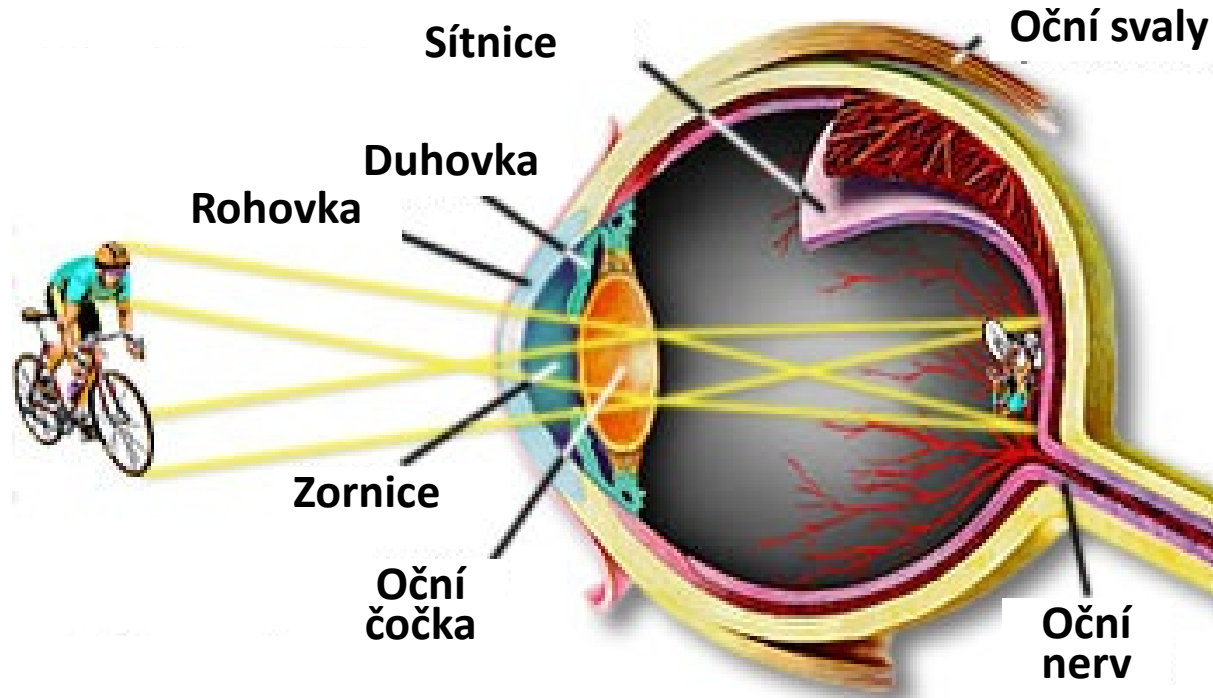


Současná optická mikroskopie



- Rozlišovací schopnost lidského oka je omezená zorným úhlem
- Zorný úhel – úhel pod kterým oko pozoruje předmět
- Rozlišení závisí na velikosti obrazu na sítnici
- Závislost na velikosti a hustotě světločivých buněk (rozteč ca 5 μm)
- Zdravé lidské oko: min. zorný úhel $\sim 1'$ (tj. 0.3 mrad)
- Při konvenční zrakové vzdálenosti ($\delta=25\text{ cm}$) rozlišíme objekty vzdálené $\sim 75\text{ }\mu\text{m}$, tj. např. 14 vrypů/mm

Jaké vlastnosti světla oko vnímá?

- Intenzitu záření $I = E^2$ (světelný tok)
- Vlnovou délku (400 – 800 nm), tj. barvu světla

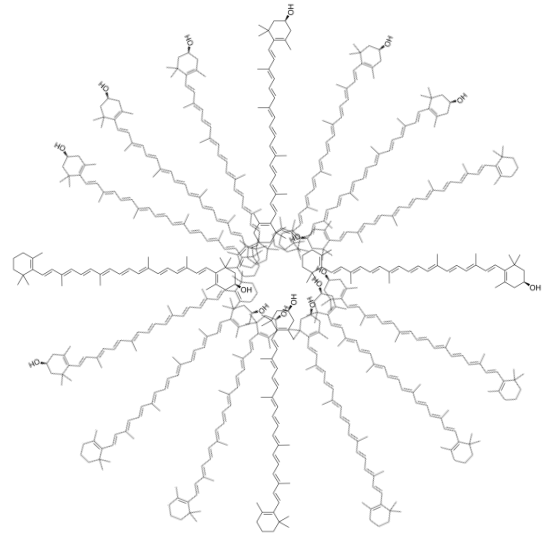
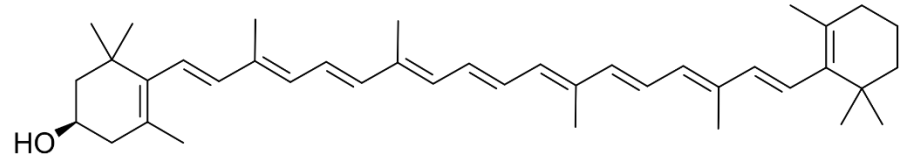
Nevnímáme:

- Změny intenzity elektrické složky EM pole E
- Polarizaci
- Fázové rozdíly

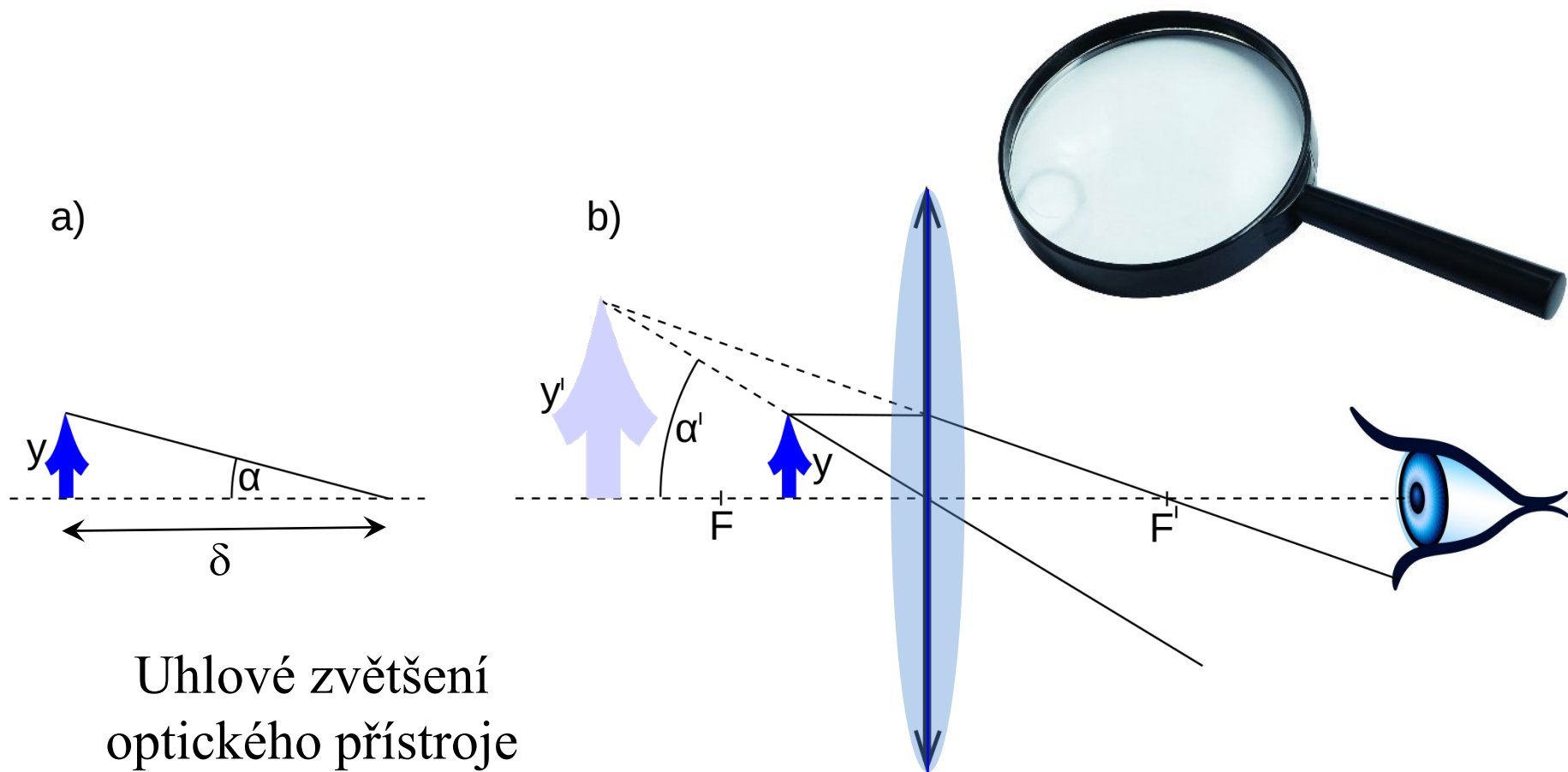
(Haidinger's brush)

směr polarizace záření

xanthofyl



Lupa - nejjednodušší optický přístroj

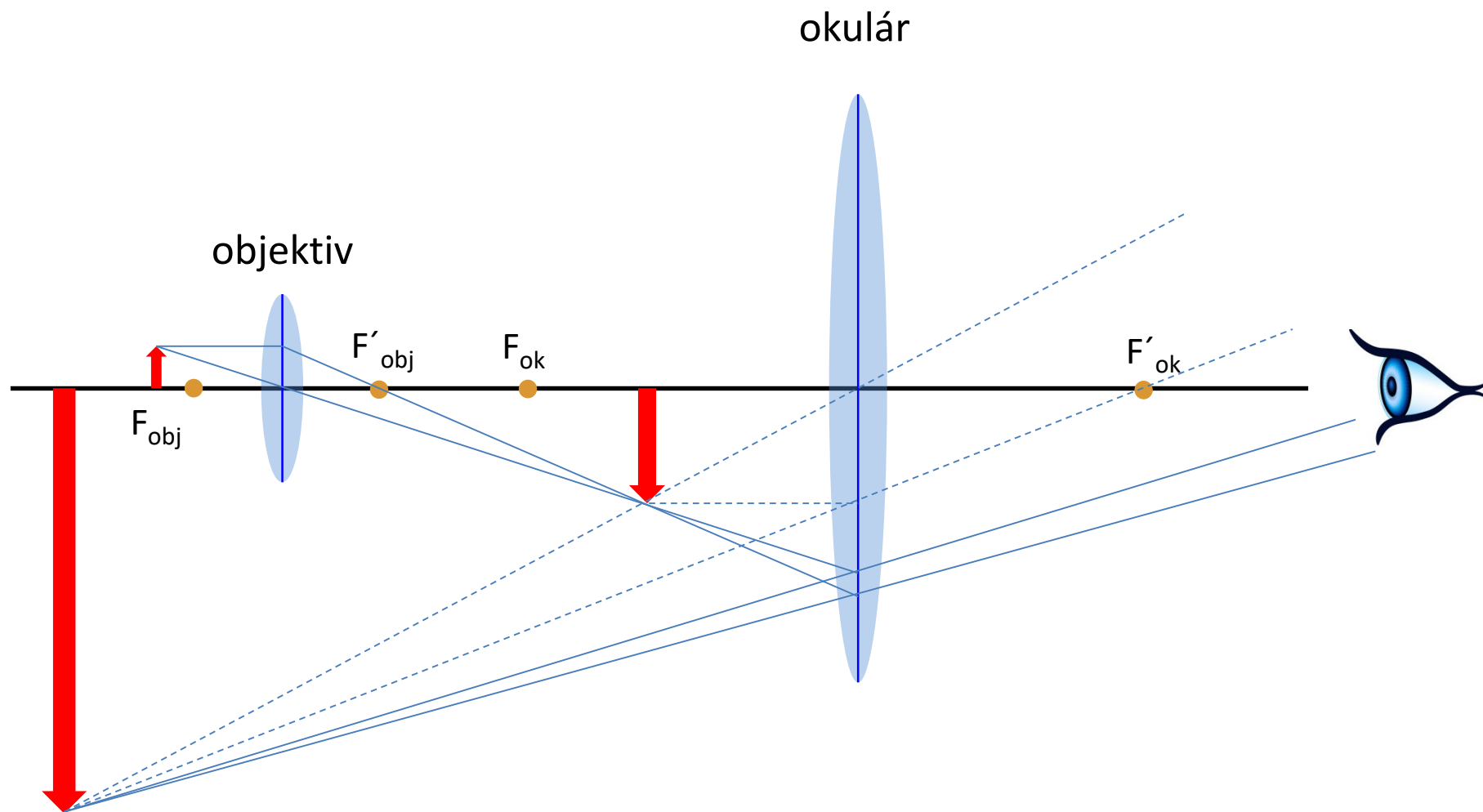


Uhlové zvětšení
optického přístroje

$$Z = \frac{\alpha'}{\alpha}$$

Konvenční zřaková vzdálenost $\delta = 25 \text{ cm}$

Princip optického mikroskopu



Základní schéma mikroskopu

- dvě soustavy spojných čoček - **objektiv** a **okulár**
- **objektiv** vytváří **skutečný, zvětšený** a **převrácený** obraz
- objekt je umístěn mezi ohnisko a maximálně dvojnásobek ohniskové vzdálenosti objektivu
- tento obraz pozorujeme **okulárem** jako lupou
- výsledkem je **velmi zvětšený, převrácený** a **neskutečný** obraz
- objektiv a okulár spojuje **tubus**
- **kondensor** – osvětlovací systém soustřeďující světlo na pozorovaný objekt, zajišťuje vhodné osvětlení

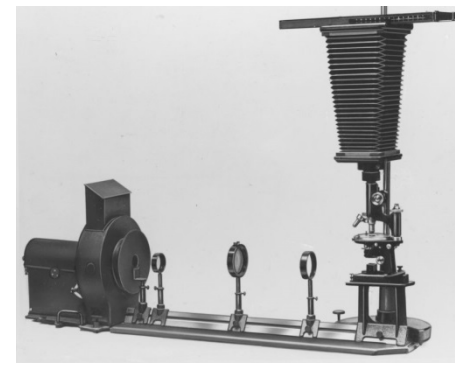
Historie optické mikroskopie

- 1590 – 1610 první použitelné mikroskopy: Hans a Zaccharias Janssen – výroba brýlí (Middleburg, NL)
- 1665 – Robert Hook: **Micrographia** (první traktát o pozorování rostlinných tkání a minerálů), zavedl pojem **buňka (cell)**
- 17./18. století – A. van Leewenhoek (Leyden, NL), brousil kvalitní čočky, zkonstruoval 500 mikroskopů, zvětšení až 270×
- **18. století – úpadek zájmu, mikroskop považován za kuriozní hračku neužitečnou pro seriózní vědu**
- 1826 – konstrukce **achromatických** objektivů (Joseph Lister, UK)
- 1834 – polarizační mikroskopie
- 1847 – Carl Zeiss (Jena, D) – vývoj a výroba mikroskopů
- 1886 – Ernst Abbe navrhuje pro Carl Zeiss **apochromatické** objektivy. Konstrukce Köhlerova osvětlovacího systému. Dosaženo rozlišení na hranici difrakční limity.
- **Začátek 20. století – věří se, že vývoj optických mikroskopů je definitivně uzavřen. Podobně jako celé klasické fyziky...**

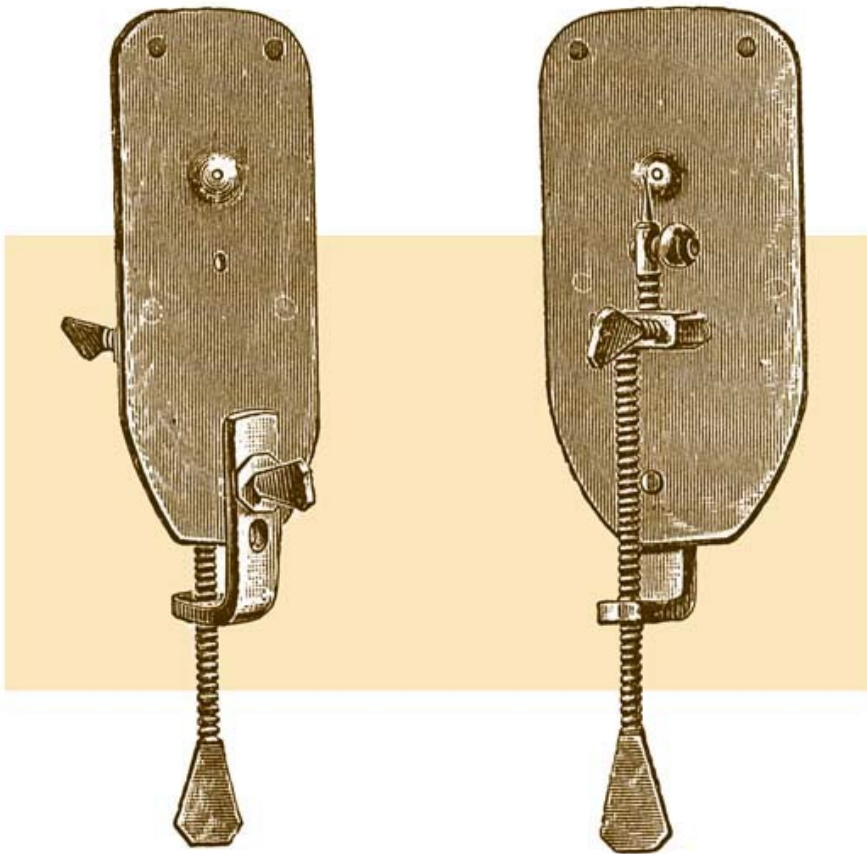


... ale není všem dnům konec

- 1911 – konstrukce fluorescenčního mikroskopu s UV excitací: **Carl Reichert** (Vídeň, A)
- 1932 – objev fázového kontrastu: **Fritz Zernick** (Holandsko, Nobelova cena 1953)
- 1955 – diferenciální interferenční kontrast: **Georges (Jerzy) Nomarski** (Polsko/Francie)
- 1960-1970 – první použití videomikroskopie (vidikon), zvýšení obrazového kontrastu, analogové zpracování optického signálu
- 1968 – rastrovací tandemový konfokální mikroskop
- 1975 – modulační kontrast: **Robert Hoffman** (USA)
- 1978 – laserový konfokální rastrovací mikroskop

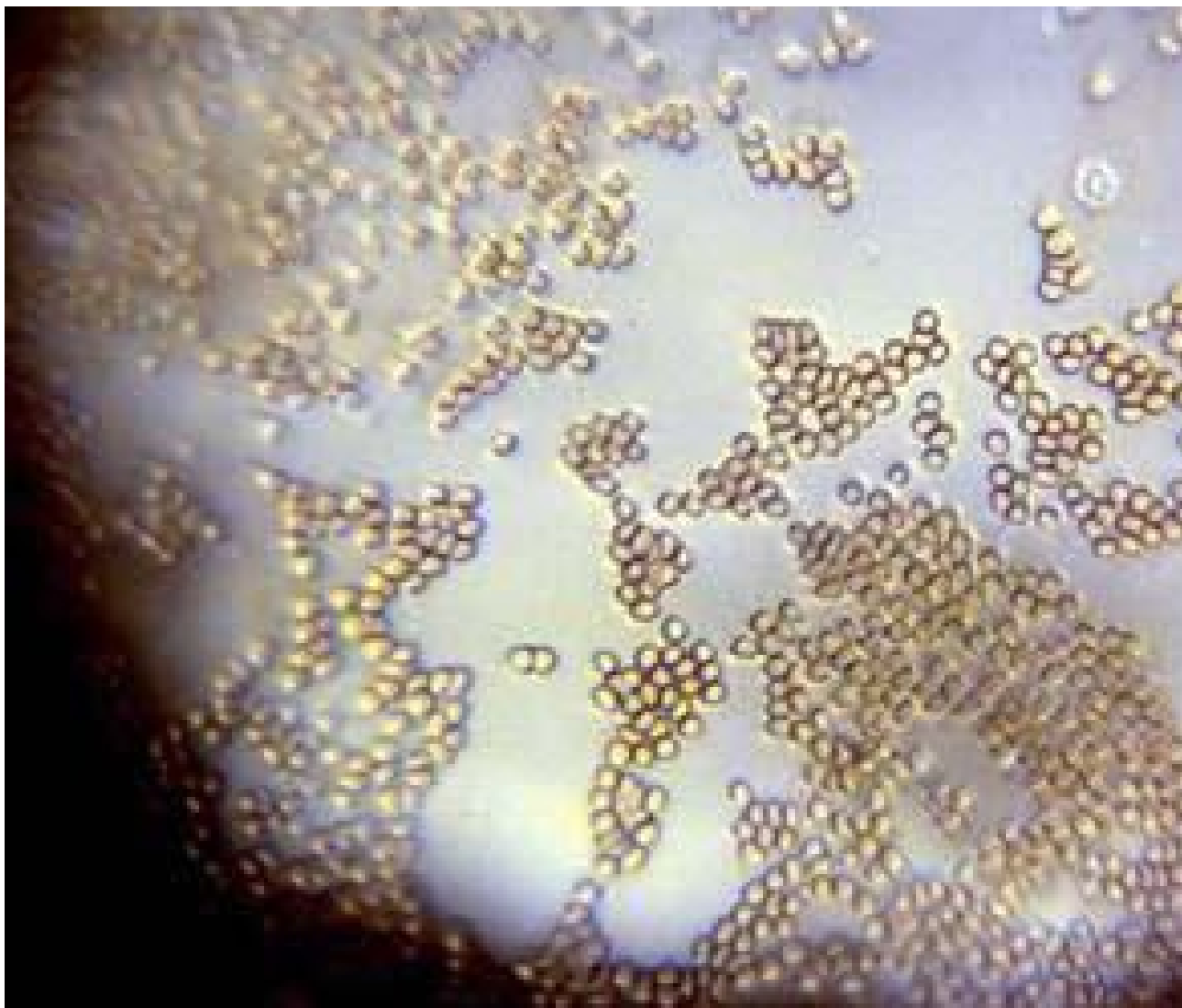


První mikroskopy (Leeuwenhoek, 17. století)



- v principu pouze **lupa** s jednou
jedinou čočkou s velice krátkým
ohniskem
- čočka – skleněná kulička o malém
poloměru 1 – 2 mm
- snadná výroba, ale velká barevná a
kulová vada

Co tak mohl Leeuwenhoek ve svém mikroskopu vidět...



První složené mikroskopy

➤ Robert Hooke 1635-1703





Faktory ovlivňující kvalitu zobrazení:

- Zvětšení
- Rozlišovací schopnost
- Obrazový kontrast

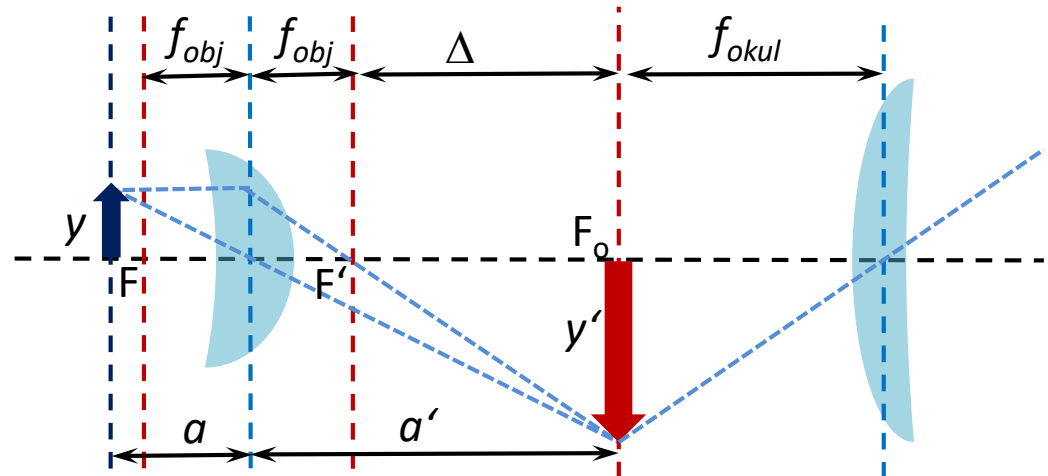
Zvětšení mikroskopu

- paradoxně **nejméně** důležitý parametr z hlediska kvality obrazu
- závisí na **příčném** zvětšení objektivu a **úhlovém** zvětšení okuláru
- maximální užitečné zvětšení: **ca 1000×**
- užitečné zvětšení je limitované **rozlišovací** schopností objektivu
- další zvětšení pomocí okuláru nad tuto mez poskytuje tzv. prázdné zvětšení (větší obraz, ale bez nových detailů)

$$\beta_{obj} = \frac{y'}{y} = \frac{\Delta + f_{obj}}{a} = \frac{\Delta}{f_{obj}}$$

$$Z_{okul} = \frac{\delta}{f_{okul}}$$

$$Z_{mic} = \beta_{obj} \times Z_{okul} \quad Z_{mic} = \frac{\Delta \times \delta}{f_{obj} \times f_{okul}}$$

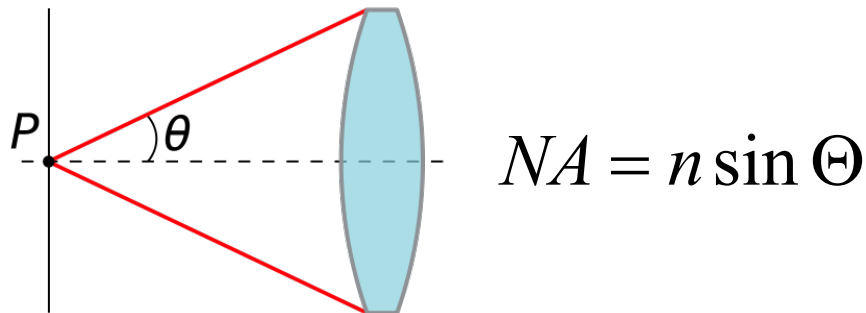


Δ – optická délka tubusu

δ - konvenční zraková vzdálenost
(tj. 25 cm)

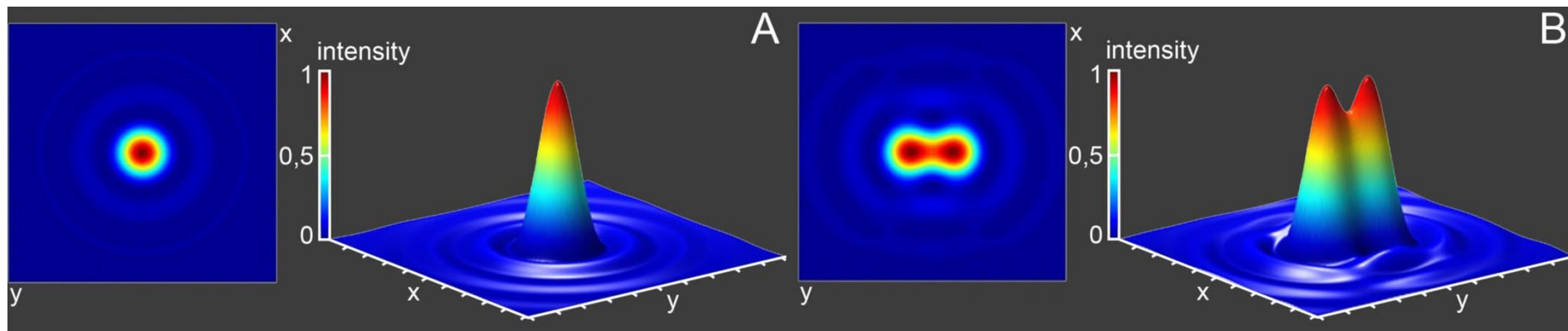
Rozlišovací schopnost mikroskopu

- fundamentální omezení dané **vlnovou** povahou světla
- u mikroskopu je daná rozlišovací schopností **objektivu**
- numerická apertura - NA
- vysoká rozlišovací schopnost sama o sobě **nezaručuje** vysokou kvalitu obrazu



$$r_{lateral} = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

$$r_{axial} = 1.4 \frac{n\lambda}{NA^2}$$

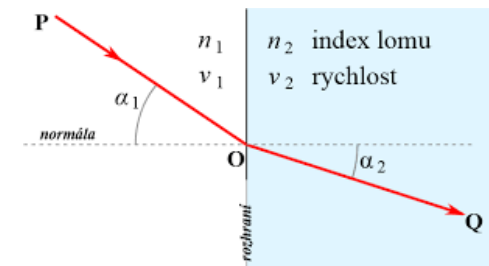


Kontrast zobrazení

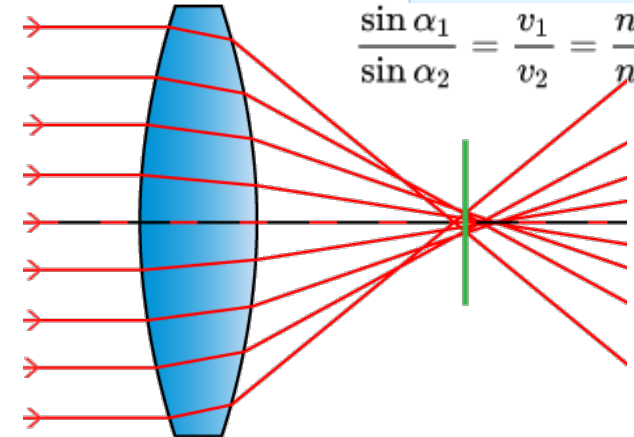
- primárním zdrojem kontrastu je interakce osvětlujícího záření se zobrazovaným objektem (absorpce, ohyb, rozptyl)
- nejdůležitější parametr určující kvalitu zobrazení
- poměr rozdílu **jasu** objektu a **jasem** pozadí k **jasu** pozadí
- mez rozlišení lidského oka při vizuálním pozorování $\sim 2 - 5\%$ (světlé pole)

$$C = \frac{B_{\text{objekt}} - B_{\text{pozadí}}}{B_{\text{pozadí}}}$$

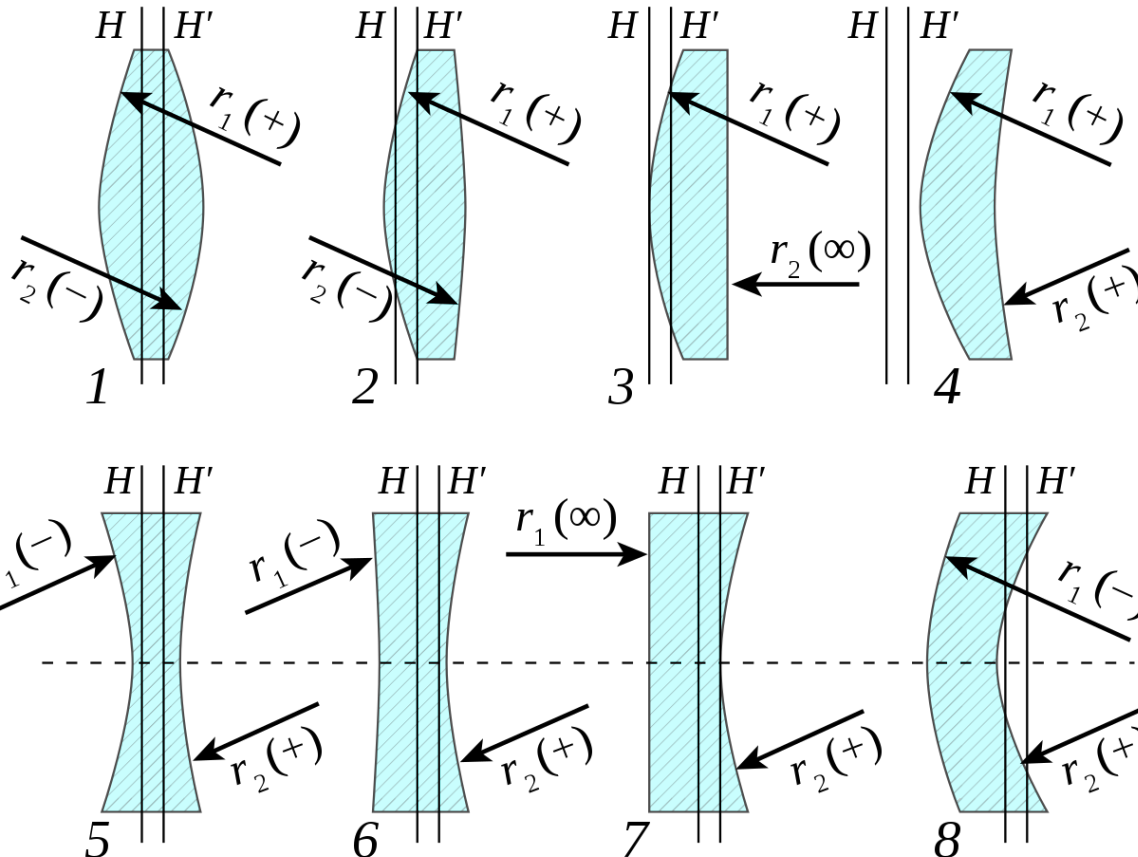
Čočky a objektivy - nikdo není dokonalý



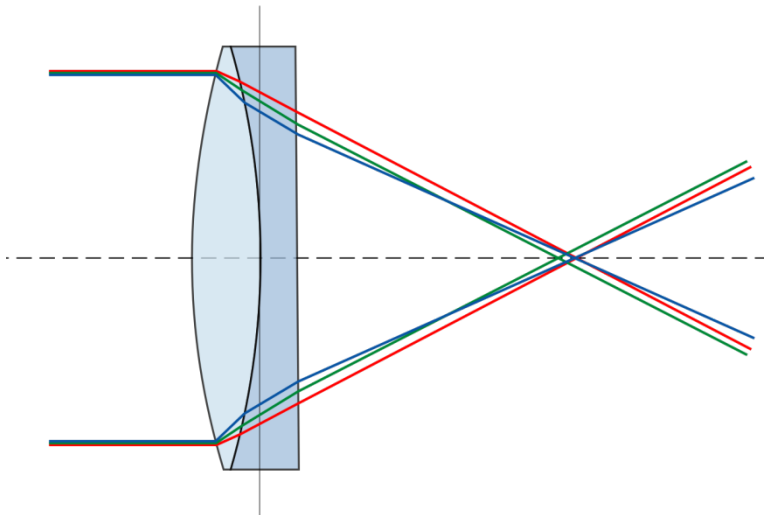
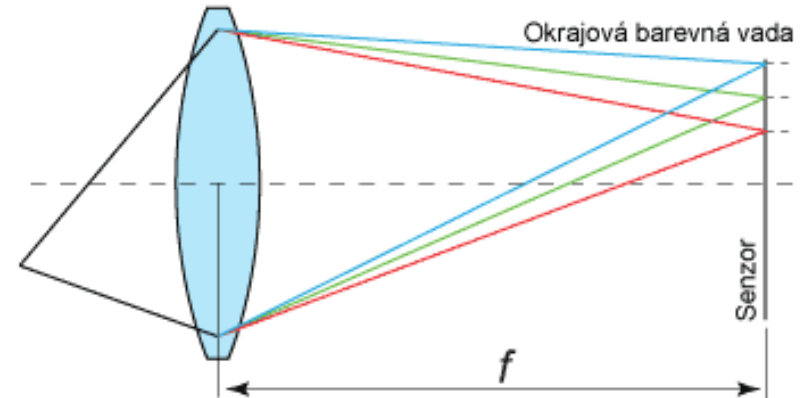
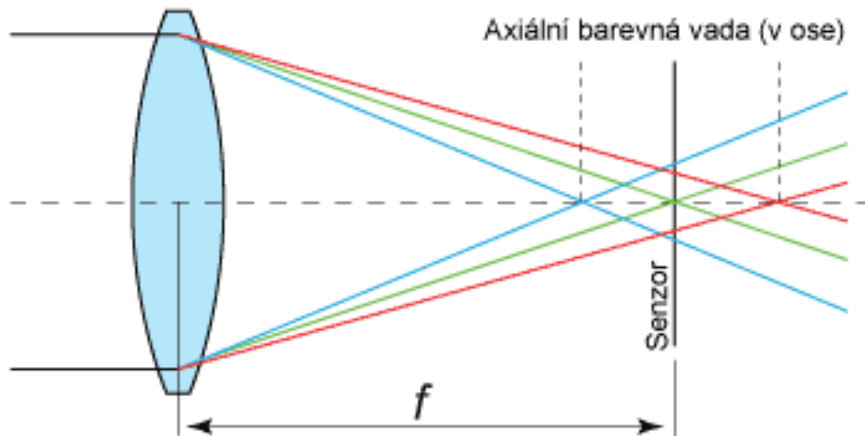
$$\frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{n_2}{n_1}$$



- lom světla na dvou rozhraních s různým indexem lomu
- komplikovaná výroba povrchů jiných než kulových a rovinných
- **nutný ray-tracing! Snelliův zákon lomu**
- kompenzace vad pomocí složitějších tvarů povrchu a kombinací různých optických materiálů



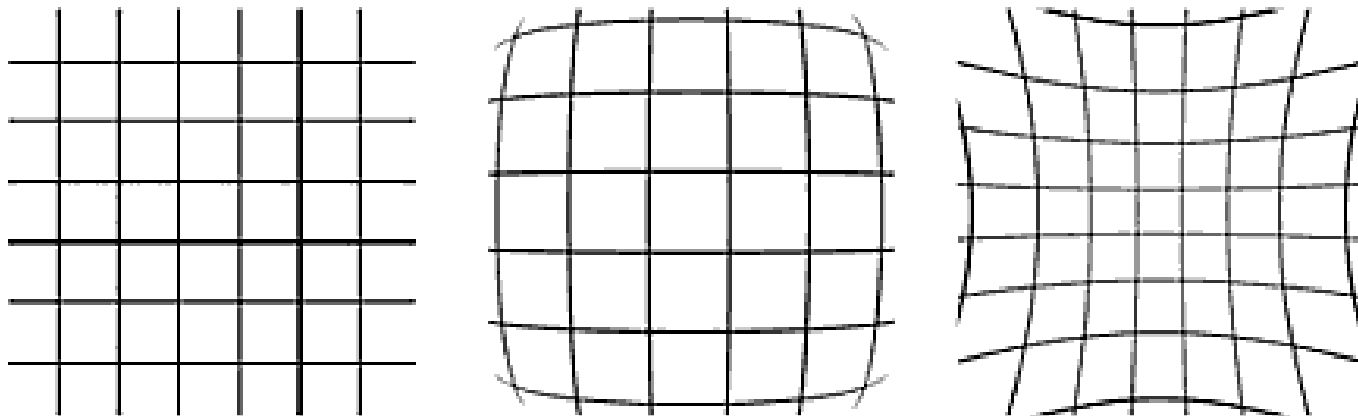
Barevná vada



Řešení barevné vady:

- Konstrukce složených čoček z materiálů s různou disperzí indexu lomu
- dublety
- triplety

Sférické deformace obrazu



- sférické zkreslení způsobí deformaci přímek
- nerealistické zobrazení k okrajům zorného pole
- soudek (**barel**)
- polštářek (**pillow**)

Objektivy mikroskopů

60x Plan Apochromat Objective



Figure 1

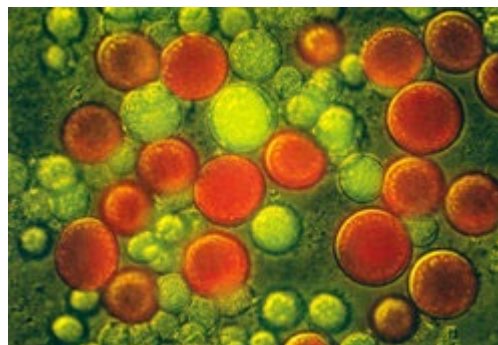
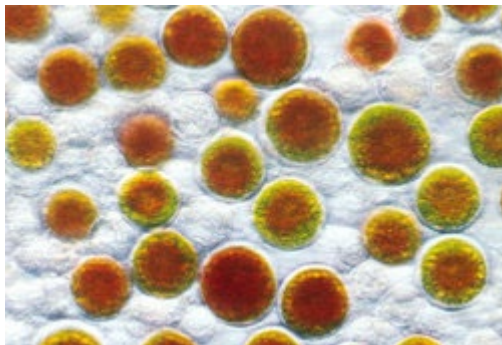
Nejsou tak jednoduché, jak vypadají zvenku...



- Nutnost korekce **optických** vad čoček: barevná vada, kulová vada
- **Achro, Achromat** – achromatické objektivy: korekce barevné vady
- **Apo, Apochromat** – apochromatické: nejvyšší stupeň korekce barevné i kulové vady
- **Fl, Fluor, Fluor, Neofluar, Fluotar** - fluoritové čočky, lepší odstranění kulové a barevné vady),
- **Plan** - korekce zklenutí zorného pole, dobré zaostření rovinného objektu v celém zorném poli mikroskopu

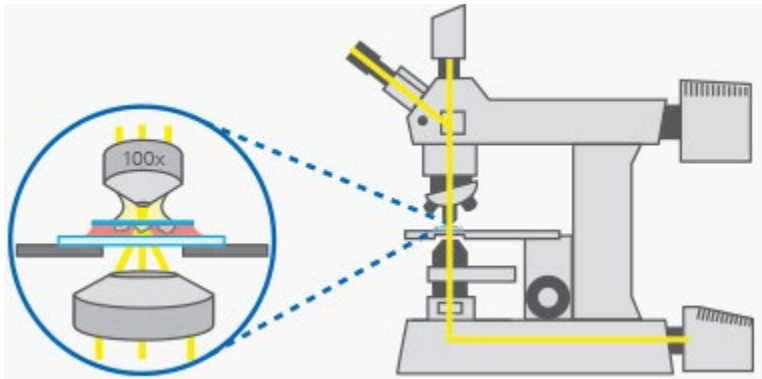
Zesílení kontrastu:

- Modulace intenzity a směru osvětlení
- Mikroskopování v temném poli
- Fázový kontrast
- Diferenciální interferenční kontrast
- Polarizační mikroskopie
- Konfokální mikroskopie
- Fluorescenční mikroskopie



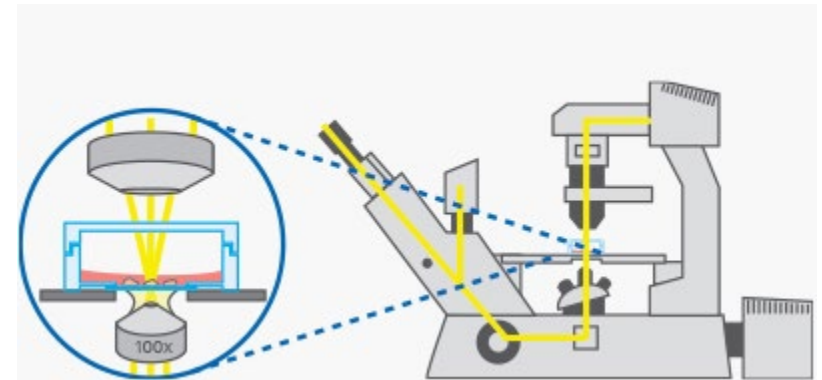
Konstrukce mikroskopu

- mikroskop **vzpřímený** (upright)
- mikroskop **invertovaný** (inverted)



Vzpřímený mikroskop

- objektiv **nad** vzorkem
- buňky imobilizované mezi podložním a krycím sklíčkem; fixované preparáty
- mikroskopování buněk ponorným imerzním objektivem (bez krycího sklíčka)
- vhodné pro fázový kontrast a fluorescenční mikroskopii



Invertovaný mikroskop

- objektiv **pod** vzorkem
- vhodný pro mikroskopování živých buněk v kultivačních miskách s průhledným dnem
- přirozená imobilizace buněk gravitací nebo adhezí v jedné rovině (jednodušší fokusování)
- lepší možnosti pro udržování vhodných kultivačních podmínek (přístup ze shora)

Osvětlovací soustava mikroskopu

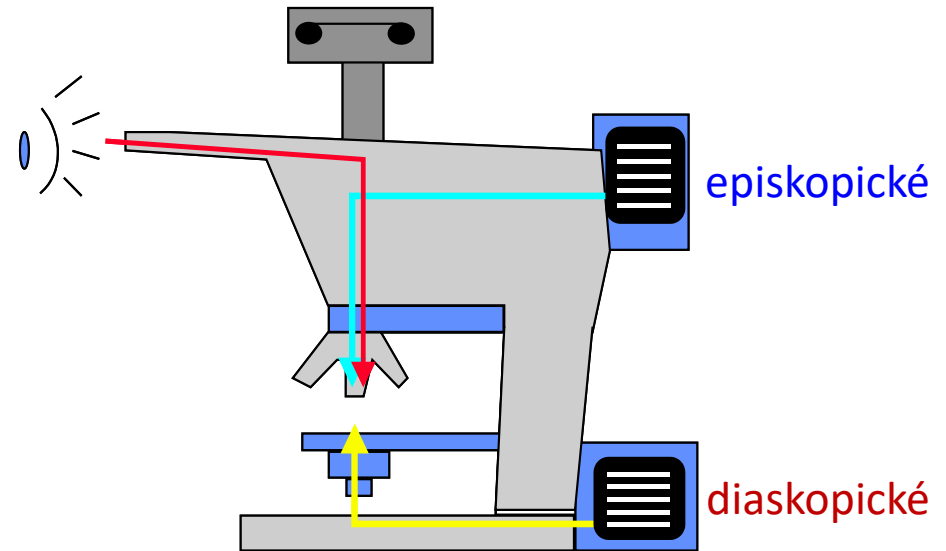
- **diaskopické osvětlení** – pozorování v procházejícím světle
- **episkopické osvětlení** – pozorování v odraženém světle

Diaskopické osvětlení

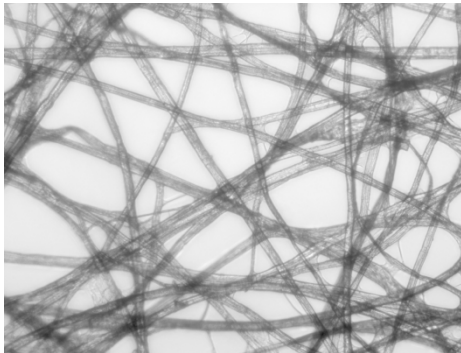
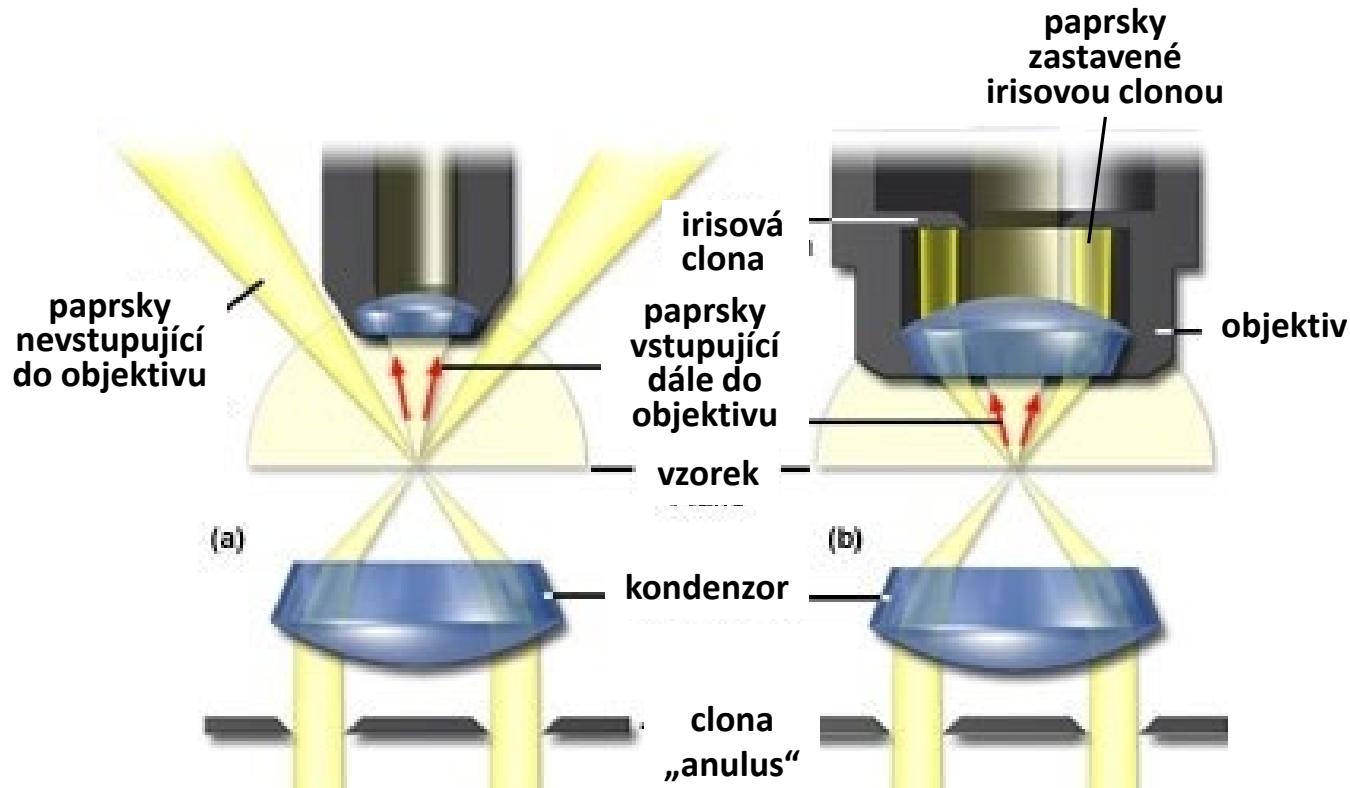
- ❖ vhodné pro pozorování průhledných vzorků
- ❖ často používané v biologii (buňky)
- ❖ světlé pole
- ❖ tmavé pole

Episkopické osvětlení

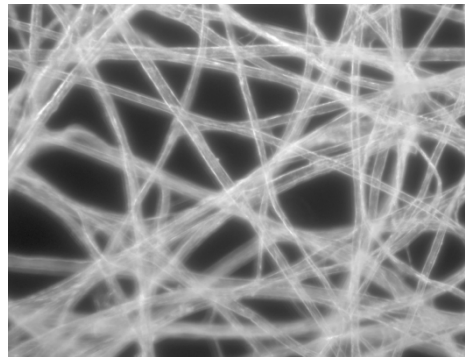
- ❖ vhodné pro pozorování neprůhledných vzorků
- ❖ Používá se ve fluorescenční mikroskopii
- ❖ stejný směr chodu paprsků pro osvětlení i pozorování – **nutný dělič svazku**



Mikroskopie ve světlém a tmavém poli



bright field



dark field

- pouze strukturní detaily, které **rozptylují**, **odrážejí**, **lomí** nebo **ohýbají** světlo přispívají k tvorbě obrazu
- vhodná pro pozorování jednotlivých buněk v jedné vrstvě
- nevhodné pro tlustší vzorky (rozptyl od mimofokálních rovin snižuje kontrast)

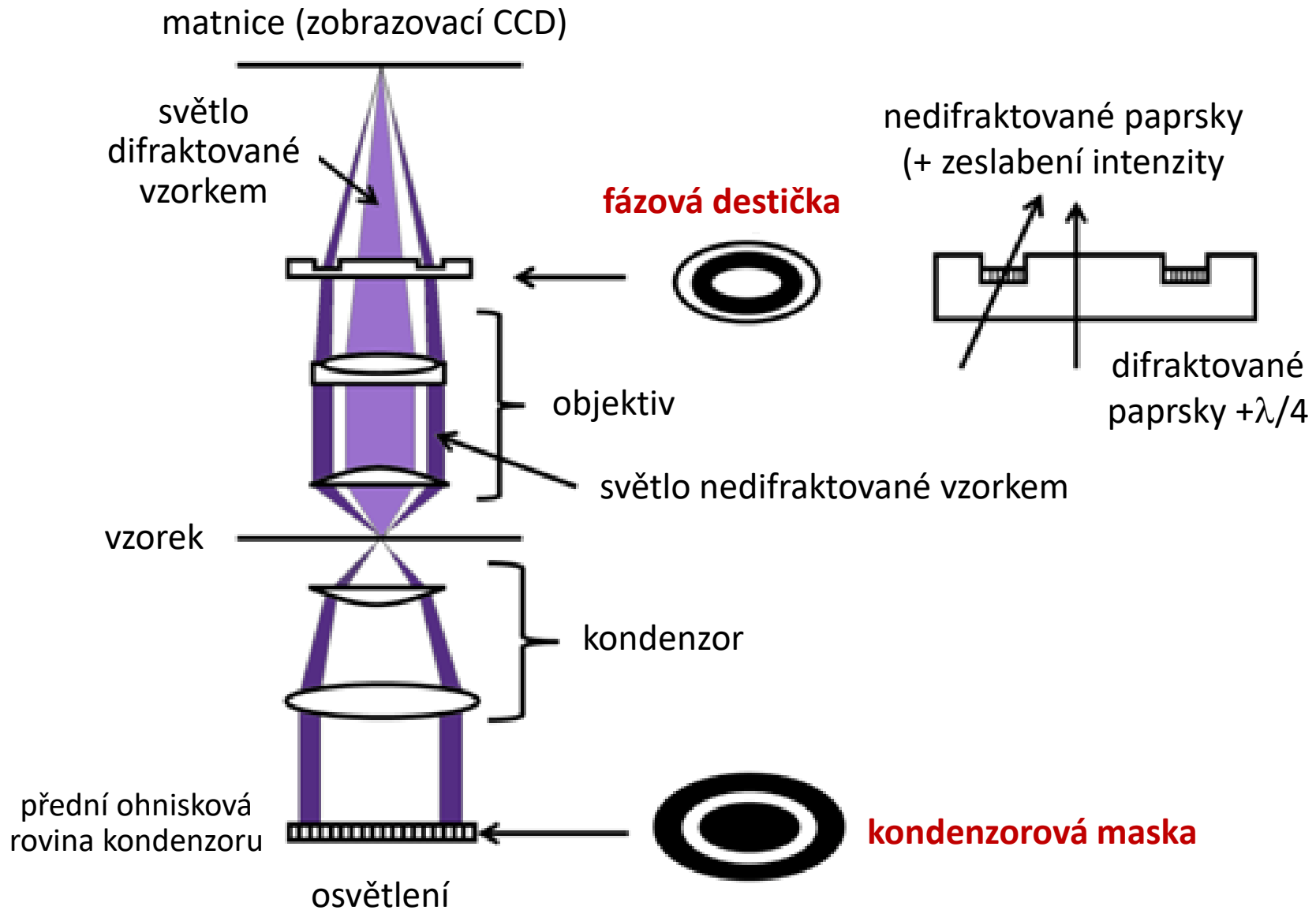
Fázový kontrast

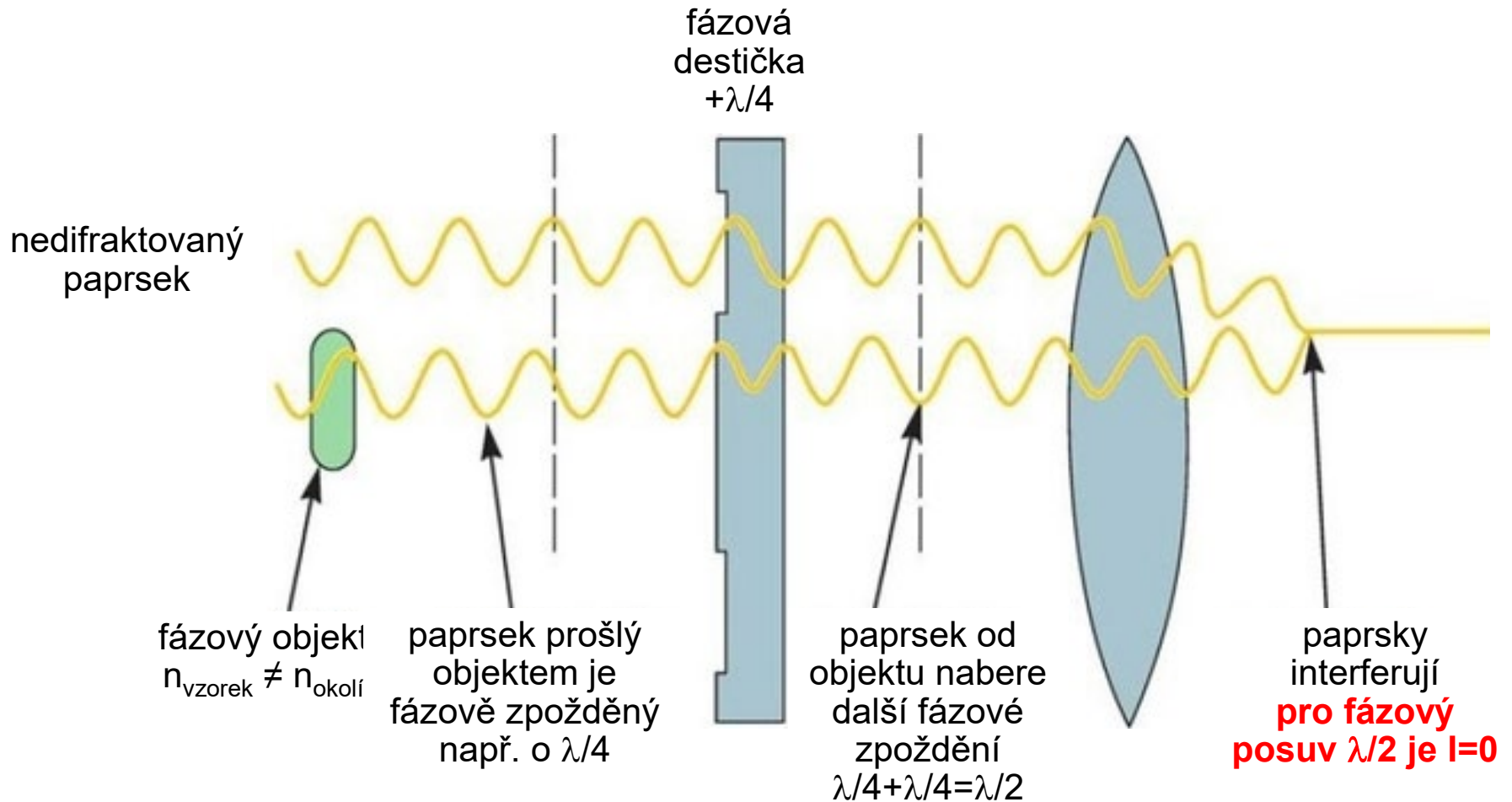
- amplitudové objekty – odlišnost v barvě (chromatičnost)
- barvení preparátu pro zvýšení amplitudového kontrastu
- fázové objekty – odlišnost v indexu lomu
- interference světla s různým fázovým zpožděním
- **nedostatek: halo efekt na rozhraních s vysokým indexem lomu (lom světla a následný rozptyl), který snižuje kontrast**



Frits Zernike
1888 – 1966
Amsterdam
Nobelova cena 1953

Princip mikroskopie s fázovým kontrastem





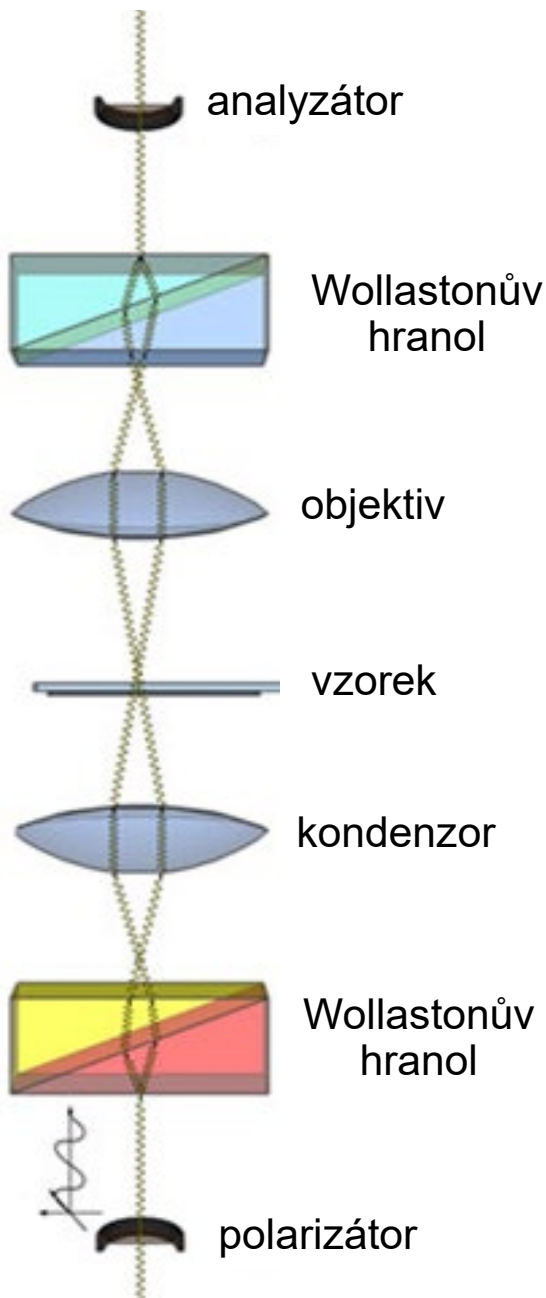
- podle konstrukce fázová destička mění fázi difraktovaného paprsku o $+\lambda/4$ nebo $-\lambda/4$
- pozitivní fázový kontrast (silnější části objektu jsou tmavší)
- negativní fázový kontrast (silnější části objektu jsou světlejší)
- používá se kvasimono chromatické osvětlení (většinou žlutozelené kvůli citlivosti oka)
- při použití bílého světla je obraz barevný (závislost indexu lomu na λ)
- modifikace propustnosti fázové destičky zlepšuje kontrast

Diferenciální interferenční kontrast (DIC)



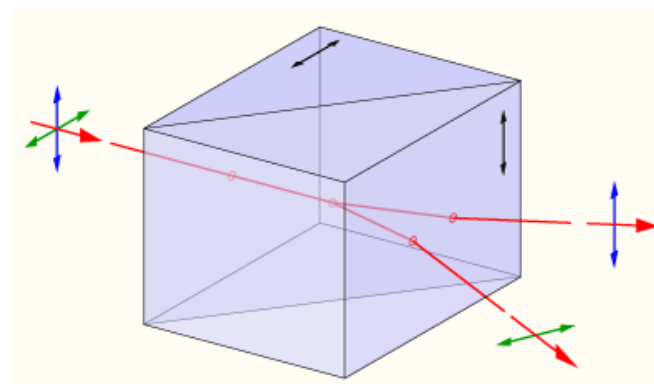
Georges Nomarski
1919 – 1997
Polsko / Francie

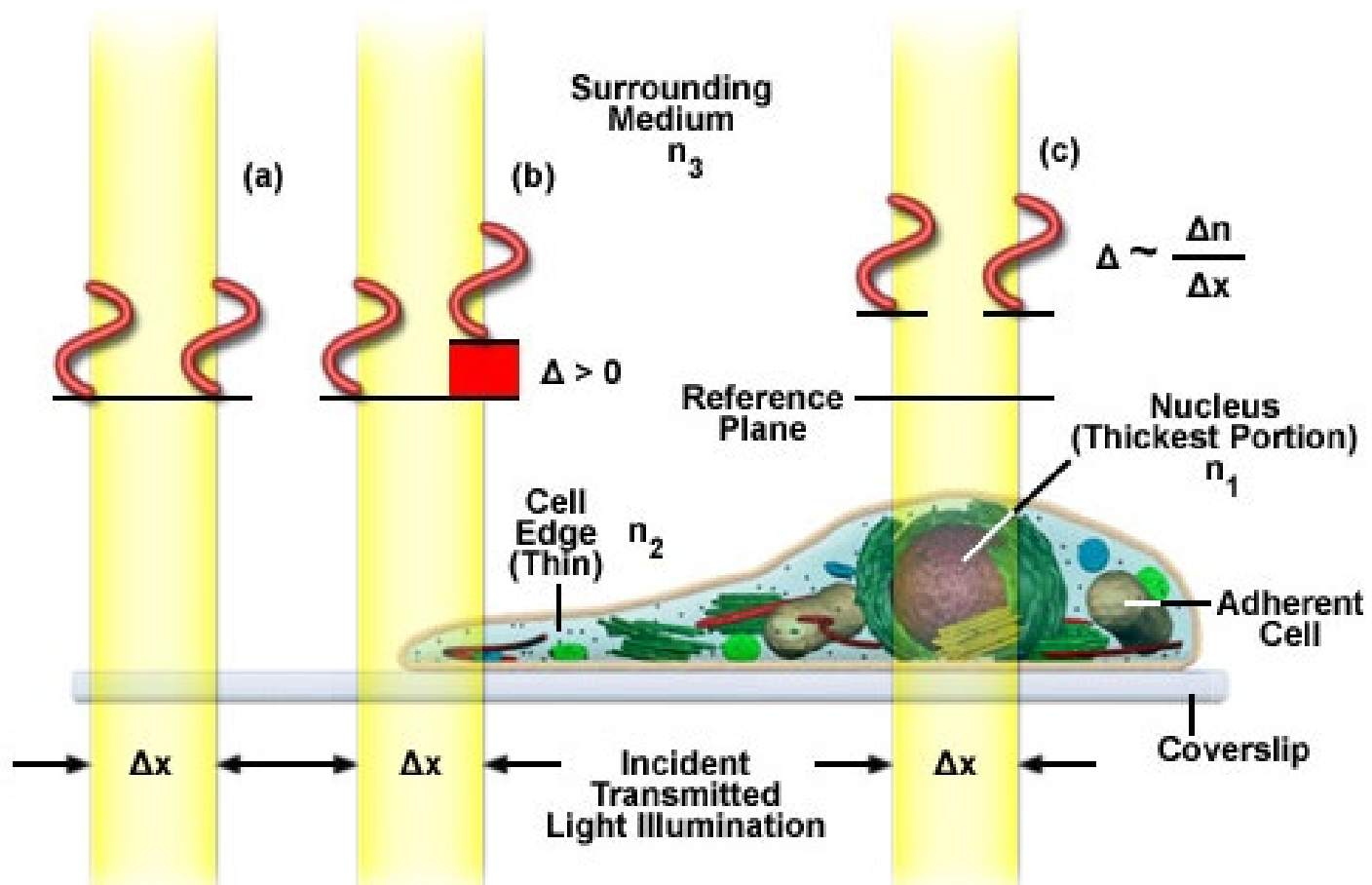
okulár/matnice



Princip DIC

- polarizátor / analyzátor
- Wollastonův / Nomarskeho hranol
- dva paprsky s ortogonální polarizací – řádný a mimořádný
- interference dvou obrazů předmětu od paprsků s ortogonální polarizací
- interference vizualizuje fázové rozdíly mezi paprsky prošlé stejným místem pod trochu jiným úhlem (tj. na gradech tloušťky nebo indexu lomu různě dlouhou optickou dráhu)
- vizualizace gradientů indexů lomu
- vizualizace gradientů tloušťky vzorku
- dobře zviditelňuje hrany objektů
- poskytuje pseudo 3D reliéfy





$\varphi_0 = 0$

$\varphi_0 = \pi/4$

Zobrazování buněk pomocí DIC

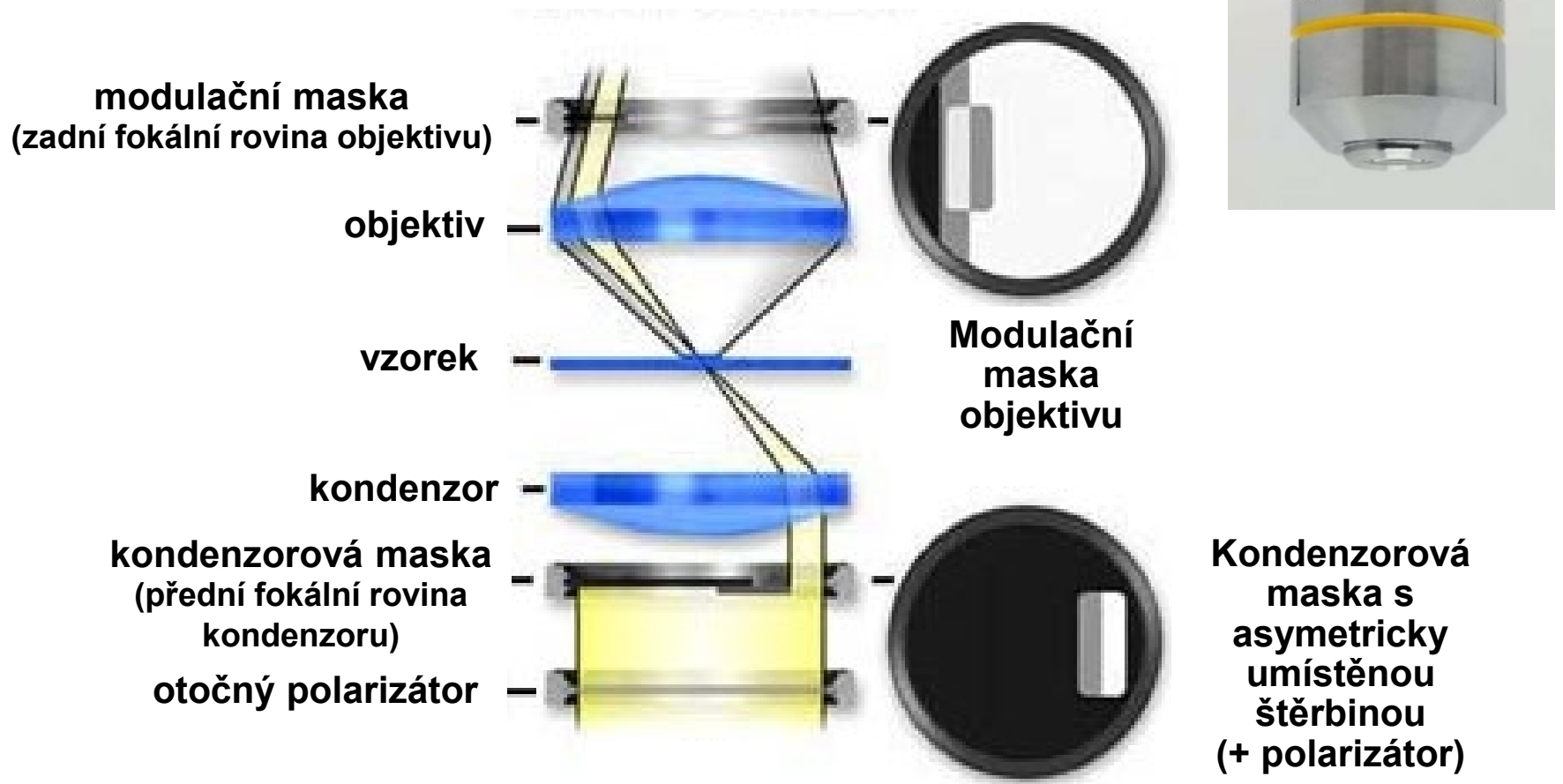


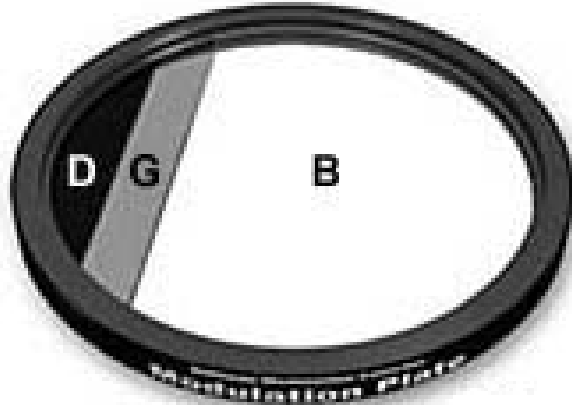
- Zvýrazněné hrany a okraje objektů, zakřivené struktury a struktury s rozdílným indexem lomu
- Poskytuje pseudo 3D reliéfy: složitý a nejednoznačný vztah s fyzikální strukturou objektu
- Iluze šikmého osvětlení
- Relativně malá hloubka ostrosti ~ 250 nm (viz obrázek B)
- Nevýhody: artefakty od podložek z opticky aktivních materiálů (plexiglas)

Hoffmanův modulační kontrast (HMC)

Robert Hoffman (1975)

- zdokonalená verze mikroskopu se šikmým osvětlením (štěrbina)
- detekce gradientů optické tloušťky vzorku
- paprsky procházející různými gradienty jsou odchýlené do různých směrů a různě zeslabené modulační maskou
- plastický reliéf vzorku podobně jako u DIC (pseudo 3D)





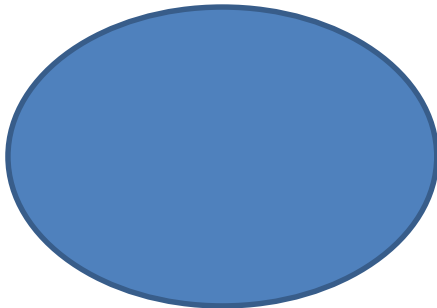
Modulační maska objektivu

- umístěná v **zadní** ohniskové rovině objektivu (tzv. Fourierova rovina objektivu)
- konjugovaná s kondenzorovou maskou se štěrbinou (vzájemné zobrazování)
- 3 zóny šedých filtrů:
- **D** (Dark) $T = 1\%$
- **G** (Grey) $T = 15\%$
- **B** (Bright) $T = 100\%$



Kondenzorová maska se štěrbinou

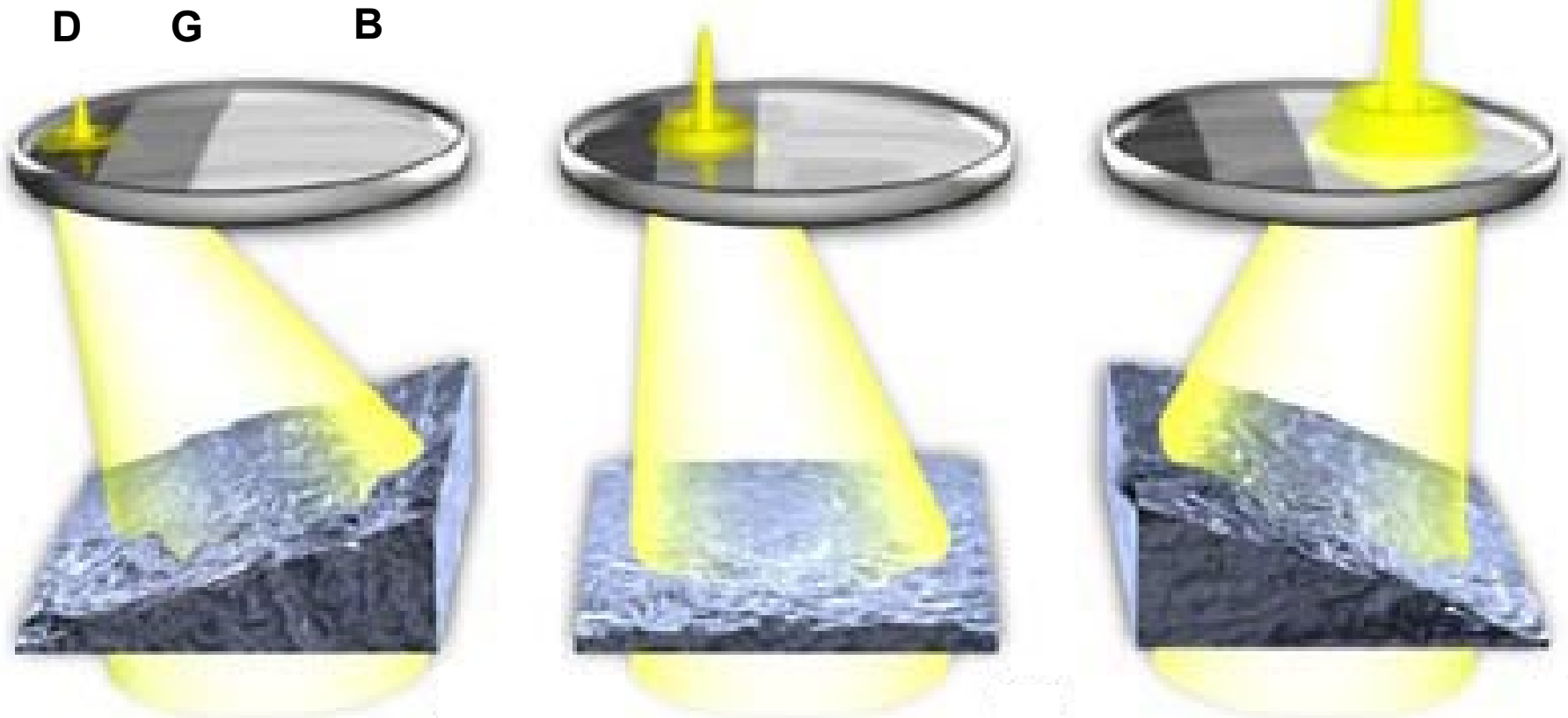
- umístěná v **přední** ohniskové rovině kondenzoru
- konjugovaná s modulační maskou objektivu
- excentrická obdélníková štěrbina se ostře promítá na zónu **G** modulační masky
- část štěrby je překrytá polarizátorem



Otočný polarizátor

- umožňuje spojitě modulovat intenzitu světla procházející částí kondenzorové štěrby
- ladění kontrastu

Princip zobrazování optických gradientů

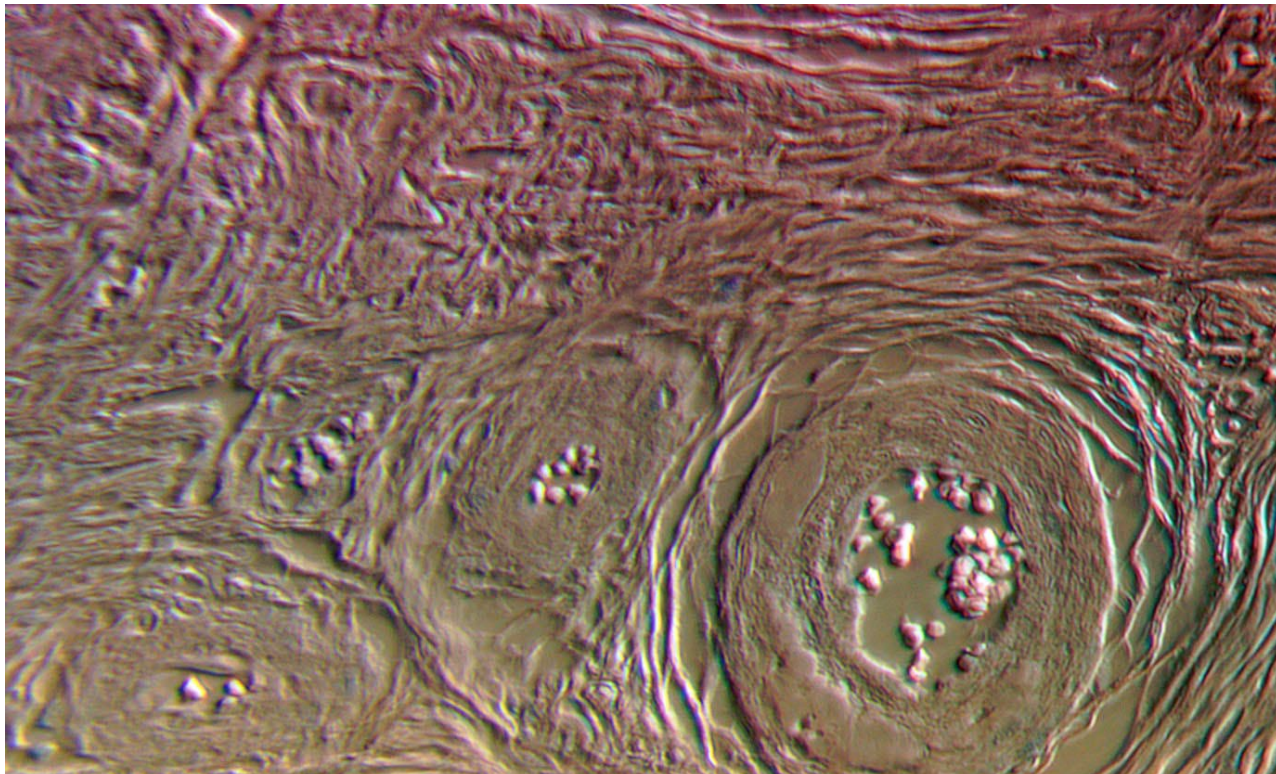


- na místech s optickým gradientem (kolmým na osu štěrbinu) se šikmo dopadající paprsky odchýlí od původního směru
- na zónu **G** se zobrazí paprsky, které se od původního směru neodchýlily (části vzorku bez optického gradientu; okolí)
- paprsky odchýlené vpravo dopadnou na zónu **B** a budou zeslabené méně než neodchýlené paprsky (zóna **G**) nebo paprsky odchýlené vlevo, které dopadnou na zónu **D**

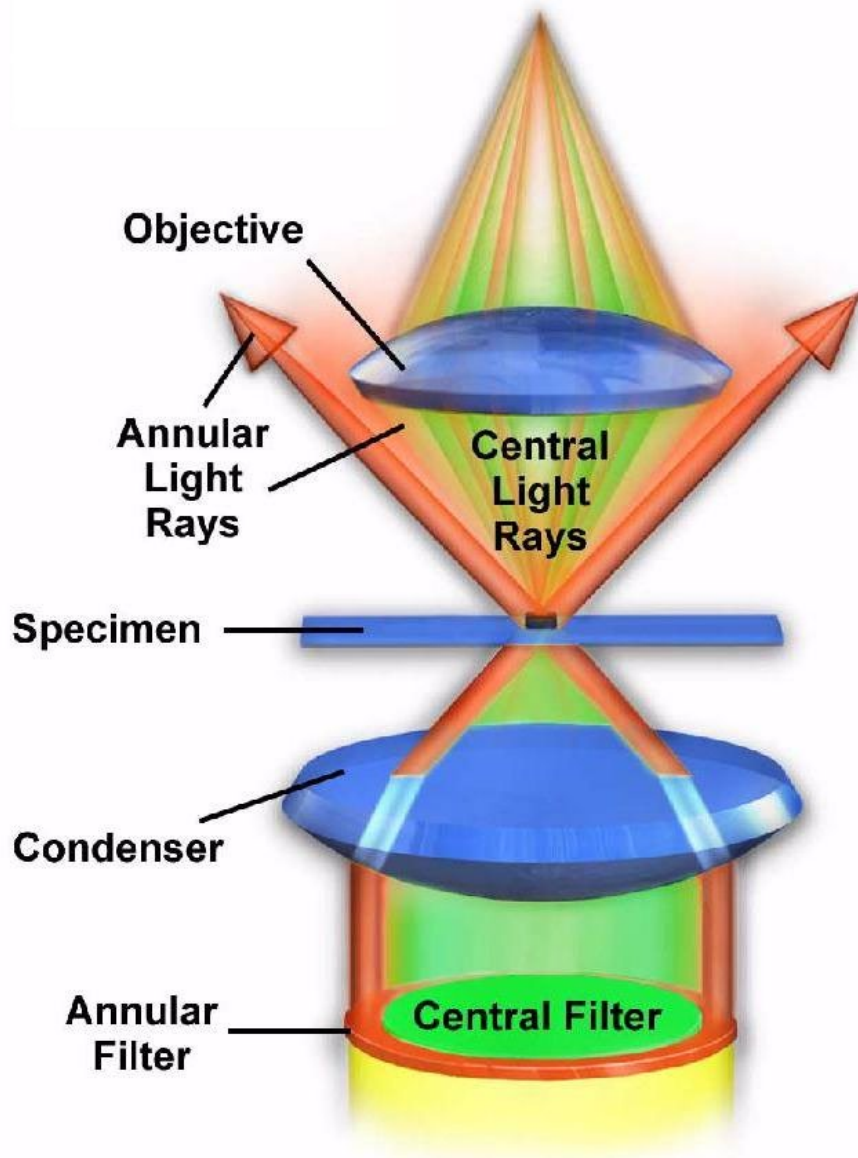
$$\Delta\alpha \approx \frac{\text{grad } D}{n-1} \quad \Delta\alpha \approx \frac{\text{grad } n}{n}$$

$\Delta\alpha$ – uhlová odchylka od směru
původního paprsku
 D – tloušťka vzorku
 n – index lomu vzorku

- asymetrická filtrace Fourierova obrazu vzorku vytvořeného v zadní ohniskové rovině objektivu
- HMC zviditelňuje prakticky stejné fázové struktury jako Nomarského DIC, ale jiným mechanismem
- vytváří plastický reliéf vzorku podobně jako DIC (pseudo 3D)
- zvýrazněné hrany objektů
- **přednost HMC – možnost pozorování na dvoujlmných podložkách (plexiglas)**
- nižší cena optických komponentů oproti DIC



Rheibergův kontrast (osvětlení)



- modifikace osvětlovacího systému pro mikroskopii v temném poli (darkfield)
- centrální maska je propustná pro vybranou vlnovou délku
- anulární maska propouští jinou vlnovou délku, obvykle komplementární
- barevný efekt



Světlé pole



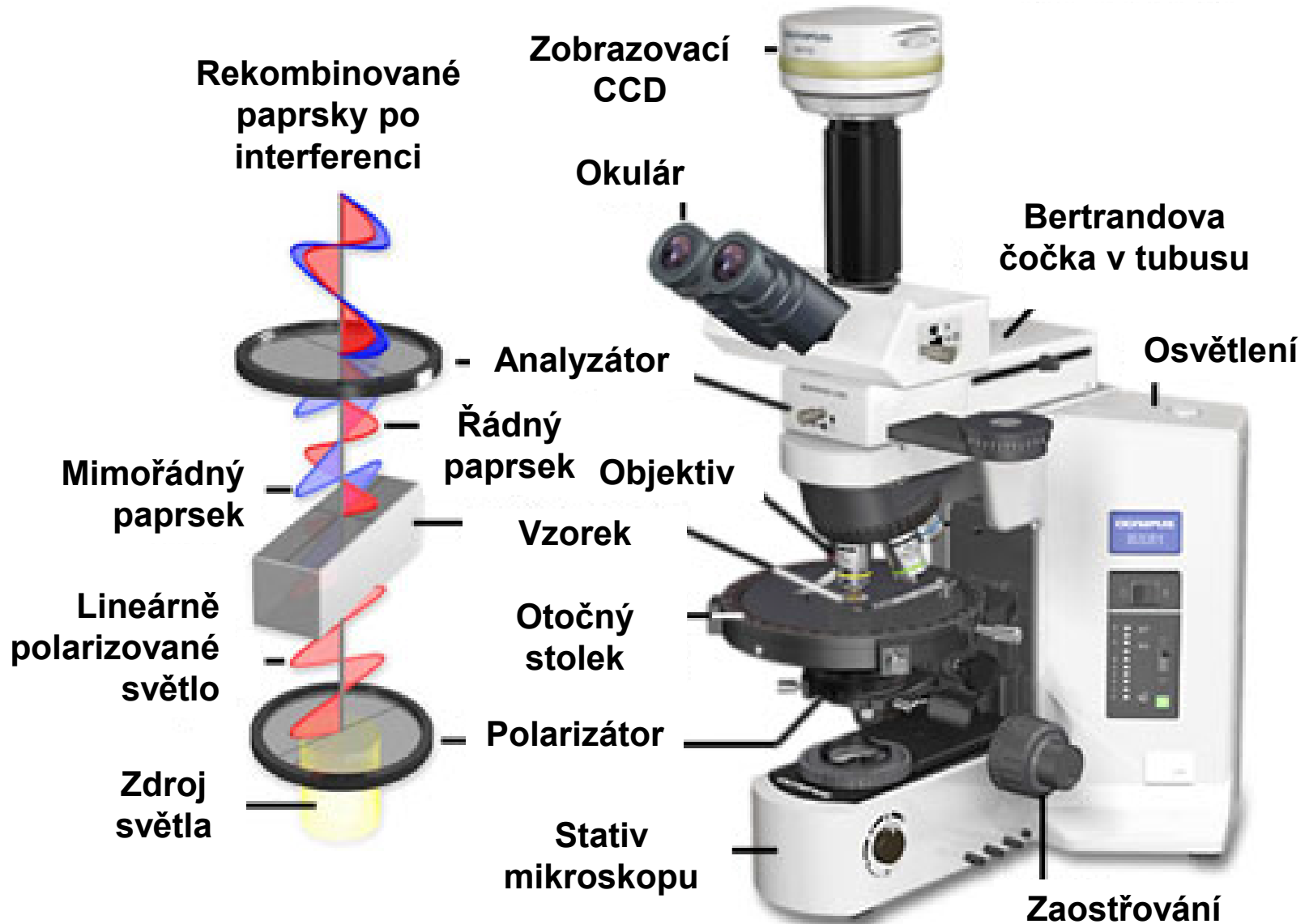
Tmavé pole



Rheinbergovo
osvětlení

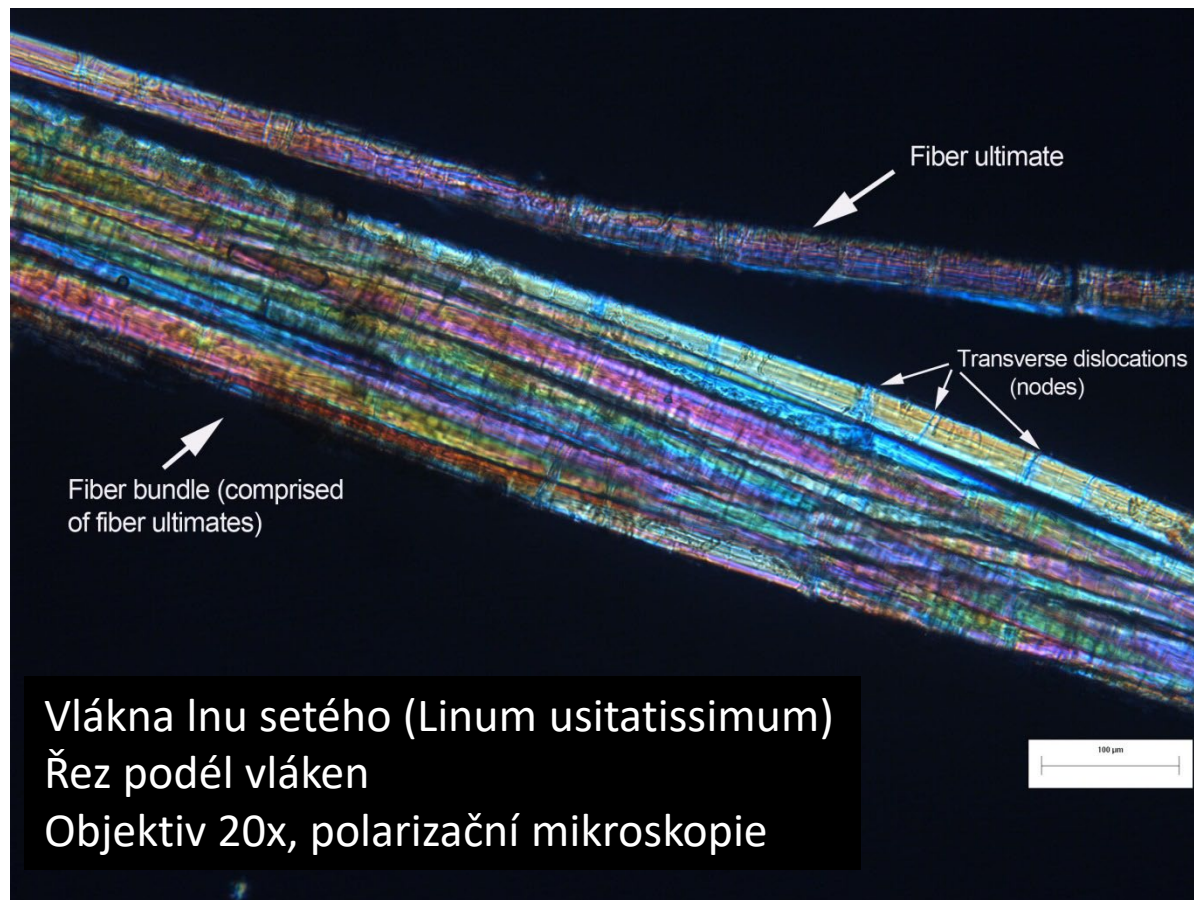
Polarizační mikroskopie

- pozorování objektů mezi zkříženými polarizátory ve světlém poli
- vhodné pro zvýraznění opticky aktivních (dvojlovných) struktur



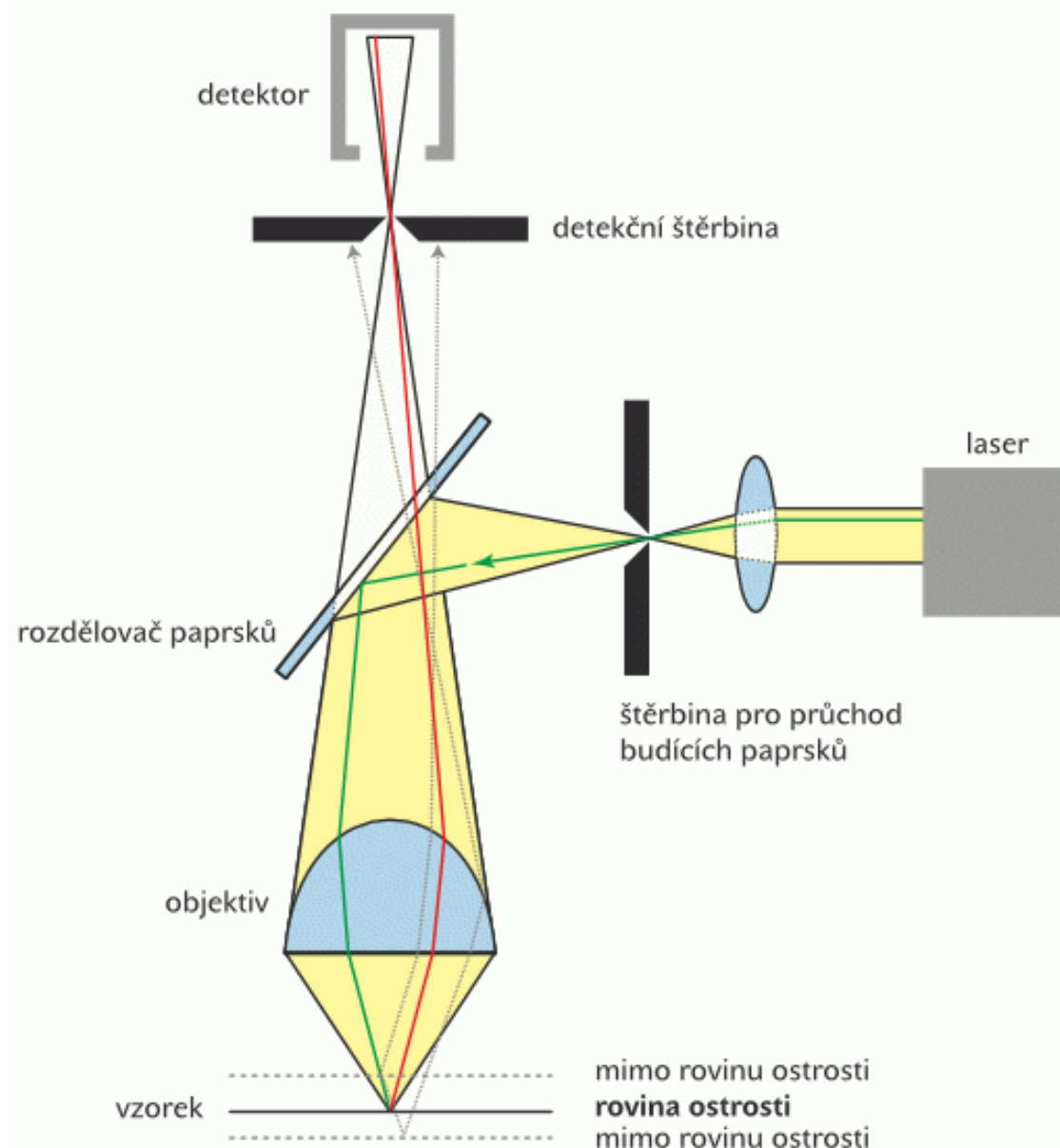
Využití

- mineralogie a geologie
- určování jednoosých a dvojosých krystalů (navíc zasouvací $\lambda/4$ fázová destička)
- ortoskopické a konoskopické uspořádání
- biologie – identifikace krystalických struktur uvnitř buněk



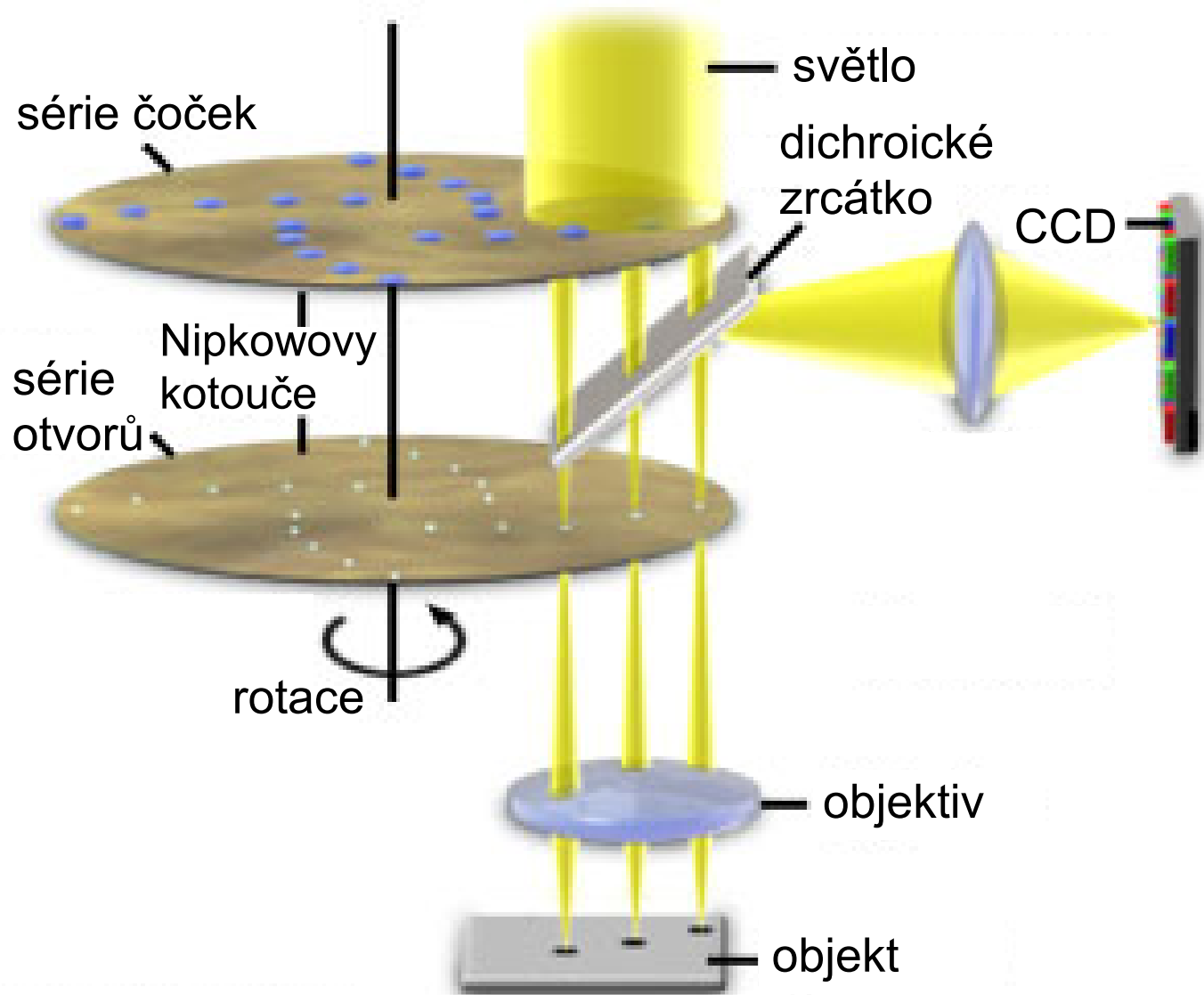
Konfokální mikroskopie

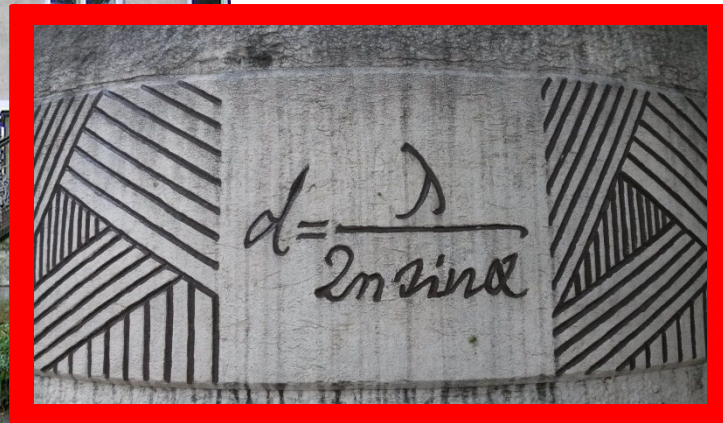
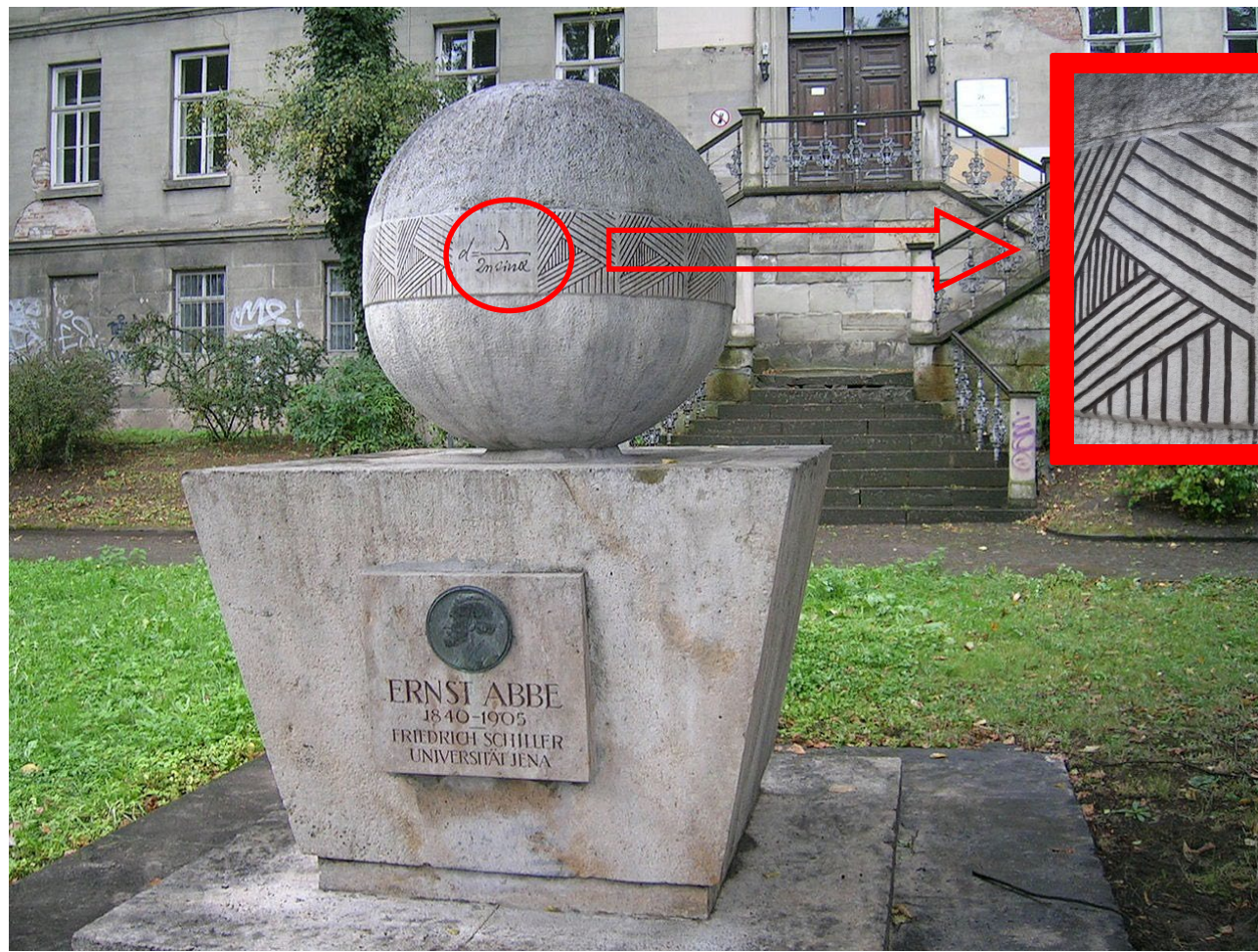
Marvin Minsky (1957)



- Marvin Minsky, patent 1957
- složitá technická realizace
- Mojmír Petrář a Milan Hadravský
LF UK Plzeň, patent 1966
- Nipkowův kotouč
- konfokální clona (pinhola)
- potlačení signálu z rovin mimo rovinu ostrosti
- vhodná metoda pro pozorování
tlustých transparentních vzorků
(např. tkáňových kultur, velkých
buněk)
- LSCM – **L**aser **S**canning **C**onfocal
Microscopy (1987)

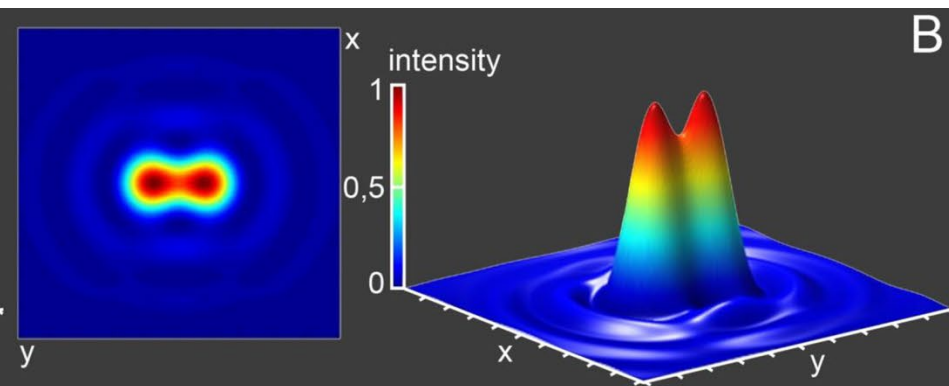
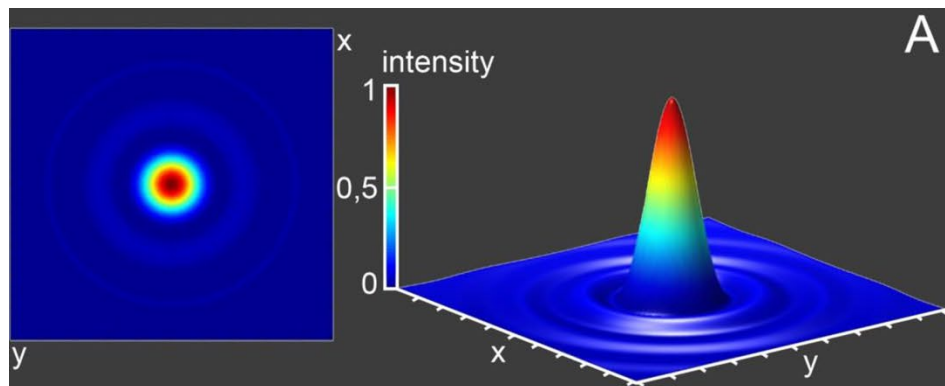
Konfokální mikroskop na bázi Nipkowova kotouče





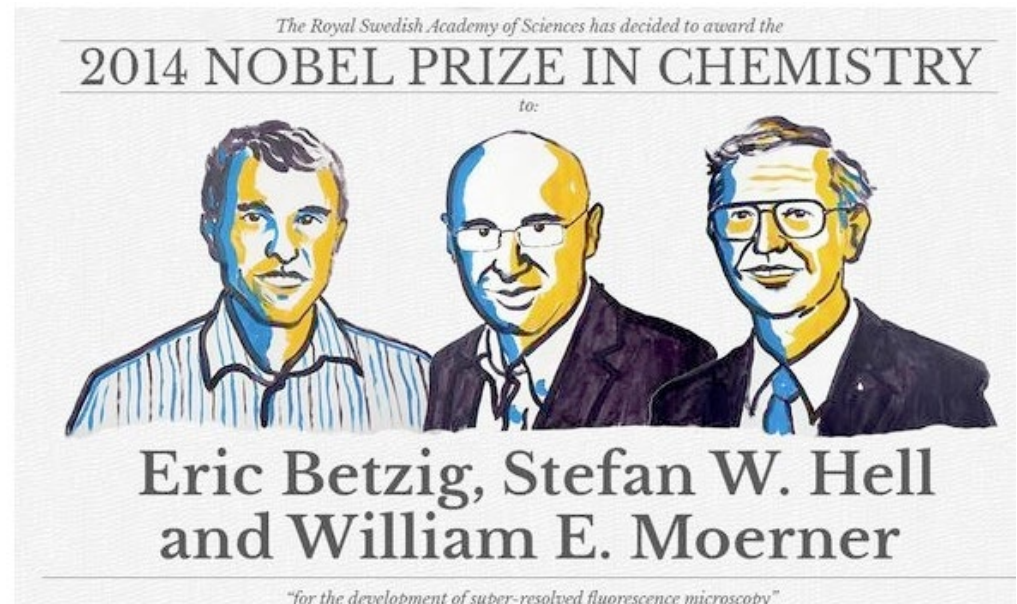
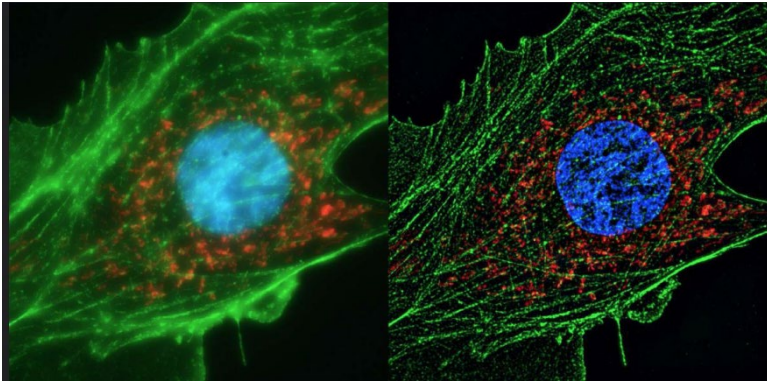
$$r_{lateral} = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

$$r_{axial} = 1.4 \frac{n\lambda}{NA^2}$$

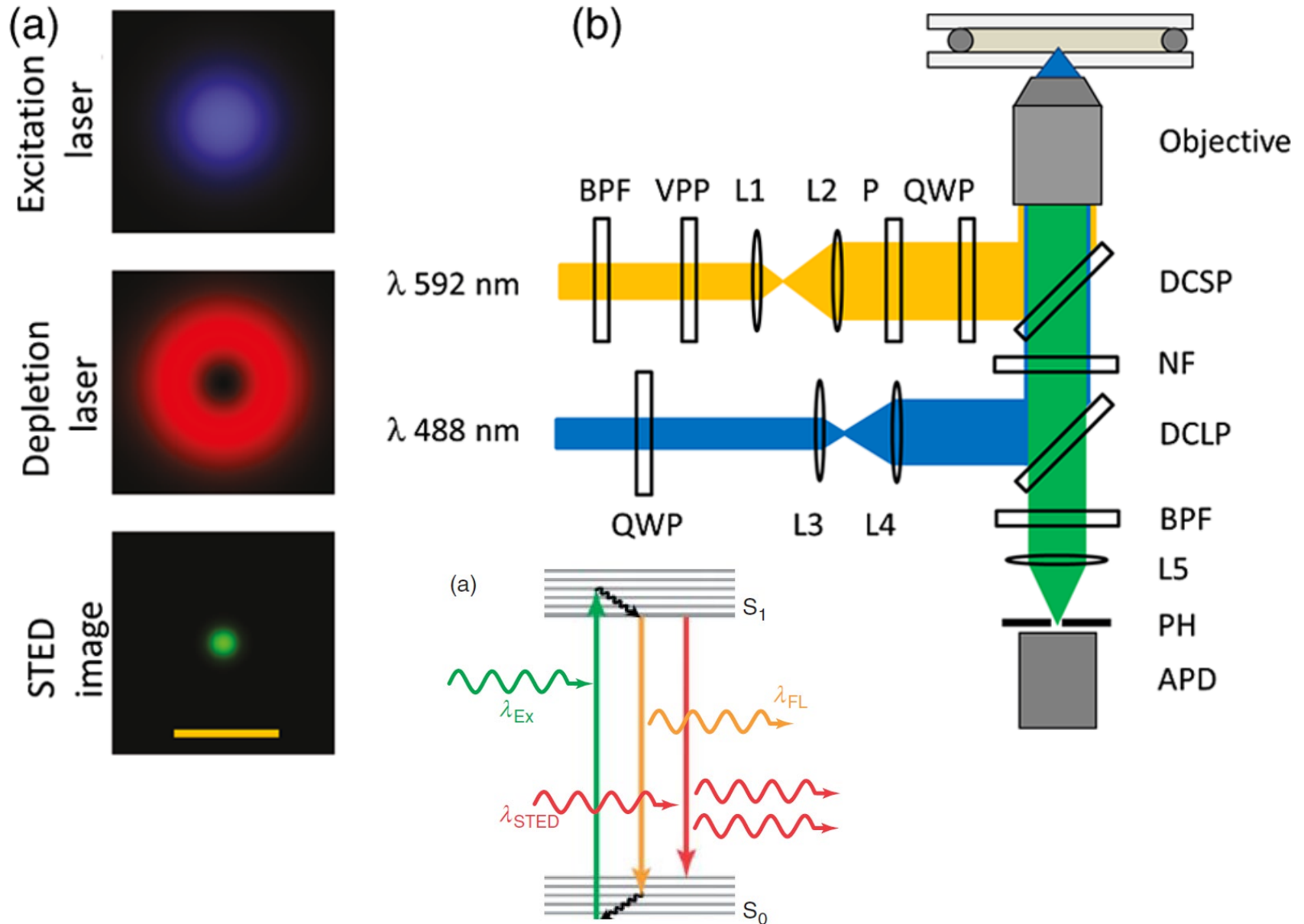


Elektronová mikroskopie a AFM přinesly rozlišení daleko za difrakční limitou, **ale**:

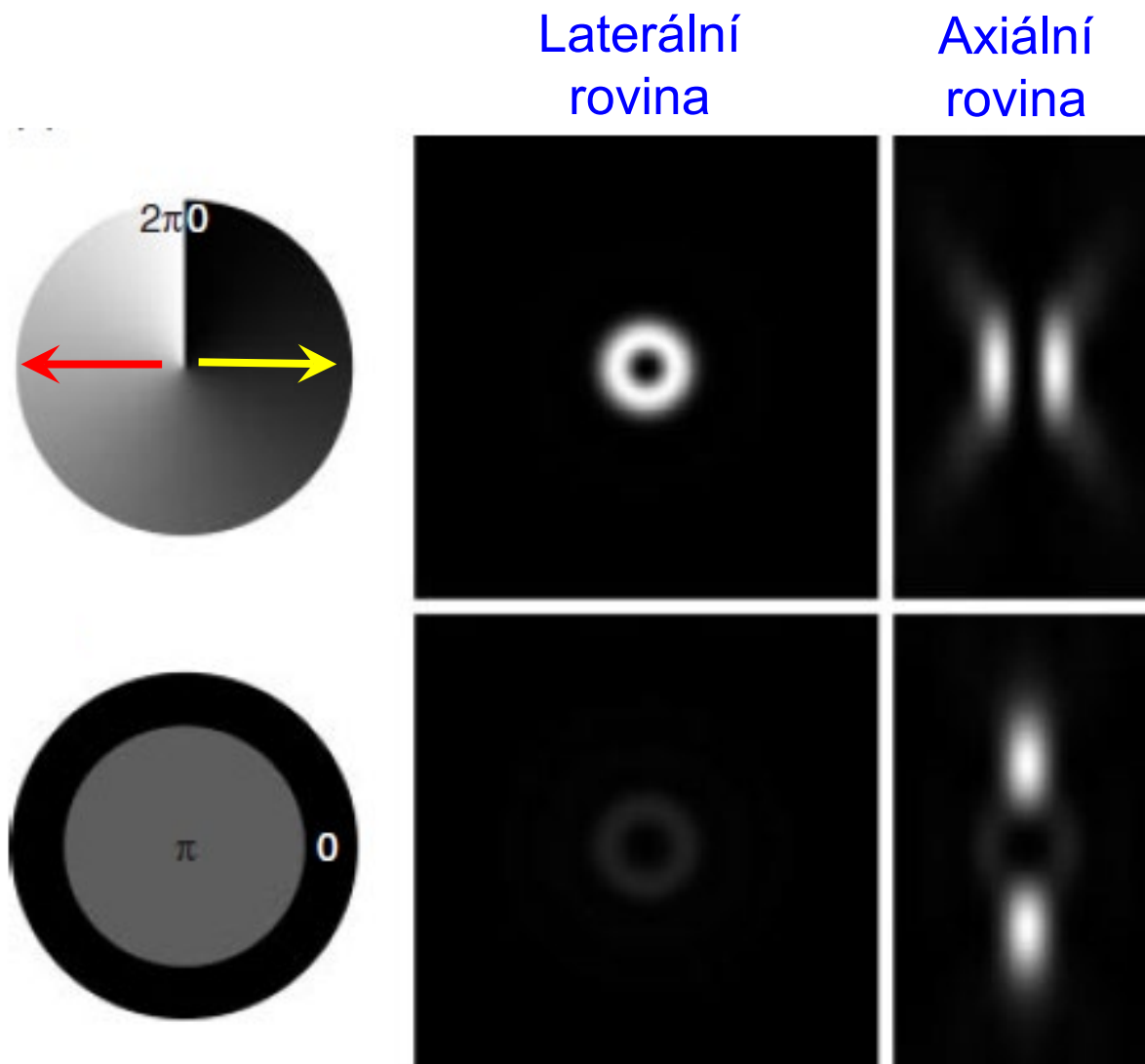
- ~ 80% všech biologických zobrazování stejně připadá na optickou mikroskopii založenou na konvenční optice
- optická mikroskopie má řadu výhod, např. možnost neinvazivního zobrazování *in vivo*, rozlišení biologických struktur na základě **různých kontrastů** včetně chemického
- 1992 – prolomení difrakční limity (S. W. Hell - 4Pi mikroskopie)
- 2014 – Nobelova cena



STED – Stimulated Emission Depletion Microscopy



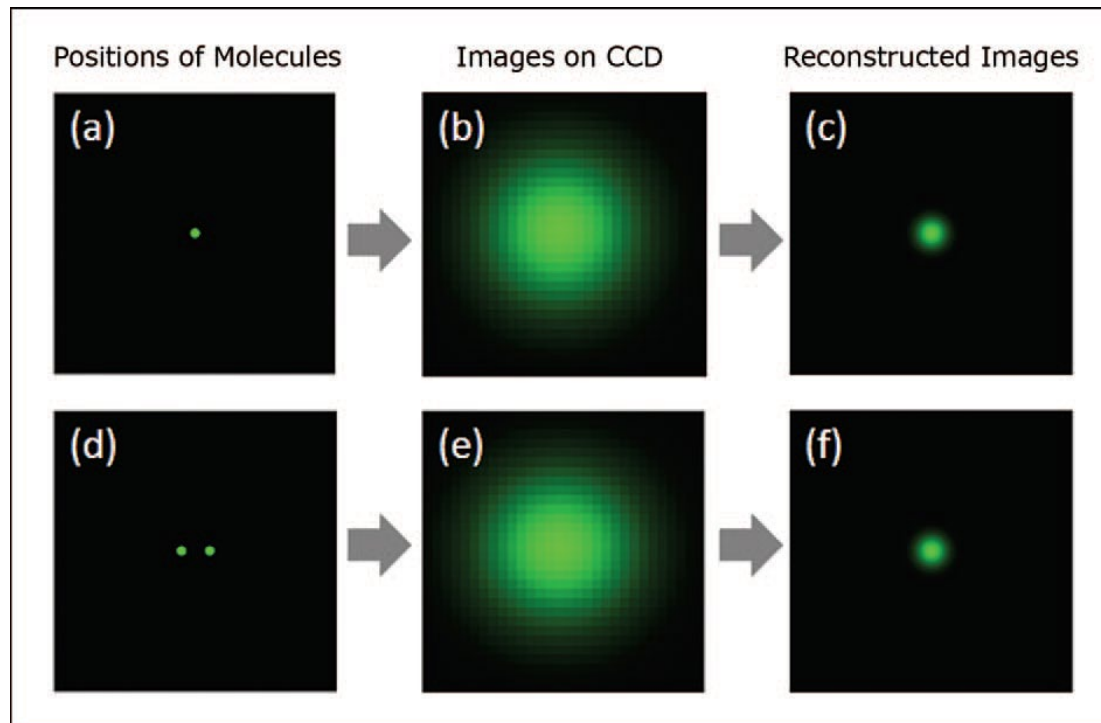
Fázové destičky pro STED



Single-fluorophore Super-resolution Microscopy

Jednomolekulární lokalizační mikroskopie

- umožňuje zobrazování celého objektu najednou (wide-field)
- stochastická expozice jednotlivých molekul (fluoroforů), záznam obrazu na CCD
- určuje se poloha každého jednotlivého fluoroforu (těžiště difrakčně omezeného obrazu na CCD)
- nutno excitovat pouze malé množství fluoroforů, aby nedocházelo v překryvu obrazů
- časově náročné, vzorek se v průběhu zobrazování nesmí pohnout
- laterální rozlišení ~ 20 nm, axiální možno vylepšit pomocí 3D-STORM, BP-FPALM, iPALM



Problém: vysoká prostorová hustota fluoroforů v biologických vzorcích

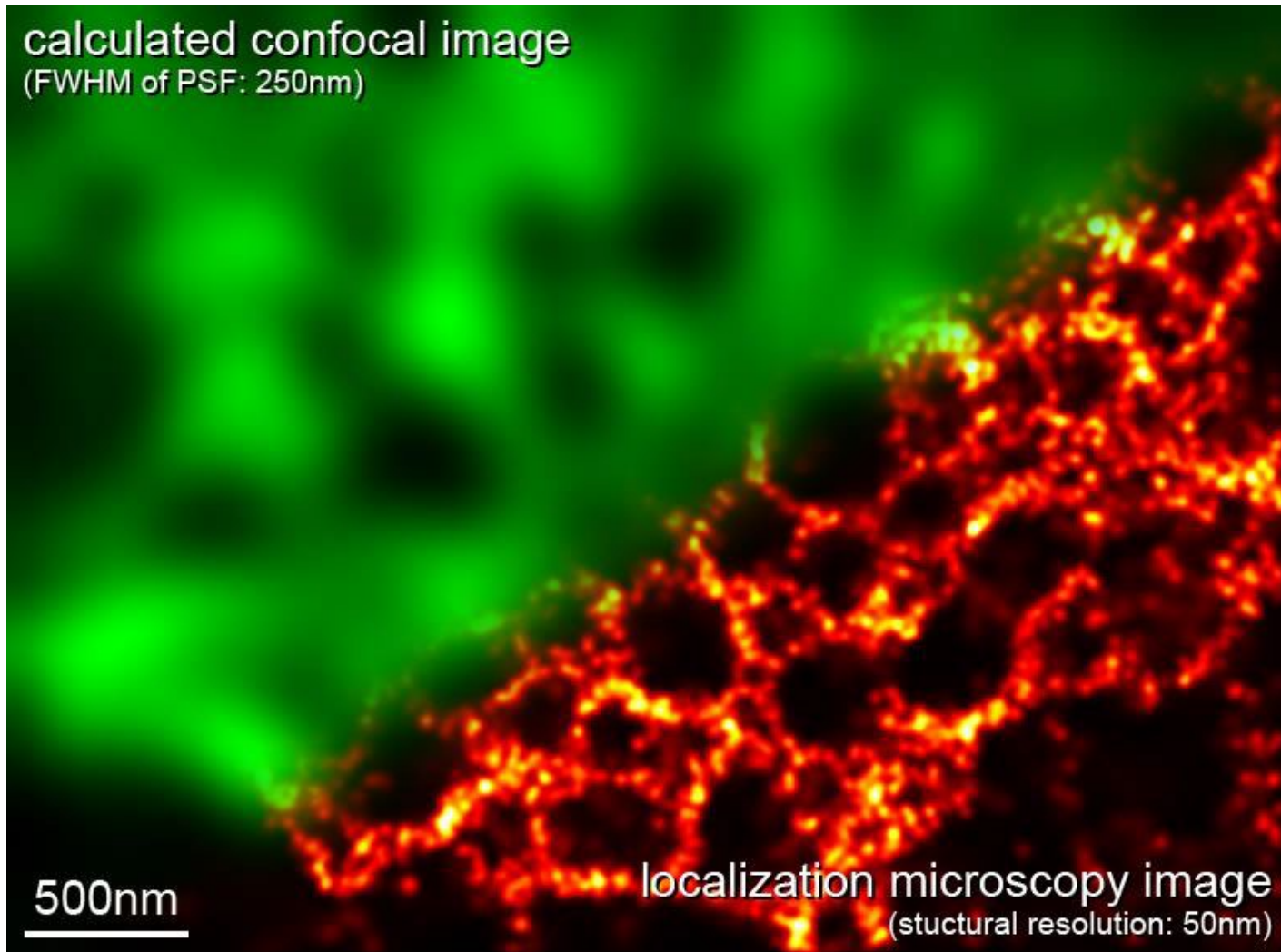
Řešení: selektivní excitace nebo fotoaktivace jenom malé části z přítomných fluoroforů. Celkový obraz vznikne superpozicí jednotlivých obrázků nasnímaných jako časová řada. Princip PALM poprvé použitý v r. 2006.

- použití fotoaktivovatelných nebo fotopřepínatelných fluorescenčních značek
- možnost multiplexového značení více fluorofory najednou

calculated confocal image
(FWHM of PSF: 250nm)

500nm

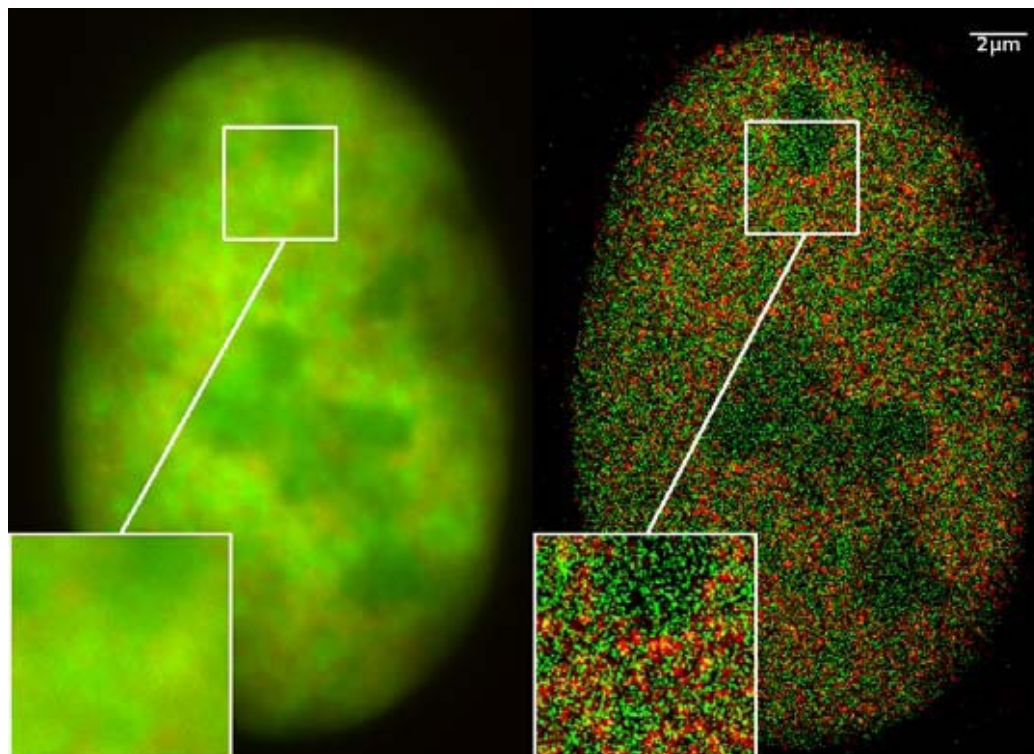
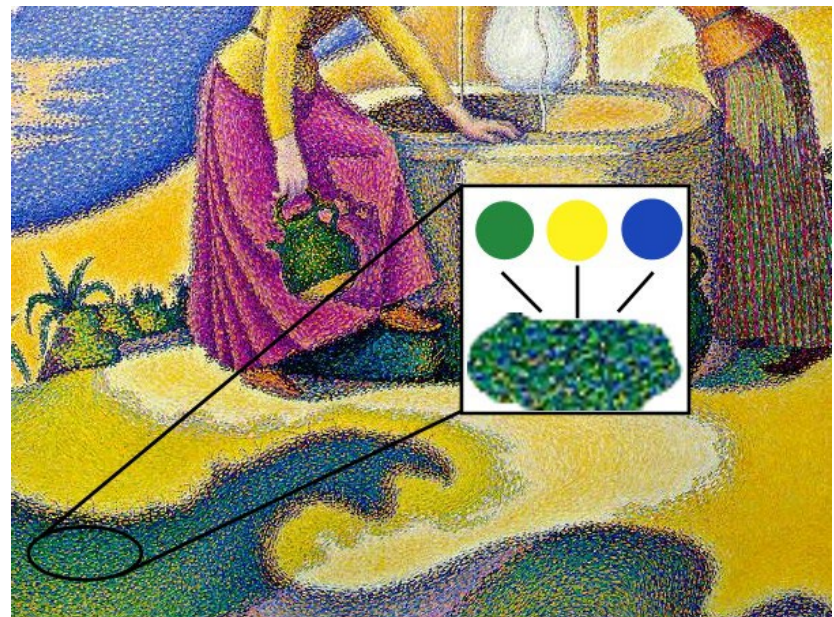
localization microscopy image
(structural resolution: 50nm)



Pointilismus v malířství

Georges Seurat

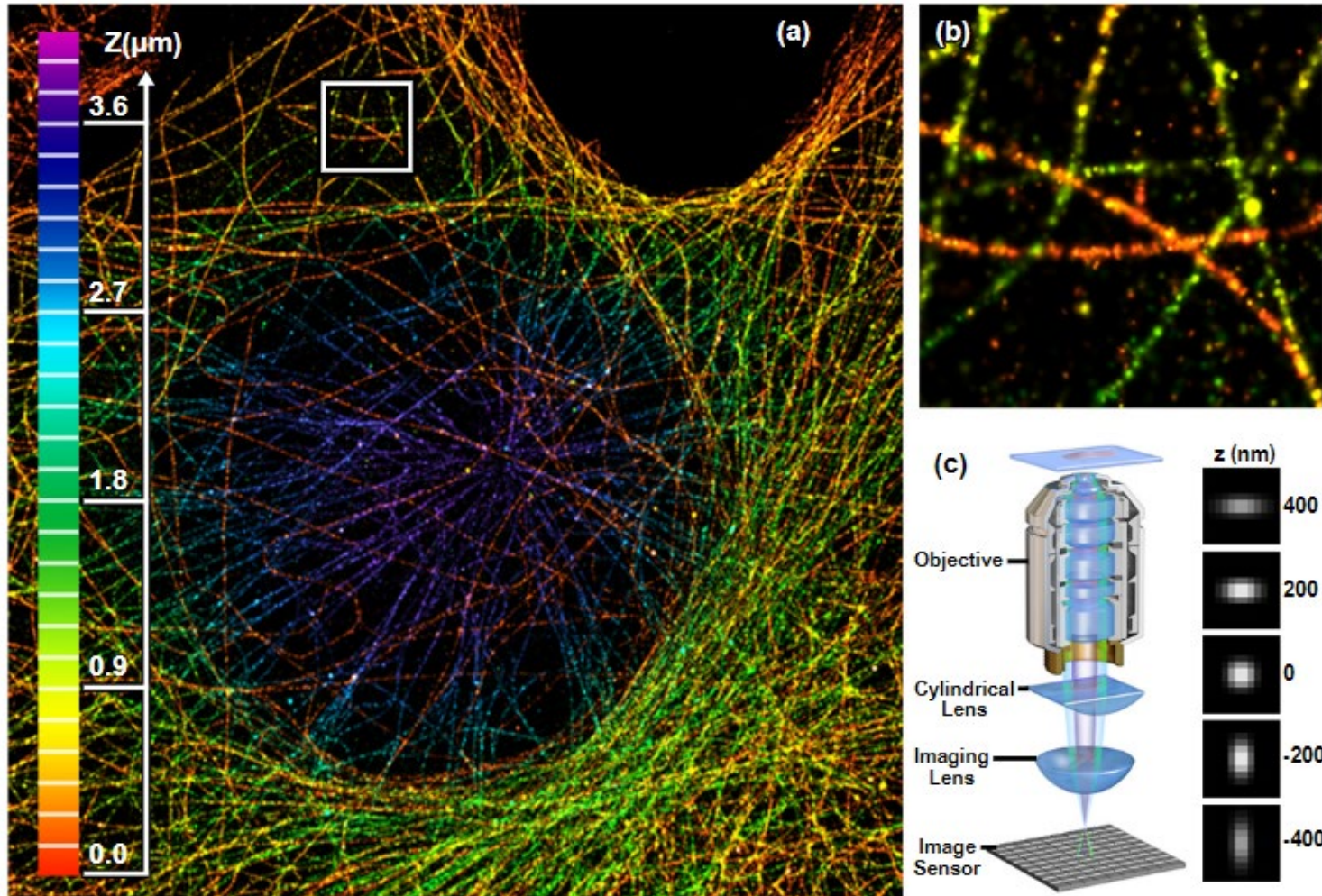
Paul Signac



Při použití metody **STORM** vzniká fluorescenční obraz vzorku tečka za tečkou, podobně jako malovali svoje obrazy **pointilisté**.

3D-STORM

STORM s axiálním rozlišením až ~50 nm



Při použití optiky s mírným astigmatismem způsobeným zařazením válcové čočky se obraz fluoroforu na CCD zobrazí jako **elipsa** s různou orientací hlavní osy, a to v závislosti na vzdálenosti od fokální roviny. Pouze signál od fluoroforu **přesně ve fokální rovině** se zobrazí jako kroužek. U obrazu se pak vyhodnocuje elipticita obrazu, podle které je možno určit i axiální polohu fluoroforu vzhledem k fokální rovině.

Ať žije a vzkvétá optická mikroskopie, a ať jsme
i nadále překvapování a udivování úžasnými
možnostmi, které nám poskytuje při
pozorování mikrosvěta!

