

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №4

Тема: Вивчення роботи тринокулярного біологічного мікроскопа.

Мета: Ознайомитися з будовою тринокулярного мікроскопу та видами освітлення, навчитись працювати з мікроскопом, відеокамерою та програмним забезпеченням.

Обладнання: мікроскоп UNICO H600, відеоокуляр DCM500, комп'ютер, програмне забезпечення ScopePhoto, підготовлені препарати.

4.1. Теоретичні відомості

Мікроскопія - сукупність методів зорового дослідження мікрооб'єктів при збільшеннях від декількох десятків до сотень тисяч разів.

Світлова мікроскопія – комплекс методів, що використовують різні оптичні ефекти. Наявність оптичних ефектів залежить від способу освітлення; розрізняють: мікроскопію у відбитому світлі та мікроскопію у світлі, що проходить. У першому випадку пучок світла падає перпендикулярно або похило на поверхню мікрооб'єкту, а його зображення будується променями, відбитими поверхнею; у другому — мікрооб'єкт розміщується в пучку світла, так, що його зображення будується променями, що пройшли крізь мікрооб'єкт.

Оптичні мікроскопи для медико-біологічних досліджень можна класифікувати наступним чином:

1) за типом об'єкту дослідження:

- **мікроскопи плоского поля** – мікроскопи, оптична схема яких забезпечує спостереження за об'єктом в двовимірному просторі; об'єктами дослідження виступають тонкі (товщиною 0,1 – 10 мм) об'єкти;

- **стереоскопічні мікроскопи** – мікроскопи, оптична схема яких забезпечує спостереження за об'єктом в трьохвимірному просторі; об'єктами дослідження є габаритні об'єкти (товщиною 1 – 100 мм);

2) в залежності від умов розміщення об'єктів (спеціальний посуд, термокамера тощо) мікроскопи конструктивно виготовляються у двох варіантах:

- **прямі мікроскопи** (класична схема побудови) – окулярна насадка розміщена над об'єктом; така конструкція застосовується і у мікроскопах плоского поля і у стереоскопічних мікроскопах;

- **інвертовані мікроскопи** – окулярна насадка знаходиться під об'єктом дослідження; застосовується тільки в мікроскопах плоского поля;

3) за типом конструкції освітлювальної системи:

- **мікроскопи, котрі працюють у світлі, що пройшло**; основний принцип освітлення пов'язаний з тим, що світло проходить крізь об'єкт. За допомогою мікроскопів, котрі працюють у світлі, що пройшло, плоского поля, які можуть бути як прямими, так і інвертованими, а також стереоскопічними, можна спостерігати прозорі і напівпрозорі об'єкти;

- **мікроскопи падаючого світла** – світло потрапляє на об'єкт, не проходячи при цьому через оптичну систему мікроскопа (об'єктив), відбивається від об'єкту і тільки тоді потрапляє в оптичну систему мікроскопа. В основному мікроскопи падаючого світла – це стереоскопічні мікроскопи;

- обидва типи освітлювальної системи можуть бути конструктивно **об'єднані**, тоді мікроскоп називається мікроскопом, що працює у світлі, що пройшло, і у відбитому світлі;

4) за принципом побудови зображення:

- **мікроскопи світлого поля** – формують на світлому фоні більш темне зображення об'єкту;

- **мікроскопи з методом похилого освітлення** – на сірому фоні спостерігають контрастне зображення об'єкту з нерівним за товщиною контуром;

- **мікроскопи з методом темного поля** дозволяють отримати на темному фоні більш світле зображення або яскравий контур об'єкту;

- **мікроскопи з методом фазового контрасту** – дозволяють з максимальним ступенем візуалізації і детальності спостерігати на сірому фоні більш темне об'єдне зображення об'єкту, яке по контуру обмежене світлою полозою. При темнопольному фазовому контрасті спостерігається зворотна картина;

- **люмінесцентні мікроскопи** – забезпечують можливість спостереження на темному фоні свічення об'єктів;

- **поляризаційні мікроскопи** – в загальному випадку забезпечують спостереження на сірому або темному фоні різнокольорового, чіткого або контрастного зображення. Передбачається використання поляризатора в освітлювальній системі для отримання лінійно-поляризованого світла, яке після об'єкту за допомогою аналізатора відбувається виділення з структури зображення елементів, пов'язаних з анізотропією об'єкта;

- **мікроскопи диференційно-інтерференційного контрасту** - забезпечують спостереження на однотонному кольоровому фоні яскравого

кольорового об'ємного зображення або зображення того ж кольору, що і фон, проте з окантовкою з іншого кольору;

- **ультрафіолетові та інфрачервоні мікроскопи** – освітлення та спостереження об'єкта здійснюється за допомогою електронно-оптичних перетворювачів поза границь видимого діапазону;

Мікроскопи четвертої групи можуть виготовлятися і як окремі допоміжні блоки для звичайних мікроскопів.

5) за способом спостереження, документування та аналізу зображення:

- звичайні **мікроскопи**, в яких зображення фіксується і аналізується оком людини; за допомогою додаткових пристосувань можна виводити зображення на екран, монітор, фотоплівку;

- **фото мікроскопи** – складна фото система, що вмонтована в схему мікроскопа і працює за допомогою автоматизованої системи налаштування; може бути здійснена передача зображення на екран та відеозапис;

- **аналізатори зображення** (апаратно-програмні комплекси) – це комплекс обладнання, в якому зображення фіксується, передається за допомогою аналогових або цифрових камер і аналізується в системі комп'ютера;

- **проекційні мікроскопи** – мікроскопи, в яких проекція зображення здійснюється безпосередньо на великий екран (звичайна система спостереження за допомогою окулярів відсутня);

- **мікроскопи порівняння** – оптичні системи, у котрих забезпечують об'єднання в одному полі зору двох зображень, отриманих за допомогою двох різних мікроскопів, при цьому два зображення можуть накладатись одне на одне або розміщуватись поруч, займаючи частину поля;

- **мікроскопи-спектрофотометри**, в яких відбувається вимірювання оптичної щільності, величин пропускання або відбиття світла ділянки об'єкту в спектральному діапазоні 300-700 нм. Це відбувається за допомогою фотометричних насадок, що містять фотоелектричний помножувач, систему діафрагм та монохроматор;

4.2 Обладнання

4.2.1 Конструкція мікроскопу UNICO H600

Основними технічними характеристиками UNICO H600 (рис. 4.1) є:

- об'єктиви зі збільшеннями: 4^x , 10^x , 40^xR , 100^xR (масляний) планахромат;
- окуляри: широкопольні $10^x/18$ мм;
- фільтри: синій, зелений, жовтий;
- револьверна головка з 5 гніздами;
- механічний двох-координатний столик розміром 130x60 мм, який переміщається по осях X-Y 76x50 мм з кроком 0.1мм;
- вбудована регульована система освітлення Келера;
- юстувальний конденсор Аббе ($A=1,25$).

Всі об'єктиви мають маркування наступного виду:

Таблиця 4.1 Маркування об'єктивів

ACHRO PLAN	збільшення	апертура	довжина тубуса	товщина покривного скла
---------------	------------	----------	-------------------	-------------------------------

Наприклад, об'єктив ACHRO 100/1,25 160/0,17 – ахромат зі збільшенням 100^x і апертурою 1,25, розрахований на довжину тубуса 160 мм і товщину покривного скла 0.17 мм.

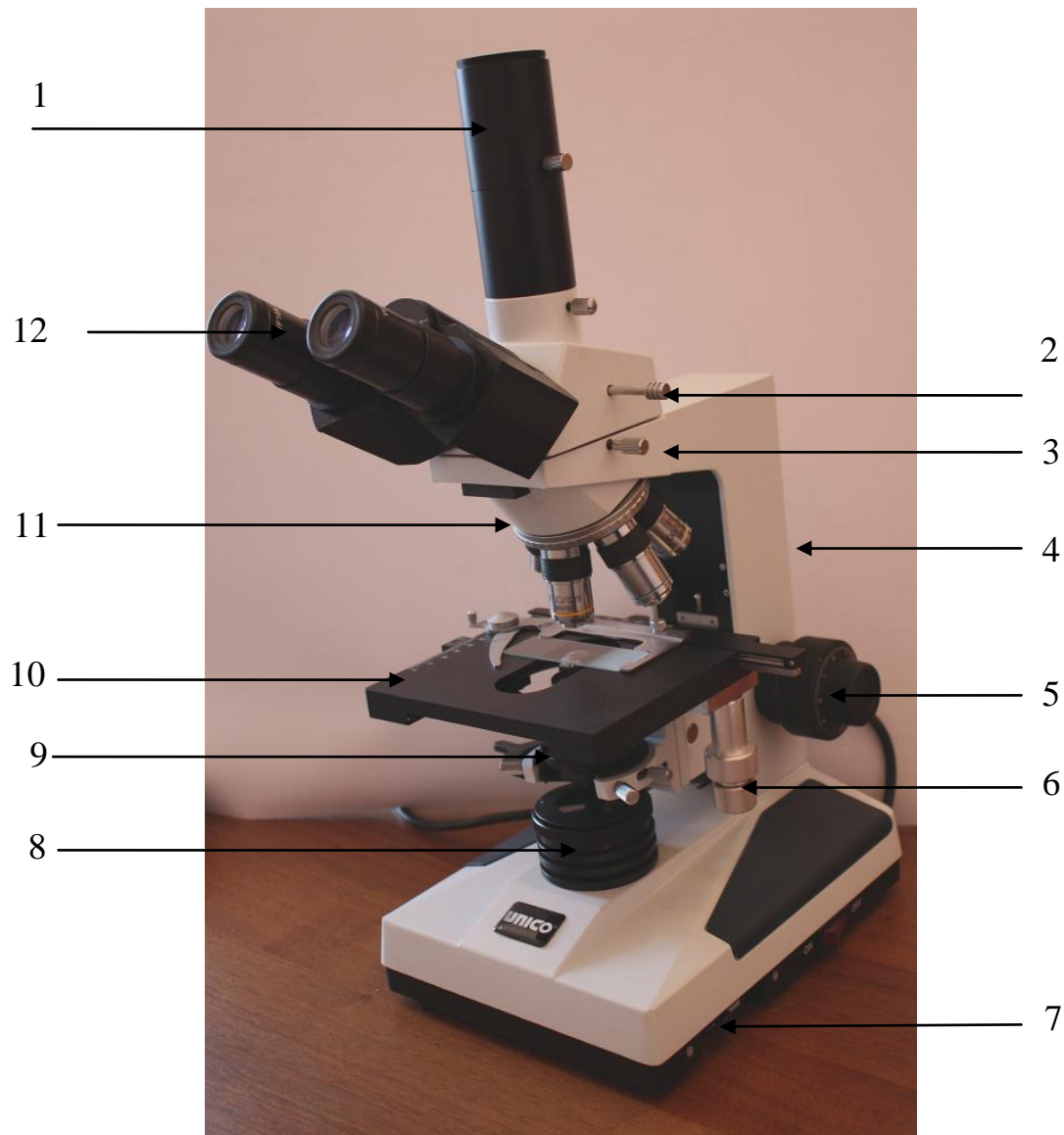


Рисунок 4.1 Мікроскоп UNICO H600, зовнішній вигляд

- 1 – адаптер цифрового окуляра; 2 – перемикач світлового потоку;
 3 – гвинт фіксації тринокулярної насадки; 4 – штатив; 5 – ручки налаштування різкості (груба і точна); 6 – ручка переміщення предметного столика в горизонтальній площині; 7 – ручка регулятора яскравості освітлювача; 8 – освітлювач; 9 – конденсор; 10 – предметний столик; 11 – револьверна головка з об’єктивами; 12 – окуляр

Ахромати мають корекцію кольору по одній основній і двом додатковим довжинам хвиль. Кривизна поля зору таких об’єктивів не

виправлена, тому при наведенні на різкість по центру зображення відбувається розмиття країв. Цей недолік малопомітний при візуальному спостереженні препаратів, проте може призводити до зниження якості фотознімків при використанні фотовідеонасадок.

Для отримання вищої якості зображення, особливо при використанні фотовідеокамер, рекомендується використовувати планахромати. У цих об'єктивів виправлена кривизна поля, хроматизм положення та хроматизм збільшення.

4.2.2 Камери для мікроскопів і їх види

Для візуалізації зображення мікрооб'єктів на екрані ПК застосовуються спеціалізовані камери, розраховані на роботу з мікроскопами. На відміну від фотовідеоапаратури загального призначення (наприклад фотоапаратів), їх оптична система імітує людське око, тобто оптична система таких камер має вигляд системи «окуляр + око», що забезпечує мінімізацію спотворень. Таку камеру називають цифровим окуляром або відеоокуляром.

Існує два основні типи фотоприймальних матриць для цифрового окуляра: ПЗЗ і КМОП.

ПЗЗ матриця (ПЗЗ – прилад з зарядовим зв'язком) – спеціалізована аналогова інтегральна схема на основі фотодіодів, що забезпечують перетворення енергії фотонів в електричний заряд. Сканування пікселів проводиться за рахунок передачі заряду між сусідніми пікселями. При цьому вимірювання заряду кожного пікселя проводиться на електродах крайніх пікселів матриці.

КМОП матриця (КМОП – комплементарна логіка на транзисторах метал-оксид-напівпровідник) – світлочутлива матриця, виконана по КМОП технології. Особливістю таких матриць є перетворення «яскравість-напруга» безпосередньо в пікселі зі скануванням отриманих значень.



Рисунок 4.2 Зовнішній вигляд відеоокуляра DCM 500

Цифровий окуляр DCM (рис. 4.2) - це оптична система з багатошаровим просвітленням і функцією покращення частотно-контрастної характеристики зображення для отримання більшої яскравості та контрасту об'єкта. Отримане зображення яскраве і чітке в центрі та на периферійних ділянках поля зору, що дозволяє використовувати їх з системою планохроматичних об'єктивів. Головним чином, ця система використовується в мікроскопах з окуляром Wf10^x, поле зору якого 18 мм, і парфокальними об'єктивами (об'єктиви з однаковою відстанню (пар фокальною відстанню) від отвору для закріплення об'єктивів на револьверній головці до фокальної точки та зразку. У випадку використання групи підігнаних об'єктивів різного збільшення, вони проєктують зображення приблизно на одну й ту саму площину в тубусі мікроскопу. Тому для зміни об'єктивів обертанням револьверної головки

необхідне лише незначне переміщення ручки точного налаштування для повторного встановлення різкого фокусу).

Для мікроскопів з монокулярною, біноклярною або тринокулярною голівкою об'єктив камери DCM вставляється в окулярну трубку замість окуляра або фототрубу тринокуляра і фіксується штатним кріпленням. Цифровий відео окуляр DCM дозволяє вести спостереження зображення в реальному кольорі і працює в середовищі програмного забезпечення «ScopePhoto» (рис. 4.3), що дозволяє переглядати і редагувати отримане зображення.

4.2.3 Програмне забезпечення ScopePhoto

ScopePhoto - програмне забезпечення спроектоване для SCOPETEK камер, у тому числі DCM, DCMC і серії DCT. Програмне забезпечення ScopePhoto дозволяє переглядати, фотографувати і редагувати отримані зображення. Зображення об'єкту спостереження передається на екран комп'ютера в реальному часі. Захват кадру здійснюється за допомогою twain-драйвера, а потім отримане зображення (кадр) можна зберегти в форматах: BMP, TIFF, JPG, PICT, PTL і ін. Крім того, камера DCM500 дозволяє записувати відеоролик.

4.3 Порядок виконання роботи

4.3.1 Підготовка мікроскопу до роботи

Перед використанням мікроскопу необхідно перевірити і при необхідності відрегулювати положення обмежувальних гвинтів переміщення

предметного столика (рис. 4.4) і конденсора. Обмежувальний гвинт конденсора знаходиться під предметним столиком напроти конденсора (з боку штатива).

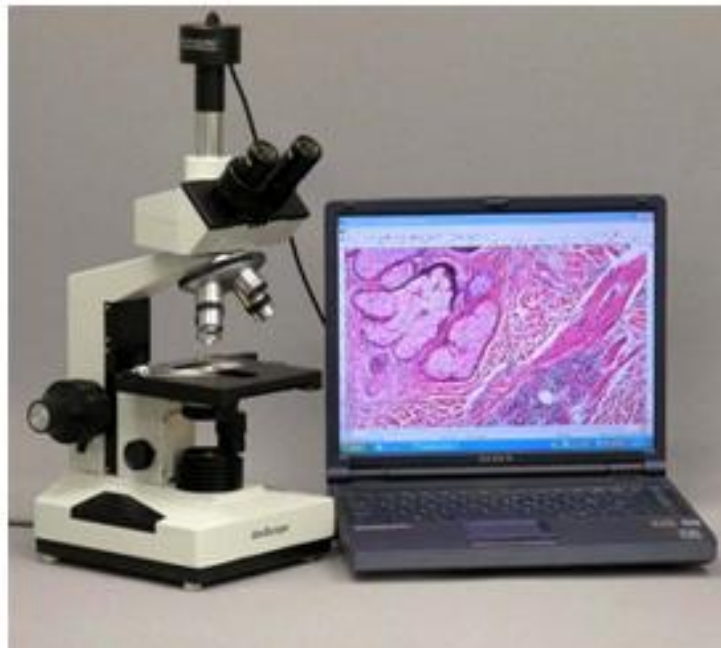


Рисунок 4.3 Робота мікроскопу UNICO H600 та відео окуляру DCM 500

4.3.1.1 Регулювання положення обмежувального гвинта предметного столика

1. Опустити предметний столик за допомогою ручки налаштування на різкість (рис.4.5) в крайнє нижнє положення.
2. Помістити предметне скло (без препарату і покривного скла) на предметний столик.
3. Встановити робочий об'єктив в 100^x поворотом револьверної головки.

4. Плавно піднімати предметний столик до легкого зіткнення фронтальної лінзи об'єктиву з предметним склом.



Рисунок 4.4 Гвинт переміщення предметного столика

Якщо предметний столик не вдається довести до зіткнення фронтальної лінзи з предметним склом, слід ослабити обмежувальний гвинт і повертати гвинт до досягнення необхідного положення.

Якщо предметний столик легко доводиться до потрібного положення і ще може переміщатися вгору, необхідно крутити гвинт до тих пір, поки не буде виключено переміщення предметного столика вище за потрібну точку.

Увага! Категорично забороняється примусове переміщення предметного столика вище точки дотику наочного скла і фронтальної лінзи об'єктиву. Це може привести до пошкодження фронтальної лінзи і поломки мікроскопа.

4.3.1.2 Регулювання положення обмежувального гвинта конденсора

1. Опустити предметний столик в нижнє положення.
2. Встановити предметне скло на предметний столик.

3. За допомогою ручки переміщення конденсора підняти конденсор в крайнє верхнє положення. При правильно відрегульованому обмежувальному гвинті верхня лінза конденсора не повинна торкатися предметного скла. В іншому випадку слід ослабити фіксуючий гвинт на ручці регулювання положення конденсора (рис. 4.5 поз. 7) і відрегулювати положення точки упору так, щоб мінімальний зазор між верхньою лінзою і предметним склом був приблизно 0.2-0.4 мм (робоча відстань між верхньою лінзи і предметним склом складає приблизно 0.85 мм).

4.3.2 Робота з мікроскопом

4.3.2.1 Налаштування освітлення по Келеру

1. Обертаючи ручку налаштування різкості, опустити предметний столик в нижнє положення.
2. Помістити на предметний столик предметне скло з готовим препаратом.
3. Обертаючи револьверну головку (рис.4.5, поз. 1), встановити об'єктив 10^x (при окулярі 10^x) в робоче положення.
4. Включити освітлювач (вимикач знаходиться на боковій панелі мікроскопа).
5. Встановити ручку регулятора яскравості (рис.4.5, поз.8) в положення, відповідне максимальній яскравості.
6. Добитися максимального відкриття польової діафрагми (по максимальній яскравості зображення), обертаючи корпус колекторної лінзи освітлювача (рис. 4.5, поз. 6).

7. Піднімаючи предметний столик за допомогою ручки грубого регулювання різкості (рис.4.5, поз.2), добитися появи в окулярі зображення препарату.

8. За допомогою ручки точного регулювання різкості (рис.4.5, поз. 3), добитися максимально різкого зображення препарату (рис.4.6.а).

9. Обертаючи корпус колекторної лінзи освітлювача, добитися максимального закриття польової діафрагми. При цьому в окулярі мікроскопа з'явиться нерізде зображення країв діафрагми у вигляді отвору, що світиться (рис.4.6.б). Якщо зображення країв діафрагми виглядає різким і знаходиться в центрі поля зору, можна вважати, що конденсор налаштований правильно. В іншому випадку слід відрегулювати положення конденсора.

10. Якщо зображення польової діафрагми виглядає нерізким (рис.4.6.б), потрібно відрегулювати положення конденсора по вертикалі за допомогою відповідної рукоятки (рис.4.5, поз. 7). Отримане зображення схоже з представленим зображенням на рис.4.6.в.

11. Якщо отвір діафрагми зміщений щодо центру поля зору, потрібно відрегулювати його положення за допомогою центрувальних гвинтів р.4.5, поз.10). Переміщення конденсора за допомогою вказаних гвинтів відбувається по діагоналі.

12. Після налаштування конденсора слід плавно розкрити польову діафрагму таким чином, щоб зображення її країв зникло з поля зору. Розкривати повністю польову діафрагму не слід, оскільки це призводить до погіршення контрасту зображення внаслідок надмірного засвічення.

13. Зняти один з окулярів і плавно закривати апертурну діафрагму (рис.4.5, поз. 9) до тих пір, поки діаметр видимої світлової плями не зменшиться приблизно на третину.

Процедуру налаштування освітлення по Келеру можна вважати закінченою.

14. Встановити окуляр.

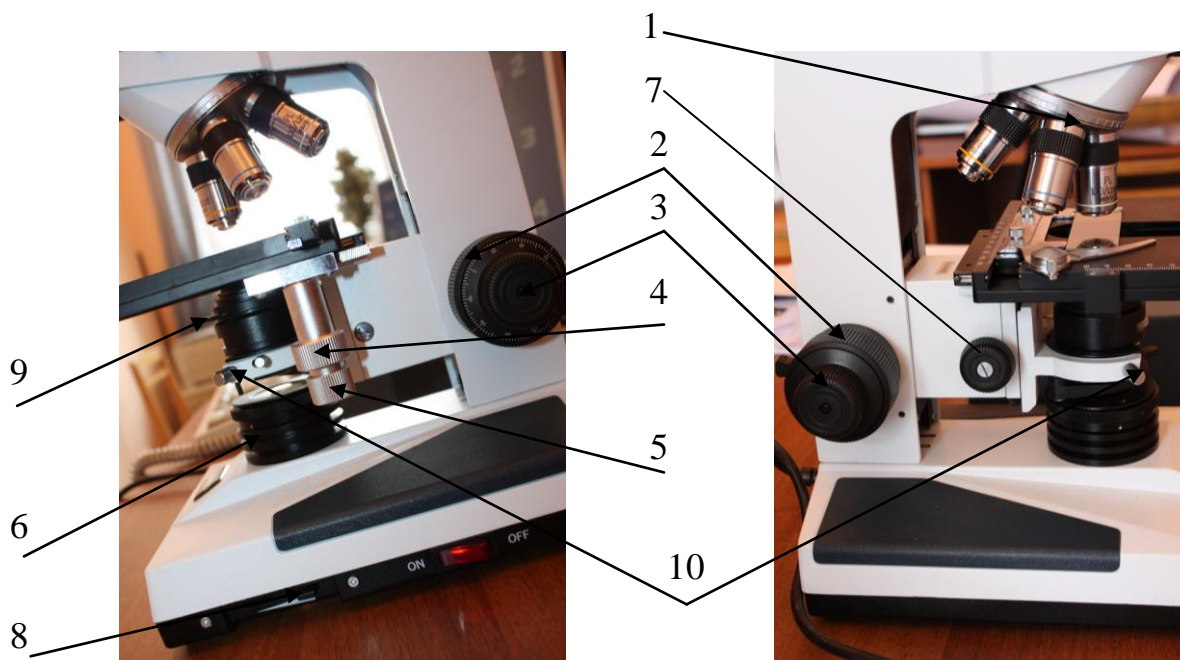


Рисунок 4.5 Елементи мікроскопа

1 – револьверна головка; 2 – ручка грубого налаштування на різкість;
3 – ручка точного налаштування на різкість; 4 – ручка переміщення предметного столика (до себе – від себе); 5 – ручка переміщення предметного столика (вправо – вліво); 6 – регулятор розкриття польової діафрагми;
7 – ручка регулювання положення конденсора; 8 – регулятор яскравості;
9 – ручка регулювання розкриття апертурної діафрагми; 10 – центрувальні гвинти конденсора

4.3.2.2 Налаштування зображення

Для роботи з мікроскопом слід відрегулювати розкриття окуляра таким чином, щоб два зображення злилися в одне. Кільце діоптрійної корекції на правому окулярі слід встановити «на нуль», якщо гострота зору обох очей однакова. В іншому випадку необхідно виконати загальне наведення на

різкість (рис. 4.5, поз. 2 і 3), після чого закрити ліве око і добитися максимальної різкості для правого, обертаючи кільце корекції.

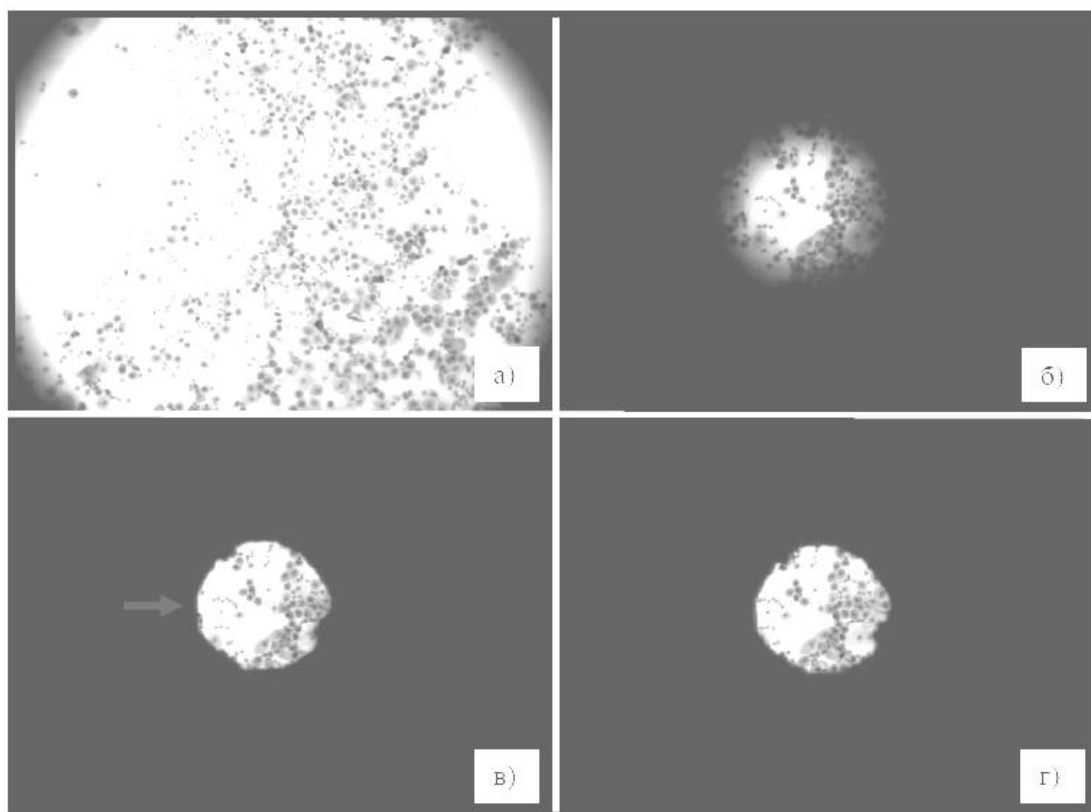


Рисунок 4.6 Налаштування освітлення по Келеру

Якість зображення мікроскопа залежить від розкриття апертурної діафрагми (рис.4.7). При дуже великому розкритті втрачається контрастність зображення (рис.4.7.а), при недостатньому – виникають «ореоли» навколо мікрооб’єктів, обумовлені дифракцією (рис.4.7.б), стають видимими різні дефекти предметного скла і роздільна здатність мікроскопа падає. На рис.4.7.в для порівняння показано зображення при правильному регулюванні апертурної діафрагми.

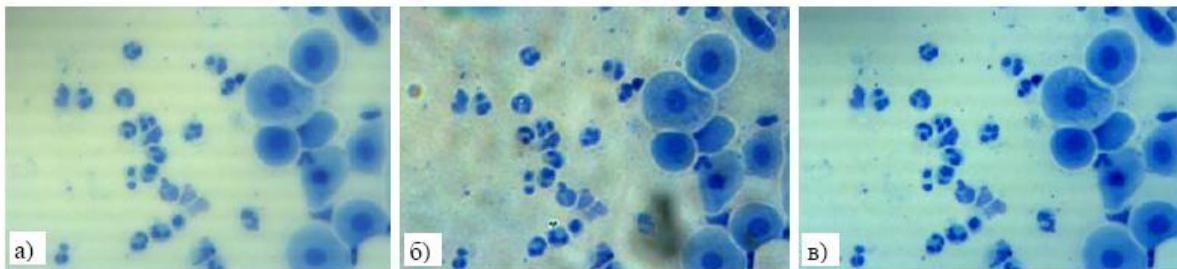


Рисунок 4.7 Вплив налаштування апертурної діафрагми

4.3.2.3 Налаштування та робота з камерою

1. Встановити камеру в адаптер мікроскопа (рис.4.1, поз.1).
2. Підключити її до USB-порту ПК.
3. Провести установку камери за допомогою **Майстра установки нового устаткування**. Програми ScopePhoto і DIRECTX 9.0, а також драйвера для камери-окуляра DCM500 (USB 2.0) встановляться із завантажувального диска автоматично. Завантаження Scoperphoto і DIRECTX 9.0. можна провести безпосередньо з диска. При цьому для установки драйверів для DCM500 (USB 2.0) натисніть відповідну іконку.
4. Включити освітлювач мікроскопа.
5. Помістити препарат на предметний столик, налаштувати освітлення і різкість звичайним способом.
6. Запустити на ПК програму ScopePhoto.
7. Вибрати з меню «Live Capture» (ікона з зображенням відеокамери) модель використовуваної камери (рис.4.8).

При цьому на моніторі повинне з'явитися вікно із зображенням препарату.

8. Ручками регулювання різкості добийтеся отримання різкого зображення препарату.

Якщо фон зображення відмінний від білого, необхідно налаштувати баланс білого.

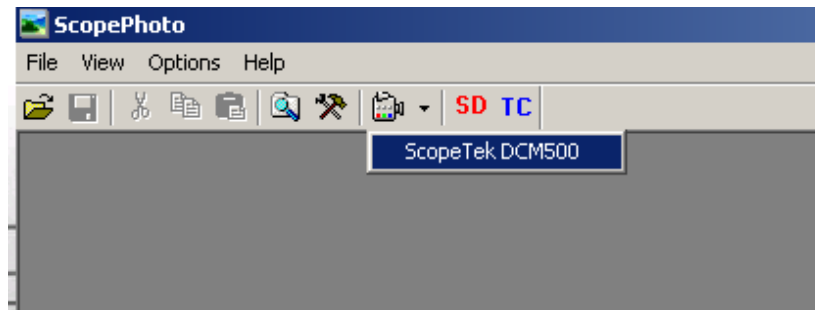


Рисунок 4.8 Вибір камери

9. Вибрати меню Setup (налаштування) >> Video Source Property (властивості джерела відеосигналу) (рис.4.9).

10. Зняти предметне скло з препаратом або встановити поле зору мікроскопа на порожню ділянку предметного скла.

11. За допомогою миші вибрати Auto White Balance (автоматичний баланс білого) на вкладці White Balance (баланс білого). При цьому програма автоматично налаштує камеру на «біле поле».

Якщо після автоматичного налаштування фон як і раніше матиме кольоровий відтінок, потрібно виконати ручну корекцію за допомогою движків «R», «G» і «B» на цій же вкладці.

12. Обертаючи корпус камери в адаптері камери, добитися, щоб при обертанні ручки переміщення предметного столика управо-вліво (рис.4.1, поз.6) зображення на моніторі ПК «прокручувалося» по горизонталі.

13. Зафіксуйте камеру фіксуючим гвинтом адаптера.

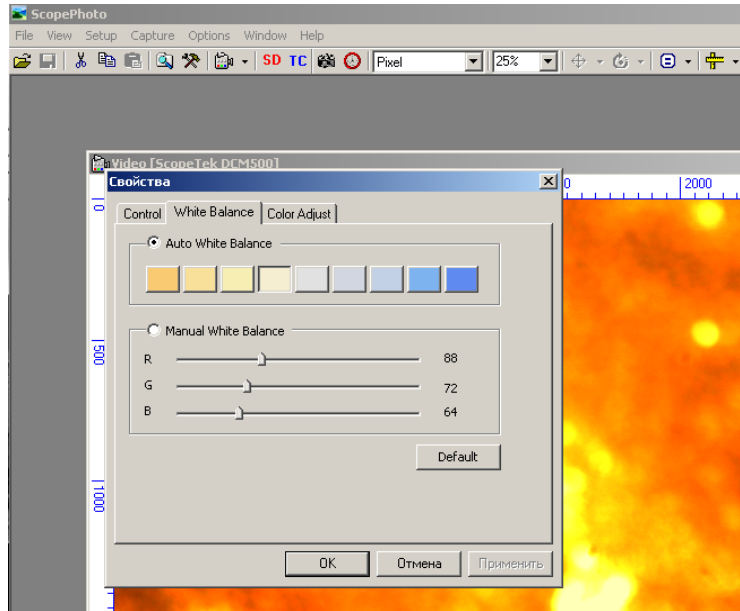


Рисунок 4.9 Налаштування балансу білого

14. Для отримання фотографії виберіть **Capture** → **Capture a Frame**. Відкриється нове вікно з отриманою фотографією. Опція **Auto Capture** (**Capture** → **Auto Capture**) дозволяє проводити автозйомку із заданим проміжком часу.

15. Проведення відеозйомки. Виберіть **Capture** → **Start Capture Video**. Далі ви можете задати тип і назву файлу, параметри зйомки і так далі Для того, щоб припинити зйомку виберіть **Capture** → **Stop Capture Video**.

16. Пункти 14-15 виконати для трьох світлофільтрів.

4.4 Обробка результатів та висновки

Наведіть фотографії об'єкту дослідження для випадків білого світла та трьох світлофільтрів. Зробіть висновки.

4.5 Контрольні запитання

1. Що таке світлова мікроскопія? Види освітлення.
2. Назвіть типи мікроскопів за кількістю оптичних блоків.
3. Складові мікроскопу UNICO H600.
4. Назвіть види об'єктивів. Їх маркування.
5. Камери для мікроскопів і їх види (за типом матриць).
6. Які можливості програмного забезпечення ScopePhoto?
7. Опишіть методику підготовки мікроскопу до роботи.
8. Опишіть метод налаштування освітлення по Келеру.
9. Процес налаштування зображення. Вплив апертурної діафрагми.
10. Опишіть роботу відеоокуляра.