VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

PROGRAMOVATELNÁ OSVĚTLOVACÍ SOUSTAVA PRO OPTICKÝ MIKROSKOP

PROGRAMMABLE ILLUMINATING SYSTEM FOR AN OPTICAL MICROSCOPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR
MARTIN LOŠŤÁK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR
doc. RNDr. RADIM CHMELíK, Ph.D.

BRNO 2008

Abstrakt
Programovatelná osvětlovací soustava (POS) využívá komerční dataprojektor a vhodnou optickou přenosovou soustavu za účelem osvětlení vzorku v optickém mikroskopu procházejícím světlem. Teoretická část diplomové práce se věnuje metodám osvětlení v optické mikroskopii pro osvětlení na průchod, jež využívají vkládání optomechanických členů do předmětové ohniskové roviny kondenzoru. Jsou to jak metody klasické, které zvyšují kontrast (metoda temného pole), případně rozlišení obrazu (metoda šikmého osvětlení), tak metoda rotující apertury kondenzoru, která poskytuje 3-D informaci o vzorku. Dále je zde uvedena teorie a základní rozdělení osvětlovacích soustav pro osvětlení vzorku na průchod. Na tuto část navazuje vlastní optický a mechanický návrh optické přenosové soustavy pro POS. V experimentální části jsou uvedeny výsledky zobrazení, kterých bylo dosaženo s dvěma různými uspořádáními POS. Na dvou různých vzorcích bylo ukázáno, že pomocí POS je možné vytvořit stejné osvětlení jako metodami klasickými. Bylo prokázáno, že POS lze nahradit rotující mechanickou aperturu kondenzoru, a získat tak 3-D informaci ze vzorku. Byly představeny některé nové statické i dynamické metody osvětlení.

Summary
A programmable illuminating system (PIS) uses a commercial multimedia projector together with a suitable optical relay system in order to illuminate specimens under microscope with transmitted light. The theoretical part of the diploma thesis describes some methods used in the optical transmission microscopy. All of these methods employ physical masks placed in the condenser front focal plane. In the case of the traditional methods the masks are used to enhance contrast (e.g. dark-field illumination) and resolution (oblique illumination). One of the methods (a condenser with rotating aperture) provides the information about the three-dimensionality of the specimen. The next part of the thesis contains the theory and the basic classification of the illuminating systems used in the optical transmission microscopy. An optical and mechanical design of the optical relay system used for PIS is introduced. The experimental part shows the results made with two different PIS arrangements. It was shown on two different specimens that the PIS provides the same illumination as the classical methods. It was also proved that the PIS can simulate the rotating aperture in the condenser front focal plane and thus to give the information about the three-dimensionality of the specimen. Some new static and dynamic illuminating methods were introduced.

Klíčová slova
kondenzor s rotující aperturou, programovatelná osvětlovací soustava, Köhlerovo osvětlení, DLP dataprojektor, optický mikroskop, temné pole, šikmé osvětlení, Rheinbergovo osvětlení

Keywords
condenser with rotating aperture, programmable illuminating system, Köhler illumination, DLP projector, optical microscope, dark-field, oblique illumination, Rheinberg illumination

LOŠŤÁK, M.*Programovatelná osvětlovací soustava pro optický mikroskop.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008. 46 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Radim Chmelík, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pouze pod odborným vedením doc. RNDr. Radima Chmelíka, Ph.D. a s použitím literatury, kterou uvádím v seznamu.

V Brně 22. května 2008

Poděkování

Chtěl bych poděkovat doc. RNDr. Radimu Chmelíkovi, Ph.D. za vedení, konzultace a podnětné připomínky, které mi pomohly při vytváření této diplomové práce. Dále chci poděkovat Ing. Haně Janečkové za odborné připomínky. Ing. Luďku Lovicarovi, Ing. Martinu Antošovi, Ph.D., Ing. Jiřímu Krškovi a Ing. Jiřímu Dvořáčkovi děkuji za mnoho technických rad. Další dík patří Matěji Týčovi, který vytvořil software nezbytný pro vznik této práce. Mgr. Janu Sklenářovi a RNDr. Vlastislavu Svobodovi z firmy Meopta Přerov chci poděkovat za cenné rady při vytváření návrhu optické soustavy a Bohuslavu Křižkovi děkuji za výrobu mnou navržených součástí. Na závěr chci poděkovat svým rodičům za velkou duševní i fyzickou podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia.

Obsah

1 Úvod **3**

2 Osvětlovací metody v optické mikroskopii využívající zásahu do předmětové ohniskové roviny kondenzoru **5**
2.1 Historie osvětlovacích metod 5
2.2 Ovlivnění rozlišení obrazu změnou velikosti průměru apertury 6
2.3 Ovlivňování rozlišení a kontrastu 6
2.3.1 Dělení objektů dle jejich účinku na procházející světlo 6
2.3.2 Zobrazování fázových objektů 7
2.3.3 Praktické provedení metod pro zvýšení kontrastu a rozlišení 8
2.3.4 Získávání informace o trojrozměrnosti objektu dělením apertury kondenzoru 12
2.3.5 Programovatelná osvětlovací soustava 13
2.4 Shrnutí 15

3 Osvětlovací soustavy v optické mikroskopii pro osvětlení na průchod **17**
3.1 Úvod 17
3.2 Kritické osvětlení 17
3.3 Köhlerovo osvětlení 18
3.4 Srovnání obou typů osvětlení 19
3.5 Diskuze 20

4 Návrh osvětlovací soustavy **23**
4.1 Úvod 23
4.2 Měření parametrů 24

5 Experiment **27**
5.1 Úvod 27
5.2 Vymezení pojmů 27
5.3 První uspořádání - jednoduchá osvětlovací soustava 27
5.3.1 Zobrazování škrobových zrn klasickými metodami 28
5.3.2 Zobrazování fázového objektu - nečistoty pod krycím sklíčkem - klasickými metodami 29
5.4 Nové uspořádání - Köhlerova osvětlovací soustava 33
5.4.1 Software 33
5.4.2 Motivace 33
5.4.3 Zobrazování klasickými metodami 33
5.4.4 Zobrazování netradičními metodami 38
5.5 Shrnutí výsledků 42

5.5.1 POS v prvním uspořádání 42
5.5.2 POS v novém uspořádání 42

6 Závěr **43**

Seznam příloh **46**

Kapitola 1

Úvod

Osvětlení vzorku v optickém mikroskopu do značné míry ovlivňuje kvalitu obrazu získaného mikroskopem.

Mnoho klasických osvětlovacích metod v optické mikroskopii, určených pro pozorování vzorků v procházejícím světle, využívá zásahu do osvětlení vkládáním optomechanických členů do předmětové ohniskové roviny kondenzoru. Tyto metody slouží pro zvýšení kontrastu a rozlišení obrazu pozorovaného vzorku. Patří mezi ně např. metoda temného pole či metoda šikmého osvětlení. Metoda, která zatím nepatří mezi klasické, využívá rotující apertury v přední ohniskové rovině kondenzoru. Touto technikou získáváme informaci o trojrozměrnosti objemových vzorků.

V článku [1] bylo ověřeno, že využitím komerčního dataprojektoru a vhodně navržené optické soustavy můžeme zajistit stejné osvětlení, jaké bychom získali libovolnou z klasických metod. Nemusíme přitom přidávat do soustavy žádný přídavný optomechanický člen.

Cílem této práce je navržení optického i mechanického provedení počítačem řízené osvětlovací soustavy, tj. programovatelné osvětlovací soustavy, kterou je možné připojit k rutinnímu optickému mikroskopu a osvětlovat jí vzorky na průchod. Dalším cílem bylo provést experimenty, které prokazují funkčnost soustavy a zajistit osvětlení odpovídající klasickým metodám. Dalším cílem bylo simulovat osvětlení mechanickou rotační aperturou a vytvořit osvětlení nová, která nelze zajistit mechanickými soustavami.

V druhé kapitole práce je pojednáno o historii a principu klasických metod a o metodě kondenzoru s rotující aperturou. Je zde též vysvětleno, jak funguje programovatelná osvětlovací soustava.

Třetí kapitola pojednává o teorii osvětlovacích soustav a jejich rozdělení do dvou základních typů. Jsou to soustavy využívající Köhlerova osvětlení a soustavy s kritickým osvětlením. Závěr této kapitoly je věnován diskuzi obou typů. Na jejím základě bylo rozhodnuto, jaký typ využít pro návrh programovatelné osvětlovací soustavy.

Optický i mechanický návrh programovatelné osvětlovací soustavy je uveden v kapitole čtvrté. Je popsán chronologicky tak, jak vznikal. Výsledkem je soustava, která zajišťuje Köhlerovo osvětlení vzorku. Součástí návrhu je též model rozložení intenzity v předmětové rovině mikroskopu.

V úvodní části páté kapitoly je experiment provedený s jednoduchou programovatelnou osvětlovací soustavou. Uvádím zde srovnání osvětlení pomocí této soustavy s osvětlením vytvořeným klasickými metodami. Taktéž je zde ukázáno napodobení metody kondenzoru s rotující aperturou. V druhé části páté kapitoly jsou uvedeny výsledky, kterých bylo dosaženo s novou programovatelnou osvětlovací soustavou. Bylo vytvořeno osvětlení, které odpovídá klasickým metodám, také se podařilo programovatelnou osvětlovací sou-

stavou osvětlovat vzorek metodami zcela novými. Dále byla na náhodně vybraném vzorku ověřována funkčnost metody rotující apertury kondenzoru.

V závěru diplomové práce je uvedeno shrnutí výsledků, kterých bylo dosaženo, a vyhlídky do budoucna.

Kapitola 2

Osvětlovací metody v optické mikroskopii využívající zásahu do předmětové ohniskové roviny kondenzoru

2.1 Historie osvětlovacích metod

Pro plnohodnotné pozorování ve světelné mikroskopii požadujeme, aby obraz měl co nejvyšší rozlišení, co nejvyšší kontrast a aby podal informaci nejen o jedné rovině vzorku, nýbrž o celém jeho objemu.

Přitom tyto tři důležité parametry jsou limitovány zejména kvalitou optických členů mikroskopu, charakterem vzorku a ve velké míře osvětlením vzorku.

Od roku 1691, kdy Bonani zkonstruoval svůj mikroskop (schéma v [2], str. 15), využívá téměř každý mikroskop k osvětlení vzorku optický člen zvaný kondenzor. Ten je situován v těsné blízkosti vzorku a zajišťuje jeho rovnoměrné osvětlení. Jedním ze způsobů, jak můžeme výrazně změnit osvětlení vzorku, a tím i kvalitu informace, již získáme, je zásah do předmětové ohniskové roviny kondenzoru.

Nejprve se věnujme zlepšení prvních dvou vlastností obrazu - rozlišení a kontrastu. Nejjednodušším případem je pouhé zmenšovaní průměru aperturní clony kondenzoru, jíž ovlivňujeme charakter osvětlení z nekoherentního na koherentní, a tím měníme i rozlišení a kontrast. J. J. Lister, dle [3], v první polovině 19. století prokázal, že vzorek osvětlený svazkem jdoucím mimo objektiv se jeví jako zářící na temném pozadí. Na principu objeveném Listerem je založena tzv. metoda temného pole. Ta se dále dělí na metodu přímého osvětlení v temném poli a metodu šikmého osvětlení v temném poli. Díky šíkmému osvětlení je možné výrazně zvýšit rozlišovací schopnost mikroskopu. Na podobném principu jako temné pole funguje metoda Rheinbergova kontrastu.

S dalším objevem přišel Holanďan Frits Zernike v roce 1934 vynálezem tzv. fázového kontrastu. Zernike o něm píše v článku [4]. Metodou fázového kontrastu zviditelňujeme předměty, jež výrazně nemění amplitudu procházejícího světla, nýbrž pouze fázi. Takovými objekty jsou např. bakterie nebo buňky. Realizace Zernikova kontrastu vyžaduje použití speciálních clon umístěných jak v předmětové ohniskové rovině kondenzoru, tak v obrazové ohniskové rovině objektivu. Nejedná se tedy o metodu, u níž dochází k ovlivnění světla pouze v předmětové ohniskové rovině kondenzoru.

Další požadovanou vlastností obrazu je jeho schopnost poskytnout trojrozměrnou in-

formaci. Pro tento účel bylo vyvinuto mnoho zobrazovacích technik, z nichž mnohé jsou založeny na dělení apertury objektivu a kondenzoru. O jejich využití se můžeme více dozvědět např. z článku [5].

V 80. letech minulého století však byla vyvinuta technika pro 3-D zobrazování využívající rotující apertury kondenzoru, která nám umožňuje získat okamžitou informaci o 3-D struktuře objektu. Tuto techniku se nepodařilo prozatím příliš prosadit. Na hledání jejích aplikací se ovšem v současné době pracuje.

V říjnu roku 2007 byl vydán článek [1] pojednávající o využití dataprojektoru jako osvětlovače pro optický mikroskop. Autorům tohoto článku se podařilo nahradit optomechanické členy vkládané pod kondenzor pomocí jejich obrazu vytvořeného dataprojektorem. Takto bylo docíleno osvětlení metodami zvyšujícími rozlišení a kontrast. Na stejném principu lze však napodobit i jiné osvětlovací metody, např. rotující aperturu kondenzoru.

2.2 Ovlivnění rozlišení obrazu změnou velikosti průměru apertury

Zvětšováním průměru aperturní clonky v předmětové ohniskové rovině kondenzoru měníme osvětlení z koherentního na nekoherentní. Jinak řečeno, zdroj přechází z bodového na plošný. Změnou osvětlení z koherentního na nekoherentní zvyšujeme výrazně rozlišovací schopnost mikroskopu. Vysvětlení tohoto jevu je uvedeno např. v [6] na str. 49-54.

Odvození vztahu pro rozlišovací schopnost mikroskopu vychází z modelu difrakce na dvou nekonečně tenkých propustných štěrbinách v nepropustném stínítku, jejichž vzdálenost je Δ. Stínítko je umístěno v předmětové rovině mikroskopu. V takovémto uspořádání je rozlišovací mez Δ_{NEKOH} rovna

$$\Delta_{NEKOH} = \frac{\lambda}{2A}, \tag{2.2.1}$$

osvětlíme-li vzorek nekoherentně. λ je vlnová délka procházejícího světla a A je numerická apertura objektivu. Pro stejný model ovšem s koherentním osvětlením se zhorší rozlišovací schopnost Δ právě dvakrát na Δ_{KOH}. Přižemž

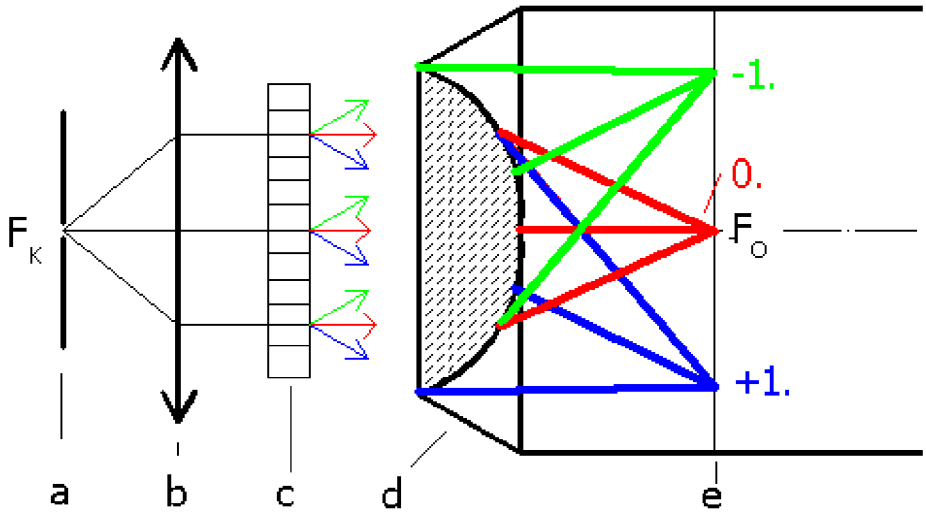
$$\Delta_{KOH} = \frac{\lambda}{A}. \tag{2.2.2}$$

Z uvedeného vyplývá, že nekoherentním osvětlením lze dosáhnout lepšího rozlišení, tedy je lepší využívat místo bodového zdroje zdroj plošný.

2.3 Ovlivňování rozlišení a kontrastu

2.3.1 Dělení objektů dle jejich účinku na procházející světlo

V mikroskopii obecně rozlišujeme dva typy objektů pro pozorování. Jsou jimi amplitudové (absorpční) objekty a fázové objekty. Amplitudové objekty snižují amplitudu procházejícího světla. Světlo prochází objektem a zde difraktuje. Paprsky vycházející pod různými úhly z jednoho bodu na objektu vzájemně interferují v obrazové rovině v místě geometrického obrazu daného bodu. Místa vzorku s vyšší absorpcí se zobrazí jako tmavší, naproti tomu místa s nižší absorpcí se budou jevit světlejší. Takto je vytvořen amplitudový kontrast.



Obrázek 2.3.1: a - Předmětová ohnisková rovina kondenzoru, b - Kondenzor, c - Předmětová rovina objektivu. Zde je umístěna fázová mřížka, na níž dochází k difrakci. d - Objektiv, e - Výstupní pupila objektivu ležící v jeho obrazové ohniskové rovině. Ve výstupní pupile pozorujeme Fraunhoferovu difrakci na mřížce.

Fázové objekty nemění amplitudu procházejícího světla, nýbrž jeho fázi. Místa v obraze se budou lišit, analogicky s amplitudovými objekty, fází a v obrazové rovině bude pouze kontrast fází. Ten je ovšem okem neviditelný. Je nezbytné jej proměnit v kontrast amplitudový. Metod, jak toho docílit, je mnoho a mluvíme o nich v odst. 3.2. Fázové předměty lze též zviditelnit nepatrným rozostřením obrazu. Nevýhodu ale je, že rozostřením obrazu se zhoršuje jeho rozlišení.

2.3.2 Zobrazování fázových objektů

Existuje mnoho mikroskopových metod, které zvyšují kontrast při zobrazování fázových objektů. Některé z nich zvyšují i rozlišení obrazu. Pro jejich vysvětlení a pochopení bude ovšem potřeba alespoň naznačit, jak vzniká obraz vzorku v mikroskopu.

V Abbeho teorii zobrazení fázových struktur, kterou nalezneme např. v [7] na str. 120, se vychází z modelu fázové mřížky s konstantními rozestupy. V tomto modelu, jenž je zakreslen na obr. 2.3.1, je mřížka umístěna v předmětové rovině objektivu. V předmětové ohniskové rovině kondenzoru se nachází bodový zdroj a na mřížku tak dopadá rovinná vlna. Světlo dopadající na mřížku zde difraktuje a vchází do objektivu. V jeho obrazové ohniskové rovině, tj. výstupní pupile[1], vzniká Fraunhoferův difrakční obrazec mřížky. Na obr. 2.3.1 je zachycen chod paprsků.

Po výpočtu rozložení intenzity a fáze ve Fraunhoferově obrazci v modelu pravidelné fázové mřížky zjistíme, že nulté maximum[2] je fázově zpožděno o $+\pi/2$ resp. $-\pi/2$ oproti vedlejším lichým resp. sudým difrakčním maximům. Výpočet je proveden např. v [7] na str. 120-124.

[1] U většiny mikroskopových objektivů leží výstupní pupila objektivu v jeho obrazové ohniskové rovině.

[2] V dalším textu je pod pojmem maximum myšleno výhradně difrakční maximum ve Fraunhoferově difrakčním obrazci v obrazové ohniskové rovině objektivu.

Ještě před uvedením metod je dobré si připomenout několik skutečností. Maxima vyšších řádů odpovídají vyšším prostorovým frekvencím ve vzorku. Čím vyšší řád maxima projde pupilou objektivu, tím jemnější strukturu můžeme rozlišit[3]. Dále platí, že čím více maxim do mikroskopu projde, tím přesněji se bude shodovat obraz s předmětem. Teoreticky vzato, kdyby se na zobrazování podílela všechna difrakční maxima, dostali bychom úplnou shodu objektu a obrazu. To však v praxi samozřejmě není možné.

Pokud nijak nezasáhneme do osvětlení a necháme fázový objekt zobrazovat tak, jak je naznačeno na obr. 2.3.1, dostáváme metodu přímého pozorování ve světlém poli. Rozmístění maxim ve výstupní pupile objektivu je naznačeno na obr. 2a). Jak je vidět z obr. 6a) a obr. 7b), při použití této metody se fázové objekty jeví nekontrastní.

Metody, kterými docílíme zvýšení kontrastu, případně rozlišení, jsou tyto:

1. Ze zobrazování vyloučíme nulté maximum (obr. 2.3.2b)). V tomto případě projde pupilou objektivu jen to světlo, které se rozptyluje na vzorku. Obraz je vyplněn tmavým pozadím, z nějž vystupují svítící struktury, jež rozptylují světlo. Tato metoda se nazývá přímé pozorování v temném poli nebo častěji temné pole.

2. Fázově posuneme nulté maximum o $\pi/2$ (obr. 2.3.2c)). Tím zajistíme, že v obrazové rovině spolu budou interferovat paprsky s fázovými rozdíly 0 resp. π a kontrast fází tak změníme na amplitudový kontrast. Metodu vyžívající tohoto principu nazýváme fázový kontrast. Příklad jejího použití je na obr. 2.3.6b).

3. Nulté maximum necháme zbarvit jinou barvou než maxima postranní (obr. 2.3.2b)). V obrazové rovině vznikne barevný kontrast. Tato metoda se jmenuje Rheinbergovo osvětlení kontrast. Příklad snímku s Rheinbergovým osvětlením je na obr. 2.3.7a)

4. Odstraníme z pozorování všechna maxima ležící po jedné straně nultého maxima (obr. 2.3.2e)). Tím propustíme maxima vyšších řádů a můžeme tak zobrazit jemnější struktury objektu, tzn. zvýšit rozlišení. To je metoda šikmého osvětlení.

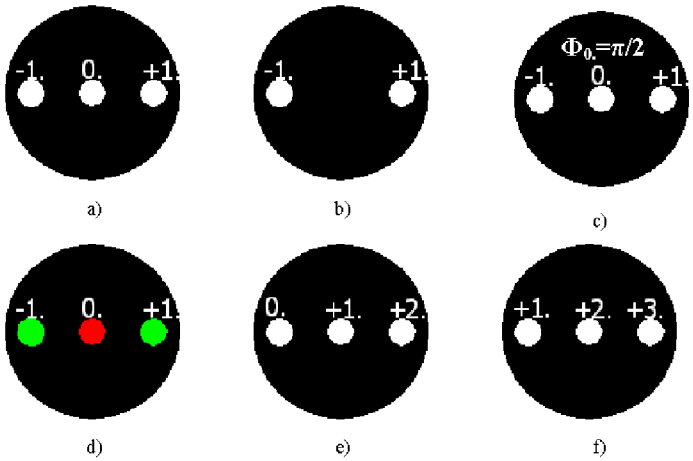
5. Odstraníme z pozorování všechna maxima ležící po jedné straně nultého maxima a samotné nulté maximum (obr. 2.3.2f)). Opět propustíme maxima vyšších řádů a umožníme tak rozlišit jemnější struktury. Díky odstranění nultého maxima navíc zvýšíme kontrast. V obraze tak budou opět vystupovat z temného pozadí svítící struktury, jež rozptylují světlo. Tato metoda dostala jméno šikmé osvětlení v temném poli. Fotografie na obr. 2.3.6c) ukazuje příklad jejího využití.

2.3.3 Praktické provedení metod pro zvýšení kontrastu a rozlišení

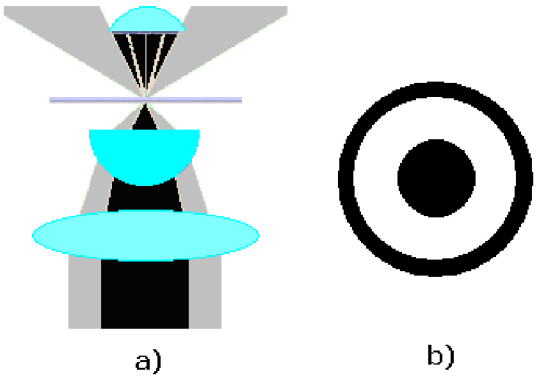
Kdybychom uměli zasáhnout přímo do Fraunhoferova difrakčního obrazce v objektivu a modifikovat tak jednotlivá maxima, pak bychom poměrně snadno mohli aplikovat všechny vyjmenované metody. Fyzický zásah do pupily objektivu však není technicky dost dobře realizovatelný. V praxi se tedy používá jiných postupů. Pro jejich pochopení je dobré si uvědomit, že nulté maximum ve výstupní pupile objektivu odpovídá geometrickému obrazu zdroje v předmětové ohniskové rovině kondenzoru.

Pro aplikaci metody temného pole se nejběžněji využívá klasický kondenzor o vyšší numerické apertuře, než je apertura objektivu. Při použití takového kondenzoru vkládáme

[3]Lze v tom spatřovat projev reciprocity. Velkému v reálném prostoru odpovídá malé ve Fourierově prostoru. Přesnější formulaci nalezneme v [8] v kap. 17.



Obrázek 2.3.2: Rozložení difrakčních maxim ve výstupní pupile objektivu pro a) přímé pozorování ve světlém poli, b) přímé pozorování v temném poli, c) fázový kontrast, d) Rheinbergovo osvětlení, e) šikmé osvětlení a f) šikmé osvětlení v temném poli. Ve fázovém kontrastu je nulté maximum fázově zpožděno o $\pi/2$.

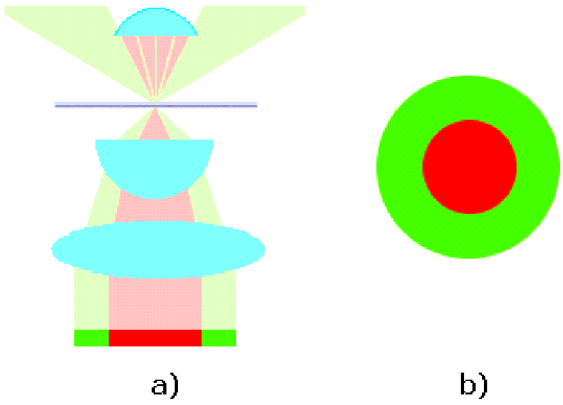


Obrázek 2.3.3: a) Schéma osvětlení v temném poli, b) clonka s propustným mezikružím vkládaná do předmětové ohniskové roviny kondenzoru. Středový kroužek v clonce kondenzoru je volen tak, aby jeho obraz (středu clonky) vyplňoval právě celou plochu výstupní pupily objektivu.

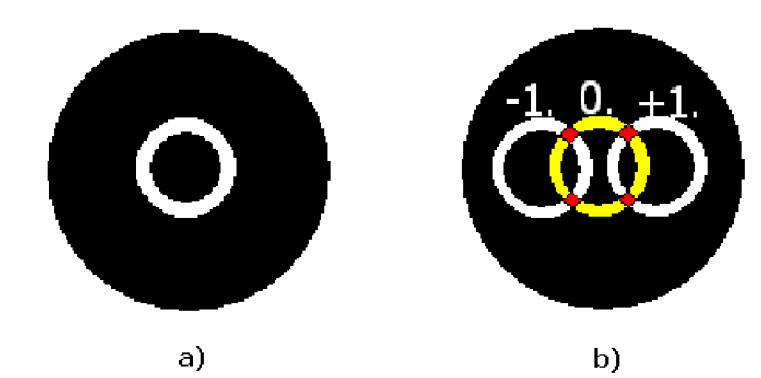
do jeho předmětové ohniskové roviny clonku s propustným mezikružím a nepropustnou středovou částí. Obraz nepropustné středové části právě vyplní výstupní pupilu objektivu, jak je to nakresleno na obr. **??**. Existují ovšem i speciální kondenzory pro temné pole (viz např. [9] str. 85-88, [7] str. 137-143, [9] str. 89-93). Mezi ně patří např. paraboloidní kondenzor a kardioidní kondenzor. Jejich společným znakem je, že světlo se v nich neláme, nýbrž pouze odráží od zrcadlových ploch. Díky nepřítomnosti lámavých ploch jsou tyto kondenzory achromatické i aplanatické.

Pro šikmé osvětlení a šikmé osvětlení v temném poli používáme clonku s kruhovou propustnou částí. Její střed ovšem neleží na optické ose, nýbrž mimo ni. Pokud propustnou část clonky vysuneme z optické osy natolik, že se její obraz dostane právě mimo výstupní pupilu objektivu, pak dostáváme šikmé osvětlení v temném poli. Pokud leží obraz propustné části clonky uvnitř výstupní pupily objektivu, dostáváme metodu šikmého osvětlení. Pro každý vzorek lze přitom nalézt optimální směr a velikost vysunutí této clonky.

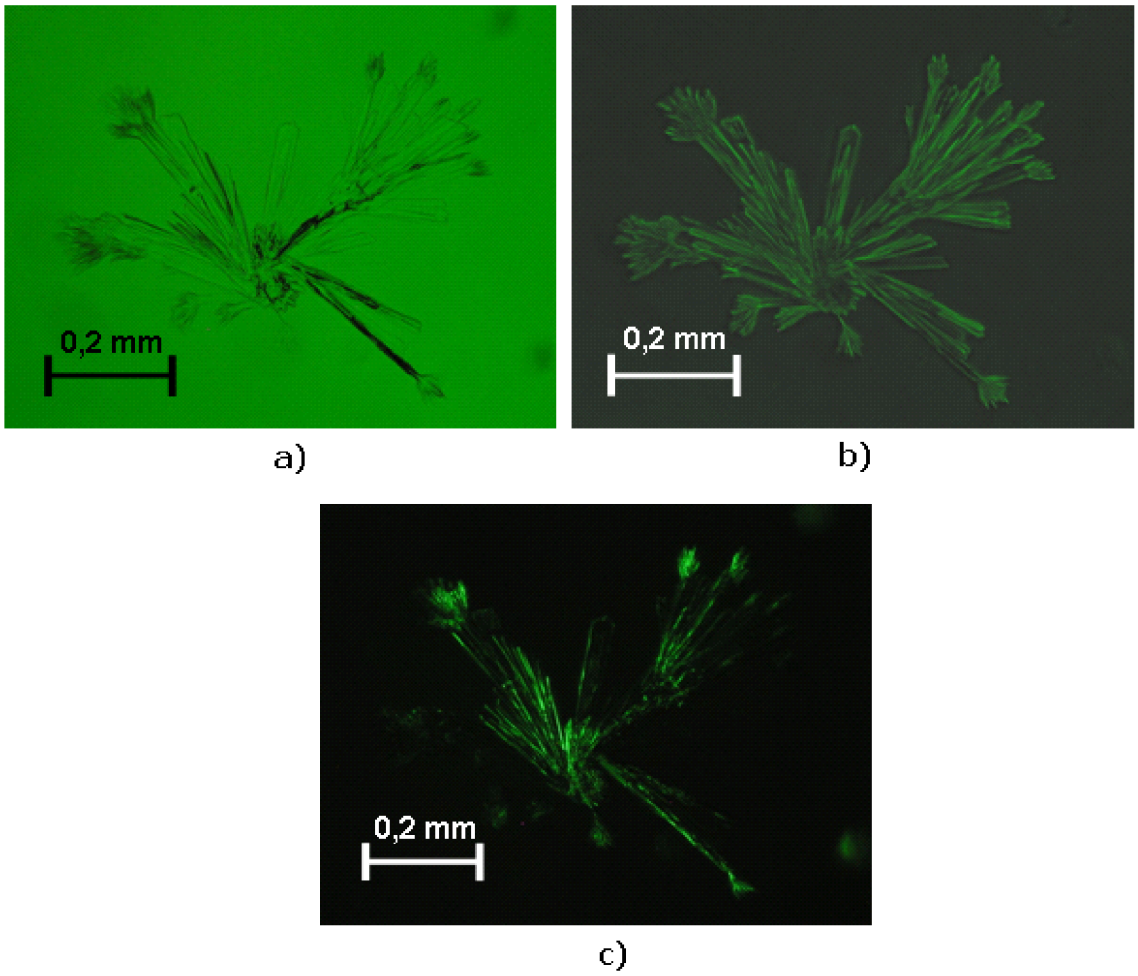
Rheinbergovo osvětlení vytváříme tak, že do předmětové ohniskové roviny kondenzoru



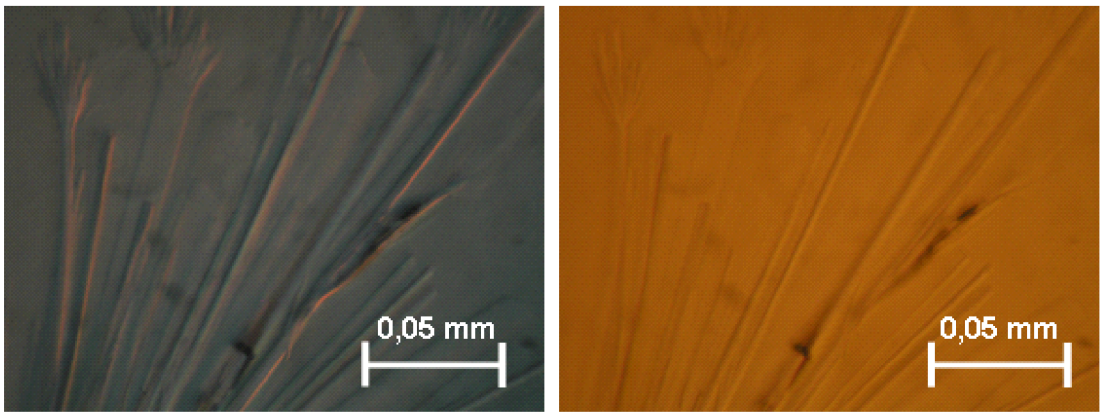
Obrázek 2.3.4: a) Schéma Rheinbergova osvětlení, b) jedna z možností tvaru a barevné kombinace clonky pro Rheinbergovo osvětlení.



Obrázek 2.3.5: Fázový kontrast. a) Clonka v předmětové ohniskové rovině kondenzoru. b) Výstupní pupila objektivu. Nulté maximum, tj. geometrický obraz zdroje, musí splývat s fázovou destičkou. Ta je vyznačena žlutou barvou. Díky volbě clonky ve tvaru mezikruží dochází pouze k malému překryvu jednotlivých maxim. Překryv je označen červenou barvou.



Obrázek 2.3.6: Zobrazení fázového objektu v prosvětlovacím mikroskopu Nikon Alphaphot2 - YS2, objektivem $10 \times /0,25$ ve světlém poli a), b) ve fázovém kontrastu (vpravo nahoře), c) v šikmém osvětlení v temném poli. Ve světlém poli splývá předmět s pozadím, pouze některé struktury rozlišíme. U fázového kontrastu naopak rozlišíme vše, co způsobuje změnu fáze. Při šikmém osvětlení dostáváme velice dobrý kontrast. Ovšem, jak je vidět, ne celý vzorek je rozlišen. Je třeba dbát na to, že každý vzorek vyžaduje při šikmém osvětlení (v temném i světlém poli) optimální nastavení jak velikosti clonky, tak směru jejího vysunutí z optické osy.



a) b)

Obrázek 2.3.7: Zobrazení fázového objektu v prosvětlovacím mikroskopu Nikon Alphaphot2 - YS2, objektivem $60 \times /0,85$ pro Rheinbergovo osvětlení a) a přímé pozorování ve světlém poli b). Zatímco ve světlém poli b) fázový objekt příliš nerozeznáme od pozadí, při použití Rheinbergovy metody a) se objekt jeví červený na modrém pozadí. Navíc je obraz plastický.

umístíme dvoubarevný filtr. Jeho středová část, jejíž obraz právě vyplňuje výstupní pupilu objektivu, propouští světlo jedné barvy. Okraje filtru propouští jinou barvu. Schéma osvětlení pro Rheinbergův kontrast je na obr. 2.3.4.

Poslední metodou je fázový kontrast. Zatímco v předešlých metodách nám stačilo vložit příslušný optomechanický člen do předmětové ohniskové roviny kondenzoru, pro metodu fázového kontrastu je potřeba využít i speciálně uzpůsobeného objektivu. Objektiv pro fázový kontrast je navržen tak, aby jeho obrazová ohnisková rovina ležela na jedné z jeho lámavých ploch, kam je rovněž nanesena fázová destička. Ta má tvar mezikruží a zpožďuje fázi procházejícího světla o $\pi/2$.

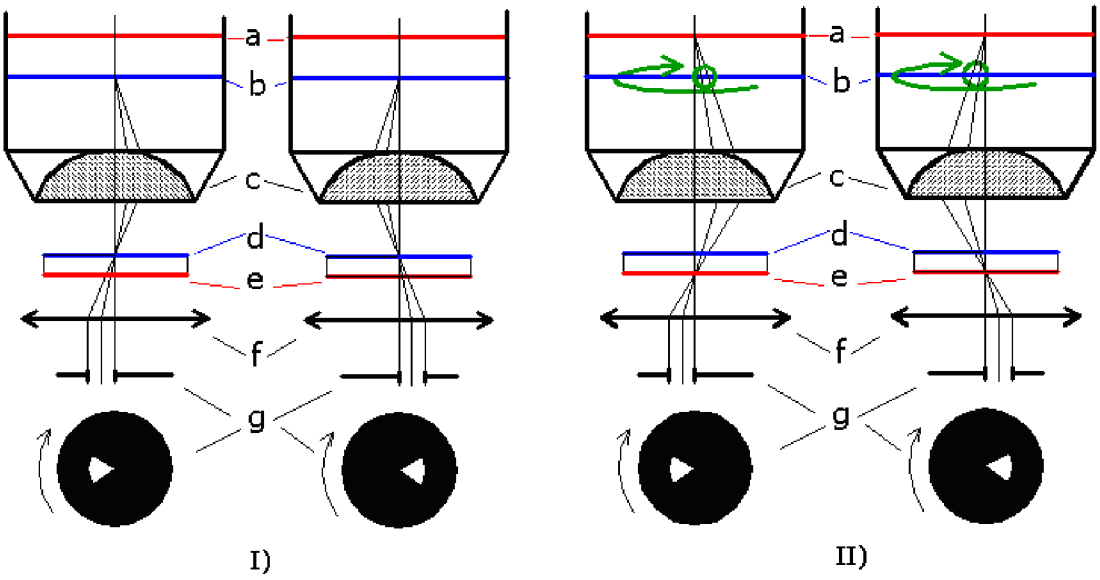
Je zřejmé, že chceme fázově zpozdit pouze nulté maximum a ostatní maxima nechat nezměněna. K tomu potřebujeme, aby fázová destička přesně splývala s geometrickým obrazem zdroje. Taktéž požadujeme, aby postranní maxima nebyla fázovou destičkou vůbec ovlivněna. Pro tyto účely volíme clonku kondenzoru s propustným mezikružím, jak je uvedeno na obr. 2.3.5a). Obraz tohoto mezikruží opravdu přesně odpovídá fázové destičce v pupile objektivu. Přesto dochází k malému překryvu jednotlivých difrakčních maxim, jak je vidět z obr. 2.3.5b).

2.3.4 Získávání informace o trojrozměrnosti objektu dělením apertury kondenzoru

Dělením apertury v kondenzoru dokážeme získat nejen zvýšení kontrastu a rozlišení, ale i informaci o trojrozměrnosti vzorku. Upusťme teď však na chvíli od vlnově optických úvah a sledujme chod paprsků dle principů geometrické optiky.

Do předmětové ohniskové roviny kondenzoru, jak je vidět na obr. 2.3.8, vložíme clonku s otvorem o tvaru kruhové výseče. Tuto clonku necháme rotovat okolo optické osy kondenzoru. Bod ve vzorku ležící v předmětové rovině objektivu se zobrazí do obrazové roviny objektivu opět jako bod a jeví se nám zaostřený. Poloha obrazu takového bodu nebude nijak záviset na poloze clonky. Tuto situaci popisuje obr. 2.3.8I).

Mod ležící mimo rovinu ostrosti, tj. bod, který se nachází mimo předmětovou rovinu



Obrázek 2.3.8: Zobrazování pomocí rotující apertury kondenzoru. I) Obraz zaostřeného bodu během rotace clonky zůstává na místě. II) Obraz nezaostřeného bodu, tj. ležícího nad nebo pod předmětovou rovinou objektivu, opisuje během rotace clonky kružnici. a - Sdružená rovina s e. b - Obrazová rovina objektivu. c - Objektiv. d - Předmětová rovina objektivu. e - Rovina nacházející se pod předmětovou rovinou. f - Kondenzor. g - Clonka v předmětové ohniskové rovině kondenzoru.

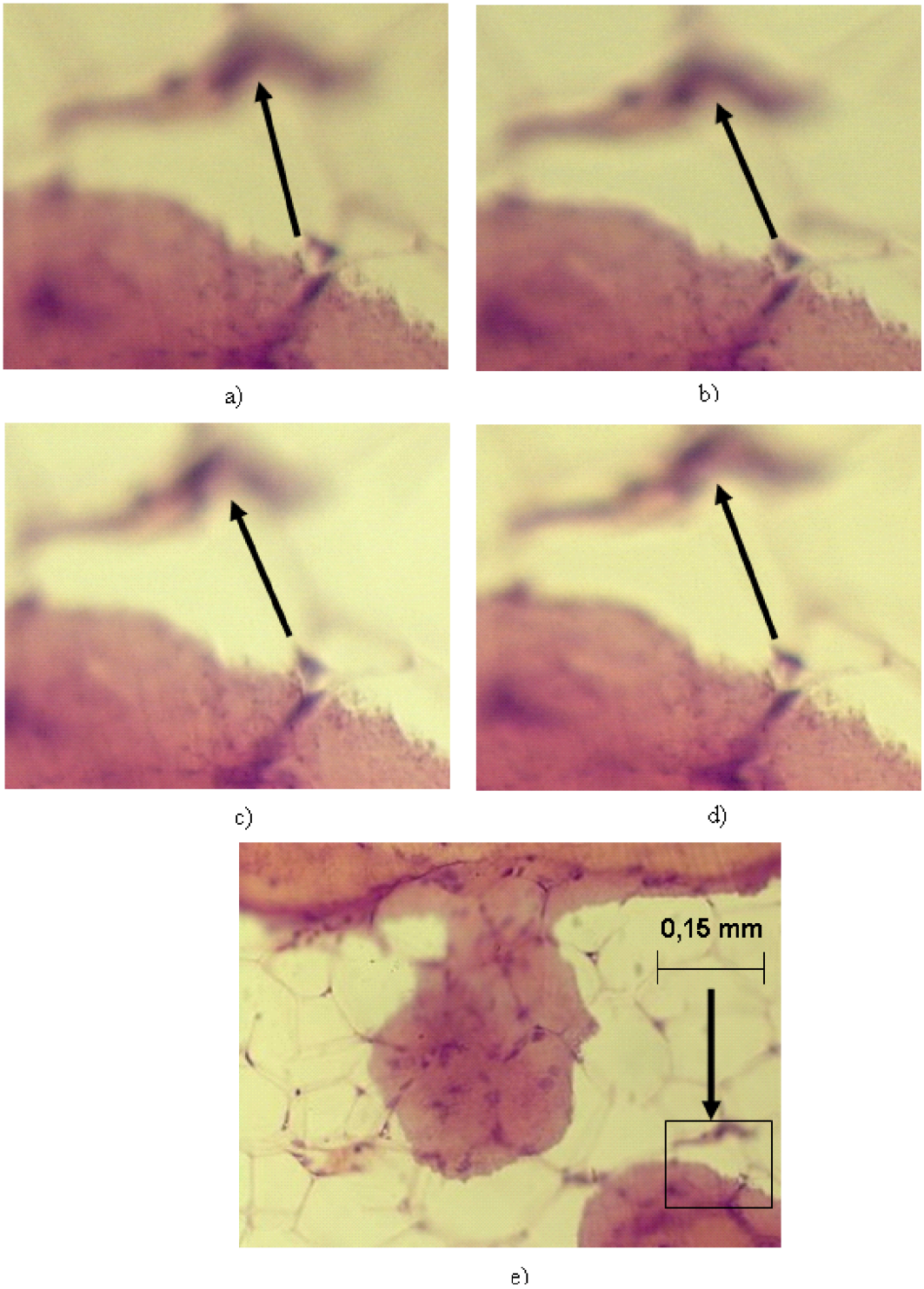
objektivu (nad nebo pod ní), se zobrazí do obrazové roviny objektivu jako neostrá ploška. Poloha této plošky však již bude záviset na poloze clonky. Jak je vidět z obr. 2.3.8II), ploška opisuje během rotace clonky kružnici. Čím dále se zobrazovaný bod nachází od předmětové roviny, tím větší je poloměr této kružnice. Pouhým pozorováním obrazu během rotace clonky tak získáváme okamžitou informaci o objemovém rozložení struktur ve vzorku, a tím i jednoduchou metodu pro trojrozměrné zobrazování.

Výše posaná metoda využívá kondenzor s rotující aperturou a pro její aplikaci je potřeba použít speciální kondenzor vybavený motorkem. Tento motorek je určen pro rotaci clonky. Na obr. 2.3.9 je jeden z příkladů použití kondenzoru s rotující aperturou.

2.3.5 Programovatelná osvětlovací soustava

Všechny výše zmíněné metody využívají při osvětlování optomechanických členů vkládáných do předmětové ohniskové roviny kondenzoru. Tato skutečnost s sebou nese jisté komplikace. Jako nejvýraznější se ukazuje finanční náročnost. V závislosti na zvětšení a numerické apertuře je totiž nutné měnit i velikost clonky v ohniskové rovině kondenzoru, tzn. použít větší či menší clonku. Při změně charakteru osvětlení je zase třeba vyměnit jeden typ clonky za jiný. Pro aplikaci osvětlení s rotující aperturou navíc nestačí vyměnit jen clonku, nýbrž celý kondenzor (viz odst. 2.3.4). Chceme-li tedy využívat všechny ze zmíněných metod, musíme být vybaveni všemi optickými a optomechanickými členy k tomu určenými.

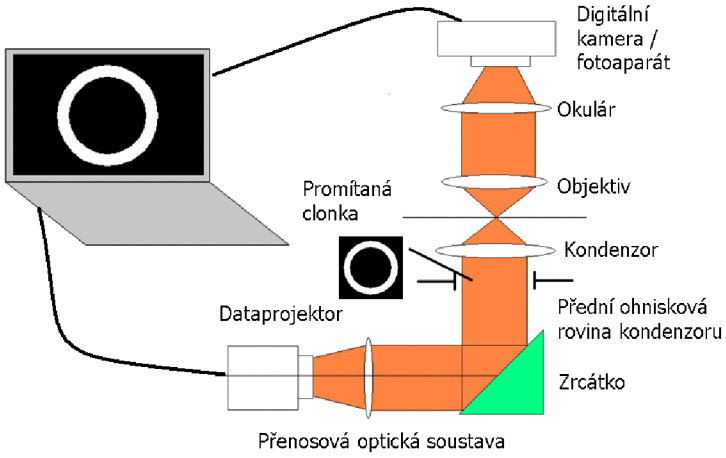
Značné zjednodušení přináší tzv. programovatelná osvětlovací soustava mikroskopu, jejíž schéma je na obr. 2.3.10. Osvětlení pomocí ní probíhá následovně. Na počítači je zvolen tvar, velikost, případně barva clonky kondenzoru. Dataprojektor pak promítne takový obraz do přenosové optické soustavy, která vytváří obraz zvolené clonky v předmětové



Obrázek 2.3.9: Vzorek tukových buněk. a), b), c) a d) jsou detaily předmětu zvýrazněné na obr e). Obrázky a), b), c) a d) představují snímky pořízené při osvětlení s různými polohami clonky v kondenzoru s rotující aperturou. Šipkou je vyznačena struktura, jež se nenachází v předmětové rovině. Jak je vidět srovnáním obrázků a), b), c) a d), v průběhu otáčení clonkou v kondenzoru se struktura pohybuje - opisuje kružnici, zatímco zaostřené struktury zůstávají na mísě.

ohniskové rovině kondenzoru, kde není umístěn žádný přídavný optomechanický člen. Přičemž jsou místa v ohniskové rovině, která by odpovídala nepropustným částem clonky, nasvícena světlem s minimální možnou inezitou, jakou je projektor schopen poskytnout. Dále osvětlení probíhá stějně jako při jiných metodách. Tzn., že kondenzor opět zajistí rovnoměrné osvětlení vzorku, jehož obraz je vytvářen mikroskopem. Na schématu 2.3.10 je pak ještě zakreslen digitální fotoaparát připevněný k mikroskopu. Pomocí něj můžeme dostat obraz vzorku zpět do počítače a proces snímání a osvětlování tak synchronizovat.

Použitím programovatelné osvětlovací soustavy v kombinaci s vhodným software můžeme získat osvětlení pomocí všech dříve zmíněných metod, a to pro libovolný objektiv. Jakoukoli změnu osvětlení jsme pak schopni provést v rámci zlomků vteřiny pouhým stiskem klávesy počítače.



Obrázek 2.3.10: Schéma programovatelné osvětlovací soustavy. Na obrazovce počítače zvolíme, jaký obraz se má promítnout do předmětové ohniskové roviny kondenzoru. Obraz osvětleného vzorku snímáme digitálním fotoaparátem a data posíláme zpět do počítače.

2.4 Shrnutí

V této kapitole jsme se seznámili se základními principy metod pozorování využívající při osvětlení zásah do předmětové ohniskové roviny kondenzoru. Viděli jsme, že ovlivněním osvětlení jsme schopni změnit rozlišení, kontrast i získat informaci o trojrozměrnosti vzorku.

Pro co nejlepší rozlišení používáme k osvětlení nekoherentní světlo. Výstupní pupilou objektivu se snažíme propustit difrakční maxima vyšších řádů.

U některých předmětů (zejména fázových) není kritickým faktorem pouze rozlišení, nýbrž i kontrast. Ten lze zvýšit např. odchýlením primárního svazku (nultého maxima) mimo objektiv, změnou fáze primárního svazku nebo barevným odlišením nultého maxima od maxim postranních.

Okamžitou informaci o prostorovosti vzorku můžeme získat např. dělením apertury kondenzoru. Jednou z možností, jak toho docílit, je použití kondenzoru s rotující aperturou, kdy v přední ohniskové rovině kondenzoru necháme rotovat otvor tvaru kruhové výseče.

Všechny optické i optomechanické členy, které jsou využívány pro osvětlení v optické mikroskopii, lze nahradit jedinou tzv. programovatelnou osvětlovací soustavou. Ta

umožňuje osvětlení vzorků pomocí všech klasických mikroskopových metod využívajících zásahu do předmětové ohniskové roviny kondenzoru.

Kapitola 3

Osvětlovací soustavy v optické mikroskopii pro osvětlení na průchod

3.1 Úvod

V praktické mikroskopii pozorujeme ve většině případů vzorky, jež nevyzařují vlastní světlo, a je tedy nutné je osvětlit. Pokud se jedná o vzorky průsvitné, můžeme je pozorovat pomocí optického mikroskopu při osvětlení na průchod.

Nejsnáze dostupným zdrojem světla používaným v optické mikroskopii jsou jasně zářící bílé mraky na denní obloze. Pro osvětlení takovýmto zdrojem postačí pouze zobrazit oblaka kulovým či rovinným zrcátkem do roviny vzorku. Takto získáme nejjednodušší osvětlení přirozeným denním světlem. Je ovšem jasné, že s oblohou jako zdrojem nemůžeme vystačit ve všech aplikacích. V dnešní době je každý optický mikroskop využívaný pro vědecké účely vybaven vlastním osvětlovacím systémem. Ten se skládá ze zdroje světla a osvětlovací soustavy, která přivádí světlo na vzorek. Každý takový systém přitom musí zajistit, aby

- celé zorné pole bylo rovnoměrně osvětleno a aby
- osvětlovací svazek vyplnil pupilu objektivu.

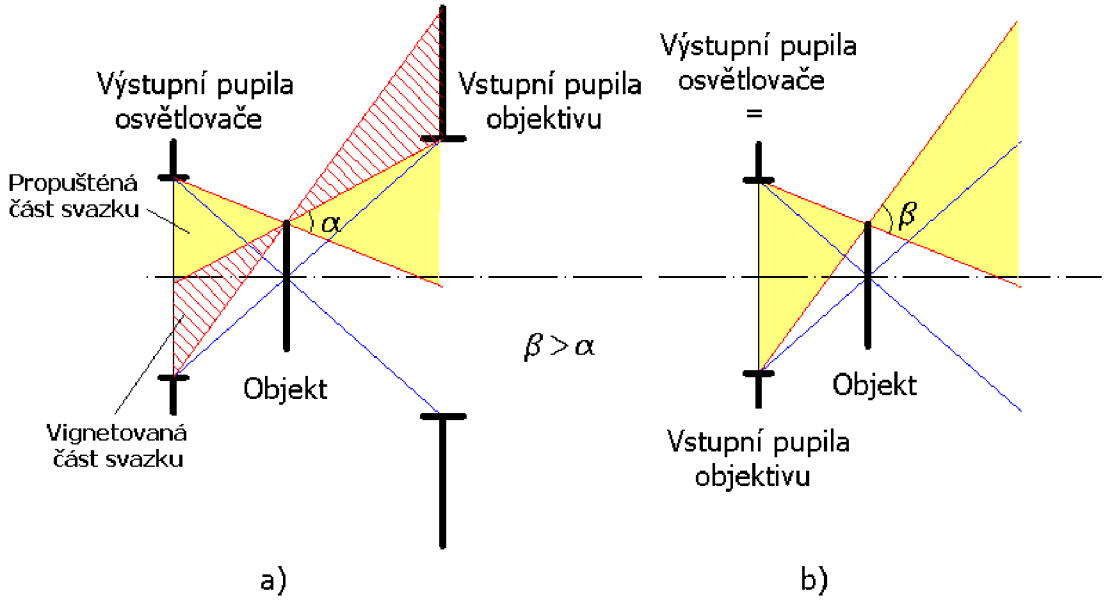
Pro rovnoměrné osvětlení zorného pole je nutné zachovat systém vstupních a výstupních pupil, jak je známo z geometrické optiky (viz např. [10]). To znamená, že výstupní pupila osvětlovacího systému musí splývat se vstupní pupilou mikroskopového objektivu. Na obrázku 3.1.1 vidíme, co se stane, když systém pupil nedodržíme. V případě b) je každý bod zorného pole osvětlen přes celou pupilu, zatímco v případě a) dochází směrem k okrajům zorného pole k postupné vinětaci svazků. Tento efekt se tolik neprojeví při pozorování s objektivem o velkém zvětšení, neboť pozorujeme pouze malé zorné pole. Při pozorování větších zorných polí však dochází k výraznější vinětaci.

Publikace [11] rozlišuje se pro osvětlení vzorku v mikroskopu dva typy:

* *kritické osvětlení* (viz odst. 3.2),
* *Köhlerovo osvětlení* (viz odst. 3.3).

3.2 Kritické osvětlení

Jak jsme uvedli v úvodu k této kapitole, pro rovnoměrné osvětlení vzorku je nutné, aby výstupní pupila osvětlovače splývala se vstupní pupilou mikroskopu. U většiny objektivů



Obrázek 3.1.1: Výstupní pupila osvětlovače a) nesplývá resp. b) splývá se vstupní pupilou objektivu. V případě a) jsou okraje zorného pole osvětleny užším svazkem než střed zorného pole.

se výstupní pupila nachází v jejich obrazové ohniskové rovině, takže platí tvrzení: „Má-li výstupní pupila osvětlovací soustavy splynout se vstupní pupilou objektivu, musí být v předmětové ohniskové rovině osvětlovací soustavy umístěna clona, která tvoří vstupní pupilu kondenzoru ...“.Viz [7]. Jak je vidět z obr. 3.2.1, clona je kondenzorem zobrazována do nekonečna a odtud objektivem do obrazové ohniskové roviny.

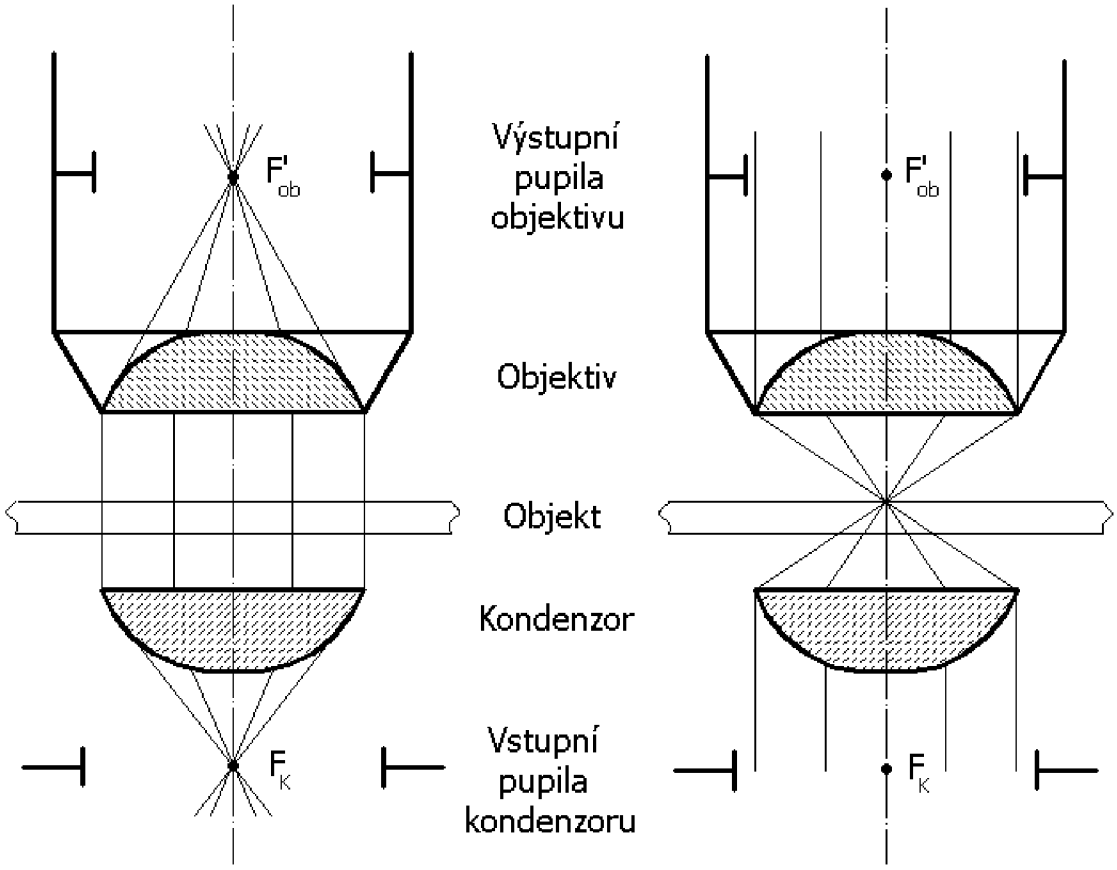
Pro kritické osvětlení, na obr.3.3.1 dole, je charakteristické, že zdroj světla je zobrazován na vzorek. Zdroj se přitom snažíme co možná nejvíce oddálit od kondenzoru z toho důvodu, aby se lampa zobrazila na vzorek pod co největším úhlem.[1] Plynulou změnou velikosti otvoru aperturní clonky kondenzoru můžeme úhel osvětlení jednoduše měnit. Polní clonou, která je umístěna těsně za světelným zdrojem, zase vymezujeme zorné pole. Polní clona se totiž spolu se zdrojem zobrazuje na vzorek.

Systém postavený na principu kritického osvětlení se jeví nevhodný v případě, kdy jas osvětlovacího zdroje není rovnoměrný. Tak je tomu např. v případě žárovek či výbojek. Obraz takového zdroje na vzorku vytváří artefakty a zkresluje obraz vzorku.

3.3 Köhlerovo osvětlení

U obou typů osvětlení, Köhlerova i kritického, můžeme měnit úhel osvětlení vzorku pomocí aperturní clonky kondenzoru a velikost zorného pole pomocí polní clonky. Köhlerovo

[1] Proto někdy bývá mezi zdroj a kondenzor vkládán ještě další optický člen, do jehož ohniska zdroj vkládáme. Vložením tohoto členu zajistíme paralelní chod paprsků vstupujících do kondenzoru. Kondenzor láme parsky do svého obrazového ohniska, a tak je vzorek osvětlen pod největším možným úhlem. Na schématu na obr. 3.3.1 nicméně zmíněný optický člen není zakreslen, protože se zabýváme spíše principem kritického osvětlení než jeho konkrétním provedením. O jeho použití je však možné se více dozvědět např. z [2].

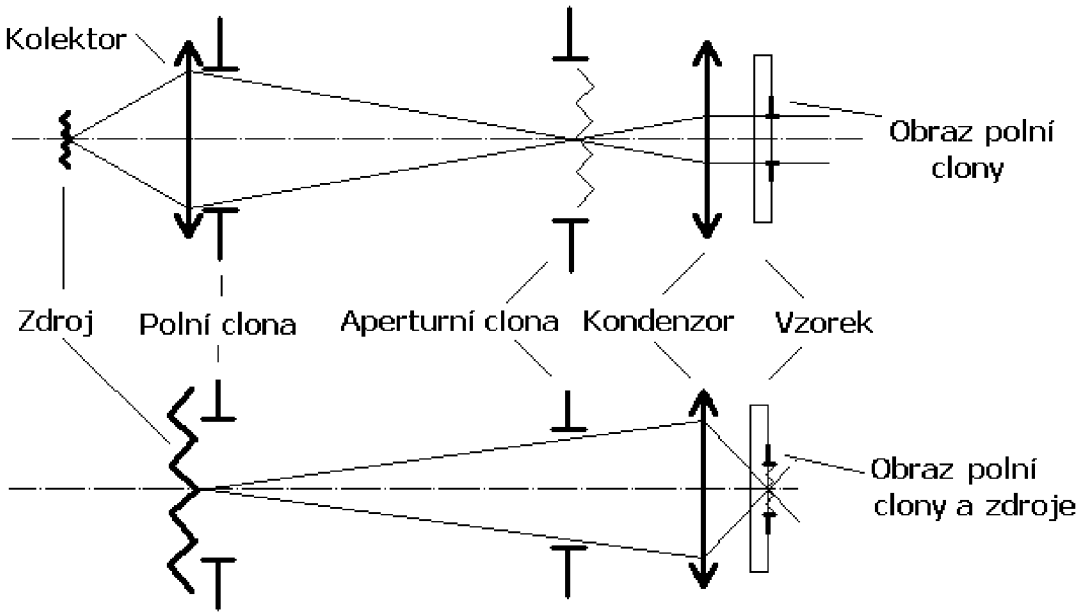


Obrázek 3.2.1: Schéma pupil kondenzoru a objektivu. Vstupní pupilou kondenzoru je clona umístěna v jeho předmětové ohniskové rovině.

osvětlení se od kritického liší zejména tím, že zdroj světla se zde nezobrazuje na vzorek, nýbrž do vstupní pupily kondenzoru. To je vidět z obr. 3.3.1 nahoře. V tomto uspořádání získáváme rovnoměrné osvětlení celého námi zvoleného zorného pole pod plným aperturním úhlem nezávisle na rozložení jasu zdroje. Abychom však byli schopni celou aperturu prosvětlit, je nutné aby obraz zdroje vyplnil celou vstupní pupilu kondenzoru. Pro zobrazení zdroje na místo aperturní clonky kondenzoru slouží optický člen zvaný kolektor.

3.4 Srovnání obou typů osvětlení

V knize [2] je uvedeno, že chceme-li získat maximální rozlišení obrazu, musíme vždy použít kritického osvětlení. Köhlerův systém je dle této knihy pouze jeho nedokonalou náhradou. Podle [11] se dokonce v některé literatuře označuje kritické osvětlení za osvětlení nekoherentní, zatímco Köhlerovo za koherentní. Výpočet v [11] ze str. 595-597 však ukazuje, že obě osvětlení jsou nekoherentní. Též odsud plyne, že rozlišovací schopnost je v obou případech stejná. V dnešní době je ovšem Köhlerovo osvětlení využíváno mnohem častěji než kritické. Zdroje světla, které jsou nyní používány, nejsou totiž pro kritické osvětlení vhodné.



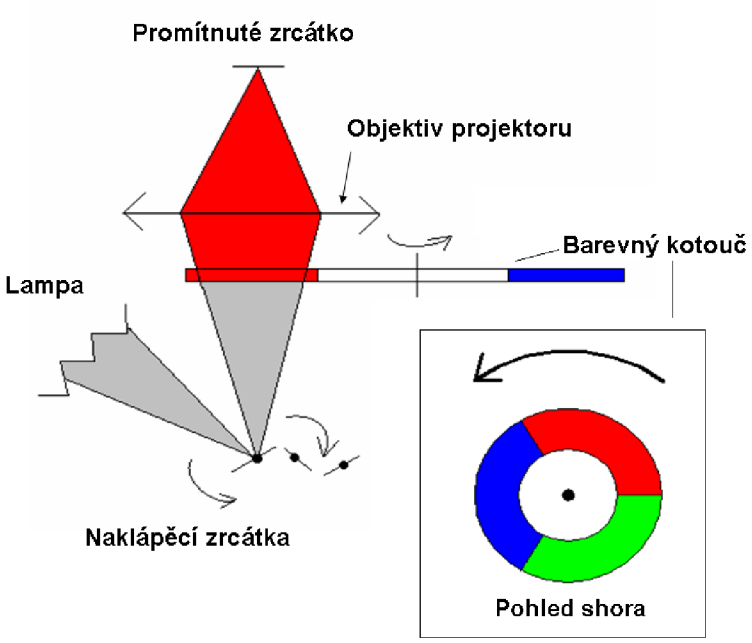
Obrázek 3.3.1: Nahoře - schéma Köhlerova osvětlení. Dole - schéma kritického osvětlení.

3.5 Diskuze

Na základě uvedených informací týkajících se osvětlovacích soustav zde uvádíme diskuzi toho, jaký typ osvětlení využijeme pro návrh optické přenosové soustavy, o které se zmiňujeme v kapitole 2. Nelze dost dobře rozhodnout, na jakém pricipu bude navržená soustava pracovat, bez znalosti základních vlastností zdroje. Proto světelnému zdroji nyní věnujeme více pozornosti.

Označit dataprojektor za světelný zdroj je nesprávné, neboť projektor sám je optickou soustavou navrženou navíc pro promítání, nikoli pro osvětlení. Projektor, který používám ve své práci, pracuje na pricipu DLP technologie a jeho zjdenodušené schéma je nakresleno na obr. 3.5.1. Tato technologie využívá pro zobrazení tzv. DMD (Digital Micromirror Device), známého též pod názvem DLP čip, což je součástka s mnoha mikrozrcátky. Každé mikrozrcátko se jako malá ploška zobrazuje na plátno. Čip tedy leží v předmětové rovině objektivu projektoru (!). Zrcátka mohou být nazávisle na sobě naklápěna do dvou krajních poloh. V jedné poloze zrcátko odráží světlo ze zdroje do objektivu, jak je to vidět z obr. 3.5.1. V druhé poloze se naopak světlo odráží mimo promítací soustavu. Intenzita osvětlení dané plošky v obraze je dána dobou, po kterou zůstane mikrozrcátko v jedné či druhé poloze. Barva v obraze je pak vytvářena pomocí rotujícího barevného kotouče, kterým světlo do objektivu prochází. Kotouč je rozdělen na tři stejně velké části, které jsou vyplněny postupně červeným, zeleným a modrým filtrem. V některých případech je kotouč rozdělen do čtyřech částí, z nichž poslední bývá prázdná a zajišťuje vyšší jas obrazu.

Jak jsme uvedli v kap. 2, jde nám o to, zobrazit do předmětové ohniskové roviny kondenzoru obraz, jejž si zvolíme na obrazovce počítače. V termínech geometrické optiky chceme, aby obraz DLP chipu splýval se vstupní pupilou kondenzoru. Světelný zdroj v da-



Obrázek 3.5.1: Princip vytváření obrazu pomocí DLP technologie.

taprojektoru, rtuťová výbojka, je pro nás v tomto ohledu nezajímavý. To vede k závěru, že za zdroj světla nyní budeme považovat obraz DLP chipu vytvořený objektivem dataprojektoru. Jinými slovy, zdrojem světla se stává obraz, který má projektor za normálních okolností promítat na plátno. Neboť chceme zobrazit zdroj do přemětové ohniskové roviny kondenzoru, tj. na místo jeho vstupní pupily, budeme chtít navrhnout osvětlovač Köhlerův, nikoli kritický.

Kapitola 4

Návrh osvětlovací soustavy

4.1 Úvod

Abychom mohli realizovat osvětlení pomocí programovatelné osvětlovací soustavy, je nutné vytvořit vhodnou optickou přenosovou soustavu, jež přenáší obraz z dataprojektoru do obrazové ohniskové roviny kondenzoru. Článek [1] sice pojednává o osvětlení vzorku pomocí dataprojektoru a ukazuje, že pomocí něj a vhodné osvětlovací soustavy lze napodobit klasické osvětlovací metody. O samotném optickém návrhu se však zmiňuje pouze velice stručně. Osvětlovací soustavu jsme tedy museli navrhnout od začátku.

Při návrhu přenosové soustavy jsme museli vyřešit některé obtíže. Ty plynou zejména z faktu, že dataprojektor není navržen pro osvětlení, nýbrž pro promítání obrazu. Překážky, které jsme museli překonat, jsem se snažil popsat v následujícím odstavci. Okótované schéma je na obr. 4.2.1, nejdůležitější rozměry jsou uvedeny v tabulce 4.1.

* Dataprojektor ACER XD 1270D, stejně jako mnoho jiných komerčních dataprojektorů, neumožňuje osové promítání obrazu. Střed obrazu je promítán pod úhlem $\phi = (12 \pm 1)^\circ$ vzhledem k optické ose.

* Světelný zdroj dataprojektoru, rtuťová výbojka, osvětluje (přes vlastní osvětlovací soustavu projektoru) DLP čip s mnoha naklápěcími zrcátky. Pomocí nich a objektivu je výbojka zobrazena do výstupní pupily dataprojektoru. Ta leží uvnitř dataprojektoru, $x' = (-61 \pm 2)\,\mathrm{mm}$ od referenční roviny (viz schéma na obr. 4.2.1). Je potřeba zajistit, aby se Hg výbojka nezobrazovala do blízkosti předmětové roviny mikroskopového objektivu.

* Při promítání dochází zejména z důvodu rotace barevného kotouče k fluktuacím světelného toku v čase. Tento jev je viditelý i pouhým okem. I při letmém pohledu na svazek vysílaný projektorem lze vidět záblesky červené, zelené a modré barvy.

* Kontrast, kterého projektor při zobrazování dosahuje, je významně menší než jedna. Místa, která by při použití klasických metod příslušela nepropustným částem clonky, jsou nyní osvětlena. To vede ke zhoršení kontrastu v obraze vzorku.

V následujících odstavcích se budeme zabývat možnostmi odstranění těchto obtíží a popisu návrhu optické přenosové soustavy.

Parametry projektoru	Označení	Rozměr
Průměr výstupní pupily	Φ'_{VP}	$(8,50 \pm 0,45)$ mm
Vzdálenost výstupní pupily od okraje	x'_{VP}	(-61 ± 2) mm
Vzdálenost obrazu	x'	(3000 ± 50) mm
Výška obrazu	y'	(500 ± 10) mm
Úhel promítání	ϕ	$(12 \pm 1)^\circ$
Ostatní parametry	Označení	Rozměr
Průměr max. zorného pole	Φ_{ZPMAX}	$(1,58 \pm 0,01)$ mm
Ohnisková vzdálenost kondenzoru	f'_k	$(8,80 \pm 0,06)$ mm
Průměr vstupní pupily kondenzoru	Φ_{PK}	$(28,7 \pm 0,1)$ mm

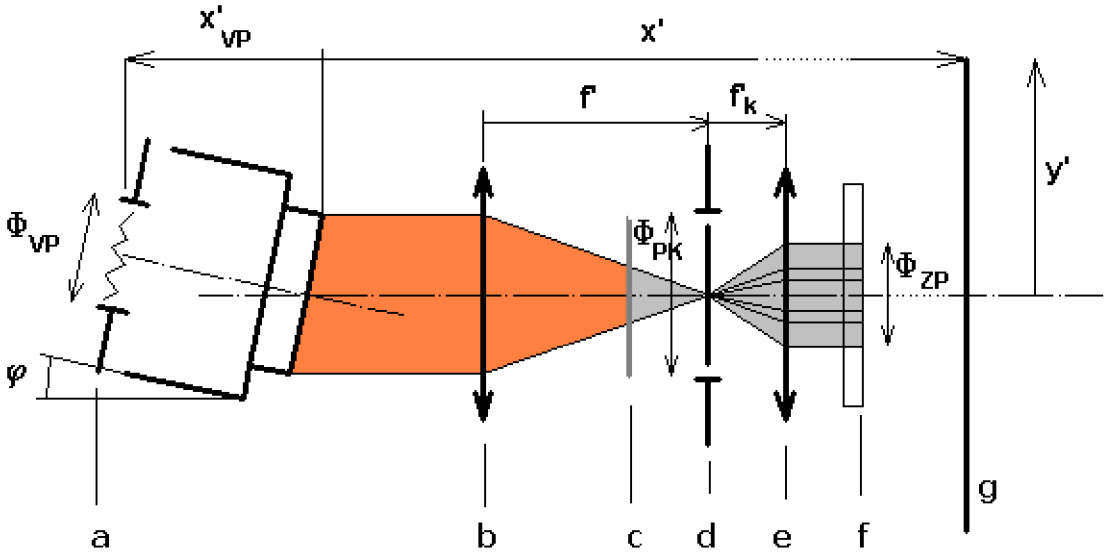
Tabulka 4.1: Parametry projektoru a ostatních členů použitých v osvětlovací soustavě. Vzdálenost a výška obrazu měřeny při nastavení hodnot ZOOM=MIN a FOCUS=MAX přímo na dataprojektoru.

4.2 Měření parametrů

Všechny důležité parametry, jež jsme museli při návrhu respektovat, jsou pro přehlednost uvedeny v tabulce 4.1. Polohu x'_{VP} a velikosti Φ'_{VP} výstupní pupily projektoru a ohniskovou vzdálenost kondenzoru f'_k jsme měřili na optické lavici ve firmě Meopta. f'_k jsme změřili pomocí Cornuovy metody. Pro změření parametrů pupil projektoru jsme použili speciální optický mikroskop.

Ostatní parametry jsou měřeny v naší laboratoři. Velikost zorného pole jsme zjistili zobrazením milimetrového kalibru do obrazové roviny mikroskopu. Polohu a velikost obrazu jsme získali měřením obrazu promítaného na zeď.

Polohy x'_{VP} a x' jsou vztahovány k referenční rovině (viz obr. 4.2.1), kterou jsme označili za okraj projektoru.



Obrázek 4.2.1: Schéma osvětlení využívajícího jako přenosovou soustavu jedinou čočku. a - výstupní pupila projektoru s obrazem Hg výbojky, b - spojná čočka $f' = 220\,\mathrm{mm}$, c - šedý filtr, d - předmětová ohnisková rovina kondenzoru (vstupní pupila), e - kondenzor, f - vzorek, g - obraz promítaný dataprojektorem

Kapitola 5

Experiment

5.1 Úvod

Součástí mé diplomové práce bylo i experimentální ověření funkce programovatelné osvětlovací soustavy tak, jak je popsána v kap. 2. Při realizaci experimentů jsme chtěli demonstrovat, že s pomocí dataprojektoru jsme schopni uskutečnit osvětlení všemi mikroskopovými metodami popsanými v kap. 2.

5.2 Vymezení pojmů

Pro přehlednost vymezíme co nejpřesněji pojmy používané v této kapitole. Od této chvíle budeme označovat osvětlení, které využívá vkládání optomechanických členů do předmětové ohniskové roviny kondenzoru, jako *osvětlení tradiční cestou*. Metody pro osvětlení popsané v kap. 2, včetně metody kondenzoru s rotující aperturou, budeme nazývat *klasickými metodami*. Programovatelná osvětlovací soustava v této kapitole vystupuje pod zkratkou POS.

5.3 První uspořádání - jednoduchá osvětlovací soustava

První uspořádání vychází z modelu popsaném v odst. **??**. Jako přenosový člen jsme použili spojnou čočku s ohniskovou vzdáleností $f' = (220 \pm 10)$ mm.

S tímto uspořádáním jsme zkoušeli na dva různé objekty aplikovat některé metody z kap. 2.

Prvním vzorkem jsou škrobová zrna fazolu obecného ve vodě. Tento objekt je dobře viditelný i bez použití technik pro zvýšení kontrastu.

Druhým vzorkem je fázový objekt. Je to nečistota, která vznikla pod krycím sklíčkem mikroskopového preparátu při jeho vytváření. Tento vzorek je vhodný pro demonstraci zobrazování fázových objektů, neboť jej nelze ve světlém poli dobře zviditelnit.

Nejzdařilejší snímky jsme uvedli v následujícím odstavci. Zde též nalezneme srovnání snímků pořízených pomocí POS (na obr. 5.3.1 a 5.3.3 vpravo) se snímky vyvořenými osvětlením tradiční cestou (na obr. 5.3.1 a 5.3.3 vlevo). Součástí fotografií (v pravém horním rohu) vzniklých osvětlením POS je též promítaný obraz tak, jak jsme jej zvolili na obrazovce počítače. Je zde uveden jen pro ilustraci, a tak přesné rozměry promítané clonky nemusí odpovídat.

Vzorek	Škrobová zrna fazolu obecného	Fázový objekt - nečistota
Osvětlení tradiční cestou	Nikon $20\times/0,4$	Nikon $40\times/0,65$
Osvětlení pomocí POS	Meopta $20\times/0,45$	Meopta $45\times/0,65$

Tabulka 5.1: Objektivy použité při experimentech. Za názvem výrobce je uvedeno zvětšení a numerická apertura

5.3.1 Zobrazování škrobových zrn klasickými metodami

Světlé pole

Fotografie škrobových zrn fazolu obecného jsou na obr. 5.3.1. a 5.3.2. Při osvětlení škrobových zrn POS jsme na počítači v aplikaci *Projecter* (naprogramoval Matěj Týč, viz [12]) zvolili tvar clonky ve tvaru kroužku. Středová část je bílá [1] a její velikost jsme zvolili tak, aby vyplnila ze 3/4 plochu výstupní pupilu objektivu. To je obvyklý postup. Pupila se nevyplňuje celá, neboť to vede při pozorování ve světlém poli k přesvětlení vzorku, a tím ke snížení kontrastu obrazu. Zbytek obrazu je černý.

Snímky vzorků osvětlených POS se liší od snímků osvětlených tradiční cestou zejména barevným podáním. Jinak můžeme vidět, že v obou případech rozlišíme stejné detaily.

Temné pole

Při osvětlení v temném poli jsme zvolili na počítači bílé mezikruží. Zbylá část obrazovky zůstala černá. Velikost mezikruží byla zvolena tak, aby jeho vnitřní část právě vyplňovala výstupní pupilu objektivu.

Srovnáme-li oba snímky pro temné pole, vidíme, že se opět liší pouze barevně. V obou případech jsou snímky pořízené v temném poli téměř komplementární k fotografiím ve světlém poli. Takže struktury, jež rozptylují světlo, se jeví jako světlé vystupující z tmavého pozadí.

Rheinbergovo osvětlení

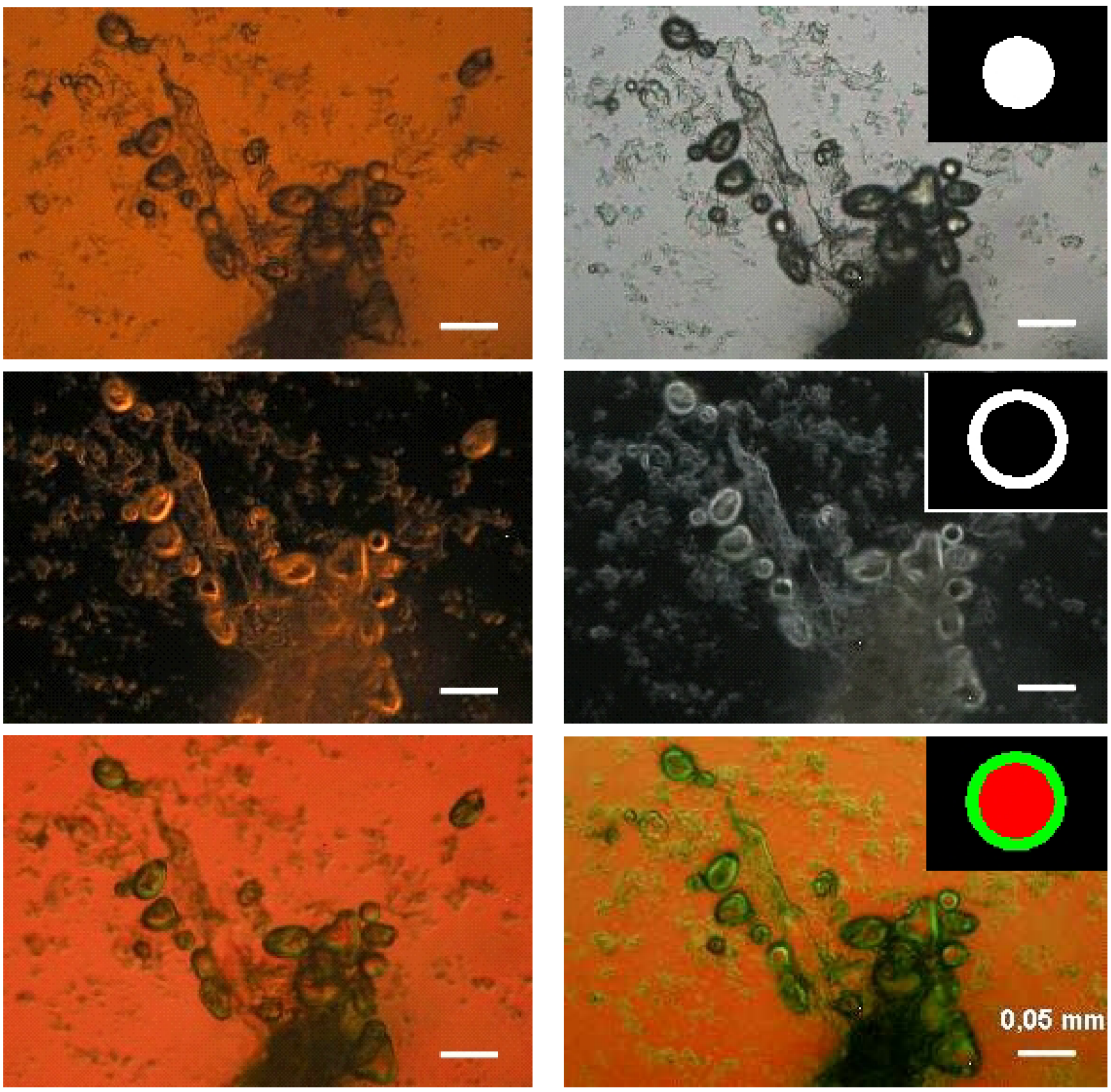
Rheinbergova osvětlení jsme docílili tak, že jsme vnitřní část pupily kondenzoru, jejíž obraz vyplní celou pupilu objektivu, osvětlili červeným světlem. Okraje pupily kondenzoru, které se zobrazí vně pupily objektivu, jsme osvětlili zeleným světlem.

Výsledek odpovídá následujícímu předpokladu. Struktury, jež rozptylují světlo se jeví jako zelené vystupující z červeného pozadí. Snímek s osvětlením pomocí dataprojektoru se liší od snímku vzniklého osvětlením tradiční cestou zejména v intenzitě zelené barvy. Tento rozdíl je způsoben faktem, že lampa v mikroskopu Nikon (halogenová žárovka) vyzařuje světlem, jehož červená složka je intenzivnější než zelená.

Kondenzor s rotující aperturou

Zvláštní pozornost věnujeme metodě osvětlení pomocí kondenzoru s rotující aperturou. Na obr. 5.3.2 jsou zachyceny dva detaily animací vytvořených ze čtyř snímků. Obě animace zachycují stejné zorné pole. Liší se pouze rovinou ostrosti. Ze snímků na obr. 5.3.2 je efekt rotační apertury zřejmý. Též je ovšem patrné, že dochází ke změně jasu osvětlení vzorku

[1] Barvy jsou voleny v RGB souřadnicovém systému. Tedy např. pod pojmem bílá je míněna barva RGB[255, 255, 255] atd. Barvy volené na obrazovce neodpovídají přesně barvám promítaným projektorem.

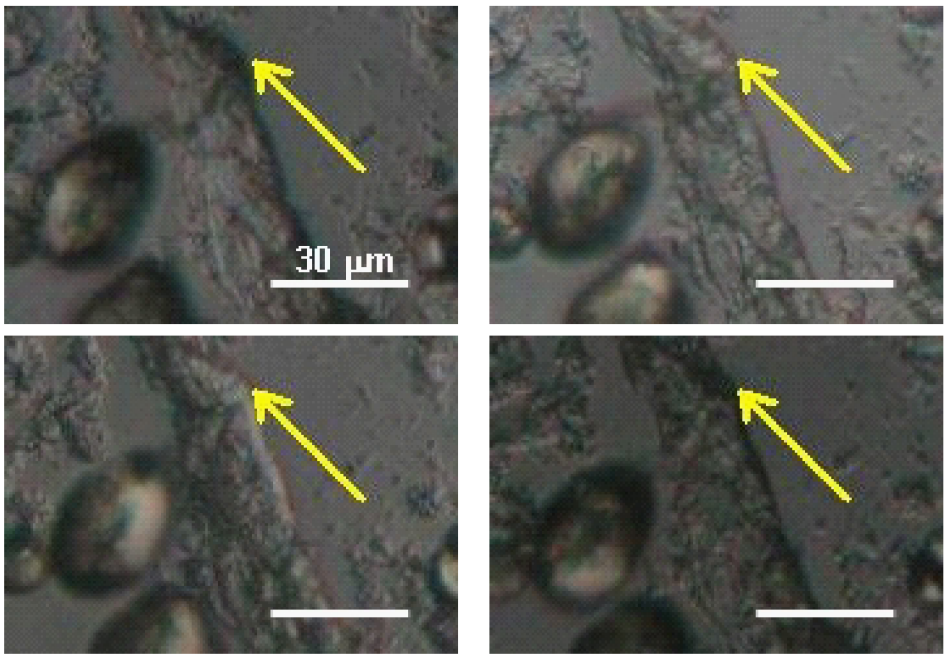


Obrázek 5.3.1: Vzorek škrobových zrn fazolu obecného ve vodě. Vzorek je dobře viditelný i ve světlém poli. Shora postupně - světlé pole, temné pole, Rheinbergovo osvětlení. Obrázky vlevo jsou vytvořeny osvětlením tradiční cestou na mikroskopu Nikon Alphaphot2 - YS2 s objektivem Nikon 20×/0,4. Obrázky vpravo jsou pořízené POS v prvním uspořádání na mikroskopu Meopta s objektivem Meopta 20×/0,45.

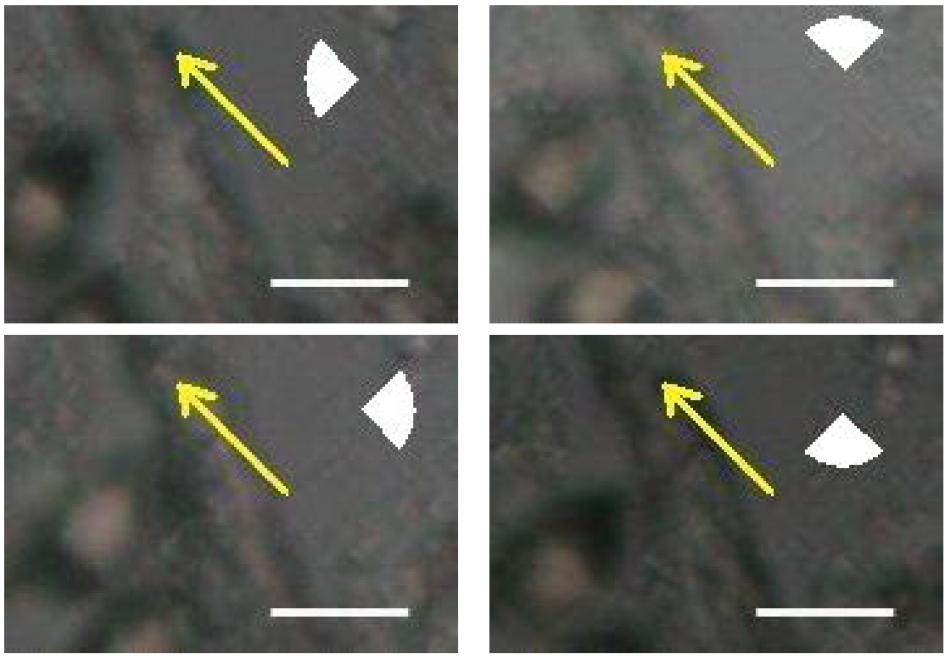
v průběhu rotace clonky. Jednoduchou POS totiž nemůžeme dosáhnout zcela korektního osvětlení. Srovnání s osvětlením tradiční cestou jsme tentokrát neuváděli, neboť naše laboratoř není vybavena kondenzorem s rotující aperturou.

5.3.2 Zobrazování fázového objektu - nečistoty pod krycím sklíčkem - klasickými metodami

Pro fázový objekt není vhodné používat osvětlení ve světlém poli, a to zejména kvůli nízkému kontrastu obrazu. To je vidět z příkladu na obr. 5.3.3, kde je zobrazen fázový objekt - nečistota pod krycím sklíčkem. Aplikovali jsme tedy klasické metody pro zvýšení kontrastu, abychom zjistili, zda získáme požadované výsledky. Při realizaci klasických metod jsme postupovali stejně jako v odst. 5.3.1. Pro ilustraci je na obr. 5.3.3 opět uvedeno



a)



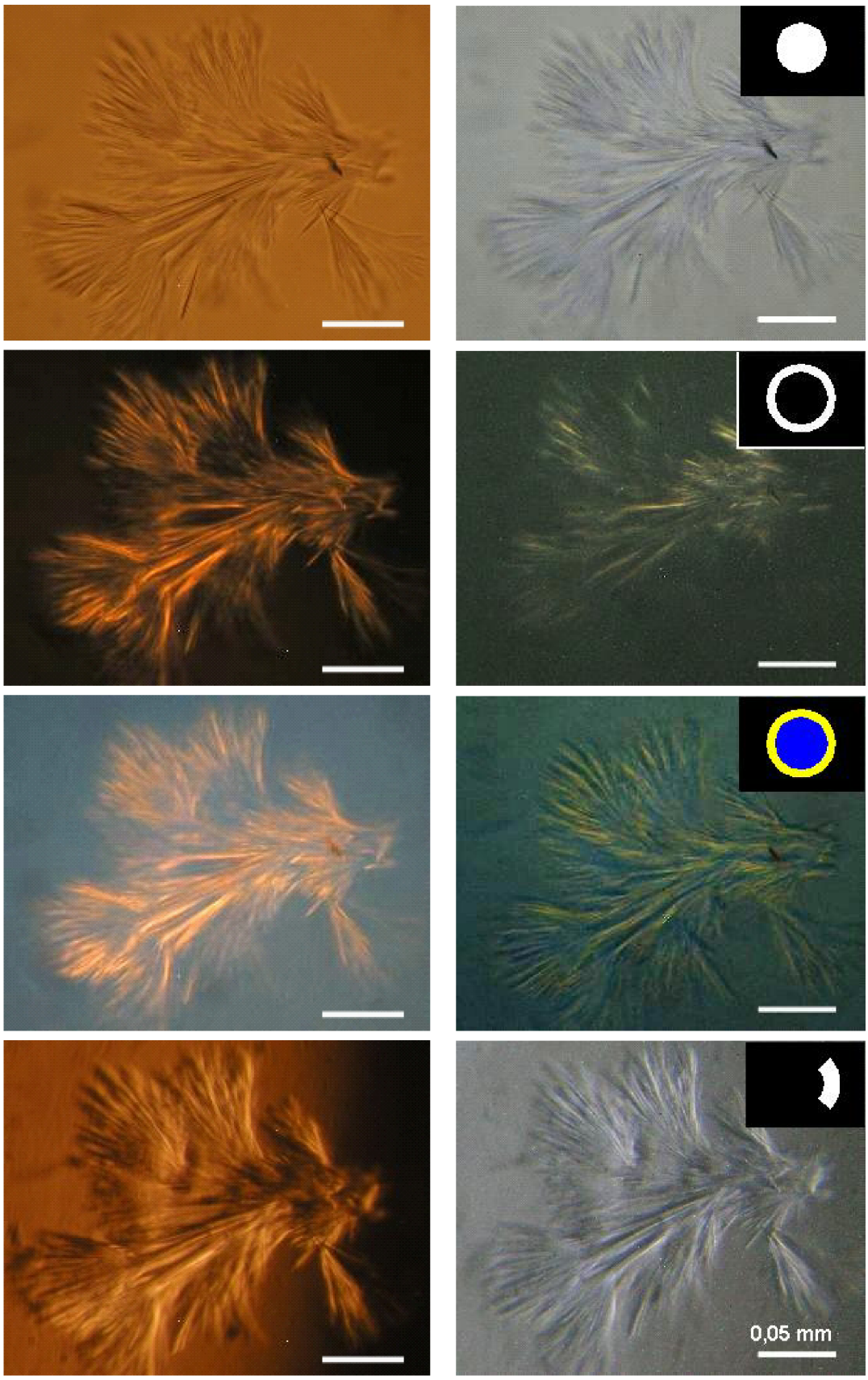
b)

Obrázek 5.3.2: Dvě animace lišící se rovinou ostrosti. V první a) resp. druhé b) animaci je objektiv zaostřen do roviny resp. nad rovinu, v které leží detail označený šipkou. Zatímco v první animaci a) se poloha označeného detailu v průběhu rotace apertury nemění, v druhé animaci b) bod opisuje kružnici. V pravém horním rohu obrázků v b) je zachycena poloha výseče příslušející danému snímku tak, jak se jeví na obrazovce počítače. Obrázky jsou pořízené POS v prvním uspořádání na mikroskopu Meopta s objektivem Meopta 20×/0,45.

srovnání některých metod uskutečněných tradiční cestou (vlevo) a pomocí POS (vpravo).

Při použití POS jsme pro temné pole sice získali tmavé pozadí, ovšem vlivem šedého

filtru se jas snížil natolik, že fotoaparát již nedokázal dobře rozlišit struktury, jež rozptylují světlo od tmavého pozadí. Pro Rheinbergovo osvětlení jsme vyzkoušeli několik barevných kombinací osvětlení vzorku. Nejvíce kontrastní byla kombinace žluto-modrá. Aplikací šikmého osvětlení ve světlém poli jsme dosáhli zvýšení kontrastu a obraz se díky osvětlení ze strany jeví plastický. Navíc se podařilo rozlišit některé detaily, které u ostatních metod splývají s okolím.



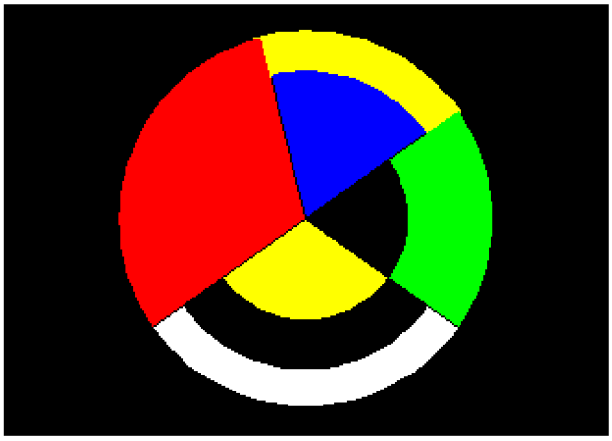
Obrázek 5.3.3: Detail nečistoty pod krycím sklíčkem vzniklé při vytváření preparátu. Vzorek není dobře viditelný ve světlém poli. Shora postupně - světlé pole, temné pole, Rheinbergovo osvětlení, šikmé osvětlení. Obrázky vlevo jsou vytvořeny osvětlením tradiční cestou na mikroskopu Nikon Alphaphot2 - YS2 s objektivem Nikon $40\times/0,65$. Obrázky vpravo jsou pořízené s POS v prvním uspořádání na mikroskopu Meopta s objektivem Meopta $45\times/0,65$.

5.4 Nové uspořádání - Köhlerova osvětlovací soustava

V tomto novém uspořádání využíváme pro osvětlení vzorku POS, jež je popsána v odst. **??**.

5.4.1 Software

Pro pořizování snímků s touto sestavou jsme využívali aplikaci *Projecter2* (naprogramoval Matěj Týč, viz [12], která umožňuje zobrazit do předmětové ohniskové roviny kondenzoru libovolný obraz skládající se z výsečí mezikruží. Příklad je uveden na obr. 5.4.1. Parametry výsečí (barvu, šířku, úhel a polohu) můžeme pomocí skriptu měnit pro každé osvětlení tak, aby výsledný obrazec vyhovoval požadavkům pro osvětlení. Vrchol všech výsečí je přitom vždy ve středu obrazovky.



Obrázek 5.4.1: V aplikaci *Projecter2* vytváříme obraz složený z výsečí mezikruží.

5.4.2 Motivace

V novém uspořádání jsme měli k dispozici kvalitnější osvětlovací soustavu. Pomocí ní a vylepšeného software jsme se snažili demonstrovat, že jsme schopni POS vytvořit osvětlení nejen všemi klasickými metodami (viz odst. 5.4.3), nýbrž i metodami netradičními (viz odst. 5.4.4). Tyto netradiční metody jsou přitom zcela specifické pro POS a nelze je tradiční cestou docílit.

5.4.3 Zobrazování klasickými metodami

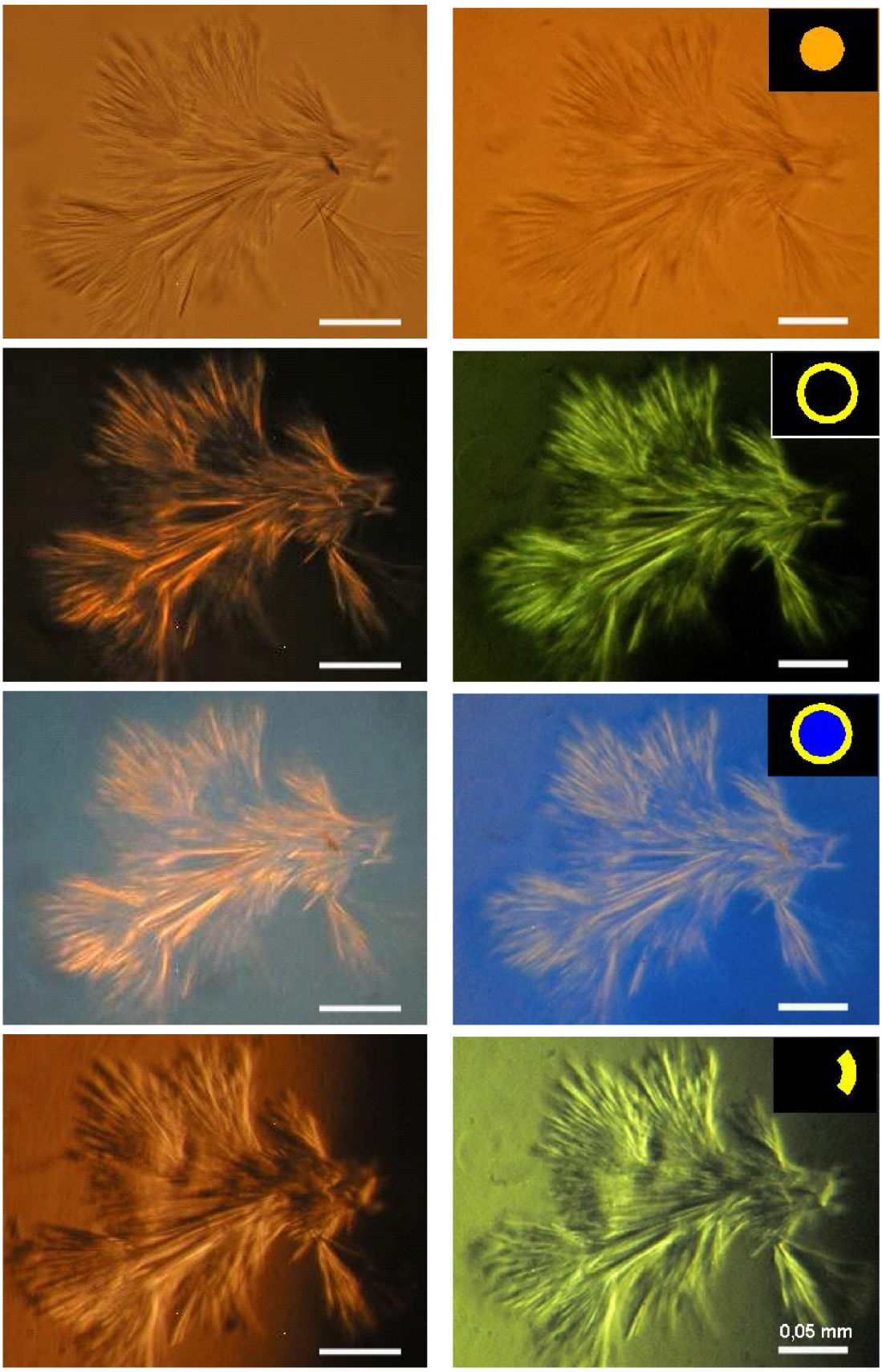
V tomto odstavci uvádíme srovnání fotografií stejného vzorku jako v odst. 5.3.2. Pouze metodu kondenzoru s rotující aperturou jsme aplikovali na jiný vzorek, abychom jasně prokázali prostorový efekt této techniky.

Jak je patrné z obr. 5.4.2, ve světlém poli opět nezískáváme potřebný kontrast pro rozlišení zobrazované struktury. Ve světlém poli se pomocí nastavení barev promítaných projektorem podařilo napodobit barvu osvětlení, kterou vytváří lampa u mikroskopu Nikon Alphaphot2 - YS2. V souřadnicích RGB je to [255, 170, 0].

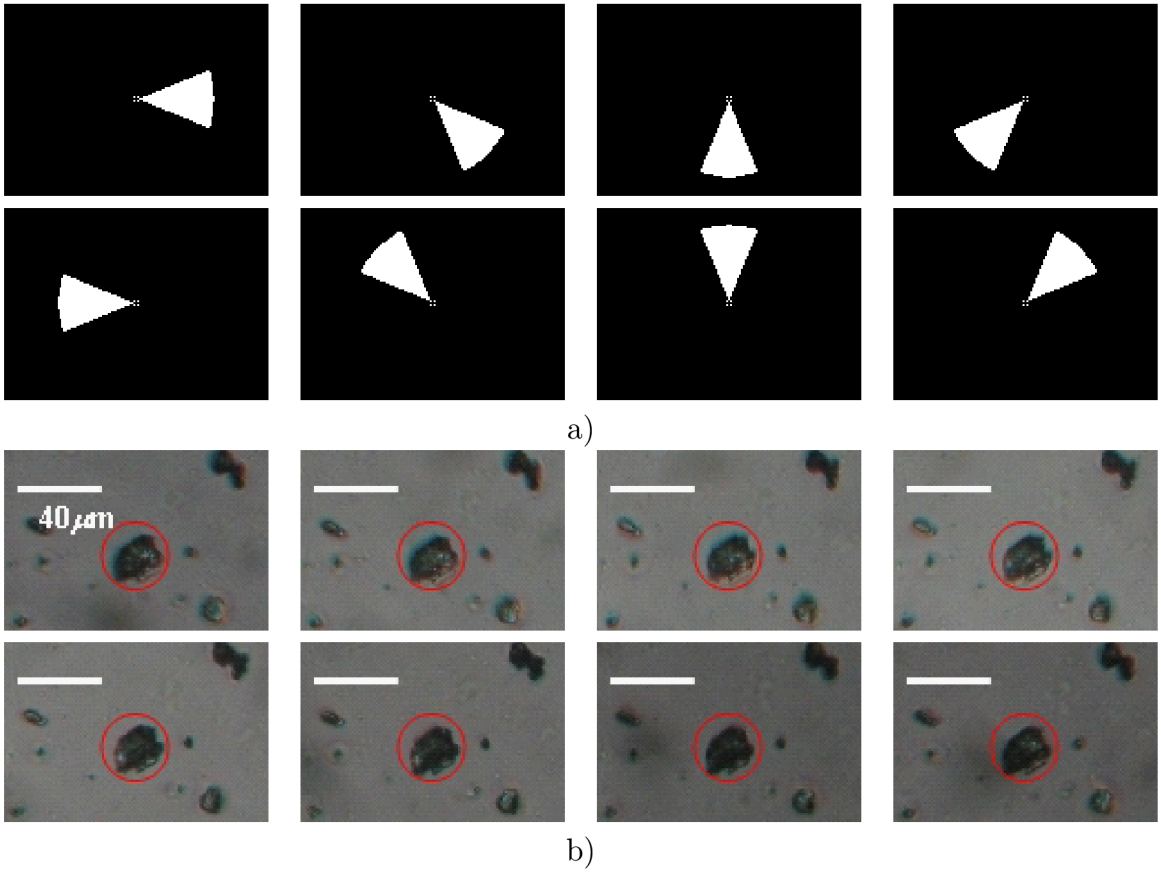
Pro osvětlení v temném poli a šikmém osvětlení ve světlém poli se snímky získané osvětlením tradiční cestou liší od snímků získaných s POS pouze barevně. Při detailnější studii snímku s šikmým osvětlením uvidíme, že se struktura jeví plastická, což je klasický projev šikmého osvětlení. Zvýšení rozlišení vlivem šikmého osvětlení se však na této struktuře zjistit nepodařilo.

Jak je vidět z fotografie s Rheinbergovým osvětlením, lepší výsledky získáváme s POS. Důvodem je zejména to, že s POS jsme optimalizovali rozměry a intenzitu jednotlivých částí promítané clonky tak, abychom získali co nejlepší osvětlení pro daný vzorek.

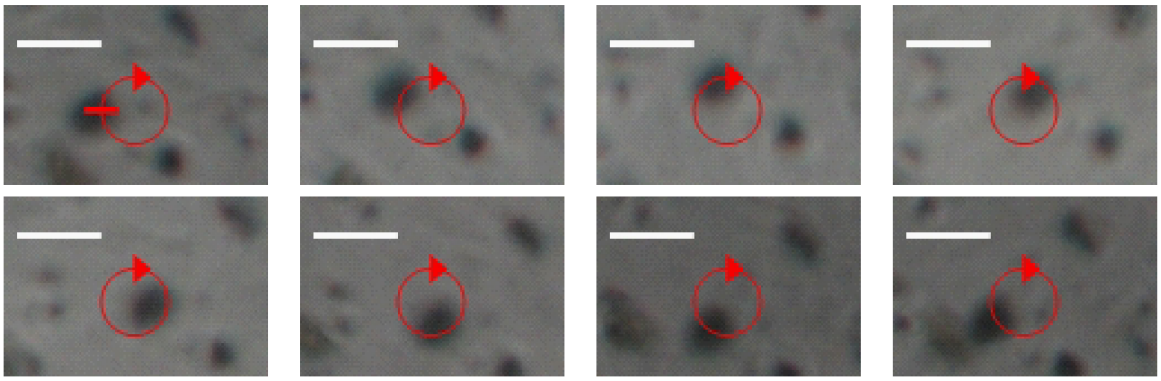
Osvětlení napodobující metodu kondenzoru s rotující aperturou je na obr. 5.4.3 a 5.4.4. V prvním uspořádání jsme ukázali tuto metodu na biologickém vzorku škrobových zrn. Pro úplné ověření, zda skutečně získáváme správné výsledky, jsme metodu s rotující aperturou kondenzoru aplikovali na vzorek zkušební. Tímto vzorkem byl detail nečistoty na povrchu krycího sklíčka. Na obr. 5.4.3 a 5.4.4 jsou zachyceny tři animace rozdělené do osmi snímků tak, jak byly postupně pořizovány. Jednotlivé animace se liši rovinou ostrosti. Jednotlivé snímky v animacích se pak liší polohou kruhové výseče ve vstupní pupile kondenzoru. Jak je vidět z obr. 5.4.4, obrazy plošek, které leží nad nebo pod rovinou ostrosti, se během pozorování pohybují po kruhové trajektorii. Obrazy zaostřených plošek zůstavají na místě.



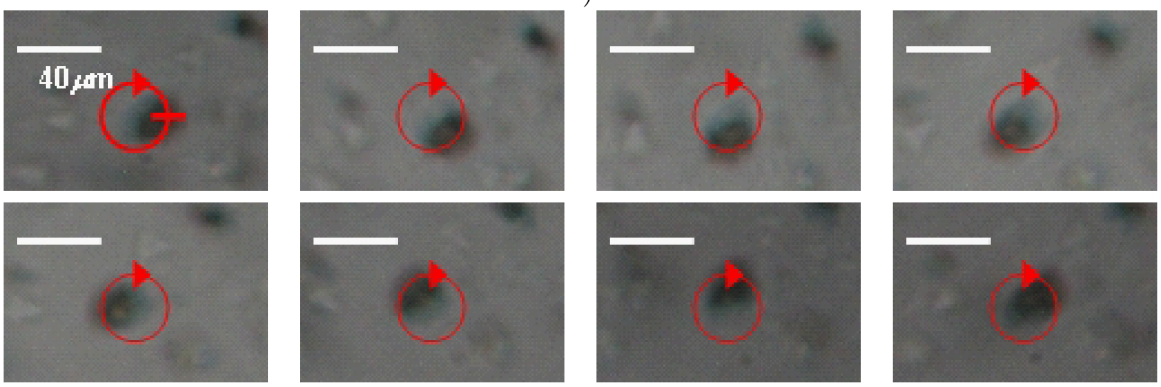
Obrázek 5.4.2: Vzorek cibule. Shora postupně - světlé pole, temné pole, Rheinbergovo osvětlení, šikmé osvětlení. Obrázky vlevo jsou vytvořeny osvětlením tradiční cestou na mikroskopu Nikon Alphaphot2 - YS2 s objektivem Nikon $40\times/0,65$. Obrázky vpravo jsou pořízené na mikroskopu Meopta s objektivem Meopta $45\times/0,65$. Osvětlení zajištěno POS v novém uspořádání.



Obrázek 5.4.3: Zkušební vzorek - nečistota na krycím sklíčku. a) Poloha výseče je zaznamenána tak, jak byla nastavena na obrazovce počítače. Výseč tvoři osminu kruhu. Vrcholový úhel je tedy $\pi/4$. Taktéž jednotlivé kroky rotace výseče mezi jednotlivými snímky jsou $\pi/4$. b) Snímek vzorku, v němž se poloha zaostřeného předmětu (nečistota uvintř červeně označené kružnice) během rotace výseče nijak nezměnila. Červená kružnice slouží jako referenční. Ve všech obrázcích má stejnou polohu. Obrázky b) jsou pořízené s POS v novém uspořádání na mikroskopu Meopta s objektivem Meopta $20\times/0,45$.



a)



b)

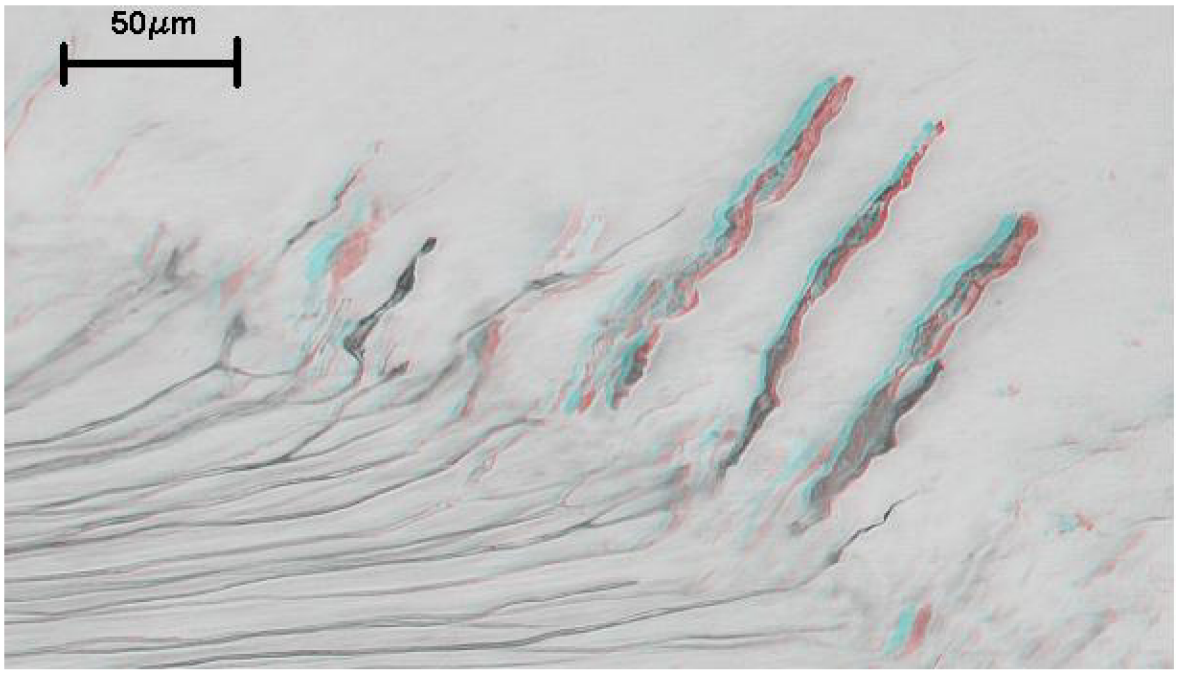
Obrázek 5.4.4: Zkušební vzorek - detail nečistoty na krycím sklíčku - zobrazení nezaostřených struktur. a)Nečistota je $(35 \pm 1)\,\mu$m pod rovinou ostrosti. Vidíme, že v průběhu rotace výseče opisuje obraz nečistoty kružnici o poloměru cca $15\,\mu$m ve směru chodu hodinových ručiček. Počáteční poloha plošky (vyznačena červenou značkou) je vlevo. b) Ploška je $(35 \pm 1)\,\mu$m nad rovinou ostrosti. V průběhu rotace výseče opět opisuje obraz nečistoty kružnici o poloměru cca $15\,\mu$m ve směru chodu hodinových ručiček. Ovšem počáteční poloha nečistoty (vyznačena červenou značkou) je vlevo. Obrázky b) jsou pořízené s POS v novém uspořádání na mikroskopu Meopta s objektivem Meopta $20\times/0,45$.

5.4.4 Zobrazování netradičními metodami

Existuje jistě řada metod, které můžeme aplikovat na osvětlování vzorku pomocí POS. Zdaleka ne všechny však přinášejí potřebné informace o vzorku. Jako příklady uvádíme některé metody, které mj. poskytují informaci o trojrozměrnosti vzorku.

Anaglyf

Anaglyf je technika, která umožňuje zaznamenávat prostorovou informaci do jediného snímku. Anaglyfní obraz je složen ze dvou barevných obrazů (nejčastější kombinací je zelený s červeným) téhož objektu pořízených ze dvou různých směrů. Jeden obraz je určen pro levé, druhý obraz pro pravé oko. Rozdělením obrazů pro každé oko zvlášť vzniká tzv. stereoskopická paralaxa, která umožňuje očím vnímat objekty trojrozměrně. Čim více jsou přitom jednotlivé barevné obrazy od sebe vzdáleny, tím je stereoskopická paralaxa vyšší, tj. předměty se jeví více vzdálené od roviny, v které se anaglyfní obraz nachází. Pro oddělění barevných obrazů pro každé oko zvlášť se používají speciální brýle s různě barevnými skly (nejčastěji zelené a červené). Příklad anaglyfního obrazu vřeten v zubní sklovině je na obr. 5.4.5.



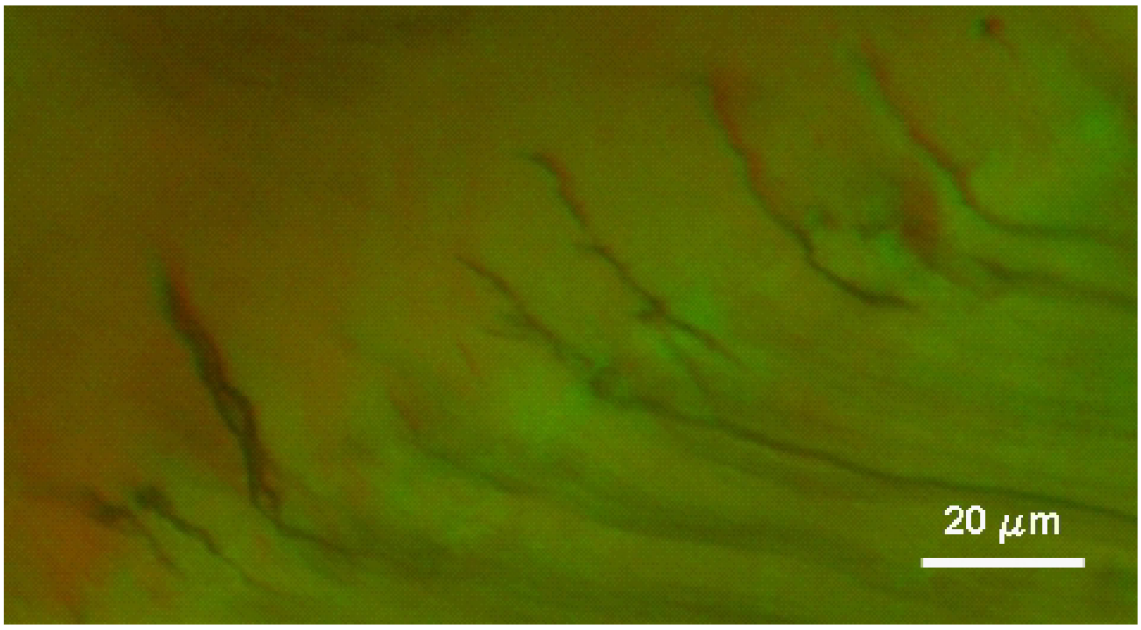
Obrázek 5.4.5: Anaglyfní obraz vřeten ve sklovině. Snímek je vytvořen softwarovou montáží ze série snímků vzniklých přeostřováním vzorku. Z obrázku je vidět výrazné oddělení červené a zelené složky u detailu vřeten (tři rovnoběžné velké struktury jdoucí ve směru úhlopříčném). Při pozorování detailů vřeten anaglyfními brýlemi se vřetena jeví za resp. před rovinou snímku. Snímek je pořízen osvětlením ve světlém poli na mikroskopu Reichert s objektivem Nikon $40\times/0,85$.

S POS jsme se pokusili vytvořit anaglyfní obraz vzorku tak, že jsme osvítili jednu část pupily kondenzoru světlem jedné barvy, druhou část pupily jsme osvětlili jinou barvou. Příklady osvětlení pupily jsou nakresleny na obr. 5.4.6 b) a 5.4.7 b). Využíváme přitom podobného efektu jako u rotující apertury. Víme totiž, že obraz struktury, jež leží v předmětové rovině se nachází v obrazové rovině na stejném místě nezávisle na směru osvětlení. Struktury mimo předmětovou roviny se naproti tomu zobrazí v obrazové rovině na různých místech v závislosti na směru osvětlení. Předpokládali jsme tedy, že když vysvítíme pupilu kondenzoru tak, jak je to naznačeno na obr. 5.4.6 b), dokážeme od sebe oddělit struktury, jež leží v předmětové rovině od struktur ležících nad či pod touto rovinou. Čím více jsou struktury vzdáleny od předmětové roviny, tím více by měly být od sebe vzdáleny jednotlivé barevné složky jejich obrazů. To je předpoklad pro vytvoření anaglyfního obrazu.

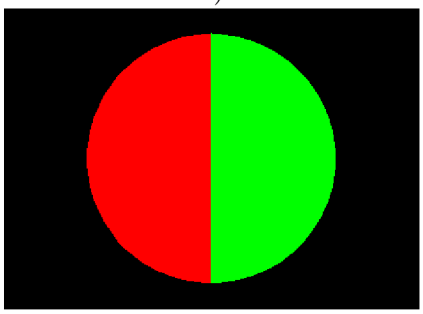
Zobrazovali jsme dva vzorky. Prvním vzorkem jsou vřetena v zubní sklovině (obr. 5.4.6). Druhým vzorkem je detail nohy v preparátu blechy psí (obr. 5.4.7).

Výsledky na obr. 5.4.6 a 5.4.7 však nevykazují výraznou prostorovost ani při jejich pozorování speciálními brýlemi. Z obrázků je patrný spíše jiný efekt. Při použití POS pro vytváření anaglyfního obrazu musíme totiž počítat s tím, že různými barvami budou odděleny nejen předměty ležící mimo předmětovou rovinu, ale i roviny různě orientované v prostoru. Tento jev vytváření anaglyfního obrazu s POS komplikuje, ovšem lze jej využít v jiných aplikacích. Například pro určení orientace rovin vzorku v prostoru.

POS dokáže zajistit změnu osvětlení během zlomku sekundy. Odtud vyplývá její použití pro metody dynamické, při kterých měníme obraz promítaný do předmětové ohniskové roviny kondenzoru během pozorování. Metoda kondenzoru s rotující aperturou přitom není jedinou možnou. Jako příklad, který jsme při osvětlováni zkoušeli, je metoda rotující apertury kondenzoru v temném poli. Místo kruhové výseče jsme nechali rotovat výseč mezikruží. Takto vlastně osvětlujeme v každém okamžiku vzorek šikmým osvětlením v temném poli. Tato metoda se jeví jako výhodná u předmětů, které nejsou ve světlém poli dostatečně kontrastní. Příklady animací zde neuvádíme. Jsou však součástí přílohy na CD-ROM.

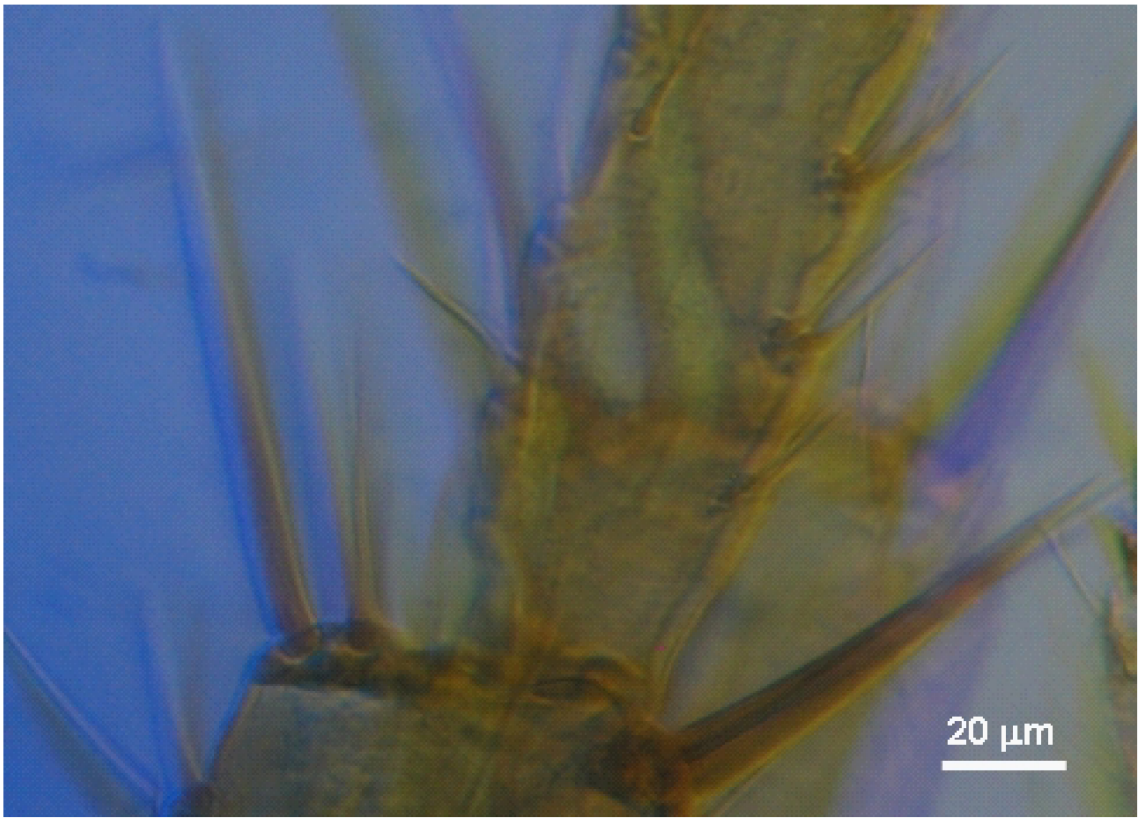


a)

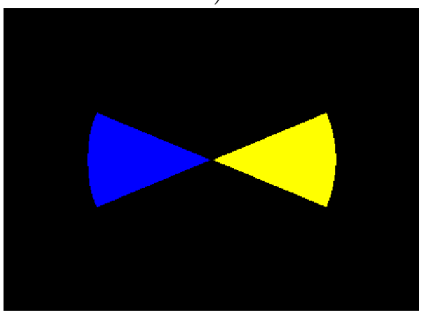


b)

Obrázek 5.4.6: Napodobení anaglyfního obrazu vřeten v zubní sklovině. Zadíváme-li se pozorně na obraz vřeten a), můžeme i bez anaglyfních brýlí říci, že některé struktury mají zelenou a červenou složku zobrazenu vedle sebe, některé mají tyto složky zobrazeny na sobě. Z obrázku ovšem též vidíme, že v jedné části vzorku převládá červená, zatímco v jiné části zelená barva. To je projev nežádoucího efektu popsaného v odst. 5.4.4 souvisejícího s různou orientací rovin v prostoru. b) Obraz clonky na obrazovce počítače. Levá strana je vyplněna červenou barvou, pravá strana zelenou barvou. Obrázek a) je pořízen s POS v novém uspořádání na mikroskopu Meopta s objektivem Meopta $45\times/0,65$.



a)



b)

Obrázek 5.4.7: Anaglyfní obraz vzorku nohy v preparátu blechy psí. a)Z fotografie nohy blechy psí vidíme, že u nezaostřených struktur jsou od sebe nezávislé barevné obrazy odděleny, zatímco u struktur zaostřených leží tyto obrazy na sobě. Použitím žluto-modré kombinace jsme získali u tohoto vzorku nejlepší kontrast. I zde ovšem získáváme efekt související s různými orientacemi rovin vzorku v prostoru popsaný v odst. 5.4.4. b) Obraz clonky na obrazovce počítače. Obě kruhové výseče mají vrcholový úhel $\pi/4$. Levá výseč je modrá, pravá žlutá. Zjistili jsme, že zmenšováním vrcholového úhlu promítnutých kruhových výsečí zvyšujeme projev prostorového efektu anaglyfního obrazu. Obrázek a) je s POS v novém uspořádání na mikroskopu Meopta s objektivem Meopta $45\times/0,65$.

5.5 Shrnutí výsledků

5.5.1 POS v prvním uspořádání

S POS v prvním upořádání jsme získali osvětlení napodobující některé klasické metody, o kterých mluvíme v kap. 2.

Při zobrazování vzorku škrobových zrn jsme získali výsledky zcela srovnatelné s osvětlením tradiční cestou. Osvětlováním pomocí metody rotující apertury kondenzoru však docházelo během rotace výseče k znatelným výkyvům intenzity v obraze.

Pro zobrazení fázového objektu - nečistoty pod krycím sklíčkem - jsme docílili osvětlení pomocí všech klasických metod, které vedou ke zvýšení kontrastu v obraze, s výjimkou fázového kontrastu. Výsledky prokazují, že POS jsme schopni napodobit osvětlení tradiční cestou. Kvůli použití jednoduché soustavy a pouze základního software je však kvalita snímků ve srovnání s tradičním osvětlením nižší.

5.5.2 POS v novém uspořádání

POS v novém uspořádání zajišťuje Köhlerovo osvětlení vzorku. Díky ní a novému software jsme docílili osvětlení, které je zcela srovnatelné s osvětlením tradiční cestou. Rheinbergovým osvětlením dokonce získáváme lepší barevný kontrast než osvětlením tradiční cestou.

Dále jsme na modelovém vzorku jasně prokázali efekt rotační apertury kondenzoru, který získáme, promítneme-li do předmětové ohniskové roviny kondenzoru rotující kruhovou výseč. Získali jsme i první kvantitativní výsledky.

S POS jsme dále využili nových metod osvětlení, které nepatří mezi klasické. Tyto metody, které jsou zcela specifické pro POS, nelze jednoduše napodobit osvětlením tradiční cestou. Mezi takové metody patří např. vytvoření anaglyfního obrazu přímo v mikroskopu nebo metoda rotující apertury kondenzoru v tmavém poli.

Při vytváření anaglyfního obrazu jsme přišli na to, že prostorový efekt roste s klesajícím vrcholovým úhlem promítnutých kruhových výsečí. Prostorový vjem anaglyfního obrazu je ovšem rušen jiným jevem, pomocí kterého ovšem získáváme informaci o orientaci rovin vzorku v prostoru.

Kapitola 6

Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo vytvořit optický a mechanický návrh programovatelné osvětlovací soustavy a provést na vzorcích ověřovací experimenty.

Prvním návrhem osvětlovací soustavy byla jednoduchá osvětlovací soustava využívající pouze jedinou spojnou čočku s ohniskovou vzdáleností $f' = (220 \pm 100)$ mm. Jednočočková soustava se však díky nerovnoměrnému a nepřesně definovanému osvětlení ukázala jako nedostačující. Bylo tedy nutné navrhnout soustavu skládájící ze z více členů. Výsledkem byl paraxiální návrh trojčočkové osvětlovací soustavy, která zajišťuje Köhlerovo osvětlení. Tento návrh byl v programu ZEMAX rozšířen na reálný model. Tenké čočky z paraxiálního modelu byly nahrazeny dublety s ohniskovou vzdáleností $f' = (80,0 \pm 0,8)$ mm. Pro zrcátko umístěné pod mikrskopem byl navržen a na našem ústavu vyroben speciální držák umožňující rotaci zrcátka kolem dvou vzájemně kolmých os a posuv ve třetí ose. Držák umožňuje přesné justování obrazu clonky promítaného do pupily kondenzoru.

Ověřovací experimenty byly uskutečněny se dvěma provedeními programovatelné osvětlovací soustavy. První uspořádání využívalo jako optickou soustavu jedinou čočku, zatímco v druhém uspořádání bylo využito navržené Köhlerovy osvětlovací soustavy.

S oběma uspořádáními se podařilo prokázat, že pomocí programovatelné osvětlovací soustavy je možné docílit stejného osvětlení, jakého je dosaženo klasickými mikroskopovými metodami, při jejichž aplikaci vkládáme optomechanické členy do předmětové ohniskové roviny kondenzoru.

Klasické metody byly simulovány na dvou vzorcích. Prvním vzorkem byl biologický preparát (škrobová zrna fazolu obecného ve vodě), který byl viditelný i ve světlém poli. Druhý vzorek byl zkušební fázový objekt (nečistota pod krycím sklíčkem), který ve světlém poli nebylo možné pozorovat.

V obou uspořádáních se podařilo simulovat mechanickou rotační aperturu kondenzoru. Na náhodně vybraném zkušebním vzorku byl ukázán princip této metody. Byly získány první kvantitativní výsledky techniky rotační apertury.

V druhém uspořádání jsem se pokusil aplikovat s programovatelnou osvětlovací soustavu metody zcela nové. Příklad nové statické metody je vytvoření anaglyfního obrazu přímo v obrazové rovině mikroskopu. Vytvořený obraz však neposkytl očékavaný prostorový vjem. Namísto toho byl pozorován jiný jev, který umožňuje získat informaci o orientaci jednotlivých rovin vzorku v prostoru. Mezi nové dynamické metody, které byly aplikovány, patří např. rotující apertura kondenzoru v temném poli.

Cíle do budoucna spočívají v návrhu univerzální programovatelné osvětlovací soustavy, kterou bude možné připojit k libovolnému optickému mikroskopu pro pozorování v procházejícím světle a k libovolnému komerčnímu dataprojektoru. Takto by se univerzální programovatelná osvětlovací soustava mohla stát běžně využívaným systémem,

který zajistí osvětlení realizovetelné doposud pouze vkládáním optomechanických členů do předmětové ohniskové roviny kondenzoru.

Získávání trojrozměrné informace o vzorku napodobením rotující apertury kondenzoru by pak mohlo vytvořit jednoduchou a finančně nenáročnou alternativu k dnes dominujícím konfokálním mikroskopům.

Vzhledem k tomu, že osvětlení je u programovatlené osvětlovací soustavy ovládáno počítačem, lze očekávat vývoj nového software pro vytvoření nových osvětlovacích metod.

Literatura

[1] SAMSON E.C. and BLANCA M.C.: Dynamic contrast enhancement in widefield microscopy using projector-generated illumination patterns. *New Journal of Physics*, October 2007, vol. 9, p. 363-376. ISSN 13672630.

[2] Wredden J. H.: *The Microscope : Its Theory and Applications*, London: J. & A. Churchill Ltd., 1947. 296 p.

[3] OCHOTERENA E.L.: Some microscopic techniques and their proper use in the study of free-living protozoa in Mexico. *Transactions of the American Microscopical Society*, 1964, vol. 83, no. 4, 428-433. ISSN 0003-0023.

[4] ZERNIKE F.: Beugungstheorie des Schneidenverfahrens und seiner verbesserten Form, der Phasenkontrastmethode. *Physica*, 1934, vol. 1, p. 689 - 704.

[5] GREENBERG G., BOYDE A.: Novel method for stereo imaging in light microscopy at high magnifications. *Neuroimage*, 1993, vol. 1, p. 121-128.

[6] LUMMER O. and REICHE F.: *Die Lehre von der Bildentstehung im Mikroskop von Ernst Abbe.* Braunschweig: Vieweg & Sohn, 1910. 108 p.

[7] KEPRT E.: *Teorie optických přístrojů [Část] 2, Teorie a konstrukce mikroskopu.* Praha: SPN, 1966. 222 p.

[8] KOMRSKA J.: *Fourierovské metody v teorii difrakce a ve strukturní analýze.* Brno: Akademické nakladatelství CERM®, s.r.o., 2007. 242 p. ISBN 978-80-214-3532-2.

[9] WOLF J.: *Mikroskopická technika optická i elektronová pro biologické účely.* Praha: SZdN, 1954. 651 p.

[10] HAVELKA B.: *Geometrická optika. Díl 2.* Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1955. 344 p.

[11] BORN M. and WOLF E.: *Principles of optics.* Cambridge: Cambridge University Press, 1999. 952 p. ISBN 0521642221.

[12] TÝČ M.: *Numerické metody zpracování obrazu z mikroskopu s rotujícím kondenzorem.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2008. 46 p.

Seznam příloh

Obrazová příloha na CD-ROM

Obrazová příloha je součástí CD-ROM. V adresáři *DruheUsporadani* jsou uloženy obrázky a animace s osvětlením v novém uspořádání. Na snímcích vzorků vřeten v zubní sklovině a detailu praskliny je ukázán efekt, který se projeví při vytváření anaglyfního obrazu přímo v obrazu mikroskopu. Domníváme se, že pomocí něj budeme schopni odlišit prostorovou orientaci rovin vzorku. Rotující apertura kondenzoru je předvedena na snímku nečistoty na krycím sklíčku. Je zde metoda rotující apertury ve světlém i tmavém poli.

Veškerá dokumentace ke snímkům je v souboru *DruheUsporadani/Dokumentace.doc*.

Výkresová dokumentace

Další součástí přílohy je plná výkresová dokumentace držáku pro zrcátko.

K3-01-00	KUSOVNÍK
3-01-00	VÝKRES SESTAVY
4-01-01	RÁM VNĚJŠÍ
4-01-02	RÁM VNITŘNÍ
4-01-03	HŘÍDEL S DRÁŽKOU
4-01-04	LŮŽKO
4-01-05	HŘÍDEL SE ZÁVITEM
4-01-06	ČEP S DRÁŽKOU
4-01-07	PODLOŽKA
4-01-08	DESKA