

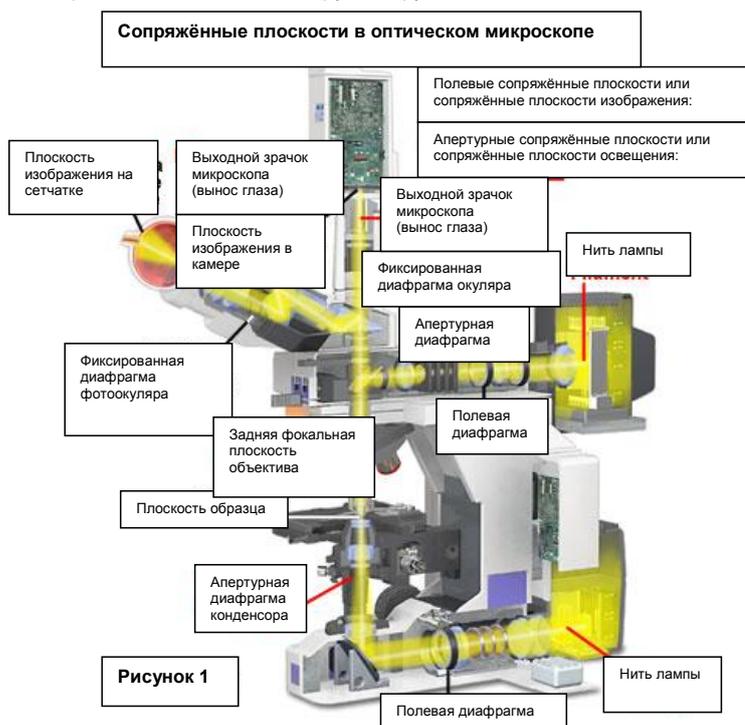
## Основные понятия и уравнения микроскопии

Чтобы в полной мере использовать возможности оптического микроскопа, необходимо глубокое понимание фундаментальных физических принципов, лежащих в основе его работы. Такие важные в микроскопии понятия, как разрешающая способность, числовая апертура, глубина поля, яркость изображения, рабочее расстояние объектива, сопряжённые плоскости и диапазон полезного увеличения, обсуждаются в статьях, ссылки на которые приведены ниже.

### Понятия и уравнения микроскопии

#### Сопряжённые плоскости в оптической микроскопии

Анализ оптической системы правильно сфокусированного и отъюстированного оптического микроскопа выявляет наличие в ней двух наборов сопряжённых друг с другом фокальных плоскостей вдоль оптического пути микроскопа. Один набор состоит из четырёх **полевых** плоскостей и называется набором сопряжённых плоскостей **изображения** или сопряжённых полевых плоскостей, в то время как другой набор, называемый набором сопряжённых плоскостей **освещения**, состоит из **апертурных** плоскостей. Все плоскости в каждом наборе сопряжены между собой, поскольку одновременно находятся в фокусе, и при наблюдении образцов в микроскоп накладываются друг на друга.



На рисунке 1 представлена схема современного микроскопа (Nikon Eclipse E600) в разрезе, на которой показано принципиальное расположение оптических компонентов, составляющих два набора сопряжённых плоскостей, находящихся в оптическом пути микроскопа, при наблюдении как в проходящем, так и падающем (отражённом или эпископическом) свете. Компоненты набора сопряжённых полевых плоскостей обозначены чёрным шрифтом, а плоскости апертурного набора (т.е. набора освещения) – красным шрифтом. Следует обратить внимание, что обозначенные сопряжённые плоскости относятся как к режиму непосредственно наблюдения, так и к режиму формирования изображения

(микрофотографированию). В таблице 1 приведён список элементов, составляющих каждый набор сопряжённых плоскостей, в том числе их часто используемые альтернативные обозначения (заключённые в скобках), которые могут встретиться в литературе. Существует небольшая разница в относительном положении полевой и конденсорной диафрагмы в зависимости от применяемого освещения (падающего или проходящего), что будет пояснено позже.

### Сопряжённые фокальные плоскости

Набор сопряжённых апертурных плоскостей (или плоскостей освещения)	Набор сопряжённых полевых плоскостей (или плоскостей изображения)
Выходной зрачок микроскопа: Диафрагма радужной оболочки глаза, диск Рамсдена и вынос глаза	Сетчатка глаза, плоскость изображения камеры
Задняя фокальная плоскость объектива (задняя апертура объектива)	Плоскость промежуточного изображения (фиксированная диафрагма окуляра)
Апертурная диафрагма конденсора (передняя фокальная плоскость конденсора)	Плоскость образца (плоскость предметов)
Нить лампы накаливания	Полевая диафрагма (диафрагма Кёллера)

Таблица 1

В режиме обычного наблюдения (с помощью окуляров) сопряжённый набор предметных или полевых плоскостей может наблюдаться одновременно, при условии, что образец находится в фокусе. Этот режим наблюдения называется **ортоскопическим**, а получаемое при этом изображение – ортоскопическим изображением. Для наблюдения сопряжённого набора апертурных или дифракционных плоскостей требуется приведение задней апертуры объектива в фокус, для чего необходимо, чтобы микроскоп был оснащён телескопическим окулярным тубусом (вместо окуляра) или встроенной линзой Бертрана. Этот режим наблюдения называется **коноскопическим**, апертурным или дифракционным, а изображение, наблюдаемое в задней апертуре объектива, соответственно, – коноскопическим изображением. Хотя обозначения «ортоскопический» и «коноскопический» довольно часто встречаются в литературе, многие микроскописты предпочитают называть эти режимы нормальным и апертурным, соответственно, поскольку эта терминология ближе к работе микроскопа, как таковой. Плоскости, принадлежащие к разным сопряжённым наборам, чередуются между собой по ходу луча, начиная от нити источника света и заканчивая изображением, формируемым на сетчатке или плоскости изображения фотоприёмника. Глубокое понимание соотношений между этими наборами сопряжённых плоскостей и их расположением в микроскопе существенно для правильного представления о формировании изображения и правильной настройки освещения. К тому же, расположение главных сопряжённых плоскостей часто является ключевым фактором при монтаже таких оптических компонентов, как фазовые пластины, призмы Волластона в методе дифференциального интерференционного контраста (ДИК), поляризаторов, модуляторов, фильтров и окулярных сеток.

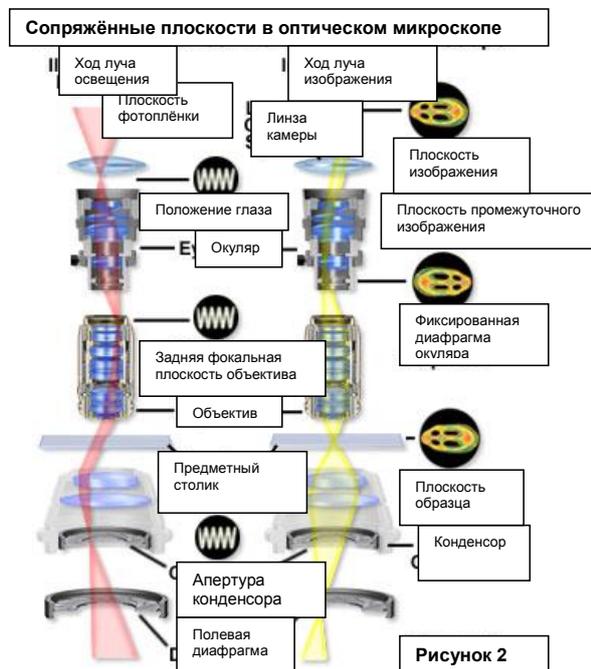


Рисунок 2

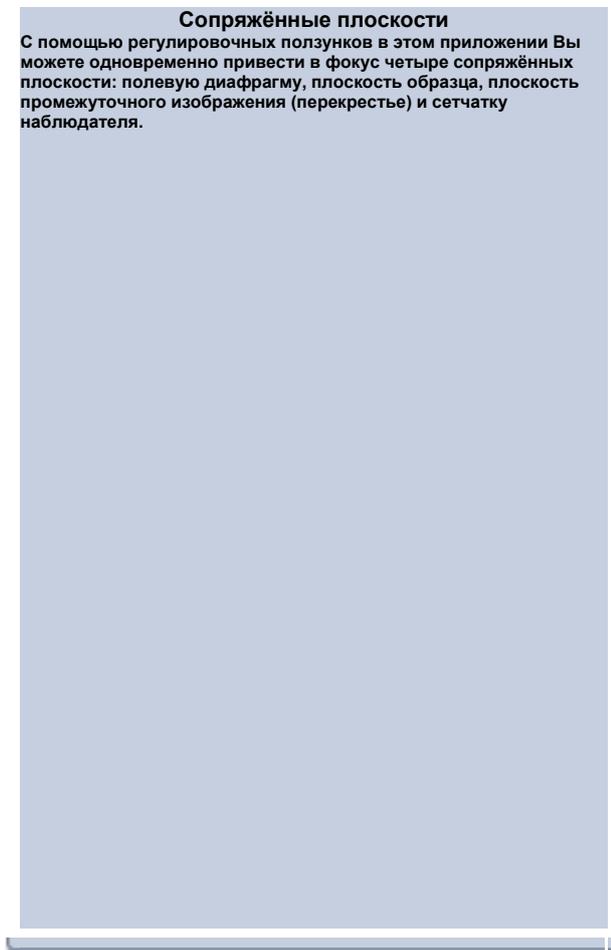
На рисунке 2 представлен ход луча освещения и луча, формирующего изображение, в микроскопе, настроенном для освещения по Кёлеру. Плоскости каждого сопряжённого набора по ходу лучей снабжены стоящими посередине надписями. На рисунке отчётливо виден взаимно обратный характер двух этих наборов сопряжённых плоскостей микроскопа. Оптически, соотношение между сопряжёнными плоскостями этих наборов основывается на том факте, что сферический волновой фронт освещающего пучка (показан красным) сводится в фокус в апертурных плоскостях, а сферический волновой фронт пучка изображения (показан жёлтым) – в полевых плоскостях. Световой пучок, сфокусированный в сопряжённых плоскостях одного набора, оказывается почти параллельным при прохождении через сопряжённые плоскости другого набора. Взаимно обратное соотношение между сопряжёнными плоскостями этих двух наборов определяет суть взаимодействия двух пучков на оптическом пути при формировании изображения в микроскопе, а также имеет практическое значение для работы микроскопа.



Интерактивное учебное приложение  
Java

### **Сопряжённые плоскости**

**С помощью регулировочных ползунков в этом приложении Вы можете одновременно привести в фокус четыре сопряжённых плоскости: полевую диафрагму, плоскость образца, плоскость промежуточного изображения (перекрестье) и сетчатку наблюдателя.**



Освещение является, возможно, наиболее важным фактором, определяющим общую производительность оптического микроскопа. Заполнение освещением всей апертуры и поля измерительного прибора лучше всего достигается при настройке его осветительной системы в соответствии с принципами, впервые введенными Августом Кёлером в конце девятнадцатого века. Именно в условиях освещения по Кёлеру удовлетворяются требования по расположению сопряжённых фокальных плоскостей двух разных наборов (полевых и апертурных плоскостей) в физически строго определённых в микроскопе местах. Настройка каждого отдельного микроскопа для освещения по Кёлеру в некоторой степени может зависеть от того, насколько требования для этого освещения учитывались при его производстве, но здесь эти подробности не обсуждаются.

Основные требования освещения по Кёлеру очень просты. Собирающая линза блока осветителя должна сводить лучи, испускаемые из разных точек нити накаливания лампы в переднюю апертуру конденсора, заполняя её при этом полностью. В то же время, конденсор должен быть сфокусирован таким образом, чтобы сопряжённые плоскости из двух наборов были выставлены в определенное положение по оптической оси микроскопа (при условии, что образец находится в фокусе). Выполнение этих условий обеспечивает яркое и ровное освещение плоскости образца даже такими, по своему существу, неоднородными источниками света, как галогенная лампа с вольфрамовой нитью (поскольку сама нить не фокусируется в плоскости образца). Нахождение образца и конденсора в фокусе

обеспечивает правильное положение сопряжённых фокальных плоскостей; при этом разрешающая способность и контрастность доводятся регулировкой полевой диафрагмы и апертурной диафрагмы конденсора.



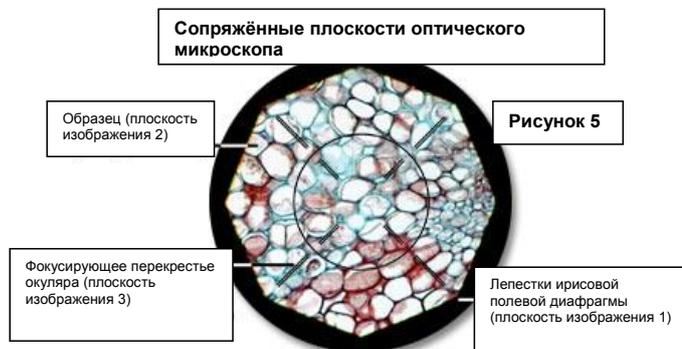
Понятие сопряжённости отдельных плоскостей на оптическом пути микроскопа означает их эквивалентность. То есть, то, что появляется в фокусе одной из плоскостей сопряжённого набора, обязательно будет в фокусе и всех других плоскостей, принадлежащих этому же набору. С другой стороны, взаимно обратный характер двух наборов сопряжённых плоскостей микроскопа требует, чтобы объект, сфокусированный в одном наборе плоскостей, был вне фокуса в другом наборе. Существование двух взаимосвязанных оптических путей и двух наборов плоскостей характерно для освещения по Кёлеру и лежит в основе использования различных регулируемых апертурных диафрагм микроскопа для регулировки угла конуса света, размера светового пятна, яркости и равномерности освещения в поле зрения. Плоскости, принадлежащие к полемому набору, иногда называются плоскостями, **ограничивающими поле**, поскольку любая диафрагма, помещённая в одну из этих плоскостей, ограничивает диаметр изображения поля. Плоскости, софокусные и совмещённые с изображением образца, представлены на рисунке 3. Апертурные плоскости могут считаться **ограничивающими апертуру**, поскольку числовая апертура оптической системы может регулироваться установкой в одну из этих плоскостей постоянной или переменной (ирисовой) диафрагмы. Взятые вне микроскопа компоненты оптической системы, представляющие набор апертурных плоскостей, т.е. не являющихся софокусными с образцом, показаны на рисунке 4.



Микроскопист может не знать, что в нормальном режиме наблюдения, изображение образца, в действительности, является комбинированной проекцией четырёх плоскостей сфокусированного изображения (включая плоскость самого образца), оптические характеристики которого определяются или модулируются другим набором четырёх (несущих расфокусированное изображение) апертурных плоскостей. Если микроскоп хорошо отъюстирован, об этом можно не задумываться. Однако когда необходимо исправить серьёзные дефекты изображения, механизм его формирования становится более понятным и приобретает непосредственный практический интерес. Понимание расположения и вклада в формирование изображения каждой из сопряжённых полевых и апертурных плоскостей является необходимым при устранении возникающих в процессе наблюдения проблем. Это также необходимо для правильной установки и использования фильтров, диафрагм, фазовых колец, ДИК призм и других оптических компонентов. В конструкции современных микроскопов учитывается расположение сопряжённых плоскостей и необходимость их доступности для микроскописта.

Одним из наиболее частых моментов, когда необходимо учитывать сопряжённость различных полевых плоскостей (включая образец) и апертурных плоскостей (включая источник освещения), является установка фильтров и других корректирующих освещение компонентов. Эти оптические элементы, из-за частой смены, подвержены загрязнению пылью и отпечатками пальцев и часто плохо объединяются с той частью оптической системы (объектив, окуляры и другие компоненты на оптическом пути), элементы которой предназначены для формирования окончательного сфокусированного изображения. По этой причине, никогда не следует помещать вспомогательные компоненты в любую плоскость, сопряжённую с образцом, поскольку любые дефекты, пыль или соринки могут проявиться в окончательном изображении образца, сформированном на сетчатке или плоскости изображения камеры.

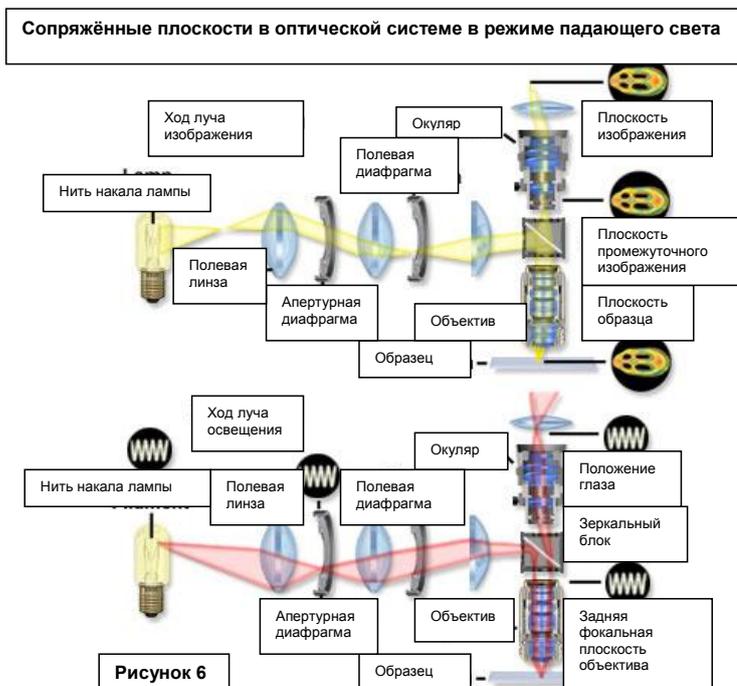
И напротив, измерительные сетки, шкалы, указатели и другие приспособления, которые необходимо иметь в фокусе и регистрировать на образце, должны помещаться в одну из полевых сопряжённых плоскостей, чтобы быть визуализированными вместе с образцом. Из практических соображений большинство серийно выпускаемых измерительных сеток предназначены для монтажа в окулярную полевую диафрагму, совпадающую с плоскостью действительного промежуточного изображения. На рисунке 5 представлено изображение поля зрения микроскопа, включающее три софокусные сопряжённые плоскости и сфокусированное на сетчатке глаза или плоскости изображения камеры. Фазовые пластины и их кольца предназначены для управления ходом луча (и не должны появляться на изображении образца), поэтому они помещаются в сопряжённые плоскости апертурного набора. Фазовая пластина обычно помещается в заднюю апертуру объектива (в самую заднюю фокальную плоскость или очень близко к ней). Но, как раз в этом месте возникает изображение соответствующей кольцевой апертурной диафрагмы, помещённой в другую сопряжённую плоскость апертурного набора (передний фокус конденсора). Таким образом изображения этих двух компонентов оказываются совмещёнными по ходу осветительного луча. По этой же причине призмы Волластона, которые разделяют и вновь объединяют световые пучки в микроскопии дифференциального интерференционного контраста, устанавливаются в передней фокальной плоскости конденсора и задней фокальной плоскости объектива. Поляризаторы и анализаторы, применяемые в поляризационной и ДИК микроскопии обычно помещаются на большом расстоянии от сопряжённых плоскостей любого из двух наборов, чтобы не испортить изображение образца пылью или отпечатками пальцев, находящимися на этих вспомогательных устройствах, и не нарушить условий освещения.



Для устранения проблем, влияющих на качество создаваемого микроскопом изображения, необходимо выяснить две возможные причины их возникновения. В окулярах нормально настроенного микроскопа сопряжённые полевые плоскости наблюдаются в фокусе. Если пыль или другие посторонние частицы видны отчётливо (т.е. находятся в фокусе с образцом), то необходимо проверить те из расположенных на оптическом пути прозрачных элементов, которые лежат в одной из полевых плоскостей, либо рядом с ней. Компонентами, на которых находится пыль и посторонние частицы (наблюдаемые одновременно с образцом), скорее всего, являются само предметное стекло, линзы окуляра, передняя линза объектива, верхняя линза конденсора, сетки и любая линза рядом с полевой диафрагмой. Часто бывает

достаточно повернуть окуляры, объектив и конденсор и посмотреть, поворачиваются ли вместе с ними находящиеся в поле зрения посторонние частицы, определив, таким образом их местонахождение.

Если эти действия не привели к обнаружению проблемы, то на следующем этапе этого поиска было бы логично осмотреть заднюю фокальную плоскость объектива с целью выявления несоосности или возможных помех на оптическом пути. Этот апертурный, или коноскопический, вид получается заменой обычного окуляра специальным телескопическим окулярным тубусом или с помощью линзы Бертрана (встроенной в наблюдательную насадку микроскопа). Хотя можно просто снять окуляр и пристально осмотреть наблюдательный тубус в задней апертуре объектива, изображение слишком мало, и поэтому его трудно исследовать без телескопа. С помощью наблюдательного тубуса в апертурных плоскостях легко обнаружить любой дефект оптической системы: несоосность линз, грязь или посторонние частицы на линзах, неравномерность освещения, например несоосность нити лампы, воздушные пузыри, которые могут присутствовать в иммерсионном масле и плохо отъюстированную диафрагму конденсора. Апертурная диафрагма конденсора определяет эффективную числовую апертуру комбинации объектив – конденсор и обычно настраивается таким образом, чтобы свет заполнял заднюю апертуру объектива на 70-80 процентов, что обеспечивает оптимальное соотношение между максимальной разрешающей способностью, глубиной поля и необходимым контрастом.



Как уже говорилось ранее, режим падающего (отражённого) света требует некоторого изменения в настройке полевых и апертурных диафрагм микроскопа. Эта дополнительная настройка связана с двойственной ролью объектива в режиме падающего освещения, поскольку в этом случае он выступает ещё и как конденсор, что требует апертурной диафрагмы, которая не лежит на пути пучка изображения между объективом и глазом или камерой. Чтобы удовлетворить этому требованию, в осветительной системе применяются линзы для создания между лампой и полевой диафрагмой сопряжённой плоскости, в которую помещается апертурная диафрагма, сопряжённая с нитью лампы. Апертурная диафрагма затем проецируется оборачивающей линзовой системой и зеркалами на заднюю фокальную плоскость (выходной зрачок) объектива, где эти две сопряжённые плоскости совмещаются

друг с другом. На рисунке 6 представлен ход лучей освещения (показан красным) и ход лучей изображения (показан жёлтым) в системе падающего света.

Только при глубоком понимании центральной роли двух взаимно обратных наборов сопряжённых фокальных плоскостей может быть достигнуто высокое качество изображений, получаемых микроскопом. Для наилучших результатов микроскопист должен представлять себе взаимосвязь между ними и их расположение в микроскопе в условиях освещения по Кёлеру. Это понимание обеспечивает использование основных и дополнительных элементов микроскопа таким образом, чтобы взаимно обратный характер наборов сопряжённых плоскостей учитывался с максимальной эффективностью.

**Юстировка микроскопа при освещении по Кёлеру** – Возможно, одним из самых недооценённых и часто пренебрегаемых в оптической микроскопии понятий является правильная конфигурация микроскопа с точки зрения освещения – критического для достижения максимальной эффективности параметра. Интенсивность и спектр источника освещения имеют большое значение, но ещё более существенно, чтобы свет, испущенный из различных точек ламповой нити, был собран и сфокусирован в плоскости апертурной диафрагмы конденсора. В этом интерактивном учебном приложении рассматриваются процедуры юстировки ламповой нити и конденсора, выполняемые при освещении по Кёлеру.

## Интерактивное учебное приложение Java

### ВНИМАНИЕ

Нашими серверами обнаружено, что на вашем браузере не установлена виртуальная машина Java, либо она не работает. Установите это программное обеспечение для просмотра наших интерактивных учебных приложений Java.

Пользователи браузеров **Нетскейп (Netscape)** и **Интернет-эксplorер** могут загрузить необходимое программное обеспечение с официальных сайтов этих браузеров.

Убедительная просьба не обращаться к нам за информацией об URL-адресах, где распространяется это программное обеспечение.

При запуске учебного приложения в окне просмотра возникает случайно выбранное изображение образца, видимое в виртуальном микроскопе, через оптическую систему которого проходит задаваемое пользователем освещение, исходная интенсивность которого определяется (случайным) начальным состоянием ламповой нити. В приложении используются два окна, переключение между которыми осуществляется с помощью селективных кнопок **Юстировка нити** и **Юстировка конденсора**. Предполагается, что виртуальный микроскоп имеет объектив с 10-кратным увеличением. Образец выбирается либо произвольно при запуске программы, либо из ниспадающего меню **Выбрать образец**. Кнопка **Сброс** используется для перезапуска учебного приложения (выбора нового образца и состояния нити накала лампы) без перезагрузки браузера.

Для работы в обучающей программе сначала с помощью селективной кнопки **Юстировка нити** в окне просмотра необходимо отобразить нить лампы. **Управление нитью** осуществляется тремя ползунками, регулируемыми **Интенсивность** лампы (от нуля до 12 вольт), её **Фокус** (положение лампы вдоль оптической оси) и **Поворот** лампы относительно лампового блока. В дополнение, **Положение нити** в поперечной плоскости регулируется двумя ползунками, смещающими её вдоль осей **x** и **y** виртуального микроскопа.

После того, как нить лампы отцентрирована, приведена в фокус, а её рабочее напряжение выставлено равным приблизительно 9,0 вольтам, щёлкните мышью по селективной кнопке **Юстировка конденсора**, чтобы переключится в окно просмотра образца, где также находятся ползунки управления регулировкой конденсора. Если регулировка ламповой нити выполнена правильно, освещение образца должно быть равномерным, независимо от тонкой фокусировки, высоты конденсора и размера отверстия полевой диафрагмы. Для юстировки конденсора сначала выполните фокусировку образца ползунком **Тонкая фокусировка образца**, а потом с помощью ползунка **Высота конденсора** приведите в фокус лепестки ирисовой полевой диафрагмы. Потом, ползунками **Поперечная регулировка конденсора**

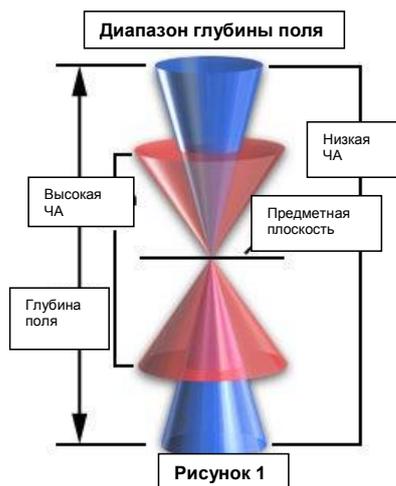
переместите полевую ирисовую диафрагму в центр окна просмотра. И, наконец, ползунком **Размер отверстия диафрагмы** раскройте полевую диафрагму до максимального размера. Если раскрытая диафрагма оказалась смещённой относительно центра, отцентрируйте её вновь с помощью ползунков **x-перемещение** и **y-перемещение**. По-другому это можно сделать, поместив курсор мыши в маленькое окошко (в котором находится перекрестье) и перетащить изображение полевой диафрагмы (белый круг) в его центр. После юстировки нити накаливания лампы и настройки виртуального микроскопа под освещение по Кёлеру, ползунком **Апертура конденсора** можно смоделировать изменение разрешающей способности и контраста образца в зависимости от значения числовой апертуры.

Этот метод микроскопического освещения был впервые описан доктором Августом Кёлером в конце 19-го века, и сегодня, более 100 лет спустя, всё ещё широко (и даже почти исключительно) применяется в современных микроскопах. В методе Кёлера необходима установка собирающей линзы либо рядом с ламповым блоком, либо в нём самом, для фокусировки изображения нити лампы в передней фокальной плоскости конденсора, где находится апертурная диафрагма. Если изображение нити лампы отцентрировано и полностью заполняет апертуру, освещение образца будет ярким и равномерным. Чтобы изображение нити попало в фокальную плоскость конденсора, часто необходимо отрегулировать высоту самого конденсора (как описано выше в учебном приложении). При правильно выполненной юстировке сопряжённые фокальные плоскости двух наборов (называемых **полевым** и **апертурным** набором) располагаются в точно заданных местах оптической системы микроскопа, что максимально повышает его производительность.

#### ВЕРНУТЬСЯ К ПОНЯТИЯМ И УРАВНЕНИЯМ МИКРОСКОПИИ

**Глубина поля и глубина фокуса** – Глубиной поля называется толщина образца, в пределах которой его изображение имеет приемлемую резкость при заданной фокусировке. И, напротив, под глубиной фокуса подразумевается диапазон смещения плоскости изображения, в пределах которого сохраняется приемлемая резкость. Когда говорят о глубине поля объектива микроскопа, часто путают два понятия и ошибочно употребляют одно вместо другого.

Под разрешающей способностью в оптической микроскопии в большинстве случаев подразумевают разрешение **по плоскости**, перпендикулярной оптической оси (рисунок 1). Другим важным аспектом разрешения является осевая (или **продольная**) разрешающая сила объектива, измеряемая вдоль оптической оси и часто называемая глубиной поля.



Осевое разрешение, также как и поперечное, определяется только числовой апертурой объектива (рисунок 2), при этом окуляр просто увеличивает детали, уже разрешённые и

спроецированные на плоскость промежуточного изображения. А глубина поля, как и в классической фотографии, определяется расстоянием между самой ближней и самой дальней предметными плоскостями, одновременно находящимися в фокусе. В микроскопии глубина поля очень мала и обычно измеряется микронами. Термин "глубина фокуса", относящийся к пространству изображения, часто используется вместо термина "глубина поля", относящегося к пространству предметов (образца).

Такая замена обозначений может привести к путанице, особенно когда оба термина относят к глубине поля объектива микроскопа. Считается, что геометрическая плоскость изображения представляет бесконечно тонкий срез образца, но даже при отсутствии aberrаций каждая точка изображения расплывается из-за дифракции вниз и вверх от этой плоскости. Диск Эйри – базовая единица дифракционной картины, производимой объективом микроскопа, – представляет собой разрез в центре плоскости промежуточного изображения. Это увеличивает эффективную глубину фокуса за счёт проникновения профиля интенсивности диска Эйри вдоль оси Z на соседние плоскости образца.

### Глубина поля и глубина изображения

Увеличение	Числовая апертура	Глубина поля (мм)	Глубина изображения (мм)
4x	0.10	55.5	0.13
10x	0.25	8.5	0.80
20x	0.40	5.8	3.8
40x	0.65	1.0	12.8
60x	0.85	0.40	29.8
100x	0.95	0.19	80.0

Таблица 1

Глубина фокуса меняется с числовой апертурой и увеличением объектива и, при некоторых условиях, системы с высокой числовой апертурой (обычно и высоким увеличением) имеют большую глубину фокуса, чем системы с низкой числовой апертурой, даже при меньшей глубине поля (см. таблицу 1). Это особенно важно в микрофотографировании, поскольку эмульсия плёнки или светочувствительные элементы цифровой камеры должны быть экспонированы или освещены в плоскости, лежащей вблизи фокуса. Небольшие ошибки в фокусировке при высокой кратности увеличения не так критичны, как допущенные при работе с объективами низкого увеличения. В таблице 1 представлены значения глубины поля и глубины изображения в плоскости промежуточного изображения, рассчитанные для серии объективов в порядке возрастания их числовой апертуры и увеличения.

В микроскопах с высокой числовой апертурой глубина поля определяется, главным образом, волновой оптикой, тогда как при низких числовых апертурах доминирует понятие геометрической оптики **кружок рассеяния**. Несколькими авторами, с применением различных критериев допустимой резкости, были предложены разные формулы для описания глубины поля микроскопа. Полная глубина поля, представляемая в виде суммы значений глубины поля в волновой и геометрической оптике, описывается следующим выражением:

$$d_{\text{tot}} = \frac{\lambda_0 n}{NA^2} + \frac{n}{M \cdot NA} e$$

где **d(tot)** – глубина поля,  $\lambda$  – длина волны света освещения, **n** – показатель преломления среды (обычно это воздух (1,000) или иммерсионное масло (1,515)) между покрывным стеклом и передней линзой объектива и **NA** – числовая апертура объектива. Переменная **e** обозначает наименьшее расстояние, различимое детектором, помещённым в плоскость изображения объектива микроскопа с поперечным увеличением **M**. Глубина поля (**d(tot)**) и длина волны ( $\lambda$ ) в этом уравнении должны быть выражены в одинаковых единицах измерения. Например, если длину **d(tot)** необходимо рассчитать в микрометрах, длину волны  $\lambda$  также необходимо выразить в микрометрах (700 нанометров красного света входят в уравнение как 0,7 микрометра).

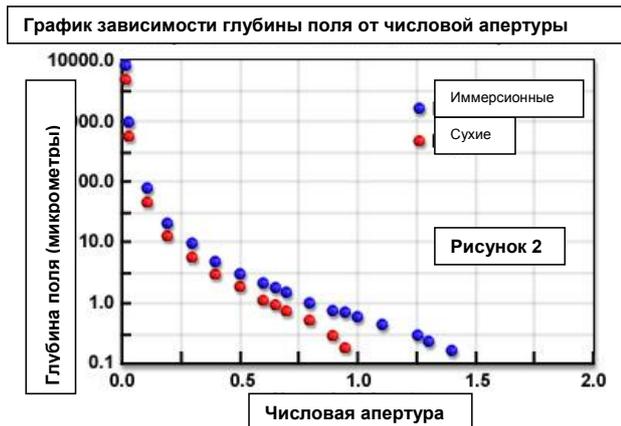
Следует обратить внимание на то, что дифракционная составляющая глубины поля (первое слагаемое в уравнении) обратно пропорциональна квадрату числовой апертуры, тогда как поперечный предел разрешения убывает обратно пропорционально первой степени числовой апертуры. Таким образом, достижимое продольное разрешение и толщина оптических срезов гораздо больше зависят от числовой апертуры, чем разрешающая способность микроскопа по плоскости.

## Интерактивное учебное приложение Java

### Вычислитель глубины поля

С помощью этого интерактивного учебного приложения Java можно определить приблизительную глубину поля обычных объективов Nikon.

Человеческий глаз в нормальных условиях способен к аккомодации на расстоянии от бесконечности до 25 сантиметров, так что глубина поля в этом случае может быть значительно больше той, которая определяется уравнением, приведённым выше, когда микроскопическое изображение наблюдается через окуляры. С другой стороны, светочувствительные элементы или фотозумльсия лежат в заданной тонкой плоскости, глубина поля и продольное разрешение которой описываются параметрами этого уравнения. В этом случае, продольное разрешение определяется условно (по договорённости), как одна четверть расстояния до первого минимума выше и ниже фокальной плоскости вдоль оси трёхмерного дифракционного изображения, создаваемого объективом.

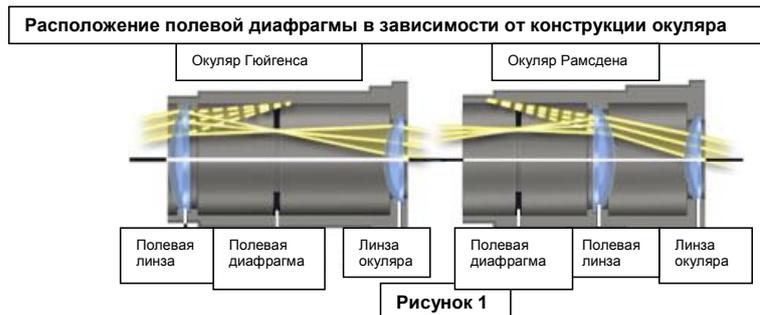


Эти значения глубины поля и распределение интенсивности в трёхмерной дифракционной картине получены для некогерентных точечных источников (освещаемых или освещающих) при том, что числовая апертура конденсора больше или равна числовой апертуре объектива. В общем, при увеличении когерентности освещения (при приближении числовой апертуры конденсора к нулю), глубина поля увеличивается в 2 раза. Тем не менее, при частично когерентном освещении и неравномерной апертурной функции, трёхмерная функция рассеяния точки (PSF) может значительно отличаться от той, которая обсуждалась до сих пор. Во многих фазово-контрастных режимах, применяемых в микроскопии, глубина поля может оказаться неожиданно меньшего значения, определяемого вышеприведённым уравнением, а получаемые при этом оптические срезы, могут быть чрезвычайно тонкими.

В цифровой и видео микроскопии, небольшая глубина фокуса передающей телевизионной трубки и ПЗС, высокий контраст, достигаемый благодаря высокой числовой апертуре объектива и конденсора, сильное увеличение изображения на экране монитора – всё вносит свой вклад в сокращение глубины поля. Таким образом, с помощью видео- устройств возможно получать очень резкие и тонкие оптические срезы и с высокой точностью определять положение фокальной плоскости в тонких образцах.

**Поле зрения** – диаметр поля в оптическом микроскопе выражается **величиной поля зрения**, или просто **величиной поля**, которая есть не что иное, как диаметр поля зрения, измеренный в миллиметрах в плоскости промежуточного изображения. В большинстве случаев размер поля зрения определяется диаметром полевой диафрагмы окуляра.

Диаметр поля в оптическом микроскопе выражается **величиной поля зрения**, или просто **величиной поля**, которая есть не что иное, как диаметр поля зрения, измеренный в миллиметрах в плоскости промежуточного изображения.



В большинстве случаев размер поля зрения определяется диаметром полевой диафрагмы окуляра. Размер поля в плоскости образца определяется делением величины поля на увеличение объектива:

$$\text{Размер поля} = \text{величина поля (вп)} \div \text{Увеличение объектива (У}_o\text{)}$$

Если между объективом и окуляром стоит дополнительная линза, её кратность увеличения должна быть перемножена с увеличением объектива (до операции деления). Хотя величина поля обычно ограничена увеличением и размером полевой диафрагмы окуляра, несомненно, существует ещё и ограничение, накладываемое самой конструкцией объектива. В объективах ранних микроскопов максимальный полезный диаметр поля не превышал 18 миллиметров, а чаще был значительно меньше, но с современными планапохроматами и другими плоскопольными объективами, максимальное полезное поле может иногда превышать 28 миллиметров.

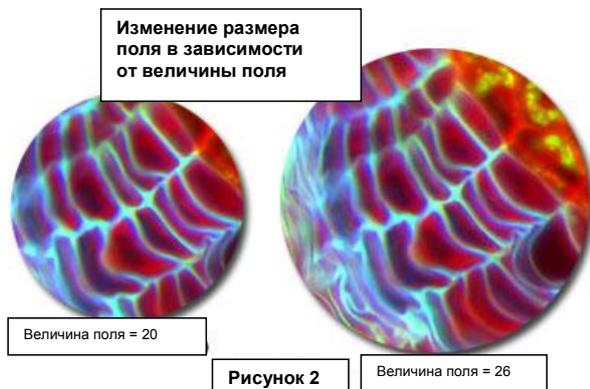
## Интерактивное учебное приложение Java

### Диаметр поля зрения

С помощью этого интерактивного учебного приложения Java можно исследовать влияние величины поля окуляра на площадь образца, видимую в оптический микроскоп.

В современных микроскопах полевая диафрагма либо предваряет оптическую систему окуляра, либо находится между её элементами. На рисунке 1 в разрезе представлены схемы окуляров Рамсдена и Гюйгенса с ходом лучей через полевую линзу, линзу окуляра и полевую диафрагму. Оптическая система окуляра Рамсдена (справа на рисунке 1) состоит из двух плосковыпуклых линз, разделённых фиксированным промежутком, определяемым их фокусными расстояниями. Первая из них называется **полевой линзой**, поскольку она ближе к плоскости микроскопа, где формируется промежуточное изображение. В конструкции окуляра Рамсдена полевая диафрагма расположена между отверстием тубуса и полевой линзой.

Во избежание визуализации вместе с образцом пылинок и других посторонних частиц и дефектов на поверхности линзы, во всех конструкциях современных окуляров полевая линза находится на достаточном расстоянии от плоскости промежуточного изображения. Верхняя линза, ближайшая к глазу наблюдателя, в обеих конструкциях называется **линзой окуляра**.

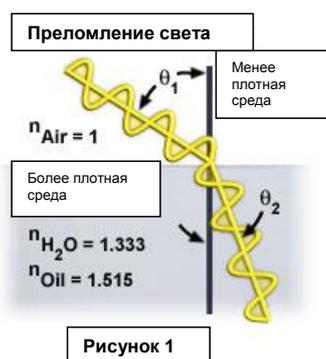


В окуляре Гюйгенса, показанном на рисунке 1 слева, полевая линза расположена перед плоскостью промежуточного изображения, совпадающей с полевой диафрагмой. В отличие от окуляра Рамсдена, в схеме Гюйгенса между глазом и полевыми линзами (в плоскости промежуточного изображения) находится фокальная точка. В этом случае линза окуляра играет роль линзы, увеличивающей промежуточное изображение.

Величина поля стандартных окуляров лежит в пределах между 6 и 28 миллиметрами и, в общем, падает с ростом увеличения окуляра. Например, величина поля окуляра с увеличением 10х лежит между 16 и 18 миллиметрами, тогда как окуляр с меньшим увеличением (5х) имеет величину поля около 20 миллиметров. На рисунке 2 сравниваются поля зрения, видимые в аналогичные окуляры: величина одного поля – 20, а другого – 26. Следует обратить внимание, что в окуляр с большей величиной поля видна большая площадь образца.

Размер полевой диафрагмы окуляра также зависит от исправления внеосевых aberrаций (комы, астигматизма и поперечной хроматической aberrации) объектива. Степень коррекции оптики современных окуляров весьма высока, что позволяет создавать **широкопольные** конструкции с величиной поля от 26 миллиметров и больше.

**Показатель (коэффициент) преломления** – Показатель преломления (среды) – это отношение скорости света в вакууме к скорости света в среде с большей плотностью. В текстах или в математических уравнениях показатель преломления чаще всего обозначается буквами **n** или **n'**.



Как показано на рисунке выше, фронт волны, падающей на поверхность раздела двух сред, преломляется при входе во вторую среду, если угол падения не прямой. Угол падения ( $\theta(1)$ ) и угол преломления ( $\theta(2)$ ) связаны между собой простым соотношением, известным как закон Снеллиуса:

$$n_1 \cdot \sin(\theta_1) = n_2 \cdot \sin(\theta_2)$$

где  $n$  – показатели преломления сред 1 и 2, а  $\theta$  – углы между световым лучом и нормалью к поверхности раздела. Из этого уравнения могут быть выведены несколько важных заключений. Если  $n(1)$  больше  $n(2)$ , угол преломления обязательно меньше угла падения. И наоборот, когда  $n(2)$  больше  $n(1)$ , угол преломления обязательно больше угла падения. При равенстве показателей преломления ( $n(1) = n(2)$ ) свет распространяется без преломления.

В оптической микроскопии показатель преломления является важной величиной при подсчёте числовой апертуры, которая определяет светосилу и разрешающую способность объектива. В большинстве случаев средой визуализации в микроскопе является воздух, но в объективах с высокой кратностью увеличения для повышения разрешающей способности между передней линзой объектива и образцом часто применяется масло или аналогичная жидкость. Числовая апертура определяется следующим уравнением:

$$NA(\text{числовая апертура}) = n \cdot \sin(\theta)$$

где  $n$  – показатель преломления среды визуализации, а  $\theta$  – угловая апертура объектива. Из уравнения очевидно, что увеличение показателя преломления при смене среды визуализации с воздуха (показатель преломления = 1,000) на низко дисперсионное масло (показатель преломления = 1,515) резко увеличивает числовую апертуру.

Примечание [И1]: Дисперсное - проверить

## Интерактивное учебное приложение Java

### Преломление света

Посмотрите, как преломляется световой луч при переходе из одной среды в другую. Обратите внимание на то, как преломление луча меняется с изменением угла падения и цвета световой волны.

Первоначально, закон Снеллиуса был определён как отношение между углами падения и скоростями света в двух средах. **Показателем преломления** называется отношение скорости света ( $c$ ) в свободном пространстве (на практике это всегда воздух или вакуум) к скорости света  $v$  в данной среде:

$$n = c/v$$

По мере роста показателя преломления среды растёт и степень отклонения или преломления светового луча при входе или выходе из этой среды. В некоторой степени показатель преломления зависит от частоты проходящего через среду света: чем больше частота, тем выше значение  $n$ . Например, показатель преломления фиолетового света в обычном стекле приблизительно на один процент больше, чем красного света. Вследствие этого явления, свет разных длин волн в некогерентном пучке преломляется по-разному, хотя эта разница и невелика. Этот эффект называется **дисперсией** и является причиной хроматической аберрации в объективах микроскопов.

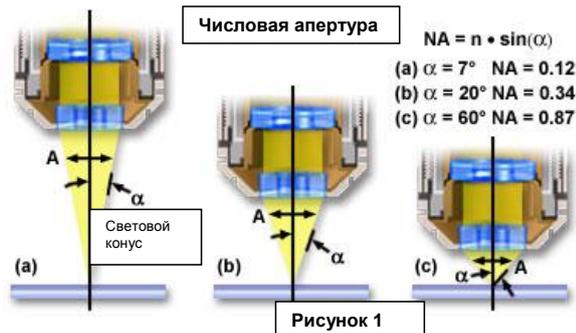
**Числовая апертура** – Числовая апертура объектива микроскопа является мерой его способности собирать свет и различать детали образца, находящиеся на заданном друг от друга расстоянии. На корпусе всех современных микроскопических объективов обозначена числовая апертура, по которой можно определить размер наименьшей разрешаемой объективом детали образца и приблизительно оценить глубину поля.

Понятие **числовой апертуры** (по-другому называемой **передней апертурой**) было впервые введено Аббе для объективов и конденсоров микроскопов, и часто сокращённо обозначается как **NA**. Она определяется простым выражением:

$$\text{Числовая апертура (NA)} = n \cdot \sin(\mu) \text{ или } n \cdot \sin(\alpha)$$

Примечание: Переменная  $\mu$  используется многими авторами для обозначения одной второй угловой апертуры, тогда как другие авторы используют более распространённое обозначение  $\alpha$ , а иногда  $\nu$ .

В уравнении для числовой апертуры  $n$  является показателем преломления среды между передней линзой объектива и образцом, а  $\mu$  или  $\alpha$  обозначают половину угловой апертуры объектива.



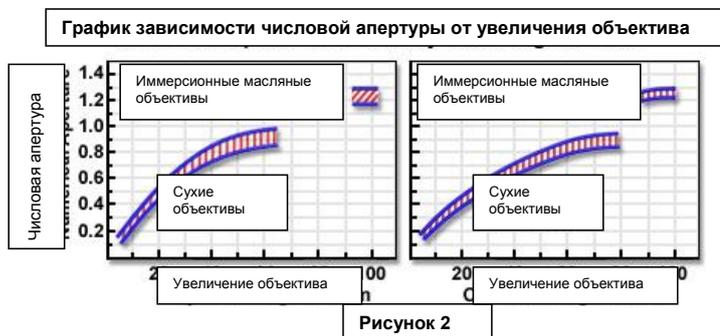
Числовая апертура объектива микроскопа является мерой его способности собирать свет и различать детали образца, находящиеся на заданном друг от друга расстоянии. На рисунке 1 (выше) формирующие изображение световые волны проходят через образец и, образуя обратный конус, попадают в объектив. Поперечный разрез этого конуса представляет собой угловую апертуру – величину, определяемую фокусным расстоянием объектива.

## Интерактивное учебное приложение Java

### Числовая апертура

Посмотрите, как изменения числовой апертуры влияют на размер и угловую апертуру световых конусов объективов.

На практике, числовая апертура сухих объективов редко превышает значение 0,95. На рисунке 1 представлена серия световых конусов объективов с различным фокусным расстоянием и числовой апертурой. Расширение светового конуса соответствует увеличению угловой апертуры ( $\alpha$ ) от  $7^\circ$  до  $60^\circ$ , а значит, и росту числовой апертуры с 0,12 до 0,87, что уже близко к пределу, достижимому при использовании воздуха в качестве среды визуализации. Более высокие числовые апертуры достигаются с ростом показателя преломления ( $n$ ) среды визуализации между образцом и передней линзой объектива. Объективы современных микроскопов позволяют использовать в качестве таких сред воду (показатель преломления = 1,33), глицерин (показатель преломления = 1,47) и иммерсионное масло (показатель преломления = 1,51). Числовая апертура объектива зависит ещё, в некоторой степени, от того, насколько в нём исправлены оптические aberrации.



Высоко скорректированные объективы при том же увеличении, обычно, имеют бóльшие числовые апертуры, как показано на рисунке 2 и в таблице 1 внизу. Если в качестве примера взять серию обычных объективов 10x, мы увидим, что для плоскопольных исправленных план-объективов числовая апертура растёт с ростом степени коррекции хроматической и сферической аберрации: планахромат, N.A. = 0.25; планфлюорит, N.A. = 0.30; планапохромат, N.A. = 0.45.

Тенденция возрастания числовой апертуры с повышением степени оптической коррекции объективов одинакового увеличения сохраняется в широком диапазоне увеличений, как показано в таблице 1. Для каждого класса объективов большинство производителей стремится обеспечить наивысшую степень коррекции и максимально высокую числовую апертуру.

#### Числовая апертура и оптическая коррекция

Увеличение	Планахромат (NA)	Планфлюорит (NA)	Планапохромат (NA)
0.5x	0.025	n/a	n/a
1x	0.04	n/a	n/a
2x	0.06	n/a	0.10
4x	0.10	0.13	0.20
10x	0.25	0.30	0.45
20x	0.40	0.50	0.75
40x	0.65	0.75	0.95
40x (масло)	n/a	1.30	1.00
60x	0.75	0.85	0.95
60x (масло)	n/a	n/a	1.40
100x (масло)	1.25	1.30	1.40
150x	n/a	n/a	0.90



**Таблица 1**

Большинство объективов с увеличением от 60x до 100x (и выше) созданы для использования с иммерсионным маслом. Из уравнения для числовой апертуры, представленного выше, следует, что максимальная теоретическая числовая апертура при использовании обычных иммерсионных масел равна 1,51 (когда  $\sin(\alpha) = 1$ ). На практике, тем не менее, максимальная числовая апертура иммерсионных масляных объективов не превышает 1,4, а чаще всего лежит в пределах от 1,0 до 1,35.

Примечание: Если специально не оговорено, под термином **числовая апертура** понимается передняя (со стороны объекта), а не задняя (со стороны изображения) апертура.

**Разрешающая способность** – Разрешающая способность микроскопа является наиболее важной характеристикой оптической системы и определяет её способность различать мелкие детали исследуемого образца. Как уже обсуждалось в этом разделе, основным фактором, определяющим разрешающую способность объектива, является числовая апертура, но разрешение также зависит от типа образца, когерентности освещения, степени коррекции aberrаций и других факторов, таких как усиление контраста либо в оптической системе микроскопа, либо в самом образце. Разрешающая способность оптического микроскопа определяется как наименьшее расстояние между двумя точками образца, которые все ещё могут быть различимы наблюдателем или камерой. На рисунке внизу (рисунок 1) это важное понятие продемонстрировано с помощью примера, в котором точечные источники света от образца возникают в плоскости промежуточного изображения микроскопа в виде дифракционной картины Эйри.



Пределом разрешающей способности объектива микроскопа в данном примере является его способность различать два близко расположенных в дифракционной картине (отмеченной на рисунке) диска Эйри. Трёхмерная дифракционная картина вблизи плоскости промежуточного изображения, известная как **функция рассеяния точки**, представлена в нижней части рисунка 1. Изображение образца представлено двумерно и трёхмерно в виде серии близко расположенных точечных источников света, формирующих картину Эйри.

Разрешающая способность в оптической микроскопии носит несколько субъективный характер, поскольку при сильном увеличении изображение, хотя и максимально разрешённое, может выглядеть нерезким. Числовая апертура определяет разрешающую способность объектива, но общее разрешение всей оптической системы микроскопа также зависит от числовой апертуры конденсора. Чем выше числовая апертура всей системы, тем выше её разрешающая способность.

 **Интерактивное учебное приложение Java**

**GO! JAVA Числовая апертура и разрешение изображения**  
 Исследуйте влияние числовой апертуры объектива на разрешение центральных ярких дисков, известных как диски Эйри и представленных в полученном с помощью микроскопа изображении дифракционной картины.

Тщательная юстировка оптической системы микроскопа также имеет первостепенное значение для достижения максимального разрешения. Конденсор должен соответствовать объективу по числовой апертуре, а юстировка его апертурной ирисовой диафрагмы должна давать чёткий световой конус и точное освещение образца. Спектр освещения, применяемого для наблюдения образца, также влияет на достижимое микроскопом разрешение. Освещение короткими длинами волн позволяет различать более мелкие детали. Существует несколько уравнений, описывающих соотношение между числовой апертурой, длиной волны и разрешающей способностью:

$$\text{Разрешающая способность } (r) = \lambda / (2NA) \quad (1)$$

$$\text{Разрешающая способность } (r) = 0.61 \lambda / NA \quad (2)$$

$$\text{Разрешающая способность } (r) = 1.22 \lambda / (NA(\text{об}) + NA(\text{конд})) \quad (3)$$

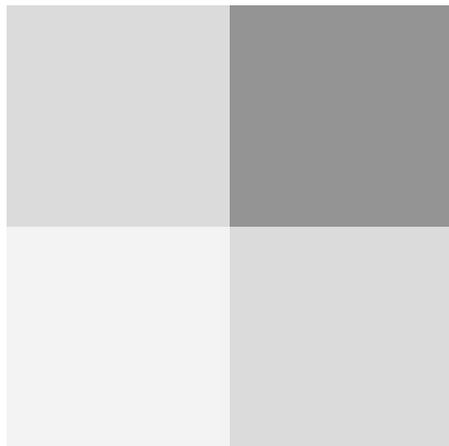
где  $r$  – разрешающая способность (наименьшее расстояние между двумя различимыми объектами),  $NA$  – обозначение общей числовой апертуры микроскопа,  $\lambda$  – длина волны визуализации,  $NA(\text{об})$  – числовая апертура объектива, а  $NA(\text{конд})$  – числовая апертура конденсора. Уравнения (1) и (2), как можно заметить, различаются множителем, равным 0,5 для уравнения (1) и 0,61 – для уравнения (2). Эти уравнения получены с учётом многих факторов (включая теоретические выкладки в области оптики), определяющих производительность объективов и конденсоров, но не должны рассматриваться как некий общий физический закон. В некоторых случаях, например в конфокальной и флуоресцентной микроскопии, разрешающая способность может, в действительности, превышать установленные любым из этих трёх уравнений пределы.

Другие факторы, такие как низкая контрастность образца и неправильное освещение, могут лишь понизить разрешающую способность, и реальное значение  $r$  (около 0,25 мкм при средней длине волны спектра 550 нанометров) и числовая апертура от 1,35 до 1,40 редко достижимы на практике. В следующей ниже таблице (таблица 1) представлены значения разрешающей способности ( $r$ ) и числовой апертуры (**NA**), соотносённые с увеличением и коррекцией объектива.

**Зависимость разрешающей способности и числовой апертуры объектива от его коррекции**

		Тип объектива					
		Планахромат		Планфлюорит		Планапохромат	
Увеличение	N.A.	Разрешающая способность (мкм)		Разрешающая способность (мкм)		Разрешающая способность (мкм)	
4x	0.10	2.75	0.13	2.12	0.20	1.375	
10x	0.25	1.10	0.30	0.92	0.45	0.61	
20x	0.40	0.69	0.50	0.55	0.75	0.37	
40x	0.65	0.42	0.75	0.37	0.95	0.29	
60x	0.75	0.37	0.85	0.32	0.95	0.29	
100x	1.25	0.22	1.30	0.21	1.40	0.20	

N.A. = Числовая апертура



**Таблица 1**

При идеальной юстировке микроскопа и соответствии между объективом и конденсором, общая числовая апертура в уравнениях (1) и (2) заменяется на числовую апертуру объектива, а уравнение (3) при этом сводится к уравнению (2). Стоит заметить, что множитель, определяемый увеличением, не входит ни в одно из этих уравнений, поскольку только числовая апертура и длина волны освещения влияют на разрешение образца.

Как уже упоминалось (и как видно из уравнений), длина волны света является важным фактором, определяющим разрешающую способность микроскопа. Короткие длины волн дают более высокое разрешение (меньшие значения  $r$ ) и наоборот. Наибольшая разрешающая способность достигается в оптической микроскопии при освещении ближним ультрафиолетовым светом, на самой короткой из эффективных волн визуализации. По способности различать детали образца за ближним ультрафиолетовым светом следует голубой, за ним зелёный и, наконец, красный свет. В большинстве случаев для освещения образца микроскопистами применяется белый свет, генерируемый галогенной лампой с вольфрамовой нитью. Середина видимого спектра приходится на длину волны около 550 нанометров, основную длину волны зелёного света (к этому свету наиболее чувствительны наши глаза). Именно эта длина волны использовалась

при расчётах разрешающей способности в таблице 1. Немаловажное значение в этих уравнениях имеет и числовая апертура, увеличение которой влечёт повышение разрешающей способности. Влияние длины волны света на разрешающую способность, при фиксированной числовой апертуре (0,95), отражено в таблице 2, из которой видно, как увеличение длины волны понижает разрешающую способность.

#### Зависимость разрешающей способности от длины волны

Длина волны (нанометры)	Разрешающая способность (микрометры)
360	.19
400	.21
450	.24
500	.26
550	.29
600	.32
650	.34
700	.37

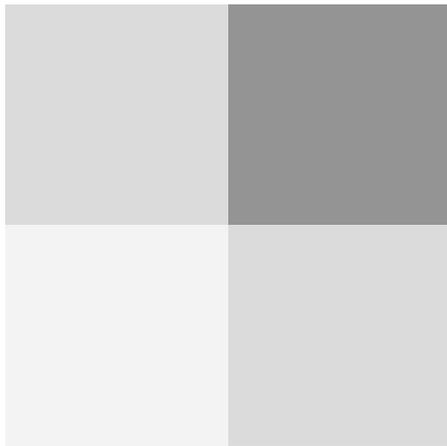


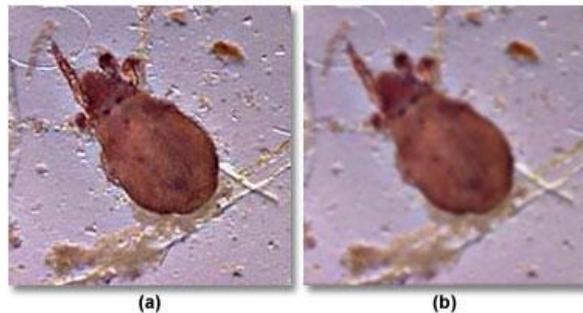
Таблица 2

Разрешающая способность микроскопа является наиболее важной характеристикой оптической системы и определяет её способность различать мелкие детали исследуемого образца. Как уже обсуждалось выше, основным фактором, определяющим разрешающую способность объектива, является числовая апертура, но разрешение также зависит от типа образца, когерентности освещения, степени коррекции aberrаций и других факторов, таких как усиление контраста либо в оптической системе микроскопа, либо в самом образце. В конечном счёте, разрешающая способность непосредственно связана с полезным увеличением микроскопа и пределом восприятия мелких деталей образца.

**Диапазон полезного увеличения** – Диапазон полезного увеличения комбинации объектив/окуляр определяется числовой апертурой системы. Минимальное увеличение, необходимое для различения мелких деталей образца, произвольно полагается равным числовой апертуре объектива, умноженной на число в диапазоне от 500 до 1000 (500 или 1000 x NA).

Чтобы мелкие детали образца были различимы в оптическом микроскопе, они должны быть достаточно контрастны и должны проецироваться на плоскость промежуточного изображения под углом, несколько бóльшим, чем угловая разрешающая способность человеческого глаза. Если (при заданной числовой апертуре) размер увеличенного микроскопом изображения достиг разрешающей способности человеческого глаза, его дальнейшее увеличение не приводит к различению ещё более мелких деталей.

Пустое увеличение



**Диапазон полезного увеличения** комбинации объектив/окуляр определяется числовой апертурой оптической системы микроскопа. Существует минимальное увеличение, необходимое для различения мелких деталей изображения, и его значение обычно произвольно полагается равным 500-кратной числовой апертуре ( $500 \times NA$ ) и описывается уравнением:

$$\text{Полезное увеличение (общее)} = \text{от } 500 \text{ до } 1000 \cdot NA \text{ (объектива)}$$

На другом конце этого интервала находится максимальное полезное увеличение изображения, которое обычно полагается равным 1000-кратной числовой апертуре ( $1000 \times NA$ ), как показано в уравнении выше. Увеличение большей кратности не даёт дополнительной полезной информации или большего разрешения деталей изображения и, обычно, приводит лишь к ухудшению его качества. В таблице 1 представлен список стандартных комбинаций объектив/окуляр, лежащих в диапазоне полезного увеличения.

**Диапазон полезного увеличения (500-1000 x NA объектива)**

Объектив (NA)	Окуляры				
	10x	12.5x	15x	20x	25x
2.5x (0.08)	---	---	---	x	x
4x (0.12)	---	---	x	x	x
10x (0.35)	---	x	x	x	x
20x (0.55)	x	x	x	x	x
40x (0.70)	x	x	x	x	---
60x (0.95)	x	x	x	---	---
100x (1.42)	x	x	---	---	---

Таблица 1

Превышение полезного увеличения приводит к тому, что изображение ухудшается из-за явления **пустого увеличения** (показано на рисунке 1(b)), когда в результате увеличения окуляром или промежуточным тубусом растёт лишь масштаб изображения без соответствующего роста разрешения деталей. И напротив, изображение на рисунке 1(a) было получено с помощью правильной комбинации объектива и окуляра, то есть числовая апертура была эффективно использована для достижения оптимального разрешения.

На самом деле, чрезмерное увеличение приводит к возникновению артефактов, эффекту гало (размытие границ изображения), что вуалирует детали образца и усложняет интерпретацию наблюдений. Микроскопические наблюдения также зависят от чувствительности человеческого глаза к интенсивности и цветовой температуре освещения, возраста наблюдателя, присутствия в глазах "**плавающих звездочек**" и усталости глаз.

### **Интерактивное учебное приложение Java Диапазон полезного увеличения**

С помощью этого интерактивного учебного приложения можно исследовать диапазон полезного увеличения комбинаций стандартных объективов и окуляров Nikon.

Для визуальных наблюдений необходимо, чтобы тонкая структура образца наблюдалась под углом, несколько большим разрешающей способности человеческого глаза. При хорошем освещении в микроскопе расстояние между двумя различными точками образца, наблюдаемого на стандартном расстоянии 250 миллиметров, равно примерно 0,15 миллиметра, что соответствует углу зрения около 2 угловых минут. Этот угол ограничен расстоянием между фоторецепторными клетками сетчатки, составляющим примерно пять микрон.

Чтобы связать предел разрешающей способности глаза с разрешающей способностью объектива, необходимо рассмотреть две близко расположенные точки образца. Если две точки лежат на предельном расстоянии друг от друга (в смысле разрешающей способности объектива), тогда:

$$r \text{ (расстояние между точками)} = \lambda/2NA$$

где  $r$  – расстояние между точками,  $\lambda$  – длина волны освещения, а  $NA$  – числовая апертура объектива. Следующее соотношение позволяет установить, во сколько раз необходимо увеличить это расстояние, чтобы выбранные точки образца отобразились на сетчатке разделёнными 0,15 миллиметра (что соответствует 2 угловым минутам):

$$0,15 \text{ мм} = M \cdot \lambda/2NA$$

что может быть выражено следующим образом:

$$M = (2NA \cdot 0,15)/\lambda$$

где  $M$  – оптимальное увеличение микроскопа. Если предположить, что образец освещается светом из зелёного участка видимого диапазона спектра (550 нанометров или 0,00055 миллиметров), уравнение может быть выражено, как:

$$M = (NA \cdot 0,30)/0,00055 = \text{(приблизительно)} 500 \cdot NA$$

Таким образом, минимальное увеличение, необходимое для визуального наблюдения мелких деталей образца, примерно в 500 раз больше числовой апертуры объектива. Это выводы касаются образцов, имеющих средний контраст, поскольку детали высококонтрастных образцов, даже при меньшем расстоянии между ними, могут быть различимы при более сильном увеличении. На практике, кратность применяемого увеличения часто лежит вне диапазона полезного увеличения. Например, очень низкие увеличения (от 1x до 4x) часто применяются для топографического картирования образцов (таких как гистологически

окрашенные тонкие срезы), когда желательно иметь широкое поле зрения для своевременной регистрации всех доступных характеристик образца. Во многих случаях объективы кратностью 2,5х могут применяться в комбинации с широкопольными окулярами с увеличением 10х, чтобы иметь возможность охватить площади диаметром 8 миллиметров и более.

Сильное увеличение, превышающее предел полезного увеличения, иногда применяется для удобства просмотра изображения. Часто к этому прибегают при наблюдении и подсчёте мелких частиц или организмов при высоких числовых апертурах и кратностях увеличения. При этом жертвуют резкостью деталей образца, которая обычно не влияет на количественный анализ изображения.

Для обеспечения оптимального увеличения без появления ненужных артефактов необходимо внимательно отнестись к выбору комбинации объектив/окуляр. Например, кратности увеличения 250х можно добиться комбинацией окуляра 25х и объектива 10х. Но, то же самое увеличение достигается и объединением окуляра 10х с объективом 25х. Поскольку объектив 25х имеет большую числовую апертуру (приблизительно 0,65), чем объектив 10х (приблизительно 0,25), и учитывая, что значение числовой апертуры определяет разрешающую способность объектива, очевидно, что вторая комбинация будет лучше. Сравнение микрофотографий, снятых этими комбинациями объектив/окуляр при одинаковом поле зрения, показало бы со всей очевидностью, что микрофотографии, полученные парой объектив 25х/окуляр 10х, отличаются большей детализацией и чёткостью изображения.

**Рабочее и парфокальное расстояние** – Объективы обычно проектируются таким образом, чтобы уменьшить их свободное рабочее расстояние, которое определяется как расстояние от передней линзы объектива до ближайшей поверхности покровного стекла, при условии, что образец находится в фокусе. Если наблюдение проводится без покровного стекла, рабочим расстоянием является расстояние от передней линзы объектива до поверхности образца.



На рисунке 1 представлено схематическое изображение объектива, на котором показаны его парфокальное и рабочее расстояние, а также некоторые обозначения, выгравированные или напечатанные на его корпусе. В общем, рабочее расстояние объектива падает с ростом кратности увеличения и числовой апертуры, как показано в таблице 1 для серии высоко скорректированных планфлюоритовых и планапохроматических объективов компании Nikon. Сегодня существует тенденция к производству сухих объективов с максимально большим рабочим расстоянием, но это стремление ограничено необходимостью, в то же самое время, иметь высокую разрешающую способность, для чего требуются большие числовые апертуры. В результате, производители вынуждены искать компромисс между этими двумя параметрами.

#### Рабочие расстояния стандартных объективов

Производитель	Коррекция	Увеличение	Числовая апертура	Рабочее расстояние
Nikon	PlanApo	10x	0.45	4.0 мм
Nikon	PlanFluor	20x	0.75	0.35 мм
Nikon	PlanFluor (масло)	40x	1.30	0.20 мм
Nikon	PlanApo (масло)	60x	1.40	0.21 мм
Nikon	PlanApo (масло)	100x	1.40	0.13 мм

Таблица 1

Иммерсионные объективы, которые работают в условиях, когда пространство между покровным стеклом и передней линзой заполнено жидкостью с определённым показателем преломления, более ограничены по длине рабочего расстояния. При слишком большом рабочем расстоянии сохранение конфлюэнтности иммерсионной среды может стать проблематичным, что иногда приводит к возникновению аберраций и, как следствие, ухудшению изображения. Объективы с очень короткими рабочими расстояниями имеют пружинный механизм, обеспечивающий возвратное перемещение всего узла передней линзы объектива при соприкосновении с покровным стеклом. Эти оправы, которые часто называют **ограничителями перемещения**, предотвращают случайное повреждение, как образца, так и передней линзы объектива при соприкосновении.

## Интерактивное учебное приложение Java

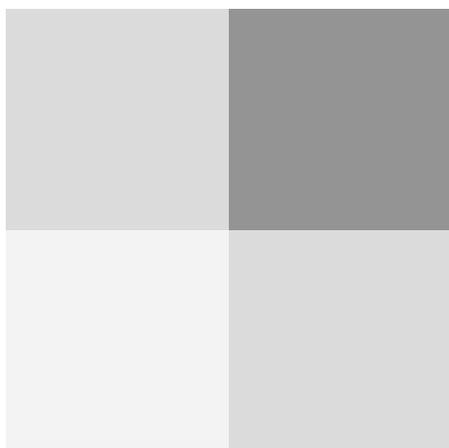
### Рабочие расстояния объективов

С помощью этого приложения можно ознакомиться с рабочими расстояниями современных объективов CF160 компании Nikon.

Для многих приложений желательно (а часто и необходимо) иметь большие свободные рабочие расстояния, поэтому для них создаются специальные объективы, несмотря на трудности, связанные с необходимостью сохранения высоких числовых апертур и приемлемой степени коррекции оптических аберраций. Объективы с большими рабочими расстояниями особенно необходимы при исследовании сквозь толстые стеклянные стенки образцов *in vitro*, а также в микроскопии для химической и металлургической промышленности, где переднюю линзу объективов необходимо защищать толстым покровным стеклом от таких внешних агрессивных условий, как высокая температура, едкие пары и летучие химикаты. По рабочим расстояниям такие объективы часто в два или три раза превосходят аналогичные объективы с той же или слегка большей числовой апертурой. В таблице 2 приведён список скорректированных на бесконечность объективов компании Nikon с очень большими рабочими расстояниями (**ELWD**) и сверхбольшими рабочими расстояниями (**SLWD**). Необходимо заметить, что хотя рабочее расстояние и падает с ростом кратности увеличения и числовой апертуры, но не так резко, как у объективов в таблице 1. Также следует обратить внимание на то, что объективы SLWD имеют существенно большие рабочие расстояния и, соответственно, меньшие числовые апертуры, чем объективы серии ELWD.

### Объективы с большими рабочими расстояниями

Обозначение	Увеличение	Числовая апертура	Рабочее расстояние
ELWD	20x	0.40	11.0 мм
ELWD	50x	0.55	8.7 мм
ELWD	100x	0.80	2.0 мм
SLWD	10x	0.21	20.3 мм
SLWD	20x	0.35	20.5 мм
SLWD	50x	0.45	13.8 мм
SLWD	100x	0.73	4.7 мм



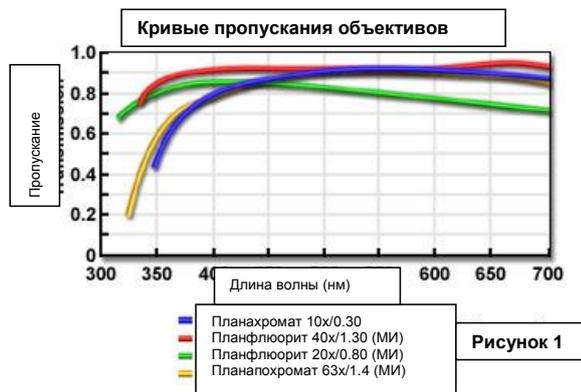
**Таблица 2**

Современные технологии производства обеспечивают значительно более высокую механическую точность при задании характеристик микроскопических объективов, включая центрирование и парфокальное расстояние – расстояние между плоскостью образца и фланцем объектива, которым он крепится к револьверному держателю (см. рисунок 1). Благодаря этому, в современных исследовательских микроскопах образец, при смене объективов на револьверном держателе, находится в фокусе (с точностью порядка микрона) и отцентрирован в поле зрения.

В течение многих лет объективы большинства производителей, изготовленные для биологических приложений, отвечали международному соглашению, по которому парфокальное расстояние равнялось 45,0 миллиметрам (стандарт Королевского микроскопического общества (RMS), определяющий размер резьбового соединения объектива с револьверным держателем), а длина тубуса составляла 160 миллиметров. Таким образом, объективы разных производителей оказывались взаимозаменяемыми. Однако, с появлением объективов, скорректированных на бесконечность, удобная взаимозаменяемость объективов разных производителей опять пропала. Основная причина этого заключается в различных критериях, применяемых для коррекции аберрации объективов и тубусных линз, а также возросшая необходимость увеличения рабочих расстояний при одновременном увеличении числовых апертур и размера поля.

Недавно компанией Nikon была выпущена оптическая система **CFI-60** с «не содержащими хрома» объективами, тубусными линзами и окулярами, благодаря чему стала возможной независимая коррекция каждого компонента. Парфокальное расстояние и диаметр резьбового соединения объективов в этой системе отличаются от стандартных RMS размеров и составляют, соответственно, 60 и 25 миллиметров.

Яркость изображения – Независимо от способа визуализации, яркость изображения в оптической микроскопии определяется светосилой объектива, которая, в свою очередь, является функцией числовой апертуры. Также как яркость освещения определяется квадратом рабочей числовой апертуры конденсора, яркость изображения пропорциональна квадрату числовой апертуры объектива.



Тем не менее, в отличие от системы освещения микроскопа, кратность увеличения изображения также существенно влияет на его яркость. В действительности, яркость изображения обратно пропорциональна квадрату поперечного увеличения:

$$\text{Яркость изображения} \propto (NA/M)^2$$

где **NA** – числовая апертура объектива, а **M** – кратность увеличения. Отношение в приведенном выше выражении является светосилой объектива в режиме проходящего света (необходимо иметь в виду, что при эпи-освещении она несколько отличается, как показано ниже). Светосила отдельных объективов Nikon, имеющих разную степень оптической коррекции, приведена в таблице 1. В общем случае, aberrации в объективах с высокой числовой апертурой исправлены лучше. Таким образом, при том же увеличении объективы с высокой числовой апертурой собирают больше света, дают более яркое и исправленное изображение (см. таблицу 1), что, в итоге, приводит к его лучшему разрешению.

Из таблицы 1 очевидно, что в проходящем свете яркость изображения быстро падает с ростом увеличения. Применение специально разработанных для эпи-освещения объективов даёт существенно более яркие изображения при росте увеличения, в отличие от аналогичных объективов для проходящего света, часто демонстрирующих обратное. Обозначения **F(прох)** и **F(эпи)** относятся к светосиле объектива и были получены из следующих уравнений:

$$F_{\text{(прох)}} = 10^4 \cdot NA^2/M^2$$

$$F_{\text{(эпи)}} = 10^4 \cdot (NA^2/M)^2$$

Теоретически, интенсивность освещения зависит от квадрата числовой апертуры конденсора и квадрата уменьшения изображения светового источника (на самом деле, яркость изображения полевой диафрагмы растёт при уменьшении его размера по квадратичному закону). В результате, яркость изображения образца на сетчатке (или в камере) прямо пропорциональна квадрату числовой апертуры объектива и обратно пропорциональна

кратности увеличения объектива. Поэтому при наблюдении в проходящем свете, смена объектива (при том же конденсоре) влечёт изменение яркости изображения в соответствии с изменениями числовой апертуры и увеличения.

#### Светосила некоторых объективов

Коррекция	Увеличение	Числовая апертура	F(прох)	F(эпи)
Plan Achromat	10x	0.25	6.25	0.39
Plan Apo	10x	0.45	20.2	4.10
Plan Fluorite	20x	0.50	6.25	1.56
Plan Apo	20x	0.75	14.0	7.90
Plan Achromat	40x	0.65	2.64	1.11
Plan Apo	40x (масло)	1.30	11.0	18.0
Plan Fluorite	60x	0.85	2.01	1.45
Plan Apo	60x (масло)	1.40	5.4	10.6
Plan Apo	100x (масло)	1.40	1.96	3.84
Plan Apo	100x (масло)	1.45	2.10	4.42

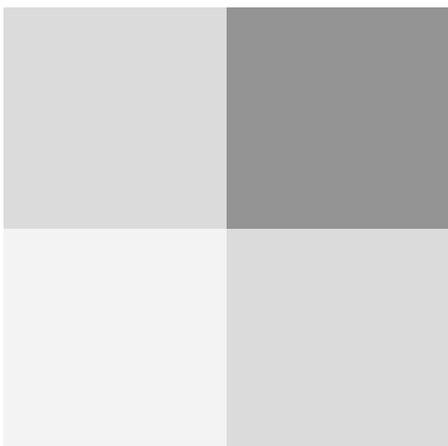


Таблица 1

При эпи-освещении во внимание принимаются те же соображения, но с учётом того, что объектив выступает одновременно и в роли конденсора. С ростом увеличения объектива изображение источника света сокращается в соответствующей пропорции, отражаясь на уровне яркости, который в меньшей степени зависит от увеличения и в большей степени от числовой апертуры (при эпи-освещении яркость пропорциональна четвёртой степени числовой апертуры). На практике, уровень яркости изображения (см. таблицу 1) меняется с размером задней апертуры объектива.

Когда имеется ограничение уровня освещенности, необходимо применять объективы с максимально высокими числовыми апертурами, тогда как увеличения и объективов, и окуляров должны быть как можно меньше для обеспечения желаемого разрешения. Сегодня производителями, во многих случаях, предлагаются иммерсионные масляные объективы с более высокими числовыми апертурами, и, соответственно, более высокими уровнями яркости изображений, чем их сухие аналоги того же увеличения. Например, числовая

апертура масляного планахроматического объектива 40x в таблице 1 в два раза больше числовой апертуры сухого планахроматического объектива 40x и даёт вчетверо большую яркость в проходящем свете. При эпифлуоресцентном освещении эти масляно-иммерсионные объективы с высокой числовой апертурой дают 16-кратное увеличение уровня яркости изображения.

Количество света, проходящего через оптические элементы микроскопа, как функция интенсивности падающего потока, особенно критично во флуоресцентной микроскопии. В тех ситуациях, когда флуоресцентная визуализация с высоким разрешением требует сильного увеличения без потери яркости, необходимо применять объективы с максимальными числовыми апертурами и наибольшим пропусканием света. Как обсуждалось выше, общая яркость изображения быстро падает с ростом увеличения, поэтому компоненты флуоресцентного микроскопа должны тщательно отбираться для максимального увеличения количества света, проходящего через оптическую систему.

Флуоресцентные микроскопы, в которых применяется эпи-освещение, оснащаются объективами с двойным назначением (объектив-конденсор). Свет, пропущенный фильтром возбуждения и отражённый от поверхности дихроичного зеркала в фильтрационном кубе, сначала проходит через объектив и формирует конус освещения, необходимый для возбуждения образца. Вторичная флуоресценция, испускаемая флуорофорами, нанесенными на образец, собирается тем же объективом и прежде, чем попасть в окуляр или систему формирования изображения, проходит обратно через дихроичное зеркало и запирающий фильтр. Объектив с высокой числовой апертурой, выполняющий функцию конденсора, повышает интенсивность сигнала (света) пропорционально квадрату числовой апертуры. Поскольку светосила объектива также пропорциональна квадрату числовой апертуры, яркость изображения будет меняться пропорционально четвертой степени числовой апертуры объектива согласно выражению:

$$\text{Яркость изображения (Флуоресценция)} \propto NA^4/M^2$$

Необходимо заметить, что во флуоресцентной микроскопии яркость также обратно пропорциональна квадрату увеличения объектива. Таким образом, для объективов одинакового увеличения, яркость как поля освещения, так и флуоресцентного изображения существенно возрастает с увеличением числовой апертуры объектива, и, главным образом, поэтому производители выпускают специально разработанные для флуоресцентной микроскопии объективы с высокими числовыми апертурами.

Дальнейшее увеличение дифракционно-ограниченного изображения, проецируемого на плоскость промежуточного изображения микроскопа, производится окулярами, которые также уменьшают общую интенсивность испускаемого образцом свечения. В действительности, яркость изображения обратно пропорциональна кратности увеличения окуляра, поэтому для нормального наблюдения флуоресценции образца необходимо использовать окуляры с возможно более низким увеличением. Поэтому во флуоресцентной микроскопии, для максимального увеличения яркости изображения следует применять объективы с возможно большей числовой апертурой в сочетании с наименее мощными окулярами (хотя чаще всего используются окуляры увеличением 10x). Эти замечания, в основном, применимы при наблюдении больших равномерно освещённых областей. В случае остро сфокусированных точечных источников света (например, мельчайшие флуоресцентные сферы), изображения этих точек являются дифракционно-ограниченными и имеют размеры, независимые от увеличения.

Во флуоресцентной микроскопии яркость изображения определяется интенсивностью освещения, квантовым выходом флуорофора и светосилой микроскопа. Чем выше интенсивность освещения и квантовый выход, тем сильнее флуоресцентный сигнал и ярче изображение, пока не наступит насыщение флуорофоров. Подобным образом, при наблюдениях в поляризованном свете, яркость изображения зависит от интенсивности освещения и величине запаздывания луча при двойном лучепреломлении. Пока фазовый сдвиг не превышает четверти длины волны, увеличение запаздывания приводит к большему лучепреломлению и, следовательно, к усилению сигнала.

В обоих случаях яркость изображения определяется идущим от образца сигналом, который зависит от интенсивности освещения и изменений, происходящих со светом в образце. В случае люминесценции, когда образец сам испускает свет, яркость изображения зависит от силы этого сигнала (от интенсивности автосвечения).

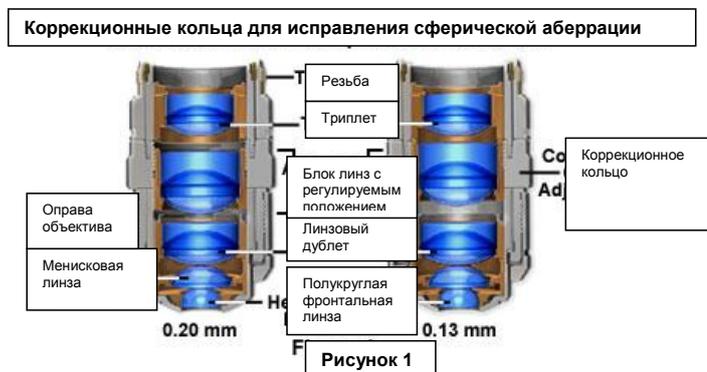
В других режимах наблюдения, таких как фазовый контраст, дифференциальный интерференционный контраст (ДИК), метод тёмного поля, модуляционный контраст Хоффмана и т.д., интенсивность освещения и контрастность изображения меняются независимо друг от друга. Тем не менее, сигнал от образца, а именно увеличение яркости изображения на единицу изменения оптического параметра (например, разницы хода луча) всё равно будет определяться произведением яркости освещения и контраста, вызванного величиной изменения оптического параметра. Для регистрации изменений любого оптического параметра, микроскописту необходимо максимально увеличить сигнал, вызванный изменением именно этого параметра.

При заданных числовых апертурах конденсора и объектива, кратностях увеличения и интенсивности освещения, яркость формируемого микроскопом изображения будет, тем не менее, зависеть от пропускания света оптическими компонентами. Пропускание света зависит от многих факторов, включая поглощение линзами и клеями, потери при отражении на оптических поверхностях, коэффициента пропускания колбы лампы, диффузоров, фильтров, поляризаторов и других дополнительных оптических компонентов. Типичные кривые пропускания для отдельных светосильных объективов представлены на рисунке 1. Эти значения более или менее типичны для любого класса объективов, выпущенных разными производителями, но даже для объективов специального типа, представленного кривыми на рисунке, коэффициенты пропускания могут меняться, например, в зависимости от просветляющих покрытий и партии стекла, из которого была изготовлена конкретная линза.

Коэффициенты пропускания (отношение интенсивности пропущенного к интенсивности падающего света) некоторых оптических компонентов могут зависеть от длины волны даже в пределах видимого диапазона, как показано на рисунке 1. На длинах волн вне видимого спектра коэффициенты пропускания линз, призм, предметных столиков и среды для заливки образца также могут заметно падать. На рисунке 1 это проиллюстрировано кривой пропускания планфлюоритового объектива 20х, демонстрирующего равномерное падение коэффициента пропускания при увеличении длины волны от 400 до 700 нанометров. Другие объективы этой серии не обнаруживают такой явной зависимости от длины волны.

**Коррекция покровного стекла** – При наблюдениях через покровные стёкла с нестандартной толщиной и показателями преломления неиммерсионные **сухие** объективы микроскопов с числовыми апертурами, превышающими 0,75, часто искажают изображения из-за возникающих аберраций. Для предотвращения артефактов многие объективы оснащаются коррекционными кольцами, которыми можно компенсировать изменения толщины покровных стёкол.

Для микроскопических объективов с высокими числовыми апертурами оптические свойства и толщина среды между передней линзой объектива и образцом имеют критическое значение для расчёта условий апланатической коррекции и условий синусов – другими словами, для исправления искажений изображения.



Если показатели преломления и дисперсия передней линзы гомогенных иммерсионных объективов и иммерсионного масла, покровного стекла и гистологической среды соответствуют друг другу, эти расчёты достаточно просты, поскольку вся среда в этом случае может рассматриваться как продолжение передней линзы объектива.

Однако, при использовании неиммерсионных объективов, покровное стекло может стать источником хроматической аберрации, возрастающей с толщиной покровного стекла и дисперсией. Другой оптический артефакт – сферическая аберрация – также пропорционален толщине покровного стекла. При создании объективов, не предназначенных для гомогенной иммерсии, предполагается стандартная толщина покровного стекла и определённая оптическая среда между передней линзой объектива и образцом. Если условия наблюдения отличаются от расчётных, сферическая аберрация и кома возрастают с числовой апертурой объектива. Это происходит потому, что изменение тангенса и синуса угла падения (благодаря которому происходит нарушение условия синусов, необходимого для коррекции этих аберраций) растёт с увеличением числовых апертур.

При использовании иммерсионных масляных объективов может оказаться, что толщина покровного стекла не сильно влияет на изображение, поскольку показатели преломления стекла и иммерсионного масла приблизительно совпадают. Это верно, когда образец погружён в канадский бальзам или другую среду для заливки, показатели преломления которых совпадают с показателем преломления покровного стекла. Но если образец погружён, например, в физиологический раствор или другую водную среду с показателем преломления, значительно отличающимся от покровного стекла, это уже не так. В этих условиях фокусировка даже через тонкий слой воды толщиной всего 10 микрон может привести к существенным аберрациям и нарушению симметрии функции рассеяния точки (ФРТ) выше и ниже фокальной плоскости. Причина этого в том, что при разработке иммерсионных масляных объективов предполагается однородность иммерсионной среды, окружающей образец (предметный столик). Оптические допущения, принятые при расчёте коррекций аберрации, остаются действительными только в случае плотного прилегания образца к покровному стеклу (даже в водном окружении).

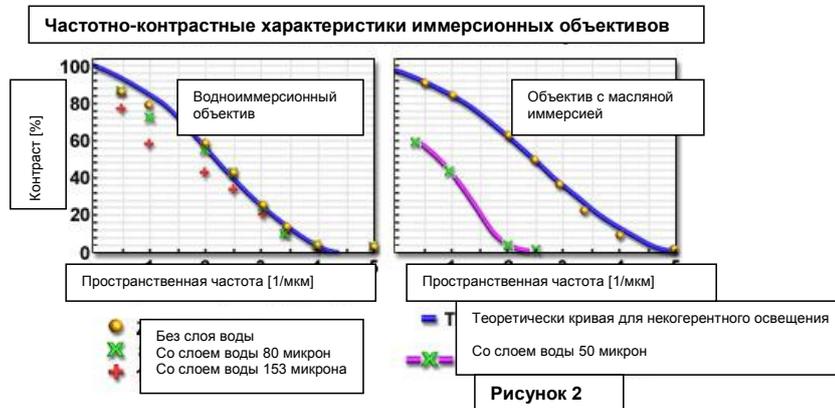
## Интерактивное учебное приложение Java

### Коррекция покровного стекла

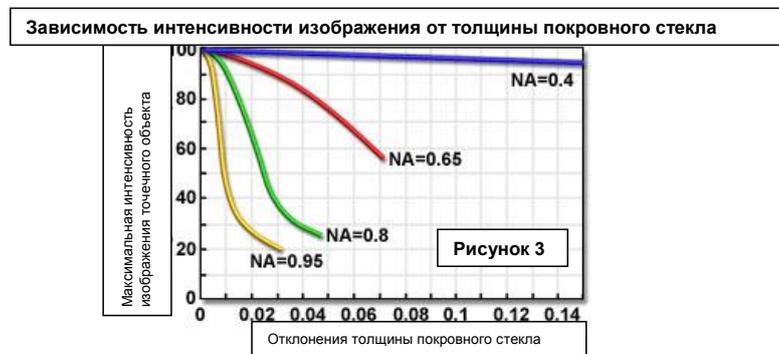
**Юстировка внутренних линз сухого объектива с высокой числовой апертурой для исправления аберраций, вызванных изменением толщины покровного стекла.**

Эти свойства иммерсионных масляных объективов были осознаны производителями микроскопов приблизительно в 1994 году, после чего они стали выпускать хорошо скорректированные водные иммерсионные объективы. Иммерсионные водные объективы Plan Apo, оснащённые коррекционными кольцами, имеют числовую апертуру около 1,2, и, хотя их числовая апертура меньше их масляных аналогов, они уже способны преодолеть ограничения, присущие визуализации сквозь водные растворы (см. рисунок 2). Конструкции

последних иммерсионных водных объективов позволяют производить фокусировку сквозь водную среду толщиной около 200 микрон, сохраняя при этом превосходную коррекцию. К сожалению, их цена очень высока, и они всё ещё не дают приемлемого изображения при погружении вглубь преломляющих тканей или клеток.



Частотно-контрастные функции иммерсионного водного объектива 60x с числовой апертурой 1,2 и иммерсионного масляного объектива 60x с числовой апертурой 1,4 (оба планохроматы) со слоем воды между покровным стеклом и тестовой дифракционной решёткой и без него представлены на рисунке 2. Из этих графиков видно, что функция передачи контраста водоиммерсионного объектива лежит в пределах теоретических значений даже при толщине водного слоя 153 микрона, тогда как частотно-контрастная характеристика объектива с масляной иммерсией существенно хуже, и его разрешающая способность падает вдвое при наблюдении тестовой дифракционной решётки уже сквозь 50-микронный слой воды. Сплошные линии представляют теоретически рассчитанные частотно-контрастные характеристики свободных от aberrаций объективов с соответствующими числовыми апертурами на длине волны 546 нанометров.



Для объективов, разработанных для применения с покровными стёклами стандартной толщины и показателем преломления/дисперсией (0,17 миллиметра и  $n(D) = 1,515$ ), изменения в толщине стекла не слишком критичны, если числовая апертура объективов не превышает 0,4 (как показано в таблице 1).

Однако, для объективов с неоднородной иммерсией и высокой числовой апертурой проблема стоит настолько остро, что отклонение толщины покровного стекла даже на микрометр или два уже ухудшает изображение, если числовая апертура **сухого** объектива 0,65 или более.

Эта закономерность проиллюстрирована на рисунке 3, где максимальная интенсивность изображения точечного объекта (как функция числовой апертуры) представлена в

зависимости от отклонения толщины покровного стекла от «идеального» значения 0,17 миллиметра. Для компенсации этих ошибок хорошо скорректированные сухие объективы с высокой числовой апертурой оснащены коррекционными кольцами, с помощью которых можно изменять положение внутренних линз объективов в соответствии с толщиной покровного стекла. Коррекционными кольцами оснащены также и объективы, предназначенные для наблюдения через слой силикона или пластика, или другую иммерсионную среду (воду, глицерин, масло).

#### Ухудшение оптических характеристик с изменением толщины покровного стекла

Числовая апертура	Отклонение 0.01 мм	Отклонение 0.02 мм
0.30	нет	нет
0.45	нет	нет
0.70	2 процента	8 процентов
0.85	19 процентов	57 процентов
0.95	55 процентов	71 процент

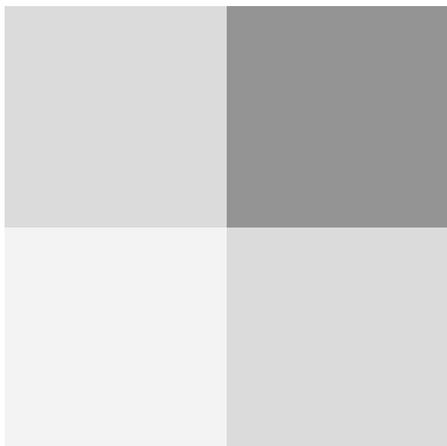


Таблица 1

Стандартная толщина покровных стёкол 0,17 миллиметра, что обозначается числом 1½. К сожалению, не все производимые покровные стёкла 1S укладываются в этот жёсткий допуск, а во многих случаях между образцом и покровным стеклом находится какая-нибудь среда. Компенсация изменения толщины покровного стекла может быть осуществлена подгонкой длины механического тубуса микроскопа или (как говорилось ранее) специальными **коррекционными кольцами**, меняющими положение между главными линзами внутри объектива. Регулировка коррекционным кольцом компенсирует изменения толщины и обеспечивает оптимальную производительность объектива. Чтобы эффективно пользоваться коррекционными кольцами, микроскопист должен быть достаточно опытным и понимать, каким образом эта регулировка влияет на изображение. Почти всегда, при регулировке

коррекционными кольцами, фокус сдвигается, и изображение начинает «гулять». Поэтому регулировку необходимо проводить пошагово, каждый раз отслеживая внесённые в изображение изменения. Ниже приведена последовательность действий по регулировке.

- Поверните коррекционное кольцо таким образом, чтобы индикаторная риска на корпусе объектива совпала с риской 0,17 миллиметров шкалы, вырезанной на кольце.
- Поместите образец на предметный столик и сфокусируйте микроскоп на мелкой детали образца.
- Слегка поверните коррекционное кольцо и перефокусируйте объектив, чтобы посмотреть, ухудшится или улучшится изображение. Сначала поверните кольцо так, чтобы задать большее компенсационное значение (0,18 – 0,23), поскольку в большинстве случаев толщина накрывающего образец «сэндвича» покровное стекло/среда достаточно велика.
- Повторите предыдущее действие, чтобы определить, ухудшается или улучшается изображение при повороте коррекционного кольца в одном направлении.
- Если изображение стало хуже, повторите те же действия, только повернув коррекционное кольцо в противоположном направлении (в сторону меньших значений), чтобы найти положение с оптимальным разрешением и контрастом.

На рисунке 1 изображён объектив 60x с числовой апертурой 0,85, оснащённый коррекционным кольцом для фокусировки на образце через покровное стекло толщиной до 1,5 миллиметров без изменений настроек фокусировки самого микроскопа. Регулировочный блок линз в центре оптической системы представляет собой склейку из трех линз, перемещаемую в различные положения для компенсации колебаний толщины покровного стекла.

Регулировка коррекционными кольцами объективов – Большинство микроскопических объективов предназначено для применения с покровными стёклами стандартной толщины 0,17 миллиметров и показателем преломления 1,515, что вполне удовлетворительно при числовой апертуре объектива 0,4 или меньше. Однако, при использовании сухих объективов с высокой числовой апертурой (от 0,8 и больше) изменение толщины покровного стекла всего на несколько микрометров приводит к серьёзному ухудшению изображения из-за аберраций, усиливающих с ростом толщины. Для компенсации этих искажений высоко скорректированные объективы оснащаются коррекционными кольцами, позволяющими регулировать положение центральной группы линз с целью компенсации колебаний толщины покровного стекла. В этом интерактивном учебном приложении показано, каким образом регулировка коррекционных колец влияет на качество изображения.

## Интерактивное учебное приложение Java

### ВНИМАНИЕ

Нашими серверами обнаружено, что на вашем браузере не установлена виртуальная машина Java, либо она не работает. Установите это программное обеспечение для просмотра наших интерактивных учебных приложений Java. Пользователи браузеров Нетскейп (Netscape) и Интернет-эксplorер могут загрузить необходимое программное обеспечение с официальных сайтов этих браузеров. Убедительная просьба не обращаться к нам за информацией об URL-адресах, где распространяется это программное обеспечение.

При запуске этого учебного приложения в окне **Микроскопическое изображение** возникает произвольно выбранный образец, справа от которого находится объектив с коррекционным кольцом, представленный в разрезе. При этом, также, происходит произвольный выбор толщины покровного стекла для образца, наблюдаемого в окне **Микроскопическое изображение**. Для работы в приложении воспользуйтесь ползунком **Коррекционное кольцо** (обратите внимание, что **Подвижный блок линз** также перемещается ползунком), чтобы выставить примерное значение 0,17 или стандартную толщину покровного стекла. Затем, с помощью ползунка **Фокус микроскопа** добейтесь наиболее резкого изображения. В зависимости от начальной толщины покровного стекла (выбранной приложением), изображение образца может ухудшиться или, наоборот, стать резче при перемещении

ползунков вправо или влево. Продолжая перемещать ползунки **Коррекционное кольцо** и **Фокус микроскопа**, найдите такое положение, при котором качество изображения будет наилучшим. Интервал корректируемой толщины покровного стекла в этом приложении составляет от 0,10 до 0,25 миллиметра.

Стандартная толщина покровных стёкол 0,17 миллиметра (170 микрометров), что обозначается числом 1½. К сожалению, не все производимые покровные стёкла 1S укладываются в этот жёсткий допуск, а во многих случаях между образцом и покровным стеклом находится какая-нибудь среда с изменяющимся показателем преломления. Компенсация изменения толщины покровного стекла может быть осуществлена подгонкой длины механического тубуса микроскопа или специальными **коррекционными кольцами**, изменяющими положение между главными линзами внутри объектива. Регулировка коррекционным кольцом компенсирует изменения толщины и обеспечивает оптимальную производительность объектива. Чтобы эффективно пользоваться коррекционными кольцами, микроскопист должен быть достаточно опытным и понимать, каким образом эта регулировка влияет на изображение. Почти всегда, при регулировке коррекционными кольцами, фокус сдвигается, и изображение начинает «гулять». Поэтому регулировку необходимо проводить пошагово, каждый раз отслеживая внесённые в изображение изменения. Ниже приведена последовательность действий.

- Поверните коррекционное кольцо таким образом, чтобы индикаторная риска на корпусе объектива совпала с риской 0,17 миллиметров шкалы, вырезанной на кольце.
- Поместите образец на предметный столик и сфокусируйте микроскоп на мелкой детали образца.
- Слегка поверните коррекционное кольцо и перефокусируйте объектив, чтобы посмотреть, ухудшится или улучшится изображение. Сначала поверните кольцо так, чтобы задать большое компенсационное значение (0,18 – 0,23), поскольку в большинстве случаев толщина накрывающего образец «сэндвича» покровное стекло/среда достаточно велика.
- Повторите предыдущее действие, чтобы определить, ухудшается или улучшается изображение при повороте коррекционного кольца в одном направлении.
- Если изображение стало хуже, повторите те же действия, только повернув коррекционное кольцо в противоположном направлении (в сторону меньших значений), чтобы найти положение с оптимальным разрешением и контрастом.

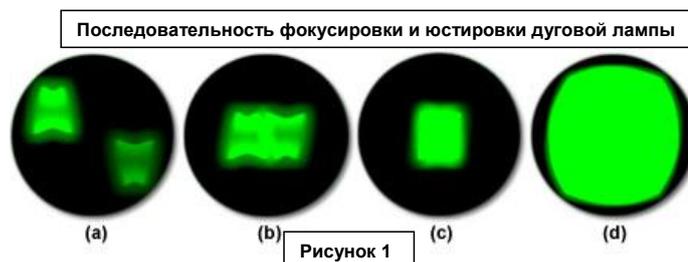
При проектировании сухих объективов с высокой числовой апертурой в расчёты закладываются оптические свойства и толщина среды, расположенной между передней линзой и покровным стеклом, чтобы обеспечить необходимое для оптической коррекции выполнение апланатических условий и условий синусов. Если объективы предназначены для применения вместе с маслом в качестве среды визуализации, то масло считается продолжением передней линзы, и на этом строится коррекция объективов. В тех случаях, когда применяются неиммерсионные объективы, рассчитанные на то, что пространство между передней линзой и покровным стеклом заполнено воздухом, малые отклонения в толщине покровного стекла и его дисперсионных свойствах могут стать причиной комы, хроматической и сферической аберрации. Такая же проблема возникает и с объективами, предназначенными для наблюдения образцов, погружённых в глицерин или воду. Для эффективного использования объективов с коррекционными кольцами необходима практика и внимательное отношение. Во время регулировки фокус часто сдвигается, а изображение «гуляет», что может привести к неправильной фокусировке и усилению аберрационных искажений.

**Фокусировка и юстировка дуговых ламп** – Ртутные и ксеноновые дуговые лампы являются весьма распространёнными источниками освещения в широкопольной флуоресцентной микроскопии. С помощью этого интерактивного учебного приложения, имитирующего юстировку лампы во флуоресцентном микроскопе, можно приобрести опыт юстировки и фокусирования дуги лампы **Ртутной и Ксеноновой лампы**.

Каждый раз при запуске приложения регулировочные ползунки занимают произвольное положение, при котором необходима настройка изображения дуги, проецируемого на

предметный столик. Для начала работы в приложении, селективной кнопкой, расположенной в нижней части окна, следует выбрать тип лампы (она может быть **Ртутная** или **Ксеноновая**). Потом, с помощью ползунка **Фокус собирающей линзы** добейтесь того, чтобы в окне появилось одно или два изображения в виде галстука-бабочки (имитирующих сфокусированный прямой и зеркальный образ дуги). С помощью ползунка **Положение зеркала в осветителе** выровняйте яркость двух изображений. Ползунками **Горизонтальное** и **Вертикальное смещение дуги** лампы наложите одно изображение на другое так, чтобы они слились в одно изображение. В результате произведённых регулировок в центре окна должно появиться небольшое изображение дуги лампы, которое с помощью ползунка **Фокус собирающей линзы** необходимо увеличить, чтобы всё окно было равномерно и симметрично заполнено освещением, что и будет свидетельствовать о правильной юстировке дуги лампы. Чтобы произвольно задать новые начальные условия приложения, щелкните мышкой по синей кнопке **Сброс**.

Последовательные результаты фокусировки и юстировки дуги лампы представлены на рисунке 1. При фокусировке дуги лампы собирающей линзой, вновь установленная и неотъюстированная лампа будет иметь совершенно произвольную ориентацию. Это проиллюстрировано на рисунке 1(a), на котором изображение дуги расположено сверху слева, а её зеркальное изображение находится снизу справа. После юстировки изображений дуги, фокусировки и выравнивания яркости зеркального образа, в окне должна появиться картинка, представленная на рисунке 1(b). В результате наложения прямого и зеркального изображения дуги появится слитое изображение, как показано на рисунке 1(c). И, наконец, после дефокусировки собирающей линзы с целью подсветки всего поля зрения, световой пучок становится симметричным и равномерным (рисунок 1(d)). Если добиться этого не удалось, дуга должна быть расфокусирована, после чего процедуру юстировки необходимо провести заново. С помощью этого учебного приложения посетители сайта могут практиковаться в юстировке и фокусировке дуги лампы, пока не будут легко достигать таких результатов.



Ртутные лампы с короткой дугой, обычно применяемые во флуоресцентной микроскопии, являются газоразрядными лампами, наполненными смесью жидкой ртути и инертного газа (например, аргона или ксенона), которая вместе с парой близко расположенных электродов заключена в стеклянной колбе. Ксеноновые дуговые лампы, напротив, содержат чистый ксеноновый газ. При подаче напряжения на электроды между ними загорается электрическая дуга (дуговой разряд), энергии которой достаточно для перевода ртути в парообразное состояние и создания высокого внутреннего давления. Поскольку размер дуги ограничен всего несколькими миллиметрами, дуговые лампы являются почти идеальными точечными источниками света, необходимыми в микроскопии. Эти лампы испускают очень интенсивный свет, цветовая температура которого приблизительно равна 5500K. В ртутной дуговой лампе плазменные «шары» расположены непосредственно у катода и анода; они имеют приблизительно одинаковую интенсивность, которая в два раза выше интенсивности центральной части дуги. Дуга ксеноновой лампы имеет только один, расположенный ближе к аноду, плазменный «шар», который в пять раз ярче участка дуги около катода.

После установки новой ртутной или ксеноновой лампы в осветитель, дуга лампы должна быть тщательно отъюстирована и сфокусирована для достижения равномерного освещения наблюдаемых образцов. Размер самой дуги очень мал (около 1 или 2 миллиметров длины), а её изображение должно быть расположено на оптической оси микроскопа в центре апертуры конденсора в вертикальном осветителе (чтобы обеспечить равномерность освещения).

Средний срок службы ртутной дуговой лампы составляет от 200 до 300 часов в зависимости от продолжительности рабочих циклов и технических характеристик. Ксеноновые дуговые лампы обычно служат от 400 до 600 часов. Для обеспечения максимального срока службы и безопасности операторов необходимо всегда следовать инструкциям производителей по эксплуатации и техническому обслуживанию дуговых ламп.

### Юстировка и фокусировка дуговых ламп

Отключите источник питания, дождитесь, пока старая лампа остынет, и установите новую лампу согласно инструкции производителя. Особое внимание во время установки обратите на ориентацию лампы. Большинство ламп (пример показан на рисунке 2) предназначены для работы в вертикальном положении с анодом (положительным электродом) внизу и имеют наконечник большего размера со стороны анода. Гнездо для монтажа лампы в ламповом блоке микроскопа имеет различные диаметры для облегчения ориентации лампы. Поскольку стеклянные колбы дуговых ламп заполнены парами ртути или ксеноновым газом под достаточно высоким давлением, никогда не перемещайте их, пока они не остыли, так как механическое усилие может привести к взрыву лампы. Новую лампу следует брать только в перчатках, поскольку жиры отпечатков пальцев являются кислыми и могут повредить кварцевую колбу и ослабить её прочность. К тому же, при нагревании колбы отпечатки могут расплыться и на ту её часть, через которую проходит световой поток. Если лампа взорвалась, необходимо выполнить все процедуры, предусмотренные техникой безопасности по очистке предметов и помещения от ртути.



После установки новой лампы включите источник питания и дайте лампе поработать 10 - 15 минут, чтобы она вышла на стабильный режим (**Важное примечание:** при первом включении новой лампы её необходимо **прожечь** в течение часа). Такой прожиг необходим для выжигания канавки в аноде и образования, благодаря этому, пути наименьшего сопротивления, обеспечивающего стабильное, без мерцания, свечение в течение всего времени службы лампы.

Расположите по ходу луча нейтральные светофильтры с плотностью, достаточной для задержки приблизительно 90 - 95 процентов падающего света. Большинство флуоресцентных вертикальных осветителей в современных микроскопах оборудованы нейтральными светофильтрами на выдвижных рамках, которые вставляются по ходу осветительного пучка для уменьшения его интенсивности. Если микроскоп не оборудован такими рамками, необходимо самостоятельно определить подходящее место для установки приобретённых отдельно нейтральных светофильтров.

Выберите подходящий блок флуоресцентных фильтров для наблюдения дуги лампы и поместите его в оптический пути. Для этой цели большинство производителей рекомендует блок с фильтром возбуждения, пропускающим в зелёном участке спектра.

Положите белый лист бумаги или открытку на предметный столик микроскопа непосредственно под револьверный держатель объективов. Удалите объектив из револьвера и поверните свободное отверстие по ходу луча, прямо над листом бумаги. Затем откройте задвижку вертикального осветителя, чтобы пустить световой пучок через револьвер. На белом листе появится круг света с **ярким** пятном, которое может быть смещено от центра. Если яркость света слишком высока, вставьте дополнительные нейтральные светофильтры. Не лишним будет надеть очки (полимерные или стеклянные) или установить на микроскоп защитный экран, чтобы предотвратить попадание отражённого ультрафиолетового света в глаза.



Начните юстировку дуговой лампы с фокусировки собирающей линзы (см. рисунок 3), в результате которой на листе должно появиться резко очерченное изображение дуги. Центровочными ручками снаружи блока лампы можно переместить сфокусированное изображение дуги в центр круга света на листе бумаги. Некоторые осветители имеют внутреннюю систему зеркал для направления в апертуру более интенсивного освещения. Микроскопы, оборудованные такими ламповыми блоками, формируют два изображения дуги (действительное и зеркальное). С помощью ручек, центрирующих зеркало и перемещающих лампу, расположите действительное и зеркальное изображение дуги (которое, обычно, более тусклое) рядом и, затем, ручкой фокусировки зеркала выровняйте их яркость (ламповые блоки, в которых нет системы зеркал, не имеют также и регулировочных ручек, поэтому внимательно прочтите инструкцию производителя по выполнению юстировки лампы). Наконец, с помощью регулировочных ручек совместите как можно точнее два изображения дуги.

После юстировки сфокусированного изображения дуги (и её зеркального изображения, если ламповый блок оснащён зеркалом) медленно расфокусируйте собирающую линзу соответствующей регулировочной ручкой. При расфокусировании линзы пучок должен расширяться, равномерно и симметрично заполняя всю область освещения. Если изображение дуги оказалось смещённым, перефокусируйте её и повторите процедуру юстировки. В заключении, вновь приведите изображение дуги в фокус и вставьте обратно объектив. Для достижения равномерного освещения, возможно, будет необходимо провести дополнительные регулировки с помощью собирающей линзы при наблюдении однородного образца в окуляры при установленном объективе.

Большинство производителей микроскопов предлагают дополнительное юстировочное устройство для облегчения центрирования изображения дуги лампы в задней апертуре объектива. В верхней части этого устройства имеется стандартное (утверждённое Королевским микроскопическим обществом) или 25-миллиметровое (совместимое с новыми револьверными держателями) резьбовое соединение, поэтому устройство может быть установлено вместо объектива. Сначала устройство вкручивается в револьвер объективов, а затем поворачивается до совмещения с оптической осью. В нижней части устройства имеется окошко с матовым оранжевым стеклом с нанесённым на него перекрестьем (как показано на рисунке 4). Пройдя дихроичное зеркало микроскопа, свет падает на встроенный отражатель центрирующего экрана и направляется им на перекрестье. С помощью регулировочной ручки собирающей линзы и винтов, центрирующих ламповое гнездо, изображение юстируется по перекрестью. Размер изображения дуги может быть увеличен или уменьшен фокусированием собирающей линзы. После юстировки дуги центрирующее устройство может быть заменено стандартным объективом.



Независимо от способа юстировки дуги (с помощью вспомогательного устройства или белого листа бумаги, помещённого на предметный столик микроскопа) её изображение в обоих случаях проецируется из входного зрачка объектива, то есть из его задней апертуры. Когда объектив возвращён на своё место, изображение дуги в его задней апертуре расфокусировано, и освещение плоскости изображения (то есть полевой диафрагмы) оказывается равномерным. В этом и состоит суть освещения по Кёлеру.

В связи с ростом популярности рабочих станций формирования и визуализации цифрового изображения и усовершенствования микроскопов, оснащаемых сегодня самыми современными камерами, необходимо помнить, каким опасным для электронного оборудования может быть источник питания дуговой лампы. Всегда включайте дуговую лампу до включения дополнительной компьютерной техники или камеры, находящихся в непосредственной близости к источнику питания, а отключение этого оборудования производите в обратном порядке, т.е. до отключения дуговой лампы. Кабель, питающий лампу, обычно хорошо экранирован, но при зажигании лампы возможен мгновенный скачок напряжения от 20.000 до 50.000 вольт. Магнитные поля, генерируемые при этом, могут вывести из строя находящиеся рядом чувствительные интегральные схемы.

#### ВЕРНУТЬСЯ К ПОНЯТИЯМ И УРАВНЕНИЯМ МИКРОСКОПИИ

#### ВЕРНУТЬСЯ К СТЕРЕОМИКРОСКОПИИ

**Линейные измерения (Микрометрия)** – Первые достоверно известные измерения с помощью оптического микроскопа были выполнены в конце 17-го века голландским учёным Антони ван Левенгуком, который для определения размера эритроцитов человека сравнивал их с песчинками. С тех пор было применено бесчисленное количество подходов для проведения линейных, плоских и объёмных измерений с помощью микроскопа (деятельность, называемая **микрометрией** или **морфометрией**) и разработано множество эффективных методов.

**Введение в микрометрию** – Выполнение измерений при большом увеличении в сложной оптической микроскопии обычно проводится с применением окулярных масштабных сеток в сочетании с микрометрами предметного столика (объект-микрометрами). Большинство измерений, выполняемых сложными микроскопами, лежат в интервале от 0,2 микрометров до 25 миллиметров (средний диаметр поля широкопольных окуляров). Поперечные расстояния меньше 0,2 микрометров находятся за пределами разрешающей способности микроскопа, а длины, большие поля зрения широкопольного окуляра, обычно (и намного проще) измеряются стереомикроскопами.

#### Интерактивное учебное приложение Java

**Калибровка окулярной сетки** – Калибровка окулярной (измерительной) сетки, т.е. определение микрометрических масштабных соотношений, для определённого объектива обычно проводится в соответствии со следующими рекомендованными стандартными процедурами. Необходимо иметь в виду, что калибровка окулярной сетки действительна только для данной тестируемой комбинации объектив/окуляр и для данной длины механического тубуса. В этом интерактивном учебном приложении можно познакомиться с приёмами калибровки различных окулярных сеток по микрометру предметного столика и определением линейных размеров образцов с помощью окулярной сетки.

### Ссылки на литературу

**Список ссылок** – В дополнение к базовым линейным измерениям оптические микроскопы часто применяются для измерения площадей и объёмов образцов и для подсчёта частиц и волокон. При подготовке материалов веб-сайта МикроскопияУ по теме измерений в качестве исходных были использованы некоторые книги и обзорные статьи по микрометрии и стереологии, опубликованные ведущими исследователями в этой области. В этом разделе можно найти информацию о периодических изданиях, публикующих статьи на эту тему, а также список выборочных обзорных статей и книг по количественной микроскопии.

**Контрастность образцов в оптической микроскопии** – Разрешающая способность в оптической микроскопии при наблюдении живых организмов и других прозрачных неокрашенных образцов обычно страдает от недостатка контрастности, что делает эти образцы почти невидимыми в режиме светлполюсного освещения. При использовании полной апертуры микроскопического объектива, изображения неокрашенных образцов получаются чрезвычайно слабыми даже для таких периодических структур, как дифракционные решётки, ориентированные волокна, реплики интегральных микросхем, нитчатые и диатомовые водоросли.

Хотя благодаря рассеянию и дифракции в прозрачных образцах обычно происходит фазовый сдвиг взаимодействующих световых пучков, эти объекты остаются невидимыми в микроскоп, поскольку человеческий глаз не регистрирует разницу в фазе. Если не прибегать к окрашиванию таких образцов достаточно яркими красителями, то единственным альтернативным способом наблюдения остаётся существенное сокращение рабочей числовой апертуры конденсора закрытием ирисовой диафрагмы. Однако, эта крайняя мера приводит к значительному падению разрешающей способности объектива.

Оптические системы современных микроскопов способны формировать изображения с высоким разрешением при больших кратностях увеличения, но без достаточной контрастности это не имеет смысла. Контрастность не является неотъемлемым свойством образца, но зависит от взаимодействия образца со светом и эффективности оптической системы в сочетании с её способностью регистрировать формирующую изображение информацию соответствующим приёмником. Управление контрастностью изображения в оптической системе микроскопа зависит от нескольких факторов, включая правильное выставление апертурных диафрагм, степень оптической аберрации, применяемый механизм контраста, тип образца и характеристики фотоприёмника. Помимо специального усиливающего контраст вспомогательного оборудования в самом микроскопе существует несколько узлов, позволяющих оператору регулировать этот параметр. Наиболее важными для оптической системы являются настройки полевой и апертурной диафрагмы конденсора, но контрастом можно также управлять, меняя коэффициент контрастности электронной камеры (или обычной плёнки), кратность увеличения видеодетектора, обрабатывая изображения в реальном времени, а также окрашивая образец.

Поскольку человеческий глаз лишь настолько воспринимает объект, насколько контрастно порождаемое им изображение, необходимо, прежде всего, исключить возникающую иногда путаницу в основных оптических явлениях, определяющих контрастность изображения. На рисунке 1 представлена полученная в различных контрастных режимах (светлполюсном, фазового контраста и дифференциального интерференционного контраста) серия из трёх цифровых изображений одного и того же, снятого в проходящем свете, поля зрения, в котором находятся прозрачные, почти бесцветные нитчатые водоросли *Zygnema*. Эти три

снимка сильно отличаются друг от друга, и независимый анализ каждого из них объясняет причины этих отличий.

Нитчатая водоросль, представленная на рисунке 1(а), была снята в светлорольном режиме с апертурой конденсора, уменьшенной до размера, при котором становятся видимыми края водоросли, и проявляются некоторые внутренние детали. Хотя в ребристых кольцах водоросли можно различить зелёные хлоропласты, изображение в целом страдает от низкой контрастности. Нитчатая водоросль в том же поле зрения, но снятая методом фазового контраста, представлена на рисунке 1(б). На этом снимке ребристые кольцеобразные структуры оказываются сгруппированы по две, а хлоропласты, проступающие на рисунке 1(а), уже видны как высоко контрастные сферы. Тёмные участки на снимке, окружённые гало, являются обычным для фазово-контрастной микроскопии артефактом. Нить водоросли, представленная на рисунке 1(с), была снята методом дифференциального интерференционного контраста с небольшим смещением, вызванным установленным компенсатором Сенармона. В результате затенения образца, произведённого компенсатором, одна часть изображения оказывается темней, а другая – ярче, что создаёт трёхмерный эффект. Каждый снимок на рисунке 1 даёт разное изображение образца и приводит к нескольким отличным интерпретациям, расшифровать которые можно, лишь имея представления о том, как формируются эти изображения в микроскопе.

Поглощение света (либо естественным образом, либо посредством вспомогательных синтетических красителей), благодаря которому в изображении появляются цвета или различные уровни яркости, было классическим методом формирования контраста в светлорольной микроскопии. Термин **контрастность** (контраст) обозначает такую характеристику изображения, благодаря которой каждая отдельная деталь образца может быть различима на фоне или в окружении других деталей. По сути, контрастность определяется как разность интенсивности света между изображением образца и его фоном по отношению к общей интенсивности фона. Свойства образца, ответственные за изменения яркости или цвета, определяются такими характеристиками, как поглощение, отражение, пространственные изменения показателя преломления, рассеяние, дифракция, двойное лучепреломление, флуоресценция, и другими подобными оптическими явлениями. В общем, контраст измеряется отношением между максимальной и минимальной интенсивностью изображения и описывается простой формулой:

$$\text{Коэффициент контрастности} = [(I_b - I_s) / I_b] \times 100$$

где **I(b)** – интенсивность фона, а **I(s)** – интенсивность исследуемой детали образца. Из этого уравнения видно, что контрастность образца определяется соотношением между максимальной и минимальной интенсивностью изображения. Если интенсивность образца меньше (он темнее) фоновой, контраст называется **положительным**, тогда как образцы более светлые, чем фон, демонстрируют **негативный** контраст. Когда образец изменяет спектральное распределение (цвет) проходящего через него света, он создает **цветовой** контраст. Этот тип контраста также является следствием интерференции белого света в образцах с близко расположенными периодическими структурами.



Графики, представленные на рисунке 2, демонстрируют влияние интенсивности фона на контрастность образца. На темно-сером фоне ( $I(b)$  равна 0,01; красная линия), малое изменение интенсивности изображения приводит к резкому повышению контрастности. При подсветке фона до серого ( $I(b)$  равна 0,10; зеленая линия), небольшие изменения интенсивности изображения вызывают приемлемое увеличение контрастности. На светло-сером фоне ( $I(b)$  больше или равна 0,50; синяя линия), контрастность изображения почти не чувствительна к его интенсивности, и значительное увеличение яркости изображения приводит лишь к малым изменениям контрастности.

В большинстве случаев интенсивности изображения и фона не являются дискретными величинами, но меняются по всему полю зрения, приводя к флуктуациям контрастности. Практика показывает, что прозрачные образцы в светлополюсном освещении демонстрируют коэффициент контрастности от 2 до 5, тогда как в методе фазового и дифференциального интерференционного контраста их контрастность достигает 15 - 20 процентов, что немного ниже контрастности связанных и окрашенных образцов, наблюдаемых в светлополюсном освещении (около 25 процентов). В сравнении с темнопольной или флуоресцентной микроскопией (средние уровни контрастности которых 60 и 75 процентов, соответственно) фазово-контрастная микроскопия и микроскопия дифференциального интерференционного контраста дают меньшую контрастность, но всё же обеспечивают такую же степень разрешения.

### Амплитудные и фазовые образцы

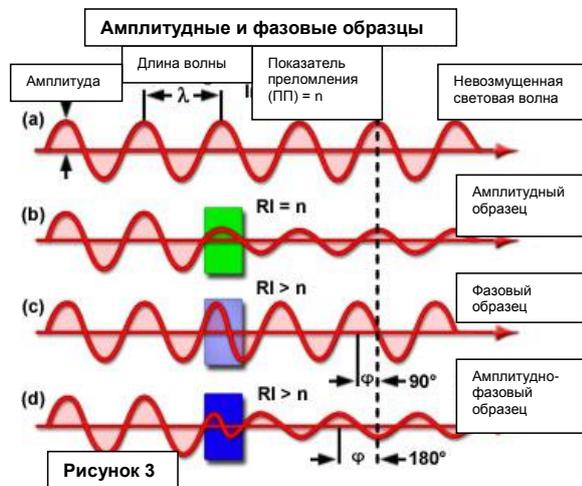
До изобретения методов усиления контраста, наблюдение в светлополюсном проходящем освещении было одним из самых распространённых режимов в оптической микроскопии, особенно для связанных и окрашенных образцов и других препаратов с высоким естественным поглощением видимого света. Обобщённо, все образцы, хорошо видимые при светлополюсном освещении, называются **амплитудными объектами** (или образцами), поскольку амплитуда или интенсивность освещающего волнового фронта падает при прохождении света через такие образцы.

Однако, контрастность многих образцов в оптической микроскопии, особенно неокрашенных или живых, настолько низка, что они остаются практически невидимыми, независимо от способности объектива различать мелкие детали образца. Часто бывает очень важно сохранять эти образцы живыми и не оказывать на них воздействия обработкой химическими красителями или фиксаторами. Эта необходимость служила причиной поиска микроскопистами методов усиления контраста на протяжении более ста лет, с целью улучшить видимость образцов и получить их более детальное изображение без изменения самих образцов. Для усиления контрастности образца, обычно, уменьшают размер апертурной диафрагмы конденсора ниже рекомендуемого или опускают сам конденсор. Хотя такие действия и приводят к усилению контрастности, они, к сожалению, существенно ухудшают разрешение и резкость изображения.

При светлорасположенном освещении и источник света (обычно галогенная лампа с вольфрамовой нитью), и конденсор располагаются таким образом, чтобы заполнить переднюю апертуру объектива частично когерентным светом с волновым фронтом, симметричным относительно оптической оси микроскопа. Амплитуда волновых фронтов, взаимодействующих с окрашенными участками образца, падает, тогда как волны, преломленные образцом, порождают дифракционную **боковую полосу частот** первого порядка со сдвигом фазы по отношению к проходящему через образец свету на 180 градусов. При формировании изображения эти дифрагированные волны боковой полосы частот интерферируют в плоскости изображения с окружающими световыми волнами, поэтому фон получается ярким, а структуры, поглотившие свет, предстают в различных цветах или оттенках серого. Однако, если показатель преломления неокрашенного образца совпадает с показателем преломления окружающей среды (обычно называемой **окружением**), интенсивность дифрагированного света резко падает. К тому же, сдвиг фаз дифрагированных волн, от образца в этом случае составляет лишь 90, а не 180 градусов, как в сильно поглощающих образцах. В сумме, эти эффекты существенно ограничивают видимость образца.

Как обсуждалось выше, образцы, меняющие интенсивность проходящего света, называются **амплитудными** образцами и видны в микроскоп благодаря их способности поглощать или, другими словами, влиять на интенсивность света, которая пропорциональна квадрату амплитуды световой волны. Другие образцы, имеющие естественный цвет или окрашенные химическими красителями, также хорошо видны при светлорасположенном освещении. Эти красители или натурально окрашенные структуры образца поглощают некоторую долю белого света, проходящего через них, и пропускают или отражают остальные цвета. Для достижения контрастности по цвету красители часто применяются в сочетаниях. Например, голубой гематоксилин, применяемый для окрашивания ядер клетки, часто комбинируется с розовым эозином, который селективно окрашивает цитоплазму. Окрашивание образцов, слабо поглощающих свет, для распознавания их изображений при наблюдении в микроскоп, стало обычной практикой.

В противоположность этому, прозрачные образцы, не поглощающие свет, но вместо этого меняющие фазу проходящего волнового фронта, называются **фазовыми объектами** (или образцами). Эти образцы фактически невидимы и очень трудно визуализируемы, поскольку человеческий глаз не чувствителен к относительному сдвигу фаз между световыми волнами. К тому же, глаз не регистрирует ориентационных изменений, например, при поляризационных эффектах, векторов электрического поля электромагнитного излучения. Фазовые образцы характеризуются несколькими параметрами, включая их форму (обычно круглую или плоскую), плотность внутренних рассеивающих свет элементов, толщину и свойства уникальных химических или электрических структур (обобщенно называемые показателем преломления). Толстые образцы могут быть относительно прозрачны и содержать лишь несколько светорассеивающих элементов, но могут быть и почти непроницаемы для проходящего освещения, если количество этих элементов велико. Эти образцы часто называют образцами **отраженного света**.



Фазовые изменения происходят, главным образом, из-за разницы в толщине и показателях преломления образца и окружающей его среды. Типичным примером является живая тканевая культура клеток, почти прозрачная в светлопольном освещении. Проходя через прозрачный образец, ни волновой фронт освещения, ни формирующая изображение поглощаемая образцом волна, не меняются в светлопольном микроскопе. Если образец находится несколько не в фокусе, в окуляры наблюдается тонкая серая тень, формируемая отражённым светом. Однако, если микроскоп сфокусирован, изображение тонкого прозрачного образца исчезает (образцы имеющие значительную толщину остаются видны благодаря свету, отражённому от многочисленных фокальных плоскостей вдоль оптической или z-оси).

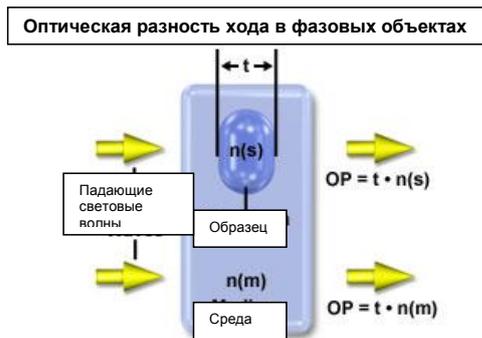
Влияние амплитудных и фазовых образцов на световые волны падающего освещения объясняется на рисунке 3. Самая верхняя синусоида на этом рисунке представляет неизменённую световую волну (окружения), прошедшую мимо образца. Там же (рисунок 3(a)) обозначены амплитуда и длина неизменённой волны, прошедшей лишь через среду для заливки образца, имеющую показатель преломления  $n$ . При попадании волн в окрашенный образец (зелёный прямоугольник на рисунке 3(b)) с тем же показателем преломления, что и среда заливки, их амплитуда падает в результате поглощения красителем, но фаза остаётся неизменной. Однако, когда световые волны попадают в образец с показателем преломления, отличным от показателя преломления среды заливки образца (рисунок 3(c)), амплитуда волн не меняется, но фаза смещается (запаздывает) на 90 градусов. В действительности, большинство встречающихся образцов демонстрируют комбинированный эффект (рисунок 4(d)), меняя амплитудно-фазовое соотношение между входящими и выходящими световыми волнами.

### Оптическая разность хода и фазовый градиент

Оптическая разность хода и фазовый сдвиг, возникающие в световых волнах, прошедших через прозрачный образец, эффективно используются несколькими распространёнными методами усиления контраста, включая фазовый контраст и дифференциальный интерференционный контраст. В большинстве случаев, часть волнового фронта, проходящая через образец, но не через окружающую его среду, либо немного опережает, либо отстаёт от остальной его части, в зависимости от разницы показателей преломления образца и среды. Учитывая, что прозрачные фазовые образцы очень плохо видны при светлопольном освещении, их способность менять длину оптического пути (что, на самом деле, эквивалентно фазовому сдвигу) чрезвычайно важна.

Большинство фазовых образцов, наблюдаемых в сосудах для культивирования или помещённых между предметным и покровным стеклом, относительно плоские или имеют

форму пластинок, как показано на рисунке 4, где изображён гипотетический образец, залитый гомогенной средой. На этом рисунке толщина образца обозначена переменной  $t$ , а показатель преломления - переменной  $n(s)$ . Показатель преломления среды для заливки –  $n(m)$ . Падающие световые волны (жёлтые стрелки) приближаются к образцу, погружённому в заливочную среду, слева и проходят через него за время, определяемое произведением показателя преломления и толщины.



При переходе света из одной среды в другую (например, при переходе из питательного водного раствора тканевой культуры в цитоплазму клетки), изменение его скорости определяется разницей показателей преломления двух сред. Таким образом, когда когерентная световая волна, испущенная сфокусированной нитью накала микроскопа, проходит сквозь фазовый образец с показателем преломления  $n(s)$  и толщиной  $t$ , скорость волны либо возрастает, либо уменьшается. Если показатель преломления образца больше показателя преломления окружающей среды, волна замедляется при прохождении через образец и, следовательно, на выходе из него сдвинута по фазе. И наоборот, если показатель преломления среды больше, фаза волны набегаёт при возбуждении образца.

Оптический путь (ОП) света при его прохождении через образец равен произведению показателя преломления образца ( $n(s)$ ) и его толщины ( $t$ ). Аналогично, оптический путь световых волн, проходящих мимо образца через среду, равен произведению толщины среды на её показатель преломления ( $t \cdot n(m)$ ). Оптическая разность хода (ОРХ) между образцом и средой может быть выражена как:

$$\text{Оптическая разность хода (ОРХ)} = \Delta = (t \cdot n_s - t \cdot n_m) = t \cdot (n_s - n_m)$$

Разность положения выходящего из образца волнового фронта (по отношению к волновому фронту, движущемуся через среду) называется **фазовым сдвигом** ( $\delta$ ) и определяется в радианах следующим уравнением:

$$\delta = 2\pi\Delta/\lambda$$

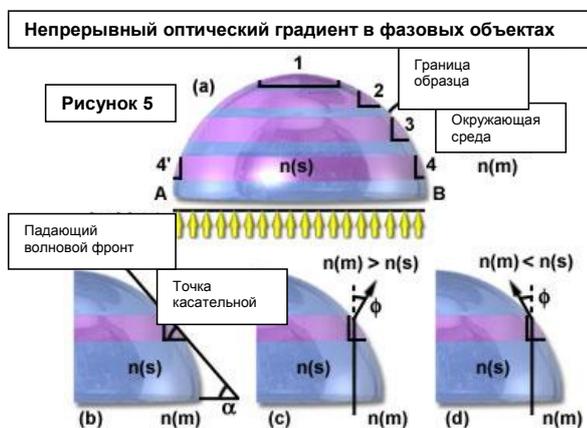
где  $\pi$  – константа (3.142), а  $\lambda$  – длина волны освещения. Оптическая разность хода является произведением двух величин: толщины ( $t$ ) и разницы показателей преломления ( $n$ ). Во многих случаях, оптическая разность хода бывает достаточно большой, даже когда толщина образца относительно невелика. С другой стороны, при совпадении показателей преломления образца и среды оптическая разность хода равна нулю даже для очень толстых образцов. В этом случае свет, проходящий через образец, просто запаздывает (разница в фазе без сдвига) по отношению к свету, проходящему через ту же толщину среды.

Принцип работы фазово-контрастного микроскопа состоит именно в том, чтобы использовать разницу фаз между различными компонентами образца и окружающей среды. Однако для формирования приемлемого изображения фазово-контрастным микроскопом помимо разницы фаз необходима ещё дифракция света в образце. Для сравнения, в методе дифференциального интерференционного контраста для достижения контраста между

участками образца с разной прозрачностью используется градиент фаз, благодаря чему возникает характерный для этого метода трёхмерный эффект.

Формы фазовых объектов с непрерывно меняющимся оптическим путём или плотностью наиболее распространены (например, полусферический образец на рисунке 5). В этом случае бока фазового объекта могут быть аппроксимированы математически формой призмы, как обсуждается ниже. Показатель преломления фазового объекта и окружающей его среды на рисунке 5 обозначены как  $n(s)$  и  $n(m)$ , соответственно. Непрерывность формы фазового объекта нарушается только на краях **A** и **B** (см. рисунок 5(a)). Свет падает на объект перпендикулярно плоскости **AB**, тогда как волновой фронт параллелен ей.

Граница в точке **1** (вершине закруглённого фазового объекта на рисунке 5(a)), по существу, параллельна падающему волновому фронту, тогда как границы в **A** и **B** перпендикулярны ему. Участки между **2** и **4** можно рассматривать образованными малыми призмами, боковыми сторонами которых являются касательные к поверхности фазового объекта (рисунок 5(b)). Угол "призмы" меньше на участке **2**, чем на участке **4**, противоположном участку **4'**. На краях **A** и **B** дифракция максимальна.



Таким образом, изогнутые или полусферические образцы можно рассматривать как состоящие из множества призм, а симметричные стороны образца – как состоящие из противоположно ориентированных призм. В районе экватора сферического образца призмы имеют наибольшую крутизну, а в нижней и верхней части – наименьшую. Эти призмы формируют оптический градиент:

$$\text{ОГ (Оптический градиент)} = \Phi = \alpha(n_s - n_m)$$

где  $\alpha$  – угол между касательной и плоскостью волнового фронта. Следует заметить, что оптический градиент является произведением двух величин: угла ( $\alpha$ ) между сторонами, через которые проходит свет, и разности показателей преломления ( $n(s) - n(m)$ ). Направление луча, проходящего через призму, меняется на угол  $\phi$  (см. рисунок 5(c) и 5(d)). Изменение направления может быть значительным, даже при малом наклоне границы, если разница показателей преломления велика. При совпадении показателей преломления световая волна не преломляется при прохождении фазового объекта. Направление выходящего из призмы света зависит от относительной разности показателей преломления фазового объекта  $n(s)$  и окружающей его среды  $n(m)$  (см. рисунок 5(c) и 5(d)).

Как уже говорилось выше, закруглённые фазовые объекты имеют меняющийся оптический градиент, и каждая отдельная «градиентная призма» преломляет свет на свой угол. На рисунке 5(c) показано направление отклонения луча, когда показатель преломления среды больше показателя преломления образца ( $n(m) > n(s)$ ), а на рисунке 5(d) – когда верно

обратное ( $n(m) < n(s)$ ). Угол отклонения  $\phi$  пропорционален углу наклона ( $\alpha$ ) и разности показателей преломления ( $n(s) - n(m)$ ), так что:

$$\tan \phi = \tan \alpha (n_s - n_m)$$

Для малых углов:

$$\phi = \alpha (n_s - n_m) \text{ (в радианах)}$$

Суммируя сказанное о преломлении на оптически градиентных границах, добавим, что если показатель преломления фазового объекта больше показателя преломления среды, то при одинаковых наклонах разных сторон объекта отклонение происходит на один и тот же угол. Угол отклонения зависит от разности показателей преломления и угла наклона ( $\alpha$ ).

Направление отклонения зависит от того, какой из показателей преломления ( $n(m)$  или  $n(s)$ ) больше, и в зависимости от этого меняется на противоположное.

Если градиент (наклон) отсутствует, то свет проходит без отклонения.

Независимо от того, амплитудным или фазовым является образец, его края, наклоны, толщина влияют на угол преломления проходящего через него света. Объективом захватывается только часть этого рассеянного света, и она зависит от его числовой апертуры. Остальная (не собранная) часть рассеянного света представляет собой потерянную информацию, не участвующую в формировании изображения образца. Апертура задней фокальной плоскости объектива имитирует низкочастотный фильтр (сглаживая крупные детали образца) дифрагированного света, который собирается в плоскости промежуточного изображения, где интерферирует и формирует изображение. Поскольку фазовые образцы с плавными закруглениями имеют мало или вообще не имеют дифракционных участков, их изображения страдают от недостатка контрастности, если не применять дополнительных, усиливающих контрастность оптических компонентов.

### Когерентность освещения

Говоря об оптических методах усиления контрастности, имеет смысл рассматривать различные характеристики с точки зрения возможности влиять с их помощью на изменения интенсивности, благодаря которым образец становится видимым. Главным является следующий вопрос: какая из характеристик объекта в данных условиях может быть преобразована в разность интенсивностей.

Мельчайшие детали и края образца, размер которых сравним с длиной волны формирующего изображение света, будут преломлять и рассеивать свет, конечно если показатели преломления образца и среды отличны. Показатель преломления обычно определяется как отношение скорости света в воздухе или вакууме к скорости света в объекте. Поскольку скорость света в любом материале меньше скорости света в вакууме, для всех образцов, исследуемых с помощью микроскопа, показатель преломления больше 1,0. Чтобы различить мелкие детали образца, находящиеся близко друг к другу, и воспроизвести их форму с достаточной достоверностью, преломлённый свет должен захватываться объективом микроскопа под большим углом.

Для воспроизведения деталей образца дифрагированный (или преломлённый) свет, собираемый объективом, должен приводиться в фокус в плоскости изображения. В плоскости изображения преломлённые световые волны интерферируют со светом, прошедшим через образец без дифракции и со светом, прошедшим мимо образца. Качество сформированного в результате интерференции изображения в сильной степени зависит от когерентности освещающего образец света, и, в общем, оно существенно возрастает с ростом когерентности. В оптическом микроскопе размер апертурной диафрагмы конденсора частично управляет пространственной когерентностью падающего на образец света. Уменьшение размера отверстия диафрагмы приводит к большей пространственной когерентности.

Освещение образца хотя бы частично когерентным светом является критическим условием для формирования изображения путём дифракции и интерференции, и это необходимо во всех методах интерференционной оптической микроскопии, включая фазовый контраст, дифференциальный интерференционный контраст (ДИК) и поляризацию. В действительности, неизменённые световые волны (прошедшие через образец без преломления или прошедшие мимо образца) и дифрагированные волны имеют равную степень когерентности, сохранение которой при прохождении света через оптическую систему и обеспечивает усиливающую и ослабляющую интерференцию в плоскости изображения.



Лампы накаливания, например галогенные лампы с вольфрамовой нитью, обычно применяемые в оптических микроскопах, являются источниками частично когерентного света с большим числом волновых фронтов, распространяющихся от своего источника – нити накала – в одной фазе. Поскольку каждый фотон колеблется несколько не в фазе с остальными фотонами из своей группы, испускаемой нитью накала, действительная степень когерентности в данном волновом фронте лишь частичная. К тому же, расстояние, в пределах которого волны в высокой степени когерентны друг с другом, составляет всего несколько десятков длин волн. В результате, на больших расстояниях будет наблюдаться модуляция амплитуды с участками высокой амплитуды, где волны колеблются когерентно (в фазе), и низкой амплитуды, где они временно находятся не в фазе друг с другом. Лампы накаливания или дуговые лампы занимают среднее положение между лазерными источниками с вынужденным излучением, когерентным на больших расстояниях (многие тысячи или даже миллионы длин волн), и совершенно некогерентным флуоресцентным свечением, генерируемым флуорохромно-окрашенными образцами.

Когерентность происходит из того, что при испускании фотонов в данном направлении атомы нити накала в пределах микроскопической зоны оказывают друг на друга сильное взаимное влияние. Эти короткодействующие эффекты приводят к разбиению всей нити накала на отдельные участки, которые служат источниками излучения, синхронного в пределах каждого участка. В результате, раскалённая вольфрамовая нить галогенной лампы или ионизированная плазма дуги ртутной лампы могут быть представлены как ансамбль миниатюрных атомных областей, независимо испускающих гармоничные вспышки света. Отдельный когерентный волновой фронт, генерируемый нитью в данном направлении называется лучом света. В освещении по Кёлеру собирающая линза (расположенная на оптическом пути микроскопа после лампового блока, но перед полевой диафрагмой) формирует изображение нити в передней фокальной плоскости (апертуре) конденсора. Эта апертура, следовательно, становится источником частично когерентного волнового фронта, освещающего образец в предметной плоскости, как показано на рисунке 6.

Для данной световой волны, падающей на образец (см. увеличение на рисунке б), дифрагированный волновой фронт и волновой фронт (нулевого порядка), прошедший образец без преломления, являются когерентными. Эта когерентность сохраняется на пути от образца к плоскости изображения, где световые волны вновь соединяются и интерферируют друг с другом. В этом месте когерентные между собой волны беспорядочно объединяются с другими волновыми фронтами и составляют конечное изображение. Этот важный принцип лежит в основе многих видов оптической микроскопии, но особенно существенен в методах фазового и дифференциального интерференционного контраста, поскольку формирование изображения через усиливающую и ослабляющую интерференцию требует хотя бы частичной когерентности освещения. Другими словами, необходимо, чтобы между непреломленными и преломленными световыми волнами существовала определённая фазовая согласованность, которая должна сохраняться на пути от образца до плоскости изображения.

Обычным способом улучшения видимости деталей и контуров фазовых образцов, к которому прибегают микроскописты, является сокращение размера апертурной диафрагмы конденсора. Контрастность амплитудных объектов также может быть усилена правильной настройкой апертуры конденсора. Малые объекты, края и детали образца преломляют свет независимо от того, является ли образец амплитудным или фазовым. Но только часть этого преломлённого света захватывается объективом (из-за ограниченности числовой апертуры); остальной преломлённый свет представляет потерянную часть изображения. Выбор правильного размера апертурной диафрагмы конденсора диктуется поиском оптимального соотношения между усилением контрастности изображения образца и появлением дифракционных артефактов. Эти последние проявляются в виде падения разрешения, накладки дифракционных колец и других нежелательных оптических эффектов, исходящих из не приведённых в фокус участков образца. При достижении дифракционного предела контрастность изображения ухудшается, поскольку детали объекта становятся меньше, а пространственная частота растёт.

В оптических микроскопах контрастность определяется взаимодействием освещающего волнового фронта и образца и зависит от способа обработки прошедшего через образец света, но не является свойством, присущим данному образцу. Более того, модуляционная передаточная функция (МПФ) и режим контрастирования микроскопа существенно влияют на контрастность образца. Модуляционная передаточная функция является количественным критерием способности микроскопа передавать информацию от образца к изображению. В общем, контрастность изображения меньше для структур образца с большей пространственной частотой (более мелких и близко расположенных деталей), независимо от режима контрастирования микроскопа или частотно-контрастной характеристики.

## **Заключение**

Контрастность изображения формируется в результате различных механизмов взаимодействия света с образцом. Сюда входит отражение от поверхности, поглощение, преломление, поляризация, флуоресценция и дифракция. Контрастность может быть усилена физической модификацией оптических компонентов микроскопа и режимом освещения, а также обработкой конечного изображения фотографическими или цифровыми методами. Ниже обсуждаются различные взаимодействия света с образцом, и приводится обзор некоторых методов оптической микроскопии (см. таблицу 1), разработанных для усиления контрастности образцов. В таблице 1 сведены методы усиления контраста различных образцов и материалов, исследуемых как в проходящем, так и в отражённом свете. Эту таблицу можно использовать как приблизительное руководство по решению специфических проблем визуализации в оптической микроскопии.

Человеческий глаз очень чувствителен к амплитуде и длине волны исходящего от образца света. Именно по этой причине многие образцы разрезаются на очень тонкие срезы (от 1 до 30 микрон толщиной) и окрашиваются химическими красителями для увеличения контрастности и выделения находящихся в образце структур. Такой метод исследования биологических образцов довольно распространён вот уже несколько сотен лет. Красители избирательно поглощают свет одной или нескольких длин волн и пропускают или отражают

все остальные. Примером может служить синий краситель, поглощающий свет всего видимого спектра за исключением синего, который он отражает или пропускает. Внутренние структурные элементы биологических образцов часто окрашиваются несколькими красителями для избирательного выделения этих элементов, при котором происходит увеличение их контрастности на фоне либо прозрачного, либо окрашенного в другой цвет вещества.

Эти методы распространяются также и на флуоресцентные красители, применяемые для усиления контраста в образцах с высокой степенью специфичности. При возбуждении флуоресцентных образцов светом одной или нескольких длин волн видимого или ближнего ультрафиолетового диапазона, они обычно флуоресцируют на более длинных волнах, и поэтому становятся заметными на фоне других объектов в поле зрения или на тёмном фоне.

### Методы усиления контраста в оптической микроскопии

Тип образца	Метод наблюдения
<b>Проходящий свет</b>	
<b>Прозрачные образцы</b> <b>Фазовые объекты</b> Бактерии, сперматозоиды, клетки в стеклянных сосудах, протозоа, клещи, волокна и т.д.	<b>Фазовый контраст</b> <b>Дифференциальный интерференционный контраст (ДИК)</b> <b>Модуляционный контраст Хоффмана</b> <b>Косое освещение</b>
<b>Рассеивающие свет объекты</b> Диатомеи, волокна, волоски микроорганизмы в свежей воде, лучевики и т.д.	<b>Освещение по Рейнбергу</b> <b>Темнопольное освещение</b> <b>Фазовый контраст и ДИК</b>
<b>Преломляющие свет образцы</b> Коллоидные суспензии порошки и минералы жидкости	<b>Фазовый контраст</b> <b>Дисперсионное окрашивание ДИК</b>
<b>Амплитудные образцы</b> Окрашенные ткани образцы с естественным окрашиванием волоски и волокна насекомые и морские водоросли	<b>Светлопольное освещение</b>
<b>Флуоресцентные образцы</b> Клетки в тканевой культуре срезы, окрашенные флуорохромами мазки и давленные препараты	<b>Флуоресцентное освещение</b>
<b>Образцы с двойным лучепреломлением</b> Тонкие срезы минералов жидкие кристаллы расплавленные и рекристаллизованные химикаты волоски и волокна кости и перья	<b>Поляризованное освещение</b>
<b>Отраженный свет</b>	
<b>Зеркальная (отражающая) поверхность</b> Тонкие плёнки, зеркала полированные металлургические образцы интегральные микросхемы	<b>Светлопольное освещение</b> <b>Фазовый контраст, ДИК</b> <b>Темнопольное освещение</b>
<b>Рассеивающая (неотражающая) поверхность</b> Тонкие и толстые плёнки горные породы и минералы волоски, волокна, кости насекомые	<b>Светлопольное освещение</b> <b>Фазовый контраст, ДИК</b> <b>Темнопольное освещение</b>
<b>Амплитудные характеристики поверхности</b> Окрашенные волокна рассеивающие металлургические образцы композитные материалы	<b>Светлопольное освещение</b> <b>Темнопольное освещение</b>

полимеры		
<b>Двоякопреломляющие образцы</b> Тонкие срезы минералов волоски и волокна кости и перья монокристаллы ориентированные плёнки		<b>Поляризованное освещение</b>
<b>Флуоресцентные образцы</b> Клетки в заливочной среде срезы, окрашенные флуорохромами мазки и давленные препараты		<b>Флуоресцентное освещение</b>

Таблица 1

В ранних, но до сих пор применяемых методах усиления контрастности окрашенных образцов используются цвето-контрастные фильтры, фильтры «Реттен» (лакированные желатиновые пластины фирмы «Кодак») или интерференционные фильтры, помещаемые в ход луча. Например, если образец окрашен красным, зелёный фильтр затемнит красные области, увеличив, таким образом, контрастность. С другой стороны, зелёные области при этом станут более яркими. Цветные фильтры бывают очень полезны для усиления контрастности образца, особенно в чёрно-белом микрофотографировании. Зелёные фильтры наиболее эффективны для приложений, где применяются ахроматические объективы с исправленными для зелёного света сферическими aberrациями. В дополнение, внутренние фазовые пластины в фазово-контрастных объективах предназначены для смещения назад или вперёд определённых волн, обычно с длинами около 550 нанометров (зелёный свет).

Живые образцы и другие фазовые объекты, контрастность которых при светлосильном освещении крайне низка, становятся отчётливо видны при применении таких оптических (которые в данном случае предпочтительнее химических) методов, как фазовый контраст, модуляционный контраст Хоффмана и дифференциальный интерференционный контраст. Эти методы требуют наличия специальных оптических компонентов в микроскопе, но обычно дают изображения достаточной контрастности, при которой становятся различимы важные детали имеющихся в образце структур.

Другим простым способом усиления контрастности является выбор среды для заливки с показателем преломления, значительно отличающимся от показателя преломления образца. Например, диатомеи могут быть погружены в различные усиливающие контраст среды, такие как воздух или имеющаяся в продаже заливочная среда Стиракс. Разность показателей преломления усиливает контрастность этих бесцветных образцов и делает более отчётливыми их контуры и внутренние детали.

Анизотропные вещества обычно демонстрируют наличие двух или более показателей преломления и называются, поэтому, двоякопреломляющими (или с двойным

лучепреломлением). В эту категорию образцов входят минералы, кристаллы (структуры которых обладают высокой степенью пространственной симметрии), волокна, волоски и широкий спектр других биологических образцов. Если свет входит в анизотропный кристалл в направлении, не совпадающим с его оптической осью, он расщепляется на два пучка, поляризованных в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и распространяющихся с разными скоростями. Световые волны в этих пучках поляризованы и могут, при соединении их в анализаторе микроскопа, интерферировать, формируя ярко окрашенные и контрастные изображения двоякопреломляющих образцов.

Когда освещение падает на непрозрачную поверхность, оно отражается в соответствии с физическими особенностями этой поверхности. Очень гладкие поверхности отражают свет под углом, равным углу падения (явление, называемое **зеркальным отражением**). Неровные или рассеивающие поверхности обычно отражают свет во всех возможных направлениях (так называемое **диффузное отражение**), в результате чего в объектив попадает меньшее количество света. Контрастность в микроскопии в отражённом свете может быть усилена тщательной подготовкой образца. Шлифы (или образцы для металлографического исследования) часто травятся химически активными жидкостями или газами для обнаружения межзёренных границ и/или полируются для увеличения количества отражённого в микроскоп света. Для усиления контрастности образцов в микроскопии в отражённом свете также применяются красители, в виде флуоресцентных меток, тонкие плёнки и металлические покрытия. Образцы, обладающие двойным лучепреломлением, могут наблюдаться с помощью поляризованного отражённого света, а к прозрачным фазовым объектам часто применяются такие методы, как дифференциальный интерференционный контраст, темнопольное освещение и модуляционный контраст Хоффмана.

Но во всех микроскопических методах усиления контрастности, фундаментальными параметрами, определяющими качество изображения, остаются разрешающая способность, увеличение и контраст. Основной функцией микроскопа является увеличение размера и различение мелких деталей образца, но это должно сочетаться с достаточной контрастностью, благодаря которой образец становится видимым приёмным устройством (цифровой или обычной камерой или человеческим глазом).