

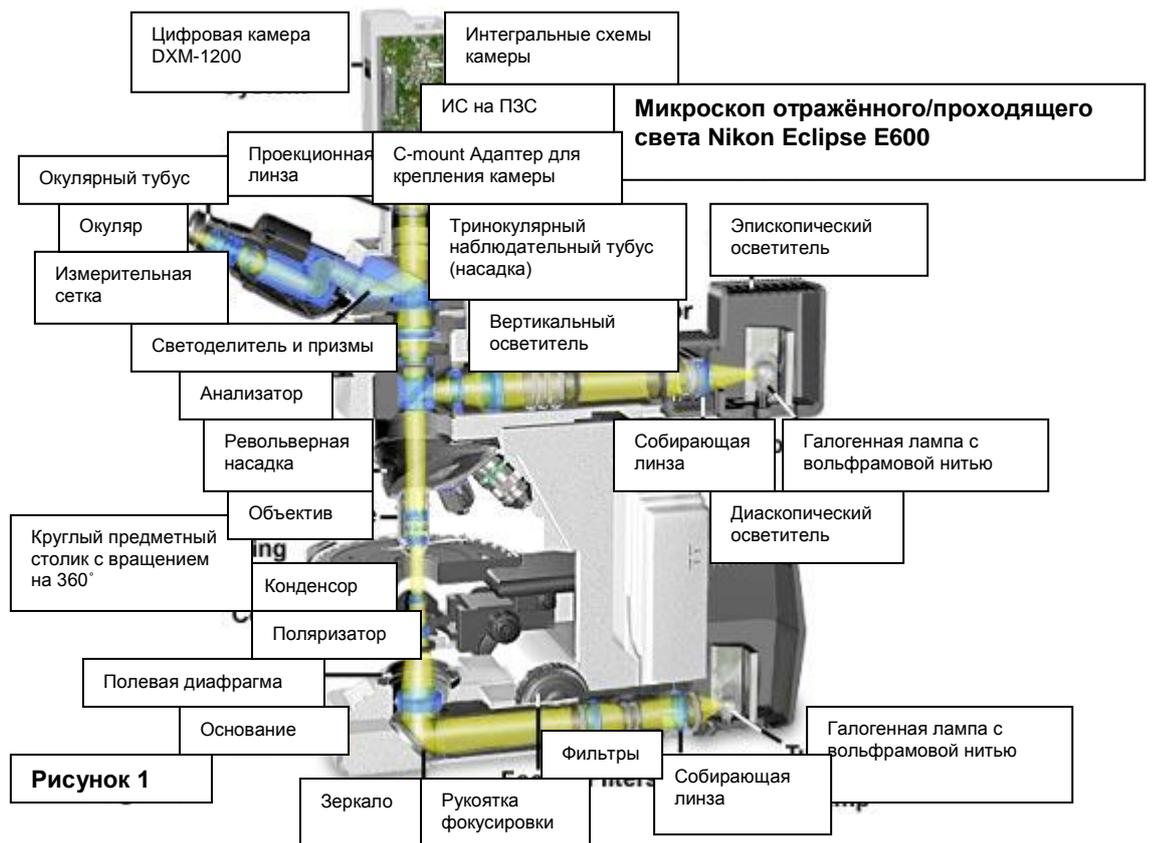
Оптические системы микроскопов

Современные сложные микроскопы предназначены для формирования увеличенных двухмерных изображений, снятых в последовательно расположенных вдоль оптической оси фокальных плоскостях образца, что обеспечивает возможность двух- и трёхмерного исследования мелких структурных деталей образца. Оптические компоненты смонтированы на прочном эргономичном основании, что обеспечивает возможность быстрой замены, точного центрирования и тщательной юстировки оптически взаимосвязанных узлов. Вместе, оптические и механические компоненты микроскопа, включая образец, помещённый между предметным и покровным стеклом, образуют оптическую систему, центральная ось которой проходит через основание и штатив микроскопа.

Оптическая система микроскопа – Оптическая система микроскопа обычно состоит из осветителя (включая источник света и собирающую линзу), конденсора, образца, объектива, окуляра и фотоприёмника, который может являться либо камерой, либо глазом наблюдателя. Исследовательские микроскопы также содержат устройство (предварительной) обработки светового пучка, обычно расположенное между осветителем и конденсором, и дополнительный фотоприёмник или светофильтры, вставленные между объективом и окуляром или камерой. Согласованная работа фотоприёмника и устройств(а) предварительной обработки пучка обеспечивает изменение контрастности изображения как функции пространственной частоты, фазы, поляризации, поглощения, флуоресценции, внеосевого освещения и/или других свойств образца и параметров режима освещения. Но даже без дополнительных устройств обработки осветительного пучка и фильтрации волн, формирующих изображение, большинство даже базовых микроскопических конфигураций обладают определённой степенью естественной фильтрации.

Введение

Современные сложные микроскопы предназначены для формирования увеличенных двухмерных изображений, снятых в последовательно расположенных вдоль оптической оси фокальных плоскостях образца, что обеспечивает возможность двух- и трёхмерного исследования мелких структурных деталей образца.



Большинство микроскопов оснащено механизмом перемещения предметного столика, позволяющим микроскописту точно располагать, ориентировать и фокусировать образец для оптимизации наблюдения и формирования изображений. Интенсивность освещения и ход лучей в микроскопе контролируются и управляются посредством размещения диафрагм, зеркал, призм, светоделителей и других оптических элементов в определенные положения, за счет чего достигается необходимая яркость и контрастность образца.

На рисунке 1 представлен микроскоп Nikon Eclipse E600, с тринокулярным тубусом и цифровой камерой DXM-1200 для регистрации изображений. Освещение производится расположенной в ламповом блоке галогенной лампой с вольфрамовой нитью, свет от которой сначала проходит через собирающую линзу, а потом попадает в оптический путь в основании микроскопа. Испущенный лампой накаливания пучок света модифицируется серией фильтров, расположенных также в основании микроскопа, после чего, отражённый от зеркала, он через полевую диафрагму падает на конденсор. Световой конус, формируемый конденсором, освещает образец, расположенный на предметном столике микроскопа, и попадает в объектив. После объектива световой пучок расщепляется светоделителем/блоком призм и направляется либо в окуляр, где формируется мнимое изображение, либо на проекционную линзу тринокулярного промежуточного тубуса для формирования цифрового изображения на фотодиодной матрице ПЗС цифровой системы регистрации и визуализации изображений.

Оптические компоненты современных микроскопов смонтированы на прочном эргономичном основании, что обеспечивает возможность быстрой замены, точного центрирования и тщательной юстировки оптически взаимосвязанных узлов. Вместе, оптические и механические компоненты микроскопа, включая образец, помещённый между предметным и покровным стеклом, образуют оптическую систему, центральная ось которой проходит через основание и штатив микроскопа. Оптическая система микроскопа обычно состоит из осветителя (включая источник света и собирающую линзу), конденсора, образца, объектива, окуляра и фотоприёмника, который может являться либо камерой, либо глазом наблюдателя (таблица 1). Исследовательские микроскопы также содержат устройство предварительной обработки светового пучка, обычно расположенное между осветителем и конденсором, и дополнительный фотоприёмник или светофильтры, размещаемые между объективом и окуляром или камерой. Согласованная работа фотоприёмника и устройств(а) предварительной обработки пучка обеспечивает изменение контрастности изображения как функции пространственной частоты, фазы, поляризации, поглощения, флуоресценции, внеосевого освещения и/или других свойств образца и параметров режима освещения. Но даже без дополнительных устройств обработки осветительного пучка и фильтрации волн, формирующих изображение, большинство базовых микроскопических конфигураций обладают определённой степенью естественной фильтрации.

Компоненты оптической системы микроскопа

Компонент микроскопа	Элементы и характеристики
Осветитель	Источник света, собирающая линза, полевая диафрагма, тепловые фильтры, выравнивающие светофильтры, рассеиватель, нейтральные светофильтры
Устройство предварительной обработки пучка	Ирисовая диафрагма конденсора, темнопольная диафрагма, теневая маска, фазовые кольца, внеосевая щелевая диафрагма, призма Номарского, флуоресцентный фильтр возбуждения
Конденсор	Числовая апертура, фокусное расстояние, aberrации, пропускание света, иммерсионная среда, рабочее расстояние
Образец	Толщина предметного стекла, толщина покровного стекла, иммерсионная среда, поглощение, пропускание, дифракция, флуоресценция, запаздывание, двойное лучепреломление
Объектив	Увеличение, числовая апертура, фокусное расстояние, иммерсионная среда, aberrации, пропускание света, оптическая передаточная функция, рабочее расстояние

Фильтр изображения	Компенсатор, анализатор, призма Номарского, ирисовая диафрагма объектива, фазовая пластина, SSEE фильтр, модуляционная пластина, пропускание света, селекция длин волн, флуоресцентный запирающий фильтр
Окуляр	Увеличение, aberrации, размер поля, вынос глаза
Детектор	Человеческий глаз, фотоэмульсия, фотоумножитель, фотодиодная матрица, видеокамера

Таблица 1

В то время как одни оптические компоненты микроскопа выступают в роли элементов, формирующих изображение, другие предназначены для различных модификаций освещающего пучка, а также выполняют фильтрующие и передающие функции. Формирующими изображение компонентами оптической системы микроскопа являются собирающая линза (расположенная в осветителе или рядом с ним), конденсор, объектив, окулярный тубус (или окуляр) и преломляющие элементы человеческого глаза или линза камеры. Хотя некоторые из этих компонентов обычно не относятся к формирующим изображение, их характеристики имеют первостепенное значение в определении качества конечного микроскопического изображения.

Понимание роли отдельных линз, составляющих компоненты оптической системы, является основополагающим для понимания процесса формирования изображения в микроскопе. Простейшим, формирующим изображение элементом является идеальная линза (рисунок 2) – идеально скорректированная, свободная от aberrаций и собирающая свет в одну точку. Параллельный, параксиальный пучок света, преломляясь в собирающей линзе, фокусируется в её фокальной точке или фокусе (на рисунке 2 она обозначена надписью **Фокус**). Такие линзы часто называют **положительными**, поскольку они способствуют более быстрому схождению конвергентного (сходящегося) светового пучка и замедляют расхождение расходящегося пучка. Свет от точечного источника, расположенного в фокальной точке линзы, выходит из неё параллельным, параксиальным пучком (направление справа налево на рисунке 2). Расстояние между линзой и её фокусом называется **фокусным расстоянием** линзы (обозначенной буквой **f** на рисунке 2).

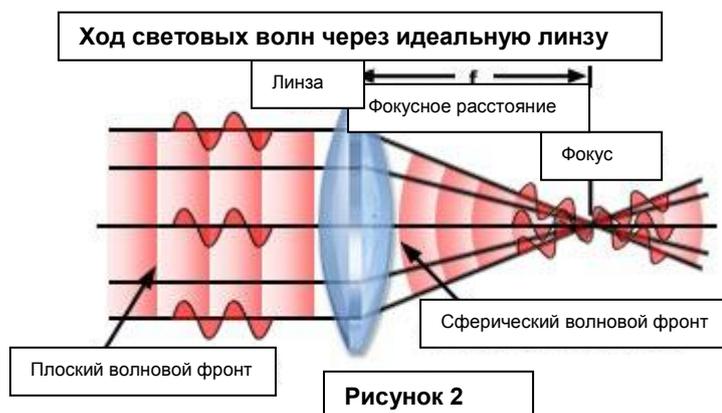


Рисунок 2

Оптические явления часто описываются в терминах либо квантовой теории, либо волновой оптики, в зависимости от рассматриваемой задачи. При прохождении света через линзу, его волновыми свойствами можно пренебречь и считать, что он распространяется по прямым линиям, обычно называемым **лучами**. Простых лучевых диаграмм или хода лучей часто бывает достаточно для объяснения многих важных аспектов и понятий микроскопии, включая преломление, фокусное расстояние, увеличение, формирование изображения и диафрагмы. В других случаях, световые волны удобнее рассматривать как состоящие из отдельных частиц (**квантов**), особенно когда свет создается в результате квантово-механического события или трансформируется в другой вид энергии. В нашем обсуждении проходящие через оптические линзы параксиальные лучи будут рассматриваться в рамках как волновой, так и геометрической (лучевой) оптики (лучевых диаграмм, в которых лучи распространяются слева направо). Параксиальными (или приосевыми) называются световые лучи, проходящие

близко к оптической оси; при этом значения углов падения и преломления, выраженные в радианах, можно считать приблизительно равными значениям их синусов.

В параллельном световом пучке отдельные монохроматические волны образуют **группу волн**, электрические и магнитные векторы в которой колеблются в фазе и образуют **волновой фронт**; при этом направление его распространения перпендикулярно направлению колебаний. При прохождении через идеальную линзу плоская волна преобразуется в сферическую, с центром в фокальной точке (**Фокусе**) линзы (рисунок 2). Сведённые в фокальной точке световые волны интерферируют, усиливая друг друга. И наоборот, сферический волновой фронт, расходящийся из фокальной точки идеальной линзы, преобразуется ей в плоскую волну (распространение справа налево на рисунке 2). Каждый световой луч плоской волны преломляется в линзе с небольшим отличием от других, поскольку падает на её поверхность под несколько отличным углом. На выходе из линзы направление светового луча также меняется. В реальных системах угол преломления и фокальная точка линзы или группы линз зависит от толщины, геометрии, показателя преломления и дисперсии каждого компонента системы.



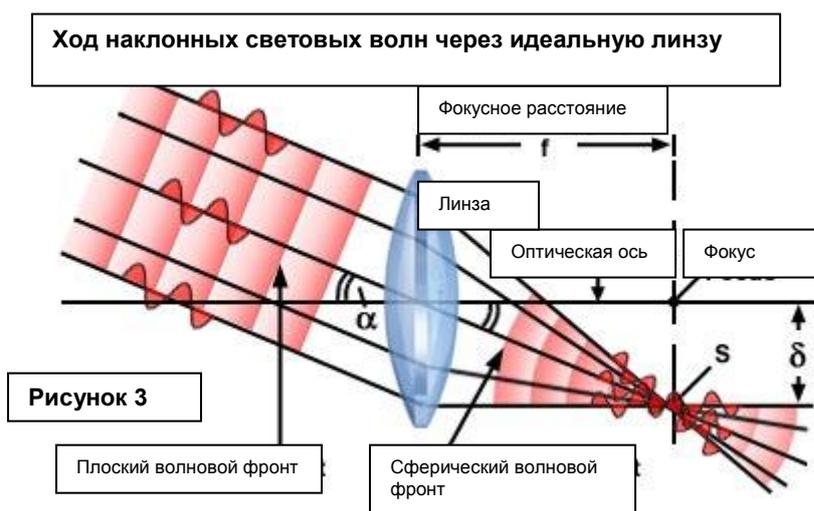
Интерактивное учебное руководство Java

GO! JAVA

Характеристики идеальной линзы

В этом приложении демонстрируется прохождение световых волн через свободную от аберраций идеальную линзу и сведение их в одну точку после преломления на её кривых поверхностях.

В общем, действие идеальной линзы (или системы линз), геометрические свойства которой определяют положение фокальной точки, заключается в преобразовании одной сферической волны в другую. С увеличением расстояния между источником света и линзой угол расходимости световых лучей на входе в линзу падает, а радиус волнового фронта, соответственно, растёт. Если радиус сферической волны, падающей на линзу, бесконечен, радиус преломлённой сферической волны становится равен фокусному расстоянию линзы. Идеальная линза имеет две фокальные точки, и плоская волна, падающая на линзу, фокусируется в одной из них, в зависимости от того, на какую сторону линзы падают световые лучи.

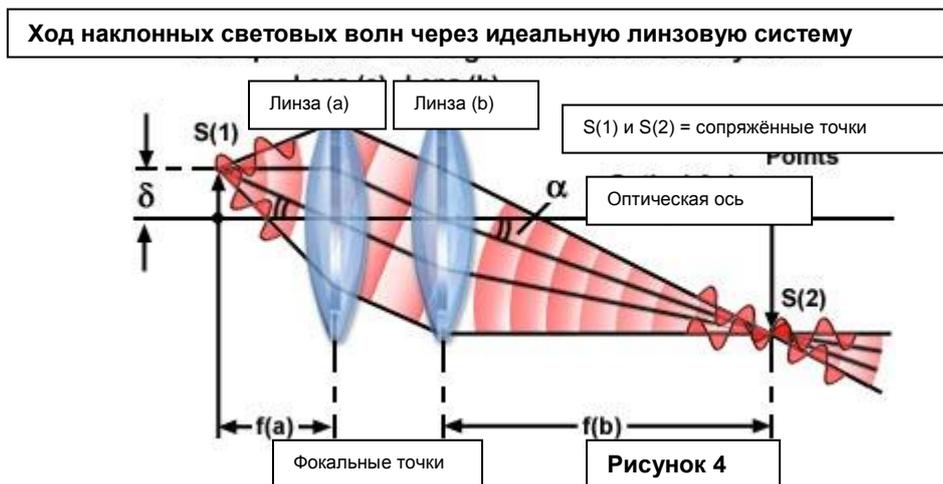


Если направление распространения плоской волны не совпадает с оптической осью линзы, фокальная точка производимой линзой сферической волны также смещается в сторону от оси. На рисунке 3 рассмотрен случай падения плоской волны на идеальную линзу под углом (α). Центр **S** производимой линзой сферической волны лежит на расстоянии δ от осевой фокальной точки (**Фокус** на рисунке 3), но в той же фокальной плоскости. Значение δ может быть выражено как:

$$\delta = f \times \sin(\alpha)$$

где f – фокусное расстояние идеальной линзы. В терминах геометрической оптики, f является радиусом дуги с центром в S , проходящей через центр линзы, как если бы она (дуга) была единичной преломляющей поверхностью.

На рисунке 4 представлен альтернативный способ рассмотрения точечного источника света ($S(1)$), не лежащего в фокальной плоскости линзы. На этом рисунке идеальная линза разбита на две отдельные линзы (**линзу(a)** и **линзу(b)**), так что точечный источник света $S(1)$ расположен на расстоянии $f(a)$ (фокусном расстоянии) от **линзы(a)**. И аналогично, точечный источник $S(2)$ расположен на расстоянии $f(b)$, фокусном расстоянии **линзы(b)**. Прямая линия, соединяющая центры **линзы(a)** и **линзы(b)** называется **оптической осью** системы линз.



В системе из двух линз (рисунок 4) сферический волновой фронт, расходящийся от точечного источника $S(1)$, лежащего на расстоянии δ от оптической оси линзы, преобразуется **линзой(a)** в плоскую волну. Плоская волна, вышедшая из **линзы(a)**, наклонена к оптической оси под углом α . И δ и α связаны приведённым выше уравнением, в котором f надо заменить значением $f(a)$. При прохождении через вторую линзу (**линзу(b)**) происходит обратное преобразование плоской волны в сферическую с центром в $S(2)$. В результате идеальная линза L , являющаяся системой **линза(a)** + **линза(b)**, фокусирует свет из точки $S(1)$ в точку $S(2)$, а также выполняет обратное действие, фокусируя свет из точки $S(2)$ в точку $S(1)$. Соотнесённые таким образом фокальные точки линзовой системы обычно называются **сопряжёнными точками**.

В классической оптике пространство между источником света $S(1)$ и входной поверхностью первой линзы называется **пространством предметов**, а пространство между выходной поверхностью второй линзы и источником $S(2)$ – **пространством изображений**. Все точки, светящиеся собственным или отражённым светом, называются **объектами** (или, применительно к оптической микроскопии, **образцами**), а картины, получаемые в результате сведения преломлённых линзой световых лучей, называются **изображениями**. Пересекающиеся световые волны создают **действительное** изображение; если же пересекаются лишь мысленные продолжения - проекции расходящихся световых лучей, система линз образует **мнимое** изображение. Действительное изображение можно визуализировать при проецировании на экран, эмульсию фотоплёнки или организовать в цифровой массив фотодиодными элементами прибора с зарядовой связью (ПЗС). Напротив, чтобы наблюдатель мог увидеть мнимое изображение, требуется дополнительная линза или система линз.



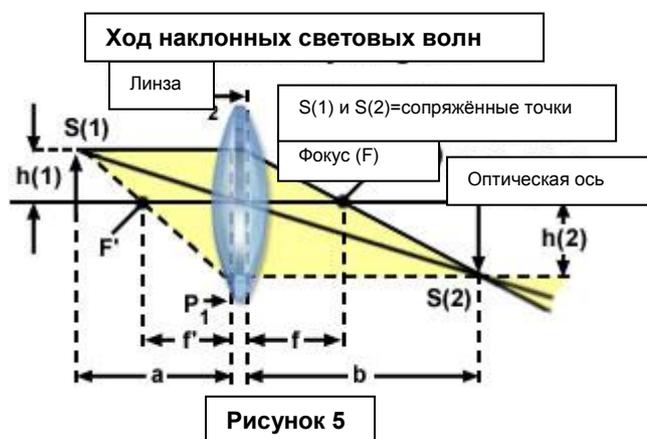
Интерактивное учебное руководство Java

Характеристики идеальной двухлинзовой системы

В этом приложении показан ход лучей от точечного источника света, не лежащего в фокальной плоскости идеальной линзы, которая представлена системой двух линз.

Если точку **S(1)** на рисунке 4 заменить набором точек, распределённых в той же фокальной плоскости, то каждая точка будет отражена идеальной линзой в соответствующую точку набора, лежащего в фокальной плоскости **S(2)**. В случае если набор точек **S(1)** лежит в плоскости, перпендикулярной оптической оси линзы, плоскость соответствующего набора сопряжённых точек **S(2)** будет также перпендикулярна оси. Верно также и обратное: каждую точку набора **S(2)** линза сфокусирует в сопряжённую точку плоскости или поверхности набора **S(1)**. Плоскости или поверхности этого типа известны как **сопряжённые плоскости**.

Другой способ представления распространяющегося волнового пакета проиллюстрирован на рисунке 5 для наклонной световой волны (косой свет). В основе этого представления лежит применение законов геометрической оптики для определения размеров и положения изображений, сформированных линзой или системой линз. Для установления параметров формирования изображения необходимо всего два характерных луча: один – параксиальный, а другой – проходящий через центр линзы (**главный луч**). Во многих книгах по гауссовой оптике эти световые лучи называются **характеристическими лучами**, а главным лучом называется луч, проходящий через центр входного или выходного зрачка, линзы и любой апертурной диафрагмы оптической системы. Часто, для определения размеров объекта и изображения применяется не главный луч, а характеристические лучи, проходящие через переднюю и заднюю фокальные точки линзы. На рисунке 5 второй характеристический луч показан пунктирной линией, проходящей через переднюю фокальную точку (**F'**) линзы.



Образец, или источник света (**S(1)** на рисунке 5), расположен на расстоянии **a** слева от линзы, в области, называемой пространством предметов. Световой луч, обозначенный пунктирной линией, выходящей из **S(1)** и пересекающей оптическую ось в предметном пространстве в фокальной точке (**F'**), преломляется обеими поверхностями линзы и выходит из неё параллельно оптической оси. Продолжения преломлённого и падающего луча пересекаются на поверхности линзы, расположенной на расстоянии **a** от источника **S(1)**. Эта поверхность (**P(1)** на рисунке 5) называется **передней главной поверхностью** (или **главной поверхностью в пространстве предметов**). Верхний луч, выходящий из **S(1)** параллельно оптической оси, преломляется линзой и проходит через фокальную точку (**F**) в пространстве изображений. Продолжения преломлённого и падающего луча пересекаются на **главной поверхности в пространстве изображений** (обозначенной **P(2)** на рисунке 5), лежащей в линзе на расстоянии **b** от изображения **S(2)**. Вблизи оптической оси поверхности **P(1)** и **P(2)** приблизительно считаются плоскими и называются **главными плоскостями** линзы. Пересечения этих плоскостей с оптической осью линзы (на рисунке не показано) называются **главными точками**. Главные точки простой зеркально симметричной выпуклой линзы также зеркально симметричны. В более сложных линзах или линзовых системах главные точки могут совпадать с поверхностью линзы или даже выходить за границы оптических элементов.

Другим набором точек, характеризующим линзу, являются **узловые точки**, лежащие на месте пересечения оптической оси и продолжений наклонных световых лучей, проходящих через линзу. Узловые точки не показаны на рисунке 5, но они лежат очень близко к главным точкам линзы. Таким образом, все три пары точек – фокальные точки линзы (**F** и **F'**), главные точки (**P(1)** и **P(2)**) и узловые точки – лежат на оптической оси линзы. Если известны положения фокальных и главных (либо узловых) точек, параметры объекта и изображения могут быть однозначно определены по геометрической схеме, отображающей ход лучей, без

рассмотрения их преломления на каждой поверхности линзы. В результате, любая система линз может быть воспроизведена с помощью фокальных точек и главных плоскостей, считая, что после пересечения передней главной плоскости световой луч идёт параллельно оптической оси и выходит из задней главной плоскости без преломления.



Интерактивное учебное приложение Java

Построение хода лучей

В этом приложении показано, каким образом с помощью геометрической оптики можно определить размеры и положение изображения, сформированного линзой или системой линз.

Обратите внимание, что расстояние a больше переднего фокусного расстояния f' линзы (рисунок 5). По этой причине в пространстве изображений формируется перевёрнутое изображение $S(2)$ на расстоянии b справа от линзы. Расстояние b больше заднего фокусного расстояния f , связанного с a и b классическим уравнением:

$$1/a + 1/b = 1/f$$

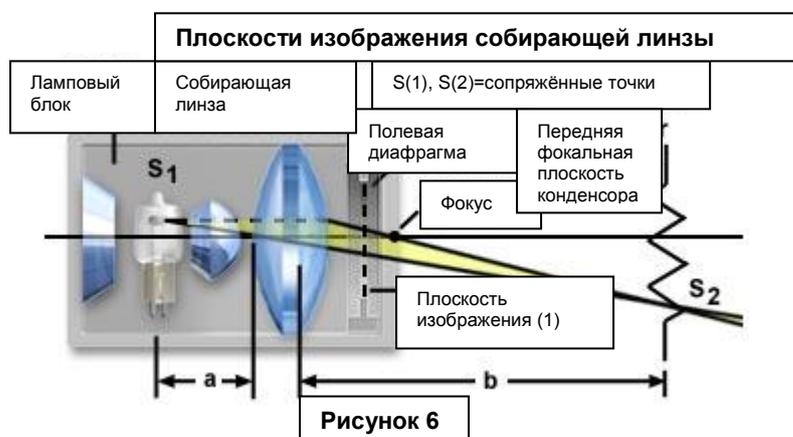
Высота $h(2)$ изображения $S(2)$ отражает увеличение размера объекта или образца $S(1)$, расположенного перед линзой на высоте $h(1)$ от оптической оси. **Поперечное увеличение M** простой линзы (которую можно приблизительно считать гауссовой тонкой линзой) выражается уравнением:

$$M = h(2)/h(1) = b/a$$

Поскольку $S(1)$ и $S(2)$ лежат в сопряжённых плоскостях, изображение $S(2)$ фокусируется линзой в $S(1)$. В этом случае фокусным расстоянием будет f' , а увеличение (M) обратится в $1/M$ благодаря уменьшению размера при рассмотрении обратного хода лучей.

Отношение расстояния между двумя точками вдоль оптической оси в пространстве изображений к расстоянию между двумя сопряжёнными точками в пространстве предметов называется **продольным** или **осевым увеличением**. Для малых расстояний в плоскости изображения величина продольного увеличения равна квадрату поперечного увеличения.

В основе функционирования всех формирующих изображение компонентов оптического микроскопа лежат приведённые выше геометрические соотношения. Сюда входит собирающая линза, конденсор, объектив, окуляры (в проекционном режиме), камера и человеческий глаз.



Первым звеном в оптической системе микроскопа является ламповый блок, в котором находится лампа и собирающая линза, и где формируется первичное освещение микроскопа. На рисунке 6 представлена типичная конфигурация, включающая лампу и собирающую линзу.

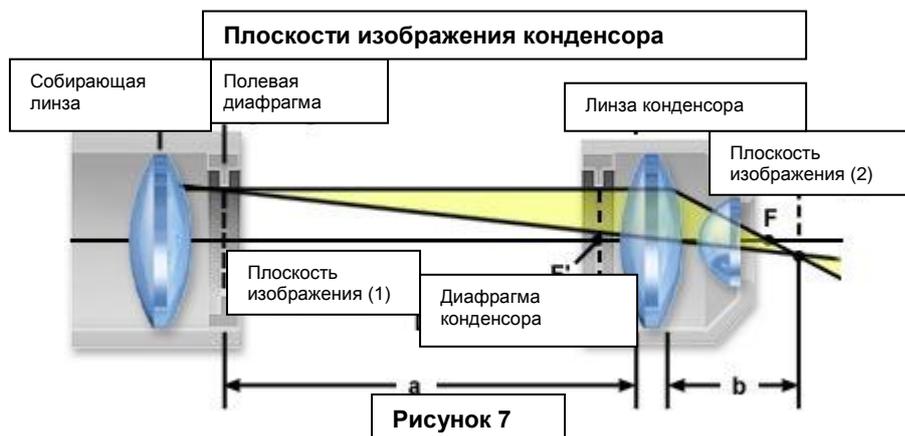
Для координат и размеров изображения используются те же условные обозначения, что были введены на рисунке 5 для базовой линзовой системы. Свет, испущенный галогенной лампой с вольфрамовой нитью, проходит через собирающую линзу, которая фокусирует нить накала в передней фокальной плоскости конденсора. Первая плоскость изображения в оптической системе микроскопа (**плоскость изображения (1)**) лежит в полевой диафрагме.



Интерактивное учебное приложение Java

Плоскости изображения конденсора
Исследуйте соотношение между плоскостями изображения в полевой и конденсорной диафрагмах и влияние размера апертуры на ход лучей.

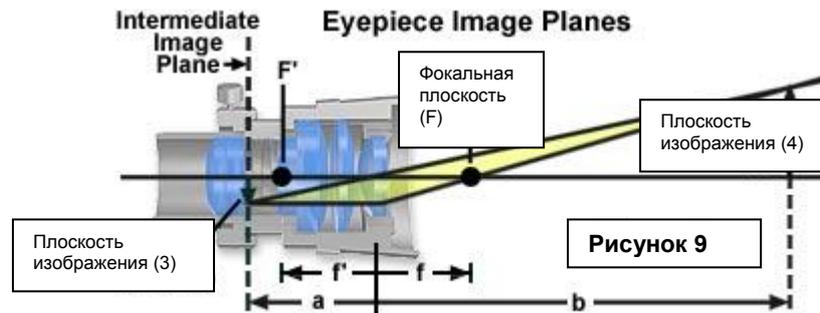
Точка **S(1)** нити лампы сопряжена с точкой **S(2)**, которая, если конфигурация микроскопа соответствует условиям освещения по Кёлеру, изображается в фокальной плоскости апертурной диафрагмы конденсора. Расстояние от **S(1)** до передней главной плоскости системы собирающей линзы обозначено буквой **a**, а **b** обозначает расстояние между ирисовой диафрагмой конденсора и главной плоскостью собирающей линзы в пространстве изображений. Полевая диафрагма микроскопа (рисунки 6 и 7) регулирует диаметр светового пучка, выходящего из осветителя, перед тем, как он попадёт в апертуру конденсора.



Связь между сопряжёнными плоскостями изображения конденсора и осветительной системы проиллюстрирована на рисунке 7. Если микроскоп настроен для освещения по Кёлеру, полевая диафрагма (**плоскость изображения (1)**) изображается в той же плоскости, что и образец (**плоскость изображения (2)**). Передняя фокальная точка конденсора (**F'**) лежит в центре апертурной диафрагмы. Длины **a** и **b** представляют соответствующие расстояния между полевой диафрагмой (**плоскость изображения (1)**) и плоскостью образца (**плоскость изображения (2)**) и главными плоскостями линз конденсора. Свет, испущенный из лампового блока, проходя через конденсор, формируется им в конус освещения, который падает на образец и проходит сквозь него. Числовая апертура этого светового конуса регулируется размером отверстия ирисовой диафрагмы конденсора.

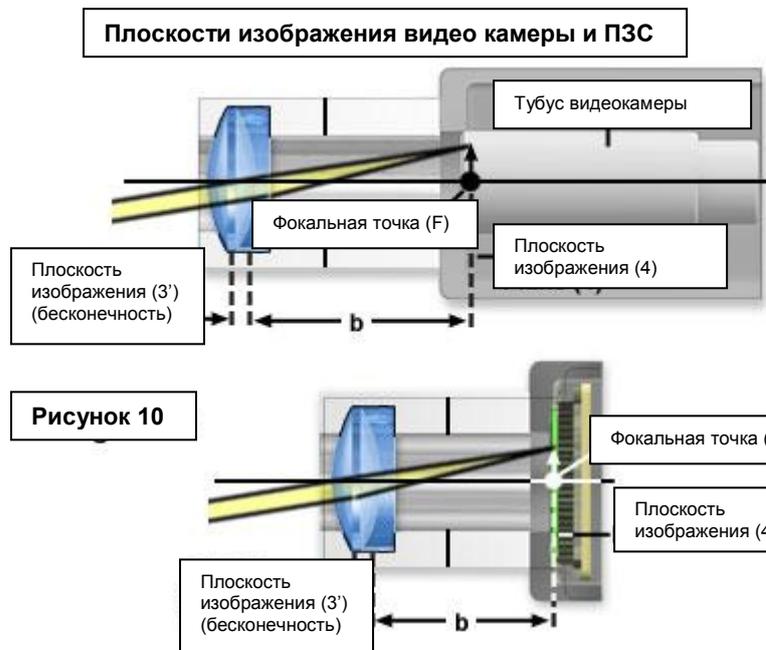


На рисунке 8 показана система линз объектива и его плоскости изображения: плоскость образца (**плоскость изображения (2)**) и относительное положение промежуточного изображения микроскопа (**плоскость изображения (3)**). Плоскости образца и промежуточного изображения сопряжены между собой и лежат на расстоянии **a** и **b** от главных плоскостей объектива, соответственно. Передняя фокальная точка объектива обозначена буквой **F'**, а задняя фокальная точка, лежащая в плоскости задней апертуры объектива – буквой **F**. Система внутренних линз объектива часто является сложной комбинацией узлов, состоящих их полусферических линз и менисков, двойных и тройных линз, а также отдельных линз сложной конструкции.



Окулярный тубус (либо мнимого изображения) **Плоскости изображения окуляра** бо действительного, в зависимости от сложного взаимного расположения плоскости промежуточного изображения, фокальных плоскостей окуляра и его внутренней полевой диафрагмы. В дополнение, линейный размер поля, наблюдаемого микроскопистом, определяется диаметром фиксированной диафрагмы окуляра Эта величина, называемая **величиной поля** или **величиной поля зрения** (сокращённо **FN** от английского «field number»), часто бывает обозначена на корпусе окулярного тубуса.

Плоскости изображения окуляра, при использовании его в проекционном режиме, представлены на рисунке 9. Главные точки **F'** и **F** являются передней и задней фокальными точками, соответственно. Плоскость промежуточного изображения (**плоскость изображения (3)**) находится в центре фиксированной полевой диафрагмы окуляра, которая расположена либо перед, либо после полевой линзы окуляра, в зависимости от его конструкции. Эта плоскость изображения сопряжена с **плоскостью изображения (4)** и является местом, куда устанавливаются фокусирующие и измерительные сетки. Величина **a** обозначает расстояние между фиксированной диафрагмой окуляра и главной плоскостью глазной линзы окуляра (ближайшей к глазу наблюдателя), а расстояние между (глазной) линзой окуляра и **плоскостью изображения (4)**, совпадающей с поверхностью светочувствительных элементов, обозначено как **b**. Поскольку **a** больше переднего фокусного расстояния линзы окуляра (**f'**), изображение, сформированное в **плоскости изображения (4)** является действительным (не мнимым). Расстояние между глазной линзой окуляра и задней фокальной плоскостью (**F**), являющееся задним фокусным расстоянием системы линз окулярного тубуса, обозначено как **f**.



Плоскости изображения на светочувствительной поверхности видео устройства и ПЗС представлены на рисунке 10, где также изображены и специальные положительные проекционные линзы, формирующие изображение на светочувствительных элементах. Фокальная точка (**F**) расположена либо на фотокатоде видео трубки, либо на поверхности фотодиодной матрицы ПЗС, в зависимости от геометрии и других параметров фотоприёмника. Если проекционная линза расположена в оптической системе после окуляра, тогда она отображает мнимое изображение (лежащее в **плоскости изображения (3')**) на светочувствительную поверхность в **плоскости изображения (4)**. Эта плоскость изображения лежит на расстоянии **b** от проекционной линзы окуляра, равно фокусному расстоянию линзы. Необходимо заметить, что вместо светочувствительных элементов видео устройства или ПЗС может быть применена традиционная фотоплёнка; в этом случае плоскость изображения совпадает с поверхностью фотоземлюсионного слоя, покрывающего плёнку.

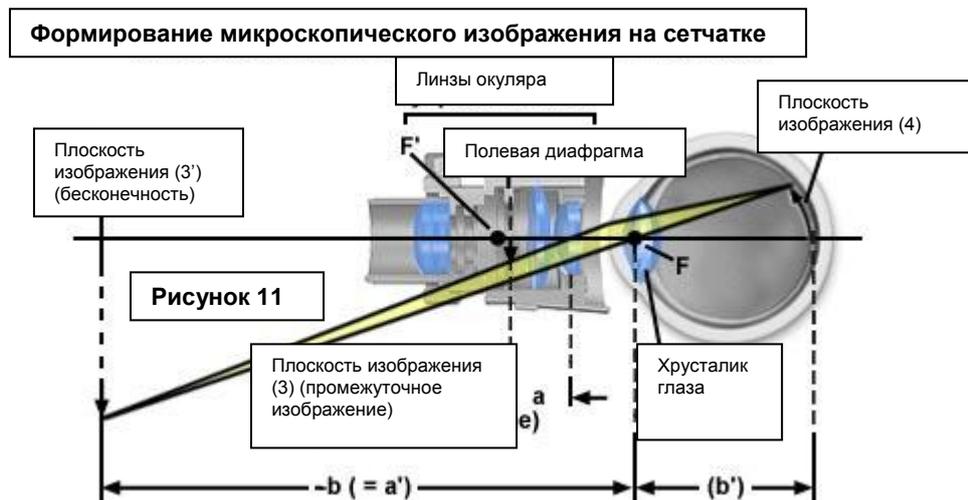


Интерактивное учебное приложение Java

Наблюдательные и проекционные окуляры

В этом приложении показано, каким образом изображение, сформированное микроскопом, отображается в системе окуляр - человеческий глаз и окуляр - камера.

При наблюдении изображений в микроскоп промежуточное изображение (см. **плоскость изображения (3)** на рисунке 11) формируется объективом несколько ближе к окуляру (на расстоянии **a**), чем его переднее фокусное расстояние (**F'**). Это исключает формирование действительного изображения за окулярной линзой, в отличие от окуляра, функционирующего в проекционном режиме, как показано на рисунке 9. Вместе, глаз и окуляр формируют изображение на сетчатке (**плоскость изображения (4)**), как если бы глаз видел мнимое изображение.



В случае, когда расстояние a меньше фокусного расстояния, расстояние b должно быть меньше нуля (согласно обратному уравнению, связывающему величины a и b с фокусным расстоянием). Поэтому, действительное изображение не может быть сформировано справа от окуляра в отсутствие глаза или камеры. Вместо этого, на расстоянии $-b$ (рисунок 11) слева от окуляра (или b справа; см. рисунок 5) возникает мнимое изображение (**плоскость изображения (3')**). При наблюдении изображения в окуляр, формирующий изображение пучок, расходящийся после линзы окуляра, кажется исходящим из мнимого источника, расположенного в **плоскости изображения (3')**. Световые лучи, выходящие из окуляра образуют конус освещения, который составляет выходной зрачок микроскопа, часто называемый также **выносом глаза** или **диском Рамсдена**. При наблюдении увеличенных образцов выходной зрачок микроскопа должен совпадать со зрачком глаза наблюдателя.

Плоскости изображения 2, 3, 3' и 4 (рисунки 7-11) связаны между собой геометрически, как показано на рисунке 12. На каждом этапе формирования изображения, за исключением **плоскости изображения (3')**, изображение является действительным и перевёрнутым (см. рисунки 7-11). При использовании окуляра микроскопа для прямого наблюдения (рисунок 11) (в отличие от проекционного режима (рисунок 9)), изображение в **плоскости изображения (3')** является мнимым, а не действительным, и не перевёрнуто по отношению к промежуточному изображению. Но, глаз человека не воспринимает изображение на сетчатке (**плоскость изображения (4)**) как перевёрнутое, несмотря на то, что оно перевёрнуто по отношению к плоскости промежуточного изображения (**плоскость изображения (3)**) и мнимому изображению, лежащему в **плоскости изображения (3')**.

Несколько главных плоскостей изображения в микроскопе оказываются лежащими либо в фиксированных, либо в регулируемых апертурах или диафрагмах, которые являются существенными компонентами всех оптических систем. **Диафрагмой** называется непрозрачная преграда или оправа линзы с круговым отверстием (часто регулируемым), которая ограничивает поперечное сечение светового пучка в микроскопе. Существует два основных типа микроскопических диафрагм: **апертурные диафрагмы**, регулирующие апертурные углы в микроскопе, и **полевые диафрагмы**, ограничивающие размер поля, визуализируемого оптическим прибором. Основным назначением диафрагм в оптических микроскопах является предотвращение сильных aberrаций световых лучей и попадания рассеянного света в плоскости изображения, а также обеспечение надлежащего распределения и интенсивности света в пространстве предметов и изображений.

Конструкция классического микроскопа включает две апертуры и две диафрагмы для регулирования прохождения света через микроскоп. Полевая диафрагма, расположенная в ламповом блоке или в основании микроскопа, является регулируемой ирисовой диафрагмой, задающей размер поля освещения. Другой ирисовой диафрагмой является апертура конденсора, расположенная в его передней фокальной плоскости и регулирующая размер сечения светового пучка и угол падения световых лучей на образец. Третья апертура имеет фиксированный размер и располагается в задней фокальной плоскости объектива. Эта апертура определяет диаметр выходного зрачка объектива и размер промежуточного

изображения, тогда как сопряжённая фиксированная диафрагма в окулярном тубусе (полевая диафрагма окуляра) определяет размер поля зрения, видимого микроскопистом.

Суммарное увеличение микроскопа определяется характеристиками объектива и окуляров. Объективы скорректированы на заданное расстояние, которое соответствует определённому увеличению, и которое приблизительно равно длине оптического тубуса. В микроскопах с фиксированной длиной тубуса это проекционное расстояние составляет примерно 160 миллиметров. Следовательно, поперечное увеличение объектива с 8-миллиметровым фокусным расстоянием будет равно $20\times$ ($160/8$), а соответствующее продольное увеличение – $400\times$ (20×20).

Для визуальных наблюдений увеличение окуляра предполагается равным единице, когда образец (или изображение) находится на расстоянии 250 миллиметров от глаза наблюдателя. Поэтому, увеличение окуляра с фокусным расстоянием 25 миллиметров составит $10\times$ ($250/25$). Суммарное увеличение микроскопа для визуальных наблюдений является произведением увеличений объектива и окуляра. Для рассматриваемых объектива и окуляра общее поперечное увеличение будет примерно равно $200\times$ ($10\times$ окуляра умноженное на $20\times$ объектива). Необходимо отметить, что большинство современных исследовательских микроскопов оснащено скорректированными на бесконечность объективами, которые уже не проецируют промежуточное изображение прямо на плоскость промежуточного изображения. Свет, выходящий из таких объективов, сфокусирован на бесконечность, поэтому для формирования изображения в плоскости промежуточного изображения необходима дополнительная линза, называемая **тубусной линзой**. Группы волн, выходящие из сфокусированного на бесконечность объектива, являются коллимированными, что позволяет с минимальными аберрационными эффектами и расфокусировкой устанавливать дополнительные компоненты (призмы для дифференциального интерференционного контраста (ДИК), поляризаторы, эпифлуоресцентные осветители) в ход лучей между объективом и тубусной линзой.



Интерактивное учебное приложение Java

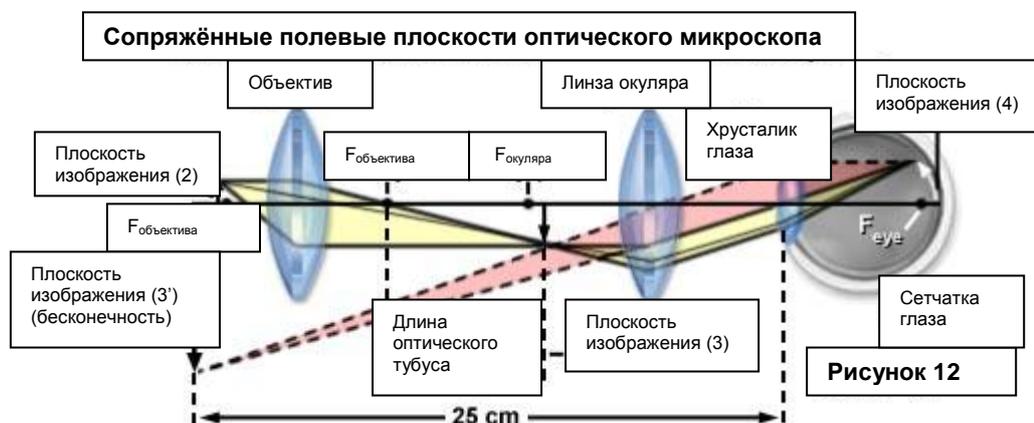
Сопряжённые полевые плоскости микроскопа
В этом приложении исследуется геометрическая связь между плоскостями изображения оптического микроскопа.

Увеличение промежуточного изображения скорректированных на бесконечность систем оптического микроскопа определяется отношением фокусных расстояний тубусной линзы и объектива. Поскольку фокусное расстояние тубусной линзы меняется от 160 до 250 миллиметров (в зависимости от производителя и модели), фокусное расстояние объектива больше не может полагаться равным 160 миллиметрам, делённым на его увеличение. Так, в скорректированном на бесконечность микроскопе с фокусным расстоянием тубусной линзы 200 миллиметров, поперечное увеличение объектива с фокусным расстоянием 8 миллиметров составит $25\times$ ($200/8$).

Более ранние «конечные» микроскопы (с фиксированной длиной тубуса) имеют заданное расстояние между отверстием револьверной головки, где крепится объектив, и положением окуляра в окулярном тубусе. Это расстояние называется **длиной механического тубуса** микроскопа. Такая конструкция предполагает, что, когда образец находится в фокусе, он лежит на несколько микрон дальше передней фокальной плоскости объектива. Стандарт длины тубусов 160 миллиметров был принят в девятнадцатом веке Королевским микроскопическим обществом (RMS) и за 100 лет получил широкое распространение. Объективы, предназначенные для использования с микроскопами со 160-миллиметровым тубусом, имеют соответствующие обозначения на своём корпусе.

Установка по ходу луча вспомогательных оптических компонентов в микроскопах с фиксированной длиной тубуса увеличивает его эффективную длину до значения, большего 160 миллиметров. По этой причине дополнительный вертикальный осветитель отражённого

света, промежуточный поляризатор и другие подобные устройства могут вызвать сферические aberrации в оптической системе, идеально скорректированной для другой длины. В то время, когда большинство микроскопических тубусов имело фиксированную длину, производители были вынуждены устанавливать дополнительные оптические элементы во вспомогательные приспособления, чтобы восстановить эффективную длину тубуса микроскопа до 160 миллиметров. Это часто приводило к росту увеличения конечных изображений и падению их яркости.



Для записи изображения на видео плёнку, фотодиодную матрицу ПЗС камеры или классическую фотоплёнку (при микрофотографировании), после окуляра часто помещается специальная положительная линза (см. рисунок 10). На выходе из окуляра сфокусированные на бесконечность световые лучи сводятся положительной линзой в плоскость фотокатода, ПЗС матрицы или фотоэмульсии. Если не рассматривать увеличение объектива, поперечное увеличение проекционной системы $M(p)$ выражается как:

$$M(p) = f(p)/f(e)$$

где $f(p)$ – фокусное расстояние проекционной линзы, а $f(e)$ – фокусное расстояние окуляра. В такой проекционной системе общее поперечное увеличение (M) экрана видеокamеры, фотодиодной матрицы ПЗС или фотоэмульсии определяется выражением:

$$M = M(o) + M(p)$$

$$M = M(o) \cdot M(e) \cdot f(p)/250 \text{ миллиметров}$$

где $M(o)$ – увеличение объектива, а $M(e)$ – увеличение линзы окуляра. Если проекционная линза не используется, а проецирование на светочувствительные элементы или фотоэмульсию осуществляется самим окуляром, выражение для общего поперечного увеличения принимает вид:

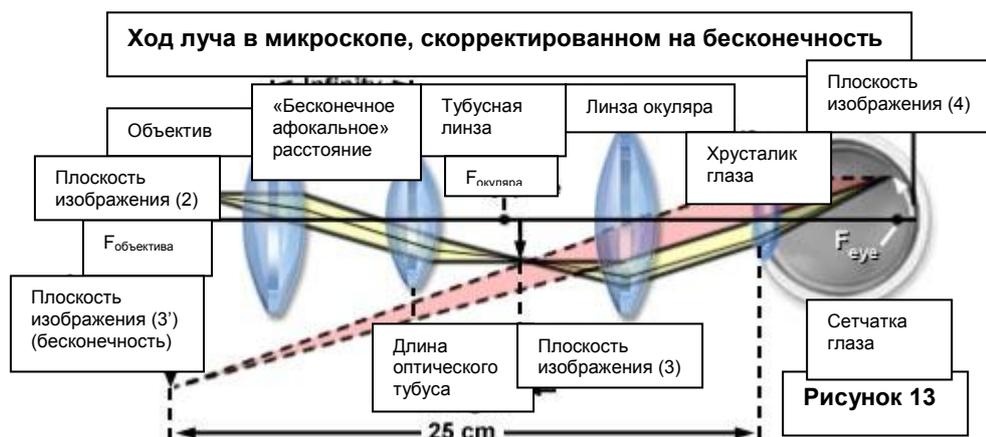
$$M = M(o) \cdot D(p)/f(e)$$

где $D(p)$ – проекционное расстояние от окуляра до плоскости изображения. Во избежание искажений изображения значение $D(p)$ должно лежать в интервале от 20 до 30 сантиметров (при использовании обычного окуляра).

Увеличения, указанные производителем на корпусе объектива и окуляра, являются номинальными и должны быть откалиброваны с помощью микрометра предметного столика для установления точных значений. Измерение увеличения проводится путём установки микрометра предметного столика в плоскость образца (на предметный столик микроскопа) и визуализации тонких линий градуировочной решетки линий в соответствующих оптических условиях.

Иногда светочувствительные элементы камеры помещаются непосредственно в плоскость промежуточного изображения, без использования проекционного окуляра; увеличение

изображения в этом случае ограничено увеличением объектива. Этот метод рекомендуется применять, только когда производительность видео системы ограничена абсолютным количеством доступного света, поскольку такая фиксация увеличения существенно сокращает возможность оптимизации качества конечного видео изображения.



Ход лучей в микроскопах с фиксированной длиной тубуса и микроскопах, скорректированных на бесконечность, рассматривается на рисунках 12 и 13. Оптическая система микроскопа с ограниченной (фиксированной) длиной тубуса проиллюстрирована на рисунке 12, куда включены ключевые оптические элементы и где показан ход лучей, определяющий взаимосвязь плоскостей изображения. Образец, расположенный на небольшом расстоянии перед передней фокальной плоскостью объектива, отображается через сопряжённые плоскости на сетчатку глаза в **плоскость изображения (4)**. Объектив проецирует действительное и перевёрнутое изображение увеличенного образца в плоскость промежуточного изображения микроскопа (**плоскость изображения (3)**), расположенную в центре полевой диафрагмы окуляра на фиксированном расстоянии за объективом. На рисунке 12 положение задней фокальной плоскости объектива на оптической оси обозначено **F'(объектив)**, а расстояние между этой фокальной плоскостью и плоскостью промежуточного изображения и составляет длину оптического тубуса микроскопа.

Интерактивное учебное приложение Java

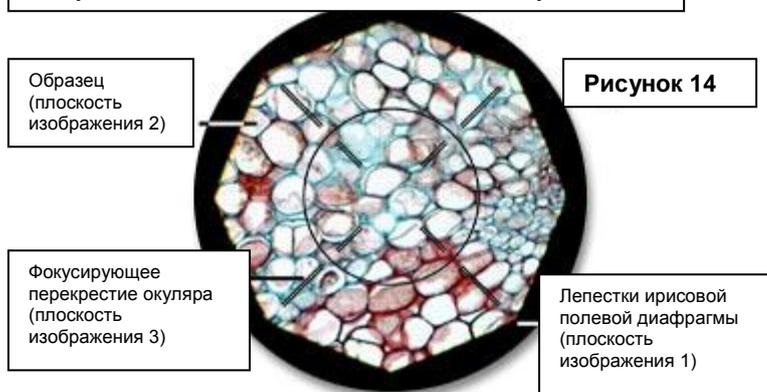
Сопряжённые полевые плоскости сфокусированного на бесконечность микроскопа

В этом приложении исследуется геометрическая связь между плоскостями изображения оптического микроскопа, сфокусированного на бесконечность и дополненного тубусной линзой.

Воздушное промежуточное изображение далее увеличивается окуляром микроскопа и проецируется на сетчатку глаза в виде прямого изображения образца, которое оказывается перевёрнутым для микроскописта. Как говорилось выше, кратность увеличения образца вычисляется по расстоянию между образцом и объективом и передним фокусным расстоянием системы линз объектива (**F(объектив)**). Изображение, формируемое в промежуточной плоскости, далее увеличивается кратно множителю, получаемому делением 25 сантиметров (ближайшее к глазу расстояние, на котором он видит объект без напряжения) на фокусное расстояние окуляра. Это визуальное изображение (мнимое) наблюдатель видит, как если бы оно находилось приблизительно на расстоянии 25 сантиметров от него.

Большинство объективов скорректировано для работы в узком интервале расстояний до изображения, а многие предназначены для работы в специально скорректированных оптических системах с соответствующими окулярами. Увеличение, обозначенное на корпусе объектива, соответствует той длине тубуса, для которой он и был разработан.

Сопряжённые плоскости оптического микроскопа



На рисунке 13 с помощью хода лучей показана оптическая система микроскопа, скорректированного на бесконечность. Для облегчения сравнения в этом случае использованы те же обозначения, что и для компонентов системы с ограниченной длиной тубуса (рисунок 12). Увеличение объектива в такой системе определяется фокусным расстоянием тубусной линзы. Обратите внимание на «бесконечное афокальное» пространство между объективом и тубусной линзой, задаваемое параллельными световыми пучками, параллельность лучей в которых сохраняется, даже если пучок распространяется под углом к оптической оси. Это пространство отведено разработчиками микроскопов для упрощения схемы установки вспомогательных приспособлений (вертикальных осветителей, призм ДИК, поляризаторов, замедляющих (фазовых) пластин и т.д.), которая, к тому же, не ведёт к серьёзным искажениям изображения. Увеличение объектива в скорректированных на бесконечность системах равняется фокусному расстоянию тубусной линзы, делённому на фокусное расстояние объектива.

В оптических микроскопах сопряжённые плоскости проецируются одна на другую и могут наблюдаться одновременно при исследовании образца через окуляр. Это свойство проиллюстрировано на рисунке 14, где изображение окрашенного тонкого среза растительной ткани наложено на лепестки полевой ирисовой диафрагмы и фокусирующую сетку окуляра в плоскости промежуточного изображения. Резкое изображение полевой ирисовой диафрагмы, расположенной рядом с собирающей линзой лампы, формируется конденсором микроскопа в плоскости образца. Далее изображения полевой диафрагмы и образца формируются объективом в плоскости промежуточного изображения и проецируются в плоскость фиксированной полевой диафрагмы окуляра, куда и помещена фокусирующая сетка. А затем, окуляром (в сочетании с глазом наблюдателя, расположенным в **плоскости изображения (4)**) изображения всех трёх плоскостей изображения формируются на поверхности светочувствительных элементов визуализирующей системы или на сетчатке наблюдателя. Полевая диафрагма, образец, промежуточное изображение и сетчатка составляют набор сопряжённых плоскостей изображения, одновременно наблюдаемых в фокусе.

Бесконечные оптические системы – Скорректированные на бесконечность микроскопы, ставшие уже стандартом в области микроскопических наблюдений, позволяют с минимальными абберационными эффектами и расфокусированием вставлять дополнительные компоненты (призмы для дифференциального интерференционного контраста (ДИК), поляризаторы, эпифлуоресцентные осветители) по ходу лучей между объективом и тубусной линзой.

За последние 10 лет большинство основных производителей микроскопов перешло на производство скорректированных на бесконечность оптических систем как для биомедицинских, так и для промышленных исследований. Поскольку в таких системах изображение фокусируется на бесконечном расстоянии, то для формирования промежуточного изображения в тубус микроскопа, между объективом и окуляром, вставляется тубусная линза.



Бесконечные оптические системы позволяют с минимальными абберационными эффектами и расфокусировкой устанавливать вспомогательные компоненты (призмы для дифференциального интерференционного контраста (ДИК), поляризаторы, эпифлуоресцентные осветители) в ход лучей между объективом и тубусной линзой. Более ранние «конечные» микроскопы (с фиксированной длиной тубуса) имеют заданное расстояние между отверстием револьверной головки, где крепится объектив, и положением окуляра в окулярном тубусе. Это расстояние называется **длиной механического тубуса** микроскопа. Такая конструкция предполагает, что, когда образец находится в фокусе, он лежит на несколько микрон дальше передней фокальной плоскости объектива. Стандарт длины тубусов 160 миллиметров был принят в девятнадцатом веке Королевским микроскопическим обществом (RMS) и за 100 лет получил широкое распространение. Объективы, предназначенные для использования с микроскопами со 160-миллиметровым тубусом, имеют соответствующие обозначения на корпусе.

Установка в ход лучей вспомогательных оптических компонентов в микроскопах с фиксированной длиной тубуса увеличивает его эффективную длину до значения, большего 160 миллиметров. По этой причине дополнительный вертикальный осветитель отражённого света, промежуточный поляризатор и другие подобные устройства могут вызвать сферические абберации в оптической системе, идеально скорректированной для другой длины. В то время, когда большинство микроскопических тубусов имело фиксированную длину, производители были вынуждены устанавливать дополнительные оптические элементы во вспомогательные приспособления, чтобы восстановить эффективную длину тубуса микроскопа до 160 миллиметров. Это часто приводило к росту увеличения конечных изображений и падению их яркости.

Функционирование некоторых систем отражённого света осложняется паразитными изображениями («засветками»), возникающими при сведении лучей, проходящих через светоделители. В попытке избавиться от артефактов, возникающих при добавлении вспомогательных оптических компонентов, немецким производителем микроскопов, фирмой Reichert, было впервые введено понятие бесконечной оптики. Компания начала эксперименты с оптическими системами, скорректированными на бесконечность, в 1930-х годах (за ней последовали компании Leica и Zeiss, но эта оптика не стала стандартной для большинства производителей вплоть до 1980-х).

Длина тубуса в скорректированных на бесконечность микроскопах называется **опорным фокусным расстоянием** и лежит в интервале от 160 до 200 миллиметров в зависимости от производителя (см. таблицу 1). Коррекция оптических аббераций в бесконечных системах осуществляется либо тубусной линзой, либо объективом. Остаточная поперечная хроматическая абберация в объективах с бесконечным фокусом может быть легко исправлена соответствующей конструкцией тубусной линзы, но некоторые производители, включая компанию Nikon, предпочитают исправлять сферическую и хроматическую абберацию в самом объективе. Это стало возможным благодаря разработке компаниями

оригинальных составов стёкол, имеющих чрезвычайно низкую дисперсию. Иногда (в особенности в ICS системах компании Zeiss применяется комбинационный подход, т.е. коррекции производятся и в тубусной линзе, и в объективе.

Характеристики бесконечных оптических систем

Производитель	Тубусная линза фокусное расстояние (миллиметры)	Парфокальное расстояние (миллиметры)	Резьбовое соединение
Leica	200	45	M25
Nikon	200	60	M25
Olympus	180	45	RMS
Zeiss	165	45	RMS

Таблица 1

В таблице 1 представлены характеристики (включая фокусное расстояние тубусной линзы, парфокальное расстояние и тип резьбового соединения) скорректированных на бесконечность микроскопов, предлагаемых основными производителями. Хотя и в Leica, и в Nikon применяются тубусы с длиной 200 миллиметров и объективы с резьбовым соединением 25 миллиметров, парфокальное расстояние этих объективов существенно больше, чем в системе Nikon CF160. Фокусное расстояние тубусной линзы компаний Olympus и Zeiss короче (180 и 165 миллиметров соответственно), но объективы обеих компаний имеют стандартный диаметр резьбы и парфокальное расстояние 45 миллиметров.

В «конечных» оптических системах (с фиксированной длиной тубуса) свет собирается объективом в плоскости промежуточного изображения, лежащей в передней фокальной плоскости окуляра, где и происходит усиливающая и ослабляющая интерференция, производящая изображение (рисунок 2(a)). Совсем другая ситуация имеет место в скорректированных на бесконечность оптических системах, где из объектива выходит поток параллельных групп волн, формирующих изображение в бесконечно удалённой плоскости (часто называемой **бесконечным пространством**, рисунок 2(b)), и эти группы волн сводятся тубусной линзой в фокус в плоскости промежуточного изображения. Необходимо отметить, что объективы, разработанные для скорректированных на бесконечность микроскопов, обычно нельзя использовать вместо объективов, предназначенных для «конечных» микроскопов (со 160- или 170-миллиметровыми оптическими тубусами), и наоборот. Сферическая аберрация бесконечных линз усиливается, когда они применяются в конечных микроскопах, из-за отсутствия в последних тубусной линзы. Иногда, тем не менее, возможно использовать конечные объективы в скорректированных на бесконечность микроскопах, но при этом возникают определённые недостатки. Числовая апертура конечных объективов падает при их использовании с бесконечными системами, что ведёт к понижению разрешающей способности. Кроме того, при использовании конечных и бесконечных объективов в одной и той же системе теряется их парфокальность. Рабочее расстояние и увеличение конечных объективов также падает при их использовании в микроскопах с тубусной линзой.

Как говорилось выше, основными оптическими компонентами бесконечной системы является объектив, тубусная линза и окуляры. На рисунке 2(b) показано, как свет, прошедший или отражённый от центральной части образца, расположенного вблизи передней фокальной плоскости объектива, собирается и преобразуется объективом в пучок параллельных лучей, проецируемых вдоль оптической оси микроскопа на тубусную линзу. Свет, попадающий в объектив из периферийных областей образца, входит в оптическую систему под углом и под углом (но всё же параллельными пучками) направляется объективом к тубусной линзе. Весь свет, собранный тубусной линзой, фокусируется в плоскости промежуточного изображения, после чего увеличивается окуляром.

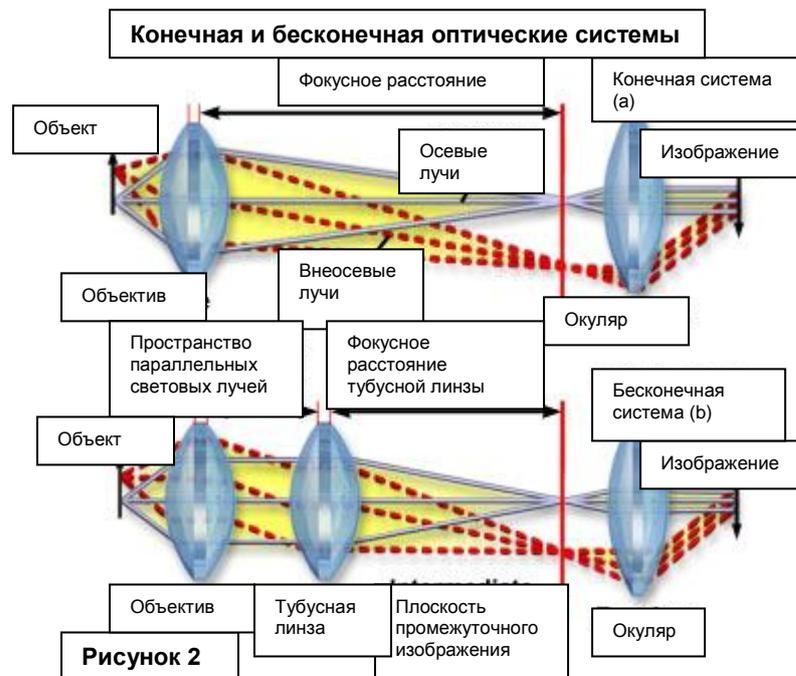
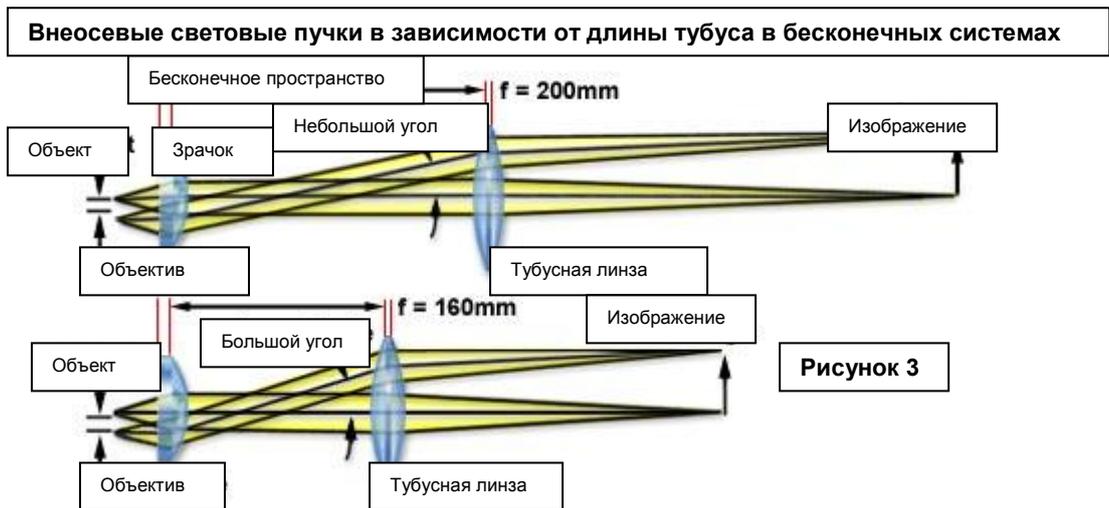


Рисунок 2

Вместе, объектив и тубусная линза образуют сложную систему линз объектива, формирующих промежуточное изображение на конечном расстоянии в пределах тубуса микроскопа. При разработке скорректированных на бесконечность микроскопов первостепенное значение имеет расположение тубусной линзы относительно объектива. Пространство между объективом и тубусной линзой (бесконечное пространство), где распространяются параллельные световые лучи, может быть использовано для размещения сложных оптических компонентов без внесения сферической аберрации или изменения рабочего расстояния объектива. На самом деле, в скорректированных на бесконечность микроскопах между объективами согласованной группы, парфокальность может сохраняться даже при установке в оптический пути одного или двух вспомогательных компонентов. Другим важным преимуществом является тот факт, что вспомогательные компоненты могут давать увеличение $1\times$ без изменения соосности между объективом и тубусной линзой. Это позволяет проводить сравнение образцов, комбинируя несколько оптических методов, (таких как фазовый контраст или ДИК с флуоресценцией), и применять их отдельно или одновременно. Это возможно потому, что вспомогательные оптические компоненты, помещённые по ходу параллельных световых лучей, не производят ни поперечного, ни продольного смещения и не меняют фокальной плоскости изображения.

Близкое расположение к объективу тубусной линзы ограничивает пространство, свободное для размещения вспомогательных оптических компонентов. Тем не менее, конструкция современных микроскопов накладывает ограничение на максимальное число оптических компонентов, которые можно установить между объективом и тубусной линзой. Слишком большое расстояние между объективом и тубусной линзой приводит к сокращению количества периферийных световых лучей, собираемых линзой, и, следовательно, затемнению и размытию границ изображения, понижая тем самым производительность микроскопа. Следует подчеркнуть, что под термином **бесконечная оптика** подразумевается способность к формированию потока параллельных световых лучей на выходе из объектива, а, разумеется, не доступное внутри микроскопа, бесконечное пространство. Для увеличения эксплуатационной гибкости микроскопа при сохранении его высокой производительности необходимо выбрать оптимальное расстояние между объективом и тубусной линзой.



Увеличение скорректированного на бесконечность объектива получается делением опорного фокусного расстояния (длины тубуса) на фокусное расстояние объектива. При увеличении фокусного расстояния тубусной линзы растёт расстояние до плоскости промежуточного изображения, что приводит к увеличению общей длины тубуса. Длина тубуса от 200 до 250 миллиметров считается оптимальной, поскольку большие фокусные расстояния приводят к уменьшению угла наклонных световых лучей, что сокращает число артефактов в системе. При большей длине тубусов увеличивается эксплуатационная гибкость системы с точки зрения конструкции вспомогательных компонентов.

Преимущества больших фокусных расстояний тубусных линз становятся очевидны при сравнении систем со 160-миллиметровым и 200-миллиметровым фокусным расстоянием тубусной линзы. В оптических системах с большими фокусными расстояниями, уменьшение угла отклонения от оси наклонных световых лучей может быть значительным. А поскольку световые лучи с меньшим углом наклона испытывают меньшее осевое и внеосевое смещение при прохождении через вспомогательные компоненты (призмы ДИК, фазовые кольца, дихроичные зеркала и т.д.), это повышает эффективность микроскопа. Существенное усиление контраста, наблюдаемое при применении эпифлуоресцентных осветителей в системах, скорректированных на бесконечность, также происходит благодаря преимуществам больших фокусных расстояний тубусных линз. Пример улучшенного, благодаря применению бесконечной оптики, изображения представлен на рисунке 4, где показан тонкий срез кишечника мыши, помеченного тремя флуоресцентными красителями. Эта микрофотография была снята микроскопом Nikon Eclipse E600 с помощью иммерсионного масляного объектива CF160 20x с числовой апертурой 0.75 в комбинированном режиме с применением одновременно методов дифференциального интерференционного контраста и эпифлуоресценции.

Ткань кишечника мыши (ДИК/Флуоресценция)

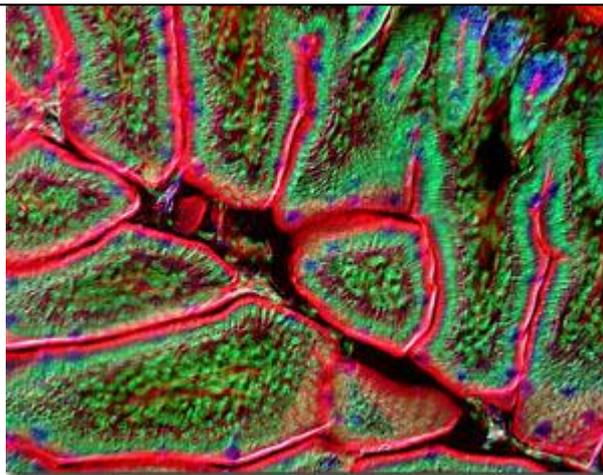


Рисунок 4

Для того чтобы бесконечные системы имели то же увеличение, что и более ранние системы с фиксированной длиной тубуса, необходимо увеличивать фокусное расстояние объективов, применяемых в новых системах. В течение многих лет все производители микроскопов с фиксированной длиной тубусов придерживались длины 45 миллиметров для парфокального расстояния, но это значение может не подходить для высокопроизводительной оптики, скорректированной на бесконечность. Например, планапохроматический 60x объектив с масляной иммерсией (один из самых производительных конечных объективов) состоит из более чем 10 линз и линзовых комбинаций. Такое число необходимых оптических элементов приводит к очень плотной посадке объективов, ограниченных парфокальным расстоянием 45 миллиметров. При замене на бесконечную систему, которая включает отдельный объектив (с ещё большим числом оптических элементов) и тубусную линзу, фокусное расстояние тубусной линзы становится эквивалентным приблизительно 150 миллиметрам. Чтобы использовать весь оптический потенциал бесконечных систем, парфокальное расстояние объектива должно соответствовать фокусному расстоянию тубусной линзы. Так, фокусному расстоянию 200 миллиметров соответствует парфокальное расстояние 60 миллиметров, что превосходит старый стандарт длины на 15 миллиметров.

Интерактивное учебное приложение Java Внеосевой световой поток и длина тубуса

В этом приложении исследуется зависимость фокусного расстояния тубусной линзы в скорректированных на бесконечность оптических системах от угла отклонения от оси наклонных световых лучей.

Увеличение фокусного расстояния объективов, применяемых в бесконечных оптических системах, требует соответствующего увеличения рабочего расстояния. А увеличение парфокального расстояния объектива является первостепенным для увеличения рабочего расстояния, особенно для объективов с низким увеличением. Например, по формуле для расчета увеличения в системах, скорректированных на бесконечность, фокусное расстояние объектива 1x будет равно фокусному расстоянию тубусной линзы. В системе с 200-миллиметровым фокусным расстоянием тубусной линзы для использования объектива с низким увеличением необходимо ещё большее парфокальное расстояние. Расчёты показывают, что такое малое увеличение, как 0,5x может быть достигнуто при 200-миллиметровом фокусном расстоянии тубусной линзы, но более короткие фокусные расстояния ограничивают минимальное увеличение объектива значениями, слегка превышающими 1x.

Другим важным параметром является диаметр зрачка. В оптических системах с большим фокусным расстоянием тубусной линзы его рост также необходим для оптимального функционирования объективов с низким увеличением. Стандартный (RMS) диаметр резьбового соединения объектива 20,32 миллиметра ограничивает эффективный диаметр зрачка и максимально достижимую числовую апертуру объективов с такой резьбой. Чтобы

добиться более высоких числовых апертур при использовании тубусных линз с большим фокусным расстоянием, необходимо увеличивать размер резьбового соединения объективов. Эффективный диаметр выходного зрачка (**D**), соответствующий данной числовой апертуре выражается формулой:

$$D = 2NA \times f$$

где **NA** – числовая апертура объектива, а **f** – фокусное расстояние объектива. Так, для апохроматического объектива 2x с фокусным расстоянием 100 миллиметров (при использовании тубусной линзы с 200-миллиметровым фокусным расстоянием) и числовой апертурой 0.10, диаметр выходного зрачка (**D**) должен быть равен 20 миллиметров. Очевидно, при проектировании бесконечных оптических систем, меньший диаметр резьбового соединения ограничивает числовую апертуру объективов увеличениями меньшими 10x. Увеличение длины тубусов свыше 200 миллиметров требует ещё большего размера выходного зрачка объектива, в результате чего этот параметр становится серьезным ограничивающим фактором в проектировании скорректированных на бесконечность микроскопов.

Хотя все четыре основных производителя сегодня предлагают микроскопы, скорректированные на бесконечность, Nikon – единственная компания, которая перешла на больший диаметр резьбы, большие рабочие расстояния и увеличенный парфокальный интервал. Сегодня компания предлагает модельный ряд из более чем 80 объективов CF160, имеющих 25-миллиметровое резьбовое соединение, парфокальное расстояние 60 миллиметров и предназначенных для использования в микроскопах с 200-миллиметровой длиной тубуса. Из доступных сегодня, объективы с аббревиатурой **CFI**, означающей «свободный от хроматической аберрации и сфокусированный на бесконечность» (от английского **Chromatic aberration-Free** (или **Chrome Free**) **Infinity**), имеют наибольшие рабочие расстояния и наибольшие увеличения при высоких числовых апертурах.

Введение в объективы микроскопов – Объективы являются, возможно, самыми важными компонентами оптических микроскопов, поскольку именно они отвечают за формирование первичного изображения и играют главную роль в определении качества изображений, которые способен производить микроскоп. Объективы также влияют на увеличение исследуемого образца и на разрешающую способность микроскопа, которая определяет различимость мелких деталей образца. Этот раздел содержит основные сведения об оптических аберрациях и способах их исправления и является введением в связанные с этим темы, обсуждаемые ниже.

Объективы являются, возможно, самыми важными компонентами оптических микроскопов, поскольку именно они отвечают за формирование первичного изображения и играют главную роль в определении качества изображений, которые способен производить микроскоп. Объективы также влияют на увеличение исследуемого образца и на разрешающую способность микроскопа, которая определяет различимость мелких деталей образца.

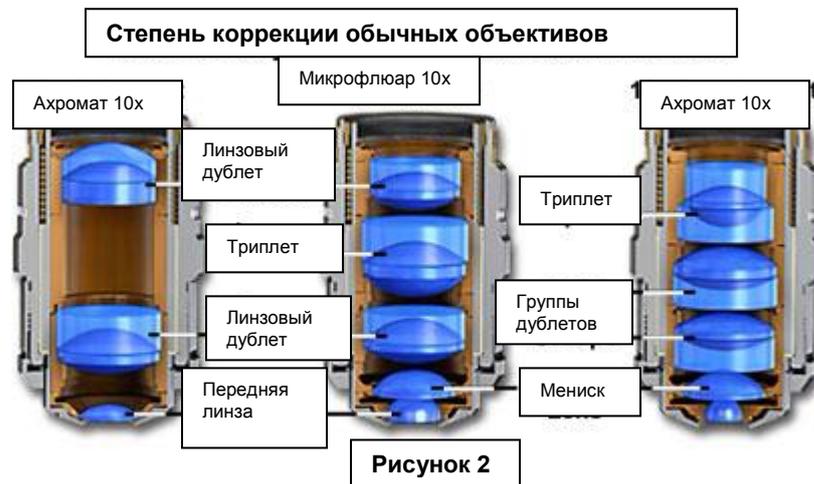


По конструкции и сборке объектив является наиболее сложным компонентом оптических микроскопов и первым компонентом, в который попадает свет на пути от образца к плоскости изображения. Своим названием объектив обязан тому факту, что по расположению он является ближайшим к наблюдаемому **объекту** (образцу) компонентом.

Основные производители микроскопов предлагают объективы различных конструкций, имеющие превосходные характеристики в широком спектральном диапазоне освещения и различные степени коррекции основных оптических aberrаций. На рисунке 1 представлен апохроматический иммерсионный масляный объектив 60x, состоящий из 15 оптических элементов: трёх дублетов, одного триплета и трёх одиночных внутренних линз. В объектив также входят полусферическая фронтальная линза и идущий за ней мениск, которые работают синхронно, помогая с минимальной сферической aberrацией захватывать световые лучи при высоких числовых апертурах. Как и большинство иммерсионных масляных объективов апохроматический объектив на рисунке 1 оснащён подпружиненным ограничителем перемещения объектива, который предотвращает столкновение передней линзы и образца, защищая их от повреждения. Внутренние линзы объектива зафиксированы в выверенном положении и плотно посажены в латунный цилиндр, герметично защищенный корпусом объектива (тубусом). Рабочие параметры объектива, такие как числовая апертура, увеличение, длина оптического тубуса, степень коррекции aberrаций и другие важные характеристики, промаркированы или выгравированы на корпусе объектива с внешней стороны. Хотя объектив, представленный на рисунке 1, предназначен для работы с маслом в качестве среды, заполняющей пространство между передней линзой объектива и образцом, передние линзы других объективов позволяют использовать их для работы либо в воздухе, либо в воде, глицерине или других специальных маслах на углеводородной основе.

Современные объективы, состоящие из многих оптических компонентов, имеют высокое качество и производительность, а их эффективность и стоимость во многом определяются степенью коррекции aberrаций и плоскостностью поля. За последние 100 лет значительно улучшилась и конструкция объективов и материалы, применяемые при их создании. Сегодня объективы разрабатываются с помощью систем автоматизированного проектирования (САПР) на основе передовых композиций стекла, включающих редкие металлы, обладающих высокой степенью однородности и качества и имеющих точно заданные показатели преломления. Благодаря этим передовым технологиям, выпускаемые сегодня объективы имеют низкую дисперсию и исправлены в отношении большинства обычных aberrаций, таких как кома, астигматизм, геометрическое искажение, кривизна поля изображения, сферическая и хроматическая aberrация. Но, производительность микроскопов повысилась не только благодаря исправлению aberrаций у объективов при увеличении размеров полей, но и за счёт существенного сокращения бликов, связанного с ростом коэффициента пропускания, в результате чего удаётся получать в высшей степени яркие и резкие изображения.

Наименее дорогими (и наиболее распространёнными) объективами, используемыми в большинстве лабораторных микроскопов, являются ахроматические объективы. В этих объективах исправлена продольная хроматическая aberrация на двух длинах волн (синей и красной, около 486 и 656 нанометров, соответственно), которые приведены в один общий фокус. Более того, в ахроматических объективах исправлена сферическая aberrация для зелёного света (546 нанометров; см. таблицу 1). Неполная коррекция ахроматических объективов может приводить к заметным артефактам, когда образец наблюдается и визуализируется посредством цветовой микроскопии и микрофотографирования. Если фокусирование проводится в зелёном участке спектра, изображения будут иметь пурпурно-красное гало (часто называемое остаточным цветом). Наилучший результат ахроматические объективы дают при пропускании света через зелёный фильтр (часто интерференционный), а также при использовании чёрно-белой плёнки, если проводится микрофотографирование. Недостаточная коррекция плоскостности поля также понижает эффективность ахроматических объективов. Последние несколько лет большинство производителей стало выпускать ахроматические объективы с исправленной кривизной изображения по полю; эти скорректированные объективы стали называть планахроматическими объективами или **планахроматами**.



Объективы следующего уровня коррекции и цены называются **микрофлюарами** или **полуахроматами** (центральный объектив на рисунке 2), из-за плавикового шпата (флюорита) первоначально используемого при их создании. На рисунке 2 представлены объективы трёх основных классов: ахроматы с наименьшим количеством коррекций, как говорилось выше; микрофлюары (или полуахроматы), у которых дополнительно исправлена сферическая абберация; и апохроматы, являющиеся наиболее высоко скорректированными объективами из доступных сегодня. Слева на рисунке 2 находится ахромат 10х, состоящий из двух линзовых дублетов и передней линзы объектива. В центре рисунка 2 представлен флюоритовый объектив 10х, в который входит несколько групп линз (два дублета и триплет) в дополнение к полусферической передней линзе и следующему за ней мениску. Справа на рисунке 2 расположен апохроматический объектив, также состоящий из нескольких склеенных и одиночных линз. Хотя его конструкция аналогична конструкции флюоритовых объективов, его линзы имеют другую толщину и кривизну и расположены в уникальном для апохроматических объективов порядке.

Исправление оптических aberrаций у объективов

Тип объектива	Сферическая aberrация	Хроматическая aberrация	Кривизна поля
Ахромат	1 цвет	2 цвета	Нет
Планахромат	1 цвет	2 цвета	Да
Микрофлюар	2-3 цвета	2-3 цвета	Нет
Планфлюар	3-4 цвета	2-4 цвета	Да
Планапохромат	3-4 цвета	4-5 цветов	Да

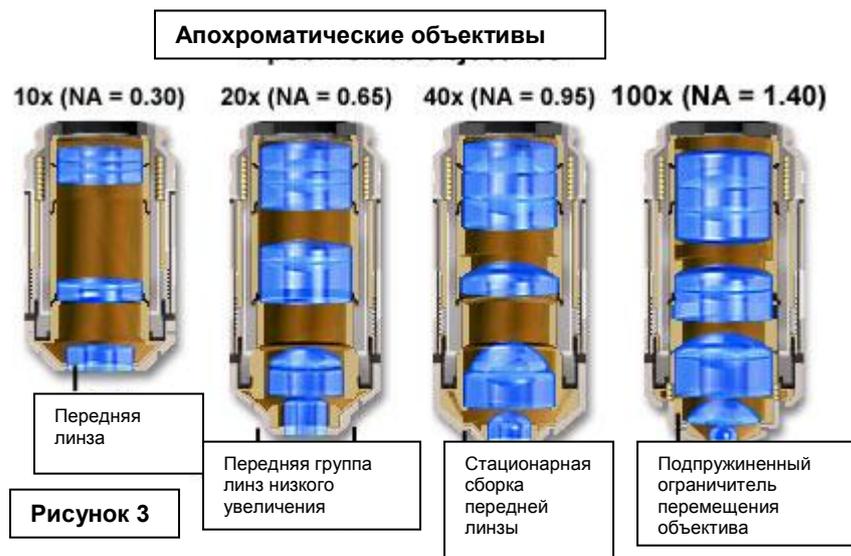
Таблица 1

Флюоритовые объективы производятся из стекла усовершенствованного состава, в который входят такие компоненты, как плавиковый шпат или его недавно разработанные синтетические заменители. Эти новые композиции обеспечивают гораздо более высокую степень коррекции оптических aberrаций. Как и ахроматы, флюоритовые объективы также исправлены в отношении красного и зелёного света. Но в отличие от ахроматов, у которых сферическая aberrация скорректирована лишь для одного цвета, микрофлюары сферически исправлены для двух или трёх цветов. Более высокая степень коррекции флюоритовых объективов в сравнении с ахроматами позволяет им иметь большую числовую апертуру, а значит и получать с их помощью более яркие изображения. Разрешающая способность флюоритовых объективов выше, чем у ахроматов, к тому же они дают более контрастные изображения, поэтому они эффективнее ахроматов при выполнении цветового микрофотографирования в белом свете.

Числовая апертура

В этом приложении можно проследить зависимость размера светового конуса, входящего в переднюю линзу объектива, от значения его числовой апертуры.

Самую высокую степень коррекции (и стоимость) имеют апохроматические объективы, представленные на рисунках 2 и 3. Высокая стоимость апохроматов, как наиболее скорректированных микроскопических объективов из доступных на сегодняшний день, отражает сложность их конструкции и тщательность компоновки, необходимую для их создания. На рисунке 3 сравниваются апохроматические объективы с увеличением от 10х до 100х. У менее мощных апохроматических объективов (10х и 20х) большие рабочие расстояния, но сами объективы короче, по сравнению с более мощными апохроматами (40х и 100х). Апохроматы хроматически исправлены для трёх цветов (красного, зелёного и синего), что почти исключает хроматическую абберацию; в них также выполнена коррекция сферической абберации для двух или трёх длин волн (см. таблицу 1). Для цветowego микрофотографирования в белом свете апохроматические объективы являются наилучшим выбором. Поскольку апохроматические объективы имеют наиболее высокий уровень коррекции, их числовая апертура, при заданном увеличении, выше, чем у ахроматов и флюаров. Многие из новейших высоко эффективных флюоритовых и апохроматических объективов хроматически исправлены для четырёх (темно-синего, синего, зелёного и красного) и более цветов, а сферическая абберация исправлена в них для четырёх цветов.



Объективы всех трёх типов страдают от выраженной кривизны поля изображения и проецируют скорее кривые, чем плоские изображения – артефакт, усиленно проявляющийся с ростом увеличения. Для преодоления этой проблемы, присущей объективам из-за кривизны линзовых поверхностей, конструкторами оптики были разработаны плоскопольные объективы, дающие изображение, лежащее в общем фокусе по всему полю. Объективы с исправленной кривизной поля и низкой дисторсией называются **планахроматами**, **планфлюарами** или **планапохроматами** в зависимости от степени остаточной абберации. Коррекция этого типа, хотя и дорогая, но весьма ценная для формирования цифровых изображений и традиционного микрофотографирования.

Кривизна поля изображения

Простая линза фокусирует лучи от протяжённого плоского объекта, такого как образец на предметном стекле, на вогнутую поверхность, напоминающую чашу. Посмотрите, как искажения, вызванные кривизной поля изображения, ухудшают качество микроскопических изображений.

Неисправленная кривизна поля изображения является наиболее серьёзной оптической абберацией у микрофлюаров (полуапохроматов) и апохроматических объективов, с которой приходилось мириться многие годы. В процессе наблюдения необходимо было постоянно перефокусировать поле зрения с его центра на края и обратно, чтобы охватить все детали образца. Коррекция кривизны поля изображения (планкоррекция) в объективах обеспечила их полноценное использование в микрофотографировании и видео микроскопии, и сегодня она является стандартом, как для обычных, так и для высоко производительных объективов. Исправление кривизны поля изображения требует существенного увеличения числа дополнительных линз, как показано на рисунке 4 для простого ахромата. Обычный ахромат (слева на рисунке 4) содержит два линзовых дублета в дополнение к простой тонкой

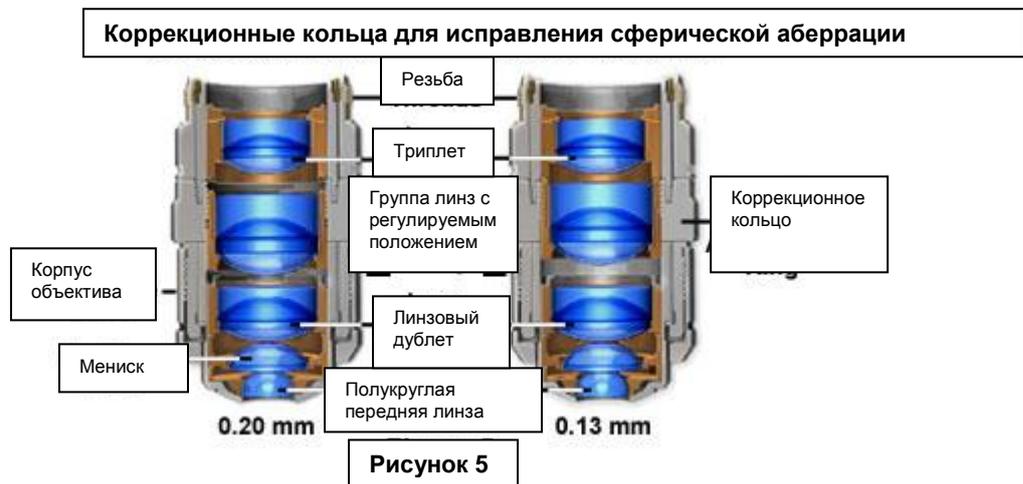
Формирующая изображение среда, заполняющая пространство между передней линзой объектива и покровным стеклом, также имеет большое значение с точки зрения коррекций сферической аберрации и комы в линзах объектива. Объективы малой мощности имеют относительно низкую числовую апертуру и предназначены для **сухих** наблюдений, когда пространство между передней линзой объектива и покровным стеклом заполнено лишь воздухом. Максимальная теоретическая числовая апертура, которую возможно получить в воздухе, равна 1,0, однако, на практике числовую апертуру сухих объективов не удаётся поднять выше 0,95. Колебания толщины покровного стекла незначительны для сухих объективов с числовой апертурой не выше 0,4, но эти отклонения становятся заметными при превышении числовой апертурой значений 0,65, когда флуктуации даже в 0,01 миллиметра могут вызвать сферическую аберрацию. Это накладывает серьёзные ограничения на апохроматы высокой мощности, предназначенные для работы в воздухе с очень короткими рабочими расстояниями и имеющие чувствительные коррекции сферической аберрации, из-за которой трудно получить резкие изображения.

Коррекция покровного стекла

В этом приложении внутренние линзы сухого объектива с высокой числовой апертурой юстируются для исправления аберраций, вызванных изменением толщины покровного стекла.

Чтобы преодолеть это, многие высоко производительные сухие апохроматические объективы оснащены коррекционными кольцами, позволяющими исправлять сферическую аберрацию путем коррекции отклонений в толщине покровного стекла (см. рисунок 5). Оптическая коррекция сферической аберрации производится вращением кольца, в результате чего меняется относительное расстояние между двумя группами линз в объективе. Объектив на рисунке 5 слева подогнан коррекционным кольцом к толщине покровного стекла 0,20 мм, в результате чего регулируемые линзы оказались расположенными очень близко друг к другу. И напротив, регулируемые линзы в объективе на рисунке 5 справа разнесены далеко друг от друга, чтобы компенсировать очень тонкое покровное стекло (0,13 мм). Регулировочный диапазон большинства объективов с коррекционными кольцами, предназначенных для прямых микроскопов проходящего света, компенсирует отклонения в толщине покровного стекла в интервале от 0,10 до 0,23 миллиметра. Многие специальные фазово-контрастные объективы, предназначенные для наблюдения тканевой культуры на инвертированных микроскопах, имеют даже больший компенсационный интервал (от 0 до 2 миллиметров). Это позволяет наблюдать образцы через дно большинства сосудов для культивирования, которые часто имеют существенные отклонения толщины. Объективами, имеющими коррекционные кольца, можно наблюдать и непокрытые образцы, например мазки крови, выставив регулировочное значение на 0, чтобы учесть отсутствие покровного стекла.

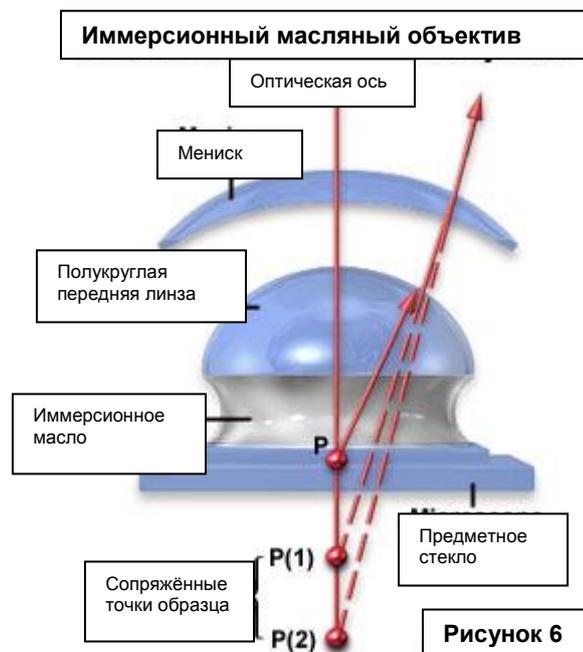
Сухие объективы с высокой числовой апертурой, но без коррекционных колец, часто дают изображения даже худшие тех, которые получаются с помощью объективов, менее чувствительных к толщине покровного стекла, с низкой числовой апертурой. Поэтому, чтобы добиться высокого контраста без артефактов, вызванных отклонениями в толщине покровного стекла, часто бывает разумнее воспользоваться объективом с низким увеличением (и числовой апертурой). Например, объектив 40x с числовой апертурой 0.65 может дать более контрастные и резкие снимки, чем объектив 60x с числовой апертурой 0.85, хотя, теоретически, разрешающая способность объективов с большим увеличением выше.



Стандартная толщина покровных стёкол 0,17 миллиметра, что обозначается числом 1½. К сожалению, не все производимые покровные стёкла 1½ укладываются в этот жёсткий допуск (их толщина колеблется в диапазоне от 0,16 до 0,19 миллиметра), а во многих случаях между образцом и покровным стеклом находится промежуточная среда. Компенсация изменения толщины покровного стекла может быть осуществлена подгонкой длины механического тубуса микроскопа или (как говорилось ранее) специальными **коррекционными кольцами**, меняющими положение между нужными 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 регулировочных 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.

Числовая апертура объективов, проектируемых для использования вместе с иммерсионной средой (маслом, глицерином или водой), может быть существенно повышена. Иммерсионная среда с тем же показателем преломления, что и покровное стекло, практически нивелирует отклонения в толщине покровного стекла, поскольку лучи в широком диапазоне угла наклона уже не испытывают преломления и легко собираются объективом. Показатель преломления обычных иммерсионных масел равен 1,51, а их дисперсионные свойства не отличаются от дисперсионных свойств покровных стёкол. Световые лучи, идущие от образца, распространяются в однородной среде (покровное стекло, иммерсионное масло) и не испытывают преломления при входе в линзу объектива, но лишь на выходе из неё. Это значит, что если образец помещён в апланатическую точку первой линзы объектива, то изображение, сформированное этой частью линзовой системы, полностью свободно от сферической aberrации.



Общая конструкция применяемых иммерсионных масляных объективов включает полусферическую переднюю линзу, за которой следует положительный мениск и дублетная группа линз. На рисунке 6 показано апланатическое преломление света в двух первых линзах стандартного апохроматического иммерсионного масляного объектива. Образец помещён между предметным и покровным стеклом микроскопа в точке **P** – апланатической точке полусферической линзы. Световые лучи, преломлённые на задней поверхности полусферической линзы, кажутся исходящими из точки **P(1)**, являющейся центром кривизны для первой поверхности мениска. Они падают на мениск вдоль радиуса его первой поверхности и, поэтому, не испытывают преломления. На задней поверхности мениска световые лучи преломляются апланатически, так что кажутся исходящими из точки **P(2)**. В результате преломления на поверхностях последовательных комбинаций линз происходит сведение световых лучей, исходящих из точки **P**, и формируется промежуточное изображение.

Должным образом спроектированные линзы иммерсионного масляного объектива исправляют хроматизм двух передних линз, внося при этом минимальные сферические aberrации. Тот факт, что световой конус оказывается частично сведён ещё до входа в переднюю линзу, помогает контролировать сферическую aberrацию. Необходимо заметить, что применение иммерсионных масляных объективов без введения масла между покровным стеклом и передней линзой приводит к дефективным изображениям. Это происходит благодаря преломлению на поверхности передней линзы, приводящему к сферическим aberrациям, которые уже невозможно исправить следующими далее по ходу луча линзами объектива.

Иммерсионное масло и показатель преломления

В этом приложении показана связь между показателем преломления среды, формирующей изображение, и способностью объектива захватывать исходящие от образца световые лучи.

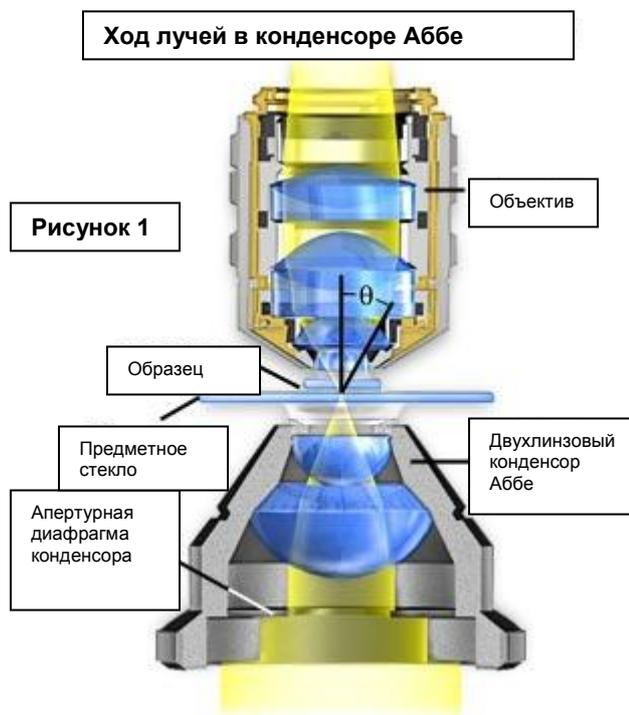
Преимущества иммерсионных масляных объективов в значительной степени теряются при использовании не соответствующей иммерсионной жидкости. Объективы производятся с жёстким допуском на показатель преломления и дисперсию, что требует использования жидкости, заполняющей пространство между покровным стеклом и передней линзой объектива, с соответствующими характеристиками. Рекомендуется применять только масло, указанное производителем объектива, и не смешивать иммерсионные масла разных производителей во избежание нежелательных артефактов, таких как кристаллизация и разделение фаз.

Объективы, использующие воду и/или глицерин в качестве среды, формирующей изображение, также применимы для наблюдений живых клеток в культурах или тканевых

срезов, залитых физиологическим раствором. Планапохроматические иммерсионные водные объективы оснащены коррекционными кольцами, а их числовые апертуры, доходящие до значения 1,2, лишь немногим меньше масляных аналогов. Эти объективы позволяют микроскопистам сохранять превосходную оптическую коррекцию при фокусировке вплоть до 200 микрон в водной среде. Недостатком иммерсионных водных объективов с высокими числовыми апертурами является их высокая стоимость, часто составляющая многие тысячи долларов, не гарантирующая при этом, что высокое качество изображения сохранится при фокусировке объектива глубоко в преломляющих тканях или частях клетки. Более подробную информацию по иммерсионным водным, масляным и глицериновым объективам можно найти на сайте **Molecular Expressions Microscopy Primer**.

Свойства объективов микроскопов – Три критических для создания микроскопа параметра определяют окончательный предел для его разрешающей способности. Этими параметрами являются длина волны света, освещающего образец, угловая апертура светового конуса, захватываемого объективом, и показатель преломления в пространстве предметов между передней линзой объектива и образцом. Эти и другие свойства микроскопа подробно обсуждаются ниже.

Три критических для создания микроскопа параметра определяют окончательный предел для его разрешающей способности. Этими параметрами являются длина волны света, освещающего образец, угловая апертура светового конуса, захватываемого объективом, и показатель преломления в пространстве предметов между передней линзой объектива и образцом.



На рисунке 1 представлена схема объектива микроскопа, освещаемого простым двухлинзовым конденсором Аббе. Свет, формируемый конденсором в конус освещения, падает на образец, проходит его и в виде перевернутого конуса попадает в переднюю линзу объектива. Размер и форма конуса освещения являются функцией числовых апертур объектива и конденсора. Угловая апертура объектива обозначена греческой буквой θ и подробно обсуждается ниже.

Разрешающая способность дифракционно-ограниченного оптического микроскопа определяется как наименьшее расстояние, на котором расположенные рядом две точки образца ещё могут быть различимыми:

$$R = \lambda/2n(\sin(\theta))$$

где R – расстояние между точками, λ – длина волны освещения, n – показатель преломления формирующей изображение среды, а θ – половина угловой апертуры объектива. Из приведённого уравнения очевидно, что разрешающая способность прямо пропорциональна длине волны освещения. Глаз человека восприимчив к длинам волн между 400 и 700 нанометрами, представляющими видимый диапазон спектра, на которых проводится большинство микроскопических наблюдений. Разрешающая способность также зависит от показателя преломления среды, формирующей изображение и угловой апертуры объектива. Объективы предназначены для наблюдения образцов, когда пространство между образцом и передней линзой заполнено либо воздухом, либо средой с более высоким показателем преломления. Поле зрения часто довольно ограничено, поэтому передняя линза объектива помещается близко к образцу, с которым она должна находиться в оптическом контакте. Когда в качестве формирующей изображение среды воздух заменяется иммерсионным маслом, разрешающая способность увеличивается приблизительно в 1,5 раза.

Последним, но, возможно, наиболее важным фактором, определяющим разрешающую способность, является угловая апертура, которая на практике ограничена верхним пределом

72 градуса (или синусом 0,95). Произведение, в котором она объединена с показателем преломления:

$$n(\sin(\theta))$$

называется числовой апертурой (сокращённое обозначение **NA**) и является удобным показателем разрешающей способности любого объектива. Числовая апертура обычно является наиболее важным критерием (не считая увеличения) при выборе объектива микроскопа. Её значения лежат в пределах от 0,1 для объективов с очень низким увеличением (от 1x до 4x) до 1,6 для высоко производительных объективов, рассчитанных на применение со специальными иммерсионными маслами. В серии объективов с неизменным увеличением объективы с большей числовой апертурой имеют бóльшую светособирающую (светосилу) и разрешающую способность. Необходимо внимательно относиться к выбору числовой апертуры, которая должна соответствовать увеличению окончательного изображения. В идеале, разрешённые объективом детали должны быть увеличены до удобных для наблюдения размеров, но при этом не следует переходить границу, за которой наступает так называемое **пустое увеличение**, мешающее наблюдению мелких деталей образца.

Также как яркость освещения в микроскопе зависит от квадрата рабочей числовой апертуры конденсора, яркость формируемого объективом изображения определяется квадратом его числовой апертуры. Увеличение объектива также влияет на яркость изображения, которая обратно пропорциональна квадрату поперечного увеличения. Отношение квадрата числовой апертуры к квадрату увеличения определяет светосилу объектива в режиме проходящего света. Поскольку в объективах с высокой числовой апертурой часто лучше исправлены аберрации, они собирают больше света и дают более яркие скорректированные изображения с лучшим разрешением. Необходимо заметить, что с ростом увеличения быстро падает яркость изображения. В случаях, когда интенсивность света является ограничивающим фактором, необходимо выбирать объектив с наибольшей числовой апертурой и наименьшей кратностью увеличения, при которой достигается требуемое разрешение.

При сборке объектива линзы сначала **устанавливаются в строго выверенном положении** в оправы, а потом сажаются в центральный цилиндр, помещаемый в корпус объектива . Отдельные линзы **устанавливаются в латунную оправу** , так что линза, закрепленная в прецизионном патроне, вворачивается в оправу, и фиксируется на месте с помощью тонкого металлического кольца . Сферическая аберрация исправляется выбором оптимального набора прокладок между оправами двух нижних линз (полусферической линзы и мениска). Парфокальность объектива достигается перемещением всего блока линз вверх и вниз вдоль цилиндра объектива с помощью стопорных гаек, в результате чего возможно переключение или смена объективов в револьвере без потери фокуса. Исправление комы выполняется тремя юстировочными винтами, регулирующими положение линз по отношению к оптической оси объектива.

Характеристики объектива в зависимости от увеличения

Увеличение	Числовая апертура	Рабочее расстояние (мм)
Ахроматическая коррекция		
4x	0.10	30.00
10x	0.25	6.10
20x	0.40	2.10
40x	0.65	0.65
60x	0.80	0.30
100x (МИ)	1.25	0.18
Планахроматическая коррекция		
0.5x	0.02	7.00
1x	0.04	3.20
2x	0.06	7.50
4x	0.10	30.00
10x	0.25	10.50
20x	0.40	1.30
40x	0.65	0.57
50x (МИ)	0.90	0.40
100x (МИ)	1.25	0.17
40x	0.65	0.48
100x	0.90	0.26
Планфлюоритовая коррекция		
4x	0.13	17.10
10x	0.30	16.00
20x	0.50	2.10
40x	0.75	0.72
40x (МИ)	1.30	0.2
60x	0.85	0.3
100x (сухой)	0.90	0.30
100x (МИ)	1.30	0.20
100x (МИ, ирисовая диафрагма)	0.5-1.3	0.20
Планапохроматическая коррекция		
2x	0.10	8.50
4x	0.20	15.70
10x	0.45	4.00
20x	0.75	1.00
40x	0.95	0.14
40x (МИ)	1.00	0.16
60x	0.95	0.15
60x (МИ)	1.40	0.21
60x (ВИ)	1.20	0.22
100x (МИ)	1.40	0.13
100x (МИ БПС)	1.40	0.17
БПС = без покровного стекла		



Таблица 1

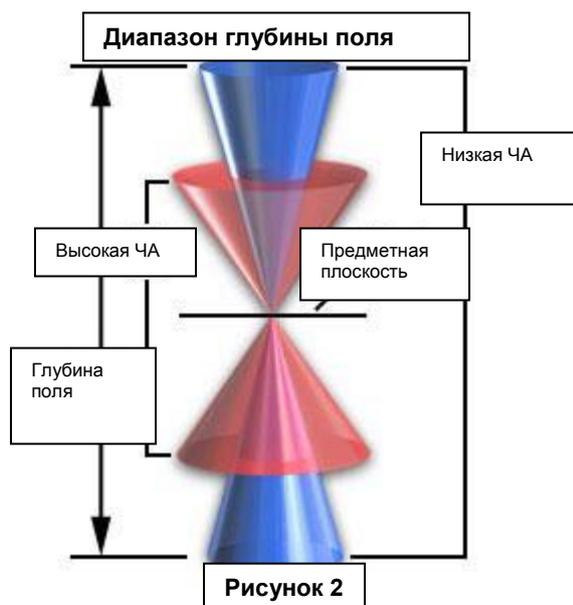
Информация об объективе находится на его корпусе. Если говорить кратко, каждый объектив имеет следующую маркировку: увеличение (например, 10x, 20x, 40x и т.д.); длина тубуса, с которым он даёт наилучшие изображения (обычно 160 миллиметров или греческий символ, обозначающий бесконечность); расчётная толщина покровного стекла, которая предполагалась постоянной при исправлении разработчиком сферической аберрации у объектива (обычно 0,17 миллиметра). Если объектив предназначен для наблюдения с каплей масла между ним и образцом, на его корпусе будет обозначение OIL, или OEL, или HI (гомогенная иммерсия). Отсутствие такой маркировки на объективе означает, что он сухой, т.е. что он спроектирован для работы в условиях, когда между ним и образцом находится воздух. На всех объективах обозначена величина числовой апертуры (**NA**). Она может меняться от 0,04 для слабых объективов до 1,3 или 1,4 для сильных иммерсионных масляных апохроматических объективов. Если на объективе не обозначены коррекции высокого порядка, то, скорее всего это ахроматический объектив. На высоко скорректированных объективах можно увидеть надписи типа apo (апохромат), plan (планкоррекция), FL (микрофлюар) и т.д. На корпусе старых объективов часто обозначено фокусное расстояние (расстояние от линзы до изображения), являющееся мерой увеличения. Объективы в современных микроскопах проектируются в расчёте на заданную длину оптического тубуса, поэтому обозначение на них фокусного расстояния и увеличения становится излишним.

В таблице 1 в зависимости от увеличения приведены рабочие расстояния и числовые апертуры объективов четырёх основных классов: ахроматов, планахроматов, планфлюаров и планапохроматов. Необходимо заметить, что ни один сухой объектив не имеет числовой апертуры больше 1,0, что может быть превышено лишь в объективах, спроектированных для работы с жидкой иммерсионной средой.

Объективы разных производителей, но одной степени коррекции, например все ахроматические объективы разного увеличения (целый раздел в таблице 1) обычно проектируются таким образом, что, при установке в револьверную головку, они проецируют изображение приблизительно в одну и ту же плоскость в тубусе микроскопа. Таким образом, смена объектива при вращении револьверного держателя требует минимальной перефокусировки для восстановления резкости изображения. Такие группы объективов, обладающие этим удобным свойством, называются парфокальными. Многие объективы проектируются таким образом, чтобы при вращении револьверного держателя образец, отцентрированный в поле зрения одного объектива, оставался бы и в поле зрения другого объектива; такие объективы называются парцентричными.

В течение многих лет объективы различных производителей, разработанные для биологических приложений, отвечали международному стандарту в отношении

парфокального расстояния. По этому стандарту большинство объективов имели парфокальное расстояние 45,0 миллиметров и были взаимозаменяемы. С внедрением тубусов, скорректированных на бесконечность, появился новый набор критериев по исправлению aberrаций в объективах и тубусных линзах. Но в связи с возрастающей необходимостью в большей гибкости, обеспечивающей возможность достижения больших рабочих расстояний, числовых апертур и полей, взаимозаменяемость объективов различных производителей была утрачена. Примером этого перехода является современная оптическая система Nikon CFI-60, состоящая из объективов, тубусных линз и окуляров "без хроматизма". Каждый компонент системы CFI-60 скорректирован независимо от другого. Благодаря использованию тубусной линзы оптическая длина тубуса положена равной бесконечности (параллельные световые лучи), а парфокальное расстояние увеличено до 60 миллиметров. В ответ на новые требования, предъявляемые к оптическим системам, был увеличен даже диаметр резьбового соединения (с 20,32 до 25 миллиметров).



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. Диаметр поля в плоскости объекта (образца) равен величине поля, делённой на увеличение объектива. Хотя величина поля обычно ограничена увеличением и размером полевой диафрагмы окуляра, несомненно, существует ещё и ограничение, накладываемое самой конструкцией объектива. В ранних объективах микроскопов практическое верхнее значение диаметра поля было ограничено величиной около 18 миллиметров (или даже существенно меньше для окуляров с высоким увеличением), но с применением современных планапохроматов и других специальных плоскопольных объективов величина поля может составлять от 22 до 28 миллиметров, а в сочетании с широкопольными окулярами даже больше. К сожалению, максимально полезная величина поля не обозначена на корпусе объектива и часто не указывается в микроскопических каталогах.

Осевое расстояние, на котором объектив может быть сфокусирован без существенной потери резкости изображения, называется **глубиной поля**. Эта величина радикально меняется с ростом числовой апертуры объективов, обычно падая при её возрастании (см. таблицу 2 и рисунок 2). При высоких значениях числовой апертурой глубина поля определяется, главным образом, волновой оптикой, тогда как при низких числовых апертурах доминирует понятие геометрической оптики «**кружок рассеяния**». Полная глубина поля, представляемая в виде суммы глубин в волновой и геометрической оптике, описывается следующим выражением:

$$d_{\text{tot}} = \lambda n / \text{NA}^2 + (n / M \cdot \text{NA}) e$$

где λ – длина волны освещения, n – показатель преломления формирующей изображение среды, NA – числовая апертура объектива, M – поперечное увеличение объектива, а e – наименьшее расстояние, различимое фмником, помещённым в плоскость изображения объектива. 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. Продольная (осевая) разрешающая способность и толщина оптических срезов в гораздо большей степени зависят от числовой апертуры системы, чем поперечная разрешающая способность микроскопа (см. таблицу 2).

Промежуток между покровным стеклом и передней линзой объектива называется **рабочим расстоянием**. Если образец наблюдается без покровного стекла, рабочее расстояние измеряется от его поверхности. В общем случае, рабочее расстояние аналогичных объективов падает с ростом их увеличения и числовой апертуры (см. таблицу 1). Объективы, предназначенные для наблюдения образцов в воздухе в качестве среды, формирующей изображение, следует выбирать с максимально возможными рабочими расстояниями, при условии выполнения требований к числовой апертуре. С другой стороны, рабочие расстояния иммерсионных объективов не должны быть большими, чтобы удерживать иммерсионную жидкость между передней линзой и образцом. Многие объективы с короткими рабочими расстояниями оснащены подпружиненными **ограничителями перемещения**, благодаря которым передняя линза может быть втянута в корпус объектива и закреплена там в определённом положении . ограничителей. При вращении револьверной головки, это устройство помогает сохранить чистым предметное стекло, по поверхности которого в таких случаях часто размазывается иммерсионное масло. Линза отпускается и готова к работе простым поворотом ограничителя перемещения в противоположном направлении . В некоторых приложениях (см. ниже) без больших свободных рабочих расстояний не обойтись, поэтому для них создаются специальные объективы, несмотря на трудности, связанные с достижением высоких числовых апертур и необходимой степени оптической коррекции.

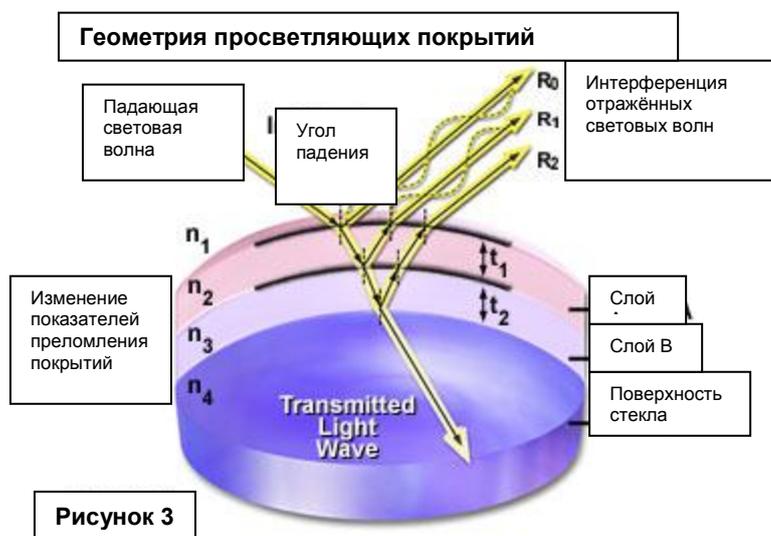


Рисунок 3

Одними из наиболее важных достижений в разработке объективов за последние годы стали достижения в технологии просветляющих покрытий, помогающих сократить нежелательные отражения, возникающие при прохождении луча через систему линз. Поверхность воздух-стекло без просветляющего покрытия может отражать от четырёх до пяти процентов светового пучка, падающего нормально к поверхности, т.е. коэффициент пропускания при нормальном падении составляет 95-96 процентов. Нанесение просветляющего покрытия толщиной в четверть длины волны с соответствующим показателем преломления может увеличить это значение на три-четыре процента. По мере усложнения объективов, состоящих из всё большего числа линз, растёт и необходимость исключения внутренних отражений - засветок. Многие современные объективы с высокой степенью коррекции имеют до 15 линз и много поверхностей воздух-стекло. Если бы линзы не имели покрытий, коэффициент пропускания упал бы до 50 процентов только за счёт потерь при отражении осевых лучей. Однослойные покрытия линз, применяемые ранее для уменьшения бликов и повышения

коэффициента пропускания, сегодня уступили место многослойным покрытиям с коэффициентами пропускания, превышающими 99,9 процентов в видимом спектре.

Глубина поля и глубина изображения

Увеличение	Числовая апертура	Глубина поля (мм)	Глубина изображения (мм)
4x	0.10	15.5	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

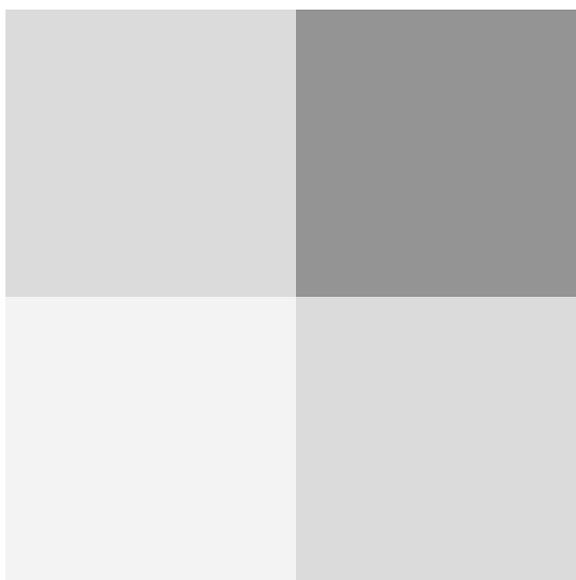
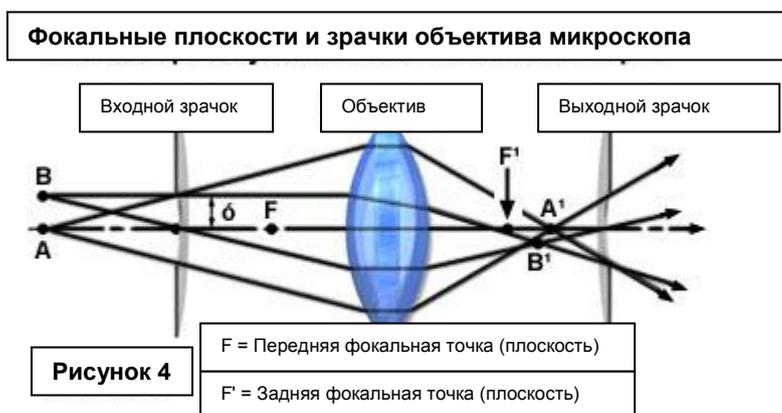


Таблица 2

На рисунке 3 схематически представлен ход отражённых и/или проходящих световых волн, падающих на линзу, покрытую двумя просветляющими слоями. При падении наклонной волны на первый слой (**слой А** на рисунке 3) часть света **R(o)** отражается от него, а часть проходит. При падении на второй просветляющий слой (**слой В**) теряется ещё одна порция света, которая, отразившись от второго слоя под тем же углом, интерферирует со светом, отражённым первым слоем. Прошедшие волны достигают поверхности стекла, где они опять частично отражаются, а частично проходят. Отраженный от стеклянной поверхности свет интерферирует (конструктивно и деструктивно) со светом, отражённым от просветляющих слоёв. Показатели преломления просветляющих слоёв отличаются от показателей преломления стекла и окружающей среды (воздуха). Большая часть света (в зависимости от угла падения, который в оптической микроскопии обычно близок к прямому) проходит просветляющие слои и стекло линзы и фокусируется для формирования изображения.

В тонкослойных оптических просветляющих покрытиях часто применяется фторид магния, но сегодня большинством производителей микроскопов для изготовления этих покрытий используются свои собственные формулы. В результате, достигнуто существенное усиление

контраста и повышение пропускания в видимом диапазоне с одновременной ослабляющей интерференцией на кратных частотах, лежащих вне полосы пропускания. При неправильном обращении эти покрытия можно легко повредить, поэтому микроскопистам следует знать об их уязвимости. Многослойные просветляющие покрытия имеют слегка зеленоватый оттенок в отличие от красноватых однослойных покрытий – признак, который может быть использован для их различения. Просветляющие покрытия внутренних линз часто гораздо мягче тех, которыми покрывают поверхности внешних линз, поскольку они дополнительно несут защитную функцию. Чистить поверхности оптических элементов, покрытых тонкими плёнками, следует с особой осторожностью, особенно когда микроскоп разобран и проводится тщательный осмотр внутренних линз.

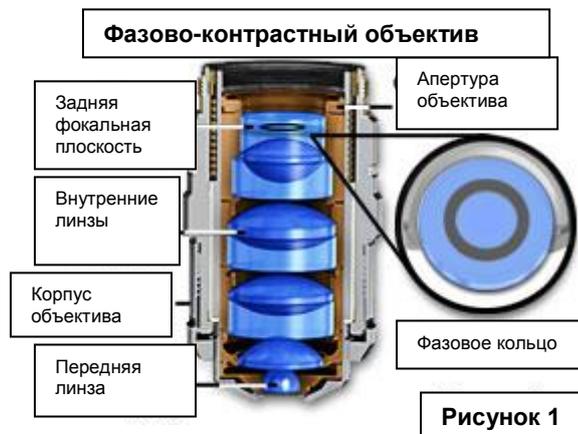


Фокусное расстояние системы линз определяется как расстояние от центра линзы до того места на оптической оси, где параллельные лучи сводятся линзой в точку (часто называемую **главной фокальной точкой**). Воображаемая плоскость, проходящая через главную фокальную точку перпендикулярно оптической оси называется **фокальной плоскостью**. Каждая линза имеет две главных фокальных точки, в которых собирается свет, входящий в линзу с разных сторон. Фокальную плоскость объектива, расположенную ближе к передней линзе объектива принято называть **передней фокальной плоскостью**, а фокальную плоскость за объективом – **задней фокальной плоскостью** (см. рисунок 4). Фактическое положение задней фокальной плоскости зависит от конструкции объектива, но для светосильных объективов обычно находится в пределах его корпуса. Задняя фокальная плоскость объективов с низким увеличением часто располагается вне корпуса объектива, например в области резьбового соединения или револьверной головки микроскопа.

Прохождение света через объектив ограничивается его задней апертурой или **выходным зрачком** объектива, как показано на рисунке 4. Диаметр этой апертуры лежит в интервале от 12 миллиметров для объективов с низким увеличением до приблизительно 5 миллиметров для сильных апохроматических объективов. Размер этой апертуры критичен при эпипосвещении, когда объектив выступает в роли системы формирования изображения и конденсора одновременно, благодаря чему его выходной зрачок одновременно является и входным. Изображение источника света должно заполнять заднюю апертуру объектива целиком, чтобы обеспечить равномерное освещение по всему полю зрения. Если изображение источника света меньше апертуры, неровное освещение приведёт к виньетированию (неровности краёв) поля зрения. Если же оно больше, только часть света попадёт в объектив, что, естественно, будет означать падение интенсивности освещения.

Специальные объективы микроскопов – Стандартные светлопольные объективы с различной степенью коррекции оптических aberrаций наиболее распространены и весьма эффективны при изучении образцов, освещённых традиционными способами. Для других, более сложных методов освещения требуются объективы специальных конструкций, которые часто рассчитаны на размещение фотоприёмников в задней фокальной плоскости объективов или около неё. Задача часто осложняется тем, что задняя фокальная плоскость объектива совпадает с какой-нибудь из его внутренних линз, что делает доступ к этой плоскости весьма затруднительным.

Возможно, около 90 процентов всех исследований в оптической микроскопии проводятся с помощью стандартных ахроматических и планахроматических объективов – наиболее дешёвых, наиболее распространённых и установленных во многих микроскопах по всему миру. Большинство производителей микроскопов также предлагают разнообразные объективы уникальных конфигураций, предназначенные для специальных задач, не выполнимых обычными лабораторными микроскопами.



Стандартные светлорольные объективы с различной степенью исправления оптических aberrаций наиболее распространены и весьма эффективны в изучении образцов с помощью традиционных методов освещения (светлорольного, темнорольного, косого освещения и освещения по Рейнбергу). Некоторые из этих методов связаны с модификацией конденсора, но всё же в них применяются стандартные ахроматические, флюоритовые и/или апохроматические объективы, либо с исправленной, либо с неисправленной кривизной поля изображения. Для других, более сложных методов освещения требуются объективы специальных конструкций, которые часто рассчитаны на размещение фотоприёмников в задней фокальной плоскости объективов или около неё. Задача часто осложняется тем, что задняя фокальная плоскость объектива совпадает с какой-нибудь из его внутренних линз, что делает доступ к этой плоскости весьма затруднительным.

Объективы, предназначенные для работы в режимах фазового контраста, модуляционного контраста Хоффмана, дифференциального интерференционного контраста требуют использования вспомогательных оптических устройств для модификации световых лучей в задней фокальной плоскости. Сама конструкция таких объективов должна предусматривать возможность физического размещения этих устройств в соответствующей фокальной плоскости внутри объектива. Фазово-контрастные объективы (как обсуждается ниже) требуют установки в заднюю фокальную плоскость фазовых пластинок с нанесённым на них покрытием нейтральной оптической плотности и/или приводящим к отставанию фаз световых волн. К тому же фазовая пластина должна быть сопряжена с соответствующим ей кольцом в конденсоре микроскопа. Объективы, предназначенные для работы по методу Хоффмановского модуляционного контраста, также требуют установки модуляционной пластины в заднюю фокальную плоскость объектива, сопряжённую со щелевой диафрагмой в конденсоре. Для дифференциального интерференционного контраста объективы обычно не требуют модификаций (не считая применения оптических элементов свободных от деформаций), но зависят от работы призм Волластона или Номарского, размещённых в системе для воздействия на оптическую разность хода преломлённых лучей, интерферирующих в задней фокальной плоскости. Другие специализированные объективы включают модифицированные оптические элементы, размещение зеркал или наклонных отражателей, регулируемых апертур и/или сменных элементов уникального назначения. Подробнее, специальные требования, предъявляемые к таким объективам, обсуждаются ниже в этом разделе.

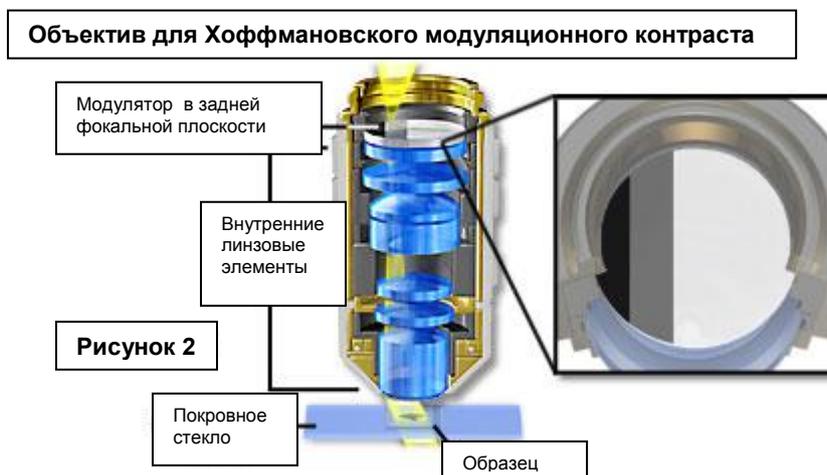
Фазовый контраст – классический метод повышения контраста изображений полупрозрачных неокрашенных образцов, таких как микроорганизмы и клетки в живой тканевой культуре, применяемый биологами в течении последних 50 лет. Фазовый контраст основан на искусном манипулировании разностью фаз между отдельными световыми лучами, исходящими от образца, и её преобразовании в воспринимаемое глазом изменение амплитуды или яркости. Объектив, необходимый для этого метода, должен быть оснащён фазовыми пластинами (нанесёнными на стекло затемнёнными кольцами или канавками), помещёнными в его заднюю фокальную плоскость, как показано на рисунке 1. В дополнение, конденсор должен иметь специальную кольцевую апертуру, соответствующую заданному увеличению и объективу. Фазово-контрастные объективы разделены на различные категории в зависимости от их конструкции и нейтральной плотности их фазовых колец:

- **DL (Тёмные)** - Объективы DL создают темное изображение на светло-сером фоне. Эти объективы обеспечивают максимальный контраст в образцах с большими скачками показателей преломления. Фазово-контрастные DL объективы чаще всего применяются для исследования клеток и других полупрозрачных живых тканей и особенно приспособлены для микрофотографирования и формирования цифрового изображения.

- **DLL (Тёмно-серые)** – Объективы серии DLL, как и DL объективы, позволяют получать хорошие изображения в светлом поле и часто используются в качестве "универсальных" объективов в микроскопах, работающих в различных режимах освещения, таких как флуоресценция, ДИК, светлопольное освещение.
- **ADL (Аподизированные тёмные)** – Недавно разработанные компанией Nikon аподизированные фазово-контрастные ADL объективы имеют вторичные кольца нейтральной плотности на каждой стороне фазового кольца. Добавление вторичных колец помогает уменьшить «гало» эффекты, часто возникающие при формировании изображений в фазово-контрастной микроскопии.
- **DM (Серые)** - Объективы DM дают темное изображение на средне-сером фоне. Эти объективы предназначены для формирования высококонтрастных изображений образцов, дающих малое фазовое смещение, таких как волокна, гранулы и частицы.
- **BM (Светлосерые)** - BM объективы, часто называемые негативными фазово-контрастными объективами, производят светлое изображение на средне-сером фоне. Объективы BM идеальны для визуального исследования бактериальных жгутиков, сгустков фибрина, мельчайших шариков и подсчёта кровяных телец.

Для удобства различения фазово-контрастных объективов их важные характеристики, такие как увеличение, числовая апертура, длина тубуса, коррекция и т.д., часто выделяются зелёным цветом. По этому цвету их можно отличить от обычных светлопольных, поляризационных, флуоресцентных и ДИК объективов, на которых маркировка нанесена каким-нибудь другим или просто чёрным цветом.

Дифференциальный интерференционный контраст (ДИК) – Дифференциальный интерференционный контраст Номарского также является эффективным методом наблюдения неокрашенных образцов, но он менее эффективен для исследования двоякопреломляющих препаратов и может применяться в металлографии и анализе воды в режиме отражённого света. Для ДИК объективы специально не модифицируются, но для получения высококонтрастных изображений они обязательно используются вместе со специальными, зависящими от увеличения, модифицированными призмами Волластона и Номарского. При удалении призм из оптической системы микроскопа эти объективы будут эффективны при светлопольном, темнопольном и других методах наблюдения. Поскольку в ДИК микроскопии применяется поляризованный свет, в объективах, предназначенных для этих приложений, должны быть минимизированы деформации напряжения. В прошлом этому требованию отвечали лишь недеформированные ахроматы, планахроматы и некоторые высоко производительные флюоритовые объективы. Но сегодня, благодаря усовершенствованиям в конструкции объективов и улучшенным просветляющим покрытиям для наблюдений в режиме ДИК, впрочем, как и в микрофотографировании и формировании цифрового изображения, могут применяться апохроматические объективы. На корпусах объективов, предназначенных для ДИК, обычно имеются обозначения специальных призм (низкая, средняя, высокая или 1,2,3 и т.д.), на применение с которыми эти объективы рассчитаны.



Модуляционный контраст Хоффмана – Объективы, созданные для модуляционного контраста Хоффмана, позволяют повысить видимость и контраст неокрашенных и живых тканей, путём регистрации оптического градиента и преобразуя его в изменения световой интенсивности. Объективы для модуляционного контраста (ахроматы, планахроматы или объективы с более высокой степенью коррекции) имеют уникальный оптический амплитудный фильтр пространственных частот, называемый **модулятором**, который вставляется в заднюю фокальную плоскость (см. рисунок 2) объектива. Модулятор имеет три зоны различной нейтральной плотности, которые пропускают один, пятнадцать и сто процентов попадающего в объектив света. В отличие от фазовых пластин в фазово-контрастных объективах, ни одна из зон в хоффмановских модуляторах не меняет фазу проходящего света. При наблюдении прозрачных объектов (практически необнаружимых в обычном светлопольном режиме) методом модуляционного контраста, они становятся видимыми и, благодаря фазовому градиенту в образце, принимают трёхмерный вид. Последние новшества в конструкции хоффмановских объективов привели к созданию моделей, позволяющих с помощью модулятора внутри

объектива менять направление контраста. Выбранное направление контраста сохраняется во всех аналогичных объективах, имеющих разное увеличение.

Инфракрасная микроскопия – Оптическая микроскопия в инфракрасном диапазоне электромагнитного излучения часто применяется для изучения материалов однородно прозрачных или, наоборот, светонепроницаемых в видимом спектре, но интенсивно поглощающих или пропускающих в полосе длин волн выше 700 нанометров. Поскольку инфракрасная микроскопия является микроскопией отражённого света, для неё было разработано несколько специальных катоптрических объективов для улавливания отражённого от непрозрачных образцов инфракрасного света.

Хотя любые микроскопические объективы пропускают какую-то часть коротких инфракрасных волн, только их малая часть скорректирована для этого диапазона и демонстрирует явный сдвиг фокуса при переходе от видимого к инфракрасному свету. Большинство производителей предлагают специальные объективы с уменьшенными числовыми апертурами, предназначенные для увеличения глубины резкости изображений, полученных в инфракрасном свете. Стандартные масла не обеспечивают нормальной работы иммерсионных масляных объективов в инфракрасной микроскопии, и единственной иммерсионной жидкостью, подходящей для этого диапазона, является парафиновое масло. Главной задачей в микроскопии этого типа является получение удовлетворительных микрофотографий традиционными методами визуализации. В настоящее время в инфракрасном диапазоне применяется фотоэмульсия нескольких типов, но всё большее распространение в качестве систем формирования изображения в этом участке спектра получают электронные фотоприёмники.



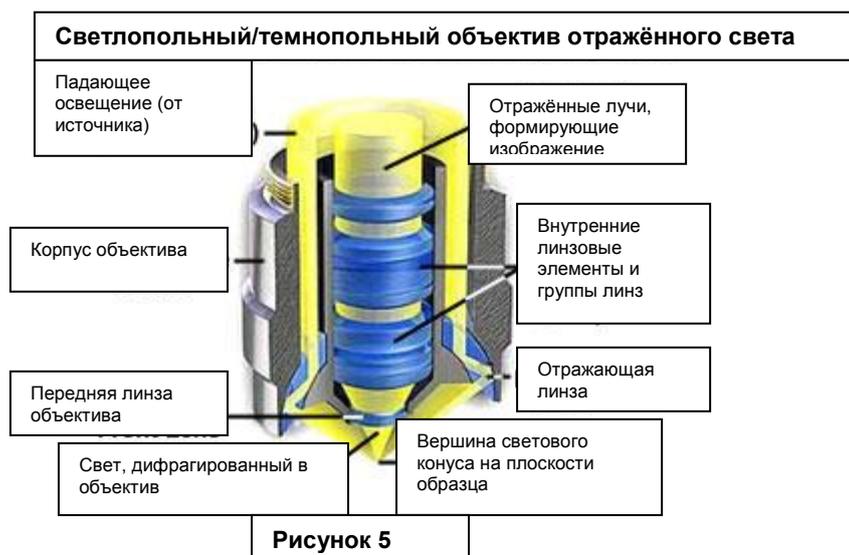
Интерференционная микроскопия – Интерферометрические методы изучения микроскопических образцов основаны на взаимодействии света, прошедшего через образец, с опорным световым пучком, идущим по отличному оптическому пути. В этих условиях непрозрачные поверхности образцов, наблюдаемых в отражённом свете, или прозрачные образцы видимы, только если разность хода между двумя световыми пучками преобразовывается в изменение интенсивности. В интерференционной микроскопии применяется большое число микроскопов и объективов различных конструкций, из которых многие в своей основе имеют интерферометры Михельсона, Маха-Цендера и Жамена. Производители промышленных микроскопов (как отражённого, так и проходящего света) часто выпускают специальные комбинации объектив/микроскоп, чтобы в полной мере использовать явление оптической интерференции и иметь возможность проводить высокоточные измерения.

Поляризованный свет – В отличие от других видов микроскопии в поляризационной микроскопии лучшие снимки получаются объективами с минимальным числом оптических элементов. Очень важно, чтобы линзы, клеи и просветляющие покрытия были свободны от деформаций и двоякопреломляющих материалов, способных повлиять на количественный анализ двойного лучепреломления образца. Апохроматические объективы, наиболее распространённые в большинстве микроскопических методов, обычно не применяются в исследованиях, проводимых с помощью поляризованного света, из-за возможных внутренних отражений и деформаций напряжения, связанных с большим числом линз. Большинство производителей выпускают объективы (чаще всего на основе флюоритовых), специально предназначенные для поляризованного света и дифференциального интерференционного контраста. Объективы, оптимизированные для поляризованного света, обычно имеют частично выкрашенные чёрным цветом корпуса с нанесёнными на них ярко красными обозначениями характеристик (рисунок 3).



Ультрафиолетовые флуоресцентные объективы – Для эпифлуоресцентных приложений, где необходимо собрать максимальное количество света от слабо светящихся флуоресцентных образцов, требуются объективы с высокой числовой апертурой. При наблюдении отдельных молекул и других флуоресцентных событий со слабым свечением первостепенное значение приобретает отношение «полезной» флуоресценции образца к присущей ему фоновой флуоресценции. Автофлуоресценция и/или внутренние отражения в самих объективах могут помешать наблюдению мелких структур и слабо флуоресцирующих мишеней.

Линзы флуоресцентных объективов выполнены из кварца и специальных стёкол с высоким коэффициентом пропускания в диапазоне от ультрафиолета (от 340 нанометров) до инфракрасных участков спектра. Чрезвычайно низкая автофлуоресценция этих объективов обеспечивает регистрируемость светового потока (вторичной флуоресценции) от введённых в образец флуорофоров. В дополнение к специальным линзам в ультрафиолетовых (УФ) флуоресцентных объективах применяются специальные прозрачные клеи и просветляющие покрытия, предназначенные для работы в расширенных диапазонах возбуждения флуоресценции по всему спектру. По степени коррекции оптических aberrаций и числовым апертурам УФ флуоресцентные объективы обычно близки к апохроматам, благодаря чему удаётся добиваться ярких изображений с высоким разрешением (рисунок 4). К тому же, для минимизации артефактов, возникающих из-за автофлуоресценции внутренних линз, эти линзы выполнены из нефлуоресцирующего стекла. Главным недостатком высоко производительных флуоресцентных объективов является тот факт, что в них не исправлена кривизна поля изображения, из-за чего изображения неравномерно сфокусированы по полю зрения. И хотя при наблюдении слабо флуоресцирующих образцов (особенно в лазерной сканирующей конфокальной микроскопии) эта проблема второстепенна, при освещении традиционными методами (светлопольном, темнопольном и дифференциальном интерференционном контрасте) ей уже нельзя пренебречь.



Объективы отражённого света – Объективы проходящего света, предназначенные для применения с покровным стеклом, неприменимы для изучения непокрытых образцов в отражённом свете. Для этих целей созданы объективы, специально скорректированные для наблюдения и визуализации образцов без покровного стекла, применяемые в микроскопии в отражённом свете. На сегодня большинство объективов отражённого света скорректированы на бесконечность и доступны в широком диапазоне увеличений от 5х до 200х. Эти объективы выпускаются с различной степенью хроматической и сферической коррекции, от простых ахроматов до планахроматов и планапохроматов. Большинство, но не все, предназначены для

использования «всухую», т.е. когда пространство между образцом и объективом заполняет воздух. Многие объективы отражённого света спроектированы для фокусировки на больших рабочих расстояниях от образца, чем другие (см. ниже). На корпусах этих объективов имеются обозначения **LWD** (большое рабочее расстояние), **ULWD** (ультра большое рабочее расстояние) и **ELWD** (очень большое рабочее расстояние).

Объективы отражённого света, предназначенные для работы при темнопольном освещении, имеют специальную конструкцию, в которой полая круговая камера окружает расположенные по центру линзы (рисунок 5). Свет от осветителя проходит по этой камере и наклонно падает на образец, образуя полый конус освещения. Это часто выполняется с помощью круговых зеркал или призм, расположенных внизу полой камеры объектива. Таким образом, объектив выступает одновременно в роли двух различных коаксиально связанных оптических систем, из которых внешняя система функционирует в качестве «конденсора», а внутренняя – в качестве обычного объектива.

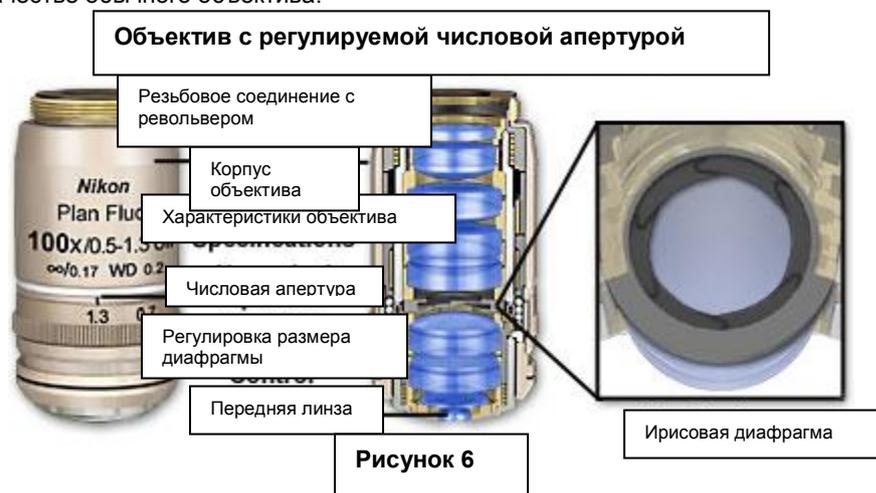


Рисунок 6

Необходимость в полой камере, окружающей линзы объектива отражённого света, требует существенного увеличения диаметра объектива по сравнению с обычными светопольными объективами. Чаще всего, диаметр резьбового соединения объективов отражённого света для крепления в револьверном держателе больше стандарта, утверждённого Королевским микроскопическим обществом (RMS). Поэтому размер резьбовых соединений револьверных держателей для темнопольных объективов отражённого света тоже увеличен и обозначается как **BD** или **BF/DF**. Большинство производителей предлагает специальные адаптеры для крепления объективов с резьбовым соединением BD на стандартных RMS револьверах, благодаря чему эти нестандартные объективы могут применяться в микроскопах, работающих в отражённом свете. При использовании револьверов с резьбовым соединением BD необходимо всегда проверять соответствие объективов длине тубуса микроскопа.

Объективы с переменной числовой апертурой – На изображениях образцов с необычайно высоким квантовым выходом флуоресценции и/или очень ярких темнопольных образцов часто возникают блики от света, идущего из областей вне фокальной плоскости. Для устранения этого артефакта производители предлагают светосильные объективы, оснащённые внутренней ирисовой диафрагмой, благодаря которой повышается контраст при микрофотографировании и формировании цифрового изображения. Открытие и закрытие ирисовой диафрагмы меняет размер задней апертуры объектива, которая определяет значение числовой апертуры в диапазоне от 0,5 до верхнего предела (1,35-1,4 у апохроматических объективов; рисунок 6) Хотя раньше ирисовые диафрагмы применялись в объективах различных конструкций, современные объективы с переменной числовой апертурой, как правило, являются светосильными (увеличение от 60х до 150х).



Рисунок 7

Объективы с ультра низким увеличением – Увеличение объективов с кратностью меньше 4х считается очень низким, и они могут оказаться несовместимыми ни с одной оптической системой микроскопа. Как правило, освещения по Кёлеру трудно добиться, если применяются объективы с малым увеличением, поскольку для заполнения освещением задней апертуры часто требуются специальные конденсоры. В последнее время были достигнуты увеличения вплоть до 0,5х, но такие объективы требуют специальных тубусных линз и конденсоров, что делает их пригодными только для использования в микроскопах, для которых они были разработаны. На рисунке 7 представлен апохроматический объектив 0,5х компании Nikon с числовой апертурой 0,025. Этот объектив требует линзы **макро сдвига**, которая вдвое увеличивает фокусное расстояние, благодаря чему объектив может быть использован в скорректированных на бесконечность микроскопах Nikon с 200-миллиметровыми тубусами. Этот объектив и его аналог с увеличением 1х применяется с **ММ** (макро/микро) конденсором Nikon для обеспечения равномерного освещения во всём диапазоне увеличений от 0,5х до 100х.

Большое рабочее расстояние (LWD) – Эти объективы имеют увеличенные с помощью специальных оптических элементов рабочие расстояния. Наиболее эффективными LWD объективы оказываются в приложениях, где живые клетки в тканевой культуре наблюдаются через толстые стенки сосудов, содержащих культуру. Другими примерами использования этих объективов являются наблюдения через толстые стеклянные пластины (например, между двумя предметными стеклами) или, когда в процессе наблюдения должны проводиться микроманипуляции. Объективы отражённого света также часто выпускаются с большими рабочими расстояниями для исследования громоздких образцов, которые из-за своих размеров не отвечают требованиям обычных оптических систем.

Иммерсионные водные объективы – Высококачественные изображения тонких срезов связанных тканей и живых клеток на стеклянной подложке обычно получают с помощью планапохроматических и планфлюоритовых объективов с высокой числовой апертурой. Однако, значительное количество современных биологических исследований включают изучение клеточной динамики внутри живых тканей, когда наиболее важные процессы происходят глубоко в образце, далеко от поверхности покровного стекла. Попытки визуализировать детали клеток и происходящие в них процессы на расстояниях порядка микрометра от покровного стекла, применяя масло в качестве иммерсионной среды, часто сопровождаются артефактами, включая сильные оптические (сферические) aberrации. Использование воды вместо масла в качестве иммерсионной среды оказалось весьма эффективным в преодолении этих проблем, поэтому для наблюдения живых клеток и тканей несколькими производителями были предложены высоко скорректированные иммерсионные водные объективы.



Недавние достижения в развитии измерительных и программных средств в сочетании с успехами в синтезировании новых флуорохромов существенно раздвинули возможности изучения живых клеток и тканей. Основными оптическими методами и методами количественного анализа изображений, применяемыми в таких исследованиях, является конфокальная и многофотонная микроскопия, дифференциальный интерференционный контраст (ДИК) и традиционные эпифлуоресцентные методы. Основной проблемой в изучении живых клеток является необходимость их содержания в камере или сосуде с соответствующим питательным физиологическим раствором и то, что представляющие интерес области часто расположены на глубине от 50 до более чем 200 микрометров от покровного стекла. Ограничения в применении иммерсионных масляных объективов с высокой числовой апертурой для формирования изображений фокальных плоскостей,

лежащих ниже покровного стекла, обсуждались разными исследователями. Наиболее серьёзные трудности связаны с падением разрешения и яркости изображения, и они начинают сказываться, начиная с глубины около 15 микрон от покровного стекла. Сферическая аберрация, вызванная несопадением показателей преломления в оптическом пути, является главной причиной искажения изображения, и она растёт пропорционально глубине наблюдения.

Применение иммерсионных жидкостей обеспечивает полноценное использование максимальных числовых апертур объективов и повышение дифракционно-ограниченного пространственного разрешения. Но главным практическим преимуществом в этом случае является уменьшение сферических аберраций. Максимально высокими на сегодня оптическими характеристиками обладают иммерсионные масляные объективы, поскольку в этом случае обеспечивается наиболее близкое соответствие показателю преломления оптического стекла, обычно используемого в микроскопических объективах. В идеальных условиях показатели преломления иммерсионного масла, передней линзы объектива и покровного стекла совпадают. Замена масла водой или другой иммерсионной средой с более высоким или низким показателем преломления понижает производительность оптической системы. Тем не менее, в условиях, отличных от идеальных, когда сферическая аберрация ограничивает качество изображения, использование иммерсионных жидкостей с более низким показателем преломления может иметь преимущество. Водная среда, помещённая на оптическом пути иммерсионной масляной системы, усиливает сферическую аберрацию, и преимущество применения иммерсионных водных объективов заключается просто в сокращении наиболее существенных и ограничивающих наблюдение аберраций в заданных условиях формирования изображения.

Теоретические соображения

Одним из наиболее широко распространённых методов исследования живых клеток и тканей является традиционная широкопольная флуоресцентная микроскопия, в которой иммерсионные масляные объективы с высокой числовой апертурой применяются для наблюдения относительно плоских образцов, непосредственно прилегающих к покровному стеклу. Связанные тканевые срезы и клетки заливаются водной средой (более низким) от покровного стекла показателем преломления. Свет, выходящий из объектива, проходит через иммерсионное масло и покровное стекло (с тем же показателем преломления), но преломляется на границе со средой заливки, поскольку её показатель преломления уже другой. Суммарный эффект отклонения света на поверхности раздела зависит от глубины плоскости наблюдения. В фокальных плоскостях вблизи покровного стекла расчётные условия для объектива выполнены, и система работает вполне нормально.

Появление и развитие таких методов, как конфокальная и многофотонная микроскопия, расширило возможности микроскопических наблюдений, позволив исследовать образцы гораздо большей толщины и визуализировать их в трёх измерениях, часто с применением алгоритмов деконволюции и восстановления изображения. Условия наблюдения оптических срезов глубоко в образце, в плоскостях, удалённых от покровного стекла, отличаются от тех, которые закладывались при проектировании оптической системы. Оптическая коррекция оптимизирована для света, распределённого в однородной среде, прилегающей к покровному стеклу, но на практике область наблюдения может лежать на некотором расстоянии от него, и в этом случае распределение света в сильной степени зависит от изменения показателей преломления и удаления фокальной плоскости от стекла. Связанные с этим отклонения ведут к потере разрешающей способности и интенсивности сигнала, а также сдвигу фокуса. Падение разрешения и яркости изображения, которое часто возникает при смещении наблюдения от поверхности раздела «образец-стекло» вглубь образца, было отмечено в середине 1980-х Стефаном В. Хелом (Stefan W. Hell) и другими и стало предметом многих исследований, связанных с интерпретацией конфокальных флуоресцентных изображений.



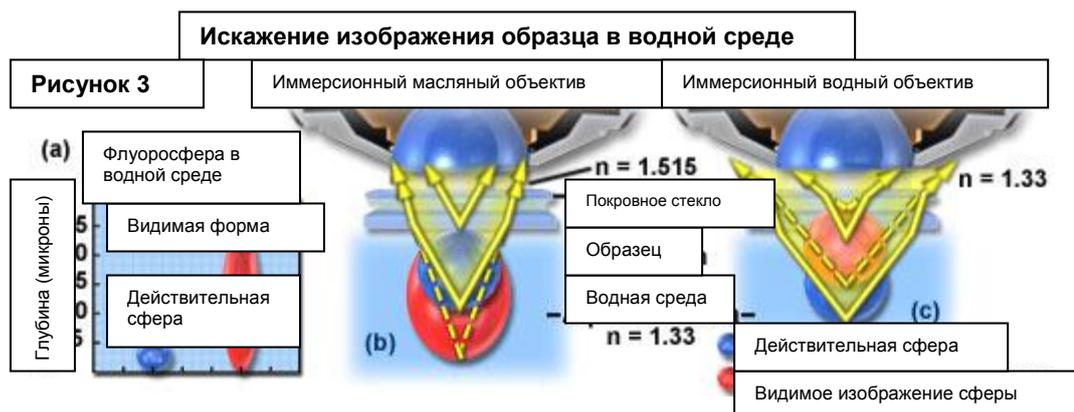
На рисунке 2 сравниваются оптические ситуации, в одной из которых условия для наблюдения иммерсионным масляным объективом идеальны (рисунок 2(a)), а в другой – несовпадение показателя преломления иммерсионного масла и водной среды приводит к серьёзным искажениям изображения (рисунок 2(b)). Оптические условия, в которых наблюдается плоскость образца, отделённая от покровного стекла слоем водной среды, являются характерными для изучения толстых биологических образцов, и неизбежное ухудшение изображения в этом случае подталкивает к применению иммерсионных водных объективов.

Идеальными условиями применения планахроматического иммерсионного масляного объектива является наблюдение, при котором образец находится в прямом контакте с покровным стеклом, поскольку в этом случае обеспечивается постоянство показателя преломления (номинально 1,515) на всём оптическом пути от фокальной точки на поверхности образца, через покровное стекло и иммерсионное масло и далее в переднюю линзу объектива. В такой конфигурации (рисунок 2(a)), не происходит преломления световых волн и в полной мере используется числовая апертура объектива. Более того, абберрации линз предсказуемы и исправлены, а сформированные изображения демонстрируют максимальное разрешение и контраст.

При перефокусировке на плоскости, лежащие в глубине клетки или тканевом срезе, или если образец залит физиологической средой, свету приходится пересекать области с ненулевым градиентом показателя преломления или поверхности раздела, на которых происходит его скачок от образца ($n=1,35$) к водному физиологическому солевому раствору ($n=1,33$) и комбинации покровное стекло-иммерсионное масло-объектив ($n=1,515$). Результатом возникающего на каждой поверхности раздела преломления является неполное использование числовой апертуры объектива и оптические абберрации, как следствие отклонений условий эксперимента от расчётных условий, заложенных в конструкцию объектива. При переходе от водной среды к стеклу, показатель преломления которого выше, световые лучи отклоняются к оптической оси, существенно ограничивая максимальную числовую апертуру объектива (см. рисунок 2(b)). Например, водный отрезок на оптическом пути в иммерсионной масляной системе с объективом, имеющим числовую апертуру 1,4, сокращает её эффективное значение до 1,33. Иммерсионный масляный объектив не может работать в соответствии со своими расчётными характеристиками, если образец залит водой или физиологическим раствором, а возникающие при этом сферические абберрации существенно ухудшают изображение. Эти эффекты усиливаются пропорционально глубине наблюдения образца, т.е. по мере увеличения расстояния между фокальной плоскостью и нижней поверхностью покровного стекла.

При визуализации живых клеток с применением масляной иммерсии сферическая абберрация является фактором, ограничивающим качество изображения. Усиление абберрации с ростом глубины наблюдения в веществе клеток или в окружающей клетки водной среде проявляется в падении интенсивности и контраста, что не позволяет различать мелкие детали образца. Было экспериментально показано, что эти искажения достаточно сильны и приводят к ошибочной интерпретации структур образца, например ресничек морских организмов. Одним из возможных решений является применение методов деконволюции, позволяющих математически компенсировать эти искажения, хотя для этого необходимы точные измерения функции рассеяния точки (ФРТ), но, поскольку сама эта функция искажена как в продольном, так и в поперечном направлении, такие измерения становятся весьма проблематичны.

В трёхмерной микроскопии, которая становится всё более распространённым методом исследования живых клеток и других не залитых биологических препаратов, искажения функции рассеяния точки существенны из-за относительно низкого показателя преломления образцов. Особенно чувствительна к искажениям функции рассеяния точки конфокальная микроскопия, поскольку возникающие при этом сферические aberrации ослабляют те её возможности, которые составляют преимущество этого метода перед другими способами наблюдения, а именно: исключение внефокусного свечения для усиления контраста и эффективного разрешения в плоскости $x-y$ и формирование оптических срезов $x-y-z$ с высоким разрешением. В той степени, в которой несоответствие показателей преломления вызывает aberrации изображения, применение иммерсионных водных объективов для визуализации образцов с низким показателем преломления должно повысить качество их изображений и значительно увеличить глубину, на которой это качество сохраняется.



В микроскопии трёхмерных образцов, данные изображения могут считаться представлением образца с содержащимися в нём aberrациями, или образца, «размытого» трёхмерной функцией рассеяния точки. Если реконструкция объекта по искажённому изображению выполняется методами деконволюции, должна быть точно определена функция рассеяния точки. Для её описания применяются как прямые измерения, так и вычислительные методы, и оба подхода имеют свои преимущества и недостатки. Экспериментальное сравнение масляной и водной иммерсионных систем с помощью либо измеренной, либо вычисленной трёхмерной функции рассеяния точки доказывает значительное ослабление зависимых от глубины фокальной плоскости сферических aberrаций в водной иммерсионной системе.

На рисунке 3 представлено сравнение хода лучей от образца к иммерсионным объективам (масляному и водному), а также предсказанное геометрической моделью $x-z$ изображение флуоресцентной гранулы, расположенной в водной среде на глубине 100 микрометров от поверхности раздела. На рисунке 3(a) сфера слева представляет действительную форму флуоресцентной гранулы, тогда как продолговатая правая форма является изображением, полученным иммерсионным масляным объективом. Ход лучей (жёлтые стрелки на рисунке 3) от гранулы к иммерсионному масляному объективу (рисунк 3(b)) и к иммерсионному водному объективу (рисунк 3(c)) проясняет механизм искажения геометрии образца при несовпадении показателей преломления. Гранула в водной среде искажается и принимает овальный вид при наблюдении иммерсионным масляным объективом, как показано на рисунке 3(b), но остаётся сферической, если применяется иммерсионный водный объектив (рисунк 3(c)). Действительные образцы показаны голубыми сферами, а их видимые изображения – красными овалом и сферой.

Для того, чтобы трёхмерное изображение было надёжным представлением действительного образца (свёрнутого функцией рассеяния точки), необходимо быть уверенными, что сама функция рассеяния точки не меняется при продольных и поперечных сдвигах фокуса. На практике это может нарушаться, если условия эксперимента не совпадают с расчётными для объектива условиями. Объектив проектируется под заданные показатели преломления образца, иммерсионной среды и покровного стекла (заданной толщины). При совпадении показателей преломления образца и иммерсионной среды, aberrации минимизированы для образца любой толщины, поскольку при фокусировке в более глубоких плоскостях образца увеличение длины оптического пути в его среде компенсируется сокращением длины пути в иммерсионной среде. Два этих следствия перемещения предметного столика компенсируют

друг друга, так что плоскости объекта и его изображения остаются сопряжёнными в оптической системе, что и требуется для формирования неискажённого изображения. Следовательно, применение иммерсионных масляных объективов для наблюдения образцов в заливочной среде не противоречит их расчётным условиям работы, но когда они используются для наблюдения биологических образцов с низким показателем преломления, очевидны значительные отклонения функции рассеяния точки вдоль оптической оси. Если функция рассеяния точки меняется вдоль оси, она должна быть рассчитана для каждой плоскости изображения из трёхмерного массива в рамках сложной модели, которая бы учитывала эти продольные изменения; кроме того, должен быть применён более мощный алгоритм цифровой обработки изображения, чем деконволюция. Все эти соображения говорят в пользу применения иммерсионных водных объективов для изучения трёхмерных биологических образцов с целью уменьшить изменение функции рассеяния точки вдоль оптической оси и, как следствие, минимизировать аберрации изображения.

Конструкция и характеристики иммерсионной водной оптики

Целью любого иммерсионного объектива (конструкция которого предусматривает замену воздуха жидкостью в пространстве между передней линзой объектива и образцом) является увеличение числовой апертуры системы. При использовании иммерсионного масляного объектива может показаться, что толщина покровного стекла не имеет большого значения, поскольку его показатель преломления приблизительно совпадает с показателем преломления иммерсионной жидкости. Это действительно так, если образец залит канадским бальзамом или другой средой с показателем преломления, равным показателю преломления покровного стекла. Но если образец залит водной средой, такой как физиологический раствор, показатель преломления которого существенно отличается от показателей преломления стекла и иммерсионного масла, оптические характеристики системы существенно меняются. Фокусировка через водный слой толщиной даже в 10 микрон может привести к серьёзным искажениям изображения из-за несимметричности функции рассеяния точки относительно фокальной плоскости (см. рисунок 2 и 3). Оптические допущения, применяемые для исправления аберраций у иммерсионного масляного объектива, действительны лишь в случае, когда исследуемый участок образца непосредственно контактирует с покровным стеклом.

Когда это свойство иммерсионных масляных объективов стало более очевидным для исследователей, и были осознаны ограничения, накладываемые на появляющиеся методики формирования и визуализации трёхмерных изображений в изучении живых клеток и тканей, некоторые производители микроскопов в середине 1990-х стали выпускать хорошо скорректированные иммерсионные водные объективы с высокой числовой апертурой. Числовая апертура иммерсионных водных объективов с планапохроматическим уровнем коррекции составляет приблизительно 1,2, что несколько ниже числовой апертуры соответствующих иммерсионных масляных объективов, но водные объективы обладают критически важным свойством получать резкие изображения в водных слоях толщиной порядка 200 микрон. Хотя основным преимуществом иммерсионных водных объективов является возможность наблюдать толстые биологические препараты с низкими показателями преломления, дополнительные выгоды проистекают из использования воды в качестве иммерсионной жидкости. Вода не имеет собственной флуоресценции, которая бы затрудняла интерпретацию изображения, снижает вероятность загрязнения физиологических растворов, не требует специальных методов очистки и расходов.

Высоко скорректированный планапохроматический иммерсионный водный объектив 60x компании Nikon был разработан с учётом характеристик, впервые предложенных Шиня Иноа (Shinya Inoue), и аналогичен объективам из этой линейки, предложенными другими производителями. Объектив имеет числовую апертуру 1,2 и рабочее расстояние – 220 микрон, которое при изучении водных образцов является потенциальной глубиной наблюдения (см. рисунок 1). Коррекционное кольцо позволяет настраивать объектив на толщину покровного стекла от 0,15 до 0,18 миллиметра, что весьма существенно для исключения сферической аберрации. К тому же, объектив имеет высокий коэффициент пропускания и хроматически исправлен в диапазоне от ближнего ультрафиолета до красных длин волн, поэтому может применяться как в конфокальной, так и в традиционной

флуоресцентной микроскопии и в микроскопии дифференциального интерференционного контраста (ДИК).

Как уже говорилось, благодаря гомогенной иммерсии световые лучи не испытывают преломления на всём пути через образец и иммерсионную среду, пока не достигнут задней поверхности передней линзы объектива. Если по ходу лучи не пересекают поверхностей раздела сред с разными показателями преломления, производительность объектива во всём диапазоне фокусировки ограничивается только дифракцией. Для исключения скачков показателя преломления при наблюдении слабо преломляющих образцов иммерсионные масла заменяются водой, но при использовании покровного стекла в эксперименте появляется дополнительная поверхность раздела (вода-стекло; рисунок 2(с)). Точное значение показателя преломления и толщины покровного стекла критично для достижения наибольшей разрешающей способности, поэтому многие иммерсионные водные объективы оснащены коррекционными кольцами для компенсации меняющихся параметров покровного стекла. Для сглаживания несоответствия показателей преломления заливочной среды и иммерсионной жидкости, применяемой с водными объективами, могут быть эффективны оптические пластмассы. Пластмассовые покровные стёкла с показателями преломления от 1,35 до 1,4 должны существенно сокращать угол преломления световых лучей, идущих от образца к передней линзе объектива через водную среду.

Анализ разрешающей способности иммерсионных объективов

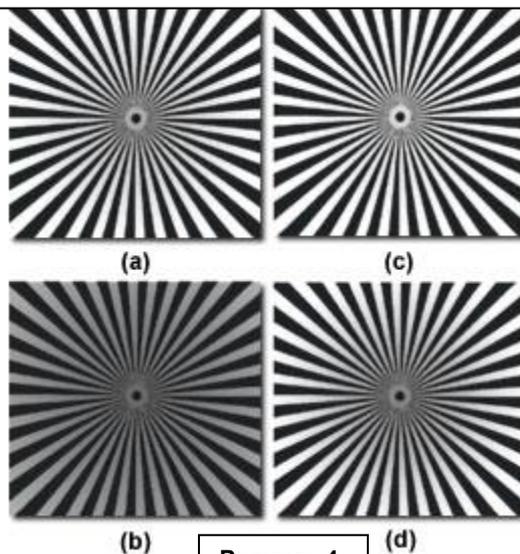


Рисунок 4

Практическая оценка иммерсионных водных объективов проводилась многими исследователями, которые различными способами пытались выяснить преимущество микроскопических систем этого типа для определённых приложений. Явные преимущества водной иммерсии перед масляной для изучения биологических образцов, особенно их участков, расположенных на некотором расстоянии от покровного стекла, предсказаны теоретически, исходя из влияния сферической аберрации на функцию рассеяния точки. Эти теоретические расчеты нашли подтверждение в экспериментальных результатах, демонстрирующих существенный прогресс в наблюдении водных образцов на всей глубине по сравнению иммерсионными масляными объективами.

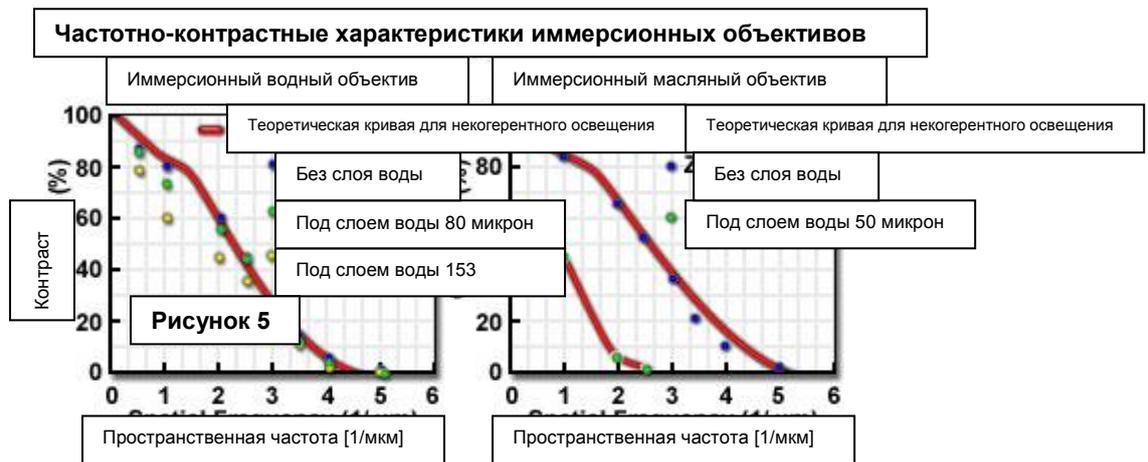
Один эксперимент по оценке производительности иммерсионного водного планахроматического объектива 60x с числовой апертурой 1,2 в сравнении с планахроматическим иммерсионным масляным объективом 60x (числовая апертура 1,4) состоял в наблюдении тестового объекта и мелких деталей диатомы на различных расстояниях ниже покровного стекла (см. рисунок 4). Результаты хорошо согласовывались с теоретическими предсказаниями: иммерсионный масляный объектив давал высоко контрастные и очень резкие изображения, только если тестовые образцы непосредственно прилегали к покровному стеклу, но при наблюдении образцов через 84-микрометровый слой воды контраст изображений падал до неприемлемого уровня. Изображения тестовых образцов, прилегающих к покровному стеклу, полученные иммерсионным водным

объективом, имели несколько меньшую резкость и контраст в сравнении с масляным объективом, но их качество почти не падало при добавлении водного слоя по ходу луча.

На рисунке 4 сравниваются изображения радиальной миры, наблюдаемой стандартным апохроматическим иммерсионным масляным объективом 60x с числовой апертурой 1,4 (рисунки 4(a) и 4(b)) и апохроматическим иммерсионным водным объективом 60x с числовой апертурой 1,2 (рисунки 4(c) и 4(d)). Тестовый образец либо был отделён от покровного стекла слоем воды толщиной 170 микромметров (рисунки 4(b) и 4(d)), либо непосредственно прилегал к нему (рисунки 4(a) и 4(c)). На рисунке 4(a) изображение тестового образца, прилегающего к покровному стеклу, получено иммерсионным масляным объективом. Контраст теряется на расстоянии 2,3 микромметра от центра, что соответствует расстоянию между полосками приблизительно 0,2 микромметра. Диаметр чёрного центрального диска, служащий базисным размером, составляет 1,2 микромметра. При наблюдении тем же объективом тестового образца в воде на глубине 84 микромметра значительно ухудшается контраст, а радиальные полоски становятся неразличимыми на расстояниях меньше 0,4 микромметра (рисунок 4(b)). Для сравнения, когда прилегающая к покровному стеклу мира наблюдается иммерсионным водным объективом, контраст исчезает на расстояниях 0,24 микромметра между радиальными линиями (рисунок 4(c)). При погружении миры под воду на расстояние 84 микромметра от покровного стекла (также как это делалось при наблюдении иммерсионным масляным объективом) контраст остаётся высоким (рисунок 4(d)) и производительность иммерсионного водного объектива не падает.

Количественная оценка производительности двух объективов представлена их частотно-контрастными характеристиками при наблюдении тестовых образцов, состоящих из равноотстоящих друг от друга тёмных и светлых полос разной пространственной частоты (рисунок 5). Частотно-контрастные характеристики отражают отношение величины контраста изображения, создаваемого оптической системой, к контрасту изображаемого объекта (образца). Изображение, сохранившее полный контраст образца на данной пространственной частоте, отображается на графике на уровне 100 процентов, что соответствует совершенной передаче контраста системой. Падая с ростом пространственной частоты, контраст обращается в ноль при определённом расстоянии между линиями, которое может считаться абсолютным пределом разрешения для оцениваемой оптической системы. Каждый график на рисунке представляет частотно-контрастную характеристику при определённых условиях: в случае прилегания тестовой дифракционной решётки к покровному стеклу или размещения её на разных глубинах под водой. В дополнение, приведены теоретически рассчитанные частотно-контрастные характеристики свободных от аберраций объективов соответствующей числовой апертуры. Для иммерсионного водного объектива данные приведены вплоть до глубины 153 микромметра, тогда как максимальная глубина наблюдения иммерсионного масляного объектива составила 50 микромметров.

Как показано на рисунке 5, контраст и резкость, передаваемые иммерсионным водным объективом, почти ложатся на теоретическую кривую, а его производительность сохраняется и на 80-, и на 153-микромметровой глубине воды – реальной глубине при наблюдении водных сред, таких как живые клетки и ткани. Напротив, иммерсионный масляный объектив демонстрирует 50-ти процентное падение разрешающей способности и серьёзное ухудшение контраста уже при погружении объекта на глубину 50 микромметров. Производительность объектива резко падает с ростом пространственной частоты.



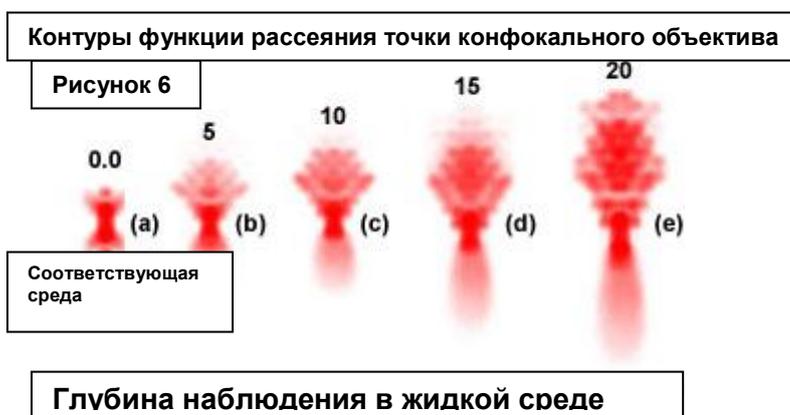
Проведённые дополнительные оценки продемонстрировали способность планахроматических иммерсионных водных объективов с высокой числовой апертурой получать изображения высокого качества даже на глубине 220 микрометров – достижение, немислимое для иммерсионных масляных объективов. Другими исследователями были проведены измерения функции рассеяния точки иммерсионных водных объективов, которые подтвердили их высокие частотно-контрастные характеристики и продемонстрировали дополнительные преимущества, связанные с улучшенной симметрией этой функции выше и ниже фокальной плоскости. Измерения показали, что зависящая от глубины дисторсия может быть смоделирована и исправлена, позволяя, тем самым, использовать водный объектив для точных измерений вдоль оси z для определения вертикальной разрешающей способности. Симметричность функции рассеяния точки относительно фокальной плоскости (свидетельствующая о минимальной сферической аберрации) позволяет сопоставить ей теоретически рассчитанную продольную разрешающую способность объектива соответствующей числовой апертуры. Одним из итоговых преимуществ таких оптических характеристик является усиление методов деконволюции, применяемых при формировании трёхмерных изображений, по сравнению с масляными объективами. Более того, в результате существенного ослабления сферической аберрации у иммерсионных водных объективов, ими собирается больше света, и увеличивается яркость изображений при наблюдениях в водной среде или тканях на глубине более 20 микрометров.

Специальные аспекты конфокальной микроскопии

Основным преимуществом конфокальных методов является контролируемое ограничение толщины фокальной плоскости, позволяющее производить оптические срезы, и повышение разрешающей способности и контраста за счёт уменьшения бликов путём отсечения сигналов, идущих из областей вне плоскости изображения. Благодаря двум этим факторам возможно x - z сканирование и создание трёхмерных представлений толстых образцов. Эти возможности ограничиваются сферическими аберрациями, усиливающимися с ростом толщины образца, в случае, когда показатели преломления образца и иммерсионной жидкости не совпадают. Если для наблюдения водного образца применяется иммерсионный масляный объектив, сферическая аберрация примерно в одну треть волны добавляется с каждым понижением фокальной плоскости в образце на один микрометр. Небольшая сферическая аберрация вызывает уширение функции рассеяния точки и эквивалентное этому падение продольной разрешающей способности (см. рисунок 6). Сильная аберрация, которая суммируется с ростом глубины фокусировки в образцах с низкими показателями преломления и сказывается уже на глубинах более 10 микрометров, производит значительное размытие функции рассеяния точки и потерю контраста изображения. Если не исключить сферическую аберрацию, потери резкости и контраста перевесят преимущества конфокального подхода уже на расстоянии 15 микрометров от покровного стекла. Применение иммерсионных водных объективов в значительной мере снимает эту проблему при наблюдении образцов на основе водной среды, таких как живые клетки.

Сферическая аберрация, проистекающая из несовпадения показателей преломления, может исказить оптическую информацию об образце до неверного истолкования его морфологии и ошибок в определении его размеров. Распространённым в трёхмерной микроскопии является искажение формы образцов, при котором они кажутся вытянутыми вдоль оптической оси (z

оси). Было применено много методик для измерения и численного моделирования этого явления, но ни одна не даёт приемлемых размеров и не описывает самой причины явления. Тем не менее, экспериментально установлено, что в результате этого кажущегося растяжения продольный размер объекта может увеличиваться в три раза (рисунок 3). Эта аномалия зависит от иммерсионной среды и считается вызванной тем, что продольное перемещение предметного столика не приводит к эквивалентному смещению фокальной плоскости. Возникающие ошибки в оценке расстояний и объёмов серьёзно сказываются во всех видах трёхмерной микроскопии. Среди факторов, влияющих на это искажение – несовпадение показателей преломления заливочной или окружающей среды и иммерсионной жидкости, размер образца, расстояние от покровного стекла и числовая апертура объектива. Применение водной иммерсии при наблюдении образцов с низкими показателями преломления, такими как биологические ткани, ослабляет это искажение, хотя при определенных условиях его не удаётся устранить до конца. Показатель преломления клеточного вещества обычно меняется от 1,33 до 1,39, следовательно несовпадение показателей преломления неизбежно даже при использовании воды в качестве иммерсионной среды.



В дополнение к ошибкам в определении размеров, искажения функции рассеяния точки, вызванные несовпадением показателей преломления, существенно влияют на интенсивность сигнала. Во многих конфокальных конфигурациях, точечное отверстие, которым сканируется поверхность образца, является одновременно и принимающий свет диафрагмой (софокусной по определению), точечность которой позволяет исключить попадание света из внефокусных областей в фотоприёмник. При наблюдении глубоких областей образца иммерсионным масляным объективом, сильная сферическая абберрация может вызвать значительное смещение фокуса, так что большая часть света, испущенного находящимися в образце флуорофорами, не сможет попасть в точечное отверстие и на фотоприёмник. Следовательно, большая часть сигнала, от областей образца, удалённых от покровного стекла, теряется, не достигнув конфокального приёмника. Смещение фокуса, вызванное сферической абберрацией, сопровождается потерей яркости формируемого изображения, и этот эффект только усиливается с увеличением глубины наблюдения образца.

В опубликованных теоретических и экспериментальных работах доказывается, что пик интенсивности флуоресцентной плоскости, наблюдаемой иммерсионным масляным объективом с числовой апертурой 1,3 в водной среде на глубине 20 микрометров, составляет менее 40 процентов от пика, наблюдаемого на глубине 10 микрон. Это проиллюстрировано на рисунке 6, на котором представлены графики конфокальной функции рассеяния точки иммерсионного масляного объектива с высокой числовой апертурой и соответствующие им выходные сигналы для нескольких глубин наблюдения. Идеальная функция рассеяния точки (без сферической абберрации) представлена на рисунке 6(a), а на рисунках 6(b)-6(e) она представлена для наблюдений на глубине, соответственно, 5, 10, 15, и 20 микрометров в водной среде. Уменьшение или полное исключение сферической абберрации в случае применения иммерсионного водного объектива с высокой числовой апертурой является эффективным подходом для поддержания адекватного уровня сигнала во флуоресцентной микроскопии высокого разрешения.

Одним из преимуществ применения иммерсионных водных объективов в конфокальной микроскопии, часто упускаемым из виду, является гораздо меньшая, по сравнению с большинством иммерсионных масел, вязкость воды, которая, благодаря этому, оказывает меньшее давление (поверхностное натяжение) на покровное стекло во время фокусировки, когда объектив и образец смещены друг относительно друга. Вследствие этого, меньше вероятность прогиба покровного стекла и смещения образца при смене фокуса во время регистрации z-серии изображений в конфокальной микроскопии. Минимизация смещения образца во время повторяющихся перефокусировок, выполняемых при регистрации изображений оптических срезов, может способствовать более достоверной и резкой трёхмерной реконструкции образца по набору плоских изображений.

Недавно было экспериментально показано, что иммерсионные водные объективы можно применять для методов наблюдения несколькими объективами, такими как **4Pi** конфокальная микроскопия и **тега**-микроскопия. Продольная разрешающая способность 4Pi конфокальной микроскопии такая же как и у оптических методов ближнего поля, что достигается комбинированием когерентных сфокусированных сферических волновых фронтов, идущих от двух противоположных светосильных объективов. Введение двух когерентных сферических волновых фронтов приводит к увеличению апертуры вдоль оптической оси и сужению минимума функции рассеяния точки. Из методов дальнего поля 4Pi микроскопия обладает на сегодня наибольшей разрешающей способностью в трёх измерениях, которая, в сочетании с реконструкцией изображения, составляет порядка 100 нанометров.

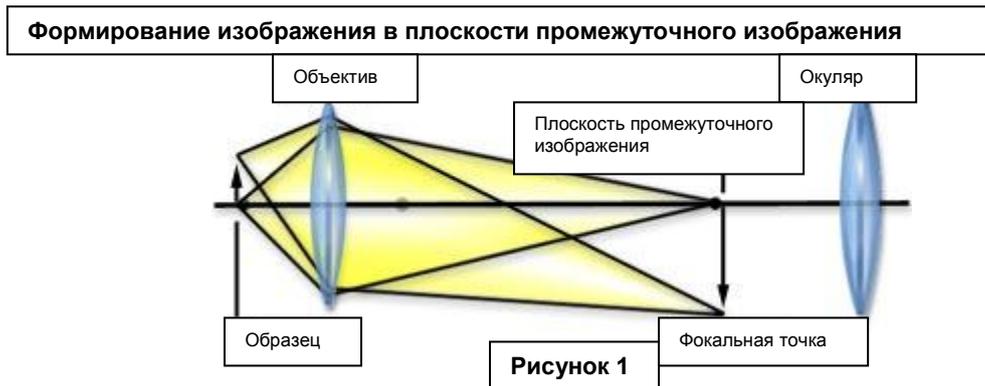
До разработки иммерсионных водных объективов высокой числовой апертуры, зависимость 4Pi конфокальной микроскопии от масляной иммерсии ограничивала диапазон её наблюдений только образцами, залитыми глицерином. Показатель преломления глицерина (1,47) достаточно близок к показателю преломления иммерсионного масла (1,51), поэтому при продольном сканировании требуется минимальная компенсация фазового сдвига. В большом числе работ по изучению клетки используются среды для заливки с глицерином в своей основе, поэтому, по крайней мере, одним производителем был разработан иммерсионный объектив высокой числовой апертуры, рассчитанный на глицерин в качестве иммерсионной среды, для минимизации искажений, вызванных несопадением показателей преломления масла и глицерина. Спроектированный для применения с кварцевым покровным стеклом (показатель преломления 1,46), этот объектив оснащён коррекционным кольцом для подстройки под концентрацию глицерина в интервале от 72 до 88 процентов. Он успешно применяется в трёхмерной флуоресцентной микроскопии, и должен упростить наблюдение залитых глицерином образцов в 4Pi микроскопии.

В случае наблюдения образцов в воде или физиологическом растворе, тем не менее, сильная сферическая абберация и фазовые сдвиги не позволяют применять иммерсионные масляные или глицериновые объективы в 4Pi микроскопии. Поэтому, масляная иммерсия не применима для наблюдения живых клеток 4Pi методами. Светосильные иммерсионные водные объективы, разработанные для минимизации сферической абберации, вызванной несопадением показателей преломления в обычной конфокальной и многофотонной микроскопии, сохраняют свои преимущества и в 4Pi методах, применяемых для изучения живых клеток. Хотя иммерсионные водные объективы имеют более низкие числовые апертуры в сравнении с масляным, некоторые исследования показали, что функция рассеяния точки этих объективов позволяет кардинально повысить продольное разрешение при трёхмерной визуализации живых образцов методами 4Pi микроскопии.

Оптическая система Nikon CFI60 – Описание скорректированной на бесконечность оптической системы Nikon CFI60 представлено для ознакомления посетителей сайта МикроскопияУ с этой новой системой. Скорректированные на бесконечность микроскопы, ставшие уже стандартом в области микроскопических наблюдений, позволяют с минимальными абберационными эффектами и смещением фокуса, устанавливая в ход лучей между объективом и тубусной линзой дополнительные компоненты (призмы для дифференциального интерференционного контраста (ДИК), поляризаторы, эпифлуоресцентные осветители) .

Введение

Иногда, даже когда микроскописты слышат словосочетание «бесконечная оптика», они представляют себе оптическую систему с безграничными возможностями. Некоторые считают, что при использовании микроскопа с бесконечной оптической системой эффективность наблюдения возрастает настолько, что производительность других систем не может быть высокого уровня.



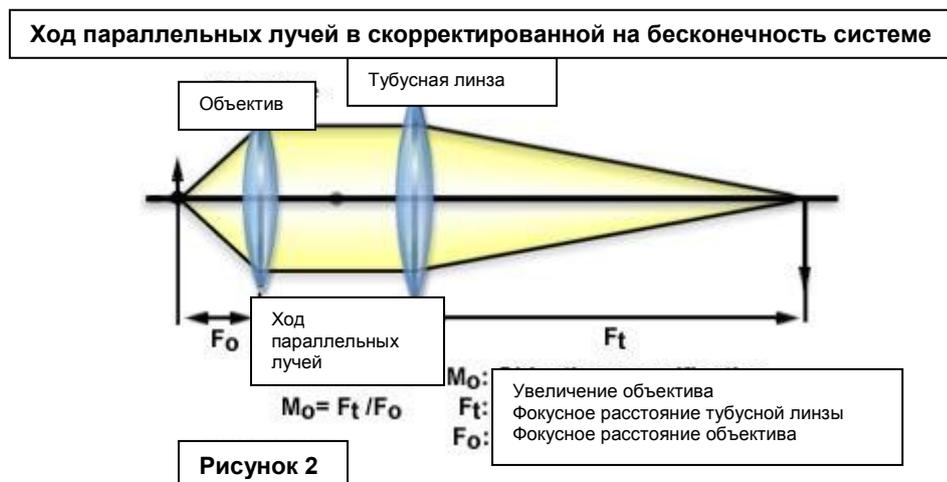
Стараются ли производители оправдать ожидания пользователей и сделать, чтобы именно так и было на самом деле? Действительно ли бесконечная оптика столь значительно повышает гибкость системы, и правда ли, что её производительность всегда выше конечных оптических систем?

Команде разработчиков системы Nikon **CFI60** пришлось столкнуться с этими суждениями. Они тщательно изучили преимущества и недостатки систем других производителей и нашли оптимальное решение - баланс производительности системы и её гибкости. Эта статья поможет понять, почему бесконечная оптическая система, включающая тубусную линзу с фокусным расстоянием 200 миллиметров, объектив с парфокальным расстоянием 60 миллиметров и резьбовое соединение объектива диаметром 25 миллиметров, устанавливает новые стандарты производительности для биологических исследований.

Почему фокусное расстояние тубусной линзы составляет 200 миллиметров?

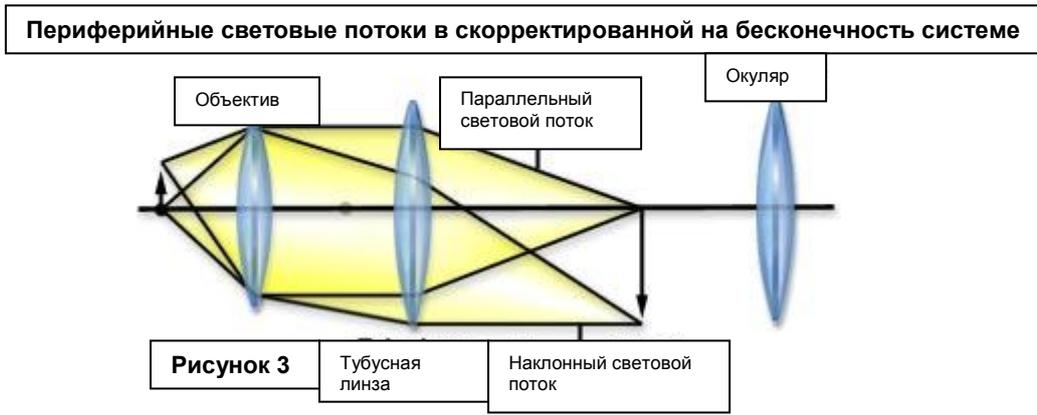
В конечной оптической системе свет от объекта проходит через объектив и направляется им в плоскость первичного изображения (часто называемую **плоскостью промежуточного изображения**), совпадающую с фокальной плоскостью окуляра, и сходятся, как показано на рисунке 1.

В бесконечной оптической системе, напротив, свет после прохождения объектива образует поток параллельных лучей, которые сходятся, только пройдя через тубусную линзу, как показано на рисунке 2. Это **не** значит, что между объективом и тубусной линзой, в каком-либо смысле, существует бесконечное расстояние. Свет от объекта, расположенного на оптической оси, после прохождения объектива, проходит параллельно оптической оси. Свет, исходящий из периферийных участков объекта, образует поток параллельных световых лучей, идущих под углом к оптической оси, как показано на рисунке 3 ниже.



Поэтому, при размещении тубусной линзы слишком далеко от объектива, часть косых лучей не сможет быть захвачена линзой. Это является причиной тёмных и размытых краёв поля зрения и не даёт использовать весь потенциал микроскопа. Термин «бесконечная оптика» означает лишь параллельность световых лучей после прохождения объектива, а не возможность получить бесконечное пространство внутри оптической системы.

Если мы хотим применить бесконечную оптику для дальнейшего усовершенствования микроскопа, необходимо увеличить расстояние между объективом и тубусной линзой, а также повысить гибкость системы. Расстояние увеличивается уменьшением угла наклона потока параллельных лучей вне оптической оси. Обычно думают, что этого можно добиться увеличением фокусного расстояния тубусной линзы, но оно тоже имеет свои ограничения.

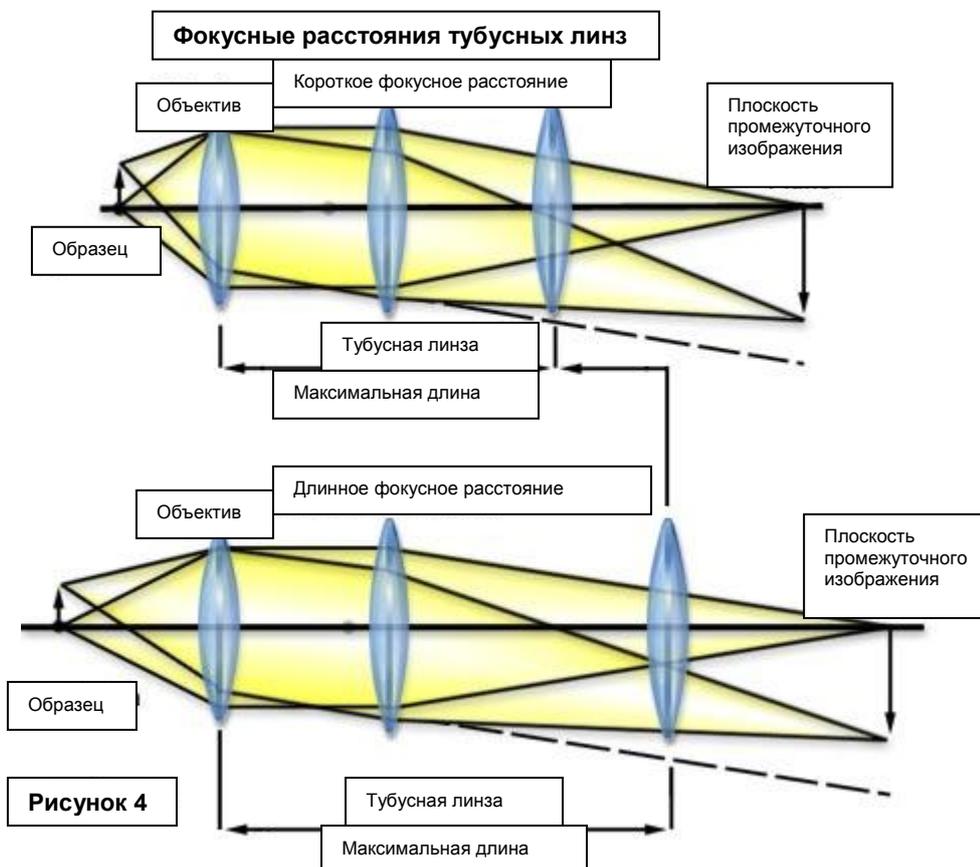


Увеличение $M(o)$ объектива в микроскопе с бесконечной оптикой описывается следующей формулой:

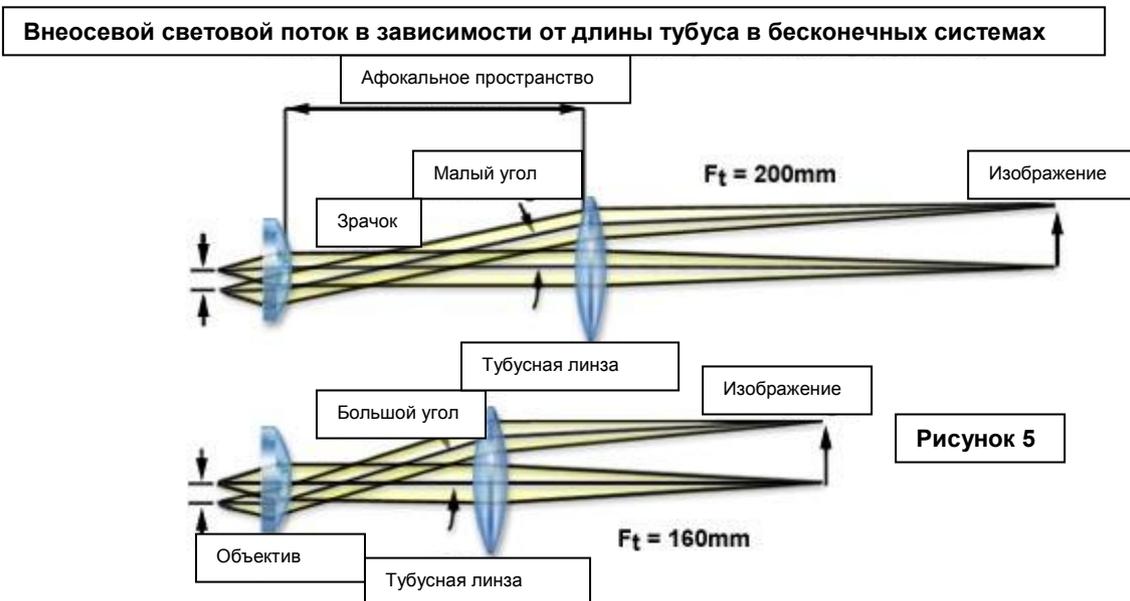
$$M_o = \text{фокусное расстояние тубусной линзы } (F_t) / \text{фокусное расстояние объектива } (F_o)$$

(фокусные расстояния тубусной линзы $F(t)$ и объектива $F(o)$ показаны на рисунке 2). Расстояние до плоскости изображения (в окуляре) увеличивается с ростом фокусного расстояния тубусной линзы и объектива. Естественно, что габариты микроскопа при этом тоже увеличиваются. Имея это в виду, разработчики пришли к заключению, что 200-миллиметровое фокусное расстояние тубусной линзы будет оптимальным. У других производителей приняты фокусные расстояния 160 и 180 миллиметров.

Тубусная линза с большим фокусным расстоянием формирует изображение объекта, расположенного далеко от оптической оси, с тем же увеличением, но за счёт лучей с меньшим углом наклона к оптической оси. Световые лучи не расходятся, поэтому расстояние между тубусной линзой и объективом может быть увеличено, что влечёт и существенное повышение потенциала системы в смысле её гибкости, как показано на рисунке 4 внизу.



Эта конструкция имеет явные оптические преимущества. Как показано на рисунке 5, внеосевые световые лучи, прошедшие через тубусную линзу с фокусным расстоянием 200 миллиметров, наклонены к оптической оси под меньшим углом, по сравнению с линзой с 160-миллиметровым фокусным расстоянием. Это значит, что при использовании фазового кольца в качестве вспомогательного устройства при проведении фазового контраста, призмы Номарского – при проведении ДИК или дихроичного зеркала – при эпифлуоресценции смещение друг относительно друга световых лучей, параллельных оптической оси и наклонных к ней, будет **меньше**, так что используемые вспомогательные устройства будут работать более эффективно. Это является большим оптическим преимуществом, а также основным фактором повышения контраста в эпифлуоресцентной микроскопии.



Почему парфокальное расстояние объектива составляет 60 миллиметров?

Увеличение фокусного расстояния тубусной линзы до 200 миллиметров, в свою очередь требует увеличения парфокального расстояния объектива по сравнению со стандартом 45 миллиметров. Как уже было объяснено в разделе, посвящённом длине тубуса, для сохранения увеличения фокусное расстояние объектива должно быть увеличено, а поскольку 45 миллиметров не могут удовлетворить этому требованию, такая конструкция не позволяет получать высококачественные изображения. Хотя на практике в масляном объективе CF N Plan Aro 60x с длиной механического тубуса 160 миллиметров, считающимся чуть ли не лучшим среди конечных объективов, удалось втиснуть большое число линз в ограниченное пространство 45 миллиметров. При замене этой конечной системы на бесконечную и разделении объектива на объектив и тубусную линзу, фокусное расстояние тубусной линзы оказывается эквивалентным приблизительно 150 миллиметрам. Исходя из этого мы можем вычислить парфокальное расстояние, обеспечивающее производительность лучшую, чем у конечной системы: парфокальное расстояние объектива конечной системы 45 миллиметров соответствует фокусному расстоянию тубусной линзы 150 миллиметров; парфокальное расстояние объектива бесконечной системы x – фокусному расстоянию тубусной линзы 200 миллиметров. Решение пропорции: $45 : 150 = x : 200$, даёт $x = 60$ миллиметров. Поэтому, при фокусном расстоянии тубусной линзы 200 миллиметров оптимальное парфокальное расстояние объектива составляет 60 миллиметров.

Из этих расчётов следует, что оптимальное парфокальное расстояние для тубуса длиной 160 миллиметров – 48 миллиметров, а для тубуса длиной 180 миллиметров – 54 миллиметра. Потенциал объективов с бесконечной оптикой не может быть использован в полной мере, если они выполнены с парфокальным расстоянием 45 миллиметров.

Поскольку с ростом фокусного расстояния объектива растёт и его рабочее расстояние (PP), производители, придерживающиеся парфокального расстояния 45 миллиметров, не имеют возможности использовать большее рабочее расстояние, достигнутое в компании Nikon. Взяв для сравнения масляный объектив Plan Aro 60x (N.A. 1.4), мы увидим, что рабочие расстояния остальных производителей по меньшей мере на 50 процентов меньше, чем у Nikon. Это говорит о разнице возможностей наблюдения различных типов образцов, а также о лёгкости выполнения операций.

Длины тубусов, скорректированных на бесконечность

Производитель	Длина тубуса (миллиметры)
Nikon	200
Olympus	180
Leica	200
Zeiss	164.5

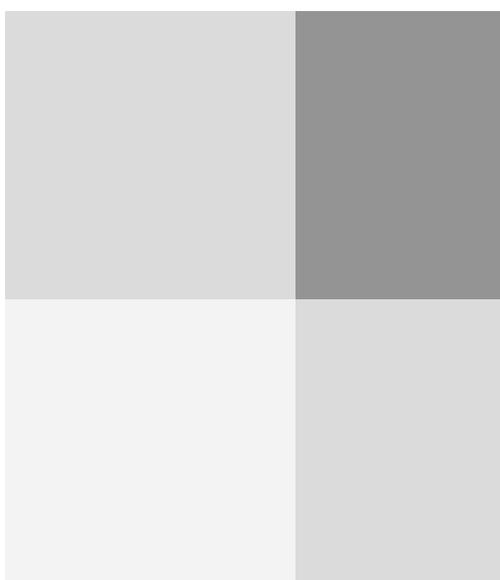


Таблица 1

Слабые линзы должны иметь специальные размеры. При увеличении объектива 1x, из формулы " $M(o) = F(t)/F(o)$ ", приведённой в разделе о длине тубуса, следует, что **фокусные расстояния объектива и тубусной линзы должны быть равны**. Очевидно, что парфокальное расстояние 45 миллиметров оставляет в конструкции слишком мало свободного пространства и не позволяет, поэтому, полноценно использовать тубусную линзу компании Nikon с фокусным расстоянием 200 миллиметров. Благодаря увеличению парфокального расстояния до 60 миллиметров (поистине революционному изменению) становится доступным не только увеличение 1x, но и 0,5x. Самое низкое увеличение, предложенное другими производителями, составляет 1,5x, и никому из них ещё не удалось выпустить объектив с увеличением 1x.

Почему мы используем размер резьбы 25 миллиметров?

С увеличением фокусного расстояния тубусной линзы должно расти и фокусное расстояние объектива. Но в этом случае трудно сохранить высокой числовую апертуру (ЧА), поскольку существует ограничение на диаметр зрачка объектива (эффективный диаметр, ограниченный сверху диаметром резьбового соединения объектива). Таким образом, это критически сказывается на ЧА объективов малой мощности. В настоящее время, все производители придерживаются диаметра резьбы 20,32 миллиметра, за исключением (как уже говорилось выше) компании Nikon, перешедшей на размер 25 миллиметров, позволяющий достигать высоких числовых апертур. Первоначально, яркость фотообъективов (F) выражалась формулой:

$$F = f/D$$

где **f** – фокусное расстояние, а **D** – эффективный диаметр. Поскольку ЧА микроскопа соответствует значению **F** фотообъектива, яркость выражается формулой:

$$F \cong 1/(2N.A.)$$

С помощью этой формулы можно найти эффективный диаметр, соответствующий необходимой ЧА. Другими словами, размер зрачка объектива (эффективный диаметр на его выходе) выражается как:

$$D = 2N.A. \times f$$

Например, чтобы определить эффективный диаметр объектива CFI Plan Apo 4x (ЧА 0.2), объектива с самой высокой (яркой) ЧА, при условии что его фокусное расстояние составляет 50 миллиметров, а фокусное расстояние тубусной линзы - 200 миллиметров, необходимо произвести следующие вычисления:

$$D = 2 \times 0.2 \times 50 = 20\text{мм (оптический диаметр)}$$

Очевидно, традиционный размер резьбы 20,32 мм физически не может быть использован. Диаметры зрачков, требуемые для создания объективов 4x с числовой апертурой 0,2 на базе тубуса длиной 160 и 180 миллиметров, соответственно равны 16 и 18 миллиметрам. Это показывает характер проблем, с которыми сталкиваются производители при проектировании объективов с размером резьбового соединения 20,32 миллиметра. Действительная числовая апертура объективов класса Plan Apo 4x составляет 0.16. Числовая апертура объектива Nikon этого же класса равна 0,20 и является самой высокой в отрасли.

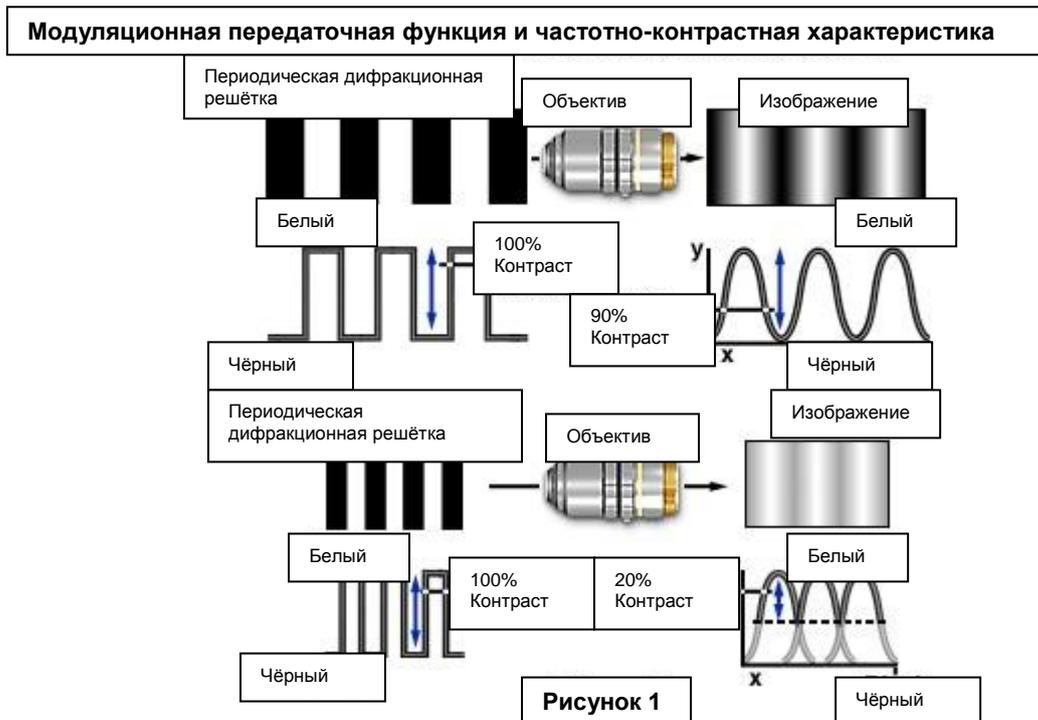
Как уже говорилось, чтобы объективы с малой кратностью увеличения имели высокую числовую апертуру им необходимо иметь зрачок большого диаметра. Чем больше фокусное расстояние тубусной линзы, тем острее необходимость в увеличении резьбового соединения объектива. В связи с этим, компания Nikon в системах CFI с бесконечной оптикой перешла на 25-миллиметровый диаметр резьбы.

В заключение

Мы надеемся, что эти пояснения, сопровождавшиеся специальными примерами, были убедительны и помогли вам понять, почему фокусное расстояние тубусной линзы 200 миллиметров является оптимальным для применения в бесконечных оптических системах и почему более высокие оптические характеристики объектива достигаются при увеличении его парфокального расстояния до 60 миллиметров, а диаметра резьбового соединения – до 25 миллиметров. Распространение бесконечной оптики заставляет жертвовать совместимостью с традиционными оптическими системами, находящимися в рамках JIS (национальные стандарты Японии) и других принятых стандартов.

Компания Nikon понимает, истинная задача разработчиков заключается в создании продукции, которая действительно нужна и отвечает требованиям тех, кто сегодня работает на переднем крае микроскопии, а не в жёстких ограничениях, накладываемых использованием стандартных размеров. Появление оптических систем Nikon серии **CFI60** стало возможным благодаря инновациям в инженерном искусстве, технологиях и контроле качества.

Передаточная модуляционная функция - Разрешающая способность и производительность оптического микроскопа может быть количественно выражена модуляционной передаточной функцией (МПФ), которая является мерой способности микроскопа переносить контрастное изображение образца с определённым разрешением в плоскость промежуточного изображения. Модуляционная передаточная функция часто применяется производителями оптики как способ объединения данных по контрасту и разрешению единым числовым параметром.



Модуляционная передаточная функция эффективна не только для оценки традиционных оптических систем, но также таких систем, как аналоговые и цифровые видео камеры, усилители яркости изображения и кинопроекторы. Это понятие заимствовано из электротехники, где оценивается зависимость модуляции выходного сигнала от частоты сигнала. В оптической микроскопии частотой сигнала можно считать пространственную периодичность, наблюдаемую в образце, от металлической дифракционной решётки, напылённой на предметное стекло, и панциря диатомовых водорослей до субклеточных частиц в клетках тканевой культуры.

Количество периодов в единичном интервале образца принято называть **пространственной частотой**, которая часто выражается количественно через периодические интервалы (**пространственные периоды**) в образце. Принятой единицей измерения пространственной частоты является количество пар линий в одном миллиметре. Например, пространственная частота протяжённой серии чередующихся чёрных и белых линий, в которой на 1 микрометр приходится одна пара, будет равна 1000 линиям на миллиметр.

Другим важным понятием является **оптическая передаточная функция (ОПФ)**, которая характеризует отношение контраста изображения к контрасту образца в зависимости от пространственной частоты и с учётом фазового смещения между положением действительного и идеального изображения. Обобщённо, оптическая передаточная функция может быть выражена как:

$$\text{ОПФ} = \text{МПФ} \cdot e^{i\phi(f)}$$

где мнимый член представляет **фазовую передаточную функцию (ФПФ)**, или изменение фазы как функции пространственной частоты. Таким образом, оптическая передаточная функция является зависимой от пространственной частоты комплексной переменной, модулем которой является модуляционная передаточная функция, а фазой – фазовая передаточная функция. Если фазовая передаточная функция линейно зависит от частоты, она представляет простое боковое смещение изображения – абберацию, известную как геометрическое искажение. Однако, если фазовая передаточная функция нелинейная, искажения изображений будут более серьёзными. Характерным примером является смещение фазы на 180 градусов, вследствие чего контраст изображения меняется на противоположный, т.е. светлые участки изображения становятся тёмными, и наоборот.

Модуляционная передаточная функция идеальной оптической системы равна единице на любой пространственной частоте, а её фазовое смещение при этом равно нулю. Когда

формируемое микроскопом (или другой оптической системой) изображение является синусоидальным без существенного фазового сдвига, модуль оптической передаточной функции совпадает со значением модуляционной передаточной функции.

Функция, представляющая отношение контраста изображения к контрасту образца, когда образцом является периодическая дифракционная решётка, состоящая из чёрных и белых полос одинаковой ширины (прямоугольные волны, или меандр), называется **частотно-контрастной характеристикой** (ЧКХ). Большинство образцов представляет собой не чётко выраженные меандры, а сочетание синусоидально меняющихся интенсивностей, модулируемых разными пространственными частотами. В этом случае кривая, представляющая зависимость интенсивности выходного сигнала (соотнесённая с интенсивностью входного сигнала) от его частоты (пространственной) сходна с модуляционной передаточной функцией. При очень больших значениях пространственной частоты образ меандра близок к образу синусоиды, и кривые частотно-контрастной характеристики и модуляционной передаточной функции практически совпадают.

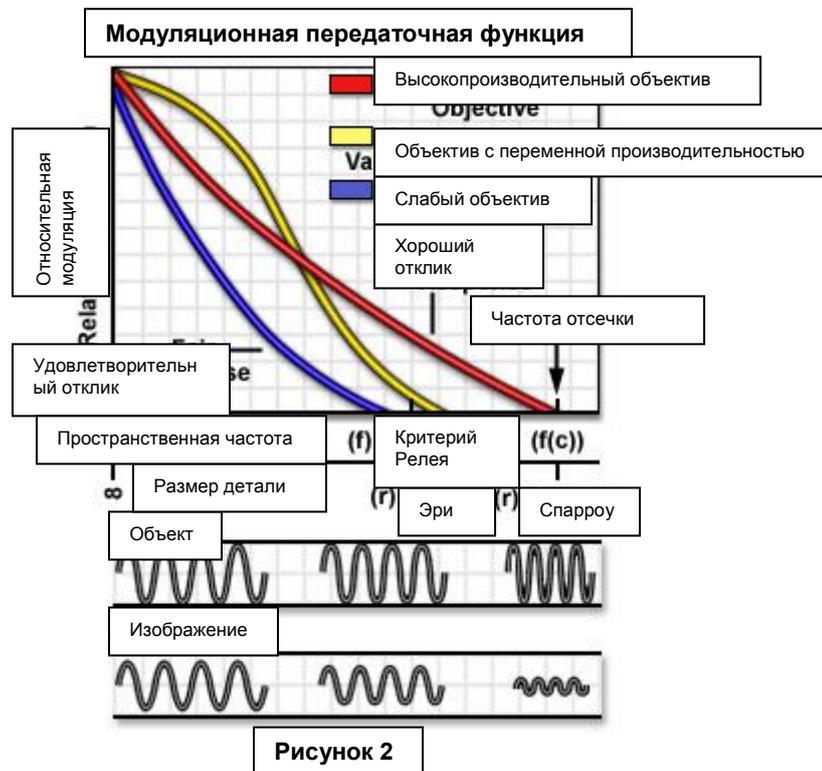
Влияние дифракции на контраст изображения

В этом приложении показано, как возрастание пространственной частоты в дифракционно-ограниченной оптической системе ведёт к падению контраста изображения.

Влияние пространственной частоты на контраст изображения в дифракционно-ограниченном оптическом микроскопе проиллюстрировано на рисунке 1. На этом рисунке периодическая линейная дифракционная решётка (слева), состоящая из чередующихся белых и чёрных прямоугольников (коэффициент контрастности равен 100 процентам) представлена на двух пространственных частотах. Изображения, формируемые микроскопом (справа), представляют собой сигнал синусоидальной интенсивности с пониженным контрастом, кривая которого в единицах контраста объекта отражена под каждым изображением. Изображение со стопроцентным коэффициентом контрастности представляет собой регулярно повторяющиеся чёрные и белые прямоугольники, тогда как нулевой коэффициент контрастности даёт серые прямоугольники, сливающиеся в сплошной фон той же интенсивности. При достижении контрастом нулевого значения, изображение становится однородной градацией серого и остаётся таким при всех более высоких пространственных частотах.

Когда входной сигнал представляет собой высоко контрастный меандр, как периодическая дифракционная решётка на рисунке 1, передача контраста определяется частотно-контрастной характеристикой. Однако, большинство образцов, наблюдаемых в микроскоп, не демонстрируют такой строгой периодичности и состоят из «прямоугольных волн», в той или иной степени синусоидальных на субмикронном уровне. В этом случае передача микроскопом контраста образца вычисляется с помощью модуляционной передаточной функции.

Модуляция выходного сигнала, интенсивность световых волн, формирующих изображение образца, определяют в микроскопии контраст изображения. Следовательно, измерение МПФ конкретного оптического микроскопа может быть проведено по контрасту изображения периодических линий и интервалов образца, которые отобразятся в виде синусоиды интенсивности, меняющейся с пространственной частотой. Если образец с пространственным периодом 1 микрон (расстояние между чередующимися поглощающими и прозрачными линиями) наблюдается с помощью хорошо подогнанной пары объектив/конденсор с высокой числовой апертурой (1,40) и масляной иммерсией, отдельные линии будут хорошо различимы микроскопом. Изображение не будет точным воспроизведением линейной решётки, но будет иметь приемлемую степень контраста чёрных и белых полос (рисунок 1). Уменьшение расстояния между линиями до пространственного периода 0,5 микрона (что соответствует пространственной частоте в 2000 линий на миллиметр) ещё больше ослабит контраст конечного изображения, но увеличение пространственного периода до 2 микрон (пространственная частота 500 линий на миллиметр) приведёт к соответствующему усилению контраста.



Предел разрешающей способности оптического микроскопа достигается при приближении пространственной частоты к 5000 линий на миллиметр (пространственный период 0,2 микрона) на длине волны 500 нанометров и при использовании высокой числовой апертуры (1,4). В этих условиях контраст будет едва различим, а изображение будет казаться нейтральной градацией серого. При наблюдении в микроскоп реальных образцов, контраст будет зависеть от размера, яркости, цвета изображения, но глаз человека не способен различить периодичность при уровне контраста ниже трёх-пяти процентов для близко расположенных полос, поэтому предел разрешающей способности в 0,2 микрона может и не быть достигнут.

При наблюдении образца в оптический микроскоп, результирующее изображение несколько ухудшается из-за aberrаций и дифракции, в дополнение к погрешностям сборки и юстировки оптики. Яркие участки образца в таком изображении будут менее яркими, чем в реальном образце, а тёмные или затенённые области будут несколько светлее. Контраст образца или модуляцию можно определить следующим образом:

$$\text{Модуляция (M)} = \frac{I(\max) - I(\min)}{I(\max) + I(\min)}$$

где $I(\max)$ – максимальная интенсивность периодичной структуры, а $I(\min)$ – её минимальная интенсивность. По определению, модуляционная передаточная функция полагается равной единице при нулевой пространственной частоте. Модуляция в изображении обычно меньше, чем в образце, также в изображении существует небольшое фазовое смещение по отношению к образцу. Сравнивая образцы с разными пространственными частотами, можно определить изменение модуляции и фазовое смещение как функцию пространственной частоты. По определению, модуляционная передаточная функция (МПФ) описывается следующим уравнением:

$$\text{МПФ} = \frac{\text{Модуляция изображения}}{\text{Модуляция объекта}}$$

Эта величина, как уже говорилось выше, выражает изменение контраста, наблюдаемого в изображении «синусоидального» объекта, как функции пространственной частоты. Эта синусоида, к тому же, смещена по фазе (или положению), и это смещение зависит от пространственной частоты как в горизонтальном, так и в вертикальном направлении. Наглядным примером является растровая развёртка в видео микроскопии, в процессе

$$\phi = \cos^{-1}(\lambda \nu / 2NA)$$

В этих уравнениях ν – угловая частота на миллиметр, λ – длина волны освещения, а **NA** – числовая апертура. На низких пространственных частотах контраст изображения максимален, но падает до нуля при превышении пространственной частотой определённого значения (на рисунке 2 он соответствует падению амплитуды изображения). **Частота отсечки $f(c)$** – пространственная частота, на которой контраст становится равным нулю, определяется уравнением:

$$f(c) = 2NA/\lambda$$

Интересно заметить, что это уравнение выражает (в терминах пространственной частоты) тот факт, что разрешающая способность увеличивается с ростом числовой апертуры и уменьшением длины волны.

Модуляционная передаточная функция также связана с функцией рассеяния точки, которая является изображением точечного источника света (обычно называемого диском Эри), проецируемого объективом микроскопа в плоскость промежуточного изображения. Распределение интенсивности света, наблюдаемого в плоскости изображения, а значит и функция рассеяния точки, зависят от оптических aberrаций и значения числовой апертуры. Необходимо заметить, что сумма производимых образцом функций рассеяния точки в дифракционно-ограниченном микроскопе составляет дифракционную картину в плоскости изображения.

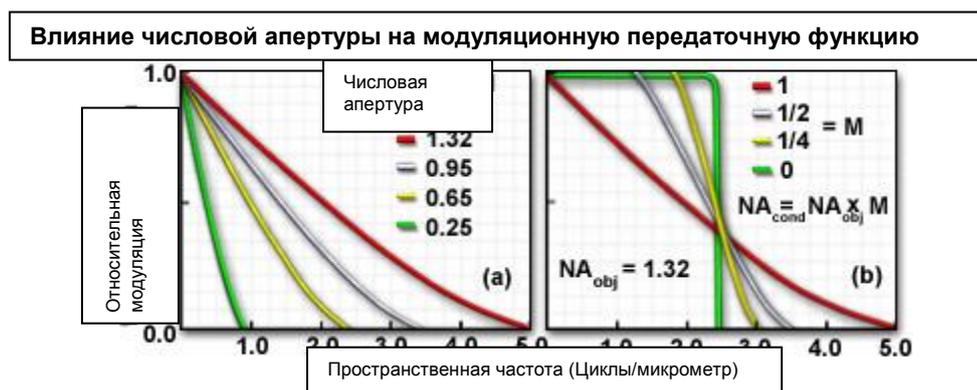


Рисунок 4

Максимальные пространственные частоты, которые могут воспроизводиться объективом микроскопа, пропорциональны числовой апертуре объектива и определяются распределением функции рассеяния точки. Функция рассеяния точки объективов с низкими числовыми апертурами имеет более широкое распределение интенсивности в плоскости изображения по сравнению с мощными объективами. На пределе разрешающей способности, соседние диски Эри или функции рассеяния точки начинают перекрываться, затрудняя различение отдельных пиков. Более узкие пики интенсивности (при более высоких числовых апертурах) могут быть сдвинуты гораздо ближе и всё ещё быть различимыми в микроскоп. Это означает соответствие между узкой функцией рассеяния точки и высокой пространственной частотой. На самом деле, оптическая передаточная функция – мера отклика оптической системы на пространственную частоту – является преобразованием Фурье функции рассеяния точки.

Соотношение между модуляционной передаточной функцией и функцией рассеяния точки в дифракционно-ограниченном оптическом микроскопе проиллюстрировано на рисунке 3. Как уже говорилось выше, частота отсечки **$f(c)$** модуляционной передаточной функции прямо пропорциональна числовой апертуре объектива и обратно пропорциональна длине волны освещения. Радиус первого тёмного кольца вокруг центрального пика интенсивности функции рассеяния точки (или диска Эри) определяется уравнением:

$$r = 0.61\lambda/NA$$

которое чаще называется критерием Релея или пределом разрешающей способности микроскопа. Поскольку r обратно пропорционален числовой апертуре и прямо пропорционален длине волны освещения, r и $f(c)$ также обратно пропорциональны, что является проявлением фундаментального свойства преобразования Фурье – ширина функции обратно пропорциональна ширине её преобразования.

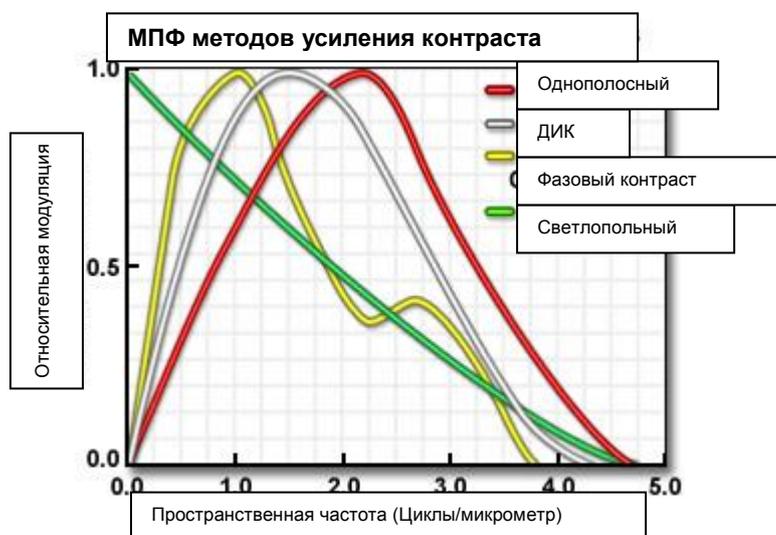


Рисунок 5

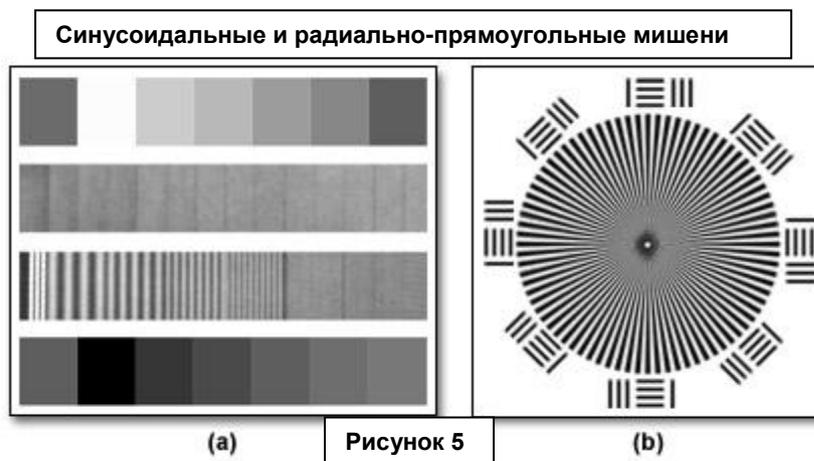
Каждый объектив имеет свою функцию передачи модуляции (или оптическую передаточную функцию), которая зависит от числовой апертуры, конструкции объектива, длины волны освещения и режима контрастирования. Если числовая апертура конденсора равна или больше числовой апертуры объектива, частота (пространственная) отсечки падает с падением числовой апертуры объектива (рисунок 4(a)). При постоянной числовой апертуре объектива, меньшим значениям числовой апертуры конденсора соответствуют меньшие значения частоты отсечки (рисунок 4(b)).

Применение методов усиления контраста, таких как фазовый контраст или дифференциальный интерференционный контраст (ДИК), приводит к получению уникальных модуляционных передаточных функций, совершенно отличных от тех кривых, которые наблюдаются при светлопольном освещении, когда используется вся числовая апертура (рисунок 5). Например, в результате узкого пучка освещения, создаваемого фазовыми кольцами в фазово-контрастной микроскопии, кривая модуляционной передаточной функции осциллирует выше и ниже светлопольной кривой, а кривая, генерируемая ДИК объективами, меняется в зависимости от угла между направлением, в котором наблюдается периодичность образца, и направлением преломления в призмах Волластона и Номарского. Также на рисунке 5 приведена кривая, производимая микроскопом, усиливающим одну боковую полосу (разработанного доктором Гордоном У. Эллисом), который даёт высококонтрастные изображения на больших пространственных частотах.

На практике, производительность объектива микроскопа или других линзовых систем часто определяется отслеживанием равномерно распределённого массива световых лучей, испущенных точечным источником, при их прохождении через виньетированный входной зрачок объектива. После выходного зрачка лучи распределяются по плоскости изображения, а их пересечения вычерчивают в ней **точечную диаграмму** источников света (световых точек). В большинстве случаев для построения точечной диаграммы используется несколько сотен лучей, при определённом расположении которых в диаграмме учитываются и оптические aberrации. Сформированная, в результате, точечная диаграмма является функцией рассеяния точки и преобразуется в график зависимости модуляционной передаточной функции от пространственной частоты, через преобразование Фурье.

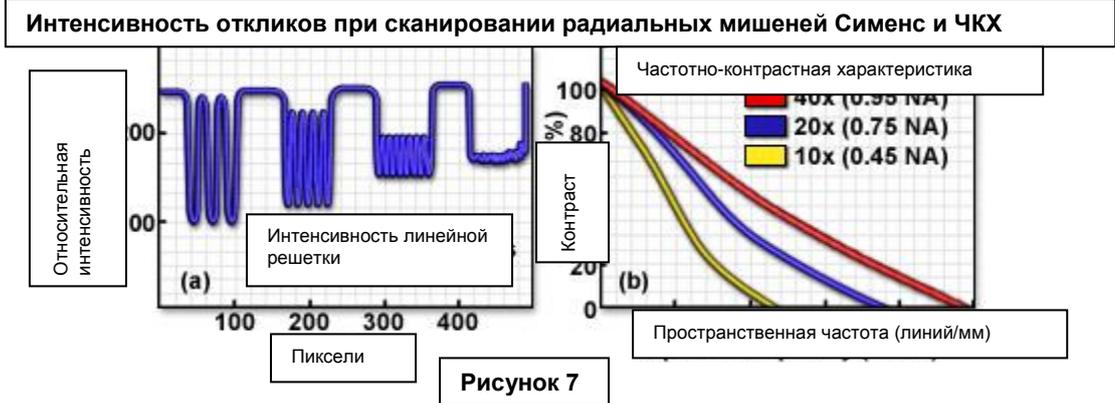
Прямые измерения модуляционной передаточной функции проводятся с помощью специальных тестовых шаблонов (мишеней), представляющих собой высококонтрастные периодические линейные дифракционные решётки с периодами от одного или нескольких

миллиметров до 0,1 микрометра, как показано на рисунке 6. Эти мишени позволяют оценить дифракционную картину (сфокусированную и расфокусированную) объектива микроскопа в различных режимах усиления контраста. Измерение распределения света в плоскости изображения производится с помощью матриц фотоприёмника, которые суммируют функции рассеяния точки, а затем к массиву данных применяется алгоритм преобразования Фурье и определяется модуляционная передаточная функция.



Мишень, представленная на рисунке 6(a) специально разработана для тестирования горизонтальной модуляционной передаточной функции макросистем формирования изображения, таких как телескоп, бинокль, видео-система, камера или цифровое видео-записывающее устройство. Мишень составлена из синусоидальных сигналов с пространственной частотой в интервале от 0,2 до 80 линий на миллиметр, оптической плотностью уровней серого в интервале от 0,2 до 1,2 и 80-процентной модуляцией синусоидальных волн. Мишени этого типа определяют качество изображения в широком диапазоне частот, кроме того, на них нанесены шаблоны для определения уровня контраста изображений с синусоидальными сигналами. В видео-микроскопии, микроскопические тестовые мишени с синусоидальными сигналами пока не распространены, поэтому установленный на микроскопе фотоприёмник определяет частотно-контрастную характеристику, а не модуляционную передаточную функцию.

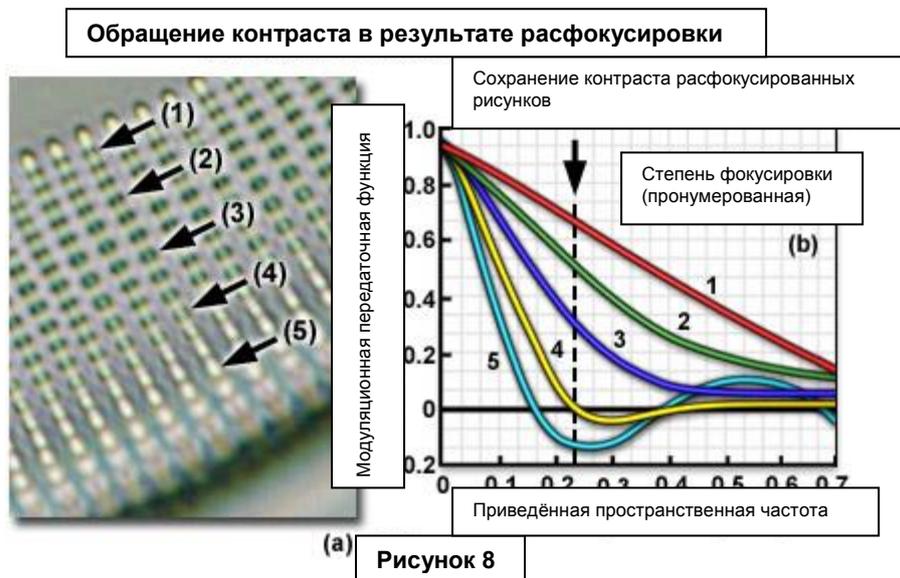
В системах с круглыми апертурами (как, например, оптический микроскоп) модуляционная передаточная функция и/или частотно-контрастная характеристика вычисляется или измеряется с помощью радиально-прямоугольных мишен, подобных изображённой на рисунке 6(b). На мишени этого типа нанесены взаимно перпендикулярные радиальные и касательные линии, которые успешно используются для определения погрешности фокусировки и таких aberrаций, как астигматизм. Модифицированные радиальные мишени с нанесёнными на них спаренными линиями и точками позволяют определять дифракционную картину объективов как в фокусе, так и вне фокуса, и являются эффективными для измерений в режимах светлопольного и эпифлуоресцентного освещения и контрастирования в отражённом свете. Расстояния между радиальными и касательными линиями лежат в интервале от 0,1 до десятков микрометров, а пространственная частота при этом меняется от 0,2 до 25 линий на миллиметр. Радиальные мишени идеальны для измерений, проводимых с высоким разрешением с помощью фотоплёнки или аналоговых светочувствительных элементов, а прямоугольные ПЗС-приёмники более эффективны в сочетании с мишенями, геометрически повторяющими решётку из рядов и столбцов, образующих светочувствительную матрицу этих устройств.



Типичный результат сканирования радиальной мишени, произведённого апохроматическим объективом с высокой числовой апертурой в режиме проходящего света, представлен на рисунке 7(a). Значения интенсивности были усреднены вдоль линий сканируемой дифракционной решётки. Результаты измерений, полученные объективами с разными числовыми апертурами, представлены на рисунке 7(b) в виде зависимостей коэффициента контрастности от пространственной частоты. Передача контраста близка к 100 процентам на очень низких пространственных частотах (больших пространственных периодах) и постепенно убывает с ростом пространственной частоты. При достижении пространственной частоты предела Аббе (длина волны наблюдения, делённая на удвоенную числовую апертуру объектива) контраст обычно уже настолько низок, что отдельные линии дифракционной решётки становятся неразличимыми.

В некоторых случаях модуляционная передаточная функция оптического микроскопа может быть меньше нуля. Это происходит, когда функционирование системы нарушено и её производительность понижена расфокусированием, абберациями и/или производственным браком. Часто, модуляционная передаточная функция колеблется выше и ниже нуля в процессе настройки положения предметного столика для приведения в фокус образца с высокой пространственной частотой. Когда передаточная функция опускается ниже нуля, в изображении происходит фазовое обращение, и его тёмные детали становятся светлыми и наоборот.

Это явление проиллюстрировано на рисунке 8(a) на примере бугорков, периодически расположенных на кривой поверхности панциря диатомы. При изменении фокуса, контраст бугорков меняется на противоположный, вызывая волновой эффект в относительной модуляции (сравните бугорки (1)-(5) на рисунке 8(a)). Чем сильнее расфокусировка, тем больше колебания модуляционной передаточной функции, при которых обращение контраста охватывает более крупные детали изображения. Если образец не в фокусе, контраст его деталей с большей пространственной частотой падает быстрее. Часто бывает полезным измерить контраст на определённой пространственной частоте, а затем проследить его изменение как функцию расстояния по обе стороны от плоскости изображения. Такой метод иногда называют определением передаточной функции **на глубине резкости**, который является мерой глубины фокуса объектива.



Связь пространственной частоты и модуляционной передаточной функции для диатомы представлена на рисунке 8 (b). Каждая кривая отражает зависимость МПФ от пространственной частоты (количества повторяющихся деталей на единицу длины) при определённой глубине фокуса. Из графиков очевидно падение относительной модуляции с усилением расфокусировки (на фиксированной пространственной частоте), а также обращение контраста на 4-м и 5-м уровне расфокусировки, когда МПФ принимает отрицательные значения. Кривая номер 1 представляет приведённый в фокус панцирь диатомы, а кривые 2-5 соответствуют последовательному усилению расфокусировки. Пунктирной линией отмечена приблизительная пространственная частота бугорков, изображённых на рисунке 8(a). Контраст минимален в месте пересечения пунктирной линии с кривой 4 и меняется на противоположный, когда кривая 5 опускается ниже нуля.

Любые оптические системы и вспомогательные компоненты, включая микроскопы, цифровые и аналоговые видео-системы, платы регистрации изображения, мониторы компьютеров, эмульсия фотоплёнок и глаз человека, имеют характерную модуляционную передаточную функцию. В случае формирующих изображение аналоговых и цифровых электронных фотоприёмников, обратное соотношение между пространственной разрешающей способностью и пространственной частотой, о котором говорилось выше, остаётся справедливым. Тем не менее, при этом функция рассеяния точки заменяется временной характеристикой очень короткого электрического импульса, а оптическая передаточная функция – откликом системы формирования изображения на синусоидальный электрический сигнал (его амплитуду и фазу). Электронные системы не имеют симметрии оптических систем, благодаря чему возникают нелинейные фазовые эффекты. Но, несмотря на это различие, в основе функционирования электронных и оптических систем лежат одни и те же базовые понятия, что позволяет сочетать оптические микроскопы с цифровыми (или аналоговыми) устройствами визуализации и применять единый подход для анализа их работы.

Модуляционная передаточная функция оптической системы, состоящей из последовательно соединённых компонентов (микроскопа, цифровой видеокамеры, платы регистрации изображения, монитора компьютера и т.д.), является произведением МПФ каждого компонента. На основе тщательного анализа модуляционных передаточных функций комбинированных систем могут быть сделаны расчетные оценки производительности системы в целом. Подобным образом, а именно сложением фазовых передаточных функций отдельных компонентов, может быть получена фазово-частотная характеристика системы (необходимо заметить, что фазовые передаточные функции **складываются**, тогда как модуляционные передаточные функции **умножаются**). Вместе, модуляционная передаточная функция и фазовая передаточная функция определяют оптическую передаточную функцию системы. Важно отметить, что частотно-контрастная характеристика не обладает теми же математическими свойствами, что и модуляционная передаточная функция, и не может быть получена простым умножением ЧКХ отдельных компонентов.

В системе формирования изображения, состоящей из серии последовательных компонентов, в каждом из них контраст теряется на определённой пространственной частоте, обычно, из области более высоких значений. Это может быть использовано для отсека или усиления на определённой частоте модуляционной передаточной функции в каждом фотоприёмнике или на каждом этапе обработки изображения. Шумы, возникающие при передаче изображения от компонента компоненту или при обработке изображения, также являются функцией пространственной частоты. Поэтому тонкая настройка передаточных функций для оптимального контраста и производительности системы зависит не только от типа информации, которую необходимо извлечь из изображения, но и от зависимости уровня шума в изображении от пространственной частоты. К тому же, поскольку модуляционная передаточная функция фотоприёмника зависит и от длины волны, условия освещения также должны быть тщательно определены.

Модуляционная передаточная функция до сих пор не определена для нескольких методов усиления контраста часто применяемых в оптической микроскопии (например, при наблюдении в свете поляризации), которые ещё ожидают появления более совершенных теорий формирования изображения и соответствующих тестовых шаблонов (или образцов) для определения, экспериментальным путём, значений МПФ.