

# Pokroky matematiky, fyziky a astronomie

---

Jaromír Plášek

Nové metody optické mikroskopie

*Pokroky matematiky, fyziky a astronomie*, Vol. 41 (1996), No. 1, 1--24

Persistent URL: <http://dml.cz/dmlcz/139719>

## Terms of use:

© Jednota českých matematiků a fyziků, 1996

Institute of Mathematics of the Academy of Sciences of the Czech Republic provides access to digitized documents strictly for personal use. Each copy of any part of this document must contain these *Terms of use*.



This paper has been digitized, optimized for electronic delivery and stamped with digital signature within the project *DML-CZ: The Czech Digital Mathematics Library* <http://project.dml.cz>

# Nové metody optické mikroskopie

Jaromír Plášek, Praha

## Úvod

Optická mikroskopie je rozsáhlý obor, který zahrnuje jak teorii a konstrukci samotných přístrojů, tak aplikace mikroskopických metod, sahající od biologie a medicíny přes chemii, mineralogii, metalurgii a jiné technologické aplikace až ke kriminalistice a restaurování uměleckých děl. Její historie začíná někdy kolem roku 1590, kdy byl pravděpodobně vynalezen mikroskop složený z více čoček. Je možné, že jeho vynálezcem byl Galileo Galilei. Doloženo je však pouze to, že Galileo Galilei byl prvním vědcem, který takový mikroskop používal [1]. Další mezníky ve vývoji optické mikroskopie jsou shrnuty v Tab. 1.

V průběhu posledních dvaceti let došlo k obrovskému rozmachu optické mikroskopie, a to jak v důsledku vysoké kvality nových objektivů navrhovaných pomocí počítačů, tak díky spojení kvalitních mikroskopů s vyspělou videotechnikou a následným zpracováním obrazů pomocí výkonných mikropočítačů či s laserovými zdroji světla. Technický pokrok změnil optickou mikroskopii natolik, že v současnosti je patrná jistá renesance jejího užití v buněčné biologii, kde v poválečném období jednoznačně dominovala mikroskopie elektronová.

V následujícím článku jsou nejprve stručně připomenuty základy teorie rozlišovací schopnosti optického mikroskopu a kontrastu zobrazení, doplněné o výklad nejdůležitějších metod pozorování fázových objektů. Třetí, závěrečná část je věnována principiálně novým metodám, jako jsou videomikroskopie a konfokální mikroskopie. Kvůli přijatelnému rozsahu byly z přehledu vypuštěny běžné metody interferenční a polarizační mikroskopie, neboť lze předpokládat, že mezi fyzikální veřejností by měly být relativně dobře známy.

## Stručné opakování základních pojmů

Obyčejný optický mikroskop se skládá z objektivu, který vytváří převrácený obraz objektu, a okuláru, kterým tento obraz pozorujeme jako lupou. Další důležitou částí mikroskopu je zdroj světla s kondenzorem. Na obr. 1 jsou schematicky znázorněny základní typy konstrukce optických mikroskopů, rozříděné podle způsobu uspořádání osvětlovací soustavy, viz např. [2] a [3].

---

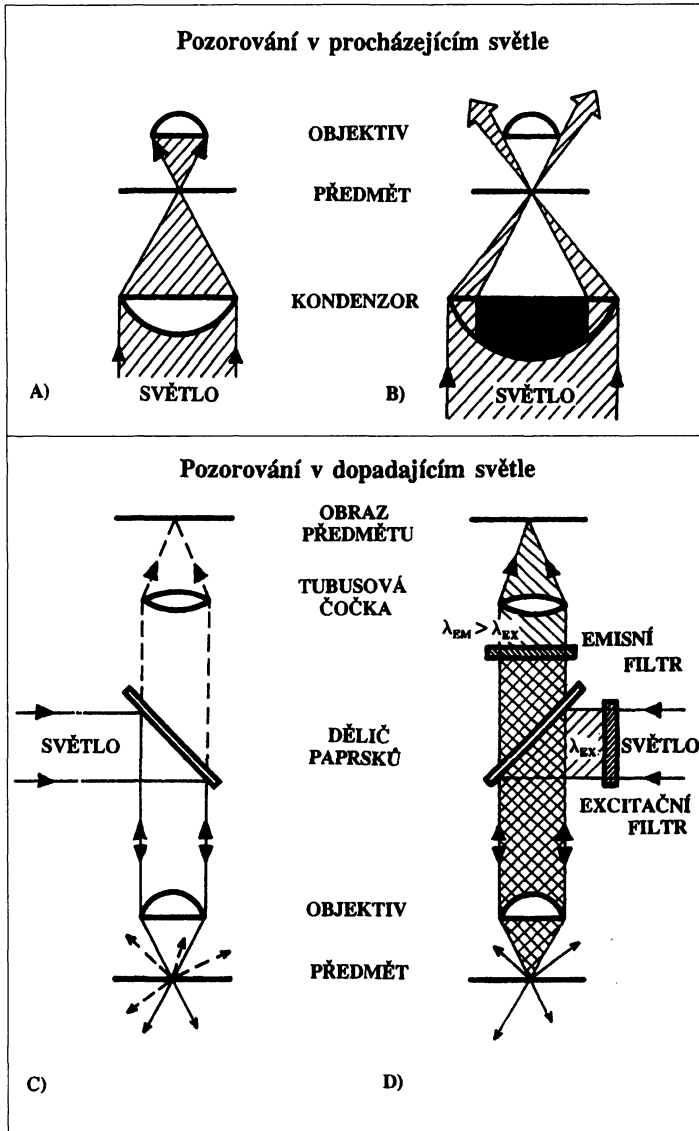
RNDr. JAROMÍR PLÁŠEK, CSc. (1950), samostatný vědecký pracovník Fyzikálního ústavu Karlovy univerzity, Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2.

Tab. 1. Významná data z historie optické mikroskopie, [1, 2].

1590 až 1610	Vyrobeny první přístroje, které lze považovat za použitelný mikroskop (Hans a Zaccharis Janssenové z Middleburgu v Holandsku).
1665	Publikován první traktát o mikroskopickém pozorování rostlinných tkání a struktury minerálů (R. Hook, Micrographia).
přelom 17. a 18. století	A. van Leewenhoek z Leydenu brousil čočky vynikající kvality. Vyrobil asi 505 mikroskopů, které zvětšovaly až 270×.
18. století	Století skepse, kdy mikroskop byl považován v podstatě za hračku, pro seriózní vědu neužitečnou.
20. léta 19. století	Amici vyrábí achromatický objektiv o velké numerické aper-tuře a objektiv imerzní.
1829	Lister zdokonalil achromatický objektiv (konečně dosaženo většího zvětšení a lepší kvality než pomocí Leeuwenhoekových mikroskopů).
1847	Zahájení výroby mikroskopů firmou Carl Zeiss v Jeně.
1886	Abbe navrhuje Zeissovy apochromatické objektivy (tyto spolu s Köhlerovým osvětlovacím principem umožnily dosáhnout mezní rozlišovací schopnosti optických mikroskopů, tj. zhruba 1/2).
poč. 20. století	Věří se, že vývoj optických mikroskopů byl již završen.
1911	Fluorescenční mikroskop s UV excitací (C. Reichert).
1932	F. Zernick objevil fázový kontrast (Nobelova cena roku 1953).
1955	Diferenciální interferenční kontrast (Nomarski).
1960–70	Videomikroskopie, použití vidikonů, zvyšování obrazového kontrastu cestou analogového zpracování videosignálu.
1968	Rastrovací tandemový konfokální mikroskop (TSCM).
1975	Modulační kontrast (Hoffman).
1978	Laserový konfokální rastrovací mikroskop.

### *Rozlišovací schopnost mikroskopu*

Žádný objektiv nezobrazí bodový objekt opět jako bod. I při dokonalé korekci všech možných vad zobrazení jsou obrazem bodu Airyho kroužky (difrakční obrazec vznikající ohybem světla na výstupní pupile objektivu). Při zobrazení dvou blízkých bodů se mohou příslušné Airyho kroužky překrývat, až se při jisté minimální vzdálenosti stanou prakticky nerozlišitelnými. Tato mez se běžně odhaduje dle Rayleighova kritéria (1879). Dva sousední Airyho kroužky se považují za rozlišitelné, pokud se vzdálenost jejich středů rovná průměru prvního difrakčního minima. Přísně vzato, použití



Obr. 1. Základní typy uspořádání osvětlovacích soustav optických mikroskopů: A) pozorování ve světlém poli, B) pozorování v temném poli, C) zobrazení odraženým světlem, D) fluorescenční mikroskop.

Rayleighova kritéria je na místě pouze při vizuálním hodnocení obrazů. V podstatě totiž vychází ze skutečnosti, že lidský zrak zaznamená pozvolný předěl mezi dvěma difrakčními kroužky teprve tehdy, poklesne-li intenzita mezi nimi alespoň o 20 % oproti přilehlým maximům, viz např. [4].

Spojením Rayleighova kritéria s teorií difrakce na kruhovém otvoru dospějeme ke známému odhadu minimální vzdálenosti dvou rozlišitelných bodů:

$$Y_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \vartheta}, \quad (1)$$

kde  $\lambda$  je vlnová délka světla ve vakuu,  $n$  index lomu prostředí před objektivem a  $\vartheta$  je polovina vrcholového úhlu kužele paprsků, které mohou vstoupit do objektivu. Veličina  $n \sin \vartheta$  je tzv. numerická apertura objektivu,  $NA$ . Uvedený odhad platí pro zobrazení nekoherentním zářením (případ fluorescenční mikroskopie). Při zobrazení pomocí koherentního světla bude příslušná minimální vzdálenost poněkud větší:

$$Y_{\min} = 0,77 \frac{\lambda}{n \sin \vartheta}, \quad (2)$$

což je důsledek toho, že při koherentním osvětlení musíme počítat s interferencí světla v překrývajících se Airyho kroužcích. Numerická apertura nejkvalitnějších imerzních objektivů bývá  $NA \sim 1,3-1,4$  (imerzní objektivy se vyznačují tím, že v prostoru mezi čelní čočkou a vzorkem se nachází imerzní kapalina o indexu lomu blízkém indexu lomu skla). Pro nejkratší vlnové délky viditelného záření,  $\lambda \sim 400 \text{ nm}$ , se pak rozlišovací schopnost takových objektivů blíží hodnotě kolem  $0,17 \mu\text{m}$ . Rozlišovací schopnost reálných objektivů závisí ovšem také na tom, jak dokonale se při jejich výrobě podařilo korigovat různé vady zobrazení.

V reálném mikroskopu je vzorek osvětlen částečně koherentním zářením, jehož stupeň koherence závisí na numerické apertuře kondenzoru,  $NA_K$ . Nejlepší rozlišovací schopnosti mikroskopu bychom měli dosáhnout, když tato apertura je rovna zhruba 1,5 násobku numerické apertury objektivu,  $NA_{OB}$ . Za uvedených podmínek bude rozlišovací schopnost mikroskopu dokonce mírně lepší než při nekoherentním osvětlení [4], kap. 10.5.

Rozlišovací schopnosti objektivu je určeno i maximální užitečné zvětšení mikroskopu. Při vizuálním pozorování je rovno zhruba  $500$  až  $1000 \times NA_{OB}$ . Za těchto podmínek je totiž minimální vzdálenost dvou rozlišitelných bodů, které vidíme v okuláru, srovnatelná s rozlišovací schopností lidského oka, např. [5]. Pokud bychom použitím silně zvětšujícího okuláru překročili tuto mez, získali bychom již jen tzv. prázdné zvětšení — to jest pouze rozměrnější obraz objektu bez nových detailů.

### Kontrast zobrazení

Kvalita zobrazení mikroskopických objektů nezávisí pouze na dostatečném zvětšení a rozlišovací schopnosti mikroskopu. Pro pohodlné pozorování detailů také potřebujeme, aby obraz byl dostatečně kontrastní. Kontrast,  $K$ , se definuje pomocí rozdílu mezi jasem pozadí,  $I_P$ , a jasem sledovaného objektu,  $I$ , jako poměr:

$$K = \frac{|I - I_P|}{I_P}. \quad (3)$$

Zbarvené objekty absorbují světlo a rozdíly v absorpaci různých jejich částí se stávají zdrojem kontrastu. Tyto objekty se nazývají *objekty amplitudové*. Mnohé mikroskopické objekty však zbarvené nejsou. Neabsorbující objekty lze také pozorovat, pokud ovšem se od okolního prostředí liší alespoň indexem lomu, který spolu s jejich tloušťkou ovlivňuje fázi procházejícího světelného vlnění (tzv. *objekty fázové*).

Kontrast některých fázových objektů biologického původu lze velmi efektivně zvýšit pomocí cytologických a histologických barviv, která se vyznačují vysokou specificitou vůči určitým buněčným strukturám a typům buněk. Barvení tohoto druhu se však zpravidla neslučuje se zkoumáním procesů probíhajících v živých buňkách. Pro tyto účely bývají zpravidla vhodnější optické metody, které elegantním způsobem převádějí rozdíly v indexech lomu na jasový kontrast obrazu (fázový kontrast, Nomarského diferenciální interferenční kontrast a Hoffmanův modulační kontrast). Zmíněné metody jsou z fyzikálního hlediska natolik zajímavé, že je jim věnována samostatná kapitola.

## Abbeova teorie mikroskopu

Věnujme se nyní podrobněji fyzikální podstatě vzniku obrazu v optickém mikroskopu. Vysvětlení tohoto jevu v zásadě podal a experimentálně doložil již Ernst Abbe (1873). Základní myšlenka jeho teorie spočívá v představě, že každý bod osvětleného objektu se stává zdrojem sekundárních sférických vln (Huygensův princip). Pro jednoduchost se dále omezíme pouze na dvojrozměrné objekty. Rovina vzorku, do které je mikroskop právě zaostřen, nechť je takovým dvojrozměrným objektem. Pokud nepracujeme s polarizovaným světlem, pak veškerou informaci o zobrazovaném objektu bude obsahovat transmisní funkce  $F(x, y)$ , jejíž proměnné  $x$  a  $y$  značí souřadnice v předmětové rovině, která je kolmá na optickou osu mikroskopu. Transmisní funkce v podstatě popisuje změny amplitudy a fáze světelných vln procházejících vzorkem. Určuje tedy i amplitudu a fázi jednotlivých sekundárních sférických vln.

Záření prošlé vzorkem vstupuje v podobě sekundárních sférických vln do objektivu a dostává se do jednoho z nejkritičtějších míst mikroskopu — do zadní ohniskové roviny objektivu  $F'$ . Zde se v jednotlivých jejích bodech setkávají paprsky, které opouštějí předmětovou rovinu šířice se stejným směrem. Rozložení amplitud kmitů difraktovaného záření v zadní ohniskové rovině objektivu proto popisuje Fraunhoferova formule, která v podstatě představuje výsledek interference sekundárních sférických vln:

$$U(\xi, \eta) = C_1 \int_{(A)} F(x, y) \exp ik \left( \frac{\xi x}{f} + \frac{\eta y}{f} \right) dx dy, \quad (4)$$

kde  $\xi$  a  $\eta$  značí souřadnice bodů v rovině  $F'$ ,  $C_1$  je konstanta,  $k$  je velikost vlnového vektoru,  $f$  je příslušná ohnisková vzdálenost a integrace probíhá přes celou plochu objektu  $(A)$ . Je zřejmé, že průchod záření zadní ohniskovou rovinou objektivu lze opět popsat v pojmech Huygensova principu. V souladu s ním se každý bod  $\{\eta, \xi\}$  v zadní ohniskové rovině taktéž stává zdrojem sekundárních sférických vln. Jejich amplitudy jsou však tentokrát určeny amplitudovou funkcí  $U(\xi, \eta)$ . Tyto vlny pak přicházejí do obrazové roviny a jejich interferencí nakonec vzniká zvětšený obraz objektu.

Vlnový popis šíření zobrazujícího světla vede k novému pohledu na rozlišovací schopnost mikroskopu v rámci konceptu fourierovské optiky [4]. Z formálního hlediska je totiž amplitudová funkce  $U(\xi, \eta)$  Fourierovou transformací transmisní funkce  $F(x, y)$ . Stačí, abychom hodnoty funkce  $F(x, y)$  mimo oblast integrace  $A$  položili rovny nule a integraci rozšířili na intervaly  $(-\infty, +\infty)$ . Toto lze bez újmy na obecnosti učinit. Podobně lze přejít od amplitudové distribuce v zadní ohniskové rovině objektivu, tj. od funkce  $U(\xi, \eta)$ , k amplitudové distribuci v obrazové rovině. Tato nechť je  $V(x', y')$ , kde  $x'$  a  $y'$  značí souřadnice v obrazové rovině, které jsou se souřadnicemi bodů transmisní funkce objektu  $F(x, y)$  svázány jednoduchými vztahy  $x' = xZ_{OB}$  a  $y' = yZ_{OB}$  ( $Z_{OB}$  je zvětšení objektivu). Pokud by vrcholový úhel světelného kužele vstupujícího do objektivu nebyl omezen konečnými rozměry čoček (jinými slovy, pokud by průchod záření rovinou Fourierova obrazu  $U(\xi, \eta)$  nebyl omezen na aperturu konečných rozměrů), byla by funkce  $V(x', y')$  Fourierovým obrazem první transformace  $U(\xi, \eta)$ . Pak by ovšem amplitudová distribuce v obrazové rovině byla identickým obrazem transmisní funkce objektu:

$$V(x', y') = \text{const } F(x'Z_{OB}^{-1}, y'Z_{OB}^{-1}), \quad (5a)$$

pro kterou by platilo:

$$V(x', y') = \text{const } F(x, y). \quad (5b)$$

Apertura objektivu je však konečná. To, co vidíme v obrazové rovině mikroskopu, není proto věrným obrazem transmisní funkce  $F(x, y)$ , nýbrž pouhou Fourierovou transformací aperturou nezastíněné části zadní ohniskové roviny objektivu. Čím větší bude apertura, tím více se pozorovaný obraz bude blížit skutečnému zvětšenému obrazu transmisní funkce objektu. Vliv apertury na kvalitu mikroskopického zobrazení se podobá tomu, co se děje s proměnným analogovým signálem  $f(t)$  při průchodu frekvenčním filtrem. Z rovnice (4) je zřejmé, že parametry  $k\xi/f$  a  $k\eta/f$  hrají podobnou roli jako kruhová frekvence  $\omega$  ve Fourierově transformaci signálu měnícího se v čase:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \exp(-i\omega t) dt. \quad (6)$$

Výše uvedené parametry  $k\xi/f$  a  $k\eta/f$  lze proto považovat za prostorové frekvence  $\nu_\xi$  a  $\nu_\eta$ , sdružené se souřadnicemi  $\xi$  a  $\eta$ . Z tohoto hlediska je efekt konečné apertury objektivu zjevně ekvivalentní potlačení horní části spektra prostorových frekvencí. Z podobnosti s přenosem analogového signálu přes dolnofrekvenční propust lze odvodit, že konečná apertura objektivu způsobí odfiltrování obrazových detailů o rozměrech zhruba se rovnajících  $d \sim \lambda/NA$ , což je srovnatelné s odhady založenými na Rayleighově kritériu.

Obr. 2 (str. 7–10). Příklady zobrazení biologických objektů pomocí různých metod optické mikroskopie: a) lidská červená krvinka v normálním stavu (vlevo) a ve stadiu echinocytu (vpravo) — temné pole (úsečka značí 10 mm); b) až f) plíseň kroupidlák černý (*Aspergillus niger*) — b) světlé pole (úsečka značí 100  $\mu\text{m}$ ), c) pozitivní fázový kontrast, d) negativní fázový kontrast, e) Nomarského diferenciální interferenční kontrast, f) Hoffmanův modulační kontrast. Autorem všech snímků plísně *Aspergillus niger* je doc. J. Reischig (referenční laboratoř mikroskopů Olympus, katedra biologie lékařské fakulty UK v Plzni).



Obr. 2a

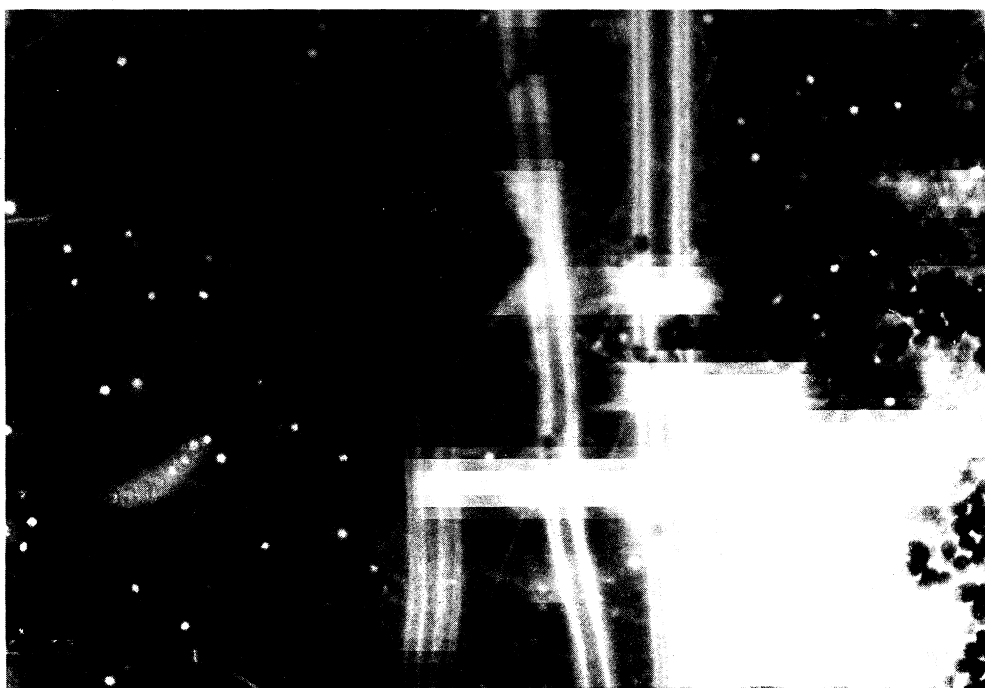


Obr. 2b

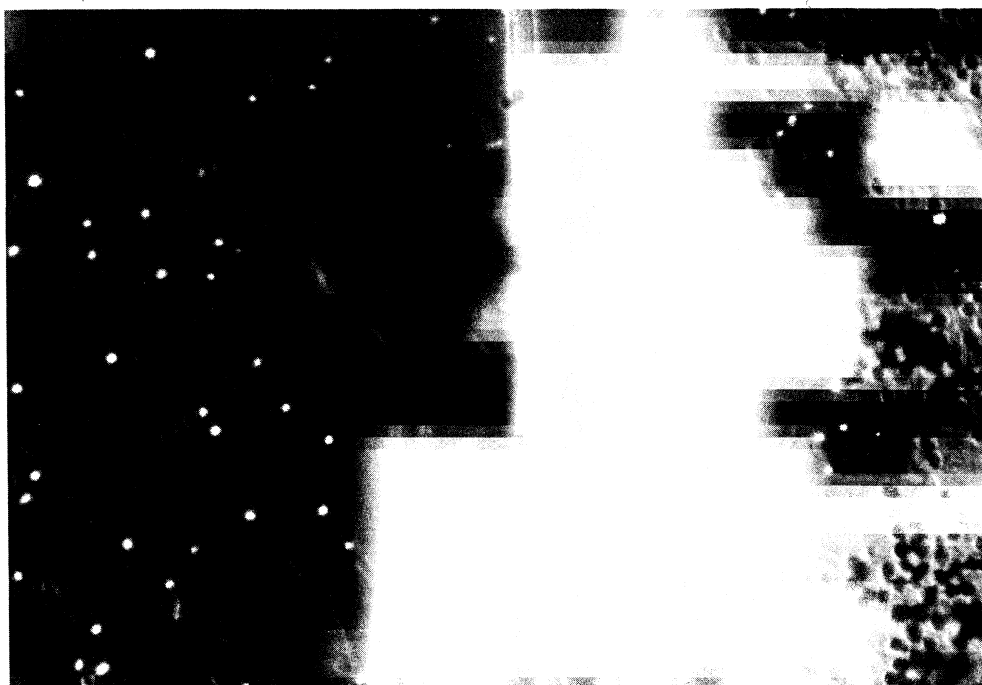




Obr. 2c



Obr. 2d



Obr. 2e



Obr. 2f

Na kvalitě a věrnosti obrazu se ale může negativně projevit i potlačení nízkých prostorových frekvencí, jak ukázal E. Abbe na příkladu zobrazení difrakční mřížky [4]. Zde je třeba upozornit, že tímto efektem je výrazně ovlivněn vzhled objektů při pozorování v temném poli. Primární (to jest nedifraktované) záření nevstupuje do objektivu, obr. 1. Pozorované objekty se proto jeví jako zářící na temném pozadí, obr. 2. Uvedenou úpravou osvětlovací soustavy mikroskopu jsou však v amplitudové funkci  $U(\xi, \eta)$  potlačeny nejnižší prostorové frekvence, včetně frekvence nulové. V důsledku toho obvykle bývají v temném poli nadměrně zdůrazněny drobné strukturní detaily nebo místa, kde se prudce mění tloušťka vzorku. Při pozorování v temném poli se vlastně jedná o záměrnou modifikaci amplitudové funkce  $U(\xi, \eta)$  v zadní ohniskové rovině objektivu. Tento princip je v podstatě základem všech metod pozorování fázových objektů, kterým je věnována další kapitola.

## Metody pozorování fázových objektů

### *Fázový kontrast*

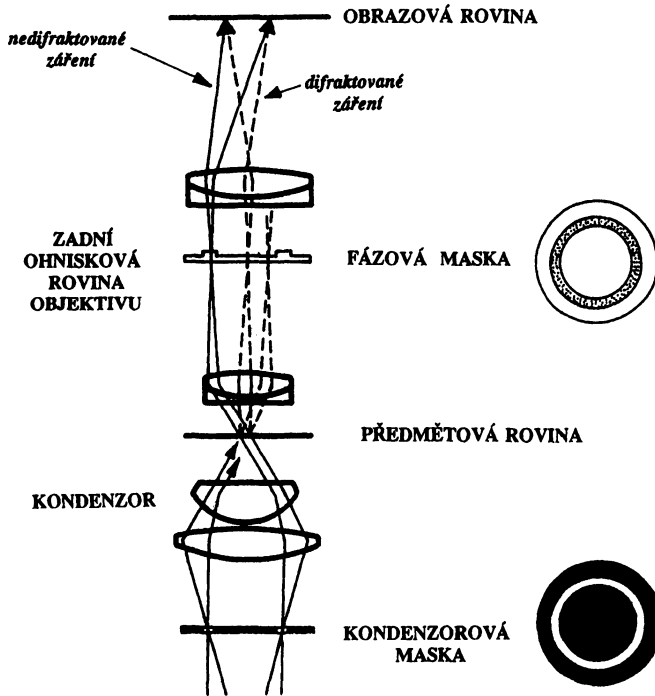
Fázový kontrast byl objeven v roce 1935 F. Zernikem, který za tento objev později získal Nobelovu cenu (1953). Již v roce 1942 nabídl F. Zernike svůj vynález Zeissovým závodům v Jeně. Byl však zdvořile odmítnut [6].

Při fázovém kontrastu je do přední ohniskové roviny kondenzoru vložena apertura ve tvaru úzkého mezikruží, která je kondenzorem a za ním následujícím objektivem zobrazena do zadní ohniskové roviny objektivu. Zde se nachází skleněná podložka s nanesenou fázovou maskou ve tvaru mezikruží, které se překrývá s obrazem kondenzorové apertury, obr. 3. Fázová maska (tenká transparentní vrstva o vhodném indexu lomu) mění fázi procházejícího záření o úhel  $\alpha$ , případně může procházející záření také částečně absorbovat. Její vliv na procházející vlnění popisujeme přenosovou funkcí  $A = ae^{-i\alpha}$ , kde  $a < 1$  značí propustnost fázové masky.

Kruhová apertura kondenzoru a konjugovaná fázová maska musí být natolik úzké, aby fázová maska působila pouze na nedifraktované záření zdroje a záření difraktované vzorkem (tj. nenulové prostorové frekvence Fourierova obrazu  $U(\xi, \eta)$ ) nechávala projít zadní ohniskovou rovinou objektivu beze změny fáze. Vnesením definovaného fázového rozdílu mezi různé složky Fourierova obrazu objektu se pozmění podmínky pro jejich interferenci, a tím samozřejmě i výsledné rozložení intenzity světla v obrazové rovině, tj.  $I(x', y') = |V(x', y')|^2$ . Podrobné odvození vztahu mezi  $I(x', y')$  a  $F(x, y)$  lze nalézt v monografii [4]. Zde si pouze shrneme jeho hlavní důsledky. Transmisní funkce  $F(x, y)$  ideálního fázového objektu nechť ovlivňuje pouze změnu fáze procházejícího záření,  $\Phi(x, y)$ :

$$F(x, y) = e^{i\Phi(x, y)} \approx 1 + i\Phi(x, y). \quad (7)$$

Rozvoj funkce  $e^{i\Phi(x, y)}$  v řadu je přípustný z toho důvodu, že změna fáze světelného vlnění při jeho průchodu mikroskopickými vzorky je velmi malá. V tomto přiblížení je



Obr. 3. Schéma optické soustavy mikroskopu pro fázový kontrast.

rozložení intenzity světla v obrazové rovině dáno rovnicí:

$$I(x', y') = \text{const} |ae^{i\alpha} + i\Phi(x, y)|^2. \quad (8)$$

Fázová destička bývá zhotovena tak, že mění fázi buď o úhel  $\pi/2$  nebo  $-\pi/2$  (ve druhém případě je fázově zpožděno difraktované záření, které prochází mimo anulus). Dosadíme-li tyto hodnoty do rovnice (8), získáme jednoduchý vztah:

$$I(x', y') \approx \text{const} [a^2 \pm 2a\Phi(x, y)], \quad (9)$$

který říká, že při fázovém kontrastu se intenzita světla v obrazu objektu mění lineárně se změnou fáze světla procházejícího objektem. S fázovou maskou měnící fázi o  $-\pi/2$  se silnější části objektu (větší hodnoty  $\Phi$ ) jeví tmavší, tzv. *pozitivní fázový kontrast*. Při změně fáze o  $\pi/2$  je tomu naopak, tzv. *negativní fázový kontrast*. Při fázovém kontrastu se často používá kvazimonochromatického osvětlení (žlutozelené světlo). Pokud použijeme bílé světlo, bude obraz vzorku zbarvený, neboť jak  $\Phi$ , tak  $\alpha$  závisí na vlnové délce.

Z rovnic (3) a (9) snadno vyvodíme, že kontrast obrazu fázového objektu vůči pozadí je roven  $2\Phi(x, y)/a$ . Roste tudíž s klesající propustností fázové masky. Tohoto jevu

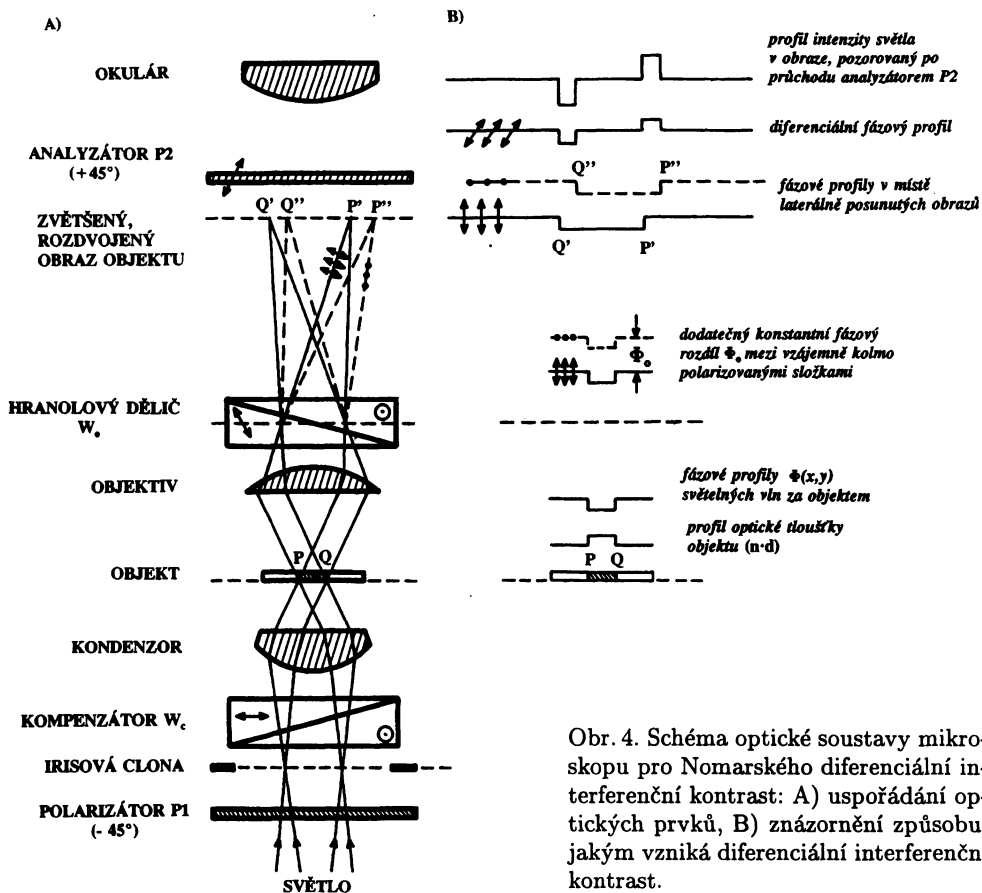
využívá tzv. *anoptrální mikroskop*, u něhož je fázová destička kombinovaná s absorpčním filtrem. Mezním případem je zcela nepropustná fázová destička,  $a = 0$ , s níž se anoptrální mikroskop vlastně změní v mikroskop pro pozorování v temném poli.

Obyčejný fázový kontrast umožňuje detekovat fázové rozdíly menší než  $10^{-2}$ . Rozdíly v relativních hodnotách indexu lomu buněk, cytoplazmatických struktur a vodního prostředí bývají řádově  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ . Nejmenší rozdíly v tloušťce různých buněčných struktur, které můžeme pomocí fázového kontrastu zaznamenat, se tedy blíží k hodnotám  $\leq 0,1 \mu\text{m}$ . Poněkud paradoxně je však pozorování silně lomivých objektů (například kvasinek) komplikovanější než pozorování objektů, které se indexem lomu blíží okolnímu vodnímu prostředí. Příčinou je existence tzv. halo, což je jasně zářící rozhraní mezi objektem a okolním prostředím, v němž se ztrácejí skutečné hranice objektů. Halo je způsobeno lomem světla na strukturách s velkým gradientem indexu lomu a s tím spojeným posuvem obrazu kondenzorové aperturní clony mimo fázovou masku objektivu. Druhým nedostatkem fázového kontrastu je to, že silně absorbující zbarvené objekty nemusí být ve fázovém kontrastu vůbec viditelné [7] (viz např. kvalitu zobrazení výtrusů při pozitivním fázovém kontrastu a ve světlém poli, kde se jeví jako černé tečky, obr. 2).

#### *Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)*

Od běžného mikroskopu se tato úprava liší pouze vloženým párem Wollastonových hranolů a párem zkřížených polarizátorů, obr. 4A. Světlo vstupující do kondenzoru je nejprve lineárně polarizováno polarizátorem P1. Pak prochází dvojlomným hranolovým děličem Wollastonova typu ( $W_c$ ), přičemž směr jeho polarizace svírá s optickými osami hranolového děliče úhel  $45^\circ$ . Druhý Wollastonův hranol ( $W_o$ ), shodně orientovaný s hranolem  $W_c$ , se nachází těsně za zadní ohniskovou rovinou objektivu. Následuje polarizátor P2, který je kvůli lepšímu kontrastu zobrazení zkřížen s P1, [8].

Pro pochopení principu DIC je podstatná funkce objektivového hranolu  $W_o$ . Tento hranol rozdělí původně lineárně polarizované zobrazující světlo na dvě vzájemně kolmo polarizované složky (odpovídající řádnému a mimořádnému paprsku), které z děliče vystupují různým směrem. V obrazové rovině objektivu v důsledku toho vzniknou dva identické obrazy předmětu, které jsou vůči sobě laterálně posunuty. Wollastonovy hranoly pro DIC se vyznačují tím, že úhlový rozdíl vystupujících paprsků je velmi malý. Činí přibližně  $10^{-4}$  radiánu. Laterální posun dvou obrazů, které vznikají v obrazové rovině mikroskopu, je za těchto podmínek pod hranicí rozlišovací schopnosti mikroskopu. V předmětové rovině je ekvivalentem tohoto laterálního posunu vzdálenost odpovídající asi  $0,1 \mu\text{m}$ . Analyzátor P2, orientovaný pod úhlem  $45^\circ$  vůči vzájemně kolmým polarizacím dvou laterálně posunutých obrazů, vytváří podmínky pro jejich interferenci. Tato interference pak vyjeví existenci případných fázových rozdílů mezi zářením procházejícím takovými sousedními místy vzorku, jejichž dílčí obrazy se navzájem překrývají, obr. 4B. Zdrojem fázových rozdílů mohou být jak změny tloušťky objektu, tak gradienty indexu lomu. Celkový fázový posun mezi interferujícími paprsky závisí samozřejmě také na příspěvku obou Wollastonových



Obr. 4. Schéma optické soustavy mikroskopu pro Nomarského diferenciální interferenční kontrast: A) uspořádání optických prvků, B) znázornění způsobu, jakým vzniká diferenciální interferenční kontrast.

hranolů. Efekt objektivového hranolu není stejný v celé jeho ploše. Ze zřejmých důvodů závisí na tom, kterou jeho částí světlo prochází. To však znamená, že hranolem  $W_o$  způsobené fázové rozdíly mezi řádnými a mimořádnými paprsky nejsou stejné pro světlo pocházející z různých míst plošného světelného zdroje. Úkolem kompenzačního hranolu  $W_c$  je učinit fázový rozdíl mezi nimi konstantní v celé ploše objektivového hranolu  $W_o$ . Hodnotu konstantního fázového rozdílu (viz  $\Phi_0$  v obr. 4B) lze plynule měnit laterálním posouváním obou Wollastonových hranolů vůči sobě. Je zřejmé, že tímto způsobem lze významně ovlivňovat vzhled obrazu. Vždy však platí, že pokud určitý gradient optické dráhy vede ke zvýšení jasu obrazu, pak gradient opačného znaménka se projeví snížením jasu. Zvětšený obraz vzorku se proto jeví jako šikmo osvětlený trojrozměrný objekt, viz například tenká vlákna mycelia na obr. 2e.

Vztah mezi reálnou fyzikální strukturou objektů a jejich vzhledem při pozorování Nomarského mikroskopem je velmi složitý a ne vždy zcela jednoznačný. Je známo, že výrazně odlišné prostorové reliéfy objektů se mohou projevit prakticky shodným optickým reliéfem, který je pro nás obrazem vzorku [8]. U biologických preparátů se však optický reliéf zpravidla dostatečně shoduje s jejich reálným prostorovým reliéfem.

Velkou předností DIC, která bohatě vyvažuje zmíněné problémy, je to, že obrazy zkoumaných objektů jsou bez rušivého halo, které se často vyskytuje při fázovém kontrastu. Pro DIC je navíc typická velmi malá hloubka ostrosti ( $< 0,25 \mu\text{m}$ ), [3, kap. 1]. Přičítá se to efektu interference, pro niž se podmínky prudce mění při přeostrění o zlomky vlnové délky. Nemusí to však být vysvětlení úplné, jak lze vyvodit ze skutečnosti, že podobnými vlastnostmi se vyznačuje i Hoffmanův modulační kontrast.

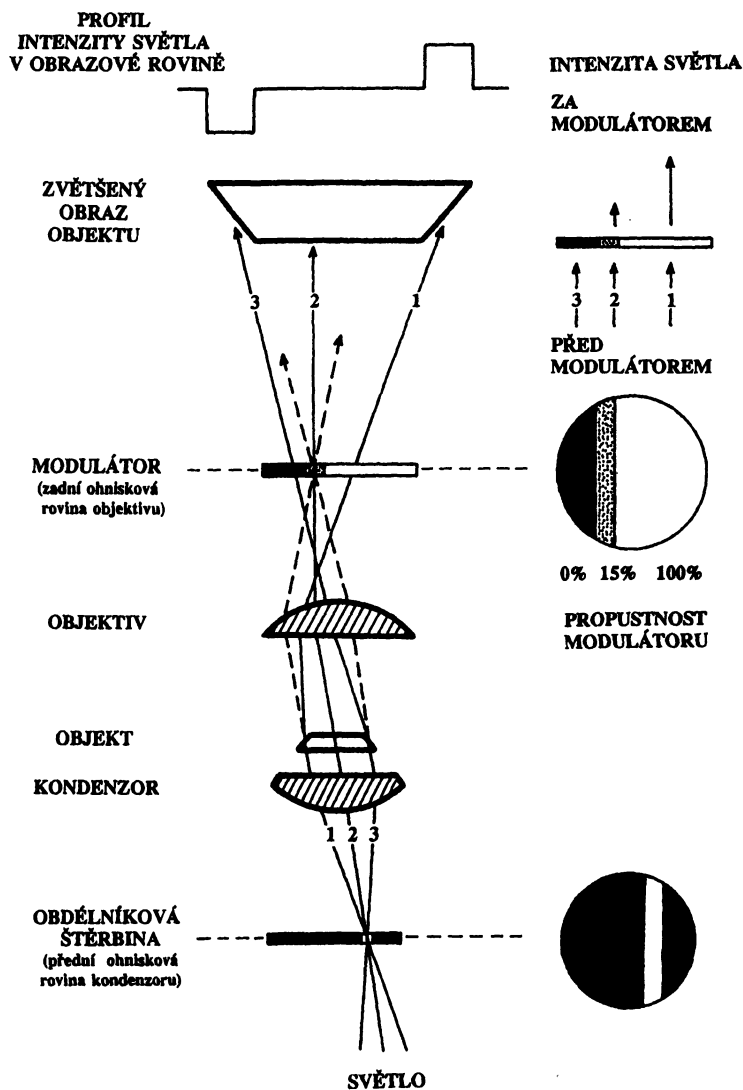
Nomarského metodu lze realizovat i při horním osvětlení. Reflexní diferenciální interferenční mikroskopie umožňuje například pozorování struktur na integrovaných obvodech. Vyznačuje se přitom mimořádnou schopností detekovat přítomnost stupňovitých vrstev o tloušťce o několik řádů menší, než je rozlišovací schopnost mikroskopu. Na růstové spirále na povrchu  $\text{Ca}_2\text{Si}$  byly touto metodou detekovány vrstvy o tloušťce menší než 1 nm [8].

### *Hoffmanův modulační kontrast (HMC)*

Hoffmanův modulační kontrast je v podstatě pouze velmi dokonalou verzí šikmého osvětlení, které ke zvýraznění kontrastu neabsorbujících objektů používal již Ernst Abbe. Virtuálním zdrojem světla zajišťujícím šikmé osvětlení při HMC je obdélníková štěrbina, nacházející se v přední ohniskové rovině kondenzoru [9]. V místě jejího obrazu v zadní ohniskové rovině objektivu je umístěn modulátor. Modulátorem je maska o propustnosti  $T \sim 15\%$ , jejíž tvar se kryje s obrazem štěrby a která z jedné strany sousedí s absorbující plochou ( $T < 1\%$ ), zbývající část modulátoru je neabsorbující ( $T \approx 100\%$ ), obr. 5. Nepropustná zóna modulátoru zabírá méně než 10% apertury objektivu. Její vliv na rozlišovací schopnost mikroskopu je proto zanedbatelný.

Princip funkce modulátoru je celkem jednoduchý. Záření zdroje, které prochází oblastmi vzorku s gradientem optické tloušťky, se odchýlí od původního směru šíření. Jeho úhlová odchylka je úměrná  $\text{grad } D / (n - 1)$  nebo  $(\text{grad } n) / n$ , kde  $D$  značí prostou tloušťku vzorku,  $n$  jeho index lomu [7]. Jednotlivé příspěvky k odchýlenému záření vytvoří v zadní ohniskové rovině objektivu dílčí obrazy kondenzorové štěrby, které jsou nějak posunuty vůči šedé zóně modulátoru. Je-li gradient kolmý na osu štěrby, posune se její obraz v závislosti na znaménku tohoto gradientu buď do nepropustné nebo do čiré zóny modulátoru. Takové posunutí je provázáno ztemněním (při opačném gradientu zjasněním) příslušného místa v mikroskopickém obrazu. Výsledek budí dojem šikmo osvětleného reliéfu a je velmi podobný zobrazení pomocí Nomarského DIC a samozřejmě výrazně závisí na orientaci zobrazovaného objektu vůči štěrbině, obr. 2f. Optické gradienty rovnoběžné se štěrbinou se v obrazu objektu neprojeví.

Z obecného hlediska představuje vznik kontrastu při HMC důsledek asymetrické filtrace Fourierova obrazu, typický pro všechny metody mimoosového (anaxiálního) osvětlení. Patří sem například i tzv. šlírová mikroskopie [7]. HMC zviditelňuje prakticky tytéž fázové struktury jako Nomarského DIC a navíc velmi podobným způsobem. Cena potřebných doplňkových komponent mikroskopu je však při HMC podstatně nižší než při DIC. Pomineme-li rozdíly cenové, pak hlavní předností HMC oproti DIC je možnost pozorovat objekty i na dvojlomných podložkách (například buněčné kultury



Obr. 5. Schéma optické soustavy mikroskopu pro Hoffmanův modulační kontrast; plné čáry vyznačují skutečný chod paprsků, čárkované ukazují, jak by se tyto paprsky šířily, pokud by ve vzorku nebyly gradienty optické tloušťky.

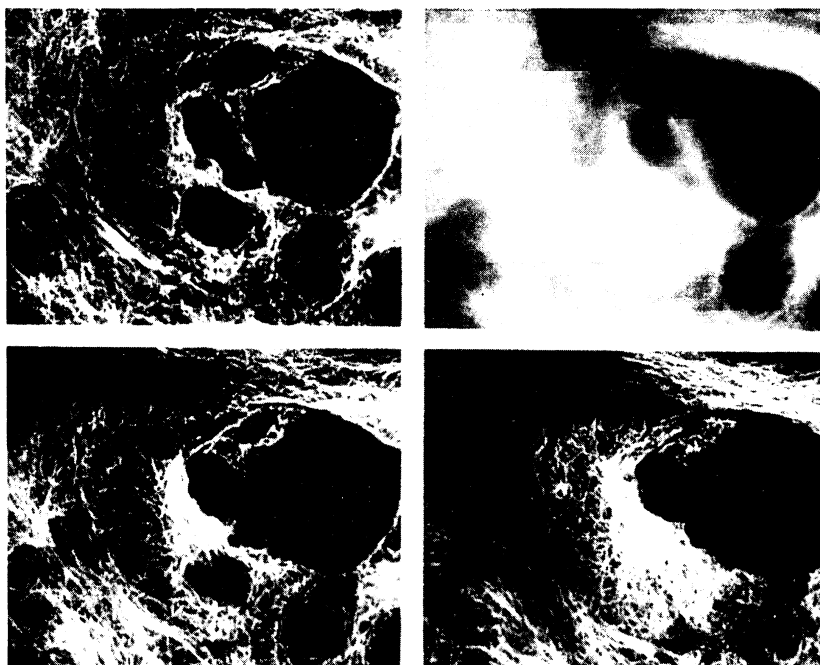
v plastických kultivačních kyvetách). Jak víme, pro DIC je podstatná polarizace zobrazujícího světla. Dvojlomné objekty i jejich podložky se proto mohou stát zdrojem rušivých efektů. Rušivé efekty se mohou objevit i na některých opticky anizotropních strukturách samotných objektů (viz například zobrazení vzpřímených vláken nesoucích výtrusnice, obr. 2e). Mezi biologi je však DIC zatím podstatně více oblíben než HMC — částečně z prostého důvodu, že je metodou s delší tradicí, zejména však kvůli tomu,



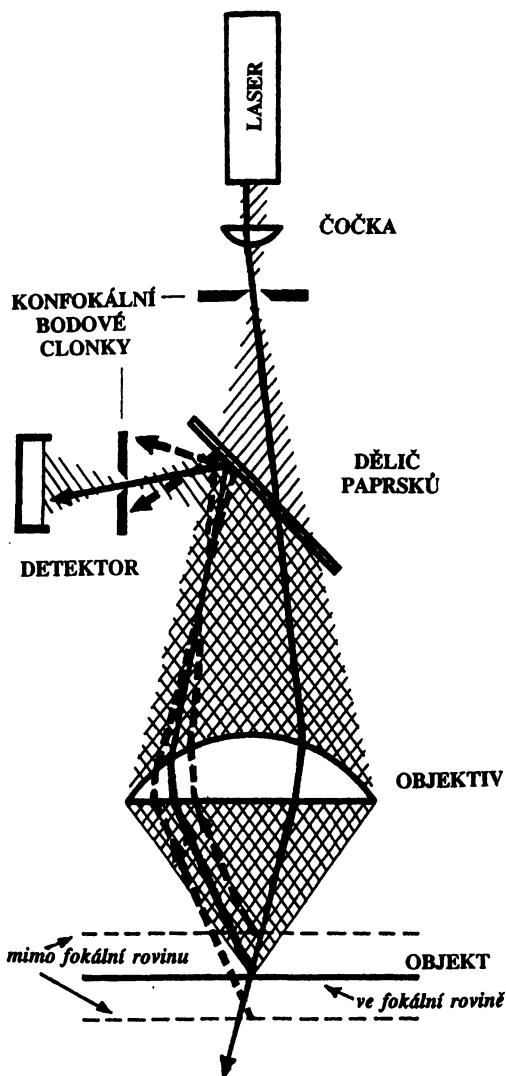
že často umožňuje lepší kontrast zobrazení jemných fázových struktur (viz zobrazení vláken mycelia na obr. 2e a 2f).

### Konfokální mikroskopie

Při pozorování silných transparentních vzorků, například tkáňových řezů nebo velkých buněk, je prakticky nemožné plně využít teoretické rozlišovací schopnosti mikroskopu. Toto je způsobeno snížením obrazového kontrastu a následujícím potlačením nejjemnějších obrazových detailů v důsledku překrývání se zaostřeného obrazu s rozmazanými obrazy struktur, které se nacházejí mimo zaostřenou rovinu. Obzvláště nepříjemný je tento jev při fluorescenční mikroskopii, obr. 6. Rušivého zamlžení obrazu zářením z mimoohniskových rovin se lze zbavit dvojným způsobem — numerickou dekonvolucí digitalizovaného obrazu (viz oddíl věnovaný videomikroskopii a počítačovému zpracování obrazů) nebo čistě instrumentálním způsobem, pomocí konfokální mikroskopie.



Obr. 6. Rozdíl mezi klasickou fluorescenční mikroskopií a konfokální fluorescenční mikroskopií. Mikrotubuly v myší jaterní buňce (barveno nepřímou metodou pomocí FITC značených protilátek proti myšimu  $\alpha$ -tubulinu): vlevo dole — standardní fluorescenční mikroskopie, dále ve směru hodinových ručiček — konfokální optické řezy v postupně se měnící hloubce vzorku. Zhotoveno s použitím prospektu k laserovému konfokálnímu mikroskopu Nikon RCM 8000.



Obr. 7. Princip laserového konfokálního mikroskopu.

stí vzorku. Konfokální obrazy jsou proto vždy zaostřené a představují optické řezy vzorkem. S imerzním objektivem o numerické apertuře  $NA = 1,3$  a při použití modrozelené čáry argonového laseru (488 nm) činí jejich tloušťka asi  $0,4 \mu\text{m}$ . Rozdíl mezi obyčejnou a konfokální fluorescenční mikroskopií demonstruje obr. 6.

Idea konfokálního mikroskopu pochází od Marvinu Minskyho, který ji patentoval již v roce 1957 [10]. V té době však zůstala bez odezvy, neboť Minsky nenašel vhodný zdroj světla pro konstrukci funkčního přístroje. O deset let později M. Petráník

Princip konfokálního mikroskopu je znázorněn na obr. 7. Pozorovaný vzorek je osvětlen bodovým zdrojem světla. Nejčastěji k tomu slouží laserový paprsek fokusovaný na clonku, která je pak objektivem mikroskopu zobrazena na vzorek do bodu o průměru rovnajícím se difrakční mezi dané numerickou aperturou objektivu. Stejný objektiv pak sbírá světlo vzorkem odražené a rozptýlené, případně fluorescenci. Při zpětném průchodu tohoto záření objektivem vznikne další obraz bodové clonky, který je pomocí děliče paprsků lokalizován před fotonásobič. V místě tohoto obrazu se nachází druhá, konfokální bodová clonka (dírká v nepropustné masce), která blokuje detekci záření pocházejícího z míst vzorku mimo rovinu, do které je mikroskop právě zaostřen. Obraz celé této roviny získáme jejím rastrováním bod po bodu. Existují tři různé způsoby rastrování: cestou rozmítání laserového paprsku nebo příčným posouváním vzorku před objektivem, případně posouváním objektivu nad vzorkem. Při rastrování je signál z fotonásobiče registrován počítačem spolu s informací o souřadnicích analyzovaných bodů. Celý soubor těchto dat je pak převeden na obraz pozorovaného vzorku. Tento obraz již díky prostorové filtraci záření dopadajícího na detektor neobsahuje neostře pozadí mimofokálních oblastí

a M. Hadravský z lékařské fakulty UK v Plzni patentovali konfokální mikroskop na bázi rotujícího kotouče s otvory (obdoba Nipkowova disku). Ten hraje roli soustavy párů pevně spřažených zdrojových a konfokálních bodových clonek, které při rotaci kotouče rastrují vzorek [11]. S tímto přístrojem (v odborné literatuře je znám pod názvem Tandem Scanning Confocal Microscope — TSCM) byly poprvé získány kvalitní optické řezy silným preparátem, konkrétně mozkovou tkání [12]. Jak výroba, tak použití Nipkowova kotouče jsou naneštěstí provázeny značnými technickými obtížemi.

Éra konfokální mikroskopie v podstatě začíná až koncem 70. let, kdy byl zkonstruován spolehlivý konfokální mikroskop s rozmítaným laserovým paprskem. Nikoliv náhodou to bylo ve stejné době, kdy se staly běžně dostupnými výkonné minipočítače. V současné době je na trhu zhruba 10 verzí konfokálního mikroskopu. Výhodou laserových rastrovacích systémů oproti staršímu principu TSCM je lepší kvalita získaných optických řezů. Pro TSCM je totiž typická určitá nepřesnost v překryvu konfokální clonky s obrazem clonky zdrojové, což je dáno omezenou přesností výroby soustavy děr v rastrovacím kotouči. Navíc TSCM není příliš vhodný pro fluorescenční mikroskopii, především pro nedostatečnou intenzitu budícího světla [13]. S tím do značné míry souvisí i současné upřednostňování laserových rastrovacích konfokálních mikroskopů v důsledku narůstající obliby fluorescenčních sond a značek v biologickém výzkumu. Existují však okruhy aplikací, kdy TSCM je nezastupitelný, neboť umožňuje pozorovat preparáty v reálných barvách a v reálném čase, díky čemuž lze okamžitě vidět efekt zaostřování do různých rovin. Intenzivně se pracuje na použití TSCM při pozorování buněk *in situ* (aplikace v oftalmologii a dermatologii). Jinou doménou TSCM jsou mikromanipulační techniky (P. Veselý, Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha — osobní sdělení). Více lze o principech konstrukce různých konfokálních mikroskopů nalézt v podrobné monografii [3], případně ve stručnější podobě ve velmi zdařilém přehledu [14].

Potlačení mlhavého pozadí obrazu a optická tomografie nejsou jediným přínosem konfokálního zobrazování. Rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu závisí nejen na numerické apertuře objektivu a vlnové délce použitého světla, nýbrž i na průměru konfokální clonky. Je-li tento průměr roven nejvýše  $1/4$  průměru Airyho kroužku, je rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu maximální — přibližně o faktor 1,4 lepší než rozlišovací schopnost standardního mikroskopu o stejné numerické apertuře objektivu. S konfokální clonkou větší než průměr Airyho kroužků poklesne rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu na hodnotu srovnatelnou s mikroskopem klasickým. Naproti tomu zlepšování rozlišovací schopnosti mikroskopu cestou zmenšování konfokální clonky je spojeno s prudkým poklesem intenzity detekovaného signálu. Blíží-li se průměr konfokální clonky ke zmíněné mezní hodnotě  $1/4$  průměru Airyho kroužku, pak se detekuje méně než 10 % z celkové intenzity světla emitovaného ze zobrazovaného bodu. Zpravidla proto musíme přistoupit na kompromis mezi zlepšením rozlišovací schopnosti a intenzitou detekovaného záření. Obvykle se používá konfokální dírka propouštějící zhruba 50–75 % světla. Faktor zvýšení rozlišovací schopnosti zůstává přitom roven přibližně 1,2. Axiální rozlišovací schopnost konfokálního mikroskopu, tj. jeho schopnost vytvořit tenké optické řezy vzorkem, závisí na průměru konfokální

clonky podstatně méně. Za výše uvedených podmínek se stále ještě blíží své mezní hodnotě, která při vlnové délce 488 nm činí asi  $0,35 \mu\text{m}$ , [3] (kap. 14).

Zdánlivě přímočarý způsob zvyšování intenzity detekovaného signálu zvýšením výkonu laserového zdroje je často nepřipustný. Jmenovitě při fluorescenční konfokální mikroskopii je maximální intenzita excitačního záření omezena jak rostoucí rychlostí fotochemických reakcí fluorochromů, po nichž mizí fluorescence (anglicky „photobleaching“), tak saturací absorpce fluorochromů. Takové omezení maximální intenzity signálu samozřejmě vede ke snížení kvality konfokálních obrazů. Statistický šum provázející měření intenzity světla je úměrný  $\sqrt{N}/N$ , kde  $N$  je počet detekovaných fotonů. Jestliže intenzitu budicího laserového záření nemůžeme libovolně zvyšovat, musíme zvýšit dobu akumulace signálu, pokud chceme dosáhnout přijatelné úrovně obrazového šumu. Běžná doba snímání jednoho optického řezu v rastru  $512 \times 512$  bodů v 256 úrovních jasu se pohybuje od 0,5 sec do desítek sekund. To ovšem znamená, že při konfokální fluorescenční mikroskopii nelze z principiálních důvodů dosáhnout současně vysokého prostorového i časového rozlišení.

S výjimkou TSCM mikroskopů jsou konfokální obrazy optických řezů produkovány v digitalizované formě a lze je proto ihned dále upravovat všemi běžnými způsoby počítačového zpracování obrazů. Specialitou konfokální mikroskopie je možnost prostorové rekonstrukce mikroskopických objektů, opírající se o několik desítek až stovek optických řezů, postupně snímaných při plynule se měnící hloubce zaostření. Velikost podobných datových souborů ovšem dosahuje až desítek megabytů. K jejich zpracování je proto nezbytný velmi výkonný počítač s velkou pamětí. Ze souboru optických řezů lze mimo jiné generovat anaglyfy, tj. zvětšené dílčí obrazy trojrozměrného objektu, jak by je vidělo pravé a levé oko. Při pozorování přes vhodné brýle (dle konstrukce displeje jsou to buď dvojbarevné brýle nebo elektronicky řízené brýle s kapalnými krystaly) skýtají anaglyfy velmi působivé stereoskopické obrazy preparátů. Jiná možnost současně prezentace více optických řezů spočívá v jejich prosté sumaci, čímž lze získat ostrý obraz objektu s fyzikálně nedosažitelnou hloubkou ostrosti, v němž navíc struktury nacházející se v různých hloubkách mohou být odlišně barevně kódovány. Ze souboru horizontálních  $x-y$  řezů lze také rekonstruovat vertikální řezy ( $x-z$  nebo  $y-z$ ). Vertikální řezy se ovšem dají získat i přímým způsobem, pomocí vhodné volby rastrovacího algoritmu mikroskopu. Další, poměrně nová metoda konfokální mikroskopie spočívá v současném snímání fluorescenčních obrazů pomocí tří fotonásobičů se spektrálními filtry pro modrou, zelenou a červenou barvu. Rekombinací tří dílčích obrazů v základních barvách získáme optický řez v reálných barvách emitované fluorescence [14].

### *Aplikace konfokální mikroskopie*

Unikátní schopnosti konfokálního mikroskopu zobrazovat preparáty s trojrozměrným rozlišením se využívá při studiu povrchových vlastností materiálů. V reflexním módu zobrazování se zkoumá textura a složení povrchů i eroze materiálů. Konfokálním mikroskopem se vyhodnocují výsledky mikrotěstů tvrdosti kovů i plastických materiálů, měří se výška strukturních elementů na polovodičových čipech.

Biologie a lékařský výzkum těží ze skutečnosti, že konfokální mikroskopie je ve své podstatě neinvazivním a nedestruktivním způsobem studia prostorové struktury buněk a tkání. Příkladem, kdy konfokální mikroskopie bezesporu převyšuje možnosti metod klasické mikroskopie, může být studium složité architektury neuronových sítí v mozkové tkáni (používá se klasické Golgiho metody kontrastování neuronů částicami stříbra, které ideálně odrážejí světlo v reflexním módu). Konfokálním mikroskopem lze kvantitativně měřit rozložení iontově selektivních fluorescenčních molekul v buňkách a takto analyzovat intracelulární koncentrace fyziologicky významných iontů (např.  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ). Jiné fluorescenční sondy umožňují měřit membránový potenciál nebo vnitrobuněčné pH. V obou posledně jmenovaných případech spočívá přínos konfokální mikroskopie v možnosti vzájemně odlišit fluorescenci z molekul nacházejících se uvnitř a vně buněk. Přehled všech prakticky významných fluorescenčních látek pro biologický a lékařský výzkum, včetně referencí k nejdůležitějším aplikacím, podává katalog firmy Molecular Probes [15]. Pomocí imunofluorescenčních metod, které jsou založeny na přesné chemické specifitě fluorescenčně značených protilátek, se studuje nejen rozložení receptorů v membránách, nýbrž například i organizace cytoskeletu, mitotický aparát během dělení, či struktura endoplazmatického retikula. V mnoha případech je zlepšení kontrastu dokonce tak dramatické, že se vyjeví buněčné struktury, které při použití klasického mikroskopu nejsou vůbec pozorovatelné [16].

## Videomikroskopie

Lidský zrak dokáže velmi efektivně identifikovat přítomnost různých objektů v mikroskopickém obraze, a to i při nízkém kontrastu zobrazení a částečném překryvu těchto objektů. Oko však není uzpůsobeno ke kvantitativnímu hodnocení. Bez patřičných pomůcek nedokážeme stanovit rozměry a plochu zobrazených objektů ani jejich jas. Nejdůležitější pomocnou metodou kvantitativní analýzy mikroskopických obrazů byla po dlouhá léta mikrofotografie. Fotografický záznam umožňuje zvýšit obrazový kontrast, usnadňuje počítání objektů a měření jejich rozměrů. Je vhodný i pro vyhodnocení jasu objektů, jejich spektrálních charakteristik, absorpance apod. K získání dokonalých snímků je však zapotřebí zkušených specialistů. Práce s fotografickým záznamem je navíc časově náročná, což znesnadňuje zpětnou vazbu mezi způsobem pozorování a optimálním výsledkem. Výrazný pokrok v metodách záznamu a kvantitativního hodnocení mikroskopických obrazů přinesla videomikroskopie, jejíž počátky spadají do padesátých let. K jejímu opravdovému rozmachu ale došlo až po roce 1970 v souvislosti s rozvojem osobních počítačů, které umožnily digitální zpracování obrazů [17–20].

Při videomikroskopii je optický obraz vytvořený kvalitním mikroskopem převeden kamerou na elektrický videosignál. Mezi dnes používanými kamerami jsou nejběžnější kamery s CCD snímači. Jedná se v podstatě o unipolární integrované obvody, vyrobené MOS technologií jako matice ortogonálně uspořádaných fotometrů. Rozměry jednoho takového detektoru, který vlastně představuje jeden obrazový element, se pohybují od

$7 \times 7 \mu\text{m}$  do  $30 \times 30 \mu\text{m}$  a ve snímačích pro vědecké účely se jejich celkový počet pohybuje od  $512 \times 512$  do  $2000 \times 2000$ . CCD snímače se oproti dřívějším vakuovým snímacím elektronkám vyznačují malou hmotností a rozměry, vyšší citlivostí i dynamickým rozsahem a linearitou, širším spektrálním rozsahem, minimálním geometrickým zkreslením obrazu a navíc i poměrně nízkou cenou.

S kvalitními CCD kamerami lze pracovat od osvětlení scény zhruba 0,1 lux (při vlnové délce světla 550 nm tomu odpovídá přibližně  $5 \times 10^8$  fotonů/sec  $\text{mm}^2$ ), přičemž dynamický rozsah měření intenzit, vyjádřený v jednotkách šumu, převyšuje hodnotu  $5 \times 10^3 : 1$ . U klasických vidikonů je dynamický rozsah pouze  $10^2 : 1$ . Spektrální citlivost CCD snímačů je dána optickými vlastnostmi křemíku, tj. 400–1100 nm. Pouze speciálně připravené CCD detektory jsou citlivé i v UV oblasti počínající od 300, případně 200 nm. Pro řadu aplikací, zejména pro fluorescenční mikroskopii, je velmi důležité, že citlivost CCD snímačů lze extrémně zvýšit ochlazením na teplotu  $-100^\circ\text{C}$ . Za těchto podmínek klesne tepelný šum jednotlivých detektorů na úroveň několika fotonů za sekundu. Dolní mez jasu pozorovatelných objektů se tím posune na úroveň čítání jednotlivých fotonů, v důsledku čehož se dynamický rozsah chlazeného snímače přiblíží hodnotě  $10^5 : 1$ . Snímaný obraz pak může být poměrně dlouho integrován cestou souběžné akumulace náboje ve všech detektorech (podobně je integrován při prodloužené fotografické expozici). Taková integrace účinně potlačí fotonový šum v obrazech o extrémně nízkém jasu, samozřejmě za cenu obětování časového rozlišení. Alternativní technickou možností snímání velmi mdlých mikroskopických obrazů jsou kamery se zesilovači obrazu, např. [17]. Nevýhodou zesilovačů obrazu je zvýšení primárního fotonového šumu málo jasných obrazů o kvantový šum fotokatody, jakož i nezanedbatelné geometrické zkreslení na okrajích obrazu a malá rozlišovací schopnost (zhruba ekvivalent pouhých 400 obrazových řádků). Je proto reálné předpokládat, že s dalším rozvojem chlazených CCD snímačů ustoupí kamery se zesilovači obrazu do pozadí.

Metody videomikroskopie se dělí do dvou úzce souvisejících kategorií. První představuje *videově umocněný kontrast* (VEC — Video Enhanced Contrast), druhou *zesílená fluorescenční mikroskopie* (IFM — Intenzified Fluorescence Microscopy), [17, 20]. Ustálená česká terminologie zde prakticky neexistuje. V závorkách jsou proto uvedeny anglické originály.

Pod videově umocněný kontrast spadají všechny metody spočívající v analogovém nebo digitálním zesílení relativně malých lokálních rozdílů v intenzitě světla, které při normálním způsobu pozorování zanikají v jasu pozadí. Takto se v zorném poli zvýrazní slabé příspěvky, kterými se v celkovém obrazu projevují drobné částice nebo strukturální elementy uvnitř větších objektů. Zesílení spočívá v tom, že se napřed odečte pozadí, zahrnující jak všechny nežádoucí odrazy a rozptyl světla v optické soustavě mikroskopu, tak neostře obrazy struktur nacházejících se mimo ohniskovou rovinu. Pak se získaný rozdílový signál vynásobí vhodným koeficientem. Díky tomu lze pozorovat objekty až o řád menší, než je mezní rozlišovací schopnost mikroskopu (například tubuly v cytoplasmě, jejichž průměr činí pouze 20–30 nm, nebo částičky koloidního zlata o průměru 20–40 nm, které se používají jako sondy proudění cytoplasmu v živých buňkách) [21]. Zde je třeba zdůraznit, že pozorování takto malých objektů není

nikterak v rozporu s Abbeovou teorií rozlišovací schopnosti mikroskopu. Budou-li totiž dva tubuly nebo částice zlata vzdáleny o méně, než odpovídá mezní rozlišovací schopnosti, uvidíme pouze jeden objekt. Nicméně pro VEC je tato mez zhruba poloviční oproti hodnotám stanoveným dle Rayleighova kritéria [20]. Toto zlepšení je prostým důsledkem přechodu od vizuálního pozorování zvětšených obrazů okulárem či na mikrofotografiích k objektivnímu měření rozložení intenzity světla v obrazové rovině mikroskopu.

Zesílená fluorescenční mikroskopie znamená v podstatě fluorescenční mikroskopii s použitím zesilovačů obrazu nebo chlazených CCD kamer. Použití takových detektorů je nezbytné u valné části biologických vzorků, neboť intenzita jejich fluorescence nebývá postačující pro obyčejné videokamery. Při zesílené fluorescenční mikroskopii lze naopak ještě snižovat intenzitu buzení oproti intenzitě potřebné pro obyčejné vizuální pozorování, čímž lze úspěšně potlačit nežádoucí vybělování fluorescence. Zesílené fluorescenční mikroskopie se často používá v podmínkách, kdy není dost fotonů na to, aby vytvořily obraz bez šumu. Musí se proto kombinovat s počítačovým zpracováním obrazu, které umožňuje zlepšit poměr signál/šum integrací několika postupně snímaných obrazů.

## Počítačové zpracování obrazů

Prvním krokem k počítačovému zpracování obrazu je jeho digitalizace. K tomuto účelu nabízí řada firem profesionální karty do osobních počítačů (uspokojivý přehled o aktuální nabídce takových obrazových převodníků získáme prolistováním několika posledních čísel magazínů *Photonics Spectra* a *European Microscopy*). Volba kamery a obrazového převodníku musí přirozeně vycházet z toho, jaké rozlišení pro danou aplikaci skutečně potřebujeme a s kolika obrazovými body můžeme reálně pracovat při dané kapacitě paměti a rychlosti počítače. Obrazové karty pro většinu běžných aplikací digitalizují obrazy o velikosti  $512 \times 512$  nebo  $640 \times 480$  obrazových elementů a rozlišují 256 jasových úrovní, čemuž odpovídá 256 kB, resp. 300 kB na jeden snímek. Lidské oko však v pozorovaném obraze rozliší pouhých 40 až 80 úrovní jasu. K prostému záznamu a pozdější reprodukci snímků na monitoru tedy postačí, aby celý systém pracoval s poměrně nízkým digitálním rozlišením (6 až 7 bitů). Pokud potřebujeme detekovat změny jasu, které již pouhým okem nejsou viditelné, musí být přesnost digitalizace alespoň 8 bitů. Pro speciální fotometrické účely se používají obrazové převodníky s přesností alespoň 10 bitů.

K základnímu arzenálu počítačového zpracování obrazů patří metody filtrace šumu (důležité pro zesílenou fluorescenční mikroskopii), nebo naopak detekce a zvýraznění gradientů intenzity, detekce pohybu mikroskopických objektů, vycházející z analýzy rozdílů mezi obrazy snímanými s definovanou prodlevou, viz např. [22]. Dále sem patří segmentace obrazu na objekty, které nás zajímají, a ty ostatní. Pro segmentaci je třeba, aby se jednotlivé objekty lišily buď jasnem, nebo barvou. Objekty vyznačené při segmentaci obrazu lze pak počítat nebo statisticky hodnotit jejich rozměry a jas.

Toho se hojně využívá jak při studiu buněčných populací, tak při analýze granulárních materiálů.

Pro biologické aplikace fluorescenční mikroskopie má zásadní význam *poměrové zobrazování* (ratio imaging). Tato metoda umožňuje měřit relativní změny intenzity fluorescence v buňce vůči vhodnému počátečnímu stavu, měřit poměry intenzit v dvou různých emisních pásmech, případně poměry intenzit fluorescence emitované při různých excitačních vlnových délkách. Změřené poměry pak lze zobrazit v nepravých barvách dle vhodného barevného kódu. Poměrového zobrazování se používá k převedení fluorescenčních obrazů buněk, které byly obarveny indikátory citlivými na membránový potenciál nebo na různé ionty (např.  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ ), na kvantitativní obrazy rozložení těchto fyziologicky významných faktorů v živých buňkách. Touto metodou se nebudeme podrobněji zabývat, neboť se týká více fluorescenčních sond samotných než podstaty fluorescenční mikroskopie [15, 23]. Mezi aplikace počítačového zpracování obrazů, které naopak s podstatou mikroskopického zobrazování souvisí velmi úzce, patří *počítačové restaurování (dekonvoluce) trojrozměrných obrazů*. Výchází, neupravená informace o objektu se získá ve formě série obyčejných dvojrozměrných mikroskopických obrazů během postupného přeastřování mikroskopu. Každý z nich zjevně obsahuje čistý obraz zaostřené roviny spolu s rozmazanými mimoohniskovými obrazy zbytku vzorku. Změříme-li k tomu závislost obrazu bodového objektu na jeho vzdálenosti od zaostřené roviny (tzv. *funkce bodového rozmazání* — point spread function), pak můžeme poměrně komplikovaným iteračním postupem odstranit z našeho 3D souboru veškerou informaci o mimoohniskových strukturách [24]. Počítačové restaurování trojrozměrných obrazů znamená zpracování velkého objemu informace. Je proto poměrně zdouhavé. Restaurování obrazů snímaných v rastru  $128 \times 128$  bodů o 64 úrovních jasu trvá při použití stanice Silicon Graphics 240 GTX zhruba 10 až 100 minut. Výsledkem je však série optických řezů, jejichž kvalita může být stejně dobrá jako při konfokální mikroskopii, viz kapitola 14 v monografii [3]. Také kvalitu obrazů z konfokálního mikroskopu lze v principu ještě dále vylepšovat počítačovým restaurováním.

## Závěr

Přes svoji dlouhou historii patří optická mikroskopie nadále mezi rychle se vyvíjející obory přístrojové techniky. Přibývají jak zdokonalení existujících základních metod (příkladem je nový způsob stereomikroskopie, využívající dvou šikmo osvětlujících paprsků [25] nebo získávání optických řezů pomocí laserem excitované dvoufotonové fluorescence), tak pokusy zásadním způsobem posunout rozlišovací schopnost za difrakční mez. Druhý směr je reprezentován rastrovací optickou mikroskopii bez čoček, která v podstatě kombinuje princip tunelové rastrovací mikroskopie s použitím optické sondy o průměru 50–60 nm. Takovou optickou sondou je laserové záření vycházející z extrémně ostrého hrotu pokoveného skleněného vlákna, a to pouze do vzdálenosti menší, než je průměr apertury, z níž ono záření vystupuje [26].



**Poděkování.** Děkuji doc. J. Reischigovi za laskavé poskytnutí snímků plísně *Aspergillus niger* a svolení k jejich použití v tomto článku. Děkuji také prof. K. Benešovi za radu týkající se doplnění seznamu literatury o učebnice [27, 28], orientované na uživatele světelné mikroskopie z řad biologů.

## L i t e r a t u r a

- [1] GRAY, P. (editor): *The Encyclopedia of Microscopy and Microtechnique*. Van Nostrand Reinhold Comp., 1973.
- [2] BEYER, H., RIESENBERG, H. (editoři): *Handbuch der Mikroskopie*. VEB Verlag Technik Berlin, 3. přepracované vydání, 1988.
- [3] PAWLEY, J. B. (editor): *Handbook of Confocal Microscopy*. Plenum Press, New York, 1990.
- [4] BORN, M., WOLF, E.: *Principles of Optics*. Pergamon Press, London, 1959.
- [5] SCHROEDER, G.: *Technická optika*. SNTL, Praha, 1981.
- [6] ZERNIKE, F.: *Science* 121 (1955), 345.
- [7] WOLTER, H.: In: *Handbuch der Physik. Grundlagen der Optik*, Vol. 24. Ed. Flueggel, S., Springer Verlag, Berlin, 1956, p. 596.
- [8] PADAWER J.: *J. Royal Microsc. Soc.* 88 (1968), 305.
- [9] HOFFMAN R.: *J. Microscopy* 110 (1977), 205.
- [10] MINSKY, M.: *Microscopy Apparatus*. US Patent Office. Patent No. 3,013,467, granted December 19, 1961.
- [11] PETRÁŇ M., HADRAVSKÝ M.: *Způsob a zařízení pro omezení rozptylu světla v mikroskopu pro osvětlení shora*. Čs. patent No 128936, udělen 15-2-68.
- [12] EGGER M. D., PETRÁŇ, M.: *Science* 157 (1967) 305.
- [13] BOYDE A., JONES S. J., TAYLOR M. L., WOLFFE L. A., WATSON T. F.: *J. Microscopy* 157 (1990), 39.
- [14] ENGELHARDT J., KNEBEL W.: In: *Scientific and Technical Information* Vol. 5, June 1993. Leica Mikroskopie and Systeme GmbH, Wetzlar.
- [15] HAUGLAND R. P.: *Handbook of Fluorescent Probes*. Molecular Probes, Inc. Eugene, 1992.
- [16] WHITE J. G., AMOS W. B., FORDHAM M.: *J. Cell. Biol.* 105 (1987), 41.
- [17] INOUE S.: *Video Microscopy*. 4. vydání, Plenum Press, New York, 1986.
- [18] SHOTTON D. M.: In: *New Techniques of Optical Microscopy and Microspectroscopy*, Cherry R. J. (edit.), Macmillan, London, 1991, p. 1-47.
- [19] HERMAN B., JACOBSON K. (editoři): *Optical Microscopy for Biology*. Wiley-Liss, New York, 1989, Part. 2.
- [20] WEIS D. G., MAILE W., WICK, R. A.: In: *Light Microscopy in Biology. A Practical Approach*, Lacey A. J. (edit), IRL Press, Oxford, 1989, p. 228.
- [21] GEERTS H., DE BRABANDER M., NUYDENS R., NUYENS, R.: In: *New Techniques of Optical Microscopy and Microspectroscopy*, Cherry R. J. (edit.), Macmillan, London, 1991, p. 119-136.
- [22] HLAVÁČ V., ŠONKA J.: *Počítačové vidění*. Grada, Praha, 1992.
- [23] WAGGONER A., DEBIASIO R., CONRAD P., BRIGHT, G. R.: *Cell Biol.* 30 (1989), 449.
- [24] AGARD D. A.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 13 (1984), 191.
- [25] GREENBERG G., BOYDE A.: *Neuroimage* 1 (1993), 121.
- [26] LEWIS A.: In: *New Techniques of Optical Microscopy and Microspectroscopy*, Cherry R. J. (edit.), Macmillan, London, 1991, p. 49-89.
- [27] BENEŠ K., PILNÝ J.: In: *Experimentální metody biofyziky*, Prosser V. (edit.), Academia, Praha, 1989, p. 262-313.
- [28] HEJTMÁNEK M.: *Úvod do světelné mikroskopie*. Universita Palackého, Olomouc, 1993.