективов 10х, 20х, 40х и со вторым для объектива 100х; третья позиция в конденсоре предусмотрена для объектива 40х тёмного поля, четвертая — для работы в светлом поле с апертурной диафрагмой, центрированной на производстве без возможности корректировки со стороны пользователя.

У некоторых исследовательских микроскопов в бинокулярную насадку встроена линза Бертрана. Эта линза имеет возможность фокусировки для того, чтобы увидеть оба кольца, позволяя, таким образом, центрировать элемент конденсора (кольцевую диафрагму конденсора). Линза Бертрана выполняет функцию фазового телескопа, но наблюдатель в этом случае смотрит через бинокулярную насадку и окуляры.

Фазовый контраст бывает позитивным (тёмные структуры на светлом фоне), и негативным (светлые структуры на тёмном фоне).

В первом случае апертурная диафрагма широко открыта, во втором — закрыта так, чтобы заблокировать внешнее кольцо.

Обычная проблема при работе с фазовым контрастом — ореолы вокруг всех деталей препарата, которые мешают извлечь нужную для вас информацию. И все же польза от фазового контраста перевешивает все его недостатки. Дифференциальный Интерференционный Контраст (DIC) по Номарскому решает проблему с ореолами, но при этом появляется другая проблема (см. далее описание этой системы).

Рис. 9. Фазовый контрастный набор



Поляризационная микроскопия

Предположим, у вас есть пара сломанных поляризационных стёкол (поляризаторов). Если вы возьмёте одно стекло и повернёте его по отношению к другому, вы получите темноту. Степень непрозрачности зависит от качества поляризаторов. Подавление 95—98 % света — превосходный показатель; если он намного меньше, появляется грязно-серый оттенок. Взаимное положение поляризаторов при получении тёмного поля называется скрещенным, при получении наиболее светлого поля — параллельным.

Перед тем как обратиться к поляризационной микроскопии, давайте вернёмся к упомянутому выше патологу.

Добавим в его светлопольный или фазовоконтрастный микроскоп между бинокулярной насадкой и корпусом микроскопа устройство, которое позволит вводить поляризационный элемент (анализатор) в оптический путь. Поместим другой поляризационный элемент (поляризатор) под конденсор и будем поворачивать его до получения полной темноты (анализатор и поляризатор скрещены); зафиксируем при этом их положение. Вставим в это устройство (между бинокулярной насадкой и корпусом микроскопа) выдвижной держатель с компенсатором — красной пластинкой первого порядка. Допустим, патолог исследует препарат ткани и замечает объект, похожий на кристалл. Он устанавливает анализатор, поляризатор поворачивает до скрещенного положения и рассматривает объект. Если это кристалл или кристаллическое образование, то оно светится, как если бы за полупрозрачным экраном был включён осветитель. Пока ещё патолог не может определить, кристалл ли это мочевой кислоты или кальция. Он вводит в ход лучей красную пластинку первого порядка и поворачивает её из одного установленного положения в другое: кристалл становится или красным, или зелёным. Таким образом можно определить природу кристалла. Затем патолог убирает из оптического пути анализатор и, при желании, поляризатор и продолжает работу (изучаемая область препарата остаётся в поле зрения).

Теперь обратим внимание на поляризационный микроскоп. Он включает многие компоненты, которые присутствуют в обычном светлопольном микроскопе,

поскольку предполагает исследование препарата в светлом поле между поляризующими элементами.

Довольно часто, особенно при обучении студентов, используют монокулярные поляризационные микроскопы по причине их низкой стоимости. Профессора предпочитают бинокулярные модели. В бинокулярной насадке может быть установлена либо фиксированная, либо с возможностью фокусировки линза Бертрана, необходимая для исследования

(её функции описаны ниже). Между насадкой и корпусом находится деталь, в которой располагается анализатор, и прорезь для установки компенсатора.

Микроскоп имеет круглый и вращаемый предметный столик, что позволяет рассматривать препарат, поворачивая его между скрещенными анализатором и поляризатором. Столик также оборудован шкалой для измерения его поворота в градусах и угловых минутах. Под предметным столиком (обычно под конденсором) находится поворачиваемый поляризатор с фиксацией его положения под 0 , 45° и 90° к положению анализатора. Разумеется, в микроскоп установлена апертурная диафрагма и, как правило, держатель светофильтров.

В окуляре моно- или бинокулярной насадки есть перекрестие. Все центрирование проводится относительно этого перекрестия, препарат также поворачивается вокруг центра этого перекрестия.

Отличие механического предметного столика в том, что он должен быть низко расположен, чтобы при повороте об него не ударялись объективы. Очень часто это измерительный столик, который при перемещении в направлении восток - запад или север - юг последовательно фиксируется через заданные промежутки. Представьте себе шарик, который попадает в бороздку, — так работает механизм фиксации. Можно взять предмет острее шарика — эффект будет тот же. Когда вы поворачиваете объективы, механизм фиксации удерживает каждый объектив в оптическом ходе лучей.

Для подсчёта различных компонентов на тонком срезе им на счётчике присваивают номера от 1 до 9. Номер 10 предназначен для выбросов или суммирования. Исследователь перемещает препарат до фиксации столика и смотрит, находится ли один из 9 компонентов на перекрестии. Если там нет ни одного из них, то выбирают номер 10. При подсчёте материала на счётчике нужно указать число каждого из компонентов и всего остального на номере 10. После просмотра всего

препарата можно рассчитать процентное содержание любого из 9 компонентов материала.

Компенсатор устанавливается в микроскопе под углом 45° к направлениям север - юг и восток - запад.

Большинство компонентов видны одинаково вне зависимости от того, как они расположены по отношению к компенсатору, но некоторые требуют поворота, и это ещё одна причина, по которой столик должен быть вращаемым. Мы не будем углубляться в описание функций различных компенсаторов или клиньев, так как вы можете приобрести специальную книгу по этому вопросу. Мы лишь упомянем некоторые названия: пластина в $1/4$ длины волны — кварцевый клин, который может иметь 6, 30 или 120 порядков; красная пластинка первого порядка (у неё есть три других названия, позволяющие определить возраст тех, кто их использует: пластина замедления света, чувствительная тоновая пластинка и гипсовая пластина, самая старая).

Рассмотрим понятие «порядок». Когда свет преломляется через призму, становятся видны все цвета спектра, затем они становятся все бледнее (третий, четвёртый и т. д. наборы цветов-порядков). Нулевой порядок — это чёрный свет в самом начале спектра. Красная пластинка первого порядка, как и следует из названия, эквивалентна красному в первом порядке цветов.

Линза Бертрана в комбинации с окуляром даёт вспомогательную визирную трубку, позволяющую рассматривать интерференционные фигуры в выходном зрачке микрообъектива в то время, когда сам микроскоп сфокусирован на определённое зерно препарата. Если геологу необходимо идентифицировать материал, он поворачивает тонкий срез минерала между скрещенными поляризатором и анализатором. При этом видны 2 цвета (и только 2), а для превращения одного цвета в другой нужен специфический угол поворота препарата. Таким образом можно идентифицировать большинство минералов. Однако некоторые минералы так схожи по параметрам цвета и углам поворота, что интерференционная картина — единственный способ их идентифицировать.

Петрография изучает геологию нефти. У петрографического микроскопа нет линзы Бертрана, поскольку его пользователям интерференционная картина не нужна.

Стандартная геологическая работа выполняется на тонком шлифе. Он представляет собой тонкий срез камня, отшлифованный, заключенный в эпоксидной

смоле на предметное стекло размером 1x2 дюйма и затем отшлифованный ещё раз для того, чтобы толщина шлифа не превышала 15 микронов; после этого препарат устанавливают на предметный столик и накрывают покровным стеклом. Такие препараты наблюдают в свете, идущем от поляризатора через тонкий шлиф.

Все подобные исследования относятся к светлопольному микроскопу, к которому добавляются поляризатор, анализатор и компенсатор.

Исследователь руды может начать подготовку образца так же, как и тонкого среза, сделав его толщиной в 6-10 мм и отшлифовав поверхность. Ему потребуется эпиеосвещение, следовательно, между бинокулярной насадкой и корпусом микроскопа должен быть помещен осветитель. Там будет и лампочка, и трансформатор; поляризатор, анализатор, компенсатор; апертурная и полевая диафрагмы, дихроичное зеркало ит. д.

Работа объективов для поляризационного света отличается от работы стандартных объективов. Главное, они должны быть свободны от внутреннего натяжения. Натяжение в объективах возникает в результате давления металлических оправ на края линзы. При наблюдении через микроскоп это проявляется во вспышке белого света, идущего от точки давления по направлению к центру.

Производители тщательно проверяют объективы на наличие внутреннего натяжения. Те объективы, в которых нет натяжения, идут в комплект поляризационных микроскопов по высокой цене; а объективы с натяжением, идут в комплект биологических микроскопов, в которых натяжение не играет никакой роли, или вовсе бракуются.

Мы продемонстрировали вам необходимость наших объективов. Эти объективы предназначены и скорректированы для работы с препаратами под покровными стёклами толщиной 0,17 мм.

При исследовании руды под микроскопом полированную поверхность не закрывают покровным стеклом. Для такой работы есть нам нужны объективы, которые не будут скорректированы относительно покровных стёкол, или объективы для металлографии, но без натяжения.

Объективы 10x могут работать как с покровными стёклами, так и без них. Для рудных микроскопов потребуются 20x и более сильные объективы, которые скорректированы на отсутствие покровного стекла.

Наш стандартный поляризационный микроскоп обычно имеет в комплекте объективы 5x, 10x и 40x. Револьвер имеет 4 гнезда для объективов, поэтому мы добавили второй объектив 40x для препаратов без покровного стекла, получив таким образом, двойной световой поляризационный микроскоп. Ранее при описании окуляров Гюйгенса, в примечании, было сказано, что они не обеспечивают цветокоррекцию или компенсацию хроматической аберрации и для решения этой проблемы следует обратиться к разделу «Поляризационная микроскопия».

С того момента, как мы определились со значением цветов, мы не хотим, чтобы окуляр или объектив давали в поле зрения цвета, не принадлежащие препарату. Мы знаем, что объективы без натяжения были выбраны для поляризационных микроскопов, из-за отсутствия натяжения и цветовой коррекции. Следовательно, очень важно, чтобы и окуляры были без цветовой коррекции или компенсации. По этой причине поляризационные окуляры обычно модифицированы до окуляров Гюйгенса. Иногда применяются также широкопольные окуляры, но специально проверенные на соответствие поляризационному микроскопу.

Будьте внимательны при подсчёте общего увеличения поляризационного микроскопа. Из-за высоты устройства, служащего для крепления анализатора и компенсатора, появляется дополнительное увеличение бинокулярной насадки. Например, микроскоп, снабжённый револьвером на 3 объектива, имеет дополнительное увеличение 1,4x, а микроскоп с револьвером на 4 объектива — 1,8x.

На рис. 10 приведен общий вид поляризационного микроскопа.

1. 10-кратный широкопольный окуляр с большим выносом зрачка
2. Линза Бертрана
3. Прорезь для компенсатора
4. Микрообъективы без натяжения
5. Вращаемый предметный столик со шкалой на лимбе; цена деления 1°
6. Конденсор
7. Вращаемый поляризатор с возможностью вывода из хода лучей
8. Полевая ирисовая диафрагма
9. Фокусирующий 10-кратный окуляр с направляющей и перекрестием
10. Бинокулярная насадка с возможностью поворота на 360° и с углом наклона 30° к оптической оси
11. Винт крепления бинокулярной насадки
12. Держатель анализатора
13. Револьвер с микрообъективами
14. Штатив микроскопа
15. Клипсы препаратодержателя
16. Регулятор перемещения по высоте кронштейна конденсора
17. Коаксиально расположенные механизмы грубой и точной фокусировки

18. Основание микроскопа со встроенным трансформатором и регулировкой яркости галогеновой лампы 6 В, 30 Вт.

Рис. 10. Поляризационный микроскоп



Флуоресцентная микроскопия

До сих пор мы везде использовали метрическую систему единиц. Введём ещё один новый термин из этой системы — нанометры.

В одном миллиметре 1000 микрон, а в микроне 1000 нанометров. То есть в одном метре миллиард нанометров. В этом параграфе приведена в нанометрах длина световой волны. Следует упомянуть, что существуют микротомы для приготовления тонких срезов человеческих тканей толщиной от 3 до 5 микрон для лабораторных исследований и толщиной до 5 нм для электронных микроскопов. Для резки последних используются алмазные или стеклянные ножи.

Раньше все флуоресцентные микроскопы работали в проходящем свете с конденсорами, требующими иммерсии при увеличении 20х и более, и с мощными источниками света (до 200 Вт).

Рис. 11. Флуоресцентный микроскоп с цифровой камерой



В дальнейшем были разработаны специальные красители, дававшие при возбуждении светом флуоресцентное свечение препарата, которое, однако, быстро выгорало под действием возбуждающих лучей. Флуоресцентная микроскопия обычно проводится в тёмных комнатах из-за малой освещенности изображения и его быстрого фотохимического изменения (выгорания).

Для возбуждения флуоресценции применяются узкополосные светофильтры. Так, например, для возбуждения флуоресценции препаратов, окрашенных по ФИТЦ (максимум возбуждения при длине волны 495 нм), применяется светофильтр с полушириной пропускания 10 нм, то есть пропускающий область спектра 485-505 нм. Когда свет проходит через окрашенный препарат, часть препарата, которая адсорбировала краситель, флуоресцирует.

Запирающие светофильтры, установленные в пространстве над объективом, поглощают возбуждающие флуоресценцию лучи, защищая ваши глаза и позволяя вам видеть излучение только той части препарата, которая флуоресцирует.

Так как существует множество красителей, обычно используют поворачиваемый барабан с 4, 5 или 6 возбуждающими светофильтрами, предназначенными для возбуждения светом определённых длин волн. Запирающие светофильтры тоже различаются, хотя постепенно стали использовать только два основных светофильтра. Получение освещения, необходимого для данного метода, стало возможным благодаря применению мощных 200 Вт ртутных ламп. После включения внутри такой лампы создается давление в 14 или 15 атмосфер. Эти дуговые лампы опасны в применении, поэтому при замене их нужно надевать защитные очки.

При применении данного метода возникает множество проблем. Главные из них: многие препараты имеют собственное свечение, которое иногда трудно отличить от флуоресценции, вызванной окраской; кроме того, интенсивность флуоресценции структур препарата быстро падает под действием возбуждающих лучей, что мешает наблюдению и особенно фотографированию препаратов.

С тех пор как этот метод используется в медицине для диагностики заболеваний и определения их тяжести, интерпретация изображения препарата стала крайне важной. Она основывается часто на том, какой цвет флуоресценции клеток виден на чёрном фоне.

Когда фирма «Лейтц» предложила использовать превосходный сухой тёмнопольный конденсор с высоким пропусканием света, но серым фоном, это ни у

кого не вызвало серьезного интереса. Пришлось бы обучать всех интерпретации цвета, контрастирующего с серым фоном, а не с чёрным, а это, в свою очередь, вызвало бы множество проблем, хотя позволило бы использовать гораздо больше света, что было так необходимо!

Проводились также эксперименты с применением различных нертутных ламп: ксеноновых, галогеновых, угольных и т. д. с мощностью до 450 Вт. Ценность лампы определялась в зависимости от длин волн и яркости их излучения. Однако для использования таких источников света потребовались бы довольно дорогие трансформаторы большой мощности.

Помните, что с помощью флуоресцентного микроскопа устанавливается первичный медицинский диагноз и что при изменении напряжения в лампе меняется цвет флуоресценции препарата. Чтобы снизить вероятность ошибки, были разработаны новые стабилизаторы напряжения, но микроскопы при этом стали еще более дорогими.

Затем кто-то (скорее всего, это была фирма «Лейтц») сконструировал флуоресцентный осветитель для работы в падающем свете. (Впервые принцип работы флуоресцентного микроскопа в падающем свете с помощью дихроичных светоделителей был предложен в 1948 году советским ученым Е. М. Брумбергом. — Прим. ред.) Этот осветитель состоял из источника света, коллектора и специального opak-иллюминатора, в который вставлялись сменные кубические блоки с возбуждающим и запирающим светофильтрами и интерференционным светоделителем (дихроичным зеркалом). Это позволило увеличить освещённость флуоресцентного изображения и тем самым сделало возможным применение менее мощных ртутных ламп (50 или 100 Вт); кроме того, была обеспечена возможность получения более контрастного изображения.

Благодаря специальным блокам для обычных и специальных красителей работа стала более обыденной и простой. Одни микроскопы имеют место для двух блоков с фиксацией положения каждого; на других устанавливают 4 или даже более блоков. Сегодня обычно используют сочетание флуоресцентной микроскопии с методом фазового контраста. Метод сводится к включению обоих осветителей и к закрытию препарата от эписвещения. Проверьте микроскоп, используя методику Кёлера, если понадобится. Сфокусируйтесь на препарат в светлом поле или в фазовом контрасте в проходящем свете, чтобы найти интересующий вас участок препарата. Заблокируйте

проходящий свет, разблокируйте свет, возбуждающий флуоресценцию, и с помощью блока с необходимыми светофильтрами исследуйте препарат и делайте фотографии, если таковые будут нужны.

Интерференционная микроскопия

В этом разделе будет рассмотрен упрощённый вариант интерференционного микроскопа — дифференциальный интерференционный контраст (DIC) по Номарскому.

Имеются вариации в изготовлении DIC, но все работают в поляризованном свете. Под конденсором микроскопа, в плоскости апертурной диафрагмы, находятся призма Волластона и поляризатор, в задней фокальной плоскости объектива — призма Волластона и анализатор. Луч плоскополяризованного света расщепляется призмой Волластона на два луча, проходящие через структуры объекта очень близко друг к другу. Вторая призма Волластона соединяет эти лучи, которые интерферируют, создавая в плоскости изображения объёмное цветное изображение. Поляризатор и анализатор должны находиться в скрещенном положении. Действие указанных элементов заключается в получении оптимальных цветов изображения, что даёт наилучший трёхмерный и цветовой эффекты.

Некоторые производители ограничиваются одним комплектом призм Волластона для всех объективов; остальные используют индивидуальные комплекты для каждого объектива, но в данном случае это не является необходимостью.

DIC имеет преимущество перед фазовым контрастом, так как при его использовании нет ореолов, которые затемняют края. Благодаря изменению угла раздвоения света в конденсоре возможны тёмные и светлые трёхмерные изображения. Для того чтобы быть уверенным в достоверности интерпретации полученного изображения, необходимо иметь возможность вращения препарата и смены светлого изображения на тёмное.

DIC не может быть установлен в каждый микроскоп. В обязательном порядке в микроскопе должны быть установлены поляризатор, анализатор и поляризационные призмы. Но если есть желание, то можете приобрести такой микроскоп, когда он будет продаваться.

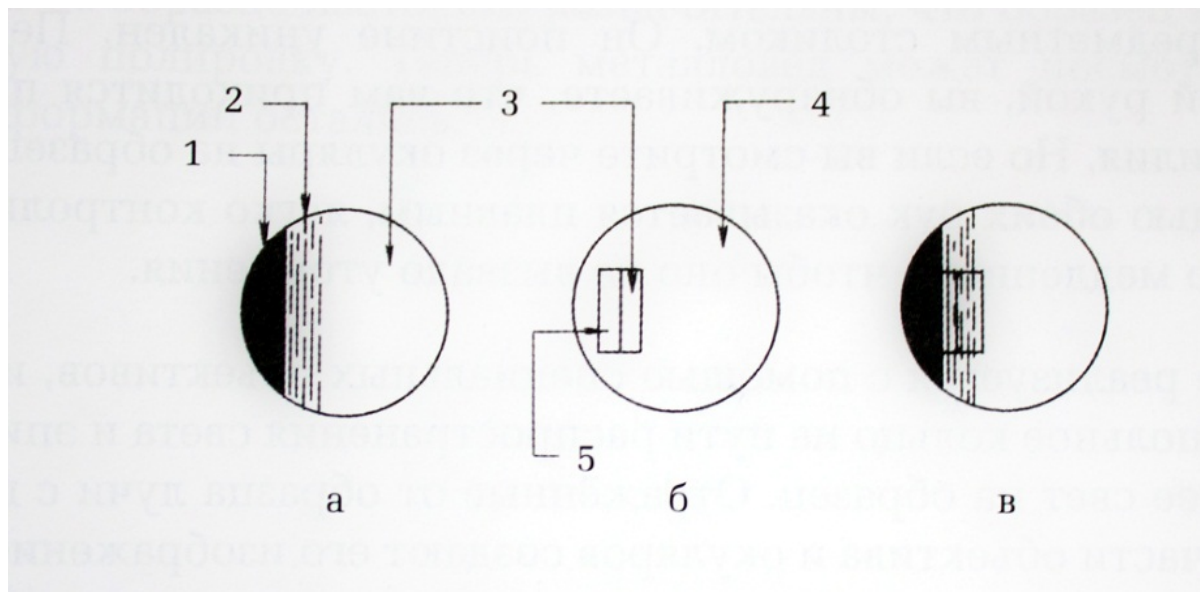
Между тем вариация под названием «модуляционный контраст по Хоффману» может быть добавлена в любой светлоспольный микроскоп проходящего света. Для получения такого контраста в зрачок микрообъектива помещается пластинка,

подобная части проэкспонированной и проявленной фотоплёнки и имеющая 3 участка — чёрный, серый и прозрачный, но поляризованный (см. рис. 12а).

Под конденсором находится другая пластинка (см. рис. 12б), которая может быть центрирована. При использовании фазового телескопа прозрачная часть этой пластинки накладывается на серый участок первой пластинки, при этом поляризационные участки обеих пластин накладываются друг на друга. Весь свет проходит через две щели; благодаря такому наклонному освещению рельеф препарата приобретает тёмные и светлые области, такие же как и при использовании DIC. Регулировка освещённости и контраста, необходимых для получения оптимального объёмного изображения, достигается за счёт поворота поляризатора, находящегося в осветительной системе.

Иногда при работе с помощью DIC и модуляционного контраста по Хоффману мы наблюдаем смещение изображения. Безусловно, смещение изображения в сторону — это плохая весть для того, кто работает с микроскопом. Однако в данном режиме оно необходимо, иначе эти методики не могут функционировать.

Рис. 12. Схема устройства для обеспечения модуляционного контраста по Хоффману



1. Чёрный
2. Серый
3. Участки в поляризованном свете
4. Непрозрачный участок
5. Прозрачный участок пластинок

- а — пластинка в конденсоре
б — пластинка в зрачке микрообъектива
в — результат совмещения пластинок

Металлографические микроскопы

Металлографический микроскоп представляет собой светлопольный микроскоп падающего (отражённого) света для исследования полированных образцов без применения покровных стёкол. Благодаря специфике объектов, подлежащих наблюдению на приборе, большинство микроскопов почти всех фирм выполняется по типу инвертированного микроскопа, у которого объектив расположен под предметным столиком. Однако имеются также микроскопы прямого типа, у которых объектив расположен над столиком.

У инвертированного металлографического микроскопа на подвижном предметном столике перемещаются объекты, установленные в сменных вкладышах для образцов разного диаметра. Исследуется нижняя поверхность образца, предварительно шлифованного или полированного. С помощью монтажного пресса изготавливаются образцы из металла в различных средах (бакелит, прозрачная пластмасса и т. д.) размерами 1; 1,25 и 1,5м или 25, 30 и 40 мм.

Инвертированный микроскоп чаще оборудуется скользящим, а не механическим предметным столиком. Он поистине уникален. Перемещая столик одной рукой, вы обнаруживаете, что вам приходится прилагать для этого усилия. Но если вы смотрите через окуляры на образец, движение с помощью обеих рук оказывается плавным, легко контролируемым и достаточно медленным, чтобы оно не вызвало утомления.

Тёмное поле реализуется с помощью специальных объективов, использующих тёмнопольное кольцо на пути распространения света и эпизеркало, направляющее свет на образец. Отражённые от образца лучи с помощью внутренней части объектива и окуляров создают его изображение. Аналогичная часть объектива используется при работе со светлым полем. Такие микроскопы могут быть укомплектованы DIC, выполненным с использованием поляризации и компенсатора.

Никто не поспорит с тем, насколько трудно поместить образец в инвертированный микроскоп. Держать его в своей руке, смотреть на него снизу и пытаться поместить его в луч света — это и в самом деле непросто. Напротив, прямой микроскоп позволяет сфокусировать луч на выбранном месте, затем поместить образец в фокус. Металлографический микроскоп прямого типа должен

обеспечивать перемещение и наблюдение объектов размером от 2 или 3 мм до 40 или 50 мм (от 1/8 до 2 дюймов); поэтому передвигаемый предметный столик должен поэтому выдерживать соответствующий вес.

Инвертированный металлографический микроскоп с его фиксированным предметным столиком нуждается только в сменных вкладышах для помещаемых на этот столик образцов различного диаметра, и если потребуется, то на него может быть помещён даже кусок металла.

Для инвертированного микроскопа достаточно, чтобы только одна сторона образца была шлифованной и отполированной. Таким образом, пользователь может исследовать поверхность, находящуюся в течение всего времени в фокусе. При использовании прямого микроскопа необходимо, чтобы обе стороны были отполированы и параллельны друг другу. Следует вдавить образец в пластилин на металлической пластине размером 1x3 дюйма, — таким образом делая верхнюю поверхность образца, находящуюся в фокусе во время сканирования, параллельной нижней поверхности.

Несколько слов о науке металлографии. Трещина в куске металла вызывает деформацию в металле глубиной иногда до 1/8" и более. Сперва поверхность стачивается, дабы сделать её более гладкой, затем шлифуется шлифовальной бумагой в проточной воде, полируется алмазной пастой до полного исчезновения деформации — и вы можете смотреть на металл, чистый и без деформаций. Проблема, однако, заключается в том, что каждое действие устраняя определённую часть деформации, само деформирует металл. При полировке алмазной пастой с размером зерна 0,25 микрона или алюминиевым порошком с размером зерна 0,05 микрона возможные царапины на образце настолько незначительны, что образец имеет почти зеркальную полировку. Теперь металловед может посмотреть, какие следы деформации остались.

Инвертированные биологические микроскопы

Так называются микроскопы для исследования клеток культур тканей. Поскольку микроскоп инвертированный, объективы смотрят на препарат снизу вверх. При этом покровное стекло расположено под предметным, ближе к объективам. Источник света, апертурная и полевая диафрагмы находятся над предметным столиком.

К данным микроскопам предъявляются следующие требования. Во-первых, достаточно большое расстояние между предметным столиком и конденсором для помещения чашек Петри и флаконов толщиной до 2" или выше; совместное движение конденсора и источника света при фокусировке плюс ко всему оба должны быть закреплены на одном кронштейне так, чтобы вся конструкция могла перемещаться на значительное расстояние вверх-вниз и/или в сторону.

Рис. 13. Инвертированный биологический микроскоп с цифровой камерой



Другое требование — это объективы с большим рабочим расстоянием, так как они должны фокусироваться на препарат через довольно толстое стекло — дно посуды. Можно создать объектив 20x с рабочим расстоянием от 1,2 до 1,7 мм или 40x объектив с рабочим расстоянием от 0,6 до 1,1 мм в отличие от нормальных 0,5 мм. Это позволит исследователю наблюдать сквозь дно чашек Петри и

фокусироваться на клетках или на других объектах, плавающих в чашках Петри, или на колониях, выращенных на агаре в чашках Петри.

Одна из компаний производит стандартные зеркальные объективы 20х с рабочим расстоянием 12,7 мм. Та же компания занимается производством зеркальных объективов с 20- и 40-кратным увеличением, которые имеют 1,5" в диаметре и рабочее расстояние до 14 мм. Численная апертура всех длиннофокусных объективов ниже, чем у их аналогов со стандартными характеристиками. Однако работать на таком микроскопе вам все равно придётся, даже если вы не сможете получить максимальную разрешающую способность.

В некоторых инвертированных биологических микроскопах применяются стандартные бинокулярные и тринокулярные насадки; другие оснащаются боковым портом для подключения фото- и кинокамеры наряду с бинокулярной насадкой. В них могут быть также установлены фазовоконтрастные устройства, перемещаемые предметные столики и прочие принадлежности прямого микроскопа.

Микроскопы с двумя насадками или мультинаблюдение

Довольно часто возникает необходимость в микроскопах со сдвоенной насадкой, чтобы преподаватель и студент могли наблюдать один и тот же образец одновременно и обсуждать его. Чтобы не возникало вопросов относительно того, что же именно и данный момент является объектом наблюдения, преподаватель использует подвижный указатель с подсветкой, При этом он не должен забывать, что поле зрения, наблюдаемое студентом, оказывается перевернутым по отношению к его собственному и вести обсуждение с учётом этого момента.

Раньше применялись микроскопы с несколькими насадками, обычно с двумя-четырьмя, но их применение осложнилось большим количеством людей, одновременно работающих с микроскопом, Полное широкое распространение получили микроскопы с одной или двумя насадками, расположенными сбоку от штатива микроскопа на расстоянии 3” от него, плюс насадка напротив преподавателя (всего на каком микроскопе могут работать 4 человека), Создавались и вариации на эту тему с числом насадок вплоть до 19 штук, В этом случае один микроскоп на основе галогенового источника света (6 В, 20 Вт) обеспечивал полное поле зрения и даже подсветку для всего работающего на нем персонала. У преподавателя применяется обычно стандартная бинокулярная насадка с одним неподвижным тубусом и одним подвижным, но все студенческие насадки имеют по два подвижных тубуса. Преподаватель может сфокусировать микроскоп с помощью своего неподвижного тубуса — студенты не могут. Они должны иметь возможность осуществлять фокусировку в обоих тубусах.

Полевые микроскопы

Как видно из названия, полевые микроскопы применяются не в лаборатории, а в открытом пространстве. Если буквально, то в лесу, на водных источниках и полях или же в такой местности, где отсутствуют источники электричества и микроскопы других видов.

Полевые микроскопы располагают зеркалом для внешнего освещения или солнечного света или же батареями, питающими очень маленькую лампочку. Они могут обладать большинством стандартных режимов светлого поля, тёмного поля, фазового контраста, а также вспомогательным оборудованием, таким как подвижный или скользящий предметный столик, конденсор с ирисдиафрагмами, светофильтры, посадочные гнезда для фотокамеры и т. д.

Одни полевые микроскопы имеют прямую конструкцию, другие напоминают вытянутую букву U и находятся под углом к вертикали, дабы достичь длины тубуса в 160 мм. Последние могут быть выполнены в виде инвертированного биологического или инвертированного металлографического микроскопа или даже в модификации для исследования поверхности земли.

Кристаллография

В кристаллографии часто требуется измерять углы между гранями кристалла, вращать кристалл в оправе, рассматривать его и т. д.

В этом случае используют поляризационный микроскоп с типичными для него тремя осями (одна вперед — назад, другая влево — вправо и третья, называемая Z -осью, вверх - вниз). Добавьте к этому универсальный стол, монтирующийся на предметном столике микроскопа и имеющий 3, 4, 5 или 6 дополнительных осей для работы. Эта разновидность микроскопов — самая сложная из всех!

Добавим, что к самому простому типу относится биологический микроскоп, затем идёт металлографический, поляризационный и кристаллографический.

Предметные и покровные стёкла

Для большинства исследований с помощью биологического микроскопа пригодны различные варианты предметных стёкол, имеющиеся в продаже. В некоторых масляно-иммерсионных тёмнопольных методиках крайне важной является идеальная толщина; такие стекла так же можно приобрести.

Среди покровных стёкол категорически не рекомендуется использовать пластиковые. Единственная причина, по которой такие стекла используют — это возможность их мыть и повторно применять (Кстати, в некоторых школах практикуется повторное использование даже предметных стёкол, по большей части это утверждение относится к начальным школам, иногда к средним — и никогда к колледжам.)

Порой автор, настаивая на использовании покровных стёкол надлежащего качества, ощущает себя «вопиющим в пустыне». Обычно встречаются покровные стёкла классов № 1 или 2, в то время как надлежит использовать стёкла класса № 1,5. Покровные стекла продаются унциями. Тот, кто покупает покровные стёкла класса № 1, полагает, что за свои деньги получает лучшую из имеющихся альтернатив. Тот, кто приобретает стёкла класса № 2, думает, что они не такие хрупкие, и он сможет использовать их с большей отдачей. Однако и то и другое является заблуждением. Поясним.

Толщина покровных стёкол: класс № 1 — от 0,13 до 0,17 мм; класс № 1,5 — от 0,16 до 0,19 мм; класс № 2 — от 0,17 до 0,25 мм. Почти все производители микроскопов разрабатывают объективы на толщину покровного стекла 0,17 мм. Такие стекла могут попадаться и в классе № 1 и в классе № 2. Но больше всего покровных стёкол оптимальной толщины в классе № 1,5. Должны ли мы быть принципиальными в вопросе использования покровных стёкол? Думаю, да. Кто-нибудь может попасть в серьёзную беду безо всякого на то желая!

Существует возможность приобрести масляно-иммерсионные объективы с регулировкой под толщину покровных стёкол. Предполагается, что это свойство особенно важно при больших увеличениях, хотя одновременно замечено, что ценность этой функции снижается вместе со снижением степени увеличения. Данная регулировка встречается в некоторых исследовательских микроскопах.

Измерение

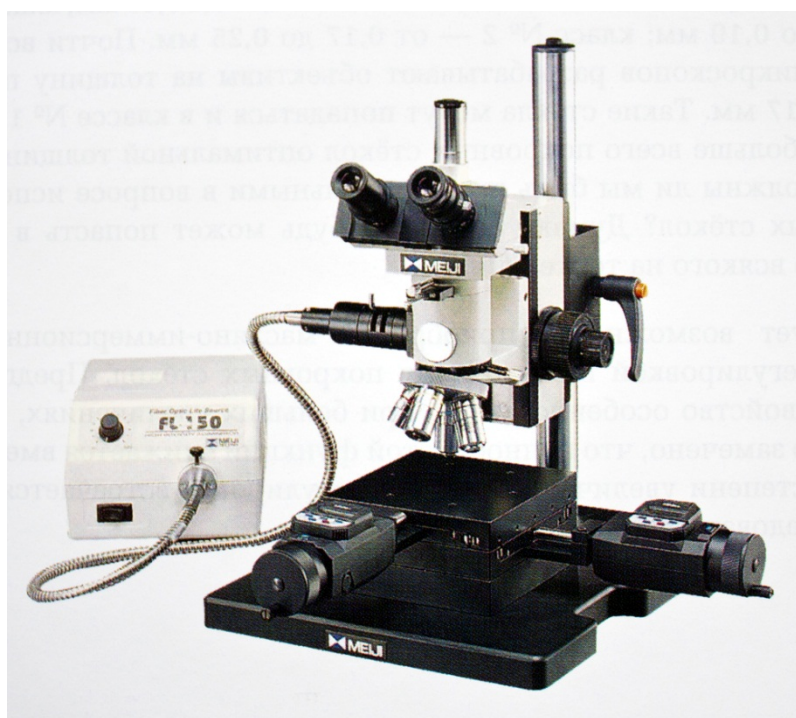
В этом параграфе будут рассмотрены различные измерительные устройства к микроскопу. Все они требуют калибровки.

Конечно, если бы все микроскопы имели одинаковую длину тубусов, все объективы соответствовали имеющимся на них обозначениям и люди, работающие с микроскопами, обладали идеальным зрением, то калибровка бы не потребовалась. Однако реальность не такова.

Как уже ранее упоминалось, некоторые бинокулярные насадки обладают постоянным увеличением, другие нет. Добавим к этому допустимую погрешность увеличения в производимых микрообъективах в пределах 2-2,5 %. Таким образом, объектив 100х мог бы оказаться 97,5х или 102х, и мы бы об этом не узнали, пока не откалибровали его. В действительности же данная погрешность никого не интересует.

Только измерение по оси Z не требует калибровки, поскольку с помощью него измеряется восходящее движение предметного столика, и данные выводятся в мм или дюймах. Таким образом, измерение по оси Z является самокалибруемым.

Рис. 14. Измерительный микроскоп



Окулярные сетки и шкалы

Graticle, graticule, reticule. Все эти слова обозначают одно и то же — сетка, шкала. Британское написание отличается от других. Сетка или шкала должна находиться в фокусе глазной линзы окуляра, чтобы прибор мог быть точно настроен под глаз конкретного пользователя. Общая практика в подобных случаях — поместить окулярную сетку или шкалу в окуляр на выступ, специально предназначенный для этой цели, и фокус будет достаточным практически для любого наблюдателя.

Окулярная шкала калибруется под каждый объектив с помощью объект-микрометра, помещаемого на предметный столик микроскопа вместо препарата. Объект-микрометр — это шкала, нанесённая на стеклянное предметное стекло размером 1x3 дюйма; она имеет, как правило, длину 1 мм и делится на десятые и сотые доли. 1 мм равен 1000 микронам; десятые доли соответствуют 100 микронам, сотые — 10 микронам. В английском варианте обычно 0,5 дюйма делятся на десятые, сотые или тысячные, последние называются «мил» — единица длины, равная 0,0254 мм.

Окулярные шкалы изображаются в виде просто шкал; окулярные сетки — в виде сеток, окружностей, концентрических окружностей, углов и т. д. Перекрестия на выбор могут быть простыми или с размеченными шкалами.

Итак, составляется калибровочная таблица для каждого объектива конкретного микроскопа. Окулярная шкала может быть размером 10 мм, поделенных на 100 частей. У откалиброванного по объект-микрометру объектива 10x каждое деление может равняться 0,12 мм или иметь другой размер; у объектива 40x деление может равняться 0,3 мм. Довольно редко встречается ситуация, когда у объектива 40x деления прямо соотносятся с делениями объектива 10x или 100x. Однако подобное все же возможно, в том числе, когда полностью совпадают шкалы двух объективов 40x.

Большая проблема при калибровке — интерполяция, то есть нахождение правильного расстояния между двумя линиями. Другими словами, мы можем брать данные только из определенного интервала. Экстраполяция, то есть выход за границы шкалы или микрометра, недопустима.

Итак, вы устанавливаете на предметный столик вместо препарата объект-микрометр (он должен находиться в фокусе) и в окуляр — шкалу (см. пример на рис. 15а).

В случае с интерполяцией (см. пример на рис. 15б) внизу расположены деления микрометра. Обратите внимание, что отметка 2,5 верхней шкалы лишь немного правее деления 3 микрометра, отметка 5 сильнее отстоит от деления 5 микрометра, чем в предыдущем случае, и расстояние от 2,5 до 3,5 верхней шкалы практически равно расстоянию между отметками 3 и 4 микрометра. На мой взгляд, оно равно 0,8. Таким образом, 5 интервалов на шкале соответствуют 4,2 интервала на микрометре, или 1 деление сетки равно 0,84 деления микрометра.

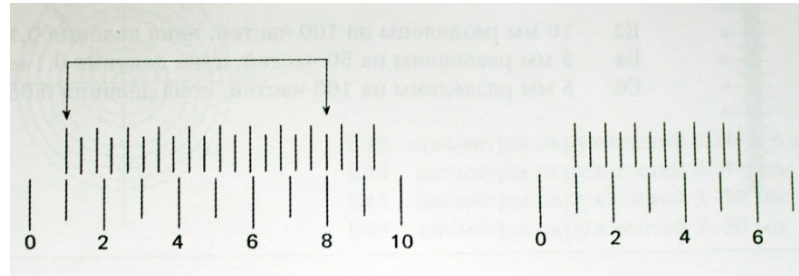
На рис. 16 вы можете увидеть несколько окулярных сеток и шкал из множества существующих. Некоторые компании производят сетки и шкалы под заказ и с индивидуальной калибровкой. Впрочем, это удовольствие не из дешёвых. Если цена на большинство окулярных шкал варьирует в пределах от 20 до 75 долларов, то для изготовленных на заказ окулярных сеток эта величина вырастает до 200 долларов.

Показанные на рис. 16 л, м сетки Porton используются при определении размера частиц асбеста. Все они требуют калибровки с помощью объект-микрометра. На практике сначала рисуют несколько реплик объекта и вписывают коэффициенты для каждого интервала, круга и т. д. Затем выясняют, какой именно вариант будет использоваться, то есть определяют коэффициент и, наблюдая через окуляры, высчитывают размер частицы. Впрочем, несложно пропустить один из элементов реплики и посчитать неверно.

Сетка Walton and Beckett (рис. 16н) калибруется под конкретный объектив 40x на конкретном микроскопе. Стоимость изготовления такой сетки на заказ составляет 100 долларов. Круг имеет ровно 100 микронов в диаметре; горизонтальная ось разбита на деления по 5 микронов, вертикальная — на деления по 3 микрона; получаются прямоугольники размером 3 на 10 микронов. Используя эту сетку, можно продолжать смотреть в окуляры и не сомневаться, та ли ячейка выбрана и правильно ли определён размер — все это верно, но только для этого микроскопа и для этого объектива. Если бинокулярная насадка имеет непостоянное увеличение, тогда результат измерения справедлив только для конкретной настройки межзрачкового расстояния.

Если у вашего микроскопа бинокулярная насадка с непостоянной длиной тубуса, вы можете увеличить межзрачковое расстояние или же уменьшить его, пока сетка точно не совпадёт с одним или всеми делениями микрометра. В таком случае вам надо измерить межзрачковое расстояние. Те же операции необходимо повторить для другого объектива.

Рис. 15. Примеры совпадения двух делений шкалы и объект-микрометра и интерполяции

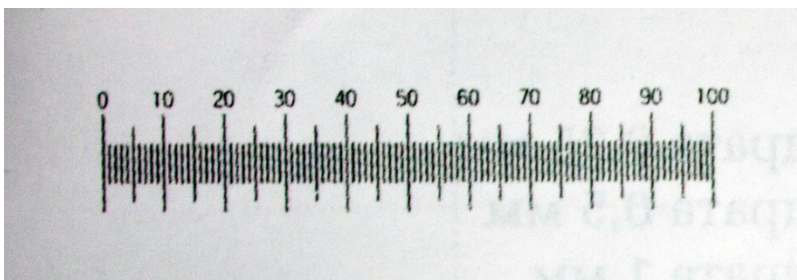


а — объект-микрометр

б — интерполяция

Зачастую деления на шкалах совпадают в двух и более местах. Соотношение между шкалой и микрометром будет соответствовать соотношению количества делений на шкале и микрометре между точками совпадения. На рисунке совпадение произошло таким образом, что 7 делений шкалы и 17 делений микрометра оказались между точками совпадения. Таким образом, каждое деление шкалы соответствует $17 : 7 = 2,42857$ деления микрометра, которые в свою очередь измеряются в абсолютных величинах.

Рис. 16а. Горизонтальный микрометр



- E1 10 мм разделены на 100 частей, цена деления 0,1 мм
- E3 5 мм разделены на 50 частей, цена деления 0,1 мм
- E5 5 мм разделены на 100 частей, цена деления 0,05 мм
- E20 0,1 дюйма разделена на 100 частей, цена деления 0,001 дюйма
- E27 2 мм разделены на 100 частей, цена деления 0,02 мм
- E28 1 мм разделен на 100 частей, цена деления 0,01 мм
- E31 0,5 дюйма разделены на 100 частей, цена деления 0,005 дюйма
- E32 0,25 дюйма разделены на 100 частей, цена деления 0,0025 дюйма
- E40 20 мм разделены на 200 частей, цена деления 0,1 мм
- E41 10 мм разделены на 200 частей, цена деления 0,05 мм

Рис. 16б. Вертикальный микрометр

- E2 10 мм разделены на 100 частей, цена деления 0,1 мм
- E4 5 мм разделены на 50 частей, цена деления 0,1 мм
- E6 5 мм разделены на 100 частей, цена деления 0,05 мм

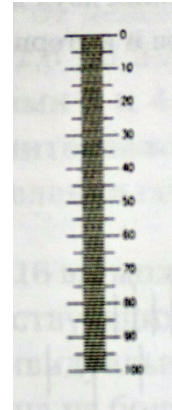


Рис. 16в. Микрометр-перекрестие

- E17 10 мм разделены на 100 частей, цена деления 0,1 мм
- E18 5 мм разделены на 100 частей, цена деления 0,05 мм
- E33 0,5 дюйма разделены на 100 частей, цена деления 0,005 дюйма

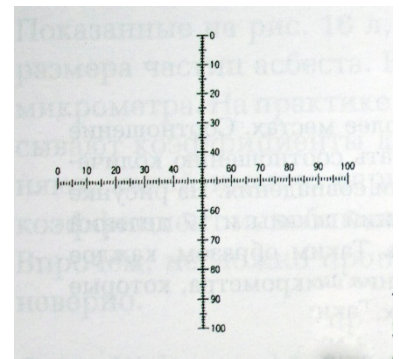


Рис. 16г. Сетка в виде квадратов по типу шахматной доски

- E12 длина стороны квадрата 0,25 мм
- E13 длина стороны квадрата 0,5 мм
- E14 длина стороны квадрата 1 мм
- E15 длина стороны квадрата 2 мм

Комментарий: объекты четко видны через прозрачные и серые части

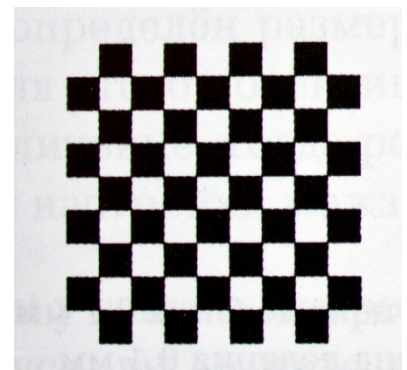


Рис. 16д. Сетка

- E29 Сетка размером 7x7 мм, используется при исследовании питьевой воды

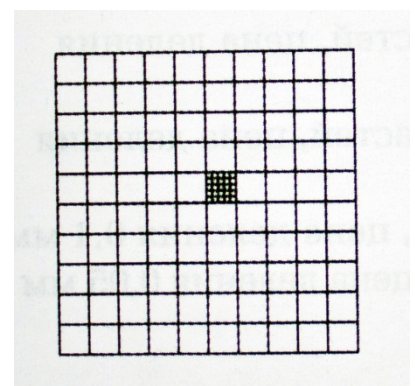


Рис. 16е. Концентрические окружности

E42 диаметры окружностей 0,25-2,5 мм
E43 диаметры окружностей 0,5-5 мм
E44 диаметры окружностей 1-10 мм
E47 диаметры окружностей 2-20 мм

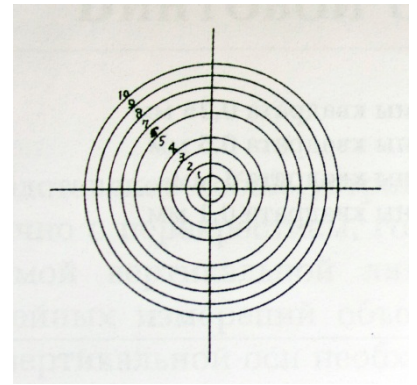


Рис. 16ж. Перекрестие

E8 толщина линий 0,015—0,2 мм
E81 толщина линий 0,04 мм
E82 толщина линий 0,005 мм
E83 толщина линий 0,002 мм (длина 2,5 мм)

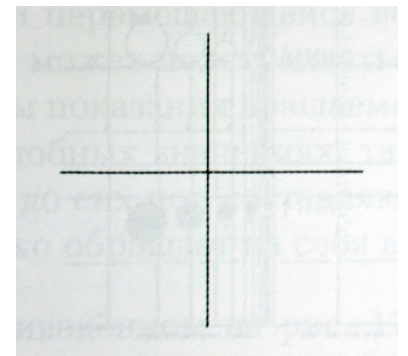


Рис. 16з. Прерывистое перекрестие

E56 ширина линий 0,015-0,02 мм

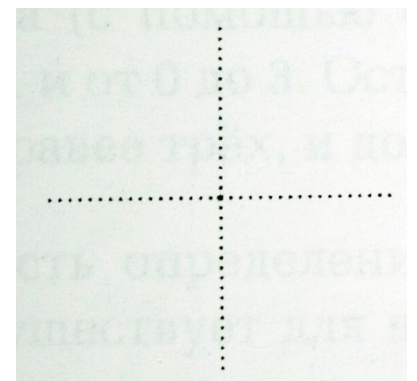


Рис. 16и. Сетка в виде квадратов

E9 площадь одиночного квадрата 0,25 мм²
E10 площадь одиночного квадрата 0,5 мм²
E26 площадь одиночного квадрата 2 мм²
E34 площадь одиночного квадрата 0,1 мм²

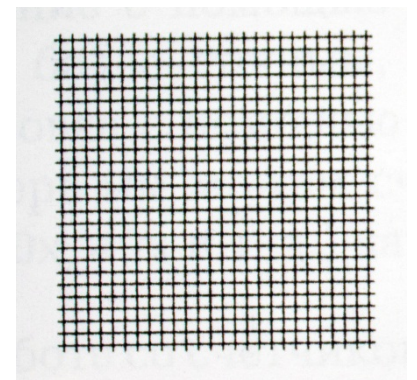


Рис. 16к. Сетка в виде нумерованных квадратов

Е9а длина стороны квадрата 0,25 мм
Е10а длина стороны квадрата 0,5 мм
Е11а длина стороны квадрата 1 мм
Е34а длина стороны квадрата 0,1 мм

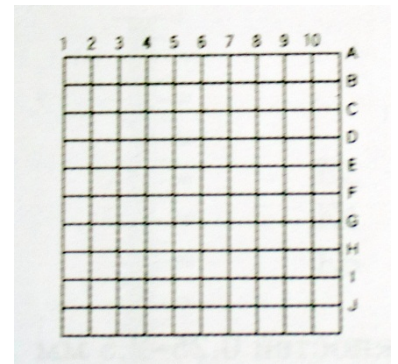


Рис. 16л. Сетка Porton G2

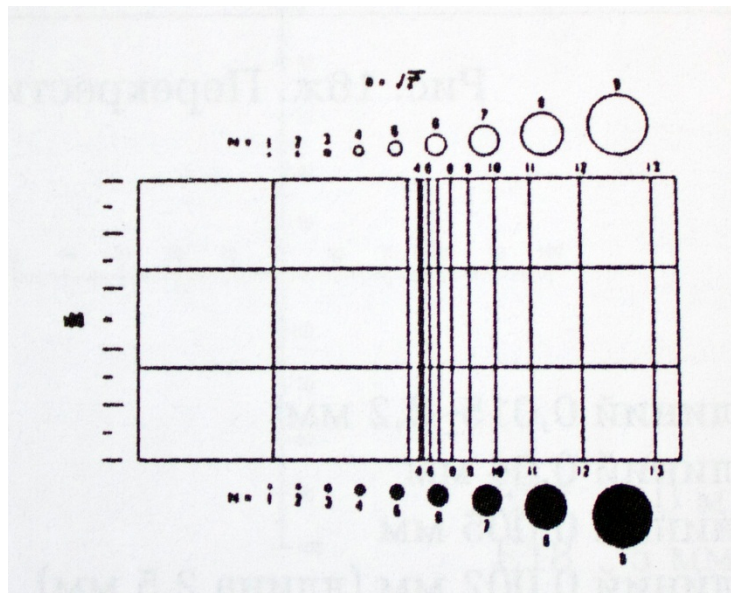


Рис. 16м. Сетка Porton G12

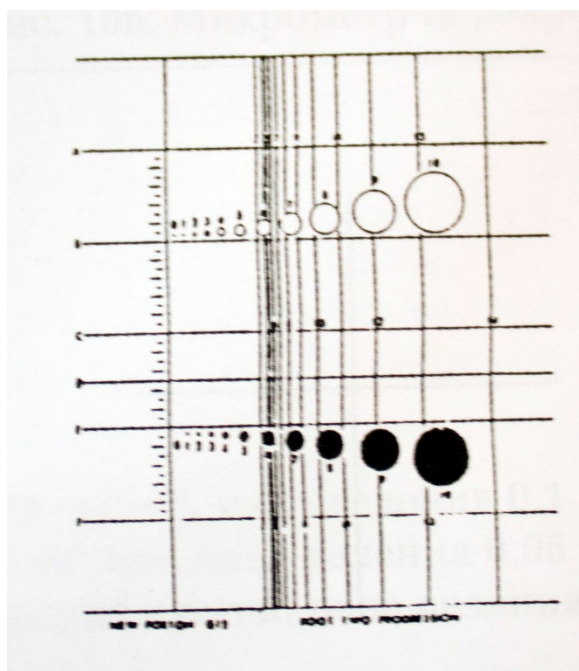
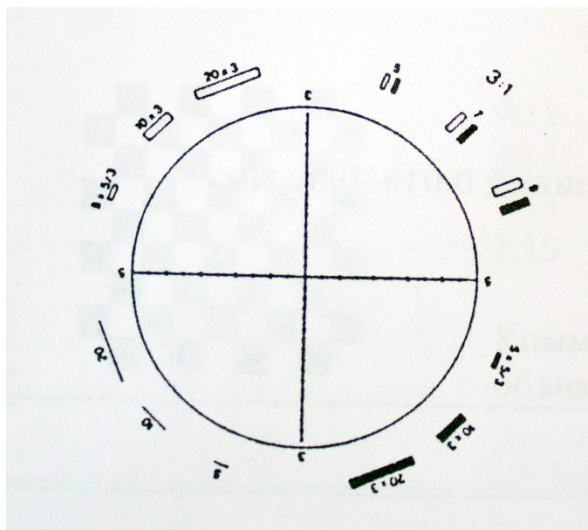


Рис. 16н. Сетка Walton and Beckett



Винтовой окулярный микрометр

Представляет собой устройство со встроенным окуляром 10х или 15х, обычно с перекрестием, горизонтальной шкалой с делениями и перемещаемой вертикальной линией. Предназначен для непосредственных линейных измерений объекта по горизонтальной оси. Для измерения по вертикальной оси необходимо повернуть микрометр в тубусе на угол 90° ; для измерений в других направлениях — на любой требуемый угол. Микрометр крепится на стандартном тубусе микроскопа вместо окуляра.

Калибровка винтового окулярного микрометра проводится с помощью объект-микрометра (см. рис. 17). Окулярный микрометр обладает шкалой и перемещающейся вертикальной линией. Заметим, что сама шкала тоже может подстраиваться. Это позволяет подвинуть её таким образом, чтобы показания вращаемого барабана микрометрического винта оказались на удобных значениях, таких как 0, 12, 20 и т. д. Некоторые исследователи до сих пор составляют таблицу для каждого конкретного объектива, однако обращает на себя внимание другая особенность.

В приведённом на рис. 17 примере объект касается левого края шкалы в значении 0. Или же он немного заходит за черту? Действительно ли вторая сторона объекта лишь касается перемещающейся линии или же они пересекаются?

Поскольку мы осуществили предварительную калибровку показаний барабана (с помощью объект-микрометра), мы точно знаем расстояния от 0 до 1 и от 0 до 3. Осталось определить лишь ту часть деления, что находится правее трёх, и дописать это значение на шкалу.

Сложность определения, действительно ли 2 линии только соприкасаются, существует для всех типов окулярных шкал, так же как и для винтовых окулярных микрометров всех типов и версий. И если группа ученых осуществляют одно и то же измерение, скорее всего, результатов будет так же много, как и самих ученых. Однако полученные результаты будут при этом очень похожими.

Измерение с помощью винтового окулярного микрометра может получиться более точным, если использовать цифровой счётчик данных. Калибровка с помощью объект-микрометра необходима в любом случае, но теперь мы можем считывать

данные для калибровки каждого объектива (10х, 40х и т. д.) напрямую с помощью счётчика.

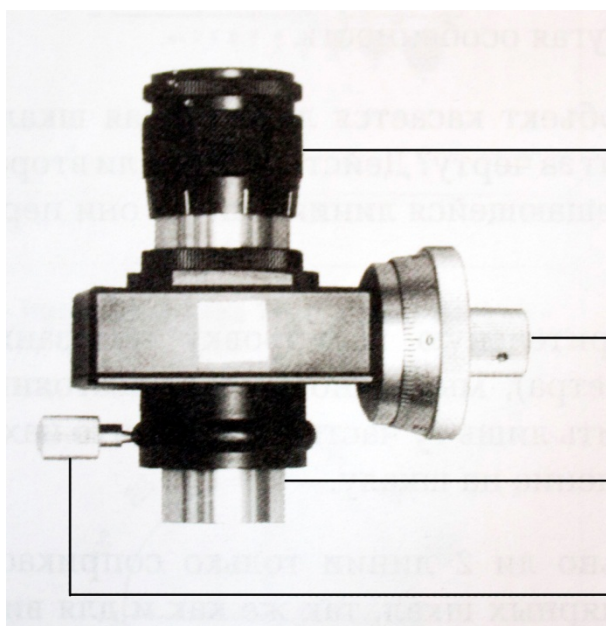
При работе со счётчиком внимательно изучите касание слева (при измерении слева направо); установите счётчик на нуле; затем с другой стороны

проделайте аналогичную операцию, установив вторую границу интервала в правой точке касания, и посмотрите на счётчик, где будет отображаться результат измерения. Благодаря использованию счётчика повышается общее качество выполнения работы.

Окулярный винтовой микрометр — это высокоточный прибор, работающий в связке с микроскопом, обеспечивающий максимальную точность измерения и исключающий множество утомительных и требующих времени процедур калибровки.

Точность измерения окулярным винтовым микрометром многократно превышает точность обычного микрометра, помещённого в окуляре микроскопа. Шкала в микрометре имеет длину 10 мм; она разделена на 10 равных частей длиной 1 мм каждая. Одно деление шкалы соответствует 100 делениям барабана. Вращающаяся рукоятка барабана за один полный оборот позволяет пройти одно деление шкалы. Таким образом, барабан может осуществлять сдвиг в размере 1/100 деления шкалы.

Рис. 17. Винтовой окулярный микрометр



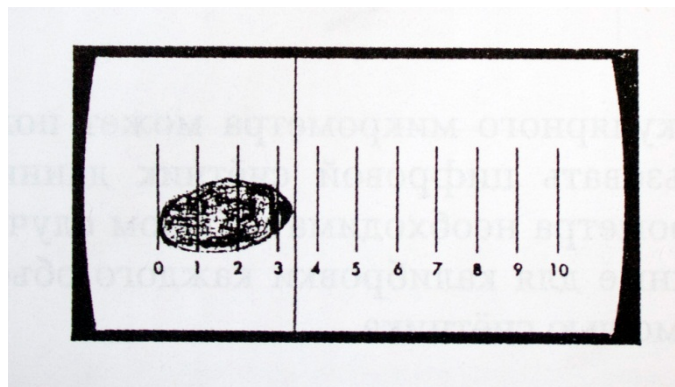
глазная линза с возможностью фокусировки

вращаемый барабан микрометра

адаптер «Б» № 429 для крепления микрометра

винт с барашком для крепления микрометра к адаптеру

а — внешний вид устройства



б — метрическая шкала, модель № 4268

Сдвиг изображения

В этом устройстве используются спаренные призмы, с помощью которых создаются два изображения. Спаренные призмы соединены в одной точке (упрощённое описание). Если они расположены на одной оси, мы видим только одно изображение. С помощью вращения специального барабана призмы разворачиваются наподобие веера, создавая два отдельных изображения.

В оптические ветви помещаются цветные светофильтры: в одну — красный, в другую — зелёный. Можно использовать один светофильтр, можно оба — для получения оптимального контраста изображений. Правда, следует заметить, что наибольшая точность измерений достигается без применения указанных светофильтров.

Когда два изображения перекрываются, наблюдается тёмная область в изображении объекта; если они не соприкасаются, наблюдается пустое пространство между ними. При точном совмещении указанных изображений счётчик показывает нулевой отсчёт. Вращением барабана добиваются того, чтобы два изображения касались друг друга.

Размер объекта отсчитывается на цифровом счётчике. Большая точность измерения достигается при двойном сдвиге изображения. При этом совершаются следующие манипуляции: левое касание изображений — наложение — правое касание, полученный отсчёт делится на 2. В системе счётчика имеется 4 потенциометра для калибровки результатов при использовании различных микрообъективов.

ССТV – система замкнутого телевидения

Прежде всего об основах ССТV — телевизионной системе без выхода сигналов в эфире. Американская система имеет 525 растровых горизонтальных строк, но мы видим в каждый промежуток времени только половину из них, то есть 262; будем считать, что строк 250. Каждая строка разделена на 500 пикселей, или 500 элементов разрешения. Если бы растровые строки были непрерывными, то изображения из-за отсутствия деталей не было бы видно. Разделяя каждую строку на 500 пикселей (некоторые будут приходиться на края, большее количество — на середину предметов), получаем картинку. Очевидно, что чем больше пикселей в том месте, которое нам необходимо увидеть, тем лучше разрешение. Но лучшее не всегда доступно из-за высокой пены.

Черно-белые ССТV имеют минимальное разрешение в 500 строк (у нас нет информации о черно-белых камерах с разрешением менее чем в 500 строк). Черно-белые ССТV также доступны с разрешением в 600, 800, 1000 и 1200 строк в сочетании с соответствующими мониторами.

Минимальное разрешение цветных ССТV — 250 строк с нормальной доступной камерой, но может быть и 400, и 600 строк с соответствующими мониторами. Пользователи обычно покупают ССТV с разрешением в 400 или 600 строк, так как этого обычно бывает вполне достаточно. Домашние телевизоры имеют 250 строк.

Подключение ССТV к микроскопу происходит при помощи адаптера C-mount.

Рис. 18. Видеокамера



Микрофотография

Все производители микроскопов предлагают собственные системы для микрофотографирования, то есть для фотографирования с помощью микроскопа: ручные, полуавтоматические или полностью автоматические.

Эти системы превосходны, если расходы на их покупку будут покрыты количеством снимков. Вы можете положиться на качество, предлагаемое производителем, и быть уверенным в том, что если изображение сфокусировано в бинокулярной насадке, то оно будет сфокусировано на фотографии, вне зависимости от её формата.

Камера, которая устанавливается на любой простой или стереомикроскоп с вертикальным тубусом, имеет горизонтально расположенный тубус с окуляром. В окуляре есть глазная (верхняя) линза с возможностью фокусировки наблюдателя на сетку, находящуюся в окуляре, в плоскость которой фокусируется препарат. Это позволяет убрать пользователя из уравнения, связанного с правильной фокусировкой на препарат, так как он фокусируется дважды: сначала на сетку, затем с помощью фокусировочных винтов микроскопа на препарат. Таким образом, человеческий фактор не оказывает никакого влияния на систему, поэтому с ней может работать любой пользователь. После подобной настройки изображение оказывается сфокусировано на плёнке.

Часто при микрофотографировании применяются зеркальные фотокамеры, особенно в настоящее время в связи с возможностью автоматического определения выдержки.

Однако при этом надо помнить о приоритете апертуры. Если зеркальная камера работает со своим объективом, то оператор устанавливает апертуру объектива (раскрытие диафрагмы в объективе), а система автоматического определения выдержки находит и осуществляет оптимальную скорость открытия затвора фотокамеры. Когда мы удаляем объектив из фотоаппарата, что чаще всего происходит при микрофотографических работах (вместо объектива фотокамеры в этом случае используется окуляр микроскопа), получается полностью открытая апертура лучей, идущих к матрице, но время открытия затвора по-прежнему определяется системой автоматического определения выдержки. В этом случае

нельзя получить приоритет установления скорости срабатывания затвора. Предположим, вы установили скорость срабатывания затвора, а автомат должен контролировать апертуру. Но мы убрали из аппарата фотообъектив вместе с его апертурной диафрагмой, значит, автоматическая система в данном случае не срабатывает.

Зеркальная камера может устанавливаться на вертикальный тубус микроскопа или на один из тубусов бинокулярной насадки.

Рассмотрим случай с установкой её на вертикальном тубусе. Адаптер фотокамеры и T-адаптер (см. пояснение ниже) добавляют около 4 дюймов к длине вертикального тубуса; кроме того, к этой величине следует! добавить толщину фотокамеры. Вы должны выбрать оптимальный угол наблюдения через видоискатель камеры.

Установка фотокамеры с адаптером на один из окуляров бинокулярной насадки обеспечивает один угол наблюдения на изображение препарата и позволяет оператору сидеть более удобно. Мнение автора таково, что если оператору удобно работать за микроскопом, то ему легче будет! фокусировать изображение, изменять его контраст и ориентироваться в препарате.

Посмотрим, какие выпускаются адаптеры и T-адаптеры. T-адаптер имеет с одного конца резьбу, соответствующую резьбе объектива фотокамеры с другого конца T-mount — резьбу для присоединения к адаптеру микро скопа. Ниже приведен список различных адаптеров одного производителя.

T1PC Praktica, Pentax (old), Yashica J, Mamiya TL

T2 EX Mamiya Sekor, Exakta, Topcon

T3M1 Miranda

T4MSRMinolta

T5N1 Nikon

T6CF Canon

T10-A Penta S, V3, V6, Frex 7, FT, F2, V6EE

T1 1-B Penta B, V2, Mamiya CP

T-13 Conica Autorex

T-14 Leica-Flex

T-15 Olympus OM1

T-16 Pentax K, all K bayonet mount

T-17 Leica M1, M2, M3

T-18 Yashica FC, Contax RTS

T-19 16 mm Movie Camera

Адаптер микроскопа имеет резьбу T-mount для ввёртывания его в T-адаптер, который, в свою очередь, присоединяется к корпусу фотоаппарата. Обычно этот адаптер имеет определённую фиксированную длину и легко присоединяется к тубусу микроскопа с окуляром. Однако, по крайней мере, две фирмы выпускают эти адаптеры с изменяющейся длиной, и на то есть свои причины.

Адаптер с фиксированной длиной имеет фактор собственного увеличения обычно от 0,3х до 0,4х. Предположим, мы послали издателю фотографию с 35-миллиметровой фотокамеры.

Предположим также, что при фотографировании нами использовался микрообъектив 40х, окуляр 10х и что фактор собственного увеличения адаптера равен 0,5. В итоге, мы имеем увеличение микроскопа 400х; с учётом фактора собственного увеличения насадки общее увеличение на матрице равно 200х. Издатель смотрит на фотографию размером 28 x 35 мм и предлагает увеличить его в 2 раза по длине и в 2 раза по ширине, то есть дать дополнительное увеличение 4х, доведя общее увеличение до 800х.

Ранее мы отмечали, что полезное увеличение микроскопа при использовании объектива 40х с апертурой 0,65 и окуляра 10х не должно превышать 650х. Более высокое увеличение не даст новых деталей в изображении, а его качество между тем ухудшится. Это и есть указанный выше случай увеличения изображения до 800х. Но вина за произошедшее не на человеке, получившем микрофотографию, а на издателе.

Снова возьмём ахроматический объектив 40х, окуляр 10х и адаптер с фактором собственного увеличения 0,4х. Тогда увеличение при микрофотографировании будет равно $40 \times 10 \times 0,4 = 160\text{х}$. Если издатель даст дополнительное увеличение 4х, то общее увеличение достигнет 640х, что находится в пределах полезного увеличения микроскопа.

Изменение длины адаптера позволяет получить необходимое (близкое к оптимальному) увеличение фотоснимка или захватить в снимке необходимое поле зрения микроскопа. Кроме того, появляется возможность путём изменения расстояния между адаптером и T-адаптером (в пределах 10 мм) увеличить расстояние от окуляра до фотопленки и получить дополнительное увеличение фотонасадки.

Известная проблема фотографии — вибрация. При её обнаружении можно передвинуть микроскоп к стене, прикрепить к станине или опустить на пол. Можно также поставить микроскоп на свободный от вибрации стол, стенд или резиновые, пробковые или пневматические амортизаторы. Главное, избавиться от вибрации, которая больше всего заметна при работе с иммерсионным объективом 100х.

Нужно сказать ещё пару слов о микрофотографировании с зеркальными фотоаппаратами, перед тем как мы перейдём к рассмотрению явления невзаимозаместимости и цветных светофильтров.

В видоискателе зеркальной камеры находится пентапризма или маленький круг, разделённый пополам: одна половина чёрная, другая — прозрачная. При небольшом движении вашей головы любая из сторон становится прозрачной. Поэтому фокусировку на клетке или детали препарата лучше настраивать в прозрачной части, при этом остальная область препарата будет видна вокруг центрального кружка. В последнюю очередь, когда все уже отлично настроено — положение препарата, и фокусировка, и контраст, — ещё немного прикройте ирисовую апертурную диафрагму.

Человеческий глаз — изумительная конструкция, которая обладает исключительными компенсаторными возможностями. Однако на плёнке изображение не будет скомпенсировано, поэтому для получения хорошей фотографии нужно все точно настроить.

Явление невзаимозаместимости

Явление невзаимозаместимости заключается в том, что светочувствительность фотографических материалов при длительных выдержках оказывается ниже их светочувствительности при нормальных (коротких) выдержках — порядка 0,5—3 секунды. Поправка на этот эффект вносится исследователем в прибор для автоматического определения выдержек при микрофотографировании; в случае отсутствия такого прибора используйте метод проб и ошибок и регулируйте выдержку сами.

В этом же разделе рассмотрим искажения в цвете изображения, возникающие из-за не соответствия чувствительности цветовой температуре источника света. В экстремальном случае красный и синий цвета препарата, окрашенного гематоксилин-эозином, превратятся в жёлтый цвет; при этом детали будут хорошо различимы.

Предположим, мы используем лампу накаливания. Цветовая температура этой лампы составляет примерно 3200 °К (по Кельвину). Спектральная чувствительность матрицы для работы с лампой накаливания может быть рассчитана на температуру 3400 °К. Тонкий синий светофильтр повышает цветовую температуру на 200°, поэтому фотографии, получаемые при окрашивании образца гематоксилин-эозином и использовании синего светофильтра, всегда оказываются чёткими и правильно передают цвета изображения.

Светофильтры

Как уже упоминалось, синий фильтр повышает цветовую температуру, жёлтый — снижает её. Компания Kodak издала очень хорошую книгу, посвященную роли светофильтров в микрофотографии.

В фазовоконтрастной микроскопии для улучшения контраста обычно применяется зелёный светофильтр — действительно эффективное решение. Однако в последнее время в литературе стали появляться указания на использование других светофильтров для метода фазового контраста.

Светофильтр, изготовленный из специального диодимового стекла (бледно красного цвета), улучшает изображение препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином.

В общем, экспериментируйте, если вам позволяет время. И не забывайте документировать все ваши действия, тогда при получении после обработки отпечатков и диапозитивов вы сможете посмотреть в ваши записи и проанализировать, что вы сделали и что работает наилучшим образом.

Светочувствительность фотоматериалов

Светочувствительность фотоматериала следует выбирать, исходя из освещённости изображения.

Обычно чем ниже светочувствительность, тем лучше можно разрешить детали препарата. В то же время чем меньше светочувствительность, тем выше вероятность попасть в большие выдержки, при которых будет действовать явление невзаимозаменяемости, способное привести к искажению цветности изображения. Отметим, впрочем, что явление невзаимозаменяемости для чёрно-белых фотоматериалов не так опасно; его следует учитывать только при определении оптимальной выдержки.

Цветовая температура источника света зависит от напряжения питания, На лампу, рассчитанную на 6 В, можно давать напряжение 5,5 В; на лампу, рассчитанную на 12 В, можно давать 11 В. Если напряжение превышает допустима, цветовая температура источника света изменяется сильнее и цвет деталей изображения на фотографии искажается.

Итак, следует устанавливать номинальное напряжение источника света; в случае необходимости можно снижать интенсивность света, попадающего в фотокамеру с помощью светофильтров с нейтральной оптической плотностью. Совершенно типичная ситуация, когда на барабане со светофильтрами находится до 4 светофильтров разной плотности, которые используются по мере необходимости.

Для уменьшения освещённости нельзя приманить ирисовые полевою или апертурную диафрагмы: каждая из них выполняет свои функции, но контроль освещённости в них не входит.

Перед тем как нажать на спусковой тросик фотоаппарата, сложите ваши руки в виде чашки над видоискателем. Это не позволит свету, падающему сверху и сбоку, попадать в видоискатель и на светочувствительный элемент, что влияет на время оптимальной экспозиции.

Стереоскопические микроскопы (стереомикроскопы)

Когда говорят о бинокулярных микроскопах, часто имеют в виду стереомикроскопы. Препаровальный микроскоп — это всегда стереомикроскоп.

Обычные микроскопы могут быть монокулярными, бинокулярными или тринокулярными, стереомикроскопы — только тринокулярными или бинокулярными.

Особенностью схемы стереомикроскопов является наличие двух оптических путей рассмотрения препарата, каждого под углом от 16° до 18° к вертикали.

Существует три типа стереомикроскопов:

Микроскоп с парными объективами, в которых для наблюдения служат две самостоятельные оптические системы, то есть парные объективы и бинокулярный тубус с оборачивающими призмами и двумя окулярами.

Микроскоп типа «Цитопласт» с одним объективом, работающим одновременно на оба тубуса. За объективом установлены парные линзовые системы для изменения увеличения.

Микроскоп с панкратической системой плавного изменения увеличения, то есть с системой Zoom.

Микроскопы первого и второго типов имеют определённые фиксированные значения увеличений; микроскопы третьего типа делают возможным дополнительное плавное изменение увеличений в интервалах, которые обеспечиваются системой Zoom.

Какие микроскопы лучше — со ступенчатым или плавным изменением увеличения? Это зависит от того, что вы собираетесь делать.

Микроскопы Zoom позволяют выбрать любое увеличение на всем установленном диапазоне, поэтому вы можете настроить самое подходящее для данного препарата увеличение (как правило, не самое высокое).

Может оказаться, что лучшее увеличение находится между доступными значениями у микроскопов категории 1 или 2. Однако при наличии нескольких ступеней увеличения каждый тип микроскопа можно приспособить для определённой задачи. Например, неплохо проводить препарирование лягушки при увеличении 10x или 15x, а для работы с мышцами и сухожилиями использовать увеличение 20x или 30x.

Вы привыкнете к манипуляциям со скальпелем и другими инструментами при определённом увеличении.

Стереомикроскоп даёт прямое изображение. Это означает, что когда вы перемещаете скальпель слева направо на изображении, которое вы видите в микроскоп, инструмент тоже движется слева направо.

Рутинные стереомикроскопы дают увеличение примерно до 100х, исследовательские — до 200х или 250х. Чтобы получить такое увеличение,

Рис. 19. Стереомикроскоп ZOOM с цифровой камерой



можно использовать окуляры (5x, 10x, 15x, 20x, 25x), а также сменные пары линз, понижающие (0,3x, 0,5x, 0,75x) или повышающие (1,5x и 2X) увеличение микроскопа.

Смена окуляров не влияет на рабочее расстояние: обычно 4", или 100 мм, при работе с окулярами 10x без вспомогательных линз. Линзы, понижающие увеличение, увеличивают рабочее расстояние до 12", а повышающие — уменьшают его до 25 мм, или 1". Большинство микроскопов первого типа и всех микроскопы второго и третьего вида имеют указанные дополнительные линзы; кроме того, все микроскопы можно использовать с разными окулярами.

Самая распространённая и недорогая модель стереомикроскопа имеет 2 пары объективов (1x и 2x, или 1x и 3x, или 1x и 4x), расположенных во вращаемом барабане. Стереомикроскоп закреплён на штативе, в котором обеспечены 4 варианта освещения: проходящий свет, косой отражённый свет, оба света включены или оба выключены. Применяется обычно в бактериологии для исследования колоний бактерий на агаре в чашках Петри и для обучения начинающих биологов.

Микроскопы второго типа имеют универсальное наименование "Cycloptic", хотя на самом деле это название определённой модели микроскопа фирмы Reichert (ранее American Optical). Их в основном используют в качестве медицинских операционных микроскопов с понижающими увеличение линзами для получения рабочего расстояния 10-12". Такое расстояние оставляет достаточно места для работы скальпелем и другими инструментами, при этом можно выбрать оптимальное увеличение для выполнения определённой задачи. Операционный микроскоп обычно имеет выход для второго наблюдателя; либо специальный тубус сбоку, либо второй бинокляр напротив хирурга. У таких микроскопов также есть выход для фотографии или телевизионной камеры для записи операции в целях последующего обучения или анализа.

Микроскопы третьего типа с плавным изменением увеличения Zoom позволяют выбрать любое увеличение на всем обеспеченном диапазоне. Обычный диапазон 0,7-3x при использовании окуляров 10x даёт увеличения 7-30x; для окуляров 20x — 14-60x; с дополнительной линзой с увеличением 2x обеспечивается увеличение 28-120x.

Все биноклярные насадки с одним фиксированным тубусом и одним фокусирующим настраиваются одинаково, вне зависимости от того, на какой

микроскоп они установлены. Сначала нужно настроить изображение препарата при помощи винтов фокусировки, глядя в фиксированный тубус, а затем отрегулировать настройку фокусирующего тубуса.

У стереомикроскопов Zoom обычно два фокусирующих тубуса. Это необходимо для того, чтобы препарат оставался в фокусе на всем диапазоне увеличения. Процедура настройки такого микроскопа следующая: (1) установите окуляры в самое короткое положение; (2) с помощью Zoom выберите самое большое увеличение; (3) настройте изображение препарата при помощи винтов фокусировки; (4) настройте Zoom на самое низкое увеличение; (5) настройте фокусировку на тубусах микроскопа. При правильном выполнении шага 3 препарат будет оставаться в фокусе во всем диапазоне увеличений.

Если вы используете стереомикроскоп, то вы уже заметили, что тубусы с окулярами в нем сходятся. Ранее утверждалось, что параллельные тубусы меньше утомляют глаза при долговременной работе, но это не так при работе со стереомикроскопом. И ни один производитель не выпускает микроскопы с параллельными окулярными трубками.

Кроме того, никто не производит тринокуляр с тремя оптическими путями для фотографии. Для фотографирования используется только один тубус с окуляром; световые лучи на фотографию направляются с помощью переключающейся призмы. Производители оборудуют для фотографии, как правило, только лучшую (и самую дорогую) модель. У V&L (американская фирма Baush and Lomb) это модель Stereo Zoom 7 с плавным изменением увеличения 1 -7x; у Reichert — Model 580 T-Body с плавным изменением увеличения 1~6x и микроскоп "Cycloptic". На Stereo Zoom 7 и Model 580 можно установить вертикальный осветитель, который направляет свет вертикально вниз между двумя оптическими путями. Но это исключает возможность его использования для фотографии.

Вернёмся к освещению. Самый распространённый вариант — уже упомянутый, с 4 видами освещения. Для этого используются лампы низкого напряжения, встроенный трансформатор, реостат и переключатель света между осветителем проходящего света и наклонным осветителем отражённого света. Часто встречается также осветитель "Nicholas" или "Nicklas" — устройство низкого напряжения с трансформатором, предварительно настроенной лампой и складным держателем. Его можно установить в определённый держатель на штативе микроскопа, получив

наклонный осветитель отражённого света: можно установить при помощи складного держателя на трансформаторе для получения освещения под любым углом: или вставить в порт основания микроскопа для получения проходящего света, чтобы направлять свет на зеркало для отражения на препарат.

У зеркала есть плоская сторона для освещения большой площади объекта и вогнутая — фокусирующая свет на меньшей области для работы с более высоким увеличением. Любопытное отступление. Производители решили, что они усовершенствовали микроскоп, перейдя от применения зеркал к встроенным осветителям проходящего света. Когда лампа находится прямо под стеклянной пластинкой стереомикроскопа (на которую помещается объект), то в ход лучей необходимо поместить матовое стекло для рассеивания света. В учебной биологии и клинической бактериологии это не вызывает проблем, однако агрономы, разыскивающие нематоды в препарате, не могли их увидеть. Поэтому для них производители вернули ли основание проходящего света с осветителем Nicklas, свет от которого направляется на зеркало с размещенной над ним прозрачной стеклянной пластинкой. С таким осветителем агрономы снова увидели под микроскопом свои объекты.

Кольцевые флуоресцентные осветители дают бестеневое освещение, которое отлично подходит для исследования металлов, керамики, плат, но не для цветов, растений и живых препаратов. Иногда эти осветители не обеспечивают достаточно яркого освещения, поэтому были предложены кольцевые осветители с подключением к галогеновой лампе 150 Вт через волоконно-оптический кабель.

По мере того как возрастала потребность во все более ярком освещении для работы с большими увеличениями, понадобился находящийся на расстоянии от микроскопа источник света для предотвращения перегрева препарата. При этом для передачи света от такого мощного источника на препарат стали использовать волоконно-оптические кабели.

Волоконно-оптические осветители используют гибкие световоды — один или два — для обеспечения оптимального освещения объектов в стереомикроскопе с целью увеличения объёмности трёхмерного изображения препарата.

Таким образом, выбор вариантов освещения препарата весьма широк.

Существует большое разнообразие штативов для крепления стереомикроскопа с окулярами и вспомогательными линзами: от простого штатива с винтами

фокусировки и без осветителя до штатива со встроенными осветителями; с широким плоским мощным основанием для установки телевизионных фотокамер; с длинной стрелой, у которого предметным столиком служит лабораторный стол; с поворачиваемой стрелой для поворота головки стереомикроскопа и фокусировки на поверхность с большой площадью, где расположены платы интегральных схем, кювета с подшипниками и т. д. Таким образом, исследователь может купить необходимую ему модель стереомикроскопа у того или иного производителя.

Штатив операционного микроскопа самый сложный. Он установлен на мощном основании, имеет ножные педали для фокусировки и регулировки интенсивности освещения, складную стрелу с противовесом и т. д. Хирург может приближать или отодвигать микроскоп, а также наклонять оптическую головку стереомикроскопа одной рукой. Она остаётся ровно в том положении, в которое он её устанавливает.

Если использовать термин, применённый нами при рассмотрении сложного микроскопа, то в стереомикроскопии мы также имеем дело с фактом горизонтального смещения изображения объекта при его фокусировке, фотографировании или измерении.

Горизонтальное смещение изображения

Поскольку каждый объектив или пара объективов находятся под углом 16-18° к вертикальной оси, горизонтальное смещение изображения неизбежно, когда вы смотрите в микроскоп одним глазом. Проблема возникает, если поля зрения неодинаковы для обоих окуляров. Тогда появляется смещение при наблюдении в оба окуляра.

Самый лёгкий способ проверить поле зрения — воспользоваться линейкой. Посмотрите в окуляр одним глазом, поставьте отметку на левом краю поля. Затем посмотрите в окуляр другим глазом, чтобы проверить, осталась ли отметка на левом краю поля зрения. Если поля зрения одинаковые или отличаются не более чем на 5 %, то глаз совместит изображения и смещения не будет.

Однако уставшие глаза могут не компенсировать разницу в изображениях. Для устранения проблемы работайте со стереомикроскопом утром или обратитесь в сервисный центр для настройки прибора.

Иногда изображения разных полей зрения смещены не только по горизонтали, но и по вертикали. У автора астигматизм, о чем он узнал именно при обслуживании стереомикроскопа. Теперь я всегда надеваю очки и использую окуляры с

вынесенным фокусом 24 мм, для того чтобы видеть все поле и совмещать изображения, если они не слишком отличаются.

Измерение

В плоскости шкалы окуляра из-за разного наклона лучей, проходящих через объектив на препарат видна более широкая часть поля в направлении восток - запад, чем в направлении север - юг. Разница может быть очень незначительной и поэтому совершенно незаметной.

Лучший способ увидеть это — переместить препарат на предметном столике до перекрестия в окуляре и измерить по шкале величину перемещения столика. Достаточно одной калибровки на все увеличения, поскольку мы перемещаем препарат на одно и то же расстояние, вне зависимости от увеличения.

Фотография

Основные сложности в фотографии связаны с глубиной резкости и наклоном оптического пути. Последний эффект приводит к тому, что препарат выглядит слегка наклонным. Глаза компенсируют это, и пользователь видит препарат плоским. Однако на плёнке препарат остаётся наклонным и некомпенсированным.

Поскольку увеличение стереомикроскопа относительно небольшое, глубина резкости значительна. Иногда можно провести двойное экспонирование одного и того же участка объекта: один кадр снять при фокусировке на верхнюю поверхность объекта с экспозицией несколько меньше 0,5 времени экспонирования; второй кадр — при фокусировке на более низко расположенную плоскость с оставшейся экспозицией. Тем самым можно ещё больше увеличить глубину фотографируемого препарата.

Некоторые 35-миллиметровые зеркальные фотокамеры позволяют использовать многократную экспозицию — закрывать и открывать затвор несколько раз, не продвигая плёнку. Понятно, что кроме автоматического режима у камеры должна иметься возможность выбора скорости срабатывания затвора.

Иногда настройка освещения препарата помогает улучшить изображение на фотографии.

Метод проб и ошибок лучше всего подходит для получения хороших фотографий при помощи определённого стереомикроскопа.

Обслуживание микроскопа

Очень важно сохранять микроскоп в чистоте. Всегда закрывайте прибор чехлом, когда он не используется и каждый день проводите его лёгкую чистку: удаляйте грязь и пыль с помощью груши или салфеток, очищайте объективы от иммерсионного масла, если вы отходите от микроскопа более чем на 10 минут, и обязательно — после завершения работы с микроскопом.

Обращайтесь с прибором осторожно. Ничего не делайте с силой. Микроскоп — точный прибор, изготовленный, как правило, из качественных материалов.

Применение силы при настройке прибора может потребоваться в следующих случаях:

1. Фокусировка конденсора. Обычно вы устанавливаете оптимальное положение конденсора и крайне редко его меняете. Для того чтобы ослабить или закрепить положение конденсора в держателе, поверните рукоятку с винтом или непосредственно сам винт.

2. Предметный столик. Обычно перемещение столика в направлении север - юг требует больших усилий, чем в направлении восток - запад. Мы просматриваем препарат по всей длине, затем немного передвигаем его по направлению север - юг и снова просматриваем по всей длине и т. д.

3. Фокусировка препарата. Перемещение предметного столика может быть затруднено в случае больших размеров и веса последнего.

Иногда возникает ситуация, когда препарат при наблюдении с помощью иммерсионного объектива выходит из фокуса и приходится подстраивать постоянно фокусировку. Если предметный столик тяжёлый или фокусировка требует усилий, то должна быть причина. Или вы можете попробовать использовать масло типа Б вместо масла А: густое масло сильнее давит на пружинящую оправу иммерсионного объектива.

Устранить эту проблему очень просто. Нанесите масло на препарат. Глядя на предметное стекло и объектив, поднимите очень осторожно с помощью предметного столика стекло до объектива так, чтобы сработала пружинящая оправа объектива. Медленно опускайте препарат на предметном столике до тех пор, пока пружинящая оправа не перестанет действовать. Положите палец на предметный столик и нажмите

на него, но не слишком сильно. Посмотрите в окуляры и настройте изображение препарата так, чтобы оно находилось в фокусе. Одновременно отпустите винт фокусировки и уберите палец со столика. Посмотрите на изображение препарата. Если оно выйдет из фокуса, то микроскоп требует обслуживания. Если нет, проверьте иммерсионное масло, подходит ли оно для работы.

Если вы используете правильный вид масла, проверьте пружинящую оправу объектива — она может застревать.

Некоторые компании предоставляют для работы с микроскопами кедровое масло. Если вы увидите кедровое масло, отдайте его врагу или выбросьте: оно слишком густое. Однако для конденсоров это масло вполне подходит.

Растворы для чистки оптики. Спиртовые растворы не оставляют плёнки после протирки оптических деталей; растворы на основе бензина хотя и пригодны, но могут оставлять плёнку, которую потом нужно удалять. Зачем проводить чистку дважды? Ксилол или ксилен — растворы на основе бензина, они отличаются слишком резким запахом, что неудобно для нормальной работы. Используйте их, только если не удаётся убрать грязь обычным чистящим средством. Я предпочитаю для чистки оптики спиртовые растворы — этанол, метанол и даже изопропил. Растворы нужно наносить только на салфетку, но ни в коем случае не прямо на линзы.

При чистке больших линз протрите их кончиком пальца салфеткой с соответствующим раствором. Фронтальные линзы микрообъективов можно чистить при помощи двух специальных палочек, заострённых до кончика с квадратным сечением (не до полного острия). Для этого возьмите салфетку, сложите ее по направлению к себе, затем сложите еще раз. Вставьте плоский конец палочки в сложенную в 4 раза салфетку и оберните салфетку вокруг палочки. Загните кончик салфетки, чтобы он прилип к остальной части, обёрнутой вокруг палочки. Прodelайте то же самое со второй палочкой. Нанесите одну или две капли раствора на одну из палочек. Когда мокрая палочка станет грязной, снимите с неё отработанную салфетку, заверните в новую (сухую) и используйте для протирания (удаления следов раствора) линзы. Ту палочку, которая раньше была сухой, теперь можно использовать для нанесения на линзу растворителя. Острый конец позволит вам попасть концом палочки в углубление на краю линзы рядом с металлической оправой объектива. Заметьте, фронтальные линзы объективов всегда защищены металлической оболочкой, чтобы

они не поцарапались при контакте с покровным стеклом, если вы пройдёте плоскость фокусировки и поднимите предметный столик слишком высоко.

Другой предмет, необходимый для чистки оптики, — это груша, резиновый мячик с острым кончиком и клапаном. Входной клапан находится напротив кончика — воздух проходит через клапан. Когда грушу сжимают, клапан закрывается и воздух может выйти только через кончик. У груши без клапана воздух входит и выходит через кончик, распространяя грязь и пыль. Любой магазин фототехники продаёт подобные недорогие груши, иногда также со щёткой на наконечнике, которая на самом деле не нужна.

Пластмассовые палочки с ватными тампонами лучше использовать не часто, поскольку они действуют жестче, чем требуется. Как и в случае с ксилолом, используйте их только для удаления въевшейся грязи или высохшего масла, когда чистка спиртом не даёт результатов.

Все указанные выше материалы предназначены для повседневной чистки оптики. Они к тому же показывают, нуждается ли микроскоп в техническом обслуживании.

Обслуживание микроскопа в специальных мастерских необходимо проводить каждые 2 или 3 года. При усиленной эксплуатации или постоянных транспортировках из лаборатории в лабораторию — чаще.

Кроме обычной чистки, описанной выше, есть ещё одна процедура, которую можно проводить каждую неделю, чтобы отсрочить необходимость технического обслуживания. Утром в понедельник перед работой с микроскопом поверните барабан грубой фокусировки до конца в одну и другую сторону по 5 раз. Затем те же действия выполните с для барабаном точной фокусировки и механическим столиком (переместите его в каждом направлении туда и обратно 5 раз).

Эта процедура помогает распределить смазку. Дело в том, что механический столик чаще перемещают в направлениях восток — запад и север — юг, и к тому же не до самого конца. Винты грубой и точной фокусировки при работе обычно поворачивают совсем немного, так что смазка сгущается на каждом конце и постепенно застывает. Поэтому рано или поздно тот или иной винт перестанет двигаться.

При правильном обслуживании микроскоп обычно полностью разбирают. Это позволяет удалить старую смазку, нанести новую и настроить подвижные

компоненты, а также найти детали механизма фокусировки, которые требуют ремонта или даже замены.

Технический персонал при обслуживании разбирает окуляры и конденсоры для чистки каждой линзы с двух сторон. Объективы обычно не разбирают, кроме как после возврата поставщику или производителю для ремонта или замены.

Автоматизация микроскопических исследований

В данном разделе рассмотрим новейшие решения и изменения в самом подходе к процедуре микроскопических исследований.

Бурное развитие полупроводниковых и компьютерных технологий во всех областях в последнее время дало также мощный толчок автоматизации микроскопических исследований. Раньше все процедуры подготовки и исследования микроскопического препарата выполнялись вручную, что при большом количестве препаратов превращалось в рутинную и утомительную работу, с трудно воспроизводимыми условиями и, соответственно, плохой стандартизацией.

Современным решением этих проблем явилось создание моторизованных вариантов основных блоков микроскопа: во-первых, предметных столиков, которые обеспечивают перемещение исследуемого препарата в горизонтальной плоскости; во-вторых, автоматизированного фокусирующего механизма — устройства для вращения микровинта — для настройки фокуса. Эти блоки могут управляться с помощью специальных программ и, если необходимо, в автоматическом режиме, без непосредственного участия оператора. Также возможно ручное управление с помощью манипулятора, который обычно выполняется в виде джойстика или трекбола.

В некоторых наиболее сложных и дорогих моделях исследовательских микроскопов моторизованы практически все механизмы — от револьвера объективов до настройки яркости.

Сегодня существует много различных модификаций моторизованных столиков: для прямых и инвертированных микроскопов, для биологических и промышленных микроскопов, для стереомикроскопов и т. д.

Моторизованные предметные столики для микроскопии бывают двух- и трёхуровневые (рис. 22, 23), состоящие соответственно из двух или трёх пластин. Каждая пластина перемещается в горизонтальной плоскости по оси X или Y (более детально различия между двух- и трёхуровневыми столиками будут рассмотрены ниже). Перемещение пластин осуществляется с помощью отдельного шагового двигателя. Шаговые двигатели питаются и управляются контроллерами — электронными устройствами, производимыми как в виде отдельных настольных

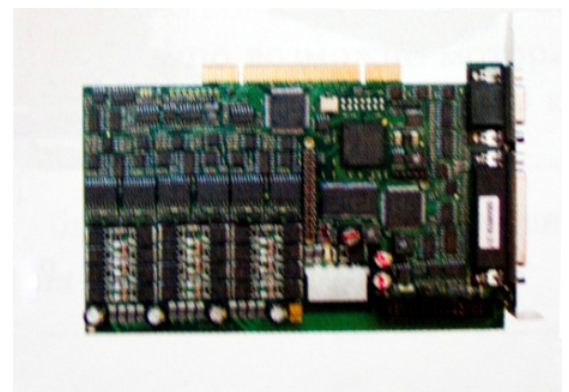
блоков, так и в виде компьютерных PCI-плат, устанавливаемых внутрь корпуса компьютера. Контроллеры являются необходимым связующим звеном между программой и «железом», обеспечивают точность и правильность перемещения препарата, размещённого на столике, и настройку на фокус.

Настольные контроллеры (рис. 20) имеют встроенный блок питания, подключаются к сети 220 В, и обеспечивают питание шаговых двигателей моторизованных столиков и блока фокусировки 48 В, что позволяет использовать максимальные скорости перемещения столика (до 12 см/с) и винта фокусировки. Контроллеры, выполненные в виде PCI- платы (рис. 21), не имеют своего блока питания, питание поступает с блока питания компьютера, куда вставлена эта PCI-плата. Напряжение питания шаговых двигателей при этом составляет 12 В, что делает максимальные скорости недоступными, для обеспечения более быстрой работы шаговых двигателей в таком случае приходится использовать внешний блок питания с повышенным напряжением — от 24 до 48 В в зависимости от требований к скорости перемещения. Но это необходимо не всем пользователям и рекомендуется прежде всего для столиков с большим диапазоном перемещения, например для моторизованного столика инвертированного микроскопа, и для блока фокусировки исследовательского стереомикроскопа RZ. Внешние контроллеры обеспечивают более высокие скорости перемещения, однако при этом имеют ряд недостатков по сравнению с контроллерами выполненными в виде PCI-платы: они более дорогие и занимают дополнительное пространство на рабочем столе.

Рис. 20. Настольный контроллер



Рис. 21. РСП-плата



Двухуровневые столы состоят из двух пластин: одна крепится к штативу микроскопа и неподвижна, другая перемещается по оси Y. Перемещение по оси X осуществляется за счёт движения препаратодержателя, при этом препарат скользит по поверхности столика. Поэтому двухуровневые столики в основном используются для работы с небольшими и лёгкими препаратами (обычно это стандартный стеклянный слайд). Для обеспечения гладкости и устойчивости к царапинам поверхность столика покрывается композитными материалами.

Трёхуровневые столики состоят соответственно из трех пластин: одна закреплена неподвижно на штативе микроскопа, две другие могут перемещаться в горизонтальной плоскости независимо, каждая по своей оси X и Y. При этом препарат перемещается вместе с верхней пластиной, что позволяет работать с более крупными и массивными препаратами, чем обычный микроскопический слайд, например с микролуночным планшетом, чашкой Петри, «матрасом» для выращивания культур клеток, куском горной породы, металлическим препаратом и т. п.

Моторизованные предметные столики обеспечивают быстроту и точность перемещения препарата, недостижимые при ручном перемещении.

Рис. 22. Двухуровневый моторизованный столик



Рис. 23. Трёхуровневый моторизованный столик



Например, столики, которыми комплектуются микроскопы Meiji Techno Co. Ltd., перемещают препарат со скоростью до 12 см/с, с точностью 3-5 мкм, разрешением 0,05-0,1 мкм и отклонением от прямой линии не более 20*.

Для полной автоматизации процесса микроскопирования кроме моторизованного столика необходима также автоматическая настройка фокуса, то есть перемещение столика по вертикальной оси (ось Z). На рис. 24 представлен такой фокусирующий механизм — устройство для вращения микровинта. Удобство конструкции этого механизма заключается в том, что его можно установить прямо поверх микровинта обычного прямого микроскопа Meiji, не внося никаких изменений в конструкцию последнего тем самым не нарушая условий гарантии производителя.

Управление настройкой фокуса осуществляется специальной программой, которая использует различные алгоритмы оценки фокуса, в зависимости от типа исследуемого образца.

Прежде чем перейти к рассмотрению программного обеспечения для микроскопии в целом и для моторизации в частности хотелось бы отметить ряд ключевых моментов, характерных для моторизации:

- Моторизованный микроскоп превращает повседневную рутинную работу в стандартизированный и увлекательный процесс.
- Моторизованный микроскоп может управляться как с помощью специального программного обеспечения, так и ручными манипуляторами.
- В случае использования микроскопов Meiji Techno возможно моторизовать уже имеющийся в наличии микроскоп без вмешательства в его конструкцию, с сохранением всех условий гарантии.
- Моторизация может быть проведена в ближайшем сервисном центре без необходимости отправки оборудования на завод-изготовитель.

Рис. 24. Фокусирующий механизм



Программное обеспечение для микроскопии

Развитие цифровых технологий открывает новые возможности работы с изображениями, полученными с помощью микроскопа. Уже само по себе использование цифровых камер и простейшего программного обеспечения позволяет осуществлять обмен данными микроскопических исследований, организовать хранение полученных изображений, обеспечить их объективную оценку.

До недавнего времени результатом микроскопического исследования как правило, становилось субъективное заключение специалиста. При проведении УЗИ-диагностики или кардиологического исследования всегда остаётся документ — снимок УЗИ или распечатка кардиограммы. Получение документа в микроскопии до сих пор остается проблемой во многих лабораториях. Единственный способ разрешения этой проблемы — использование камер, и здесь компания Vision (Австрия) предоставляют полный перечень камер и программное обеспечение под различные задачи.

Не менее актуальная в современной микроскопии задача стандартизации процедуры исследования и обработки полученных изображений, определения диагностически значимых критериев, снижения зависимости конечного результата от субъективных факторов.

Использование программного обеспечения позволяет в значительной мере решить описанные выше проблемы.

Программное обеспечение для работы с микроскопами можно условно разделить на несколько типов:

- ПО для документации, например Scopelimage Plus, входящее в комплект поставки камер Vision CAM V200, CAM V400;
- универсальное ПО, предназначенное для решения широкого круга задач: Vision Bio — для медицины и биологии, Vision Material — для материаловедения.
- узкоспециализированное ПО для решения определенных задач — KaryoFISH — хромосомный и FISH-анализ, программы для исследования семенной жидкости.
- ПО для работы с моторизованными микроскопами — Vision Slide, Vision Hema, Vision Morho, Vision Epi, SwichBoard.

Более чёткое к систематизированное представление о программном обеспечении, его возможностях и функциях дано в таблице ниже.

Группа ПО	ПО	Краткая характеристика
Для документации	Scopelimage Plus	Поставляется в комплекте с камерой, предназначено в первую очередь для документального подтверждения результатов исследований. Поддерживает ограниченное число камер, обладает минимальными функциями обработки изображений. Позволяет делать фотографии и записывать видео, просматривать живое изображение на экране монитора
Универсальное	Vision Bio, Vision Material	Поддерживает все те же возможности, что и Scopelimage Plus. Большой потенциал в обработке полученных изображений. Имеет встроенные методики подсчёта, измерения и классификации объектов, позволяет создавать автоматические отчёты. Все операции проводятся со статическим изображением, обработка видео невозможна. Поддерживает широкий спектр камер
Специальное	KaryoFISH	Предназначено для определения кариотипа и FISH- анализа. Обладает набором специфичных функций только для данного применения, имеет специальные требования к системе ввода (микроскоп + камера). Располагает встроенной базой данных для хранения информации о пациентах и результатов исследования. Может использоваться для создания отчётов о других исследованиях, но без возможности обработки полученного изображения
	Анализ спермы	Предназначено для анализа семенной жидкости. Требовательно к системе ввода (микроскоп + камера). Поддерживает анализ видео — только согласно методике исследования спермы. Более широкое применение не представляется возможным, из-за высокой специфичности методики
Для работы с моторизацией	SwichBoard	Простое управление моторизованным столом, сканирование образов, запоминание местоположения интересующих объектов. Без поддержки управления автофокусом, без поддержки камер. Не имеет базы данных для сохранения информации об исследовании
	Vision Slide	Сложная программа, с поддержкой камер, моторизованных столиков и автофокуса. Предназначена для формирования цифровых копий препарата. Имеет встроенную базу данных.
	Vision Epi, Vision Morho	Vision Morho предназначено для работы с объектами, полученными на микроскопах проходящего света, в тёмном поле или с использованием фазового контраста. Vision Epi дополнительно поддерживает работу с изображениями, полученными на флуоресцентных микроскопах.
	Vision Hema	Специализированная программа для автоматизации анализа мазков крови. Имеет встроенный алгоритм сортировки клеток, построения кривых и расчёта других значимых показателей

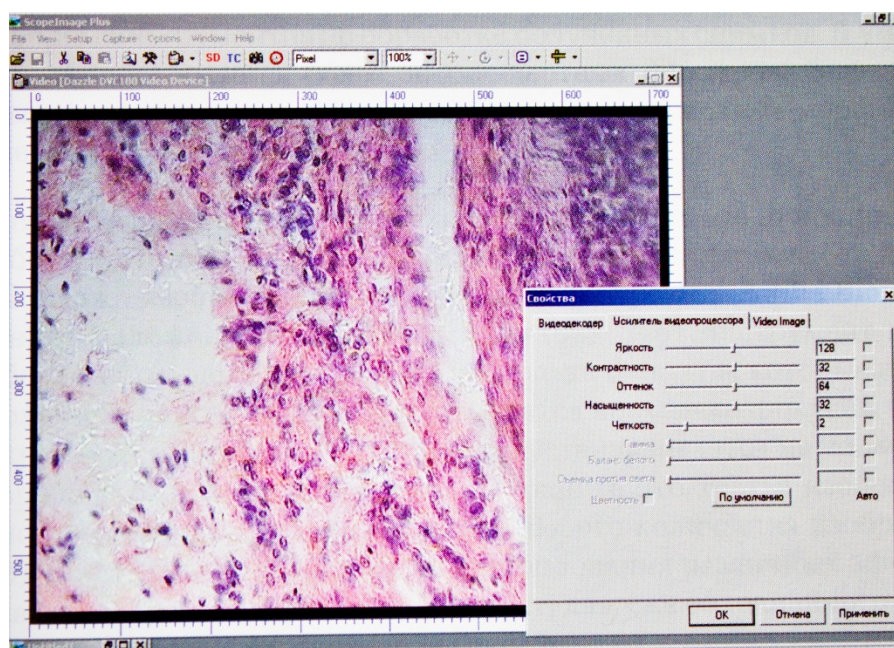
Перед тем как двигаться дальше, хочется ещё раз отметить, что деление на типы весьма условно, поскольку внутри каждого типа можно так же выделить программы, обладающие своими особенностями. Далее мы более детально рассмотрим все представленные ПО.

Программное обеспечение для документации

Программное обеспечение входящее в комплект с цифровой камерой, например ScorpImage Plus (входит в комплект поставки цифровых камер САМ V200, САМ V400, Vision, Австрия), позволяет делать снимки и записывать видео.

Для изображения доступны простейшие операции, такие как регулировка яркости, контрастности, цветовой насыщенности. Полученные снимки и видеоролики могут быть сохранены в виде файлов различных форматов, поддерживаемых большинством программ. Сохранённые файлы могут быть переданы по электронной почте, что открывает возможности обмена данными для удалённых консультаций. Распечатанные снимки могут быть приложены к отчёту о микроскопическом исследовании, для снимков также возможно применение простых фильтров, проведение линейных измерений, добавление комментариев.

Рис. 25. Внешний вид программного обеспечения ScorpImage Plus



Как видно из перечисленного выше, даже простое ПО позволяет решить ряд типичных проблем микроскопии, а именно: создавать архив изображений, обмениваться данными между исследователями, проводить обучение, организовать консилиум и обеспечить документальное подтверждение к отчёту об исследовании. Кроме того, данное ПО экономит средства, поскольку уже включено в комплект поставки камеры. Если перед пользователем не ставятся специальных задач или пользователь ограничен в средствах, то выбор камеры в комплекте с ПО будет оптимальным решением.

Универсальное программное обеспечение

Универсальное программное обеспечение предназначено для решения широкого круга задач. К таким программным продуктам можно отнести Vision Bio и Vision Material. Данные программы, в отличие от Scopelimage Plus поддерживают широкий спектр камер различных производителей, в отличие от Scopelimage Plus описанного выше. Кроме того, они позволяют получать изображение напрямую со сканера или работать с уже готовыми изображениями полученными из других источников.

ПО Vision Bio и Vision Material представляют собой довольно мощные аналитические инструменты с большим набором функций и встроенными методиками исследований. Наиболее типичными являются измерение объектов, их классификация, подсчёт, фазовый анализ, анализ толщины разрывов. Однако аналитическая часть этих программ не ограничивается встроенными методиками, в распоряжении пользователя оказывается все необходимое для создания собственной последовательности процедур, согласно которой будет проводиться обработка типовых изображений, — таким образом, у него появляется возможность сделать процесс работы с изображением стандартным, одинаковым для всех однотипных исследований.

Помимо аналитических возможностей данные программы располагают большим набором инструментов по обработке полученных снимков. В Vision Bio и Vision Material имеется более 30 стандартных фильтров, более 20 специальных фильтров, а также поддерживаются все основные морфологические операции.

Отдельно хотелось бы отметить некоторые специальные функции делающие работу с данным по более привлекательной. Во-первых, это возможность монтажа изображений с различными фокусами (Alpha Blending — взвешенное наложение смешиваемых цветов). Этот инструмент полезен при работе с образцами, имеющими несколько фокусов, которые не могут быть получены одновременно. Захватывается несколько фокусов, и два из них открываются в этом модуле. Яркость устанавливается на уровне, дающем хороший результат просмотра. Сохраните это третье изображение, и можно продолжать процесс далее для любого количества изображений (рис. 25). Во-вторых — возможность использования различных

эффектов, таких как тёмное поле и фазовый контраст, для уже сохранённого изображения, полученного в светлом поле (рис. 26).

Vision Bio и Vision Material имеют встроенный редактор отчётов — и пользователь может настроить несколько вариантов отчёта для различных типов исследований. В отчёт могут включаться исходное и обработанное изображения, результаты измерений, графики, гистограммы и любые другие данные, которые необходимы для создания полной картины исследования.

ПО Vision Bio ориентировано на применение в медицине и биологии, Vision Material предназначено для использования в материаловедении.

Рис. 25. Монтаж (Alpha Blending)

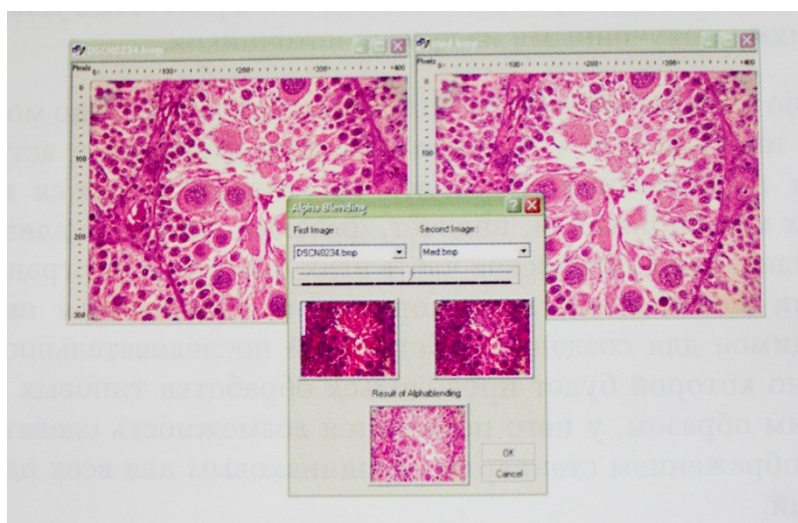
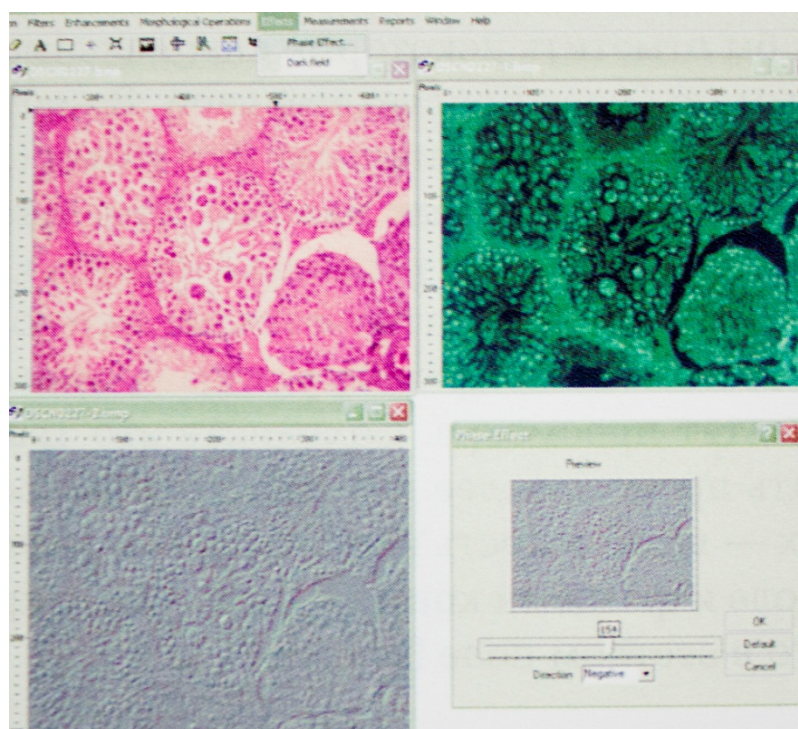


Рис. 26. Применение эффектов тёмного поля и фазового контраста



Специальное программное обеспечение

Узкоспециализированное программное обеспечение предназначено для решения специальных задач, стоящих перед исследователем. Некоторые из них имеют стандартную методологию и стандартные решения. В медицине к таким задачам можно отнести хромосомный и FISH-анализ, а также анализ спермы; в материаловедении это может быть анализ различных включений. Такое программное обеспечение уже содержит в себе алгоритм обработки изображений и имеет заложенную процедуру анализа. Кроме того, оно снабжено набором специальных функций, которые востребованы только в рамках решения определённой задачи. Например, для хромосомного анализа специальной функцией является разделение перекрещивающихся и соприкасающихся хромосом, для анализа спермы характерна работа с живым видео — это обусловлено спецификой самого анализа. Подобных примеров можно привести ещё много, однако, не углубляясь в детали, важно понимать, что работа с узкоспециализированным ПО накладывает и определённые требования к оборудованию, а именно к микроскопу и камере, составляющим вместе систему ввода. Прежде чем приобретать подобный программный продукт, следует проконсультироваться со специалистами — иначе можно оказаться в неприятной ситуации, когда имеющееся оборудование не сможет обеспечить качество картинки необходимое для корректной работы данного ПО.

Рис. 27. Комплекс для хромосомного и FISH анализа на базе по KarvoFISH (Vision, Австрия) и микроскопа MT6300 (Meiji Techno, Япония)



Применение KaryoFISH не сводится только лишь к хромосомному и FISH-анализу, поскольку база данных позволяет сохранить любое изображение, а не только снимок хромосом. Конечно, в этом случае возможности редактирования изображения сильно ограничены, поскольку нельзя воспользоваться специальными инструментами для кариотипирования и FISH. Тем не менее применение простых стандартных фильтров, таких как яркость, контрастность и другие, возможно и для всех типов изображений. Встроенный редактор позволяет формировать отчёты для разных типов исследований, которые могут включать исходное и обработанное изображения, данные пациента и результаты его исследования.

Программное обеспечение для моторизованных микроскопов

Программное обеспечение для моторизованных микроскопов — это в первую очередь полное изменение стиля работы. Однако по-настоящему все преимущества моторизации раскрываются с использованием специального ПО. Подробное описание возможностей моторизации дано в предыдущей главе, поэтому здесь хотелось бы остановиться на конкретных примерах.

ПО для моторизации можно разбить на 2 группы:

1. Стандартное ПО для непосредственного управления моторизованными элементами микроскопа, которое входит в комплект моторизованного микроскопа.
2. ПО для работы с изображениями, полученными с помощью моторизованного микроскопа, которое приобретается дополнительно.

Рассмотрим отдельно эти группы по для моторизованной микроскопии.

Использование стандартного программного обеспечения SwitchBoard позволяет решить следующие задачи:

- Повторное нахождение интересующего объекта на слайде. Многие операторы сталкиваются в своей практике с тем, что крайне сложно, а иногда и невозможно отыскать на предметном стекле ранее обнаруженный объект, особенно при работе на больших увеличениях. Использование шкалы на стандартных предметных столиках в этом случае малоэффективно. Программа SwichBoard позволяет запоминать координаты интересующего объекта с точностью до микрона. Поэтому для его обнаружения достаточно просто положить стекло на предметный столик и щёлкнуть мышью по ранее сохранённой координате.

- Непрерывное сканирование образца, то есть быстрый просмотр объекта с целью обнаружения интересующих элементов. При необходимости быстрого просмотра всего образца пользователь может задать траекторию движения, время задержки на каждом поле и область сканирования. При таком просмотре вы гарантированно будете каждый раз просматривать образец по стандартной процедуре, всегда одинаковой площади и, что самое важное не пропустите ни одного поля зрения. При обнаружении интересующего элемента всегда есть возможность

остановить процесс сканирования, запомнить нужную координату и вернуться к этому полю позднее — например, для того, чтобы изучить объект при большем увеличении.

Программное обеспечение для создания виртуальных слайдов Vision Slide

Программное обеспечение Vision Slide — это мощный инструмент для создания виртуальных препаратов. Данный продукт позволяет создавать простые (двухмерные) и сложные (трехмерные) цифровые копии микроскопических образов. Простой виртуальный препарат представляет собой плоское изображение заданного размера, где соседние поля склеены друг с другом. Такая склейка может проводиться как с корректировкой фокуса по соседним полям, так и без неё. Сложные виртуальные слайды представляют собой полную цифровую копию образца, включая несколько фокусов для каждого поля по оси Z, так называемые Z-слои. Такие препараты могут использоваться для создания полноценного архива: они не выцветают и не портятся, отсутствует риск сломать или потерять препарат. Кроме того, в целях обучения, консультаций, для использования возможностей телемедицины может быть сделано неограниченное количество копий данного препарата.

Рис. 28. Выбор параметров сканирования и список координат интересующих объектов

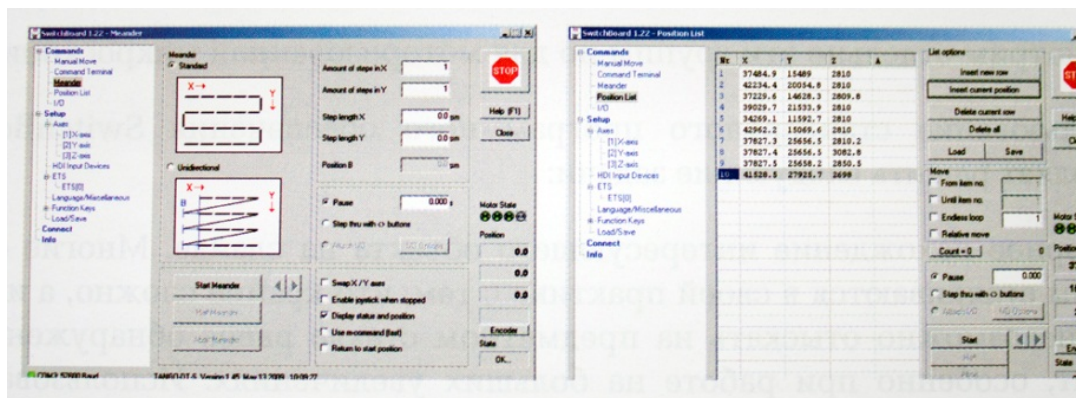


Рис. 29. Программа Vision Slide захватывает соседние поля (слева), обработанное и «склеенное» изображение (справа)



Для создания виртуального препарата запускается автоматическое сканирование микроскопического препарата с определёнными параметрами. Это может быть требуемая площадь объекта, наличие или отсутствие автофокуса, процент перекрытия полей и др. Программа с помощью автоматизированного столика и видеокамеры будет последовательно делать снимки участков микроскопического или макроскопического препарата и склеивать эти отдельные снимки в одно большое изображение, избавив пользователя от трудоемкой, рутинной работы. Затем врач-лаборант или другой исследователь может легко и быстро просмотреть полученный виртуальный препарат на мониторе компьютера. Эта программа незаменима также в случаях, если у вас есть крупный объект, не попадающий целиком в поле зрения на соответствующем увеличении: такой объект просто невозможно увидеть целиком без создания виртуального препарата. Наконец автоматизированный предметный столик позволяет вернуться к тому самому полю, где находится заинтересовавший исследователя объект, чтобы, например, рассмотреть его более внимательно с большим увеличением.

Ещё одной областью применения виртуальных препаратов может стать использование их для внутрилабораторного контроля качества.

Программы обработки и анализа виртуальных слайдов Vision Morpho и Vision Epi

Vision Morpho и Vision Epi, помимо создания виртуальных слайдов, поддерживают функции обработки изображений и анализа полученных препаратов.

Автоматизированная микроскопическая система Vision Morpho снижает долю рутинных, трудоёмких операций для исследователей и позволяет уделить больше времени собственно анализу полученных данных и решению поставленных задач. Можно поручить системе просканировать и измерить определённые параметры исследуемого объекта, например длину и ширину клеток, соотношение ядра и цитоплазмы, фактор округлости клеток, цветовые характеристики ядер, цитоплазмы и т. п. Такие морфометрические измерения и статистическая их обработка позволят затем создать алгоритм распознавания определённых элементов. Также этот подход устраняет или существенно снижает субъективность оценки микроскопических препаратов. Данное ПО обеспечивает выполнение анализов морфологии, формы, меток, оптической плотности, концентрации широкого круга объектов (цитология,

гистология, гинекология, микробиология и др.). Программа имеет диалоговый анализатор. В ПО встроены средства выделения границ объектов в поле зрения с автоматическим определением контрастных контуров и полуавтоматическим или ручным выделением слабоконтрастных контуров локально или по кадру в целом. Автоматически измеряются параметры отдельных объектов и параметры выборки объектов, включая оптическую плотность, цветность, яркость, форму, площадь, размеры, текстуру, относительное расположение, углы, количество фрагментов и отверстий объекта, площадь отверстий, ядерно- цитоплазматическое и ядерно-клеточное отношения, минимальный и максимальный диаметры и их соотношение, эквивалентный диаметр, концентрации объектов в поле зрения.

Vision Epi, помимо перечисленных выше функций, поддерживает средства комбинирования изображений, полученных при разных условиях микроскопии. например с цветными флуоресцирующими метками и в проходящем свете; специализированные средства автоматического выделения и количественного анализа цитохимических и флуоресцентных меток различных типов (FISH, FITC, AgNOR, HER2, Ki-67 и др.); средства статистической обработки накопленных в базе данных измерений выборки. Калиброванное определение оптической плотности с нормировкой к объектам с единичной плоидностью позволяет при окраске по Фельгену определять плоидность ДНК.

Программа автоматического анализа мазка крови Vision Nema

Ещё один продукт, который хотелось бы выделить особо, программа Vision Nema, Данная программа предназначена для стандартизации наиболее часто проводимого медицинского лабораторного исследования — анализа мазка крови. Vision Nema самостоятельно сканирует образец и собирает данные для анализа, предварительно сортирует форменные элементы крови, и записывает их изображения в базу данных пациента. Vision Nema может также работать с виртуальными препаратами, полученными ранее.

При сканировании препарата выполняется поиск и последующая дифференцировка определённых объектов, а именно специфических клеток. Vision Nema позволяет измерить, рассчитать и оценить несколько десятков параметров для объективного анализа крови, при этом будут проанализированы сотни эритроцитов и определена лейкоцитарная формула. В крови человека эритроциты и лейкоциты

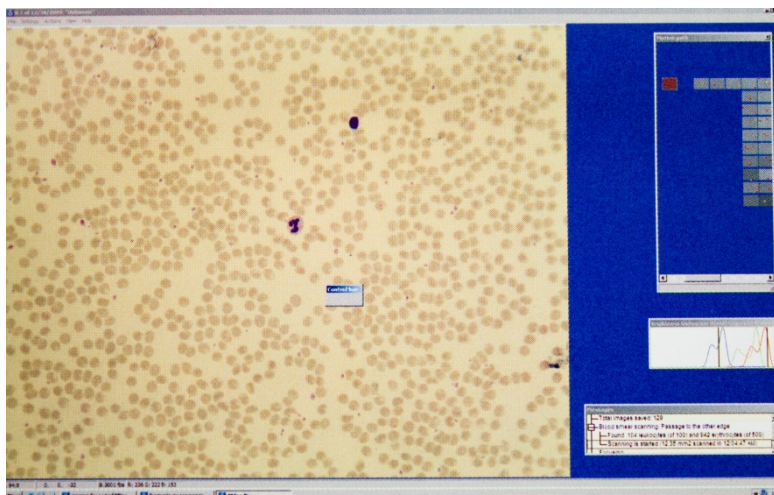
играют важную роль, но в норме лейкоциты составляют всего около 0,1 % всех клеток, то есть на каждую тысячу эритроцитов приходится один лейкоцит. В окрашенном мазке крови лаборанту для достоверного подсчёта необходимо просмотреть огромное количество полей зрения, и, конечно же, лучше доверить такую рутинную работу автоматической системе. Под управлением специальной программы моторизованный столик будет продвигать препарат по определённой траектории, модуль автофокусировки — подстраивать фокус, видеокамера — захватывать изображения, в которых будет происходить распознавание клеток, затем клетки будут рассортированы по классам. Пользователю останется просмотреть захваченные изображения к деток, принять или скорректировать результат их дифференцировки. Подобный метод можно использовать также для распознавании опухолевых или других патологических клеток.

Таким образом, ученые-исследователи, практикующие врачи, специалисты с помощью автоматизированных микроскопических систем получают мощный инструмент, позволяющий стандартизировать методики исследования, получать новые данные, недоступные с помощью традиционных методов, сделать результаты исследований более объективными.

В заключение хочется сказать, что ПО постоянно совершенствуется и с выходом каждой новой версии появляются новые возможности. В момент написания этой главы к выходу готовится ПО для создания отчётов о микроскопических исследованиях Vision Report.

Приобретая лицензионное ПО, вы помогаете производителю вести постоянную работу по улучшению качества продукции и расширению возможностей программ, получаете постоянную поддержку и обновление уже имеющихся у вас продуктов.

Рис. 30. Программа Vision Нема обнаруживает лейкоциты



Список литературы

1. F. M. CarryL How to use a light microscope. 1987.
2. S. Beauchomin and J, Barron. The computation of optical flow. 1996. а, M. Bom and E. Wolf, Principles of Optics. 1999.
3. H, Burkhardt and S, Siggolkow. Nonlinear Model — Based Image/Video Processing and Analysis. 2001.
4. K. Cthelappa. Digital Image Processing. 1992.
5. VV. Smith. Modern Optical Engineering. 2007.

Различные типы промышленных микроскопов

Рис. 32а. Бинокулярный стереомикроскоп



Рис. 32б. Геммологический микроскоп



Рис. 32в. Исследовательский микроскоп



Рис. 32г. Моторизованный микроскоп



Рис. 32д. Исследовательский микроскоп



Рис. 32е. Моторизованный микроскоп



Рис. 32ж. Исследовательский микроскоп



Рис. 32з. Моторизованный микроскоп



Издано

Meiji Techno Co., LTD., Япония и Вест Медика, Россия

www.meijitechno.ru, www.westmedica.ru

Подписано в печать 20.09.2010 г. Формат 60x90 1/16.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 7.

Тираж 2000 экз. Заказ № 1199.

Отпечатано в ООО «Студия «ЗёБРА».
Россия. 614990, г. Пермь, ул. Окулова, 80.
Тел. (342) 239-08-39.



МЕИДИ ТЕХНО