ДЕЖЁ САБО

ЦВЕТНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОФОТОГРАФИЯ



AKADÉMIAI KIADÓ
ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК ВЕНГРИИ БУДАПЕШТ 1967

СОДЕРЖАНИЕ

ЧАСТЬ ПЕРВАЯ

Аппаратура для цветного микрофотографирования 11

Штатив микроскопа 11

Оптическая аппаратура для получения изображения 11

Объектив 11

Ошибки при получении изображения 11

Мощность объективов. Разрешающая сила объективов. Нумерическая апертура. Резкость 13

Ахроматы 14

Апохроматы 15

Флуоритные объективы 15

Плановые объективы 15

Объективы слабого увеличения 16

Специальные объективы 17

Окуляр 18

Компенсационные окуляры 20

Фотографические окуляры 20

Средства оптического направления освещения 22

Конденсоры, обеспечивающие в проходящем свете полное центральное освещение по методу светлого поля 22

Конденсоры для объективов слабого увеличения ... 24

Конденсоры для объективов сильного увеличения ... 25

Панкратический конденсор 26

Методы усиления контраста 27

Оборудование для косого освещения 27

Оборудование для освещения по методу темного поля 28

Оборудование для фазовоконтрастного освещения .. 29
Универсальные конденсоры 31
Средства оптического «окрашивания» 31
Средства освещения падающим светом 34
Средства освещения смешанным светом 35
Источники света. Светильники 35
Лампы накаливания 37
Дуговые лампы 38
Ртутные лампы высокого давления 39
Ксеноновые лампы высокого давления непрерывного свечения 40
Ксеноновые микроимпульсные разрядные трубки 42
Осветительное устройство микроскопа 42
Фильтры 45
Компенсационные светофильтры 46
Селективные светофильтры 48
Нейтрально-серые светофильтры 49
Поляризационные светофильтры 50
Интерференционные фильтры 51
Лупа и простой микроскоп 51
Сложный микроскоп. Полезное и бесполезное увеличение .. 52
Микрофотографическое оборудование 54
Зеркальные камеры 55
Насадочные камеры 57
Вертикальные камеры 60
Камеры-микроскопы 61
Специальные приспособления 66
Цветные фотографические материалы, обычно используемые в микрофотографии 67
Цветные обратимые пленки 67
Цветные негативные пленки 69

Изготовление цветных микрофотографий 73

Подготовка к съемке 73

Объект 73

Выбор метода исследования. Фазовые объекты. Амплитудные объекты 74

Выбор фотоматериала для цветных снимков 74

Определение времени экспозиции 75

Применение обычных микроскопических методов исследования и фотографирование наблюдаемого изображения 84

Центральное светлопольное освещение проходящим светом 84

Применение принципа Кёлера 84

Критическое освещение 87

Снимки слабого увеличения 87

Снимки среднего и сильного увеличения 90

Освещение проходящим светом по методу темного поля 91

Фазовоконтрастное освещение проходящим светом 92

Фотографирование в падающем свете 94

Фотографирование при смешанном свете 97

Применение специальных методов микроскопического исследования и фотографирование наблюдаемого изображения 97

Методы флуоресцентной микроскопии 97

Методы поляризационной микроскопии 107

Методы интерференционной микроскопии 114

Методы стереомикроскопии 118

Сравнительные микроскопические методы 121

Уход за микрофотографическим оборудованием. Протокол съемки 122

Возможные ошибки в процессе изготовления цветных фотографий 123

ЧАСТЬ ТРЕТЬЯ

Обработка цветных микроснимков 125

Цветные процессы в теории и практике 125

Общие свойства цветных фотоматериалов 126

Средства обработки цветных фотоматериалов 123

Оборудование темной комнаты 128

Специальные химикалии 131

Основные указания по обработке цветных фотоматериалов 133

Цветные позитивные материалы и основные указания к их обработке 135

Субтрактивный цветокорректировочный процесс 137

Аддитивный цветокорректировочный процесс 138

Цветной процесс «Полароид ленд» 139

Приложение 143

Микроскопы советского производства и принадлежности к ним 143

Цветные негативные фотоматериалы советского производства 143

Литература 145

Предметный указатель 149

АППАРАТУРА ДЛЯ ЦВЕТНОГО МИКРОФОТОГРАФИРОВАНИЯ

ШТАТИВ МИКРОСКОПА

Используемые для целей микрофотографирования микроскопы должны отвечать следующим механическим условиям:

1. микроскоп должен располагать, по крайней мере, такой стабильностью, чтобы выдержать смонтированную на его тубусе камеру без изменения установленной резкости изображения из-за веса последней;
2. образованию изображения не должны мешать механические колебания;
3. необходимо, чтобы с помощью системы конденсора осуществлялся принцип освещения по Кёлеру (см. стр. 84);
4. предметный столик должен позволять легко и точно передвигать препараты в плоскости, перпендикулярной оптической оси;
5. расстояние между препаратом и объективом должно изменяться с помощью макрометрического (грубо) и микрометрического (точно) винтов;
6. быстрая смена объективов различной кратности увеличения должна осуществляться таким образом, чтобы предварительно сфокусированная в центре часть препарата продолжала оставаться в центре;
7. целесообразно, чтобы тубус микроскопа можно было снимать или заменять, так как таким способом можно применять специальные тубусы, необходимые для различных методов исследования и микрофотографирования.

Обычные лабораторные и исследовательские микроскопы большей частью удовлетворяют перечисленным выше условиям. Для целей специальных микроскопических исследований изготовляются особые штативы. Вышеизложенные условия вообще действительны и для последних.

ОПТИЧЕСКАЯ АППАРАТУРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ

ОБЪЕКТИВ

Ошибки при получении изображения

На основе законов преломления света получения идеального изображения с помощью линз можно ожидать только при условии, если применяется монохроматический свет, отверстие линз очень маленькое и используется

лишь центр изображения. При таких условиях изображение объекта, лежащего в единственной плоскости, возникает в единственной плоскости изображения. Это плоскость изображения Гаусса. На практике, однако, употребляют линзы с относительно большим отверстием и значительной кривизной, дающие точки изображения не в идеальной плоскости изображения. Так возникают различные отклонения (аберрации). Отдельные недостатки линз имеют место и при применении монохроматического, гомогенного света (монохроматические ошибки изображения).

Другая группа недостатков линз основывается на том, что белый луч света — подобно явлению, наблюдаемому в отношении призм, — распадается на составляющие его цвета (хроматическая аберрация).

В практике черно-белого микрофотографирования хроматическая аберрация в значительной степени устранима варьированием цветового сочетания источника света. При цветном микрофотографировании указанный способ не может быть применен; требования в отношении линз гораздо строже, так как они должны быть эффективно исправлены и с монохроматической, и с хроматической точек зрения.

Для простых собирательных линз характерно, что световые лучи, параллельные оптической оси, в периферических частях преломляются сильнее, чем в центре. Это явление сферической аберрации, последствием которой является нерезкое изображение. Возможности устранения ошибки: уменьшение относительного отверстия объектива, изменение формы линзы, комбинация из нескольких линз, выбор стекла с соответствующим коэффициентом преломления.

Если не соблюдается условие синуса, то в случае полного отверстия линзы изображение нерезкое, так как различные зоны отверстия линзы формируют изображения различных размеров. Объективы, свободные от сферической аберрации и упомянутого выше недостатка, называются апланатами.

Астигматическая ошибка возникает тогда, когда косо падающие на собирательную линзу световые лучи конвергируют не в одной точке, а в так называемой фокальной линии. При этом одной точке соответствуют две линии, возникающие в двух различных плоскостях, перпендикулярных одна другой.

Если изображение плоского объекта, расположенное перпендикулярно оптической оси, искривляется, то речь идет об искривлении поля зрения. В случае собирательных линз явление объясняется тем, что изображение точек, лежащих дальше от оптической оси, возникает ближе к линзе, чем изображение, находящееся поблизости от центра линзы. При микрофотографировании это обусловливает то, что внутренние и наружные зоны поля зрения одновременно невозможо наводить на резкость.

Если увеличение различных частей поля зрения неодинаково, то возникает искаженное изображение. Это имеет место тогда, когда отношение углов наклона входящих и выходящих основных лучей непостоянно.

Световые лучи, идущие от изображения объектной точки, лежащей дальше от оптической оси, не всегда встречаются в одной точке, а часто «окутывают» поверхность. Эта ошибка называется комой, так как срез каустической поверхности образует пятно, напоминающее комету. Эта ошибка в цветном микрофотографировании проявляется в нерезком изображении.

Фокусное расстояние простой собирательной линзы различно в отношении света различных цветов; при синем свете, например, короче, чем при красном. И в случае остальных цветов, в соответствии с длиной вольны, могут наблюдаться большие или меньшие расхождения в фокусном расстоянии. Эта ошибка — так называемая хроматическая аберрация, — которая для одной и той же объектной точки формирует точки изображения различного цвета.

Комбинацией нескольких линз можно достичь, чтобы различного цвета световые лучи встречались на одинаковом расстоянии, в точке, расположенной вблизи главной оси линзы. Это, однако, не означает, что различного цвета изображения больших объектов будут и одинаковых размеров. Если, например, красное изображение больше синего, то у цветного изображения объекта будет красная кайма. Это явление — хроматическая ошибка увеличения. Наибольшая интенсивность ошибки наблюдается по краям.

Мощность объективов. Разрешающая сила объективов. Нумерическая апертура. Резкость

В то время, как к характерным данным объективов фотоаппаратов относится их светосила $\left(\text{светосила} = \frac{\text{диаметр линзы}}{\text{фокусное расстояние}}\right)$, характеристикой объективов микроскопов — в случае определенной дистанции объекта — служит увеличение, а также нумерическая апертура. Увеличительная способность объективов микроскопа зависит от фокусного расстояния и длины используемого тубуса. Увеличение тем сильнее, чем меньше фокусное расстояние объектива и чем больше длина тубуса.

Детальность получаемого с помощью объектива изображения зависит от разрешающей силы системы линз. Разрешающая сила данного объектива (системы линз) тем лучше, чем меньше расстояние между двумя объектными точками, раздельно определяемыми, чем больше угол пучка лучей, идущих от объекта и воспринимающихся линзами. Глаз человека из конвенциональной дистанции зрения (250 мм) способен раздельно отличать точки или линии, находящиеся на расстоянии 0,2—0,3 мм друг от друга. Разрешающая сила оптического микроскопа при применении коротковолновых лучей достигает 2000 Å.

Наименьшее расстояние (d), при котором система линз воспринимает две точки или линии еще как раздельные, зависит от длины волны используе-

мого для освещения света (λ), от коэффициента преломления (n) среды, находящейся между фронтальной линзой и объективом, а также от синуса ($\sin \alpha$) половины угла апертуры линзы.

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

Знаменатель формулы — числовая апертура. Числовая апертура у сухих объективов 0,95, у обычных иммерсионных объективов в основном 1,30, а в особых случаях не превышает значения 1,65.

В практике черно-белого микрофотографирования в интересах достижения лучшей разрешающей способности можно применять источник света, богатый коротковолновым излучением, и в соответствии с этим — сенсибилизированный фотоматериал. Такой способ при цветном микрофотографировании не применим. Поэтому в интересах хорошей разрешающей способности используются объективы с возможно большой апертурой.

С увеличением апертуры объективов ухудшается их проникающая способность, снижается глубина резкости. Изменением апертурной диафрагмы конденсоров микроскопа всегда можно получить пучок лучей наиболее соответствующей апертуры (см. стр. 85).

Объектив передает на определенное расстояние увеличенное и перевернутое изображение объекта. При данной длине тубуса (в основном 160-170 мм) и данном объективе величина возникающего изображения постоянна. В соответствии с этим индивидуальное увеличение объективов обозначается числами, выражающими отношение полученного изображения к объекту (например, 20:1).

От способности объективов давать резкое изображение зависит достоверность воспроизведения объекта. Объектив дает более резкое изображение, если он свободен от монохроматической и хроматической аберраций. Известны следующие различные в своей основе типы объективов: ахроматы, апохроматы, флуоритные объективы (полуапохроматы). За последнее время упомянутые типы выпускаются в виде так называемых «плановых» (plan) объективов.

Ахроматы

Ахроматические объективы представляют собой основной узел большинства простых микроскопов. С точки зрения хроматической аберрации они исправлены, в основном, для двух цветов. Фотоматериалы (в зависимости от их чувствительности) могут быть чувствительными и к тем цветам для которых ахроматы не были корригированы. В то время как в черно белом микрофотографировании хроматическая аберрация ахроматических объектов легко устраняется применением цветных фильтров, в цветной фото[x]

графии этот способ не может быть использован. Тем не менее, современные ахроматы применимы для целей менее требовательного микрофотографирования.

Апохроматы

В противоположность ахроматам апохроматы исправлены для трех цветов, и в отношении других цветов их так называемый третичный спектр является незначительным. Апохроматы нужно применять с компенсационными окулярами, ибо таким образом можно почти полностью устранить поперечную хроматическую аберрацию. Из изложенного выше следует, что как для визуального наблюдения, так и для целей наиболее точного цветного микрофотографирования лучше всего подходят объективы апохроматического типа.

Флуоритные объективы (полуапохроматы)

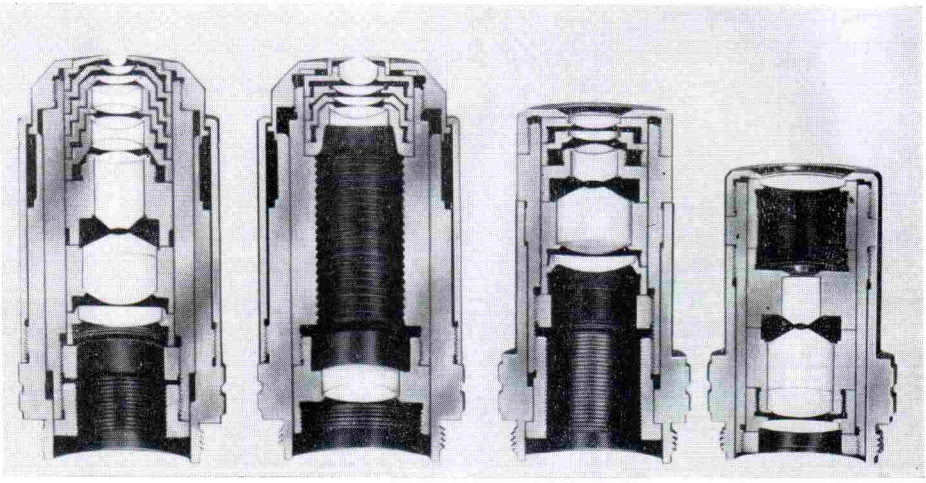
На основе своих свойств они занимают промежуточное положение между ахроматами и апохроматами. Современные флуоритные объективы по своим качествам приближаются к апохроматам. Подобно последним они используются вместе с компенсационными окулярами. Эти объективы могут быть успешно применены для визуального наблюдения и для целей черно-белого и цветного микрофотографирования.

Несмотря на то, что описанные три типа объективов обладают совершенно различными свойствами в отношении хроматической коррекции, с точки зрения микрофотографирования для них характерна очень мешающая общая ошибка, которая называется кривизной поля изображения. Поэтому для целей микрофотографирования они должны применяться в комбинации с фотоокулярами, исправляющими кривизну поля изображения (см. стр. 20).

Плановые объективы

Плановые объективы (рис. 1) сильно скорригированы в отношении кривизны поля изображения, так что резкость центра поля изображения совпадает с резкостью краевых частей. С точки зрения хроматической коррекции плановые объективы изготовляются в трех видах (план-ахроматы, план-апохроматы, план-флуориты). Как для визуального наблюдения, так и для микрофотографирования рекомендуется вместе с план-объективами использовать обычные компенсационные окуляры. Применение фотоокуляров нецелесообразно.

В настоящее время для целей цветного микрофотографирования шире всего используются объективы типа план-апохроматов.



а б в г

Рис. 1. Плановые объективы производства Э. Лейц (Вецлар)
а) Pl Apo Öl (масло) 100/1,32;
б) Pl 40/0,65;
в) Pl 10/0,25;
г) Pl 4/0,10

Объективы слабого увеличения

Для обзорных снимков и для изготовления снимков с помощью лупы существуют специально сконструированные объективы. Для этих объективов характерно, что их можно применять, в основном, без окуляра, кроме того, их фокусное расстояние длиннее, чем таковое у объектива обычного микроскопа, используемого вместе с окулярами.

Наиболее известные типы:

Бауш и Ломб (США) «Микро—Тессар», f = 16, 32, 48, 72 мм
Цейс (Йена) «М», f = 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 мм
К. Цейс (Оберкохен) «Луминар», f = 16, 25, 40, 63, 100 мм
Э. Лейц (Вецлар) «Милар», f = 20, 30, 40, 50, 65, 80, 100 мм

Согласно данным заводских таблиц, объективы «М» 15 и 20-миллиметровые, а также «Луминар» 16, 25 и 40-миллиметровые можно использовать и в комбинации с окулярами, однако нужно следить за тем, чтобы используемые окуляры не имели компенсационного эффекта и чтобы их увеличение не превышало 12,5-кратного размера. Для большей части перечисленных объективов рекомендуется применение «очковых конденсоров» (см. стр.

25). В случае наблюдений, происходящих в проходящем свете, отверстие диафрагмы объектива суживать нельзя, однако при системе верхнего освещения с целью увеличения глубины резкости диафрагму можно сузить.

Специальные объективы

Некоторые предприятия применяют «Ph», «Pv» и другие обозначения для фазово-контрастных объективов, которые от обычных типов объективов, по существу, отличаются тем, что в их фокусной плоскости со стороны изображения имеется кольцевидная фазовая пластинка. Эта пластинка определенной толщины и абсорбции, в зависимости от того, пропускает ли она или задерживает проходящие через нее лучи на 1/4 длины волны, обусловливает позитивное или негативное фазовоконтрастное изображение. В первом случае наиболее толстые и с наибольшим показателем преломления части объекта представляются темными по сравнению с окружением, в последнем — светлыми.

Для целей поляризационной микроскопии служат тщательно изготовляемые объективы, обозначаемые «Pol», «P» и т. д., — так называемые свободные от напряжения типы объективов. В определенных случаях (исследование объектов с интенсивным двойным преломлением) могут быть использованы как ахроматы, так и апохроматы. Изготовленные для поляризационномикроскопических исследований объективы чаще всего выпускаются с оправой, способной концентрировать.

Для флуоресцентномикроскопических исследований подходящими являются те объективы, которые или свободны от флуоресценции, или обладают незначительной собственной флуоресценцией. Для этой цели (за исключением некоторых старых типов апохроматов) подходит большинство объективов, однако выпускаются и специальные типы объективов. Например, объективы фирмы Рейхерт, (обозначаемые «*fl. UV*»), изготовляются для целей флуоресцентномикроскопических исследований; они имеют встроенный фильтр, абсорбирующий ультрафиолетовые лучи.

Устройства, обеспечивающие верхнее освещение, например, специальные объективы «Ультропак» также могут быть заменены и вместе с осветительным устройством (см. стр. 34) образуют одно целое.

Преимущество зеркальных объективов состоит в том, что практически они свободны от хроматической аберрации, и благодаря их конструкции имеется относительно большое расстояние между исследуемым объектом и зеркальным объективом. (Это, например, выгодно при микроманипуляции). Из-за трудностей коррекции некоторых недостатков изображения, проблем центрирования, а также из-за ограничения увеличения апертуры распространенность зеркальных объективов пока невелика.

Кроме упомянутых, известны еще многочисленные виды объективов, которые, однако, в практике цветного микрофотографирования применяются редко или совсем не применяются.

ОКУЛЯР

Решающим условием изготовления безупречного цветного снимка с помощью микроскопа является использование окуляра, соответствующего объективу.

Окуляр предназначен для дальнейшего увеличения действительного изображения, образованного объективом, и для исправления определенных недостатков объектива.

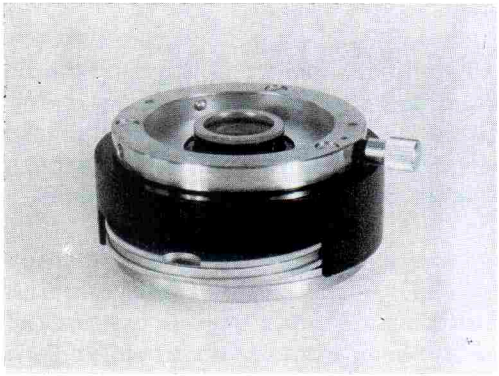


Рис. 2. «Оптовар» — выпускает К. Цейс (Оберкохен) — устройство, помещаемое между объективом и системой окуляра. Обеспечивает повышение увеличения микроскопа в 3-х ступенях. Состоит из анализатора, необходимого для поляризационномикроскопических исследоеаний, а также вспомогательной линзы, применяемой для фазовоконтрастномикроскопической установки

При соответственном подборе применяемых для целей фотографирования объективов и окуляров необходимо учитывать определенные точки зрения, однако, отмечаем, что на практике объективы и окуляры одного и того же производства и одной и той же марки нередко имеют индивидуальные различия. Поэтому вполне целесообразно спроектированное с помощью устройства окуляр-объектив изображение получить на матовом стекле тонкой структуры, расположенном в плоскости фотоматериала. Полученное изображение основательно исследуется с помощью лупы как в центральной части, так и на периферии поля изображения. Подобранные таким способом объективы и окуляры в дальнейшем не должны заменяться, а должны сохраняться исключительно для целей фотографирования.

Необходимо проявлять предельную заботу о содержании в чистоте линз окуляра. Пылинка или какие-нибудь другие загрязнения проектируются в плоскости изображения в увеличенном виде, и это является большой помехой. На практике для обнаружения загрязнения окуляр следует поворачивать на 360°, тогда загрязнение, спроектированное в плоскости изображения, также вращается по кругу.

Кратность увеличения окуляров указана на их оправах. Его можно получить путем деления 250 мм на фокусное расстояние окуляра:

$$У_{ок} = \frac{250}{f}$$

где $У_{ок}$ — индивидуальное увеличение окуляра,
250 — конвенциональная дистанция зрения (мм),
f — фокусное расстояние окуляра (мм).

В случае замены окуляра изменяется и окулярное увеличение. При фотографивовании важно знать, что изменение времени экспозиции пропорционально квадрату увеличения окуляра.

Новые таблицы, кроме уже известных данных, содержат фактор окуляра, обозначенный в немецкой номенклатуре как «Sehfeldzahl» (SFZ — коэффициент поля зрения).

Использованием систем линз «Оптовар», выпускаемых фирмой К. Цейс (Оберкохен), располагаемых между окуляром и объективом, увеличение микроскопа (в случае данного объектива и окуляра) можно усилить еще на 3 ступени (рис. 2).

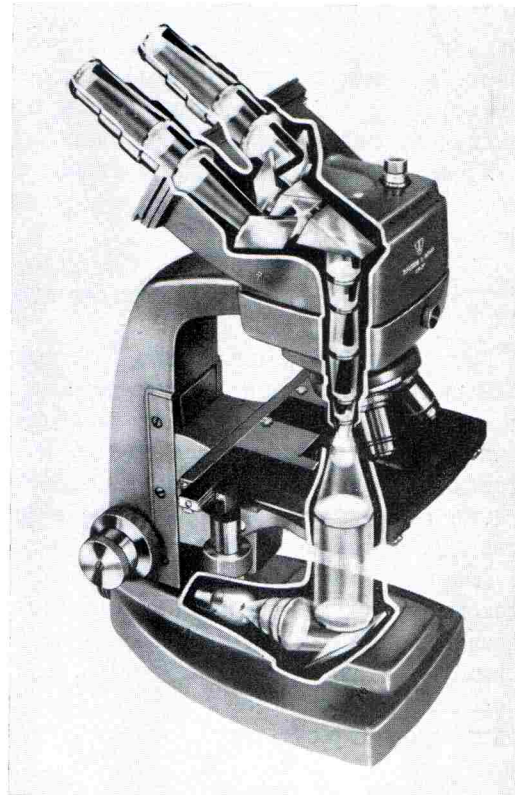


Рис. 3. Оптическая система «Майкро Зум» бинокулярного лабораторного микроскопа «Дина Зум», выпускает Бауш и Ломб (США)

Оптическое устройство фирмы Бауш и Ломб «Майкро Зум» (рис. 3) обеспечивает постоянно изменяемое увеличение в пределах данной области.

Более простые типы окуляров, как например, тип «Гюйгенс», изготовляются для визуальных наблюдений с помощью ахроматических объективов. В комбинации с объективами большого увеличения их использование при фотографировании не рекомендуется. Недостатки окуляров «Гюйгенс» сильного увеличения в проецировании уже в меньшей степени мешают при применении так называемых ортоскопических окуляров.

Нужно учитывать, что даже у лучших апохроматических объективов еще продолжают оставаться два недостатка: поперечная хроматическая аберрация и кривизна поля изображения. Оба эти недостатка могут корригироваться компенсационными и фотографическими окулярами, описание которых следует ниже.

У плановых объективов кривизна поля изображения минимальная, но им присуща поперечная хроматическая аберрация, поэтому вместе с плановыми объективами используют компенсационные окуляры. Фотоокуляры вместе с плановыми объективами обычно не применяются, ибо они обусловливают кривизну поля изображения, отличающуюся от обычной.

Кроме упомянутого, существует еще целый ряд окуляров, предназначенных для специальных целей, однако редко применяемых в цветной микрофотографии.

Компенсационные окуляры

Поперечную хроматическую аберрацию ахроматических объективов большого увеличения и апохроматических объективов «выравнивает» компенсационный окуляр. Для его обозначения применяются сокращения K., Komp., Compens. и другие. В то время как в черно-белом микрофотографировании уменьшение поперечной хроматической аберрации осуществляется с помощью цветного фильтра, для изготовления цветных снимков применение компенсационного окуляра является единственно возможным путем. Вместе с ахроматами сильного увеличения рекомендуется использовать компенсационный окуляр и для визуальных исследований, а с флуоритными и апохроматическими объективами его применение является необходимым. Так как компенсационный окуляр не преодолевает кривизну поля изображения, в микрофотографировании он дает хороший результат только при применении с плановыми объективами.

Фотографические окуляры

Недостатком объективов обычного микроскопа, представляющим помеху при образовании изображения, является кривизна поля изображения. Этот недостаток нужно учитывать практически в случае использования любого типа объектива, за исключением плановых.

Суть кривизны поля изображения состоит в том, что поверхность изображения, проецируемого объективом, не плоская, а вогнутая, если смотреть со стороны объектива. В то время как при визуальном исследовании этот недостаток не представляет собой значительной помехи, так как, регулируя микрометрическим винтом, всегда можно видеть резкое изображение в поле зрения, при фотографировании центральные и наружные части поля изображения на плоской поверхности фотоматериала не могут быть одновременно наведены на резкость. На практике кривизну поля изображения корригируют с помощью так называемых фотоокуляров. Это такие окуляры, кривизна поля изображения которых противоположна таковой объективов, и таким образом недостаток последних уменьшается или выравнивается. Различные предприятия выпускают фотоокуляры под разными

названиями. Наиболее известными из них являются окуляры «Периплан» фирмы Лейц (Вецлар), «Фотокомпенс», выпускаемый фирмой Цейс (Оберкохен), а также «Йена Проектив» и «Гомал» фирмы Цейс (Йена). Некоторые фотоокуляры снабжены регулируемой глазной линзой. Это необходимо потому, что при визуальных исследованиях правильно установленная система объектив-окуляр дает соответствующее изображение только с определенной (посредством приспособления глазной линзы) коррекцией. Градуировка на окуляре должна быть всегда поставлена в соответствии с длиной применяемой камеры.

При использовании в фотографии другой группы окуляров необходимо увеличить длину тубуса в зависимости от длины применяемой камеры. Окуляры различного увеличения требуют различного увеличения длины тубуса. Удлинение возможно с помощью коротких трубок, помещаемых на шейку окуляра. Корригирующего эффекта также можно достичь путем помещения вспомогательной линзы между окуляром и фотоматериалом.

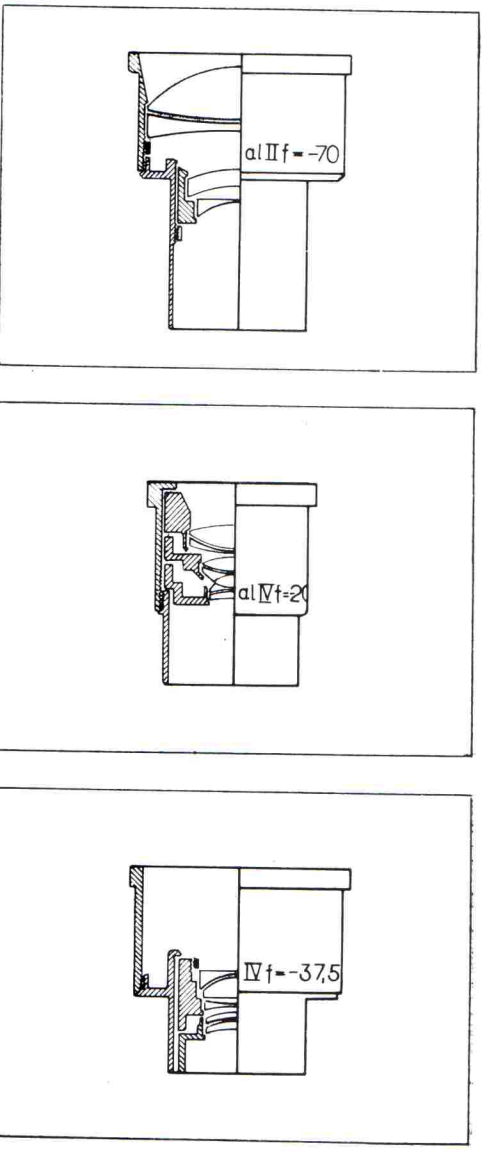


Рис. 4. Окуляры «Гомал» производства К. Цейс (Йена)

Для целей микрофотографирования (а также и для визуальных исследований) изготовляется серия окуляров марки «Проектив» производства фирмы К. Цейс (Йена). В случае механической длины тубуса в 160 мм и длины камеры в 125 мм они дают соответствующий результат. При соблюдении указанных длин окуляры «Проектив» не требуют увеличения длины тубуса. Увеличение снимка можно легко

высчитать с помощью имеющегося на окулярах «Проектив» числового индекса. Для непосредственного получения увеличения снимка в отношении фотоматериала размером в 24 × 36 мм при наличии упомянутой длины тубуса и камеры нужно только помножить индивидуальное увеличение объектива на числовой индекс, имеющийся на окуляре. Если снимки, сделанные с помощью обозначенного как «4:1» окуляра «Проектив» на пленку в 24 × 36 мм, мы увеличим до размеров 9 × 12 см, то достигнем оптимального максимума увеличения снимков (полезное увеличение; см. стр. 52). На некоторых окулярах «Проектив» можно видеть знак «К», который указывает на их компенсационное свойство.

Специально для целей микрофотографирования изготовляются окуляры «Гомал» (рис. 4) производства К. Цейс (Йена). Они имеют негативное фокусное расстояние, поэтому не могут применяться для визуальных исследований. Их рекомендуется использовать в первую очередь с апохроматическими объективами. Эти окуляры отлично исправляют недостатки объективов, как поперечную хроматическую аберрацию, так и кривизну поля изображения. У апохроматов различного увеличения различна и кривизна поля изображения, которую не представляется возможным целиком исправить одним типом окуляра «Гомал». Лучше всего подходят различные типы «Гомал» для различных объективов.

Фотоокуляры с негативным фокусным расстоянием, подобные системе »Гомал», выпускают и другие фирмы. Такими, например, являются окуляры «Амплиплан» и «Ультраплан» производства Бауш и Ломб (США).

Хотя фотоокуляры прежде всего подбираются к типам объективов, соответствующих данным выпускающего предприятия (например, типы «Гомал» — к апохроматам), тем не менее, за исключением плановых объективов, фотоокуляры с варьирующим результатом могут быть применены и с остальными типами объективов, то есть и с флуоритными ахроматическими объективами.

СРЕДСТВА ОПТИЧЕСКОГО НАПРАВЛЕНИЯ ОСВЕЩЕНИЯ

КОНДЕНСОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ В ПРОХОДЯЩЕМ СВЕТЕ ПОЛНОЕ ЦЕНТРАЛЬНОЕ ОСВЕЩЕНИЕ ПО МЕТОДУ СВЕТЛОГО ПОЛЯ

При установлении освещения для микрофотографирования с помощью оснащенного зеркалом микроскопа в любом случае должно быть использовано плоское зеркало.

Для оптического направления освещения могут быть использованы различные типы конденсоров. В случае цветной микрофотографии конденсоры должны отвечать более высоким требованиям, так как использование несоответствующей системы конденсора сильно нарушает в остальном правильно подобранное сочетание системы объектив–окуляр.

Освещение медицинских и биологических объектов обычно осуществляется проходящим светом, реже — падающим. Чаще всего применяется освещение по методу светлого поля, реже — по методу темного поля или другие методы освещения. Контрастность изображения и распознаваемость отдельных частей в большой мере зависит от освещения.

При освещении по методу светлого поля лучи, непосредственно освещающие препарат, проникают в объектив, и изображение предмета появляется на светлом фоне.

Требования к конденсору могут быть суммированы следующим образом:

1. Собранные лучи источника света конденсор должен проецировать на исследуемый объект в виде сходящегося пучка лучей. Апертура этого сходящегося пучка лучей должна быть изменяемой и при необходимости соответствовать апертуре объектива микроскопа.
2. Конденсор, соответственно принципу освещения по Кёлеру (см. стр. 84), должен проецировать в плоскость исследуемого объекта изображения так резко, как только позволяет полевая диафрагма, и изображение должно быть свободным от хроматических аберраций.

Второе требование является особенно важным в практике цветной микрофотографии. Если конденсор имеет хроматический дефект, то возникает опасность того, что незначительное изменение высоты конденсора (на несколько десятых мм, особенно в случае сильного увеличения) вызывает значительное смещение цвета на снимке. Это явление наблюдается довольно часто и при визуальном наблюдении, когда изменяется цвет края проецирующей полевой диафрагмы, а вместе с этим — цветовой состав первоначально белого луча света, освещающего объектив. В этом случае, в зависимости от изменения высоты конденсора, исследуемый объект будет покрыт цветовой дымкой, где голубоватой, где красноватой (цветн. иллюстр. I/1, 2).

На цветных микроснимках, иллюстрирующих научные сообщения, а также при показе диапозитивов во время лекций можно наблюдать, что если снимки небольшого и среднего увеличения дают правильное отражение цветов, то при сильном увеличении они имеют уже упомянутое смещение цвета. Хотя причина этого может и не зависеть от конденсора, все-таки чаще всего это связано с вышеуказанным явлением. Нежелательный феномен можно устранить с помощью так называемого ахроматического апланатического конденсора (рис. 5 и цветн. иллюстр. I/3). Если такового нет, то нужно работать при большем отверстии диафрагмы, чем это следует по правилу Кёлера, а высота конденсора в определенном среднем положении должна выбираться так, чтобы не проявлялись упомянутые цветовые сдвиги.

При так называемом полном центральном освещении по методу светлого поля в освещении объекта принимают участие как проходящие через центр лучи маленькой апертуры, так и лучи большой апертуры, проходя-

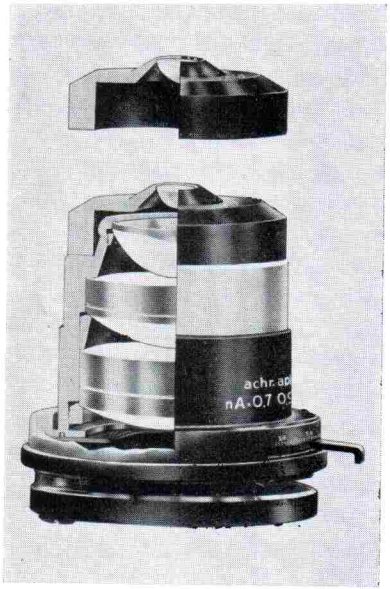


Рис. 5. Ахроматическая апланатическая система конденсора, выпускает фирма Вильд (Хербругг)

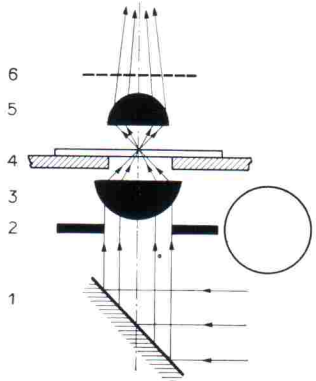


Рис. 6. Ход лучей при полном центральном освещении по методу светлого поля:

1. зеркало,
2. апертурная диафрагма,
3. конденсор,
4. плоскость объекта,
5. объектив,
6. задняя фокальная плоскость объектива

щие через краевые зоны (рис. 6). Лучи большой апертуры могут быть исключены сужением апертурной диафрагмы. Таким путем можно усилить контраст изображения. В связи с целесообразной установкой апертурной диафрагмы должны приниматься во внимание точки зрения, упомянутые в описании принципа освещения по Кёлеру.

Конденсоры для объективов слабого увеличения

При изготовлении снимков с помощью лупы и макрофотографии требование, предъявляемое к конденсору, заключается в равномерном освещении относительно большой поверхности исследуемого предмета. У определенных типов конденсоров фронтальная линза может быть вывернута, у других — откинута. Таким способом их фокусные расстояния станут длиннее, и они могут быть использованы для освещения большей области.

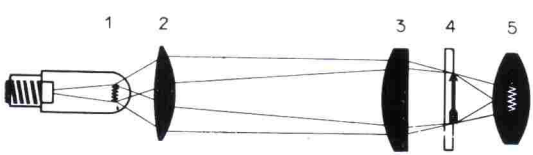


Рис. 7. Ход лучей в конденсоре, действующем по принципу диаскопа:

1. источник света,
2. фонарный конденсор,
3. конденсор,
4. плоскость объекта,
5. объектив и изображение нити накаливания

Из упрощенных способов освещения применим и принцип диаскопа. Конденсор формирует изображение источника света в объективе, в то время как конический пучок лучей освещает относительно большую область плоскости объекта (рис. 7).

Преимущественно для снимков, изготовляемых с помощью лупы, выпускается так называемый «очковый конденсор» (рис. 8). При его применении апертура пучка лучей, освещающих большую область плоскости объекта, существенно не изменяется, однако лучевой конус, покидающий поле объекта, направляется во входной зрачок объектива. Таким образом, выходной зрачок конденсора перемещается ко входному зрачку объектива. В зависимости от величины освещаемой плоскости объекта «очковые конденсоры» изготовляются с различными фокусными расстояниями.

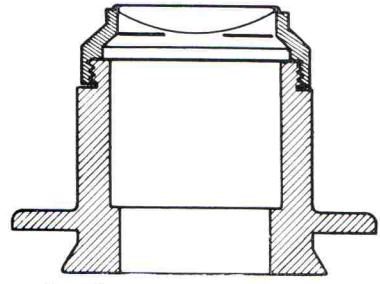
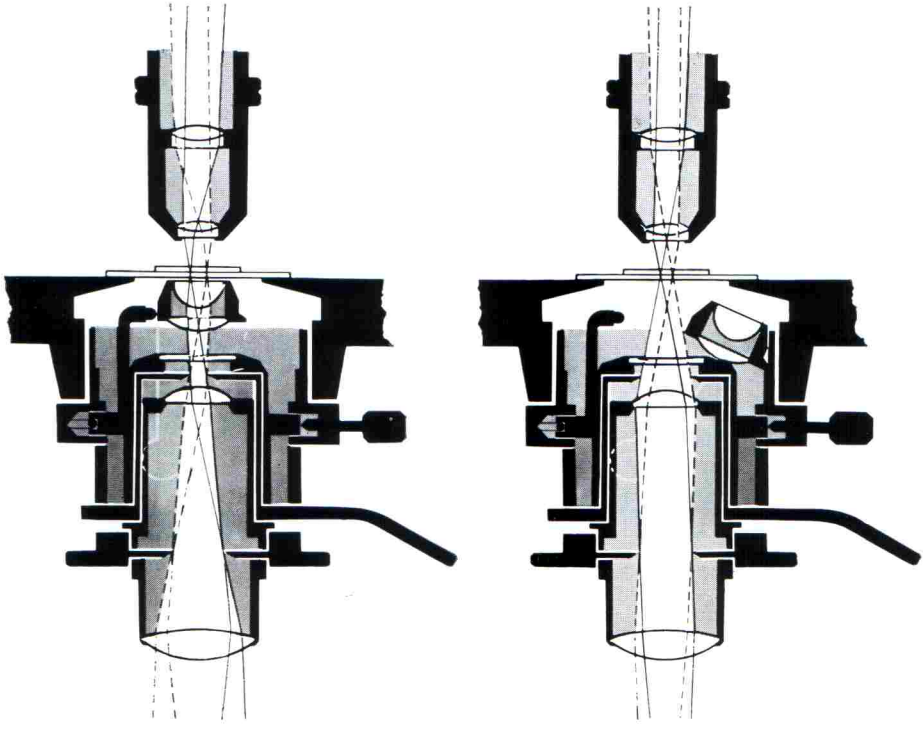


Рис. 8. «Очковый конденсор»

Конденсоры для объективов сильного увеличения

Объективы большой апертуры, обеспечивающие хорошую разрешающую силу, могут продемонстрировать свой максимум при условии, если

Рис. 9. Ход лучей в конденсоре типа «Берек» с двумя диафрагмами производства Э. Лейц (Вецлар)



это позволит конденсор адекватно большой апертуры. Из этого следует, что старые конденсоры с апертурой 0,6, состоящие из одной единственной линзы, могли удовлетворить лишь скромные требования. Современными конденсорами может быть достигнута 1,4 нумерическая апертура. Полная апертура отдельных объективов на практике не всегда применима для увеличения контраста и глубины резкости. Опыт показывает, что, например, в случае иммерсионного апохроматического объектива с нумерической апертурой 1,30 у большей части исследуемых объектов хороший результат получается уже и при освещающей апертуре 0,95—1,00. В этом случае, например, напрасно применять конденсор с апертурой 1,4, если апертура все равно суживается апертурной диафрагмой до 0,95—1,00.

Конденсор «Берек» производства Лейц (Вецлар) имеет две диафрагмы: верхняя контролирует апертуру, а нижняя регулирует освещение поля (рис. 9). При слабом увеличении после откидывания фронтальной линзы функцию апертурной диафрагмы выполняет нижняя диафрагма.

Панкратический конденсор

Применение системы панкратического конденсора упрощает установку освещения. При его использовании апертура освещающего пучка лучей может быть установлена в соответствии с величиной освещаемого объектного поля быстро и просто. Синхронное движение линз системы панкратического конденсора осуществляется поворотом кольца, на котором указан знак, соответствующий апертуре применяемого объектива. Между тем фокусное расстояние конденсора непрерывно изменяется. Панкратическими конденсорами снабжены например, «Лумипаны», выпускаемые фирмой К. Цейс (Йена), а также их модернизированные варианты — микроскопы подобного производства типа «Nf» и «Nu».

Револьверная оправа системы панкратических конденсоров производства К. Цейс (Йена) для объективов небольшой апертуры и слабого увеличения имеет «очковый конденсор», апланатический конденсор с апертурой 016-1,40, а также кардиоидный конденсор с апертурой 1,05. Вращающееся кольцо служит для установки любого значения апертуры (рис. 10).

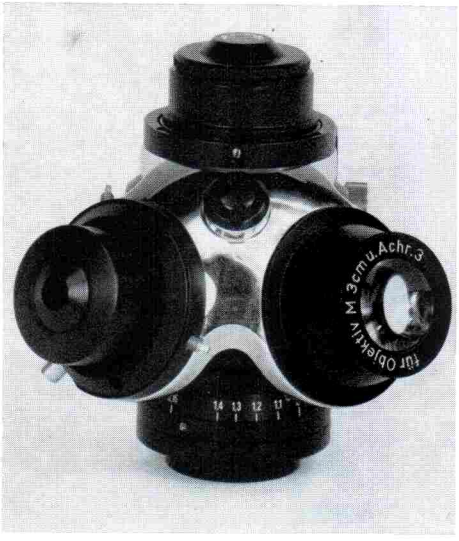


Рис. 10. Панкратическая конденсорная система производства К. Цейс (Йена)

При центральном освещении по методу светлого поля степень контраста и разрешающая сила не достигают максимума мощности микроскопа. Благодаря открытию Зернике фазовоконтрастного освещения все большее распространение получают реализуемые оптически методы, усиливающие контраст, которые могут быть применены не только в черно-белой, но и в цветной микрофотографии.

При этих процессах наблюдаемое изображение, сопоставленное с первоначальным объектом, всегда показывает большее или меньшее расхождение. В связи с этими методами особенно важно учесть, что основательное знание применяемого метода является предпосылкой получения правильной информации об исследуемом объекте.

Оборудование для косого освещения

Одним из способов осуществления косого освещения является задержка части освещающего пучка лучей с помощью темной пластинки в форме полумесяца, помещенной в фильтродержатель, под апертурной диафрагмой. В сущности подобный эффект обеспечивают так называемая эксцентрическая диафрагма (рис. 11), децентрализация апертурной диафрагмы и эксцентрическая установка зеркала микроскопа. Использование перечисленных возможностей дает так называемое одностороннее косое освещение. Его преимущество в том, что наряду с хорошей разрешающей силой можно

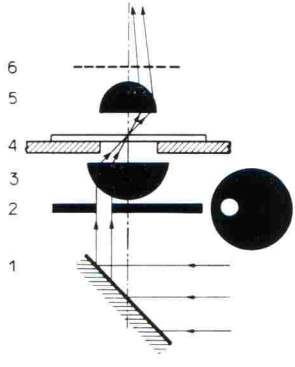


Рис. 11. Ход лучей при одностороннем косом освещении в случае использования эксцентрической диафрагмы
1. зеркало,
2. эксцентрическая диафрагма,
3. конденсор,
4. плоскость объекта,
5. объектив,
6. задняя фокальная плоскость объектива

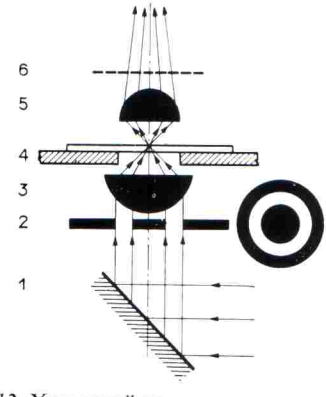


Рис. 12. Ход лучей при освещении, осуществляющемся в форме кольца в случае задерживания центральных лучей малой апертуры
1. зеркало,
2. диафрагма для задерживания центральных лучей,
3. конденсор,
4. плоскость объекта,
5. объектив,
6. задняя фокальная плоскость объектива

получить рельефное пластическое изображение с высокой степенью контраста. Его недостаток — частое искажение изображения.

Другая возможность — косое освещение в кольцеобразной форме. Предпосылкой этого метода является задержка центральных лучей малой апертуры. Это достигается применением диафрагмы, при которой идущие через конденсор лучи проходят через кольцевидное отверстие (рис. 12).

Поскольку косыми лучами кольцевидной формы объект освещается равномерно со всех сторон, достигается определенная пластичность при одновременном сравнительно небольшом оптическом искажении.

Оборудование для освещения по методу темного поля

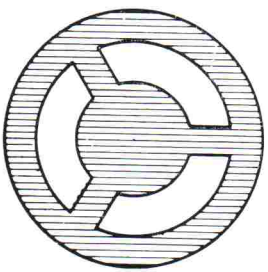
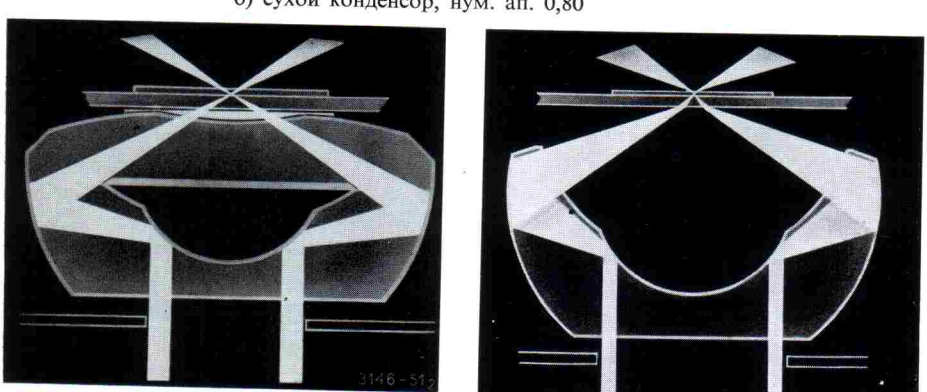


Рис. 13. Простое средство получения освещения по методу темного поля — помещение звездчатой диафрагмы в фильтродержатель светлопольного конденсора

При освещении по методу темного поля лучи, непосредственно освещающие предмет, не проникают в объектив, а детали объекта становятся видимыми с помощью диффракционных, рассеянных или преломленных лучей. Косые лучи света большой апертуры, идущие из конденсора и не входящие в объектив, преломляются, рассеиваются на препарате, и таким способом очень маленькие и малоконтрастные объекты, трудно наблюдаемые посредством других методов, светятся, сверкают в темном поле.

Простое получение освещения по методу темного поля возможно с помощью звездчатой диафрагмы (рис. 13). В случае применения соответствующих кардиоидных конденсоров (рис. 14) для

Рис. 14. Ход лучей в кардиоидных конденсорах, дающих темнопольное освещение, производства Э. Лейц (Вецлар)
а) иммерсионный конденсор, нум. ап. 1,20,
б) сухой конденсор, нум. ап. 0,80



а б

наблюдения и фотографирования препаратов могут быть использованы как сухие, так и иммерсионные объективы. Большой апертуры лучи иммерсионного конденсора темного поля выходят при содействии иммерсионной жидкости, поэтому между конденсором и предметным стеклом должны быть помещены капли иммерсионной жидкости. Апертура лучей, идущих из конденсора, должна быть больше, чем апертура объектива, поэтому в случае объективов с большой апертурой для уменьшения последней применяются ирисовые или воронковые диафрагмы. Преимущество кардиоидных конденсоров заключается в том, что они действуют по принципу отражения с зеркальной поверхности и потому свободны от хроматических аберраций.

Оборудование для фазовоконтрастного освещения

Применением фазовоконтрастных процессов, открытых Зернике, может быть увеличен контраст микроскопических препаратов, в результате чего становятся видимыми неокрашенные и с едва уловимым контрастом детали. Усиление контраста осуществляется оптическим путем, то есть фазовая разница световых волн, проходящих через объект, в плоскости изображения воспринимается уже как разница в силе света.

При появлении микроскопического изображения идущие с препарата световые волны, подвергнутые минимальному отклонению, проходят через фокусную плоскость объектива со стороны изображения. По сравнению с сильно отклоненными лучами они более интенсивные и дают фазовую разницу, соответствующую 1/4 длины волны. Глаз человека не улавливает фазовые изменения световых волн. Если в фокусную плоскость объектива со стороны изображения вносится слой, благодаря которому изменяется фаза менее отклоненных лучей, а также уменьшается их интенсивность, возникает изображение с высокой степенью контраста. Фазовая пластинка (изменяющий фазу слой) помещается в задней фокусной плоскости объектива, в форме

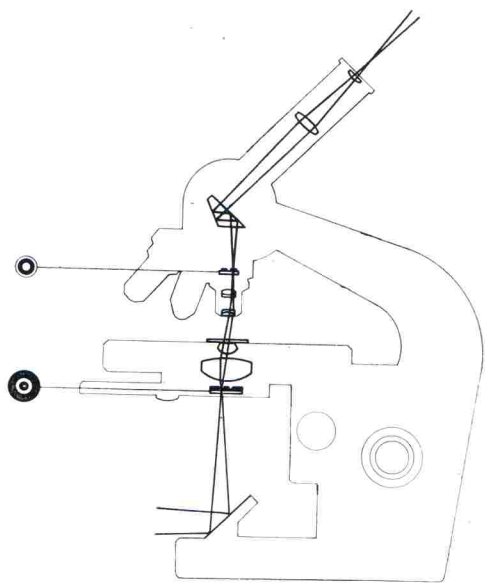


Рис. 15. Ход лучей в фазовоконтрастном микроскопе (схема Вильд, Хербругг). При правильной установке изображение кольцевой диафрагмы конденсора точно покрывает кольцевидную фазовую пластинку, имеющуюся в задней фокальной плоскости объектива

кольца на поверхности линзы. Этот слой обладает и свойством, абсорбирующим свет.

Для фазовоконтрастных микроскопических исследований с применением фазовоконтрастных объективов, а также фазовоконтрастной конденсорной системы можно использовать практически любой микроскоп. Предназначенный для целей фазовоконтрастной микроскопии конденсор отличается от обычного конденсора, по существу, тем, что он снабжен кольцеобразной апертурной диафрагмой меняющихся размеров. Для фазовоконтрастных объективов, дающих различное увеличение, должны применяться кольцевые диафрагмы разного диаметра. Диафрагма соответствующих размеров

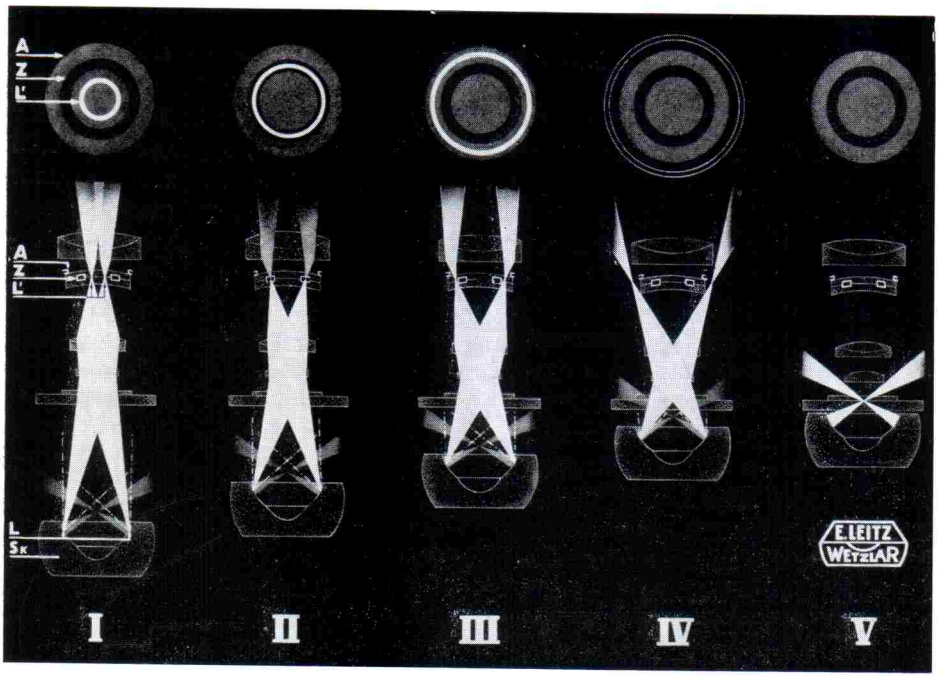


Рис. 16. Ход лучей в конденсоре «Гейне» (производства Э. Лейц, Вецлар)
I. В наиболее низко опущенном положении тела зеркала (SK) узкое световое кольцо (L), произведенное конденсором, изображается в (L'), внутри фазовой пластинки (Z). Результат: светлопольное освещение
II. При подъеме тела зеркала изображение светового кольца увеличивается до тех пор, пока оно полностью не покроет кольцевидную фазовую пластинку. Результат: фазовоконтрастное освещение
III. Дальнейший подъем тела зеркала обусловливает дальнейшее увеличение светового кольца. Результат: косое освещение в форме кольца
IV. При дополнительном подъеме тела зеркала световое кольцо исчезает за краем апертурной диафрагмы (A). Результат: освещение в форме кольца, подобное темнопольному освещению
V. В этом положении поле зрения освещается сильно конвергирующими лучами. Результат: темнопольное освещение

проецируется на кольцеобразную фазовую пластинку, помещенную в задней фокальной плоскости объектива (рис. 15). После центрировки и правильной установки (см. стр. 92) хорошо проявляется эффект, усиливающий контраст.

Кольцевые диафрагмы различного диаметра помещаются на револьверный диск, вращением которого на пути световых лучей вводится кольцевая диафрагма, соответствующая применяемому объективу.

С помощью панкратической конденсорной системы с одной кольцевой диафрагмы можно получить изображение кольца различных размеров.

Так называемые универсальные конденсоры различного производства также применимы для установки кольцевых диафрагм, соответствующих различным фазовоконтрастным объективам.

Универсальные конденсоры

Конденсоры «Гейне» фирмы Э. Лейц (Вецлар), (рис. 16), а также «Полифос» фирмы Рейхерт (Вена) с помощью вертикальной регулировки тела зеркала обеспечивают непрерывный переход от освещения по методу светлого поля через фазовоконтрастное и кольцевидной формы косое освещение к освещению по методу темного поля.

Средства оптического «окрашивания»

В конце прошлого столетия Й. Рейнберг впервые опубликовал метод, благодаря которому стало возможным оптическое «окрашивание» в различные цвета центральных и периферических пучков лучей конденсора. Сущность метода заключается в следующем:

Два фильтра дополнительного цвета помещаются под конденсором большой апертуры (в фильтродержатель) таким способом, чтобы один из фильтров занял центральное место, а другой — периферическое. Центральным фильтром окрашивается задний план, а наружным кольцеобразным фильтром — объект. Таким путем в отношении неокрашенных объектов может быть достигнут яркий цветовой эффект. Чрезвычайно эффективна комбинация фильтров зелено-синего с красным, а также сине-фиолетового с оранжевым. Апертуру освещающего пучка цветных лучей можно изменить, помещая черные диски различного диаметра на центральный фильтр

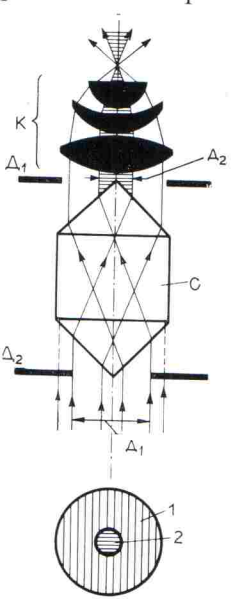
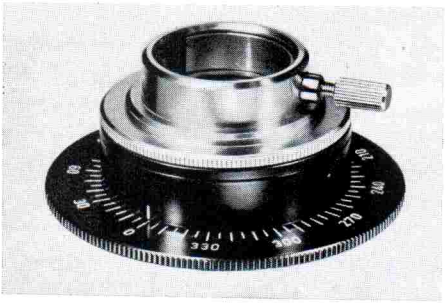
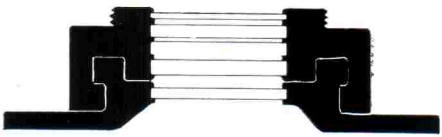


Рис. 17. Ход лучей в конденсоре «U 7», выпускает МОМ, Будапешт (подробное изложение см. в тексте)



а



б



в

Рис. 18. Устройство «Вариоколор» — производства Э. Лейц (Вецлар) — и его эффект:

а) устройство, пристраиваемое к конденсору микроскопа,

б) схема поперечного разреза «Вариоколор»,

в) кривая спектрального пропускания «Вариоколор»; положение, дающее пурпурный, сине-зеленый и желтый цвета

и различного диаметра черные кольца на периферический фильтр. Таким путем достигается желаемый эффект.

Конденсор «Микрополихромар» фирмы Цейс также основан на эффекте Рейнберга. Его конструкция обеспечивает быстрое непрерывное изменение апертуры освещающего пучка цветных лучей.

Описанные методы, и сущности, основываются на принципе освещения по методу темного поля. Центральные лучи малой апертуры, идущие к объективу, которые в случае освещения по методу темного поля исключаются, через цветной фильтр направляются к препарату, а на пути лучей большой апертуры помещается фильтр другого цвета. Таким образом, неокрашенные объекты под влиянием цветного освещения, применяемого различными способами, видны в микроскопе как цветные.

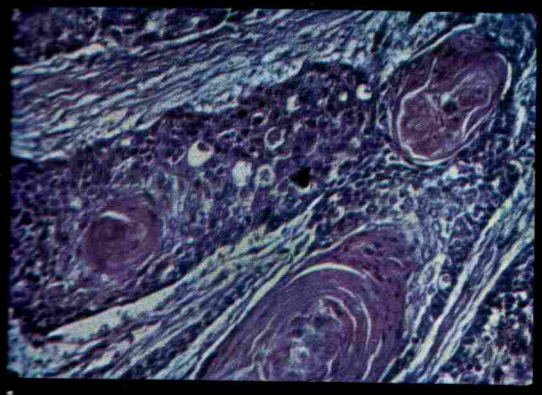
→

Рис. 1—3. Конденсор с хроматической аберрацией при установке на различной высоте обусловливает цветовое смещение.

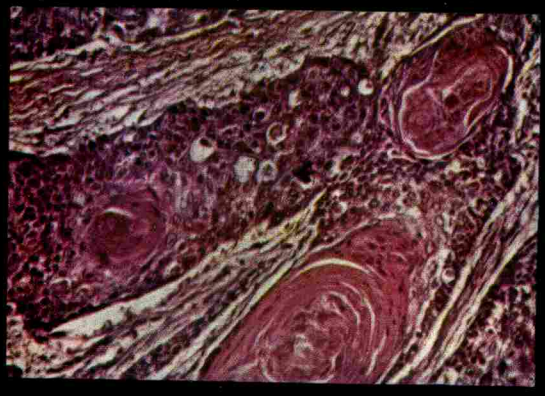
Объект: опухолевая ткань (кератоидная плоскоклеточная карцинома). *Окрашивание:* гематоксилин-эозин. *Объектив:* апохромат 10/0,30. Увеличение = 100 : 1. *Фотоматериал:* обратимая пленка «Орвоколор UK14». 1. При слишком высоком положении конденсора цвета покрываются синей дымкой. 2. При слишком низком положении преобладает оранжево-красный тон. 3. При правильном положении конденсора (или при применении ахроматического-апланатического конденсора) цвета соответствуют действительности

Рис. 4. Микроснимок изготовлен на цветном фотоматериале с неокрашенного препарата. Освещение осуществлялось через обычный конденсор

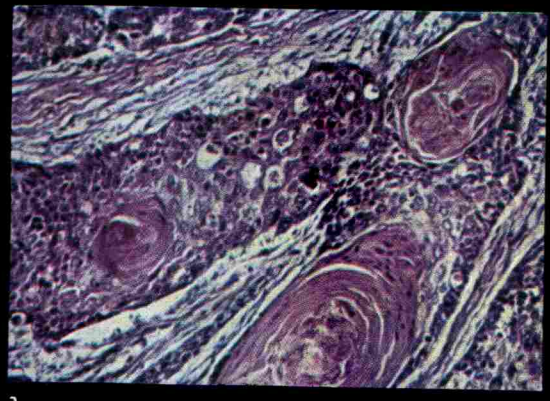
Рис. 5. Оптическое «окрашивание», осуществляемое посредством конденсора «U 7» (выпускает завод MOM, Будапешт). С помощью фильтра лучи большой апертуры окрашиваются в красный цвет, а лучи с малой апертурой — в синий. *Объект:* экскреция простаты. *Объектив:* HI 60/1,0. Увеличение = 600 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Агфаколор CN 17»



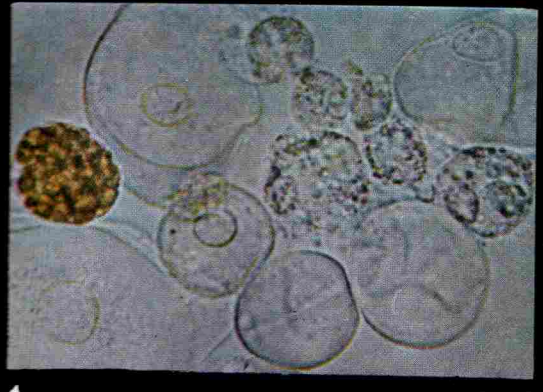
1



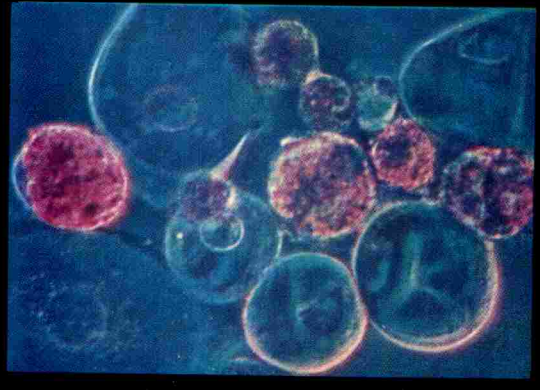
2



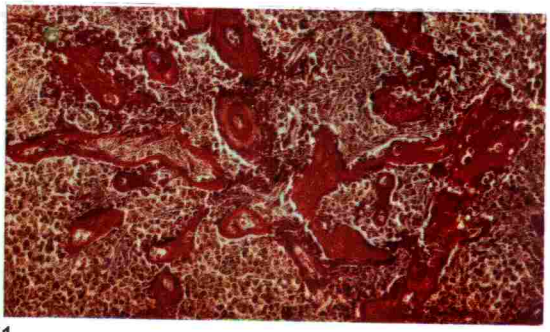
3



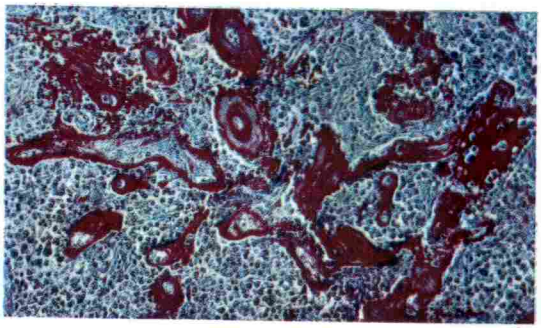
4



5



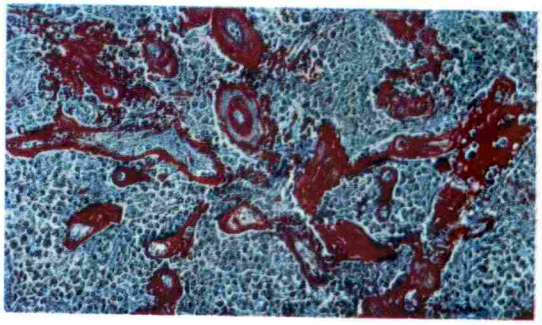
1



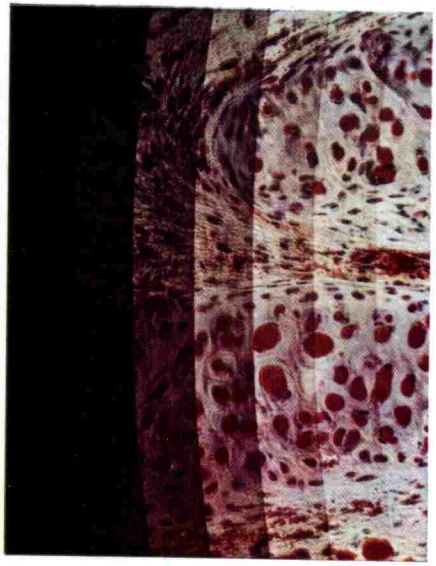
2



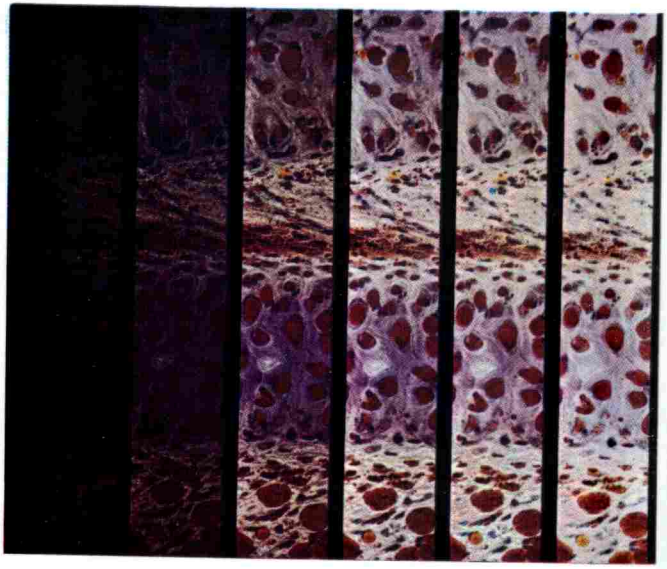
3



4



5



6

Для достижения эффекта, подобного одному из изложенных, существует простой и целесообразный метод, который состоит в том, что в фильтродержатель под конденсором помещается стекло, у которого на одной половине (например, в форме полумесяца) имеется красная фольга, а на другой — зеленая фольга подобной же формы, то есть комбинация двух дополнительных цветов.

Конденсор «U 7» будапештской фирмы MOM (рис. 17), кроме достижения различных эффектов освещения, применим также и для оптического окрашивания (цветн. иллюстр. I/4, 5).

Оптическое устройство конденсора «U 7» следующее.

Концы цилиндрического стеклянного тела (С) системы линз апланатического конденсора (К) ограничиваются коническими поверхностями. В каждой плоскости, проходящей через вершину, помещена ирисовая диафрагма ($Д_1$, $Д_2$). Когда $Д_1$ диафрагма сужается, в центральной части лучей, выходящих из стеклянного тела, возникает циркулярное темное пространство. Диаметр темного пространства ($д_2$) всегда пропорционален диаметру входного отверстия ($д_1$), оставшегося свободным. Если $Д_1$ диафрагма полностью открыта, все отверстие конденсора является эффективным. Постепенным суживанием диафрагмы в поле лучей, выходящих из конденсора, можно образовать округлое темное поле, постепенно растущее от центра к краям. Ширину освещающего кольца можно изменять диафрагмой $Д_2$. Если поместить в фильтродержатель конденсора комбинированный фильтр, на-

←

Рис. 1—4. Микроснимки, выполненные на цветном фотоматериале, не соответствующем цветовой температуре используемого источника света, и их коррекция посредством конверсионных фильтров. *Объект:* опухолевая ткань (множественная миелома). *Окрашивание:* по Массону. *Объектив:* апохромат 10/0,30. Увеличение = 100 : 1. *Фотоматериал:* обратимая пленка «Орвоколор UT 16» и «UK 14»

Рис. 1. При свете лампы накаливания с цветовой температурой 3200°К без конверсионного фильтра на снимке, изготовленном на пленке дневного типа, изображение покрыто оранжево-красной дымкой

Рис. 2. С применением синего конверсионного фильтра получаем снимок, правдивый в цветовом отношении

Рис. 3. При свете источника света с цветовой температурой 6000°К без конверсионного фильтра на снимке, изготовленном на пленке для искусственного света, изображение покрыто зелено-синей дымкой

Рис. 4. С применением оранжево-красного конверсионного фильтра получается снимок, правдивый в цветовом отношении

Рис. 5. Каждая полоса серии пробных снимков, изготовленных кассетой с градуированной крышкой, показывает различную часть объекта. *Объект:* бронхиальный хрящ (отложение жира). *Окрашивание:* гематоксилин-феттрот. *Объектив:* апохромат 10/0,30. Увеличение = 100 : 1. *Фотоматериал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17»

Рис. 6. С помощью умножателя, имеющего щель, пробный снимок может быть выполнен всегда с одной и той же области обьекта. Технические данные: как в предыдущем случае

ружная часть которого, например, синяя (1), а внутренняя — красного цвета (2), то объект в синем поле представляется «окрашенным» в красный цвет. Кроме того, конденсор «U 7» применим еще для осуществления центрального по методу светлого поля, косого, комбинированного, по методу темного поля, а также фазовоконтрастного освещения.

Цвет поля зрения микроскопа может быть постепенно изменен с помощью устройства «Вариоколор» фирмы Э. Лейц, Вецлар (рис. 18). Прибор, который помещается между источником света и конденсором, состоит из кристаллической пластинки между двумя поляризационными фильтрами. При повороте одного из последних, соответственно пределу спектра источника света возникает интерференция цветов. Посредством «Вариоколор» в зависимости от характера исследуемого объекта может быть вызван различный цветовой контраст.

СРЕДСТВА ОСВЕЩЕНИЯ ПАДАЮЩИМ СВЕТОМ

Устройства, дающие верхнее освещение, используются как в исследованиях по методу светлого и темного полей, так и для фазовоконтрастной микроскопии. Из них для медицинских и биологических целей наибольшее значение имеет, в основном, устройство, обеспечивающее исследование в падающем свете по методу темного поля.

В случае слабого увеличения простым и хорошим решением является освещение исследуемого препарата от объектива светом одной или нескольких ламп. Таким способом, например, можно получить пластическое, рельефное изображение поверхности органов.

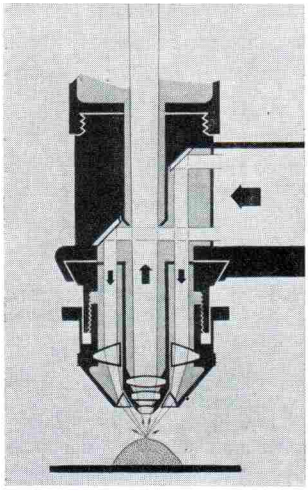


Рис. 19. Устройство «Ультропак», обеспечивающее верхнее освещение и ход лучей в нем, выпускает Э. Лейц (Вецлар)

В случае сильного увеличения, когда расстояние между объектом и объективом небольшое, необходимо применять приборы особой конструкции.

Устройство «Ультропак» фирмы Э. Лейц (Вецлар) с помощью кольцевидного зеркала направляет лучи источника света на конденсор, кольцеобразно окружающий объектив (рис. 19). Высоту этого кольцевого конденсора можно изменять, конденсор можно дополнить приспособлениями для освещения объекта выходящими лучами под различным углом. Устройство дополняется специальным набором объективов.

В другой системе устройства, дающего верхнее освещение, замена объективов обеспечивается револьверной системой.

СРЕДСТВА ОСВЕЩЕНИЯ СМЕШАННЫМ СВЕТОМ

Падающим и проходящим светом одновременно пользуются для освещения таких объектов, изображение поверхности и контуров или поверхности и внутренней структуры которых желательно получить. Такую возможность обеспечивает, например, устройство типа «Зетопан» (рис. 20) фирмы К. Рейхерт (Вена). Комбинационные возможности ультрафиолетового света и обычного источника света используются в исследованиях флуоресцентным микроскопом (см. стр. 97).

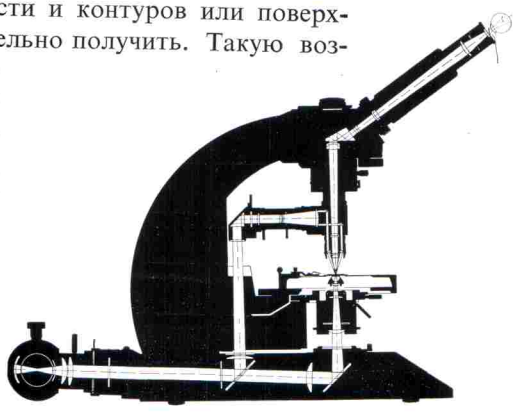


Рис. 20. Ход лучей при смешанном освещении, производимом микроскопом «Зетопан» — выпускает К. Рейхерт (Вена)

ИСТОЧНИКИ СВЕТА. СВЕТИЛЬНИКИ

Одной из характерных черт источников света является спектральное распределение энергии испускаемого ими света, то есть световой источник испускает световые кванты при отдельных длинах волн.

Для микрофотографии как источники света обычно применяются лампы накаливания, питающиеся электрическим током. В их спектре постоянно имеются цвета видимых длин волн (постоянный спектр). В противоположность этому, например, в спектре также широко используемых газоразрядных ламп преобладают несколько лучей определенной длины волны (линейный спектр).

Цвет света, испускаемого источником света, зависит от температуры нити или тела накаливания лампы. С повышением температуры преобладает синяя часть спектра, а с понижением температуры – красная. Целесообразно поэтому характеризовать источники света на основе их так называемой цветовой температуры, которую выражают в градусах Кельвина (°К) и Mired (M) или Dekamired (DM) как единицах измерения.

Исходная точка абсолютной температуры, измеренная в °К, представляет собой температуру абсолютно черного тела или абсолютный нуль, — 273°С. Из этого следует, что измеренная в °К абсолютная температура — всегдашний °С + 273.

Цветовая температура, выраженная в °К, информирует о том, какой абсолютной температуре черного тела соответствует цвет данного источника света.

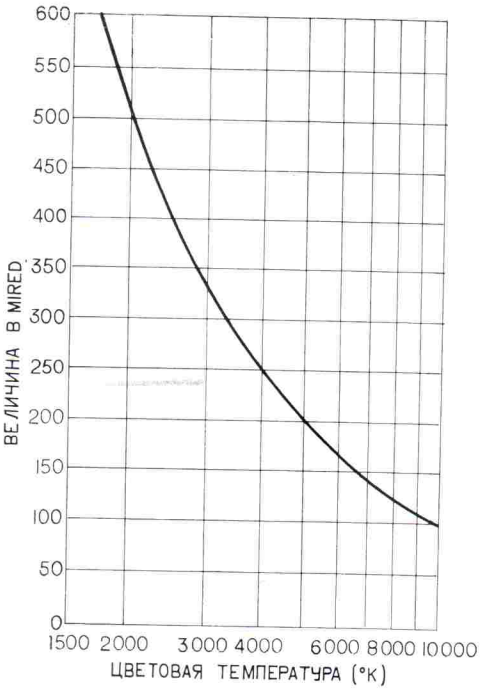


Рис. 21. Взаимосвязь между цветовой температурой, измеренной в градусах Кельвина и значениями Mired

Каждая цветовая температура может быть выражена в величинах Mired (Micro Reciprocal Degree Kelvin) или Decamired

$$1\ \text{Mired (M)} = \frac{1\,000\,000}{^{\circ}\text{K}};$$

$$1\ \text{Decamired (DM)} = \frac{100\,000}{^{\circ}\text{K}}$$

Преимущество подсчета в «М» и «DM» проявляется при вычислениях, связанных с выбором цветных фильтров (корректировочные фильтры).

Взаимосвязь между цветовой температурой, измеренной в °К, и значениями Mired наглядно представлена на графике (рис. 21); данные источников света, встречающихся в практике цветной микрофотографии, выраженные в °К и определенные в значениях DM, показаны в таблице I.

Таблица I

Данные искусственного источника света, измеренные в градусах Кельвина (°К) и определенные в Decamired (DM)

Источники света	°К	DM
Ксеноновые импульсные трубки	5500—6500	18—15
Ксеноновые лампы непрерывного света	6000	17
Угольный дуговой источник света (в зависимости от качества угля)	3800—5500	26—18
Перекаленные фотолампы (срок годности 2 часа)	3400	29
Нормальные фотолампы (срок годности 100 часов)	3200	31
Проекционные лампы	2900—3200	34—31
Низковольтные микроскопные лампы (12 в 100 вт, при 12 в)	3200	31
Низковольтные микроскопные лампы (6 в 15 вт, при 6 в)	2850	35
Обычные лампы накаливания	2500—2800	40—36

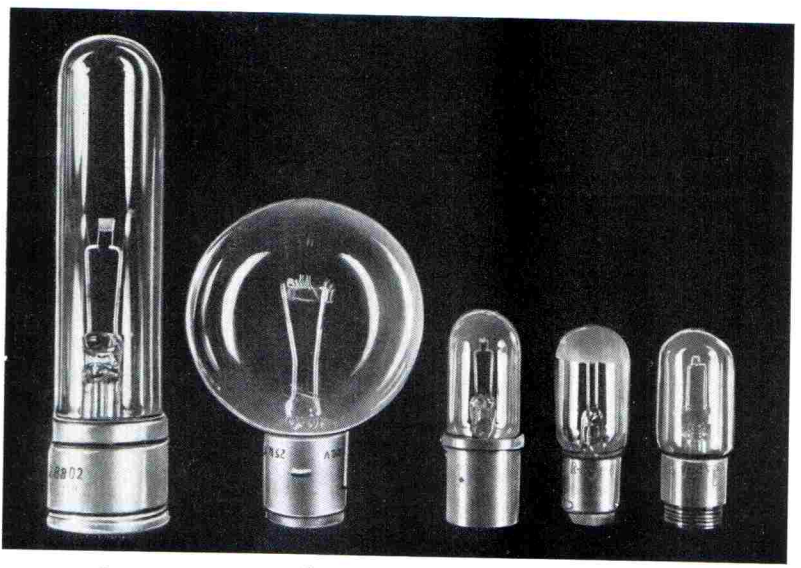
Для измерения цветовой температуры служат фотоэлементные устройства.

Значения, представленные в цветовой температуре, не дают информации об интенсивности источников света; можно проследить лишь спектральное распределение энергии.

В практике цветной микрофотографии сохранение цветовой температуры источника света на постоянном уровне является важным условием. Колебание напряжения в пределах 10 — 15% и изменение цветовой температуры в пределах 5 — 7% еще не вызывают на цветном снимке существенных цветовых сдвигов. Однако, во избежание больших колебаний, уже желательно использовать устройство для стабилизации напряжения.

ЛАМПЫ НАКАЛИВАНИЯ

Лампы для низковольтной электрической цепи являются наиболее часто используемыми источниками света в микроскопии (рис. 22). Их нити накаливания сконцентрированы на площади в несколько квадратных милли-



а б в г д

Рис. 22. Лампы накаливания, питающиеся низковольтным напряжением
а) 12 в, 100 вт-ная лампа с тубулярным корпусом и проекционной ламповой оправой;
б) 12 в, 100 вт-ная лампа со сферическим корпусом и штыковым цоколем;
в) 6 в, 15 вт-ная лампа с тубулярным корпусом и центрируемой оправой, снабженной внутренней резьбой;
г) 6 в, 15 вт-ная лампа с матовой вершиной, тубулярным корпусом и штыковым цоколем;
д) 6 в, 15 вт-ная лампа с тубулярным корпусом и центрируемой оправой, снабженной наружной резьбой

метров. Стеклянная колба может быть сферической или цилиндрической, цоколь винтовым или байонетным. Наиболее распространены лампы 6 в 15 вт, 6 в 30 вт и 12 в 100 вт. Последний тип особенно широко применяется для целей цветной микрофотографии вследствие его цветовой температуры, приспособленной к пленке искусственного света. Стеклянные баллоны некоторых типов ламп могут быть матовыми.

Несмотря на то, что проекционные лампы изготовляются для проекции стационарных и движущихся изображений, их можно использовать также для микрофотографических целей. Они выпускаются в виде ламп на 110 в и 220 в, питающихся непосредственно из сети. Их мощность может достигать нескольких сот вт, но в качестве источников света при микрофотографировании экономнее применять лампы меньшей мощности.

В последнее время широкое распространение получают йодокварцевые лампы. Их корпус наполнен парами йода. Внутри ламп – вследствие химической реакции между йодом а раскаленным вольфрамом – происходит восстановление угольного электрода. Благодаря этому внутренняя поверхность корпуса ламп в процессе использования не чернеет, и световая интенсивность и цветовая температура остаются постоянными. Лампы малых размеров и большой интенсивности сильно нагреваются, поэтому их корпус изготовляют из кварца.

Перечисленные выше лампы накаливания можно питать в одинаковой мере как от постоянного, так и переменного тока, однако низковольтные типы целесообразно питать переменным током через трансформатор.

Световая мощность ламп накаливания при повышении применяемого напряжения возрастает, одновременно с этим растет и их цветовая температура, но срок их службы сокращается.

ДУГОВЫЕ ЛАМПЫ

Угольные дуговые лампы являются световыми источниками, которые выгодны в отношении цветовой температуры, их особенно успешно применяют для микроскопической работы при высоких «световых требованиях». Минимальное напряжение, необходимое для поддержания дуги постоянным током, равняется приблизительно 40 в, а при переменном токе — приблизительно 33 в. Используемые угольные стержни, если вся их масса гомогенного состава, называются гомогенным (Н) углем. Если же в угольном стержне имеется трубчатое отверстие, заполненное менее плотным углем или металлическими солями, то такие стержни назвываются начиненным углем.

Создать дугу можно и с помощью переменного тока, хотя применение постоянного тока более желательно. При переменном токе угольные стержни накаливаются одинаково; при постоянном же токе уголь, соответствующий положительному полюсу, где образуется так называемый кратер, на-

каливается сильнее. Это обеспечивает 80% тотального выхода света. Сама дуга едва испускает видимый свет, цветовой состав которого приходится на часть волн с более короткой длиной. Угольный стержень накаливания на участке в несколько мм под дугой испускает красные и инфракрасные лучи. Химический состав угольного стержня сильно влияет на цветовую температуру света дуги. В то время как в случае обычных гомогенных «Н» угольных стержней соотношение в световом составе передвигается в сторону более теплых цветов (50% — оранжевый, красный; 32% — зеленый, желтый; 18% — фиолетовый, синий), угли «Н 1» большой мощности обеспечивают «более белый» свет (31% — оранжевый, красный; 34% — зеленый, желтый; 35% — фиолетовый, синий).

В процессе горения угли расходуются, причем в случае постоянного тока — в различной степени. Поэтому диаметр и длину используемых углей нужно выбирать так, чтобы расходование двух углей происходило равномерно. Необходимо заботиться и том, чтобы увеличивающееся в процессе каления расстояние между углями не вызвало прерывания дуги. Регулировка осуществляется рукой и механическим или электромагнитным приспособлениями. Важна установка накаливающих световых верхушек в соответствующий фокус. Это производится с помощью установочного винта. Расход электроэнергии дуговыми лампами относительно велик, значит, провода и предохранители должны быть подобраны соответственно этому. Ввиду развития высокой температуры (температура кратера 3500—4000°С), необходимо заботиться и об эффективном охлаждении. С помощью жидкостного светофильтра (например, 2—3% раствор сульфата меди) или теплопоглощающего стекла, помещенных на пути световых лучей, можно фильтровать лучевую часть, богатую красными лучами. Положительные свойства дуговой лампы и лампы накаливания объединяет в себе вольфрамовая дуговая лампа. Распространенным типом является так называемая лампа «Пойнтолит».

Современный вариант металлической дуговой лампы — циркониевая дуговая лампа. Она может питаться постоянным (или выпрямленным переменным) током, ее цветовая температура 3200°К. Ее световая плотность есть многократное обычных ламп накаливания.

РТУТНЫЕ ЛАМПЫ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ

Ртутные лампы высокого давления дают голубовато-белый свет, и, как показывает их спектральное распределение энергии, максимум их мощности приходится на ту часть волн, которые имеют более короткую длину (рис. 23). В практике цветной микрофотографии использование ртутных ламп высокого давления ограничено. Чаще всего они применяются при флуоресцентно-микроскопических исследованиях. Для этой цели они при-

годны благодаря их благоприятному спектральному световому составу, а также большой световой плотности.

Ртуть, находящаяся внутри кварцевой трубки ртутных ламп высокого давления, после включения начинает испаряться, и внутри кварцевой трубки возникает давление в 35—70 атм. Поэтому необходимо заботиться о прочном корпусе лампы.

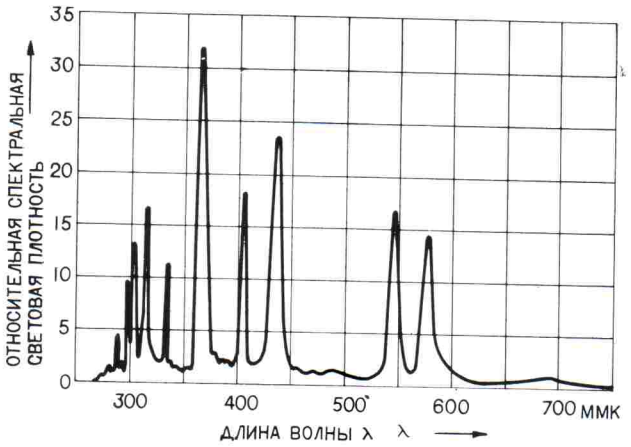


Рис. 23. Относительное спектральное распределение энергии «Осрам HBO 200 вт»

Сферический корпус лампы марки «Осрам HBO 200 вт» (рис. 24) изготовляется из кварца. Кроме пары электродов, размещенных вертикально, она имеет еще третий, так называемый зажигательный электрод, посредством которого лампа одинаково зажигается как на холоду, так и в тепле. Лампа питается от постоянного тока напряжением 120 в или переменного тока напряжением 220 в. Мощность 200 вт. Световая плотность 25 000 cd/см^2. Срок службы 200 часов.

Известны еще другие ртутные лампы большей или меньшей мощности фирмы Осрам или другого производства, работающие по подобному принципу. Распространенные типы Филипс: CS 100 вт, CS 150 вт, CS 500 вт, CS 1000 вт. Данные, необходимые для эксплуатации ламп, размеры зажигательных аппаратов и дроссельных катушек подробно излагаются в фирменных инструкциях, приложенных к лампе. Ртутные лампы достигают своей максимальной мощности приблизительно через 5 минут после включения.

Типы ламп с зажигательным электродом с помощью соответствующего зажигательного аппарата одинаково зажигаются в холодном и теплом состоянии.

КСЕНОНОВЫЕ ЛАМПЫ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ НЕПРЕРЫВНОГО СВЕЧЕНИЯ

Специалисты цветной микрофотографии называют ксеноновые лампы высокого давления, дающие непрерывное свечение и разработанные в последние годы, источниками света будущего. Это объясняется тем, что их спектральный цветовой состав (рис. 25) подобен таковому дневного света.

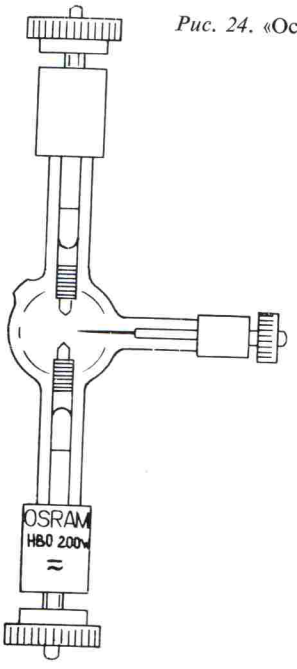


Рис. 24. «Осрам НВО 200 вт» — ртутная лампа высокого давления

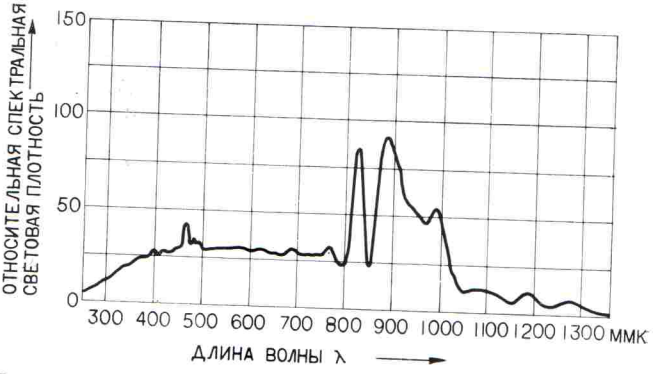
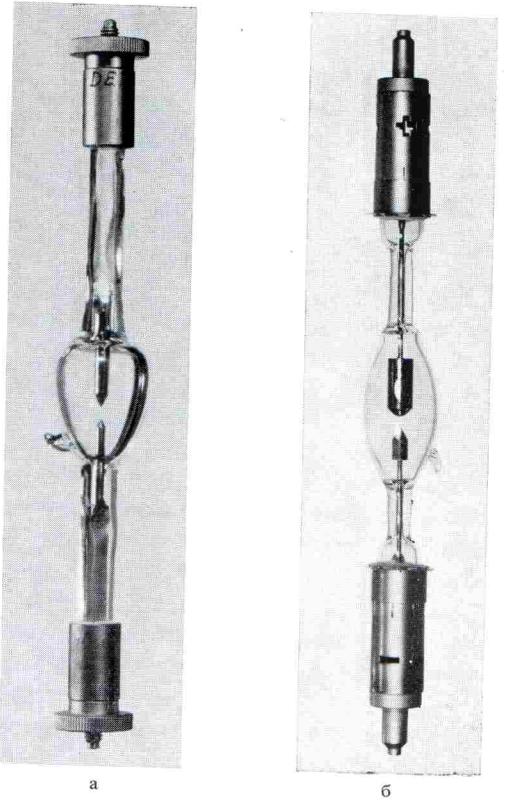


Рис. 25. Относительное спектральное распределение энергии «Осрам ХВО 900 вт»—ксеноновой лампы высокого давления



а б

Рис. 26. Ксеноновые лампы Филипс высокого давления
а) «CSX 150 вт» б) «CSX 900 вт»

Цветовая температура этих ламп равна 6000°К и при наличии колебаний напряжения она не изменяется. С развитием технологии производства ламп срок их службы достигает 1500—1800 часов. Их световая плотность очень высокая. Например, 57 000 cd/см^2 для 1600 вт-ного типа. Известны ксеноновые лампы с короткой и длинной дугой.

Ксеноновые лампы «Осрам» типа XBO изготовляются мощностью в 450 вт, 900 вт, 1600 вт. Распространенные типы Филипс: CSX 150 вт (рис. 26,а), CSX 450 вт, CSX 900 вт (рис. 26,б), CSX 1600 вт.

Мощные длиннодуговые ксеноновые лампы можно питать как переменным, так и постоянным током.

КСЕНОНОВЫЕ МИКРОИМПУЛЬСНЫЕ РАЗРЯДНЫЕ ТРУБКИ

Микроимпульсные разрядные лампы, разработанные исключительно для микроскопических исследований, располагают наиболее благоприятными свойствами вышеизложенных ксеноновых ламп. Они не дают непрерывного свечения, так как работают с интервалами в несколько секунд между отдельными вспышками.

ОСВЕТИТЕЛЬНОЕ УСТРОЙСТВО МИКРОСКОПА

Осветительное устройство микроскопа должно удовлетворять следующим требованиям:

1. обеспечивать свет достаточной интенсивности для исследования объекта;
2. источник света должен быть, по возможности, точечным, равномерного светораспределения, а также постоянной цветовой температуры;
3. соответствующая система линз (коллектор) должна быть помещена впереди светового источника для проекции изображения источника света в плоскость апертурной диафрагмы;
4. должно располагать полевой диафрагмой постепенно изменяемого диаметра;
5. должно обеспечить возможность помещения фильтра или матового стекла между коллектором и полевой диафрагмой;
6. во избежание теплового повреждения исследуемого объекта необходимо эффективное охлаждение лампы. В окружающую среду должно попадать как можно меньше рассеянного света;
7. если осветительное устройство не смонтировано вместе со штативом микроскопа, оно должно быть приспособлено для установки и закрепления в вертикальном, горизонтальном и в промежуточных направлениях.

Если осветительная аппаратура соответствует перечисленным условиям, ее можно применять и для осуществления принципа освещения по Кёлеру.

Микроскопные лампы со штырьками крепятся к штативу микроскопа, и часть их может питаться непосредственно от сети (рис. 27). Они подходят при менее точных исследованиях и для изготовления снимков слабого увеличения.

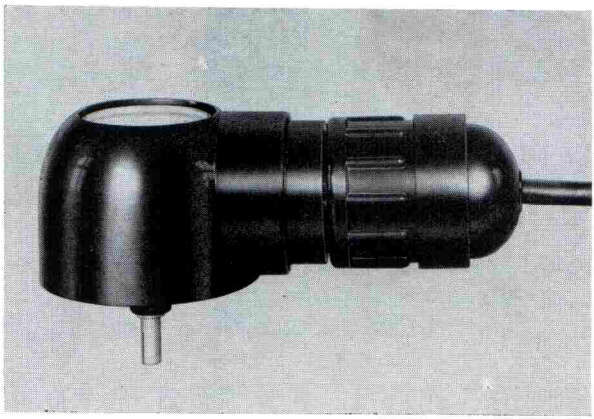


Рис. 27. Микроскопная лампа со штырьками, питающаяся непосредственно из сети, — выпускает К. Цейс (Оберкохен)

Наиболее часто используемые виды светильников имеют маломощные лампы накаливания и питаются низковольтным напряжением. Корпус светильника некоторых типов можно регулировать по вертикали, вперед — назад и закреплять в желаемом положении. Другие типы со штативом микроскопа дают жесткую связь. Небольшое изменение положения корпуса светильника возможно и в этом случае; они снабжены коллекторной линзой, ламповой диафрагмой, а также фильтродержателем.

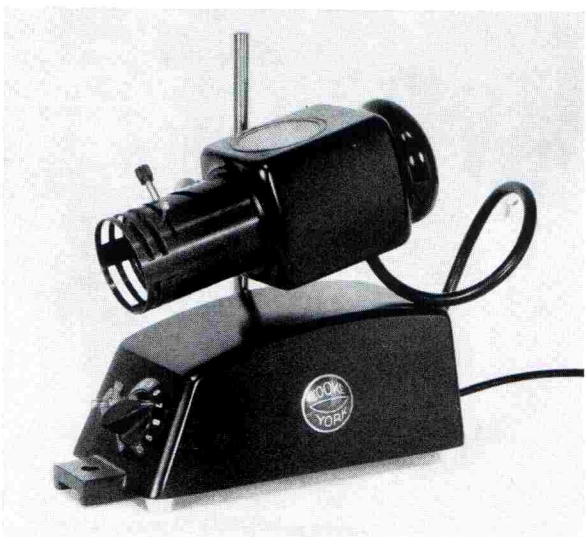
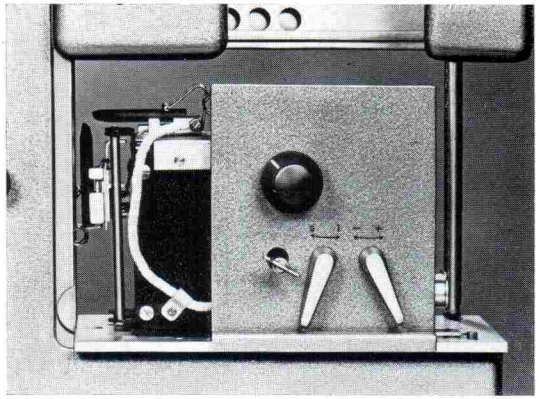


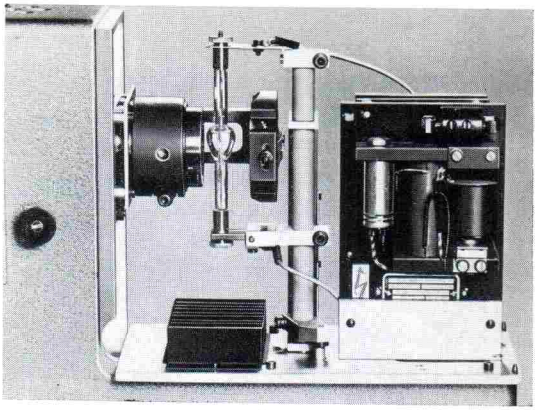
Рис. 28. Мощная лампа. Выпускает Кук, Трогтон и Симс. В корпусе находится трансформатор, регулятор интенсивности света и включатель

Мощные (12 в и 100 вт) микроскопные светильники, питающиеся током низкого напряжения, пригодны для исследований, требующих достаточного количества света. Они особенно рекомендуемы для целей цветной микрофотографии, так как их цветовая температура согласуется с цветовой чувствительностью обычно применяемых пленок для искусственного света.

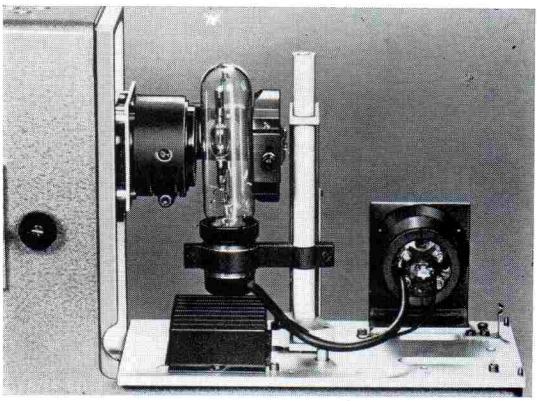
Низковольтные лампы подключатся в сеть переменного тока обычно через трансформатор. В случае необходимости через реостат лампы могут



а



б



в

Рис. 29. Осветительное устройство камерного микроскопа «Панфот» — выпускает Э. Лейц (Вецлар):
а) угольная дуговая лампа;
б) ксеноновая лампа «HBO 162»;
в) ртутная лампа высокого давления «CSO 150»

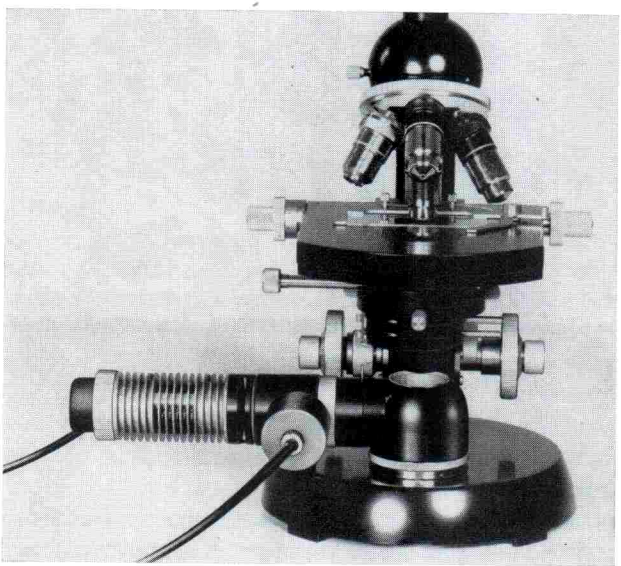


Рис. 30. Микроимпульсный аппарат, обеспечивающий проходящий свет — выпускает К. Цейс (Оберкохен)

питаться и постоянным током, но такого рода работа ламп не является экономной. Свет ламп может быть усилен или ослаблен при помощи трансформатора, регулирующего напряжение (рис. 28). В цветной фотографии очень важно поддерживать заданные напряжение и цветовую температуру. Ошибки, возникающие от большого колебания напряжения сети, можно устранить с помощью автоматически работающего трансформатора, регулирующего напряжение.

Корпус светильника, обеспечивающий универсальную возможность освещения, характеризует устройство «Панфот» производства Э. Лейц (Вецлар). Кроме лампы 12 в, 60 вт, он может работать с угольной дуговой лампой (рис. 29,а), ксеноновой лампой (рис. 29,б) и ртутной лампой высокого давления (рис. 29,в).

При применении ксенонового микроимпульсного устройства для установления микроскопического объекта служит низковольтная лампа накаливания, помещенная в общий с импульсной трубкой, наполненной ксеноном, корпус светильника. Ксеноновые микроимпульсные лампы могут быть использованы для целей освещения как проходящим (рис. 30), так и падающим светом. Поскольку уже при мощности в 60 вт время экспозиции достигает 1/2000 сек, становится возможным изготовление и цветных фотографий движущихся объектов при сильном увеличении. Во время последовательной съемки 20—25 снимков рекомендуется делать перерыв приблизительно в одну минуту.

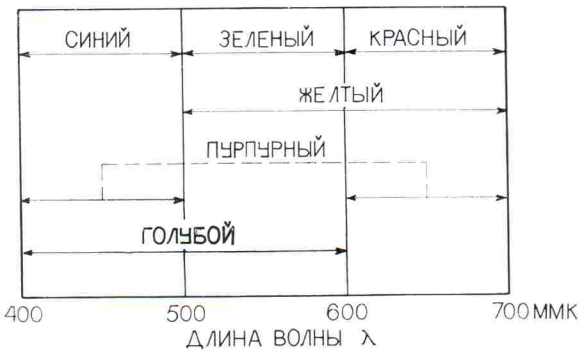
ФИЛЬТРЫ

В практике цветной микрофотографии фильтры применяются во время съемки, а также в процессе обработки. Цветные фильтры пропускают лучи, цвет которых соответствует цвету фильтра, а лучи дополнительных цветов ими поглощаются.

Так называемый белый свет в действительности представляет собой смесь различных цветов с различной длиной волны (рис. 31). В практике цветных фотохимических процессов важно знать три основных цвета (синий — прибл. 400—500 ммк, зеленый — прибл. 500—600 ммк и красный —



Рис. 31. Белый свет может быть разложен на различные цвета. Волновая длина излучений, соответствующих отдельным цветам, также различна. (Взято из брошюры Геверта)



могут быть представлены их связью с основными цветами и длинами волн. Желтый — дополнительный цвет синего, пурпурный — зеленого, а голубой — красного. (Взято из брошюры Геверта)

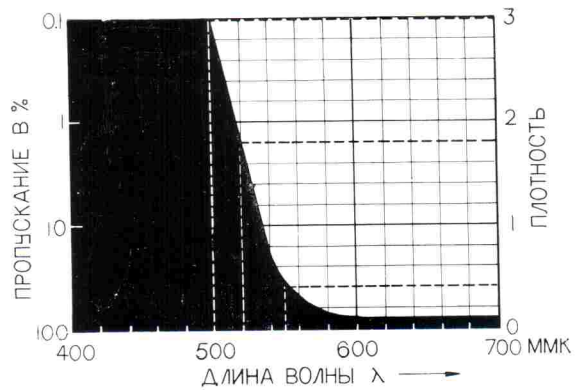


Рис. 33. Кривая пропускания цветного фильтра, который полностью абсорбирует фиолетовый и синий, частично поглощает зеленый, а желто-зеленый, желтый, оранжево-красный и красный полностью пропускает. На абсциссе отложена длина волны, на ординате — величины проницаемости в процентах. С графика можно считать и данные оптической плотности. (Взято из брошюры Геверта)

прибл. 600—700 ммк), а также цвета, их дополняющие (желтый, пурпурный и голубой) (рис. 32).

Более наглядным, чем перечисление в таблице данных, характеризующих свойства отдельных видов фильтров, является графическое изображение спектрального пропускания различных типов. Длина волн в ммк отложена на оси абсцисс, а величина пропускания в процентах — на оси ординат (рис. 33).

При микрофотографировании фильтры обычно располагаются между коллектором источника света и конденсором.

Фильтры должны быть защищены от излишних механических нагрузок, чрезмерного тепла и действия света, а также от пыли и прочей грязи.

КОМПЕНСАЦИОННЫЕ СВЕТОФИЛЬТРЫ

Компенсационные светофильтры предназначаются для создания согласованности между различными источниками света и цветными фотоматериалами.

Пленки для искусственного света изготовляются для фотографирования объектов, освещенных светом, цветовая температура которого равна 3200—3400°К, тогда как пленки для дневного света используются для цветовой температуры в 5500—6000°К. Источники света, применяемые для микроскопов, дают свет с цветовой температурой 2800—6000°К. Цветовая температура света, излучаемого наиболее широко используемыми низковольтными лампами, равна 2850—3200°К. При таком источнике света, применяя пленку для дневного света, снимки показывают слишком «теплые» цвета, отличающиеся от действительности, подобно тому, как если бы эти цвета рассматривались через оранжево-красный фильтр (цветн. иллюстр. II/1). Наоборот, используя источник света более высокой цветовой температуры (например, ксеноновую лампу), съемка делается на пленку для искусственного света; полученные изображения будут слишком «холодных» цветовых тонов, как будто бы цвета, существующие в действительности, рассматривались через зеленовато-синий фильтр (цветн. иллюстр. II/3). С помощью компенсационных фильтров можно устранить упомянутые цветовые сдвиги (цветн. иллюстр. II/2, 4). Различного производства компенсационные фильтры теперь имеют международные обозначения величинами Mired (M) и Decamired (DM).

Таблица II

Конверсия источников света с цветовой температурой 2490—4140°К посредством фильтров Кодак Вратten

Цвет	№ фильтра Кодак Вратten	Фактор	Цветовая температура источника света		Значения в Mired
			Изменив на 3200°К	Изменив на 3400°К	
Синеватый	82C + 82C	1 1/3	2490	2610	—89
	82C + 82B	1 1/3	2570	2700	—77
	82C + 82A	1	2650	2780	—65
	82C + 82	1	2720	2870	—55
	82C	2/3	2800	2950	—45
	82B	2/3	2900	3060	—32
	82A	1/3	3000	3180	—21
	82	1/3	3100	3290	—10
фильтр не обязателен		—	3200°К	3400°К	—
Оранжевый	81	1/3	3300	3510	9
	81A	1/3	3400	3630	18
	81B	1/3	3500	3740	27
	81C	1/3	3600	3850	35
	81D	2/3	3700	3970	42
	81EF	2/3	3850	4140	52

Комплект компенсационных фильтров производства Агфа (Вольфен), состоит из 4 синих и 4 коричневато-красных фильтров. Набор фильтров другого производства содержит оранжево-красные, а также синие фильтры.

В практике цветной микрофотографии нужно рассчитывать не только на упомянутые крайние случаи. Наиболее часто встречающуюся проблему представляет собой согласование более тонких, чем описанные, различий в цветовой температуре.

Наиболее распространенным источником света при микрофотографировании является лампа накаливания, питающаяся током низкого напряжения. Цветовая температура лампы 6 в 15 вт — 2850°К (35 DM), а 12 в 100 вт — 3200°К (31 DM). Пленки для искусственного света различного производства изготовляются для цветовой температуры 3200—3400°К. Так как у упомянутых ламп цветовая температура может изменяться и в зависимости от напряжения, согласование цвета источника света и используемого цветного фотоматериала часто становится важной задачей.

Превращение варьирующей между 2490 и 4140°К цветовой температуры источников света в 3200—3400°К может быть произведено с помощью фильтров Кодак Вратten (таблица II).

СЕЛЕКТИВНЫЕ СВЕТОФИЛЬТРЫ

Согласно предназначению, они изолируют или задерживают определенной длины волны лучи спектра источника света. Возбуждающие и заграждающие фильтры (см. таблицу VI), относящиеся к группе селективных светофильтров, чаще всего применяются при флуоресцентной микроскопии. Кроме оранжевого и желтого фильтров, используемых в практике флуоресцентной микроскопии, существуют и практически бесцветные УФ фильтры. В интересах защиты исследуемого объекта, а также линз микроскопа от вредного воздействия тепла впереди светового источника с интенсивной тепловой радиацией помещается теплозащитный фильтр и фильтр, абсорбирующий инфракрасные лучи.

Из теплозащитных фильтров наиболее широко распространены виды бледно-зеленого цвета в тонком слое. Поглощением длинноволновой части спектра они задерживают тепловые лучи, однако видимые лучи пропускаются ими почти без потерь; в то же время сами они нагреваются. Это

→

Рис. 1. Обзорный снимок, изготовленный простым микроскопом. *Объект:* 6-недельный человеческий эмбрион. *Окрашивание:* толуидин синий. *Объектив:* Микротар 6,3/90; нум. ап. 0,08. Увеличение = 7 : 1. *Фотоматериал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17».

Рис. 2. Снимок малого увеличения, выполненный простым микроскопом. *Объект:* 6-недельный человеческий эмбрион. *Окрашивание:* толуидин синий. *Объектив:* Микротар 3,2/20; нум. ап. 0,15. Увеличение = 20 : 1. *Фотоматериал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17»



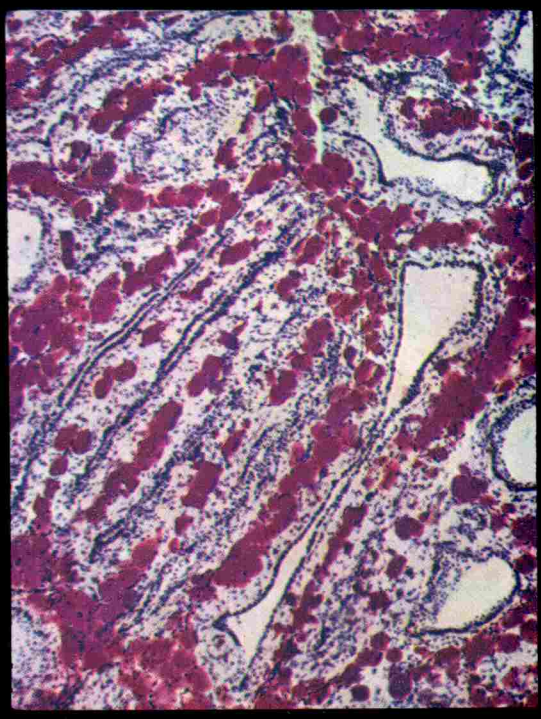
1



2



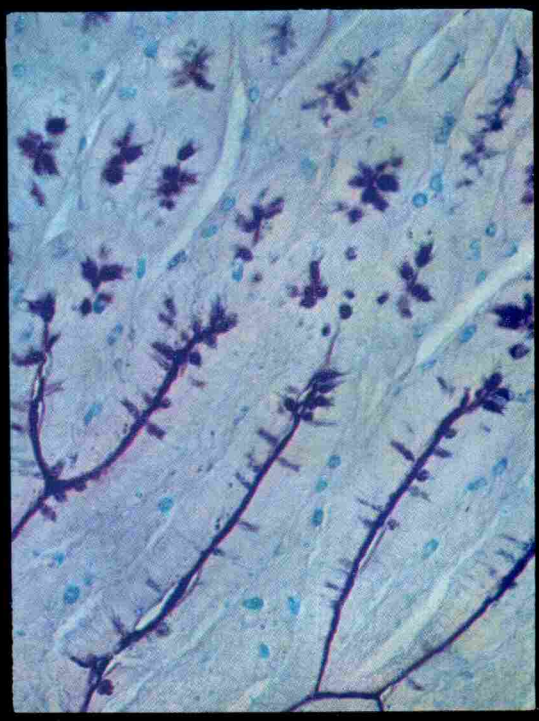
1



2



3



4

нагревание иногда может быть довольно значительным, поэтому теплопоглощающее стекло рекомендуется поместить в наполненную дистиллированной водой кювету. Существуют и жидкостные теплозащитные фильтры,

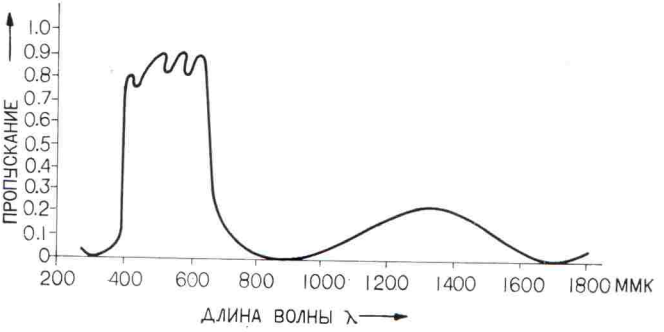


Рис. 34. Кривая пропускания теплофильтра «Кальфлекс» — выпускает Бальцерс, Лихтенштейн

среди которых водный раствор сульфата меди (несколько %-ный) абсорбирует 80—90% тепловых лучей.

Интерференционный теплозащитный фильтр «Кальфлекс» дает лучший эффект, чем предыдущие. Он не поглощает тепловых и ультрафиолетовых лучей, а отражает их, в результате чего сам нагревается незначительно. Видимые лучи спектра, за исключением длинноволновых красных, им пропускаются (рис. 34).

НЕЙТРАЛЬНО-СЕРЫЕ СВЕТОФИЛЬТРЫ

Нейтрально-серые фильтры применяются для смягчения световой интенсивности без изменения цветовой температуры. В практике цветной микрофотографии значение серых фильтров намного больше, чем их распространенность. Известно, что даже обладающие опытом «специалисты» делают ошибку, поддерживая время экспозиции на том же уровне путем изменения апертурной диафрагмы в каждом отдельном случае. Это, естественно, противоречит принципу освещения по Кёлеру, согласно которому диаметр

←

Рис. 1—4. Микроснимки среднего увеличения.

Рис. 1. Объект: почка. *Окрашивание:* азан. *Объектив:* планапохромат 10/0,32. Увеличение = 140 : 1. *Фотоматерал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17»

Рис. 2. Объект: щитовидная железа (амилоидоз). *Окрашивание:* Dahlia. *Объектив:* планапохромат 10/0,32. Увеличение = 70 : 1. *Фотоматериал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17M»

Рис. 3. Объект: кожа головы. *Окрашивание:* по методу Ван—Гизона и малахитовый зеленый. *Объектив:* планапохромат 10/0,32. Увеличение = 80 : 1. *Фотоматериал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17»

Рис. 4. Объект: тонкий кишечник. *Окрашивание:* ШИК-реакция с световым зеленым. *Объектив:* планапохромат 25/0,65. Увеличение = 200 : 1. *Фотоматериал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17»

апертурной диафрагмы зависит не от яркости освещения, а частично от используемых оптических условий, частично же от характера объекта. Соответственно этому, для выдерживания времени экспозиции в пределах определенного диапазона единственно правильной возможностью в практике цветной микрофотографии является применение серых фильтров.

Для цветной микрофотографии важно требование, чтобы используемые серые фильтры были действительно нейтрально-серыми. Если спектрофотометрическая кривая (кривая пропускания) такого фильтра — прямая линия, то это значит, что фильтр совершенно не имеет цвета.

Таблица III

Комбинационные возможности серых фильтров с 3, 12 и 50%-ной проницаемостью (выпускает К. Цейс, Оберкохен)

Комбинация фильтров D	Проницаемость %	Фактор, удлиняющий время экспозиции
50	50	2x
50 + 50	25	4x
12	12	8x
12 + 50	6	16x
3	3	32x
3 + 50	1,5	64x
3 + 50 + 50	0,75	128x
3 + 12	0,375	256x
3 + 12 + 50	0,185	512x
3 + 12 + 50 + 50	0,095	1024x

Наиболее современные серые фильтры — неокрашенные стекла или желатиновая фольга — представляют собой металлические слои различной толщины, нанесенные на стекло. Такого типа фильтры изготовляет фирма К. Цейс (Оберкохен). Их проницаемость составляет 3, 12 и 50%, что обеспечивает возможность различных комбинаций (таблица III).

ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЕ СВЕТОФИЛЬТРЫ

За счет своей «растровой» структуры поляризационные фильтры пропускают свет только в определенном направлении (см. рис. 77). Современные поляроиды изготовляются из органического материала, состоящего из длинных палочковидных молекул. Когда два поляроида идентичной ориентации помещены один на другой, они только слегка ослабляют проходящий свет (верхняя пара фильтров на рис. 35). Однако после поворота одного из фильтров на 90° в так называемую «перекрестную позицию» свет, поляризованный первым фильтром, уже не проходит через второй (нижняя пара

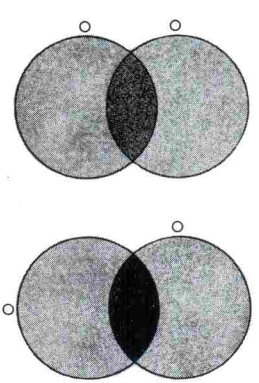


Рис. 35. Идентично ориентированные и скрещенные поляризационные фильтры

фильтров на рис. 35). Поляризующие фильтры чаще всего применяются при поляризационных оптических (поляризационный микроскоп) методах. Их используют также и для понижения световых рефлексов у микроскопов с верхним освещением. Были попытки использовать эти фильтры и для ослабления света. В этом случае поворотом одного из двух поляроидов, помещенных перед лампой микроскопа, можно достичь постепенного ослабляющего эффекта.

ИНТЕРФЕРЕНЦИОННЫЕ ФИЛЬТРЫ

Интерференционные фильтры обладают разрешающей способностью высокой степени. В противоположность другим видам фильтров, подлежащие устранению лучи ими не поглощаются, а вследствие интерференции гасятся. По мере изменения угла металлических интерференционных фильтров, закрытого оптической осью, в процессе использования изменяется и проницаемость фильтров. Одновременно с этим изменяется и спектральный состав пропущенного света. В практике цветной микрофотографии при применении источников света, вырабатывающих большое количество тепла, может быть успешно использован теплозащитный фильтр «Кальфлекс» (см стр. 49).

ЛУПА И ПРОСТОЙ МИКРОСКОП

Две точки воспринимаются глазом раздельно, если угол между двумя прямыми, проведенными из этих точек к глазу, больше 1'. Если исследуемый объект настолько мал, что на расстоянии приблизительно 10 см от глаза угол зрения не превышает 1', то для умеренной степени увеличения угла зрения применяют оптические системы малого увеличения, такие как лупы и простые микроскопы.

Конвенциональное расстояние или расстояние ясного видения, — это такое расстояние, при котором глаз с правильным преломлением света (эметроп) наиболее мелкие предметы, например буквы, способен воспринимать длительное время (с минимальным утомлением для глаза). Один из методов использования лупы заключается в том, что объект помещают между лупой и ее фокусной точкой на таком расстоянии, чтобы получить мнимое изображение, создаваемое лупой на конвенциональном расстоянии от глаза — 250 мм (рис. 36).

Другой способ исследования или фотографирования увеличенных лупой или с помощью соответственно исправленных систем собирательных линз предметов состоит в том, что объект помещают между одинарным и двойным фронтальными фокусными расстояниями линзы. В этом случае можно получить перевернутое действительное увеличенное изображение за задним

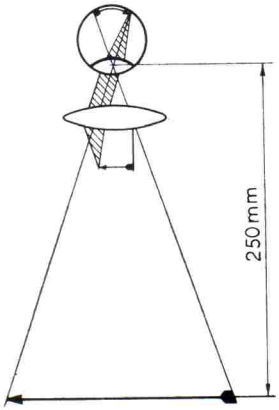


Рис. 36. Ход лучей в лупе

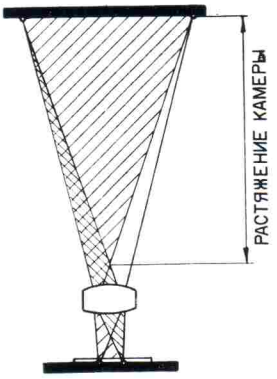


Рис. 37. Ход лучей в простом микроскопе

двойным фокусным расстоянием линзы. Устройство, действующее по последнему методу, называется простым микроскопом (рис. 37).

Определение увеличения микроснимка в случае простого микроскопа:

$$У = \frac{К}{f},$$

где К — длина оптической камеры (расстояние между задним фокусом лупы и изображением или фотоматериалом), мм;

f—фокусное расстояние лупы, мм.

На практике для целей фотографирования простым микроскопом используют специальные микроанастигматы.

СЛОЖНЫЙ МИКРОСКОП. ПОЛЕЗНОЕ И БЕСПОЛЕЗНОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ

Простой микроскоп не дает удовлетворительного результата при увеличении, большем, чем приблизительно 30:1. В таком случае прибегают к сложному микроскопу. И хотя вытекающие из свойства света волновые оптические условия ограничивают и увеличение сложного микроскопа, все-таки с его помощью так называемое полезное увеличение возможно в отношении приблизительно 1300:1.

С точки зрения формирования изображения сложный микроскоп может рассматриваться как двуступенчатая увеличительная система, состоящая из двух оптических единиц (объектив и окуляр), (рис. 38,а и б). Свет направляется зеркалом или призмами через конденсор на объект. Объектив «Об'» (в соответствии с так называемой оптической тубусной длиной) проектирует увеличенное перевернутое изображение «О'» объекта «О» на опреде-

ленном расстоянии от задней фокусной плоскости объектива. «О'» называется действительным промежуточным изображением. Величина возникшего изображения является постоянной в случае данной механической тубусной длины (расстояние между гнездом объектива и прилегающей плоскостью окуляра). Увеличение объекта представляет собой частное величины изображения, полученного указанным путем, и величины объекта, например, 20 : 1. Промежуточное изображение «О'» дальше увеличивается окуляром «ОК». Визуальное наблюдение изображения или его проекция на фотоматериал при фотографировании осуществляется через окуляр. Подобно лупам, окуляры обозначаются их индивидуальным увеличением.

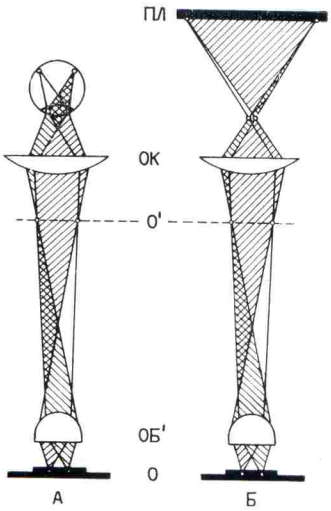


Рис. 38. Ход лучей в сложном микроскопе
А) визуальное наблюдение,
Б) фотографирование

Общее увеличение сложного микроскопа:

$$У_{Микр.} = У_{Об'} \cdot У_{Ок},$$

например $У_{Микр.} = 20 \cdot 10 = 200$

где $У_{Микр.}$ — общее увеличение микроскопа,
$У_{Об'}$ — увеличение объектива,
$У_{Ок}$ — индивидуальное увеличение окуляра.

На практике между объективом и окуляром могут быть расположены тубусные линзы, например, у «Оптовар» (см. стр. 19), или соответственно различным бинокулярным тубусам, системы призм. В таком случае еще один фактор должен быть использован для умножения результата.

Вышеприведенная формула действительна только в том случае, если используемая оптическая камерная длина (расстояние между выходным зрачком окуляра и фотоматериалом) составляет 250 мм. Так как, однако, оптическая камерная длина наиболее часто используемых для целей микрофотографирования малоформатных камер меньше 250 мм — часто равна половине (125 мм) или одной трети (83 мм), — необходимо принимать во внимание камерный фактор (К) 0,5 или 0,3 (соответственно).

$$У_{Микр.} = У_{Об'} \cdot У_{Ок} \cdot \frac{К}{250}$$

Применяя в указанной формуле, например, обозначенный через 20 : 1 объектив, окуляр, маркированный 10 ×, и камерную длину 125 мм, получим:

$$У_{Микр.} = 20 \cdot 10 \cdot \frac{125}{250} = 20 \cdot 10 \cdot 0{,}5 = 100.$$

Разрешающую силу объективов можно оптимально использовать при условии, если увеличение микроскопа больше апертуры используемого объектива в 500—1000 раз. Выходящие за этот предел новые детали уже не появляются на изображении. Увеличение в пределах указанных выше границ известно как полезное.

Кроме объектива на размеры увеличения влияют еще следующие факторы:

а) индивидуальное увеличение окуляра,
б) длина тубуса,
в) длина меха камеры,
г) возможное повторное (конечное) увеличение снимка.

Целесообразно всегда использовать объектив максимальной силы и дальнейшее увеличение обеспечивать (в границах полезного увеличения) за счет возможностей перечисленных в пунктах а, в, г.

Увеличение, которое выходит за пределы полезного увеличения, называется бесполезным увеличением. Всегда следует указывать линейное увеличение снимков. Согласно международно принятому обозначению, например, масштаб снимка: У = 650 : 1.

МИКРОФОТОГРАФИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Имеющиеся в употреблении аппараты для микрофотографирования обычно предназначены для изготовления негативов размером 24 × 36 мм, 6,5 × 9 см или 9 × 12 см. Негативы малых размеров в практике цветной фотографии имеют больше преимуществ, чем в черно-белой микрофотографии. Для этого имеются многочисленные причины. Среди различных цветных фотоматериалов в торговле наибольший выбор имеется по размеру 24 × 36 мм. Стоимость малоформатных цветных пленок значительно ниже, чем таковая у фотоматериалов больших размеров. Малые размеры позволяют значительно сократить время экспозиции в процессах, требующих много света (например при флуоресцентном микрофотографировании). Аппаратом малоформатной пленки можно быстро производить последовательные снимки, тогда как при применении плоских пленок и пластинок работать труднее. Обработка цветных фотоматериалов — процесс, требующий многих часов и большого внимания. В условиях небольшой лаборатории за то же время можно обработать больше негативов малого формата.

В противоположность перечисленным преимуществам, бесспорно то, что с помощью негативов больших размеров можно достичь качественно лучшего результата. Увеличение с малоформатной пленки едва ли можно сравнить с контактной копией плоской пленки 9 × 12 см. Вот почему жела-

тельно применять негативы больших размеров для снимков специальной темы, размножающихся типографским способом, однако, цветной снимок, технически правильно выполненный на фотоматериале хорошего качества, размером 24 × 26 мм, может удовлетворить высокие требования.

Известны многочисленные виды микрофотографической аппаратуры, начиная от насадочной камеры и кончая автоматически фотографирующим камерным микроскопом. Если на микроскоп поместить коробку, выкрашенную внутри черным, на дне которой вырезано соответственно окуляру круглое отверстие, а на вершину поместить матовое стекло, то на последнем появится изображение объекта, установленного на микроскопе. Так как «прибор» лишен затвора, освещение фотоматериала, установленного вместо матового стекла, осуществляется в затемненной комнате включением и выключением источника света микроскопа. Вследствие своей примитивности этот метод (рис. 39) едва ли можно рекомендовать даже для изготовления черно-белой микрофотографии, его изложение преследует цель дать схему практического хода микрофотографирования.

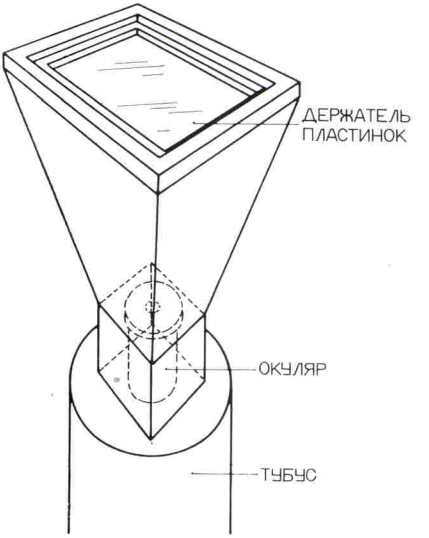


Рис. 39. Простой аппарат для микрофотографии

ЗЕРКАЛЬНЫЕ КАМЕРЫ

Из зеркальных фотоаппаратов типами со сменными объективами и общими тубусами («Контафлекс», «Контакс Д», «Экзакта», «Лейкафлекс», «Практина», «Практисикс» и др.) можно изготовлять микроснимки, используя при этом простые вспомогательные средства.

Во время микросъемки применяют камерный каркас без объектива, хотя можно изготовить снимок и через объектив, установленный на бесконечность. При самом простом способе на место удаленного камерного объектива фотоаппарата помещают винтовую или байонетную соединительную часть микротубуса, состоящую из промежуточных колец.

При фотографировании наклонный или бинокулярный тубус микроскопа целесообразно заменить фототубусом, на котором помещением окуляра монтируется промежуточное кольцо. Существуют способы, которые обеспечивают моно- или бинокулярное наблюдение в случае применения камеры, смонтированной на микроскопе, и в момент экспозиции. При выборе окуляра необходимо принимать во внимание точки зрения, изложенные в

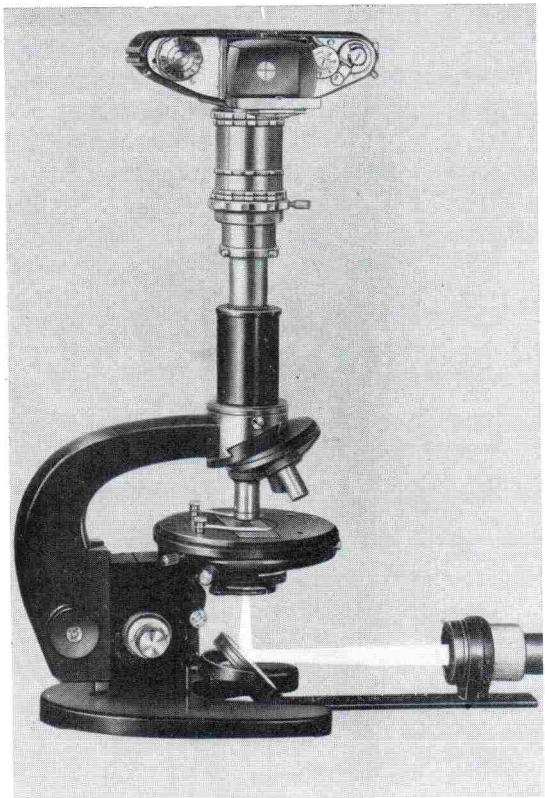


Рис. 40. «Экзакта Варекс» — выпускает Ихаге (Дрезден). В видоискателе круглое прозрачное поле с перекрестом из нитей, облегчающим установку. Посредством помещения микротубуса непосредственно присоединяется к тубусу микроскопа производства К. Цейс (Йена)

соответствующей главе (см. стр. 18). Наводка изображения на резкость происходит на матовом стекле камерного видоискателя. Для рассматривания полученного таким путем изображения служит лупа среднего увеличения. Наблюдение микроскопического препарата более тонкой структуры может быть затруднено при применении матового стекла грубой зернистости. При большом увеличении полученное на матовом стекле изображение обычно недостаточно ярко. Поэтому желательно использовать такое матовое стекло, в центре которого имеется округлый прозрачный участок диаметром в несколько мм. На этом участке (в целях наводки на резкость независимо от аккомодационной способности глаза) можно видеть перекрест нитей (рис. 40). Посредством используемой лупы должны быть сфокусированы вначале перекрещивающиеся нити, затем наводится на резкость появляющееся через округлый прозрачный участок так называемое «воздушное изображение». Матовая часть видоискателя используется в этом случае для контроля за областью изображения.

Определенные трудности может причинить то обстоятельство, что во время экспозиции из-за раскрывающегося зеркала нет возможности непрерывно видеть микроскопическое изображение. Раскрытие может вызвать и вибрацию.

Зеркальные камеры могут быть использованы в некоторых вариантах микрофотографических методов, которые будут рассмотрены в дальнейшем. В этих случаях они имеют значение только как механизмы, принимающие и наматывающие пленку, а для установки изображения служит не зависящая от аппарата система видоискателя.

НАСАДОЧНЫЕ КАМЕРЫ

Насадочные камеры являются широко распространенным при микрофотографировании вспомогательным средством и представляют собой легко управляемое устройство малых размеров и веса (рис. 41). Они монтируются непосредственно на микроскоп и не требуют отдельного штатива. Их камерная длина чаще всего постоянна и обычно составляет половину или одну треть от конвенционального расстояния зрения, то есть 125 или 83 мм. Обычно они снабжены затвором компур и с помощью различных колец могут быть прилажены к разным фотоаппаратам. Резкость изображения, установленная посредством их видоискателя, гарантирует резкость снимка и в плоскости фотоматериала. У камер этого типа на пути лучей, проектирующих изображение, устанавливается или постоянно встроенная камерная призма (частично пропускающая лучи в направлении фотоматериала, а частично отражающая их в направлении видоискателя), или откидывающиеся в момент экспозиции призма или зеркало. В видоискателе, установленном перпендикулярно относительно оптической оси, изображение можно видеть через лупу, реже — на матовом стекле. Наводка на резкость не должна зависеть от аккомодационной способности глаза. Насадочные камеры обеспечивают это таким образом, что перед экспозицией с помощью так называемого диоптрического кольца можно видеть в видо-

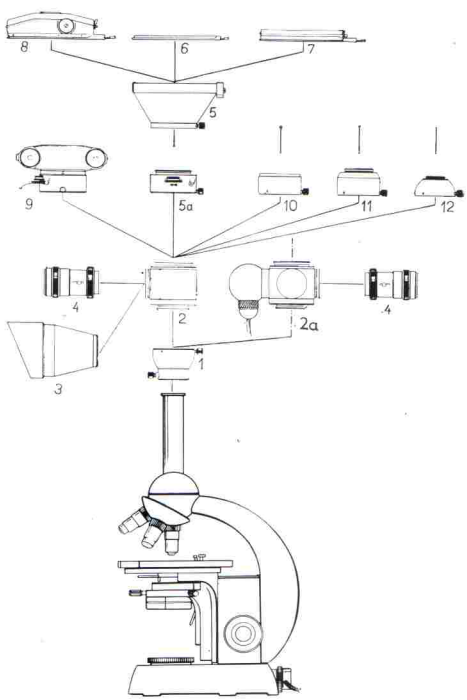


Рис. 41. Основные составные части насадочной камеры (выпускает К. Цейс, Оберкохен):

1. кольцо для соединения тубуса
2. корпус I
2,а. корпус II
3. насадка с матовым стеклом для наблюдения
4. окуляр для наводки на резкость
5. микрофотонасадка 6,5 х 9 см
5,а. затвор
6. кассета для пластин
7. кассета для фильмпака
8. кассета для катушечной пленки
9. малоформатная пленочная камерная насадка
10, 11, 12. соединительные насадки для камер «Контакс», «Лейка» и «Робот»

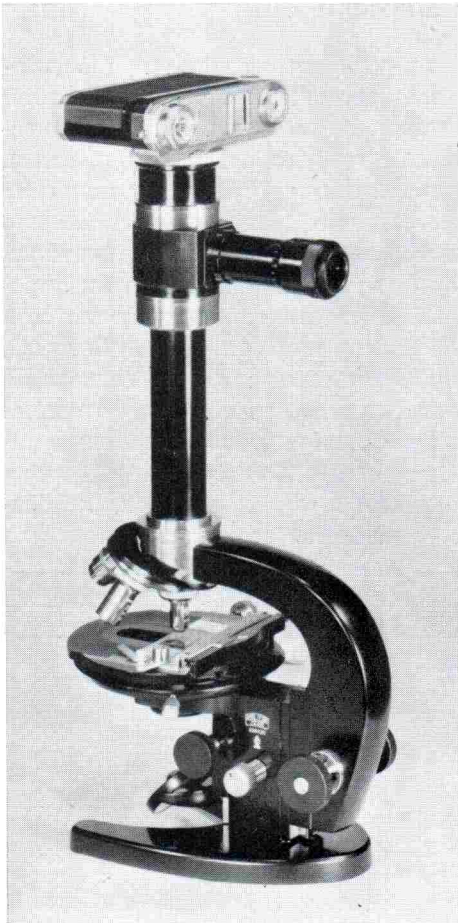


Рис. 42. Насадочная микрофотокамера «MF», смонтированная на микроскопе «Lg» — выпускает К. Цейс (Йена)

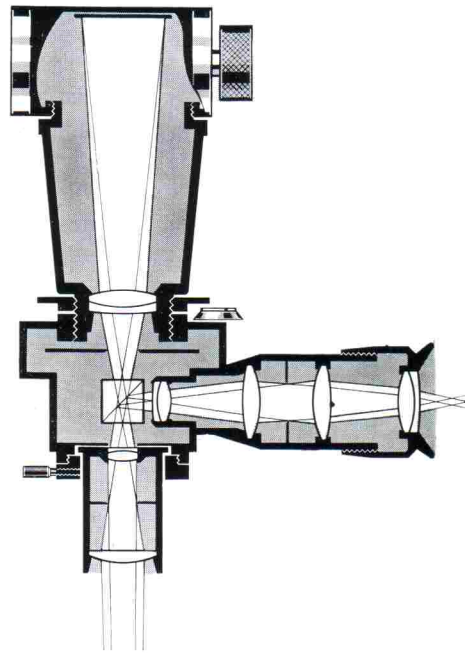


Рис. 43. 24 × 36 мм микрофотонасадка «Микас» — выпускает Э. Лейц (Вецлар). Схема поперечного сечения насадки и хода лучей

искателе начерченные крест или сетку, которые наводятся на резкость, и только потом — микроскопическое изображение. В видоискателях, снабженных фиксированной призмой, на пути проектирующих лучей помещают такие две, одна с другой склеенные 45°-ные призмы, на соприкасающиеся поверхности которых наносится тонкий металлический слой, частично пропускающий свет. В этом случае большая часть проектирующего пучка лучей проецируется в направлении светочувствительного фотоматериала, меньшая часть — в перпендикулярном относительно оптической оси направлении, то есть в направлении видоискателя. Преимущество изложенного метода перед откидывающейся и полностью отражающей призмой или зеркалом заключается в том, что установленное изображение видимо и во время экспозиции. Недостаток метода состоит в том, что свет абсорбируется, и качество изображения несколько ухудшается

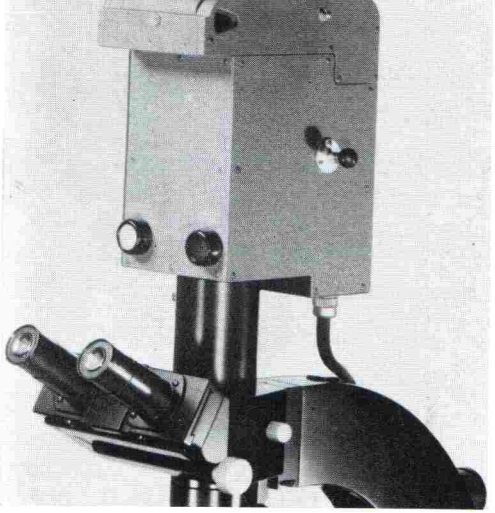


Рис. 44. Насадочная микрофотокамера «Ортомат» с автоматическим регулятором времени экспозиции, смонтирована на микроскопе «Ортолюкс». Выпускает Э. Лейц (Вецлар)



Рис. 45. Камера «J 66 Поларoид» для катушечной пленки с автоматическим электромагнитным затвором — выпускает «Викерс инструментс»

за счет того, что формирующие изображение лучи проходят через стеклянную призму.

Насадочная камера «MF» (рис. 42) фирмы К. Цейс (Йена) с помощью ее соединительных колец может быть соединена с малоформатными камерами различного производства. Кроме того, она пригодна еще и для приема пластинок пакфильма размером 6,5 × 9 см или роликовых пленок. Длина камеры «MF» — 125 мм. Три вида окуляров «Проектив», относящиеся к «MF», исправлены для этой камерной длины. Если числа, обозначающие окуляры «Проектив», нумерованные 2,5 : 1, 4 : 1, 6,3 : 1, помножить на увеличивающую силу примененного объектива, то получим масштаб увеличения снимка относительно кадра размером 24 × 36 мм. При использовании насадки в 6,5 × 9 см полученный результат нужно еще умножить на фактор 1,6.

При использовании микрофотографической насадки «Микас» производства Э. Лейц (Вецлар) в момент экспозиции призму можно сдвинуть с места с помощью двойного спускового затвора (рис. 43). Если призма остается на пути пучка лучей, то 25% света отражается в видоискателе. В этом случае время экспозиции, естественно, должно быть увеличено. «Микас» с камерой «Лейка» обеспечивает размер кадра 24 × 36 мм. Насадка «Макам»

той же фирмы Лейц дает кадры размером в 9 ×12 см. Фирма с упомянутой камерой при применении объективов с апертурой выше 0,3 рекомендует использовать окуляр «Периплан» 10×.

Комбинированная аппаратура фирмы Э. Лейц для установки изображения посредством зеркального приспособления позволяет наблюдение на матовом стекле, а через окуляр — в телескопическом визире.

Насадочная камера «Ортомат» производства Лейц рис. 44), комбинированная с регулятором времени освещения и соединенная с электрическим усилителем, совершенно автоматически измеряет и регулирует количество света, падающего на фотоматериал.

Аппаратом, комбинированным с поляроидной камерой (рис. 45), спустя одну минуту после экспозиции можно получить окончательный цветной отпечаток (см. стр. 140).

ВЕРТИКАЛЬНЫЕ КАМЕРЫ

Вертикальные камеры часто используются при микрофотографировании и в крупномасшабной съемке. Имеют следующие основные части: стойка из чугуна или твердых пород дерева, на которой у отдельных типов имеется винт, служащий для закрепления микроскопа и источника света. Камеру при помощи одного или нескольких держателей, смонтированных на стойке, можно двигать и закреплять в желаемом положении. Вертикальная камера состоит из части, служащей для приема фотоматериала, видоискателя, меха и затвора. Изложенные основные части могут работать горизонтально и вертикально. Вертикальное расположение более целесообразно, поэтому оно используется шире. Чаще всего изготовляются для кадров размером в 9 ×12 см, но известны и аппараты, работающие с малоформатным фотоматериалом. Поскольку длину камеры можно изменять в широких пределах, особенно при большом растяжении нужно устранить вибрацию, так как при работе затвора камеры микроскоп сотрясается. Амплитуда колебаний, возникающих в плоскости исследуемого объекта, в плоскости фотоматериала увеличивается точно так же, как и сам объект. Из-за упомянутой причины рекомендуется применение так называемой «светонепроницаемой манжеты», с помощью которой можно избежать «металлического» соединения между микроскопом и камерой (рис. 46). В связи с тем, что интенсивность освещения понижается пропорционально квадрату расстояния, у вертикальных камер (из-за большого растяжения) желательно использовать мощные микроскопные лампы. Установка резкости изображения может осуществляться посредством матового стекла, помещенного в плоскость фотоматериала или (у отдельных аппаратов) с помощью зеркального видоискателя. Фокусировка и резкость изображения до средней степени увеличения удобно контролируются изложенным методом. При более сильном увеличении наводка на резкость производится такими видоискателями, с помощью которых микроскопическое изобра-

жение может наблюдаться и через монокулярный или бинокулярный тубус. Вертикальные камеры пригодны и в макрофотографической работе.

С помощью устройства «Аристофот» фирмы Э. Лейц (Вецлар) в проходящем свете или при верхнем освещении можно удобно готовить снимки размером как 24 × 36 мм, так и 9 × 12 см.

Вертикальная камера «Стандард» производства Цейс, Йена (рис. 46) выпускается для кадров размером в 9 × 12 см, но с помощью специального держателя может быть оборудована и малоформатной камерой. Ее мощная (12 в, 100 вт) лампа обеспечивает интенсивное освещение. Изображение, с целью лучшего наблюдения, может проецироваться в монокулярный или бинокулярный тубус посредством призмы, устанавливающейся на пути хода лучей.

С помощью устройства «Vielzweckgerät» фирмы Ихаге (Дрезден) камера «Экзакта» может быть смонтирована на микроскоп для использования в качестве вертикальной камеры (рис. 47).

КАМЕРЫ-МИКРОСКОПЫ

Камеры-микроскопы являются наиболее совершенными микрофотографическими аппаратами. Новейшие типы, кроме микроскопа, источника света и камеры, оснащены еще автоматическим контрольным устройством, определяющим и регулирующим время экспозиции. С помощью встроенного источника света принцип освещения по Кёлеру осуществим легко и просто. Кроме ламп накаливания, питающихся током низкого напряжения, можно работать и со специальными источниками света. Наряду с обычными микроскопическими методами они применяются и для проведения специальных исследований.

Камера-микроскоп «Панфот» фирмы Лейц (Вецлар) обеспечивает прямой ход лучей от объектива до фотоматериала (рис. 48). Снимки могут изготавливаться одновременно с наблюдением через бинокулярный видоискатель. Соответствующее кадрирование изображения можно контролировать и в видоискателе, снабженном матовым стеклом. Для работы камеры-микроскопа «Панфот» могут быть использованы, кроме лампы 12 в и 60 вт, дуговой свет, ртутная и ксеноновая лампы (см. рис. 29). Нажав кнопку, на пути лучей можно расположить различные фильтры. С ними возможна съемка в проходящем и падающем свете, при освещении по методу светлого и темного полей, и они успешно применимы и для фазово-контрастного, поляризационного и флуоресцентного микрофотографирования. Снимки могут изготовляться на фотоматериале размером в 24 × 36 мм и 9 × 12 см; аппарат можно комбинировать и с насадочной камерой «Ортомат», снабженной автоматическим регулятором времени экспозиции.

Универсальный исследовательский микроскоп «Nu» производства Цейс (Йена), соединенный с микрофотографическим оборудованием «MF» и экспонометром, применяется для решения многосторонних задач (рис. 49).

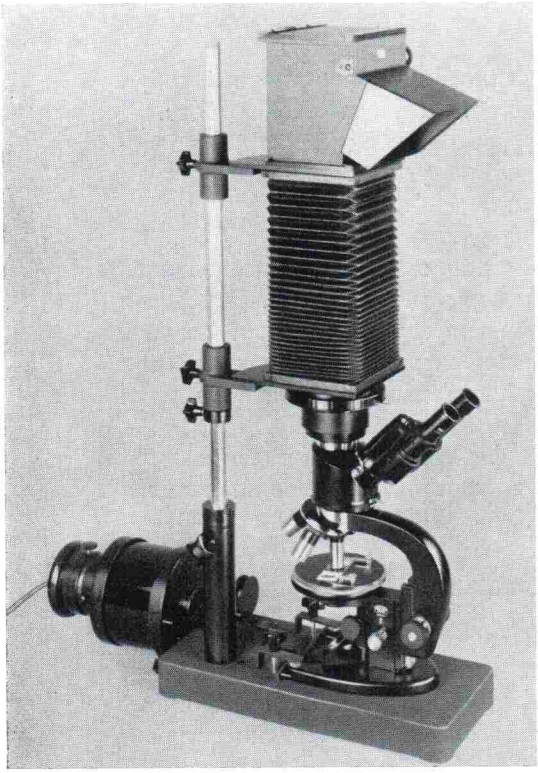


Рис. 46. Вертикальная камера «Стандарт» со сменным микрофототубусом на микроскопе «Lg» — выпускает К. Цейс (Йена)

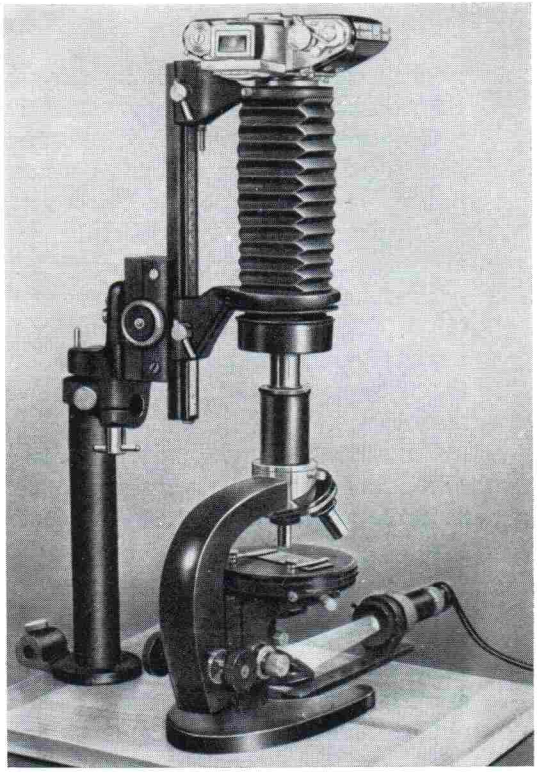


Рис. 47. Устройство «Vielzweckgerät» с камерой «Экзакта Варекс» — выпускает Ихаге (Дрезден). Длину камеры можно изменять с помощью меха

Рис. 48. Универсальное фотоустройство «Панфот» — выпускает Э. Лейц (Вецлар)

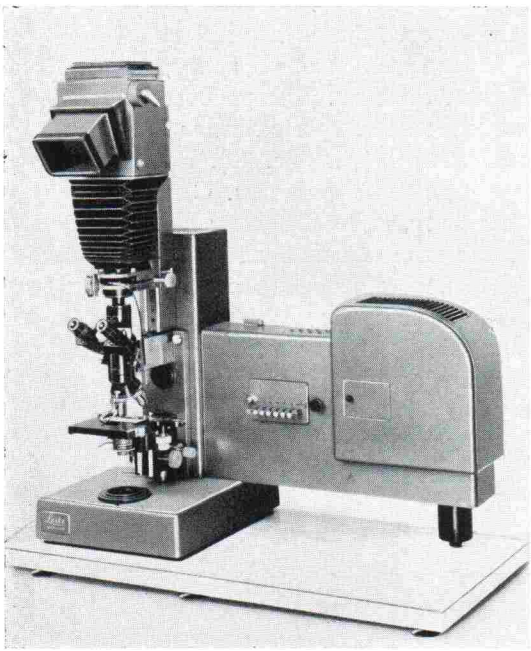
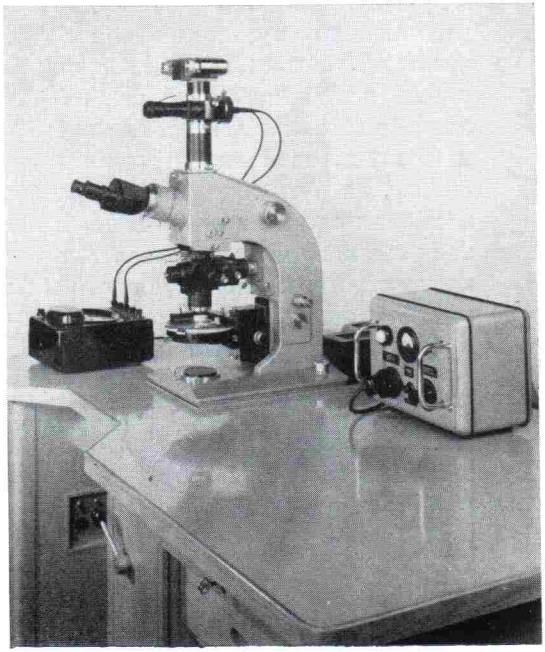


Рис. 49. Универсальный исследовательский микроскоп «Nu» — выпускает К. Цейс (Йена)



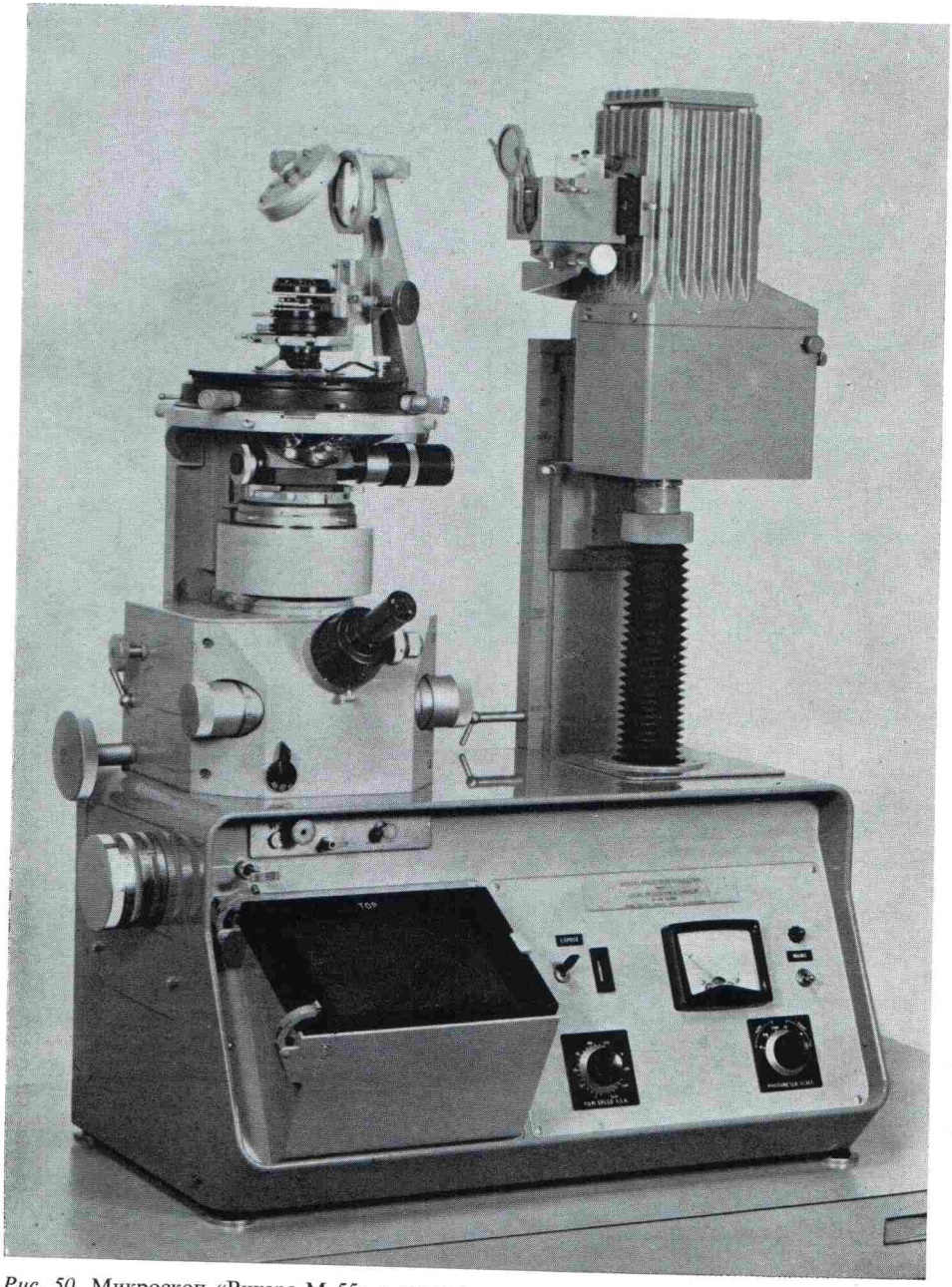
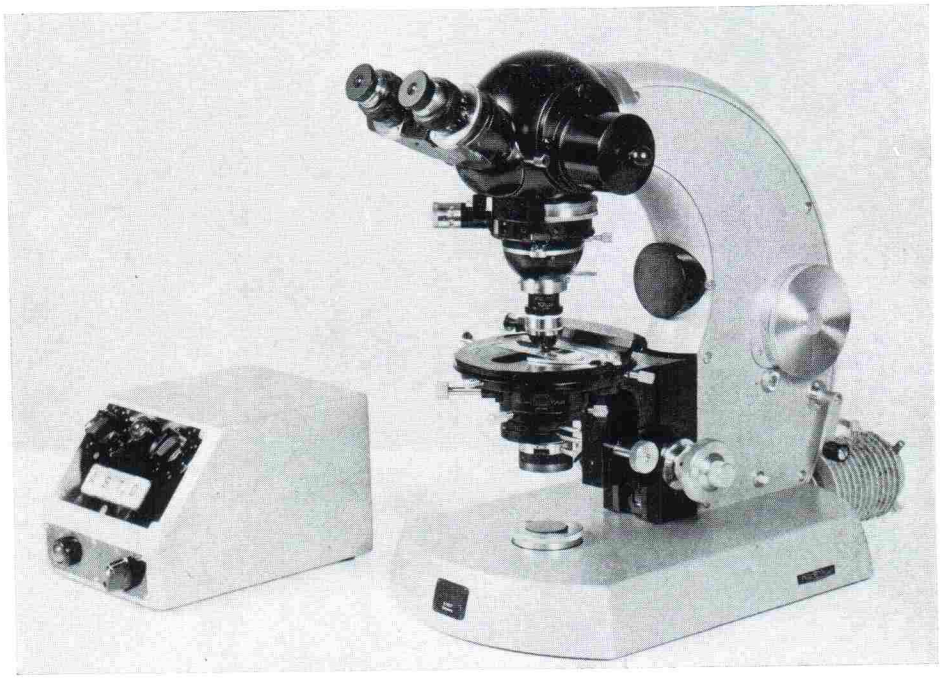


Рис. 50. Микроскоп «Викерс М 55» с автоматическим экспонометром — выпускает Кук , Трогтон и Симс



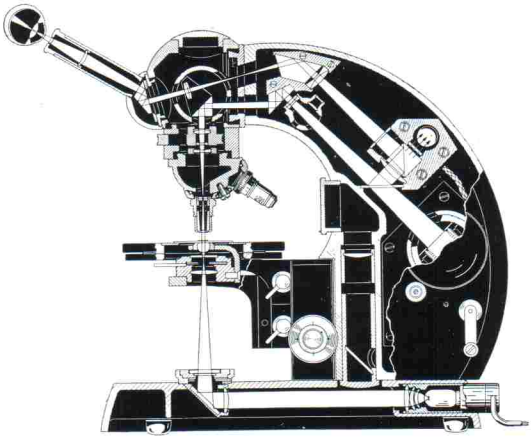
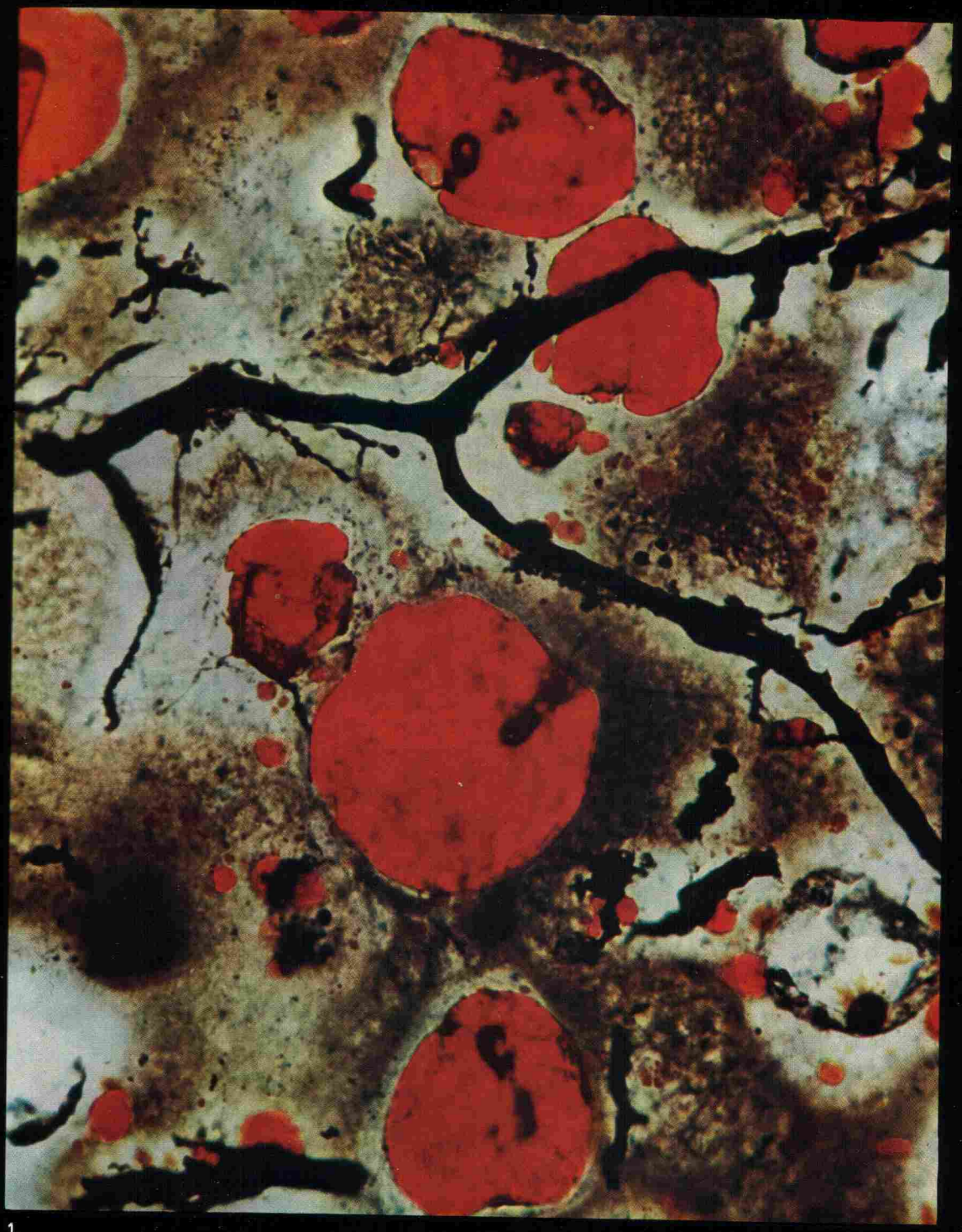


Рис. 51. Малоформатное микрофотоустройство «Фотомикроскоп» с автоматическим регулятором освещения (и ход лучей) — выпускает К. Цейс, Оберкохен

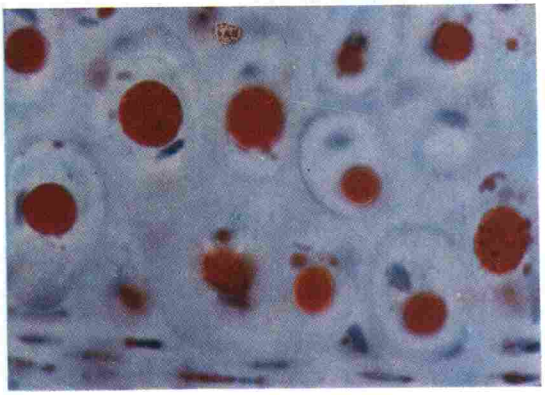
При микроскопе «Викерс М 55» перевернутого типа (рис. 50) исследуемый препарат помещают над объективом. Встроенный автоматический регулятор времени экспозиции гарантирует правильную выдержку как при использовании пластиночного фотоаппарата, так и при применении 35-миллиметровой камеры.

→

Рис. 1. Микроснимок среднего увеличения. *Объект:* человеческий костный мозг. *Окрашивание:* судан III и импрегнация серебром. *Объектив:* апохромат 20/0,65. Увеличение = 350 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Кодак Истмен-Колор». Тип: 5248



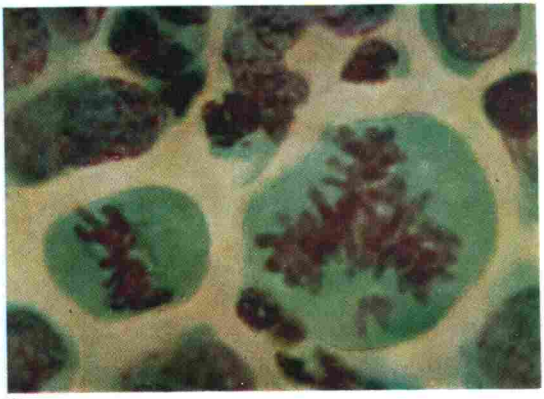
1



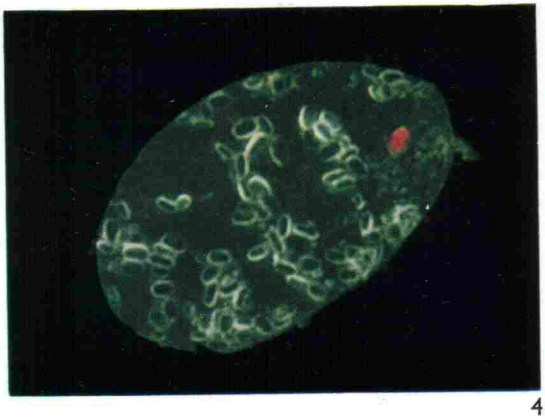
1



2



3



4



5

Камера-микроскоп оптического завода в Ратено также объединяет источник света, микроскоп и камеру, принимающую фотоматериал размером 24 × 36 мм. Интенсивность источника света в момент установки слабее, во время экспозиции усиливается, что способствует экономии ламп накаливания.

Аппараты фирмы К. Цейс (Оберкохен), малоформатный «Фотомикроскоп» (рис. 51) и дающий снимки размером 9 × 12 см «Ультрафот II» (рис. 52), располагают автоматическим регулятором времени экспозиции. Применяются и при специальных методах исследования.

←

Рис. 1—2. Снимки с сухим объективом большого увеличения. *Объект:* жировые капли в бронхиальном хряще. *Окрашивание:* гематоксилин-феттрот. *Объектив:* апохромат 40/0,95. Увеличение = 500 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16». 1) Пример ухудшения качества изображения при неправильном выборе покровного стекла. 2) Выбор покровного стекла адекватной толщины в случае применения сухого объектива сильного увеличения является предпосылкой изображения хорошего качуества

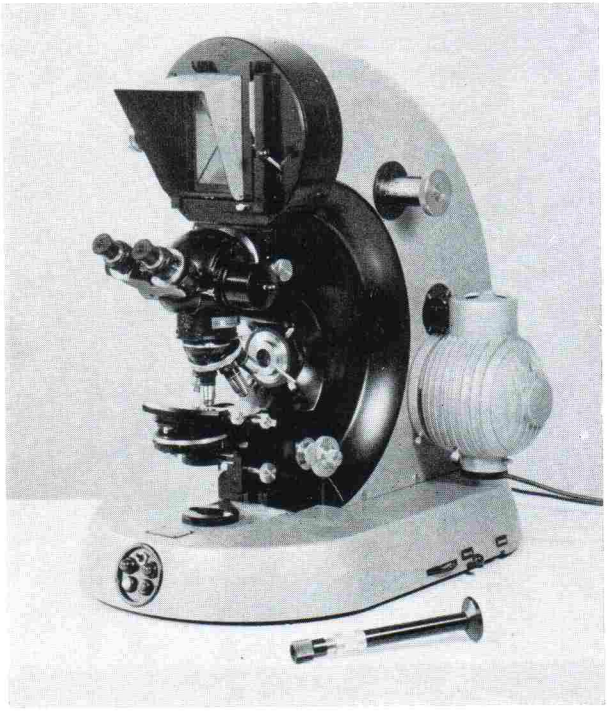
Рис. 3—5. Иммерсионные снимки

Рис. 3. Объект: мышиная асцитическая саркома (митозы). *Окрашивание:* реакция Фейлгена. *Объектив:* Н. I. 60/1,00. Увеличение = 700 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16»

Рис. 4. Снимок, выполненный по методу темного поля. *Объект:* водоросль (euglena). Неокрашенный препарат. *Объектив:* апохромат Н. I. 90/1,30. Увеличение = 1000 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16»

Рис. 5. Объект: стернальный пунктат (нелеченная злокачественная анемия). *Окрашивание:* Май-Грюнвальд. *Объектив:* планапохромат Н. I. 100/1,32. Увеличение = 1000 : 1. *Фотоматериал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17»

Специальные приспособления, используемые вместе со специальными типами микроскопов (флуоресцентными, поляризационными, интерференционными, стереоскопическими и микроскопами сравнения), являются составной частью упомянутых аппаратов. Более подробно перечисленные аппараты будут рассмотрены в дальнейшем (см. часть II).



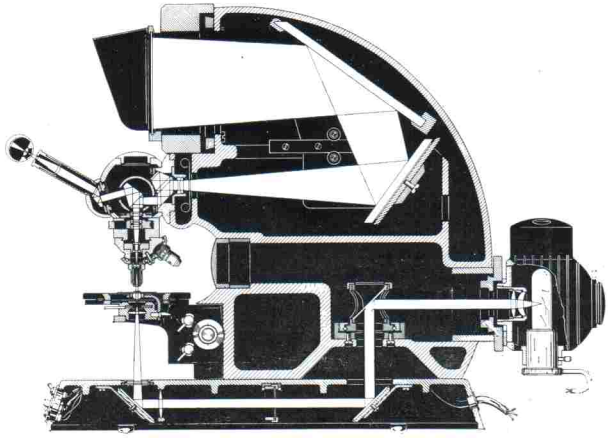


Рис. 52. 9 × 12 см-овое микрофотоустройство «Ультрафот II» с автоматическим регулятором освещения (ход лучей) — выпускает К. Цейс, Оберкохен

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ЦВЕТНЫХ МИКРОФОТОГРАФИЙ

ПОДГОТОВКА К СЪЕМКЕ

ОБЪЕКТ

В случае цветного микрофотографирования специальная обработка фотографируемого объекта является особенно важной. В медицинской и биологической практике большинство объектов — это окрашенные тканевые срезы, гистохимические препараты, мазки; менее часто — тканевые культуры, шлифы, кристаллические субстанции.

За исключением некоторых особенно ярких гистологических методов окрашивания цветоконтраст обычно довольно слабый. Последнее относится и к большей части гистохимических реакций. В противоположность препаратам, изготовленным для визуального наблюдения (где предпочтение отдается более бледному окрашиванию), используемые для цветного микрофотографирования препараты окрашены несколько сильнее обычного. Когда объект занимает только небольшую часть поля видимости, высокой брильянтности красок ожидать не приходится, и этому нельзя способствовать даже более сильным увеличением. Если в препарате доминируют определенные «кричащие» цвета, то их рефлексы часто маскируют части, окрашенные более скромно. Идеальный цветной препарат максимально заполняет поле видимости, окрашен ярко во многие цвета, но эти цвета близки по своей тональности. Хотя различные препараты, в зависимости от их свойств, индивидуально обусловливают применяемые методы окрашивания, все-таки и окрашивание, и выбор поля, подлежащего фотографированию, могут давать возможности вариаций. Фотографирование слишком толстого препарата не дает желаемого результата. Покрывающие материалы должны быть бесцветными. Загрязненность, дефекты срезов и окрашивания представляют собой помехи. Некоторые процессы окрашивания и химические реакции могут значительно поблекнуть в течение недель, дней и даже часов, поэтому их рекомендуется фотографировать как можно скорее.

Область препарата, подлежащая фотографированию, должна быть выбрана с большой тщательностью. Важно, чтобы она была характерной и технически безупречной. Простой метод обозначения выбранных областей препарата, покрытого покровным стеклом, заключается в обведении их тушью. Изготовленный фирмой инструмент для маркировки объектов процарапывает алмазом небольшой круг различного диаметра на покровном стекле над выбранной областью.

Изготовление и обработка цветных снимков — работа, требующая большого знания дела, большой тщательности и больших усилий и скрывающая в себе многочисленные возможности ошибок и неудач. Поэтому необходимо,

чтобы подлежащий фотографированию объект не имел изъянов с технической точки зрения. Здесь уместно привести строки из книги Курта Михеля «Микрофотография»: «С хорошо и чисто подготовленного объекта всегда можно сделать безупречную микрофотографию. В противоположность этому, даже располагающий самыми лучшими подсобными средствами и большим умением фотограф не может изготовить хороший снимок с плохого препарата».

ВЫБОР МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ. ФАЗОВЫЕ ОБЪЕКТЫ. АМПЛИТУДНЫЕ ОБЪЕКТЫ

С помощью различных методов исследования можно получить различные микроскопические изображения одного и того же объекта. В каждом случае перед выбором метода исследования нужно тщательно взвесить все обстоятельства. Цель — получение правильной информации. Хотя, строго говоря, ни один из методов исследования не показывает объект в совершенном соответствии с действительностью, все-таки основательное знание отдельных методов гарантирует правильную оценку полученных информаций.

Исследование неокрашенных структурных элементов большинства медицинских и биологических микроскопических препаратов возможно потому, что их показатель преломления отличается от показателя преломления окружения, а также потому, что существует разница в толщине частиц. Между световыми волнами, проходящими через частицы с различным показателем преломления, возникает разница в длине пути, и это обусловливает сдвиг волн по фазе. Такие структурные элементы известны как фазовые объекты. Так как ни глаз, ни светочувствительный материал непосредственно не воспринимают разность фаз, то для исследований по методу светлого поля препараты обычно окрашиваются. Вследствие окрашивания амплитуда волн, проходящих через препарат, в процессе светопоглощения более или менее уменьшается. Это явление улавливается глазом, и подготовленные таким способом препараты могут быть сфотографированы. Это так называемые амплитудные объекты. Большая часть цветных микроснимков медицинских или биологических объектов изготовляется с окрашенных амплитудных объектов при центральном освещении по методу светлого поля. Кроме пригодного для исследования фазовых объектов фазово-контрастного процесса, в практике цветного микрофотографирования все чаще применяют освещение по методу темного поля, косое, а также комбинированное освещение. Упомянутые методы могут быть использованы как в проходящем, так и в падающем свете.

ВЫБОР ФОТОМАТЕРИАЛА ДЛЯ ЦВЕТНЫХ СНИМКОВ

Хотя из многочисленных видов цветного материала, дающих большой выбор, любой может быть отобран для изготовления микроснимков, все-таки возникают определенные обстоятельства, влияющие на выбор.

Обратимый и негативно-позитивный процессы одинаково гарантируют хороший результат. В настоящее время уже теряют свое значение те соображения, по которым несколько лет тому назад четко различали применение упомянутых двух процессов. В наши дни и с обратимых снимков могут быть изготовлены копии, а также позитивы хорошего качества. Но безупречное цветовоспроизведение и высокая брильянтность красок теперь уже не являются свойством только обратимых пленок. Автоматические процессы, дающие цветовую маску, усовершенствовали и негативно-позитивную технику; известны и другие методы, обеспечивающие хороший результат.

Чувствительность различных цветных фотоматериалов достигает приблизительно 13—24 DIN. Пленки с низкой чувствительностью обычно обладают лучшей разрешающей способностью и более благоприятной брильянтностью красок, чем высокочувствительные пленки. Таким образом, рекомендуется их применение для целей микрофотографирования. В процессах, требующих длительной экспозиции, например, при флуоресцентномикроскопическом фотографировании, преимущество отдается пленкам с более высокой чувствительностью.

Если при одинаковых условиях освещения время экспозиции изменяется в широких пределах, то цветовоспроизведение снимков может показывать большую или меньшую разницу (см. цветн. иллюстр. II/5,6). Поэтому желательно выбирать такой тип пленки, который обеспечивает наиболее адекватное цветовоспроизведение при наиболее часто используемых выдержках. Слабая дивергенция исправима и конверсионными фильтрами.

Хотя в практике микрофотографирования в качестве источника света наиболее часто применяются лампы накаливания низкого напряжения, кроме пленок для искусственного света с конверсионными фильтрами можно успешно использовать и пленки дневного типа.

При применении специального источника света (например ксеноновой лампы), а также в определенных случаях специальных методов исследования (например флуоресцентное, поляризационное, интерференционное микрофотографирование) пленки дневного типа дают желаемый результат и без конверсионных фильтров.

Сведения относительно размеров фотоматериала приведены в других главах (см. стр. 54).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ ЭКСПОЗИЦИИ

Изготовление пробного снимка является часто применяемым методом, суть которого состоит в том, что с одного и того же поля видимости делается серия снимков таким образом, чтобы время экспозиции каждого снимка равнялось приблизительно половине предшествующей выдержки; например, 4 — 2 — 1 — 1/2 — 1/5 — 1/10 — 1/25 сек и т. д. Из полученной таким способом серии после проявления выбирается соответствующее время экспозиции. Этот процесс особенно выгоден при малоформатном оборудовании.

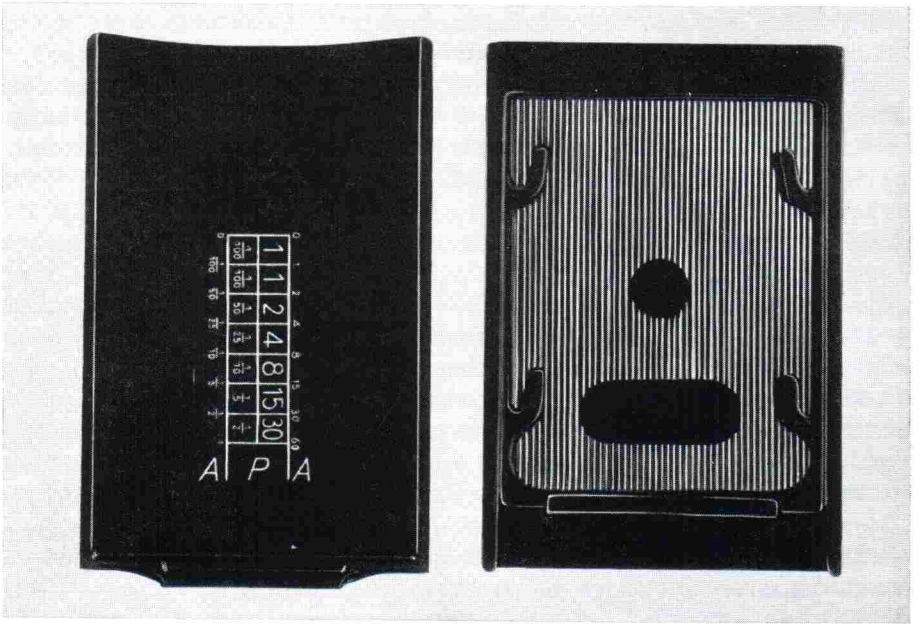


Рис. 53. 9 × 12 см-овая кассета, снабженная градуированной крышкой — выпускает К. Цейс (Йена)

Таблица IV

Время экспозиции для полос кассеты, снабженной градуированной крышкой

№ экспозиции	№ полосы						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	1	1	1	1	1	1	1
2		1	1	1	1	1	1
3			2	2	2	2	2
4				4	4	4	4
5					8	8	8
6						15	15
7							30
Суммарное время экспозиции (сек)	1	2	4	8	16	30	60

Когда используется дорогой фотоматериал, например, цветная плоская форматная пленка, с хорошим результатом может быть применена кассета с градуированной задвижкой (рис. 53). Постепенным выдвижением задвижки кассеты при различном времени освещения одна и та же пленка разбивается

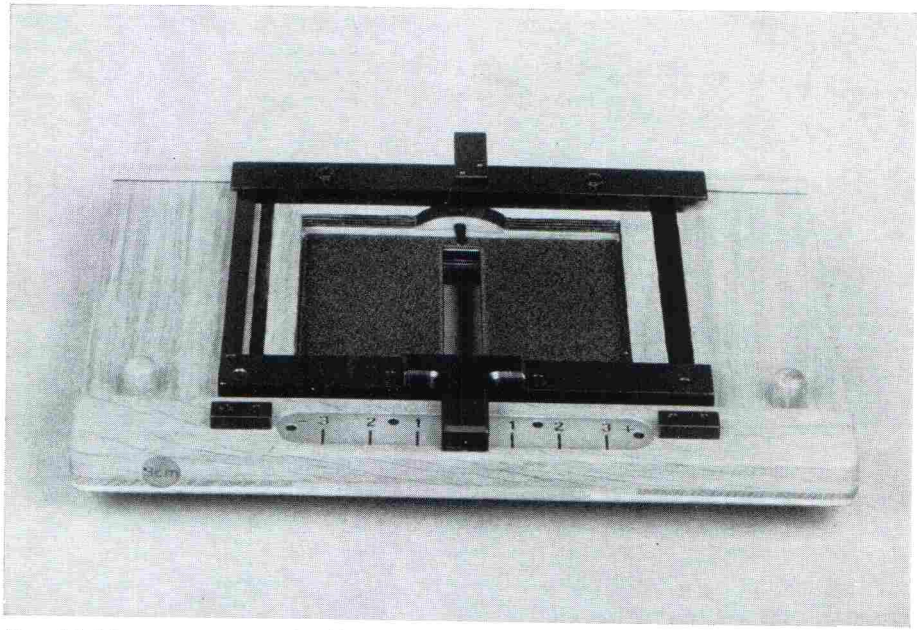


Рис. 54. Мультипликатор с 9 × 12 см-овой светопреграждающей пластинкой, снабженной щелью. Без кассеты. Выпускает К. Цейс (Йена)

на отдельные полосы. Таблица IV показывает время освещения для каждой полосы пленки в 7 ступенях в интервале от 1 до 60 секунд.

Другая возможность — применение мультипликатора. Суть этого состоит в том, что перед фотоматериалом помещается светонепроницаемая пластинка. Свет может проходить только через определенный участок шириной в несколько мм в центре этой пластинки (рис. 54). Щель остается на одном месте, тогда как фотоматериал в кассете постепенно продвигается дальше.

Предшествующим методом изготовляются снимки различных частей объекта (цветн. иллюстр. II/5); в случае же применения мультипликатора меняется только время экспозиции для каждой полосы, а не поле (цветн. иллюстр. II/6). Из существа двух методов вытекает, что первый из них используется при объектах гомогенной структуры, в то время как для второго такого ограничения не существует.

Снимки 5 и 6, приведенные на II цветной иллюстрации, сделаны на цветной плоской пленке — можно видеть сдвиг контраста и цвета от неправильного освещения. Цвета в частях с передержкой — ненасыщенные, изображение (по общему впечатлению) представляется светлым и недостаточно контрастным. В результате недодержки снимки часто являются более контрастными, с более насыщенными цветами, чем это бывает на правильно экспонированных снимках. При более внимательном рассмотрении изображений можно установить, однако, что на снимках, значительно недодер-

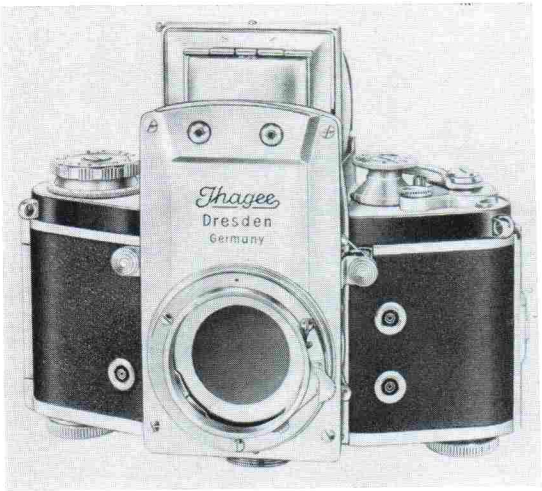


Рис. 55. Камера «Экзакта Варекс» с экспонометром (с селеновым фотоэлементом) — выпускает Ихаге (Дрезден)

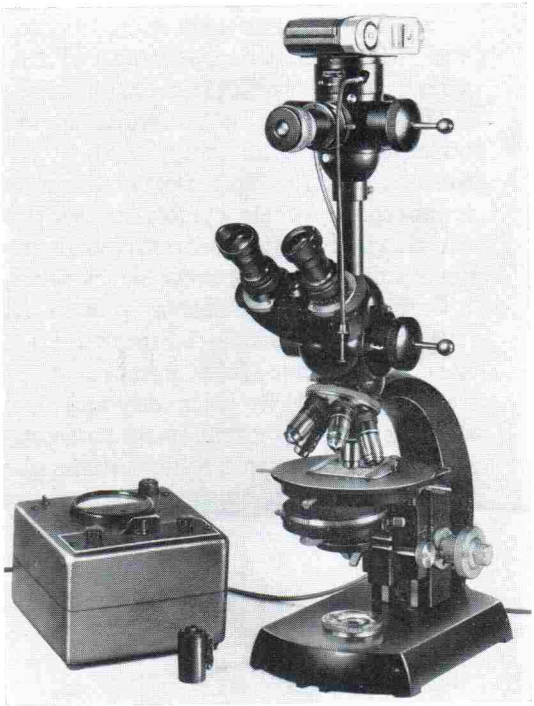
жанных, уже обнаруживается цветная пелена, которая в зависимости от характера фотоматериала может быть разного цвета; одновременно с этим значительно понижается брильянтность красок.

Недостаток изложенных методов заключается в том, что они требуют слишком много времени. По понятной причине они не могут быть использованы в случае таких наблюдаемых через микроскоп явлений, где, напри-

Рис. 56. Экспонометр «Ремифот» — выпускает К. Рейхерт (Вена)



Рис. 57. Малоформатная насадочная камера с экспонометром, содержащим щелочной фотоэлемент и микроскопом «Стендерд ВЛ» — выпускает К. Цейс (Оберкохен)



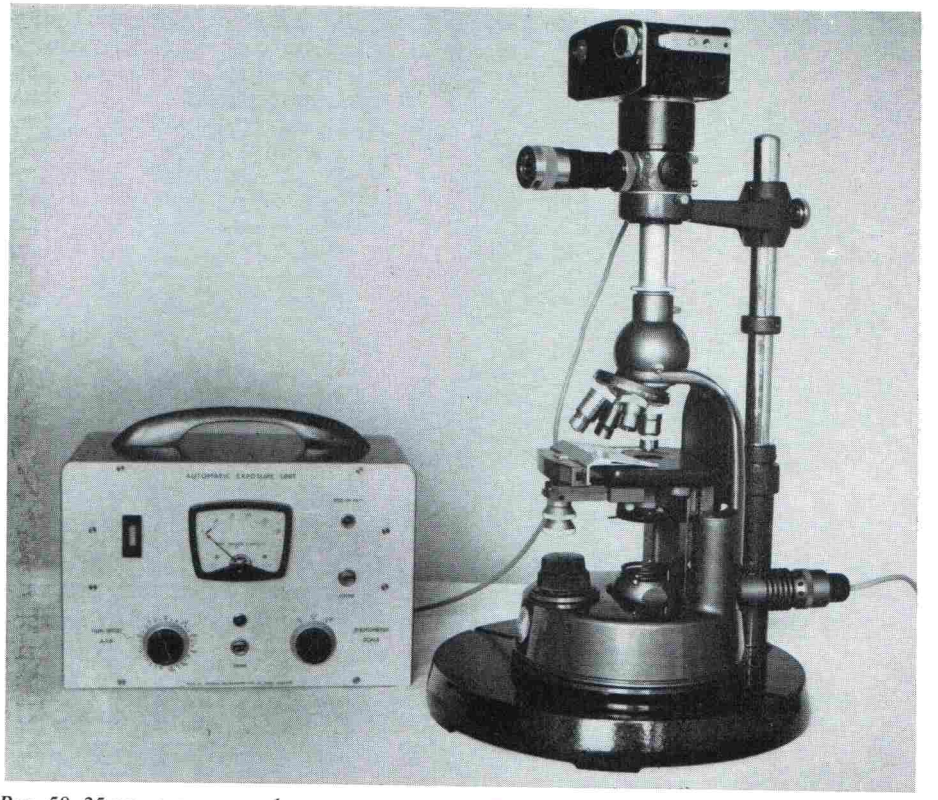


Рис. 58. 35 мм-овая микрофотокамера с полностью автоматически действующим регулятором времени экспозиции и механизмом транспортировки пленки — выпускает «Викерс Инструментс»

мер, в течение нескольких минут изменяется форма, цвет, толщина объекта и т. д.

Со времени появления различных фотоэлементов, фотоэлектрических измерителей освещения их старались использовать для определения времени экспозиции при микрофотографировании. Фотоэлектрические экспонометры подразделяются следующим образом: селеновый фотоэлемент, экспонометры с полупроводниковым фотосопротивлением и фотоумножателем.

Экспонометр фирмы Ихаге (Дрезден) работает с селеновым элементом (рис. 55). Прибор закрепляется между фотоаппаратом и микроскопом с помощью байонетного соединения. По принципу полупроводникового фотосопротивления работает экспонометр «Ремифот» фирмы Рейхерт (Вена) (рис. 56).

Из насадочных камер, смонтированных вместе с фотоэлектрическим экспонометром, оборудование фирмы К. Цейс (Оберкохен) работает с щелочным элементом (рис. 57). Перед элементом помещается желтый фильтр, задер-

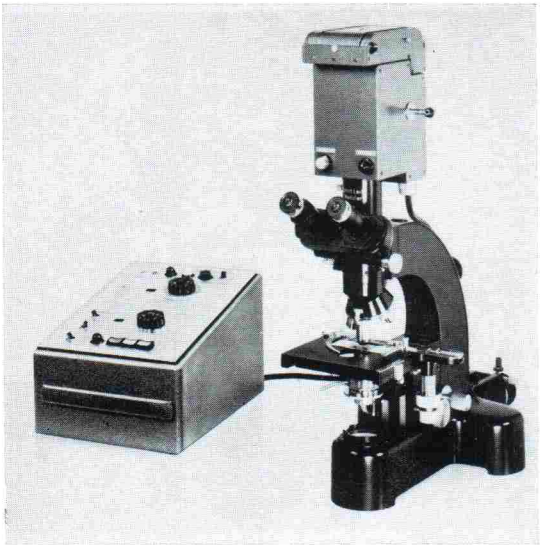
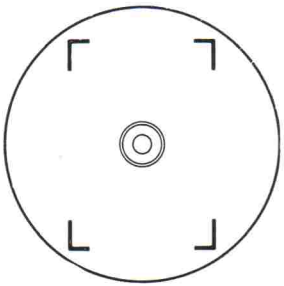


Рис. 59. Микрофотокамера «Ортомат» с автоматическим регулятором времени экспозиции, смонтированная на микроскопе «Ортолюкс» — выпускает Э. Лейц (Вецлар)

Рис. 60. Поле зрения фокусирующего окуляра «Ортомат» — выпускает Э. Лейц (Вецлар)



живающий синие лучи, так как упомянутый фотоэлемент сильно чувствителен к синему цвету. К фотоэлементной насадке, монтируемой на микроскоп, относится многокаскадный электрический усилитель, снабженный гальванометром.

Из камер-микроскопов «Фотомикроскоп» (рис. 51) и «Ультрафот II» (рис. 52) производства фирмы К. Цейс (Оберкохен) автоматически оценивают световые условия и контролируют затвор. Автоматическая 35-миллиметровая микрофотокамера «Викерс» (рис. 58) обеспечивает правильную экспозицию (от 1/30 сек до 15 мин) соответственно данным световым условиям и автоматически протягивает пленку дальше.

Фирма Лейц (Вецлар) выпускает автоматическую насадочную камеру «Ортомат» для микрофотографирования, которую можно смонтировать на микроскопы различных типов (рис. 59). Когда в поле устанавливающего

→

Рис. 1—4. Сравнение снимков, получаемых с одного и того же объекта при помощи различных методов микроскопического исследования

Объект: водоросль (haematococcus). Неокрашенный препарат. *Объектив:* ахромат Ph.H.I. 90/1,25. Увеличение = 900 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16». 1) Снимок, изготовленный по методу светлого поля. 2) Фазовоконтрастный снимок. 3) Снимок, выполненный при одностороннем косом освещении. 4) Концентрическое косое освещение

Рис. 5—6. Снимки, полученные с помощью одностороннего верхнего освещения. *Объект:* узелковая поверхность печени (цирроз печени). Нативный препарат. *Объектив:* Микротар 6,3/90; нум. ап. 0,08. Увеличение = 2 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16». 5) Светорефлексы могут быть устранены скрещенными поляризационными фильтрами, помещенными перед источником света и объективом. Пластичность уменьшается, но структура (изображение поверхности вен) распознается лучше. 6) Светорефлексы обусловливают пластический эффект



1



2



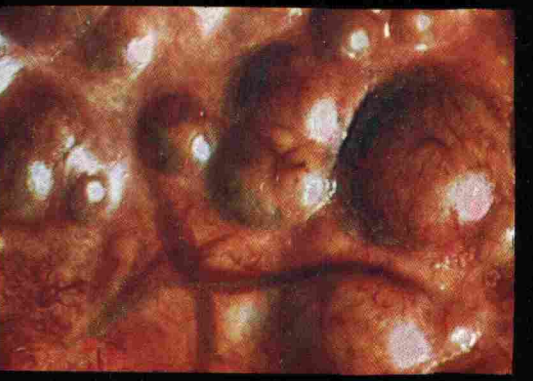
3



4



5



6



1



2

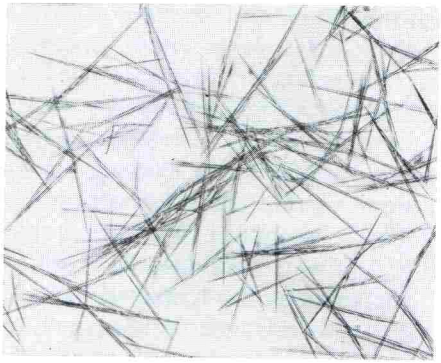


Рис. 61. Если при изготовлении снимка по методу темного поля объект заполняет поле зрения только частично, преобладает светлый фон. В таком случае экспонометры показывают слишком короткое время экспозиции

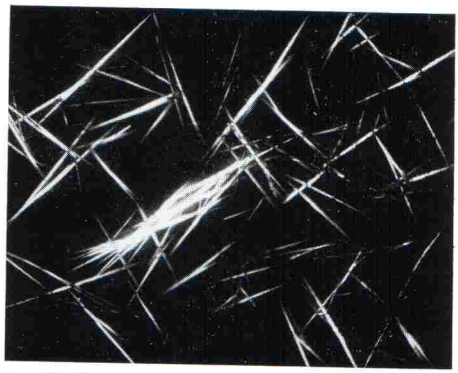


Рис. 62. Снимок выполнен с предшествующего объекта при использовании поляризационных фильтров в скрещенном положении. В этом случае, как и на темнопольных снимках, доминирует темный фон. При этом экспонометры показывают слишком длинное время экспозиции

Объект: кристаллы белка. *Объектив:* ахромат 10/0,20. Увеличение = 100 : 1. *Фотоматериал:* «Агфа Документфильм»

окуляра этой камеры (рис. 60) два больших круга видны как отдельно стоящие, установленная в видоискателе резкость изображения действительна и для плоскости пленки. Видимый в центре видоискателя малый измерительный круг занимает 1/100 часть области поля. Он имеет значение в случае негомогенных препаратов, так как в результате наблюдения в нем части исследуемого объекта и включения измерительной диафрагмы, суживающей поле видимости аппарата, становится возможным измерение световой абсорбции, соответствующей выбранной частице препарата.

Таким образом, мы подошли к одной из проблем микроскопического измерения света. Препараты не всегда гомогенны, часто не заполняют ровно все поле. В таком случае возникает опасность, что на светочувствительный элемент аппарата будет попадать много света вследствие сильной светопроницаемости фона, имеющего относительно большую поверхность (рис. 61), и время экспозиции, примененное в соответствии с данными реги-

←

Рис. 1. Снимок выполнен при концентрическом верхнем освещении. *Объект:* кристаллы витамина B_{12}. *Объектив:* Ультропак, UO 3,8/0,12 с кольцевидным конденсором. Увеличение = 7,5 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Истмен-Колор», тип 5248

Рис. 2. Снимок 6-недельного человеческого эмбриона, выполненный при освещении смешанным светом. Сине-зеленый фильтр, дающий проходящий свет, повышает плотность амниотической жидкости. Светорефлексами белого источника света, обеспечивающего верхнее освещение, подчеркивается округлость амниона, через который хорошо виден сам эмбрион. *Объектив:* Микротар 6,3/90; нум. ап. 0,08. Увеличение = 7 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16»

стрирующего прибора, даст недодержанный снимок. Противоположное этому явление может иметь место в определенных случаях темнопольных, поляризационных (рис. 62), а также флуоресцентных микроснимков. За счет фона с большой поверхностью, практически свободного от света, прибор измеряет низкие значения, и поэтому полученное продолжительное время экспозиции обусловливает передержку. Устройство, дающее возможность измерений с суженным полем в аппарате «Ортомат», имеет целью уменьшить этот недостаток. Известны и другие процессы, в которых светочувствительным элементом, например, фотоэлементом, перемещаясь с точки на точку в плоскости изображения, «прощупывают» отдельные части препарата. В этом случае фон оставляется без внимания. Метод требует много времени. Экспонометр «SEI» (производства «Селфорд Электрикел Инструментс») действует на принципах, отличающихся от изложенных выше, и хотя изготовляется не специально для микроскопических измерений, все-таки применим для «прощупывающих» измерений частиц негомогенных объектов.

Спектральная чувствительность светочувствительных элементов различна, но использованием фильтров ее можно изменить и согласовать с цветовой чувствительностью цветных фотоматериалов.

В связи с определением времени экспозиции важно учитывать отклонения от так называемого закона взаимозаменимости. Соответственно первоначальному закону Бунзена—Роско, для получения идентичного фотохимического эффекта требуется идентичное количество света. Под количеством света должно подразумеваться произведение интенсивности и времени экспозиции:

$$E = I \cdot t$$

По первоначальному закону не делается разница между световой интенсивностью и временем воздействия. Шварцшильд установил, что в случае чрезмерно продолжительной выдержки связь $E = I \cdot t$ является недействительной и время экспозиции следует возвести в степень:

$$E = I \cdot t^p$$

Согласно закону Шварцшильда, светочувствительный слой использует тем меньшее количество падающей общей энергии, чем длиннее время иррадиации. В микрофотографической практике в определенных случаях должно применяться относительно продолжительное время экспозиции (например, при темнопольном или флуоресцентном микрофотографировании). В таких случаях недостаточно продлить время экспозиции пропорционально уменьшению световой интенсивности, а нужно учитывать еще и определенные факторы. Допустим, например, что на основании данных измерительного прибора, при заданных световых отношениях, экспонируя

стрирующего прибора, даст недодержанный снимок. Противоположное этому явление может иметь место в определенных случаях темнопольных, поляризационных (рис. 62), а также флуоресцентных микроснимков. За счет фона с большой поверхностью, практически свободного от света, прибор измеряет низкие значения, и поэтому полученное продолжительное время экспозиции обусловливает передержку. Устройство, дающее возможность измерений с суженным полем в аппарате «Ортомат», имеет целью уменьшить этот недостаток. Известны и другие процессы, в которых светочувствительным элементом, например, фотоэлементом, перемещаясь с точки на точку в плоскости изображения, «прощупывают» отдельные части препарата. В этом случае фон оставляется без внимания. Метод требует много времени. Экспонометр «SEI» (производства «Селфорд Электрикел Инструментс») действует на принципах, отличающихся от изложенных выше, и хотя изготовляется не специально для микроскопических измерений, все-таки применим для «прощупывающих» измерений частиц негомогенных объектов.

Спектральная чувствительность светочувствительных элементов различна, но использованием фильтров ее можно изменить и согласовать с цветовой чувствительностью цветных фотоматериалов.

В связи с определением времени экспозиции важно учитывать отклонения от так называемого закона взаимозаменимости. Соответственно первоначальному закону Бунзена—Роско, для получения идентичного фотохимического эффекта требуется идентичное количество света. Под количеством света должно подразумеваться произведение интенсивности и времени экспозиции:

$$E = I \cdot t$$

По первоначальному закону не делается разница между световой интенсивностью и временем воздействия. Шварцшильд установил, что в случае чрезмерно продолжительной выдержки связь $E = I \cdot t$ является недействительной и время экспозиции следует возвести в степень:

$$E = I \cdot t^p$$

Согласно закону Шварцшильда, светочувствительный слой использует тем меньшее количество падающей общей энергии, чем длиннее время иррадиации. В микрофотографической практике в определенных случаях должно применяться относительно продолжительное время экспозиции (например, при темнопольном или флуоресцентном микрофотографировании). В таких случаях недостаточно продлить время экспозиции пропорционально уменьшению световой интенсивности, а нужно учитывать еще и определенные факторы. Допустим, например, что на основании данных измерительного прибора, при заданных световых отношениях, экспонируя

в течение 1/50 сек, получаем правильно выдержанный снимок; после этого уменьшаем свет в такой степени, чтобы упомянутый прибор показывал время экспозиции в 20 сек, соблюдая эту выдержку, получим недодержанное изображение. Умножая, однако, время экспозиции на соответствующий фактор (таблица V), получаем правильно выдержанный снимок. Фактор (в зависимости от типа пленок и их чувствительности, а также от проявителя) может быть различным. Крон установил, что дивергенция наблюдается на стороне не только низкой, но и высокой световой интенсивности. Таким образом, в случае использования ксеноновых трубок большой интенсивности, но с коротким временем вспышки тоже надо учитывать такие факторы. В светочувствительной эмульсии 1000 вспышек, каждая из которых длится 1/1000 сек, не вызывают такого же эффекта, как однократная вспышка с интенсивностью, равной интенсивности каждой из предыдущих одиночных вспышек, однако продолжительностью в 1000 × 1/1000, то есть 1 сек.

Таблица V

Факторы, удлиняющие время экспозиции обратимой пленки «Перуц Колор С 18», при использовании длинных выдержек. Значение, измеренное экспонометром, надо умножить на соответствующий фактор

Измеренное время экспозиции (в сек)	Удлиняющий фактор
2 — 3	1,2
3 — 6	1,5
6 — 10	1,8
10 — 20	2,0
20 — 30	2,3
30 — 60	2,7
60 —120	3,2
120 —240	3,7
240 —480	4,2

При работе с цветными пленками, применяя крайне короткую или длинную выдержку, надо считаться не только с упомянутым фактором, но и с цветовым сдвигом (вследствие различной чувствительности трех слоев). Соответствуюшие данные обычно сообщаются выпускающими пленки предприятиями. Например, длительное время экспозиции в случае использования обратимых пленок производства Агфаколор обусловливает появление дымки зеленого цвета, для преодоления которой должен быть применен пурпурный приемный фильтр. С другой стороны, при применении ксеноновых импульсных ламп с целью уменьшения пурпурного цветового смещения рекомендуется использовать зеленый приемный фильтр. Хотя в связи с упомянутыми факторами и фильтрами опубликованы многочисленные таблицы, целесообразно индивидуально определять значение фактора и фильтра в отношении данных условий.

На основании сказанного следует сделать вывод, что вопрос измерения времени экспозиции при микроскопическом фотографировании не решен окончательно даже в случае автоматически действующей аппаратуры. Причина этого заключается в отсутствии универсально используемого метода для каждого исследовательского процесса, поэтому (в зависимости от характера объекта, подлежащего фотографированию) решение рекомендуется искать среди перечисленных возможностей.

ПРИМЕНЕНИЕ ОБЫЧНЫХ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ И ФОТОГРАФИРОВАНИЕ НАБЛЮДАЕМОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ

ЦЕНТРАЛЬНОЕ СВЕТЛОПОЛЬНОЕ ОСВЕЩЕНИЕ ПРОХОДЯЩИМ СВЕТОМ

Применение принципа Кёлера

Точное знание и применение принципа освещения по Кёлеру (рис. 63) — основа правильного микроскопического наблюдения и фотографирования. Несмотря на то, что встроенный и заранее отрегулированный источник света в новых типах исследовательских микроскопов и микрофотоаппаратуры не требует особого обращения, знание принципа Кёлера является предпосылкой безошибочной эксплуатации и этих приборов.

Установка освещения соответственно принципу Кёлера в случае отдельной микроскопной лампы осуществляется следующим образом.

Микроскопную лампу необходимо установить так, чтобы плоскость осветительной диафрагмы лампы находилась от центра зеркала микроскопа на расстоянии 15—25 см. Затем лампу включаем и через суженную до 1/2—1/3 полевую дифрагму (с помощью коллекторной линзы лампы) проектируем изображение источника света на плоскость зеркала микроскопа, расположенную вертикально. Наблюдение изображения может быть облегчено помещением на зеркало листочка белой бумаги. Перемещая корпус лампы вперед или назад (а при необходимости — поднимая или опуская), стараемся направить пучок света в центр зеркала. Если перед лампой имеется матовое стекло, его удаляют. При использовании лампы накаливания спроектированное изображение нитей (в случае других источников света — изображение частей, непосредственно излучающих свет) фокусируется путем изменения расстояния между источником света и коллекторной линзой. При применении матовой колбы или матированной коллекторной линзы всегда следует устанавливать наиболее светлую точку. После этого

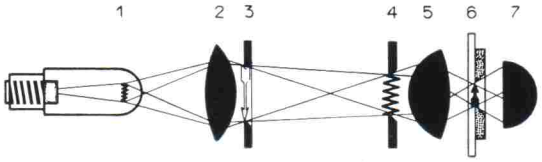


Рис. 63. Ход лучей при освещении по Кёлеру

1. источник света,
2. фонарный конденсор,
3. полевая диафрагма,
4. апертурная диафрагма и изображение нити накаливания,
5. конденсор,
6. плоскость объекта и изображение полевой диафрагмы,
7. объектив

корпус лампы закрепляется, при этом надо следить за тем, чтобы с этого момента штатив микроскопа не двигался.

Следующий шаг состоит в том, что находившееся до сих пор в вертикальном положении зеркало микроскопа наклоняют до такой степени, пока на полностью закрытой апертурной диафрагме не появится изображение источника света. По ходу действия наблюдение полученного изображения можно облегчить с помощью обычного зеркала, помещенного на высоте основания микроскопа. Точная фокусировка видимого изображения происходит тоже путем изменения расстояния между источником света и коллекторной линзой. В случае правильной установки величина источника света, появляющегося на апертурной диафрагме, совпадает с наибольшим диаметром диафрагмы (рис. 64,а). Если же имеется расхождение, то причину надо искать в неправильном выборе расстояния между лампой и микроскопом.

За этим следует наводка изображения исследуемого объекта на резкость посредством объектива среднего увеличения (например 10 : 1) и окуляра (например 7 ×). После этого полевая диафрагма максимально затягивается, в течение чего ее изображение (как правило, вне фокуса и эксцентрично) появляется в поле (рис. 64,б). Резкость изображения полевой диафрагмы достигается подъемом или опусканием конденсора (рис. 64,в), затем полученное изображение центрируется (рис. 64,г) изменением плоскости зеркала.

После этого проводится исследование — выбранные для съемки объектив и окуляр помещаются на пути лучей, а изображение объекта наводится на окончательную резкость. (При этом нужно контролировать, осталось ли резким в центре, вследствие замены объектива, предварительно установленное изображение полевой диафрагмы).

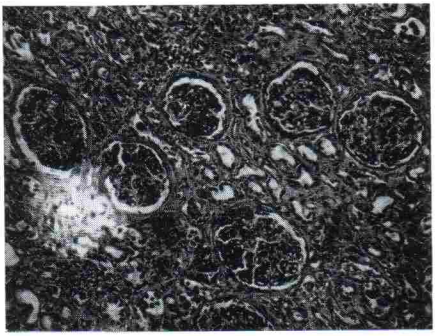
После завершения возможной коррекции начинаем постепенно раскрывать апертурную диафрагму, в процессе чего можно наблюдать, как освещается все большая и большая область поля (рис. 64,д). Для визуальных наблюдений диафрагма раскрывается до тех пор, пока полное поле, видимое через окуляр микроскопа, не станет таким же светлым. В случае фотографирования величина изображения, намеченного в видоискателе, должна быть стандартной (рис. 64,е).

При использовании объектива слабого увеличения часто наблюдается такая ошибка, что описанным способом не удается осветить все поле. Тогда, если возможно, отвинчивается фронтальная линза конденсора, а у отдельных типов она отводится в сторону. Если это не помогает, то должен быть применен конденсор с более длинным фокусным расстоянием.

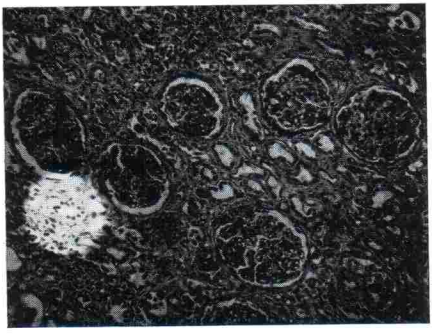
Следует последний шаг — установка апертурной диафрагмы. Очень важно учитывать то, что апертура освещающего пучка лучей должна быть адекватной апертуре применяемого объектива. При очень сильно раскрытой диафрагме изображение покрыто дымкой, недостаточно контрастное. С другой стороны, слишком суженная апертурная диафрагма может увеличи-



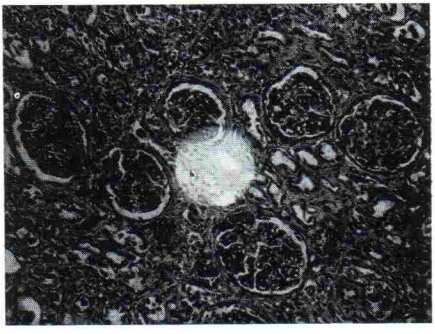
а



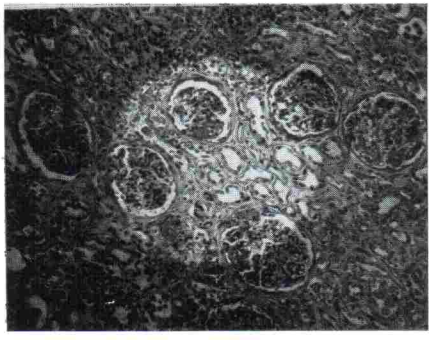
б



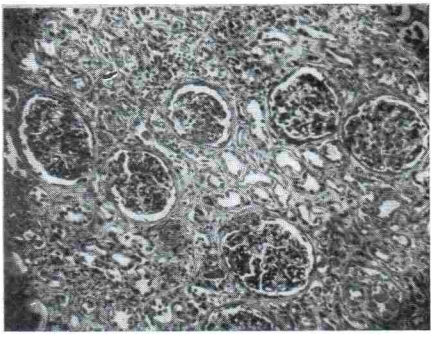
в



г



д



е



ж

Рис. 64. Основные действия для осуществления принципа освещения по Кёлеру (подробности см. в тексте)
а) изображение нити накаливания появляется на апертурной диафрагме;
от б) до е) центрировка и установка изображения полевой диафрагмы;
ж) апертурная диафрагма открыта до 2/3

вать контрастность изображения до степени, когда это представляет собой помеху; в это время растет глубина резкости и понижается разрешающая сила микроскопа.

Упомянутые в начале главы амплитудные объекты требуют более раскрытой апертурной диафрагмы, чем фазовые объекты.

Правильную установку апертурной диафрагмы в случае так называемого вспомогательного микроскопа или «Оптовара» (см. рис. 2) облегчает использование вспомогательной линзы, через которую изображение апертурной диафрагмы видно в верхней фокусной плоскости объектива. Располагая некоторым опытом, за работой апертурной диафрагмы можно следить невооруженным глазом через тубус, удалив окуляр микроскопа. Хотя отверстие апертурной диафрагмы определяется индивидуальными свойствами объектов, а также используемой оптической системой, для ориентировки необходимо учитывать, что при изготовлении снимка цветного объекта желаемый результат может быть получен только при условии, если апертурную диафрагму устанавливаем так, чтобы были освещены 1/2—2/3 части выходного отверстия объектива (рис. 64,ж).

Критическое освещение

Более простым, чем изложенный метод, является применение так называемого критического освещения. В противоположность принципу Кёлера в плоскость объекта проектируется не полевая диафрагма, а сам источник света (рис. 65). В таком случае рекомендуется использовать матовое стекло или матовую лампу.

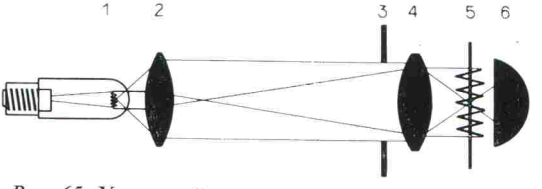


Рис. 65. Ход лучей при критическом освещении

1. источник света,
2. фонарный конденсор,
3. апертурная диафрагма,
4. конденсор,
5. плоскость объекта и изображение нити накаливания,
6. объектив

Снимки слабого увеличения

На основе поверхностного знакомства с проблемами цветного микрофотографирования можно ошибочно заключить, что изготовление иммерсионных снимков представляет собой задачу, требующую наибольшей тщательности. Практика, однако, доказывает противоположное: безупречного ка-

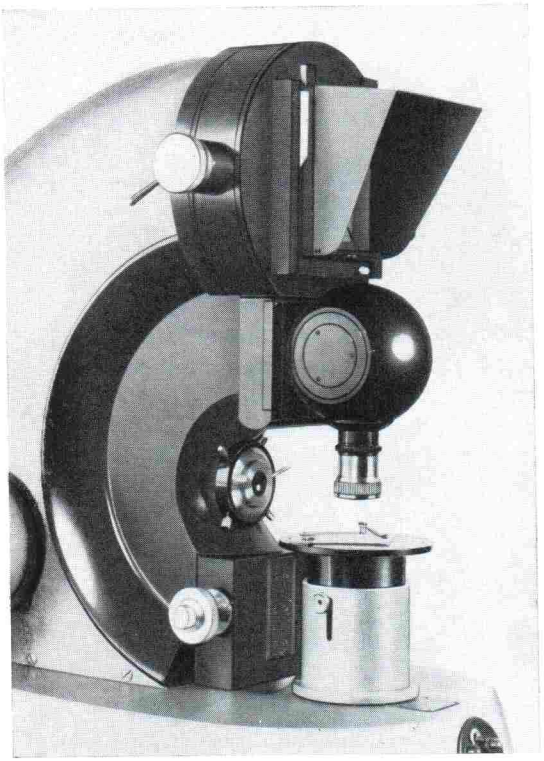


Рис. 66. Микродиастолик «Ультрафот-а II» для изготовления снимков с помощью лупы и обзорных фотографий — выпускает К. Цейс (Оберкохен)

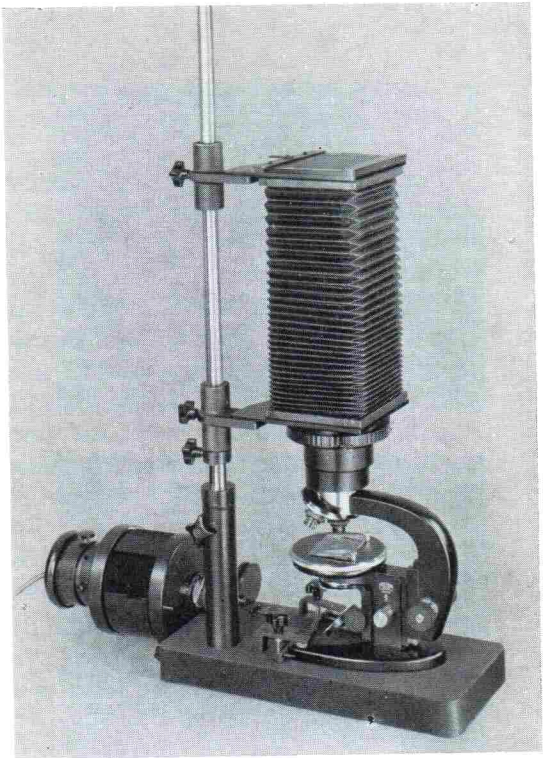
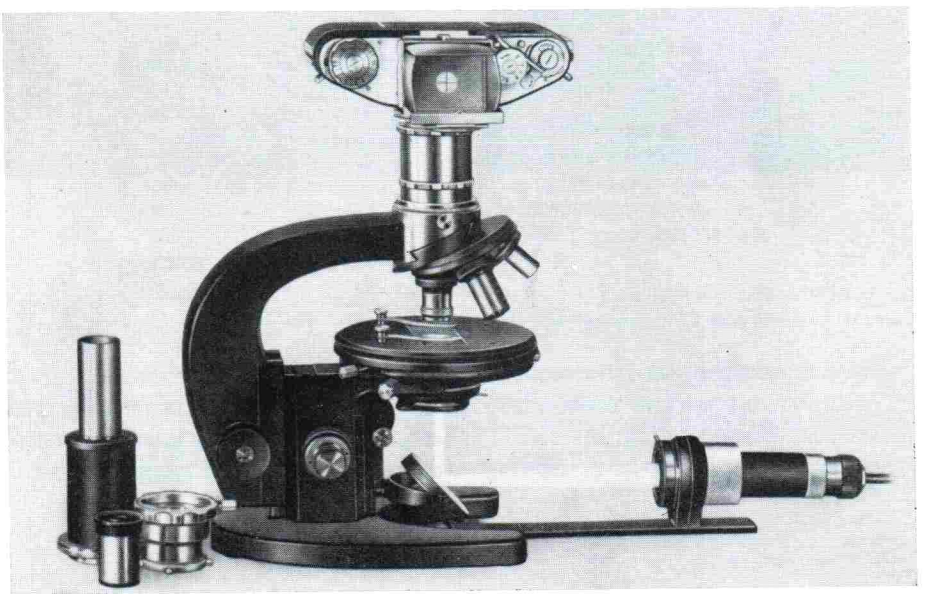


Рис. 67. Вертикальная камера «Стандарт» производства К. Цейс (Йена) с объективом «М» для микрофотоснимков слабого увеличения

Рис. 68. Малоформатное устройство для изготовления снимков с помощью лупы: штатив «Lg» — производит К. Цейс (Йена) — и камера «Экзакта Варекс» с промежуточными кольцами — выпускает Ихаге (Дрезден)



чества снимок малого увеличения скорее требует знаний и опыта от специалиста цветной микрофотографии. Многие неправильно применяют для целей фотографирования ахроматические, флуоритные и апохроматические объективы без окуляра. Таким путем в самом деле можно изготовить снимки более слабого увеличения, чем через окуляр, однако качество изображения не будет удовлетворительным, так как упомянутые недостатки объективов (поперечная хроматическая аберрация и кривизна поля изображения) частично исправляются окулярами.

Соответствующий результат дают поступившие недавно в обращение плановые объективы слабого увеличения, комбинированные с окулярами слабого увеличения.

Для изготовления снимков слабого увеличения выпускают специальные объективы (см. стр. 16).

При слабом увеличении трудность представляет равномерное освещение объекта. Поскольку речь идет об освещении относительно большой поверхности (несколько $мм^2$ или даже $см^2$), широко распространенный классический принцип освещения по Кёлеру здесь не может быть применен. Выбор надо делать из возможностей освещения, изложенных на стр. 24. Равномерное освещение объектов при изготовлении макрофотоснимков обеспечивают специальные столики (рис. 66). Если объект освещается помещенным непосредственно под предметный столик источником света с большой поверхностью и диффузным светом, рекомендуется применять соответствующих размеров диафрагму (например вырезанную из черной бумаги) вместо удаленной диафрагмы поля для задержания ненужных периферических лучей. Пары объектив—окуляр слабого увеличения некоторых стереоскопических и препарационных микроскопов также пригодны для изготовления снимков слабого увеличения. Освещение проходящим светом обеспечивается специальным столиком со встроенным источником света, дающим равномерное распределение света на большой поверхности. Если мы не стремимся достичь стереоскопического эффекта, снимок можно изготовить с одного угла зрения посредством тубуса, выпускаемого специально для этой цели.

Вертикальной камерой «Стандард» (рис. 67) и объективом «М» производства К. Цейс (Йена) снимки изготовляются на цветной плоской пленке размером 9 × 12 см (цветн. иллюстр. III/1, 2).

Для изготовления снимков слабого увеличения размером в 6,5 × 9 см служит аппаратура производства К. Цейс (Оберкохен), с помощью 16, 25 и 40-миллиметровых объективов «Луминар» которой в негативной плоскости достигается увеличение 5 : 1 — 20 : 1.

Кроме того, аппарат для изготовления снимков слабого увеличения может быть составлен из малоформатной камеры «Экзакта Варекс IIa», объектива слабого увеличения и укороченного тубуса (рис. 68).

Фотографирование объективами, дающими увеличение 6,3 : 1—25 : 1, практикуется наиболее часто. Микрофотографии, сделанные таким путем, демонстрируют относительно большую область объекта (стало быть, определенные связи еще сохранились), но это увеличение уже обнаруживает структуры средней тонкости (цветн. иллюстр. IV/1—4 и V). В нормальной и патологической гистологии редко возникает такая тема, для которой не подходили бы снимки, изготовленные объективами с увеличением 20 : 1—25 : 1. Фотографирование клеток, клеточных ядер, микроорганизмов и т. д. требует, конечно, значительно более сильного увеличения. Темы, связанные со специальными методами исследования (например фотографирование цитологических препаратов), могут быть разрешены почти исключительно посредством иммерсионного увеличения.

Линзы с увеличением 40 : 1—63 : 1 представляют собой наиболее сильные сухие объективы, за которыми следуют иммерсионные объективы. Упомянутые объективы применяются для воспроизведения очень тонких деталей. Эти линзы выпускаются или с фиксированной оправой, или (соответственно толщине покровного стекла) с приспособляемой коррекционной оправой. Вследствие короткого фокусного расстояния указанных объективов дистанция от их фронтальной линзы до препарата очень мала, а их апертура достигает 0,75. Они чрезвычайно чувствительны к различиям в толщине покровного стекла препаратов. Если покровное стекло чересчур толстое или неправильно устанавливается коррекционная оправа, то результатом является дымчатый, матовый снимок (цветн. иллюстр. VI/1). Или удается соблюсти заданную толщину (0,17 мм) покровного стекла, или на коррекционной оправе объектива надо установить соответствующую данной толщине величину (цветн. иллюстр. VI/2). Для измерения толщины покровных стекол используют микрометры. Располагая опытом, оптимальное положение можно установить и без измерительного прибора — поворотом коррекционного кольца объектива, одновременно визуально контролируя изменения в качестве изображения. Существуют и такие объективы, которые используются для исследования препарата без покровного стекла.

Иммерсионные объективы в определенных пределах не чувствительны к толщине покровного стекла. Именно поэтому всегда следует обдумать, не является ли более целесообразным в данном случае применение иммерсионного объектива аналогичного увеличения (например 60 : 1), вместо сухого, когда это возможно в зависимости от характера препарата.

При помощи иммерсионных объективов с увеличением 90 : 1—100 : 1 при изучении и съемке тонких структурных элементов клеток и тканей можно обеспечить наиболее сильное увеличение и наилучшую разрешающую способность, достигаемые световым микроскопом. Своей максимальной мощности иммерсионные объективы способны достигать только вместе с конденсорными системами соответственно большой апертуры.

Важно, чтобы иммерсионная жидкость, используемая между объективом и препаратом, была чистой, без пузырьков и соответствующего показателя преломления. В определенных случаях необходимо поместить несколько капель иммерсионной жидкости и между конденсором и нижней поверхностью предметного стекла. Наиболее известной иммерсионной средой является кедровое масло, показатель преломления которого 1,515. Его недостаток состоит в том, что вследствие испарения растворителя оно относительно быстро густеет и при его удалении надо применять средства, которые не безразличны для склеивания линз. С более благоприятным результатом можно применять синтетические масла, имеющие подобный показатель преломления и хорошо сохраняющие вязкость. Исследование и фотографирование нормальных и патологических клеточных форм также осуществляется посредством иммерсионных объективов. Изготовление хорошего цитологического снимка требует большой осмотрительности. В первую очередь следует заботиться о безупречно приготовленном и окрашенном мазке. Хотя и с помощью малоформатного оборудования могут быть получены вполне пригодные снимки (цветн. иллюстр. VI/3, 4), все-таки лучший результат в этом случае обеспечивают фотоматериалы больших форматов (цветн. иллюстр. VI/5).

В связи с выбором размеров фотоматериала в случае изготовления снимков слабого увеличения, а также иммерсионных снимков целесообразно отдать предпочтение фотоматериалу больших размеров, тогда как для снимков, изготовляемых посредством сухих объективов среднего и сильного увеличения, рекомендуется малоформатная аппаратура.

ОСВЕЩЕНИЕ ПРОХОДЯЩИМ СВЕТОМ ПО МЕТОДУ ТЕМНОГО ПОЛЯ

Установка освещения темнопольными конденсорами (см. стр. 28) происходит следующим образом.

Центрировку источника света (подобно освещению по методу светлого поля) начинают светлопольным конденсором в соответствии с принципом Кёлера. Другая возможность: оптические элементы микроскопа (конденсор, объектив, окуляр) убираются, и центрировка источника света контролируется на матовом стекле, помещенном на тубус.

За этим следует временная установка препарата с помощью объектива и окуляра среднего увеличения. В случае применения иммерсионного конденсора между фронтальной линзой последнего и нижней поверхностью предметного стекла должна быть накапана иммерсионная жидкость.

Наблюдая в это время в микроскоп, можно видеть на темном фоне светлое кольцо или пятно, которые обычно располагаются эксцентрично, но с помощью конденсорного винта центрировки их можно переместить в центр поля.

При сильно суженной полевой диафрагме подъемом или опусканием конденсора надо добиваться того, чтобы светлая кольцевидная зона сузилась,

по возможности — до наименьшей светящейся точки (рис. 69). Начиная с этого момента, величина светящейся точки может изменяться в зависимости от положения диафрагмы поля. За этим следует применение необходимых для целей фотографирования объективов сильного увеличения. При использовании объективов, снабженных световой диафрагмой, нужно заботиться о том, чтобы диафрагма была в затянутом положении. Если к объективу принадлежит светозагораживающая воронка, то следует заботиться о размещении последней.

Заменив использованный до сих пор окуляр слабого увеличения типом, предназначенным для фотографирования, постепенно раскрываем диа-

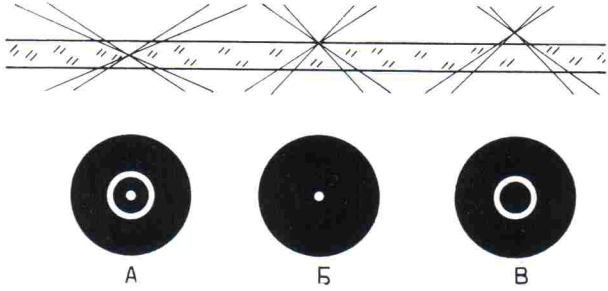


Рис. 69. Установка освещения по методу темного поля
А) низкое
Б) правильное } положение конденсора
В) высокое

фрагму. Это происходит до такой степени, пока на темном фоне не появиться изображение светящихся и сверкающих частиц препарата.

Если по указанной выше схеме соответствующий результат не достигается, то причиной этого может быть неадекватная толщина предметного или покровного стекол или препарата. Толщина предметного стекла должна быть около 1 мм, а покровного стекла — не более 0,17 мм. Для исследования по методу темного поля рекомендуется готовить, по возможности, самые тонкие препараты, которые должны быть свободны от пыли и других загрязнений.

Применяя освещение по методу темного поля, можно готовить и цветные снимки, которые отличаются брильянтностью цветов и богатством деталей (цветн. иллюстр. VI/4 и VII/4).

Время экспозиции при фотографировании определяется в соответствии с принципами, изложенными на странице 81.

ФАЗОВОКОНТРАСТНОЕ ОСВЕЩЕНИЕ ПРОХОДЯЩИМ СВЕТОМ

Практически штатив любого современного микроскопа может быть приспособлен для фазовоконтрастных исследований с помощью фазовоконтрастных объективов и фазовоконтрастных конденсоров (см. стр. 29).

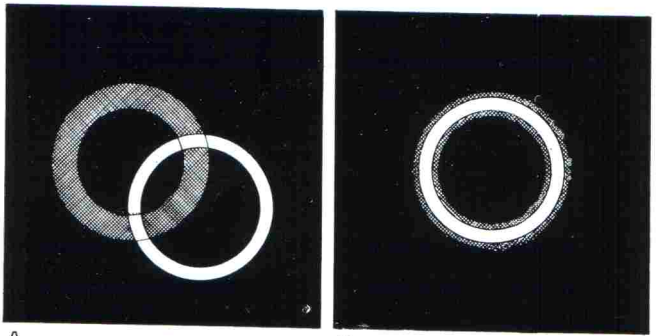


Рис. 70. Центрировка кольцевидной фазовой пластинки объектива и кольцевой диафрагмы конденсора фазовоконтрастного устройства, что производится посредством вспомогательного микроскопа. Светлое кольцо — спроецированная кольцевая диафрагма конденсора, серое кольцо — фазовая пластинка объектива
А) неправильная установка, Б) правильная установка

Установка микроскопа, оснащенного вращающимся фазовоконтрастным конденсором, производится следующим образом.

Фазовоконтрастные объективы и выбранный окуляр помещаются в микроскопе.

С помощью обычного конденсора Аббе устанавливается освещение соответственно принципу Кёлера, затем полностью раскрывается апертурная диафрагма.

Вместо окуляра устанавливается вспомогательный микроскоп, посредством которого можно наблюдать заднюю фокальную плоскость объектива.

Поворотом регулируемой части вспомогательного микроскопа наводится на резкость фазовая пластинка объектива. Функцию, подобную таковой вспомогательного микроскопа, выполняет вспомогательная линза устройства «Оптовар» (см. рис. 2). На фазовоконтрастном конденсоре устанавливается кольцевая диафрагма, соответствующая применяемому объективу. Глядя во вспомогательный микроскоп, можно видеть, что изображение кольцевой диафрагмы тоже появляется в поле.

Посредством центрировочных конденсорных винтов изображение фазовой пластинки совмещают с изображением кольцевой диафрагмы (рис. 70).

Наконец, вспомогательный микроскоп заменяется предназначаемым для исследования или фотографирования окуляром.

Совмещение изображений фазовой пластинки и кольцевой диафрагмы должно контролироваться при каждой замене объектива. Зеленый фильтр, принадлежащий к фазовоконтрастному устройству, в случае цветного фотографирования не используется.

На микроскопе, снабженном панкратическим конденсором, применением единственной кольцевой диафрагмы может быть установлено изображение кольцевой диафрагмы соответствующего диаметра для любого фазово-контрастного объектива. Дополненные соответствующими объективами конденсоры «Гейне» производства Э. Лейц (Вецлар) (см. рис. 16) и «Полифос» производства Рейхерт (Вена) также используются для осуществления фазовоконтрастного освещения. Во время съемки апертурная диафрагма теряет свою функцию, так как количество света, падающего на препарат, определяется диаметром кольцевой диафрагмы. Из-за этого может иметь место некоторое уменьшение световой интенсивности, поэтому рекомендуется применение микроскопной лампы большой мощности.

При изготовлении препаратов надо следить за тем, чтобы последние были достаточно тонкими. Предпосылкой успешного фотографирования является соответствующая разница в показателях преломления покровного материала и препарата.

Предпочтение отдается цветным фотоматериалам, дающим высокий контраст.

Для изготовления цветных снимков фазовоконтрастным микроскопом наиболее пригодны те объекты, в которых наряду с интенсивно окрашивающимися деталями (амплитудные объекты) имеются и слабо окрашивающиеся или вообще не окрашивающиеся части (фазовые объекты).

Фазовоконтрастный эффект (цветн. иллюстр. VII/2) может быть особенно наглядно продемонстрирован при сопоставлении его с изображениями, полученными с того же объекта, но другими методами исследования (цветн. иллюстр. VII/1, 3, 4).

ФОТОГРАФИРОВАНИЕ В ПАДАЮЩЕМ СВЕТЕ

Падающим светом исследуются те объекты, через которые свет не проникает, то есть непрозрачные объекты. Хотя микроскопы с верхним освещением наиболее широко распространены для исследования металлических поверхностей, горных пород, волокон текстильных тканей, пластмассы, их используют и в медицинской и биологической практике для исследования эмбриональных тканей, сосудов, костей, поверхностей органов и кожи и т. д. Метод применим как в исследованиях по методам светлого и темного полей, так и в фазовоконтрастных исследованиях. Для исследований в падающем свете медицинских или биологических препаратов чаще всего применяется аппаратура, дающая косое освещение или освещение по методу темного поля.

В определенных случаях даже стереоскопический микроскоп может быть использован с верхним освещением.

При слабом увеличении простым и хорошим методом является косое освещение исследуемого объекта одной или несколькими лампами сосре-

доточенного света. Таким способом можно получить пластическое изображение (цветн. иллюстр. VII/6). Для обзорных снимков, а также снимков слабого увеличения выпускаются устройства, обеспечивающие кольцевое верхнее освещение (рис. 71). Среди медицинских и биологических препаратов почти не встречаются такие совершенно плоские поверхности, при которых применение объектива сильного увеличения не сопровождалось бы ухудшением глубины резкости. Поэтому рекомендуется использование объективов слабого и умеренного увеличения. Для целей цветного фотографирования можно рекомендовать мощные лампы накаливания или ксеноновые лампы. При флуоресцентномикроскопических исследованиях с верхним освещением целесообразно применение дуговых источников света или ртутных ламп высокого давления.

Аппарат «Ультропак» фирмы Э. Лейц (Вецлар) (подробности см. на стр. 34) может быть использован и в микрофотографическом оборудовании, со встроенным мощным световым источником (рис. 72). Таким путем обеспечивается и интенсивное освещение, необходимое для производства цветного снимка (цветн. иллюстр. VIII/1).

Другим аппаратом, использующим верхнее освещение, является кольпомикроскоп, который главным образом применяется для исследования влагалища и шейки матки. Для фотографирования камеры различного

Рис. 71. Камерный микроскоп «Панфот» с «макроконцентрическим» верхним освещением — выпускает Э. Лейц (Вецлар)

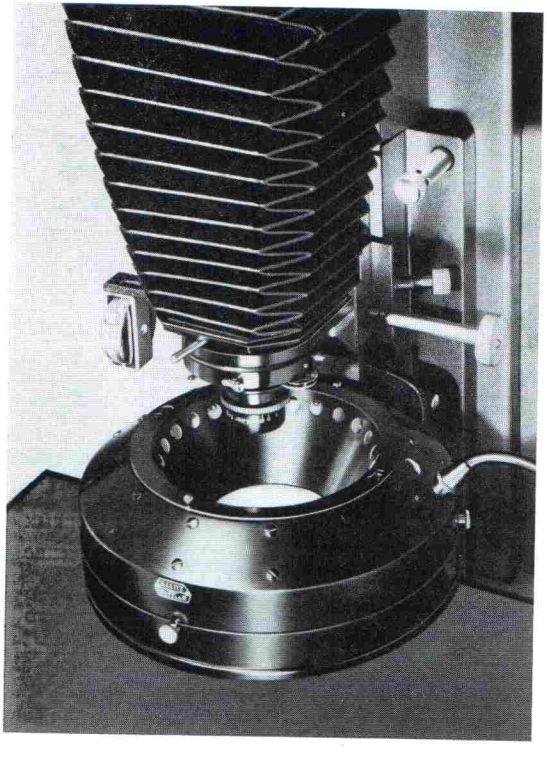
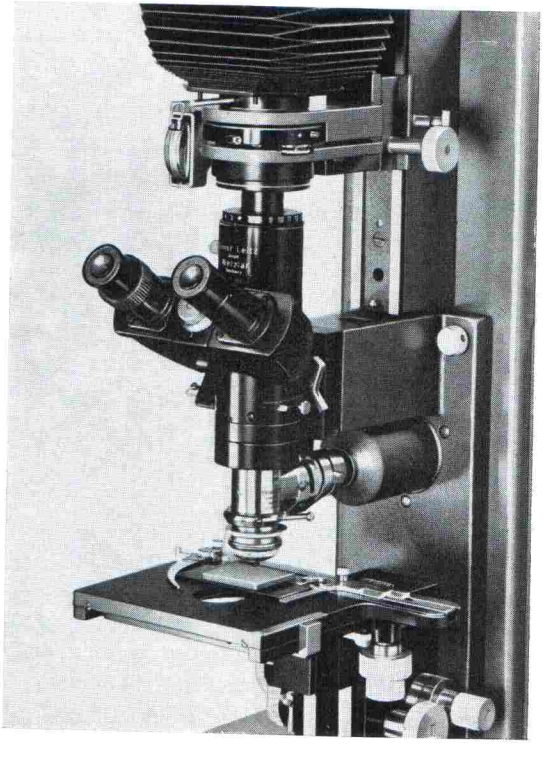


Рис. 72. Камерный микроскоп «Панфот» с устройством «Ультропак» — выпускает Э. Лейц (Вецлар)



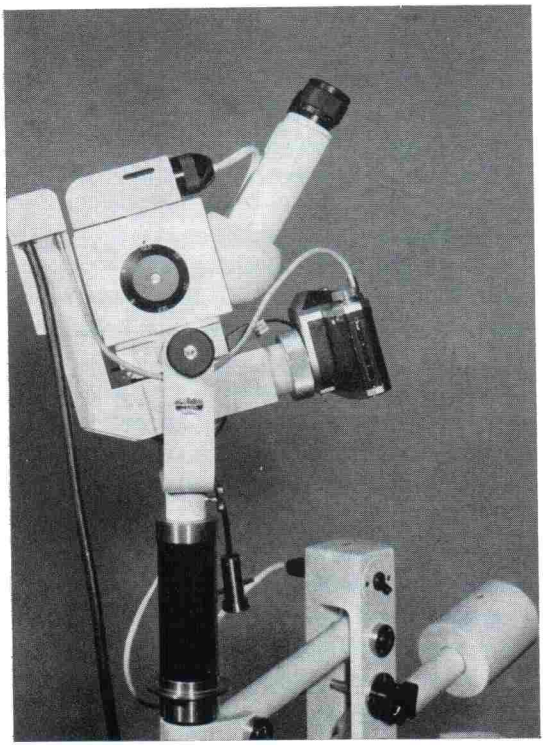


Рис. 73. «Кольпоскоп III» с фотоустройством — выпускает К. Цейс (Йена)

производства с щелевым затвором и сменным объективом могут быть установлены на аппарат посредством присоединительных колец. Установка области, подлежащей фотографированию, происходит с помощью лампы, дающей концентрированный свет, и коаксиально соединенного с ней кольцевидного ксенонового источника света, обеспечивающего освещение необходимой интенсивности (рис. 73).

Операционный микроскоп по существу представляет собой специально сконструированный стереоскопический микроскоп с верхним освещением, который может быть установлен над областью операции с помощью специальной опоры. Он может оказать помощь при глазных, ушных и других, требующих тончайшей работы операциях. Фотографирование осуществляется соответственно принципам, описанным в отношении кольпомикроскопии.

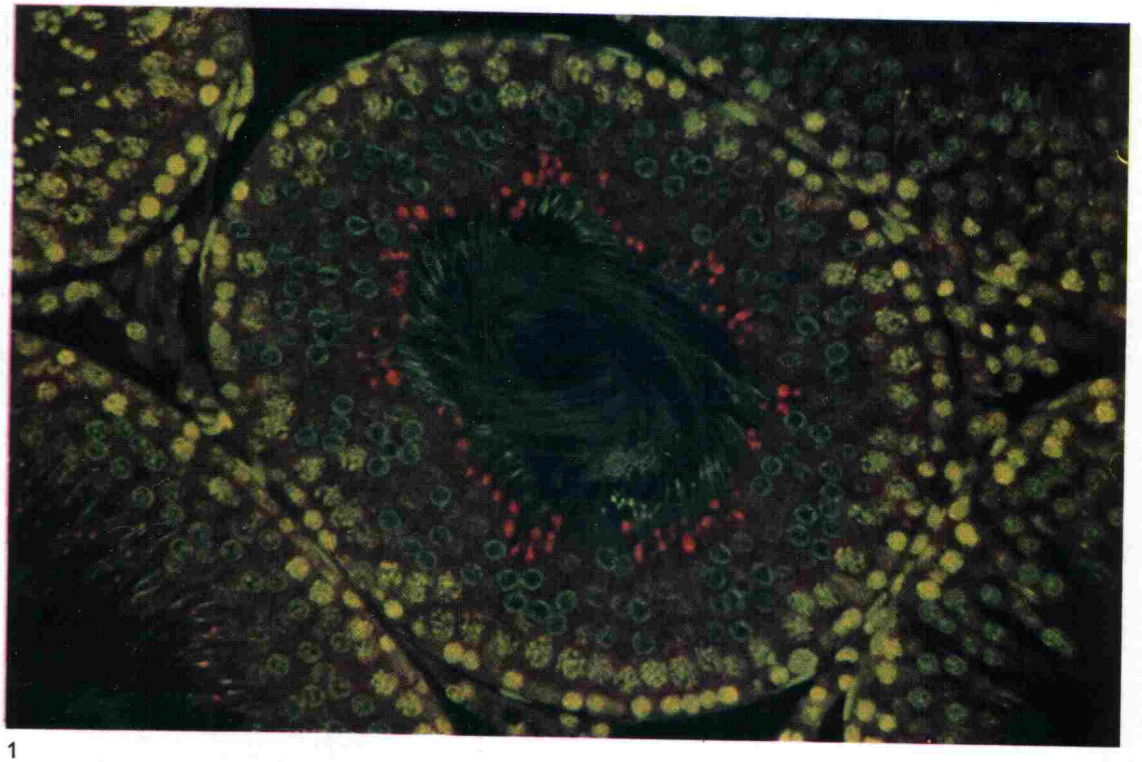
Капиллярный микроскоп, который тоже работает в падающем свете, служит для исследования подкожных капилляров и капиллярной крови. С целью устранения светорефлексов, мешающих съемке, исследуемый участок кожи рекомендуется покрыть смесью, состоящей из равных количеств кедрового и гвоздичного масел.

В аппаратуре, работающей при верхнем освещении, для преодоления световых рефлексов могут быть применены поляризационные фильтры, (цветн. иллюстр. VII/5), однако света, отражаемого металлическими поверхностями, нельзя погасить и поляризационным фильтром.

→

Рис. 1. Флуоресцентный микроскопический снимок, изготовленный с тестикулярных проходов крысы. *Флуорохром:* акридин-оранж. *Объектив:* флуорит 16/0,32. Увеличение = 350 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Агфаколор CN 17»

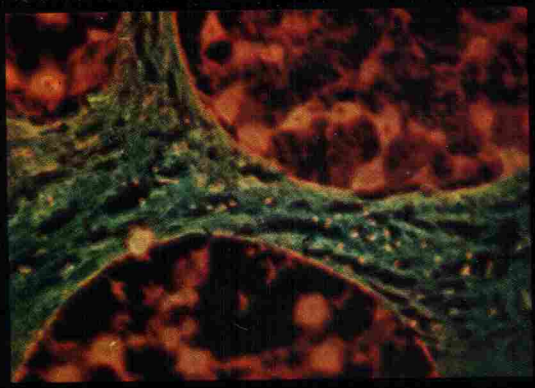
Рис. 2. Флуоресцентный микроскопический снимок, выполненный с предшествующего препарата. *Объектив:* флуорит 40/0,75. Увеличение = 850 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Агфаколор CN 17»



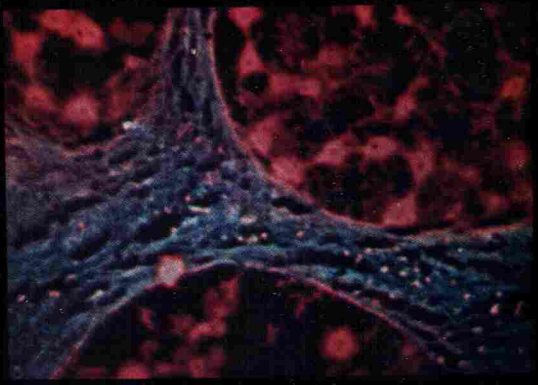
1



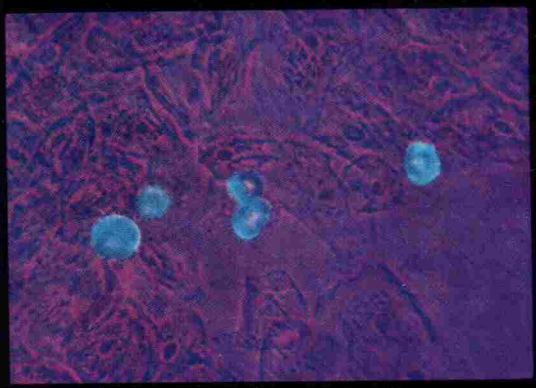
2



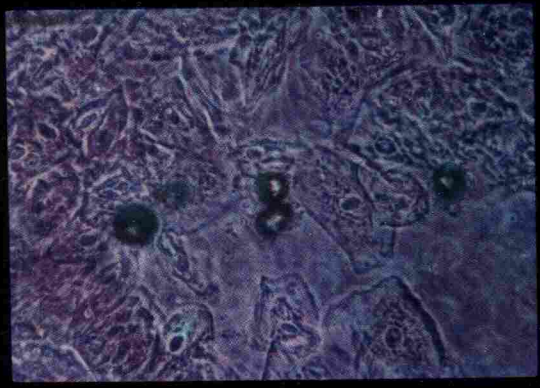
1



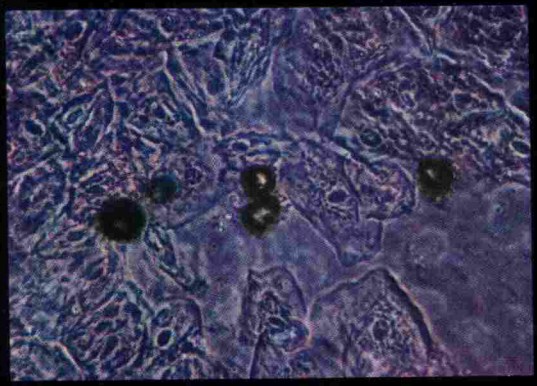
2



3



4



5



6

ФОТОГРАФИРОВАНИЕ ПРИ СМЕШАННОМ СВЕТЕ

Освещение обзорных снимков смешанным светом становится возможным при совместном использовании столиков с вмонтированным источником света, дающим проходящий свет, и приспособлений, обеспечивающих верхнее освещение (цветн. иллюстр. VIII/2).

В случае изготовления снимков малого, умеренного и сильного увеличения смешанное освещение обеспечивают многочисленные фирменные устройства (например см. рис. 20).

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕЦИАЛЬНЫХ МЕТОДОВ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ФОТОГРАФИРОВАНИЕ НАБЛЮДАЕМОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ

МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Флуоресцентный микроскоп предназначается для исследования микроскопических объектов, освещенных коротковолновыми лучами видимого спектра и длинноволновыми — из ультрафиолетовой части спектра.

Несмотря на то, что волновой состав ультрафиолетовых лучей распространяется от фиолетовой части видимого спектра до длинноволновых рентгеновских лучей, флуоресцентный микроскоп использует из этих лучей только упомянутую выше фазу. Обыкновенное стекло поглощает коротковолновые ультрафиолетовые лучи, кварц — пропускает их. Коротковолновое ультрафиолетовое излучение для глаза является невидимым, однако, может стать видимым с помощью флуоресцирующих, а также светочувствительных фотоматериалов.

Многочисленные объекты, подвергающиеся исследованию (сюда относятся и биологические препараты), флуоресцируют и без всякой обработки,

←

Рис. 1—2. Сопоставление флуоресцентномикроскопических снимков. 1) Снимок, изготовленный на пленку дневного типа, соответствует действительности в цветовом отношении. 2) Цвета на пленке для искусственного света «холодные». *Объект:* грибки (cryptococcus neoformans) в ткани человеческого мозга. *Окрашивание:* акридин-оранж. *Объектив:* флуорит 16/0,32. Увеличение = 240 : 1. *Фотоматериал:* обратимая пленка «Орвоколор UT 16» и «Орвоколор UK 14»

Рис. 3—6. Одновременный контрастный флуоресцентный эффект. Модель, служащая для целей демонстрации, содержит кристаллическую органическую субстанцию и эпителиальные клетки. На действие возбуждающих УФ лучей кристаллические субстанции (круглые формации) флуоресцируют в сине-зеленом цвете. Эпителиальные клетки, освещенные видимым светом, в зависимости от интенсивности и цвета источника света обусловливают различный фазовоконтрастный эффект. Снимки были изготовлены микроскопом «Зетопан», снабженным световым источником «Бинолюкс» и контрастным флуоресцентным конденсором фирмы Рейхерт. *Объектив:* Ph 16/0,32. Увеличение = 160 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16»

в естественном состоянии. Это явление — первичная, или собственная флуоресценция. Слабо флуоресцирующие материалы после обработки так называемыми флуорохромными веществами могут иметь отчетливую флуоресценцию. Это явление — вторичная флуоресценция. Флуорохромные вещества, в противоположность обычным краскам, могут быть использованы уже в малой концентрации ($1 : 10^4 — 1 : 10^6$), итак, благодаря их относительно сильному разбавлению, становится возможным и исследование живых клеток (витальная флуоресценция).

На основе исследований Хайтингера, Хамперла и других известен целый ряд различных флуорохромных веществ для целей тканевого окрашивания, отчасти — основной, отчасти — кислой и нейтральной реакции. Наиболее широко применяемые флуорохромные вещества:

Акридиновый желтый	Фуксин
Акридин-оранж NO	Геранин G
Аминотерефталевая кислота	Магдалрот
Аурамин	Метиловый зеленый OO
Аурофосфин G	Морин
Берберинсульфат	Нейтралрот B экстра
Бриллантдианил зеленый G	Фосфин 3 R
Бриллантфосфин G экстра	Примулин
Бриллантсульфофлавин	Пиронин
Келидониум экстракт	Родамин B
Хлорофилл экстракт	Родамин 6 G
Хорифосфин O	Тиазинрот R
Эухризин 2 GNX	Тиофлавин S

Для флуоресцентных исследований лучше всего подходит свежий, фиксированный в течение короткого времени материал. Успешно применяемые фиксаторы: формалин и смесь Карнуа. Флуорохромом обрабатывают чаще всего срезы, приготовленные из замороженного или залитого в парафин материала.

Известны многочисленные процессы для специфического выявления различных видов тканей и клеточных органелл в человеческих и животных тканях.

Обработанные флуорохромным раствором акридин-оранжа NO, хорифосфина O, фосфина 3 R или эухризина 2 GNX в разведении 1 : 10 000 клеточные ядра выделяются желтым цветом.

Для выявления жира могут быть одинаково успешно применимы водные растворы фосфина 3 R, примулина O и тиофлавина S в разведении 1 : 10 000. Первые две краски дают окрашивание в зеленый цвет, последняя — в темно-синий.

Лейкоциты и лимфоциты окрашиваются в оранжевый или желтый цвет в результате обработки растворами хорифосфина O, эухризина 2 GNX или тиофлавина S при разбавлении 1 : 1000.

Выявление сывороточных белков, выделяющихся из капилляров и появляющихся в тканях в случаях серозных воспалений, осуществляется с помощью эухризина 2 GNX и тиазинрота R.

Результат: зеленые и желто-зеленые ядра, соединительная ткань — желто-зеленого и бледнорозового цвета, мышечные клетки — голубые, вышеидий сывороточный белок — коричнево-красный.

Флуоресцентномикроскопическая техника может быть широко применена в бактериологической, паразитологической работе, а также в вирусологических исследованиях. Здесь следует упомянуть о разработанной Келлером — первоначально для быстрого и простого выявления микобактерий туберкулеза — так называемой синесветовой технике, которую развили дальше и широко применяют и сегодня. При этом методе пригодна и обычная микроскопная лампа, если используются синий возбуждающий и оранжево-желтый абсорбирующий фильтры (см. таблицу VI).

Таблица VI

Фильтры, используемые для целей флуоресцентной микроскопии

Возбуждающие фильтры, пропускающие ультрафиолетовые и синие лучи		
Обозначение		Эффект
Шотт	UG 1	Пропускает ультрафиолетовые, видимые фиолетовые и крайние красные лучи
Шотт	UG 2	Как и UG 1, но пропускает меньше видимых фиолетовых лучей
Шотт	BG 3	Синий фильтр, пропускающий ультрафиолетовые и крайние красные лучи
Шотт	BG 12	Как и BG 3, с сильным поглощением крайних красных лучей
Корнинг	№ 5860	Частично пропускает ультрафиолетовые лучи и поглощает видимые фиолетовые и крайние красные
Корнинг	№ 5850	Фильтр, пропускающий ультрафиолетовые, видимые фиолетовые и крайние красные лучи
Корнинг	№ 5874	Умеренно пропускает ультрафиолетовые лучи, видимые фиолетовые — в следах, крайние красные — слабо
Корнинг	№ 9863	Сильно пропускает ультрафиолетовые лучи, видимые фиолетовые — слабо, крайние красные — умеренно
Корнинг	№ 5330	Синий фильтр, пропускающий ультрафиолетовые и крайние красные лучи

Таблица VI (продолжение)

Обозначение		Эффект
Возбуждающие фильтры, пропускающие ультрафиолетовые и синие лучи		
Корнинг	№ 5562	Как и № 5330, с сильным поглощением крайних красных лучей
Кодак Вратten	18A	Пропускает ультрафиолетовые лучи. Видимые лучи поглощает за исключением некоторых крайних
Кодак Вратten	18B	Пропускает ультрафиолетовые лучи. Видимые лучи поглощает за исключением некоторых фиолетовых и крайних красных лучей
Кодак Вратten Кодак Вратten	49 50	Синие фильтры, пропускающие видимые ультрафиолетовые лучи
Абсорбирующие фильтры, задерживающие ультрафиолетовые и синие лучи		
Шотт	GG 13	Абсорбирует ультрафиолетовые лучи. В комбинации с BG 3 и BG 12 применим в витальной флуоресцентной микроскопии для образования излучения, свободного от ультрафиолетового
Шотт	GG 9	Абсорбирует близкую к ультрафиолетовой радиацию
Шотт	GG 4	Используется для абсорбции ультрафиолетовой радиации при флуоресцентной микроскопии
Шотт	GG 10	Для абсорбции ультрафиолетовой радиации
Корнинг	№ 3060	Фильтр, абсорбирующий близкую к ультрафиолетовой радиацию и пропускающий видимые лучи
Кодак Вратten	2B	Желатиновый фильтр, абсорбирующий ультрафиолетовые и пропускающий видимые лучи
Кодак Вратten	15G	Абсорбирует близкую к ультрафиолетовой радиацию и пропускает видимые лучи
Теплофильтры		
Раствор сульфата меди		В 4%-ной концентрации, растворенный в дистиллированной воде, в кювете толщиной в 50 мм абсорбирует большую часть тепловой радиации

Таблица VI (продолжение)

Теплофильтры		
Обозначение		Эффект
Шотт	KG 2	Обеспечивает защиту теплочувствительных препаратов от инфракрасного излучения
Бальцерс	Кальфлекс	Обеспечивает надежную защиту от тепловой радиации комбинацией абсорбционного и интерференционного действия светофильтра
Лучезаглушающий фильтр		
Шотт	NG 10	Применяется для заглушения света флуоресцентного светового источника
Фильтр из уранового стекла		
Шотт	GG 17	Сильно флуоресцирующий фильтр, облегчающий центрировку лучевого источника флуоресцентного микроскопа

Флуоресцентномикроскопический метод может применяться и в диагностике рака. Берталанфи (1961) продемонстрировал с помощью забуференного раствора акридин-оранжа разницу в цвете между раковыми и не пораженными раком клетками. Этот факт объясняет содержанием в клетках различной рибонуклеиновой кислоты.

Посредством так называемого метода Кунса в бактериологии, протозоологии, вирусологии, а также микологии возможно выявление специфических антигенов. Наиболее важными флуорохромными веществами, применяемыми при этом методе, являются следующие:

1-диметиламинонафталин-сульфокислый хлорид-5 (DANS),
флуоресцеинизотиоцианат (FITC),
лиссамин-родамин B 200 (RB 200).

Из методов флуоресцентной микроскопии метод Кунса требует наибольшей тщательности, опыта и знания литературы.

Волновой состав источников излучения, используемых для целей флуоресцентномикроскопических исследований, находится между 300—400 ммк, но иногда применяют и коротковолновую часть видимого спектра.

Особенно раньше, но еще и сейчас в качестве источника излучения используется угольная дуговая лампа (см. стр. 38). Ее спектральный цветовой состав богат ультрафиолетовым излучением, меняющимся в зависимости от качества угля.

Широко применяется ртутная лампа высокого давления, которая вследствие благоприятного спектрального цветового состава (см. рис. 23) пригодна в качестве источника света при флуоресцентной микроскопии.

Общий закон фотохимии, что эффективным является только поглощенный свет, действителен и для флуоресценции. Поэтому исследуемый препарат освещается светом, длина волны которого абсорбируется больше всего. Видимая часть источника излучения устраняется посредством соответствующих селективных светофильтров. Упомянутые фильтры в практике флуоресцентной микроскопии известны как возбуждающие фильтры.

В настоящее время обычно используются стеклянные фильтры. Они пропускают и длинноволновое красное излучение. Это излучение, с одной стороны, нагревает, с другой — мешает наблюдению. С целью уменьшения длинноволнового излучения рекомендуется использовать теплозащитные фильтры (см. таблицу VI).

Микроскопические препараты абсорбируют только некоторую часть возбуждающих коротковолновых лучей, большая же часть излучения через микроскоп попадает в глаз исследователя или на светочувствительный фотоматериал. Для устранения этого излучения применяют так называемые барьерные фильтры (см. таблицу VI). Последние должны максимально абсорбировать возбуждающие лучи, а флуоресценцию препарата — в минимальной степени. Поскольку применяемые возбуждающие фильтры требуют использования барьерных фильтров, выбор последних также является важным. Барьерные фильтры целесообразно установить между объективом и окуляром, хотя при необходимости можно поместить их и над окуляром.

Устройство, оснащенное барьерными фильтрами производства К. Цейс (Оберкохен), может применяться универсально, так как с помощью двух вращающихся дисков на пути лучей могут быть помещены различные барьерные фильтры или комбинации фильтров. Фирма Рейхерт (Вена) для целей флуоресцентной микроскопии выпускает объективы типа «*fl UV*», со специальным стеклом или барьерным фильтром, абсорбирующим ультрафиолетовые лучи.

При изготовлении препаратов следует применять свободные от флуоресценции предметные и покровные стекла, а также материалы для заливки. При иммерсионных исследованиях нужно следить за тем, чтобы и иммерсионная жидкость была свободной от флуоресценции. Иммерсионная жидкость, свободная от флуоресценции и имеющая показатель преломления 1,515, применяется для исследования препарата вместе с покровным стеклом, жидкость же с показателем преломления 1,52 применяется для исследования препаратов без покровного стекла.

В течение многих десятилетий успешно использовался флуоресцентномикроскопический аппарат с угольным дуговым источником света; теперь наряду с выпуском этого аппарата некоторые фирмы все больше внедряют в производство приборы с ртутной лампой высокого давления.

Со времени открытия флуоресцентносерологической реакции антиген-антитело по Кунсу и введения ее в практику флуоресцентной микроскопии стала возможной внутриклеточная и гистологическая локализация флуоресцирующих частиц, хотя при этом имеется много технических трудностей, так как, соответственно классическому методу, часто приходится прерывать флуоресцентномикроскопическое наблюдение и продолжать его другими методами (темнопольный, фазовоконтрастный микроскоп). Это довольно кропотливая и требующая много времени работа. Так называемый контрастнофлуоресцентный процесс упрощает эту процедуру.

Для контрастнофлуоресцентной микроскопии применяется микроскоп «Зетопан» фирмы Рейхерт (Вена), снабженный источником света «Бинолюкс» (рис. 74). В его комбинированном корпусе светильника имеется ртутная лампа высокого давления «Осрам HBO 200 вт» и низковольтная лампа накаливания 30 вт. Одно из двух его зеркал полностью отражает свет, другое — частично пропускает, а частично отражает его. В зависимости от того, какое зеркало помещается на пути лучей, два источника света могут применяться каждый отдельно (рис. 75,а и б) или вместе (рис. 75,в). Область вокруг кольцевой диафрагмы специального фазовоконтрастного конденсора микроскопа не пропускает видимых лучей, однако ультрафиолетовые лучи проходят через нее. Кольцевая диафрагма (с соответствующими объективами) служит для получения фазовоконтрастного изображения, в то время как все отверстие конденсора практически свободно в отношении возбуждающих лучей. Аппаратом можно добиться как позитивного, так и негативного фазовоконтрастного эффекта. Он снабжен возбуждающими, тепловыми и барьерными фильтрами, а также фильтрами, помещаемыми перед низковольтной лампой. Смонтированный на высоте объектива оранжево-желтый защитный фильтр служит для задержания рассеянных ультрафиолетовых лучей, идущих с препарата и оказывающих вредное воздействие на глаз исследователя. Если перед низковольтной лампой поместить цветной фильтр, цвет которого отличается от цвета флуоресцирующих частиц препарата, например, в случае зеленой флуоресценции — красный цвет, то контраст лучше бросается в глаза. С ослаблением света низковольтных ламп накаливания или выключением последних нефлуоресцирующие частицы вначале тускнеют, а затем исчезают. Таким путем с помощью прибора возможна одновременная идентификация и локализация флуоресцирующих и не показывающих флуоресценцию частиц препарата (цветн. иллюстр. X/3 — 6). Флуоресцентносерологические реакции различных грибов, клеток и тканей, полученные с помощью упомянутого аппарата, описали Кунц, Габлер и Герцог.

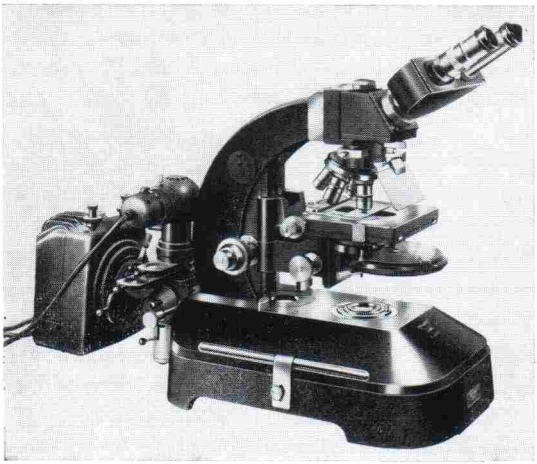
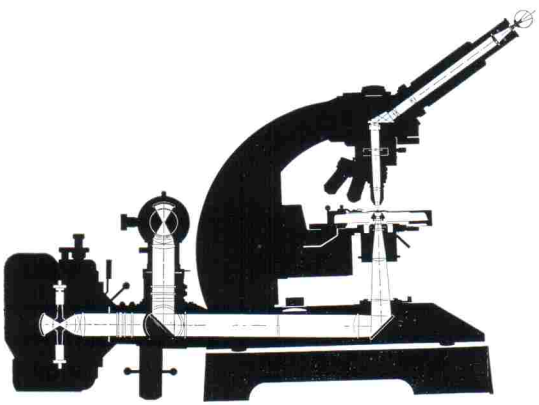
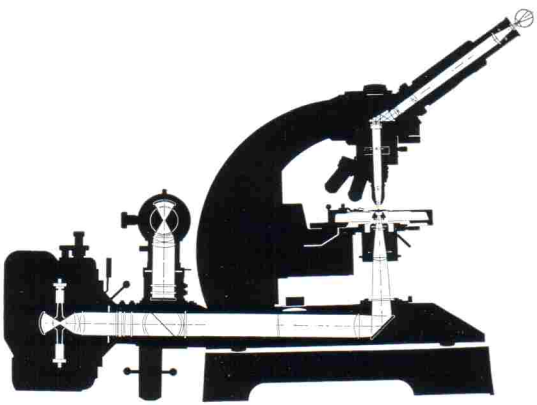


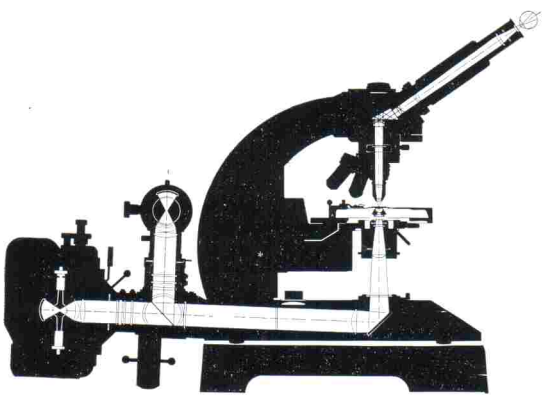
Рис. 74. Флуоресцентное устройство, работающее с источником света «Бинолюкс» на ртутной лампе высокого давления «НВО 200 вт» и 30 вт-ной низковольтной лампе накаливания, с микроскопом «Зетопан» и контрастнофлуоресцентным конденсором. Выпускает К. Рейхерт (Вена)



а



б



в

Рис. 75. Ход лучей в большом флуоресцентном устройстве «Зетопан» с источником света «Бинолюкс», выпускает К. Рейхерт (Вена)

а) освещение только низковольтной лампой накаливания;

б) освещение только ртутной лампой высокого давления;

в) комбинированное освещение, при котором лучи низковольтной лампы накаливания смешиваются с таковыми ртутной лампы высокого давления

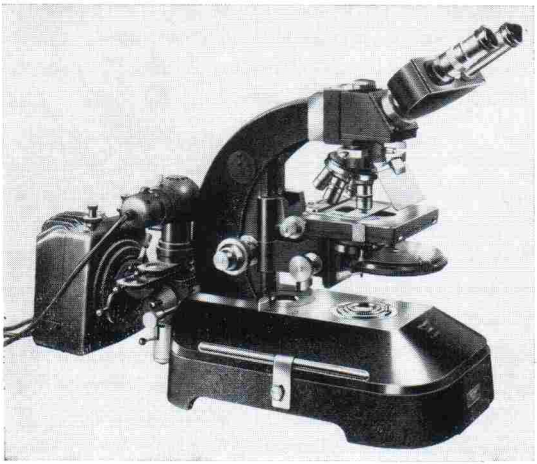
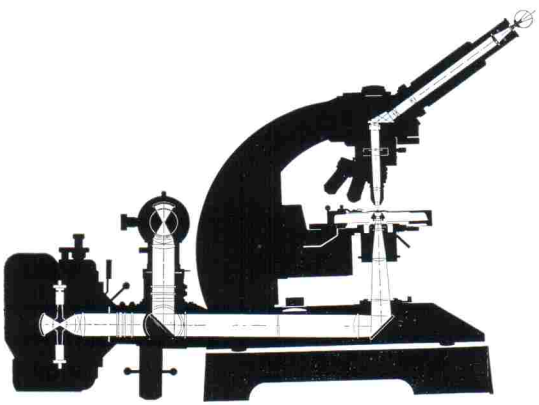
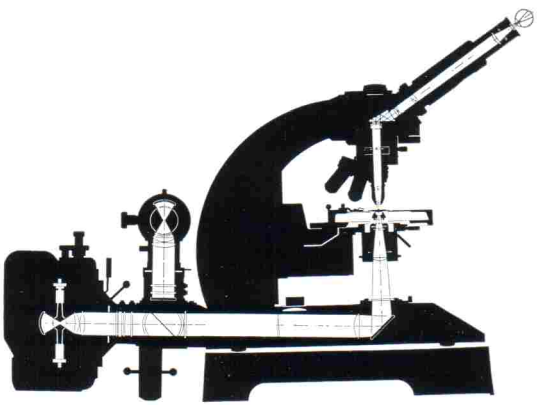


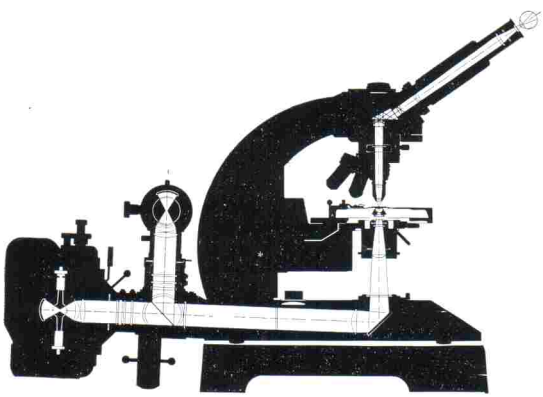
Рис. 74. Флуоресцентное устройство, работающее с источником света «Бинолюкс» на ртутной лампе высокого давления «НВО 200 вт» и 30 вт-ной низковольтной лампе накаливания, с микроскопом «Зетопан» и контрастнофлуоресцентным конденсором. Выпускает К. Рейхерт (Вена)



а



б



в

Рис. 75. Ход лучей в большом флуоресцентном устройстве «Зетопан» с источником света «Бинолюкс», выпускает К. Рейхерт (Вена)

а) освещение только низковольтной лампой накаливания;

б) освещение только ртутной лампой высокого давления;

в) комбинированное освещение, при котором лучи низковольтной лампы накаливания смешиваются с таковыми ртутной лампы высокого давления

Аппарат в сочетании со специальным апланатическим темнопольным конденсором можно применять также для флуоресцентных исследований по методу темного поля.

«Фотомикроскоп» производства К. Цейс (Оберкохен) также может работать на смешанном свете. С лампой «HBO 200 вт» он использует 65% ультрафиолетового света, с низковольтной лампой в 60 вт — 0—6%. В связи с этим аппаратом нужно отметить известные работы Готтшевского, который провел исследования на личинках дрозофилы.

Несмотря на применяемые интенсивные источники света, изображение, достигаемое посредством различных типов флуоресцентного оборудования, сравнительно бедно светом. Это доказывается и тем фактом, что во время съемки, если применяется дуговой источник света, время экспозиции составляет примерно 15 — 60 мин, а в случае ртутной лампы — приблизительно 1—15 мин. При микрофотографировании особенно важна тщательная установка источника света.

В интересах сокращения сравнительно длинной выдержки применяются конденсоры и объективы большой апертуры, а также окуляры малого увеличения. По возможности, следует применять малоформатную микрофотонасадку с коротким мехом. Размеры кадра в 24 × 36 мм в противоположность размерам кадров в 9 × 12 см обеспечивают возможность сокращения времени экспозиции в пропорции 1 : 12. Из-за световой бедности изображения, видимого в флуоресцентном микроскопе, предпочтение отдается тем устройствам (видоискателям, приспособлениям для установки), в которых интенсивность проектирующих лучей претерпевает изменения лишь в небольшой степени. Именно поэтому трудно установить резкость изображения в видоискателях зеркальных камер и в других фокусирующих системах с матовым стеклом. Для флуоресцентномикроскопического фотографирования успешно применяется сменный микрофототубус производства К. Цейс (Йена), так как с помощью его отклоняющей призмы изображение без потери света направляется в камеру или видоискатель.

Определение времени экспозиции или измерение его приборами возможно посредством чувствительных фотоэлементов или фотоумножателей с мощными усилителями. Несмотря на это, по причинам, упомянутым на стр. 81, при определении выдержки необходимо считаться и с факторами коррекции.

Флуоресцентное оборудование, выпускаемое фирмой Э. Лейц (Вецлар) (рис. 76), позволяет делать нормально выдержанные снимки и с флуоресцентномикроскопических препаратов при помощи насадочной камеры «Ортомат», автоматически регулирующей время выдержки. Конструкция корпуса его лампы позволяет наблюдение препаратов как в проходящем свете, так и при верхнем освещении. Может быть использован с любым типом ртутной лампы высокого давления мощностью до 250 вт.

Если нет в распоряжении измерительных приборов, пробные снимки могут быть сделаны на черно-белую пленку с чувствительностью, подобной таковой применяемого цветного фотоматериала, или на цветную пленку. Хотя

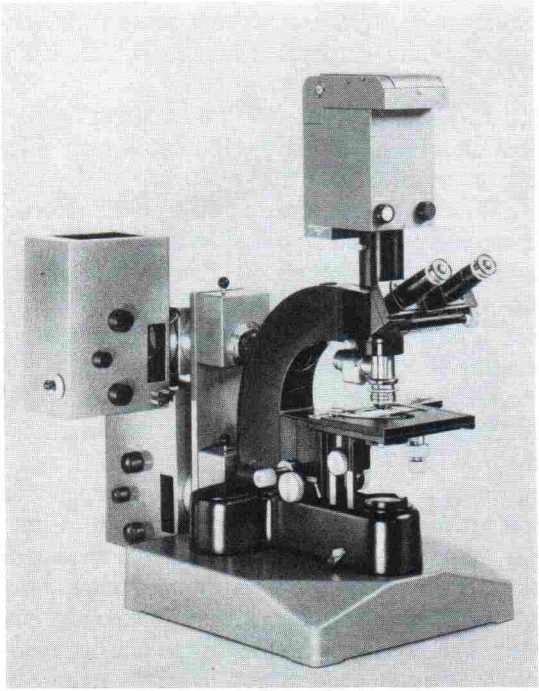


Рис. 76. Флуоресцентное устройство «Ортолюкс» для освещения проходящим и падающим светом, работает на ртутной лампе высокого давления, с автоматически регулирующей освещение насадкой «Ортомат», смонтированной на микроскопе. Выпускает Э. Лейц (Вецлар)

последнее является довольно трудоемким процессом, все-таки рекомендуется, так как располагая «измеренными» данными, с этого момента можно уверенно работать с 1 — 2 экспозициями.

Некоторые препараты, окрашенные флуорохромами, под влиянием возбуждающего излучения быстро выцветают. Именно поэтому продолжительную процедуру центрировки и установки света следует проводить не с препаратами, предназначенными для фотографирования.

Из цветных обратимых и цветных негативных пленок в первую очередь рекомендуется материал дневного типа (цветн. иллюстр. X/1). На пленках для искусственного освещения возникают отличающиеся от действительности, «холодные» цветовые тона (цветн. иллюстр. X/2). В принципе пленки для искусственного освещения могут быть использованы с оранжево-красными конверсионными фильтрами, однако на практике автофлуоресценция упомянутых фильтров часто представляет собой помеху. Если конверсионные фильтры располагать после барьерных, то опасность автофлуоресценции становится меньше.

Известны цветные негативные пленки, которые благодаря своей чувствительности могут быть успешно применены как в дневном, так и в искусственном свете. Например, пленки типа «Агфа CN 17» и «Орвоколор NC 16» можно использовать прямо, без каких-либо фильтров, поскольку впоследствии коррекционными фильтрами можно добиться правильного цвета изображения (цветн. иллюстр. IX/1, 2).

Негативные пленки, содержащие автоматический цветной маск-компонент, за счет их высокой цветоселекции особенно рекомендуются для изготовления флуоресцентномикроскопических снимков.

На безупречном флуоресцентномикроскопическом цветном снимке фон представляется бархатным в глубоком черном цвете, а препарат «светится»

одним или многими цветами. Исключение представляют те случаи, при которых автофлуоресценция заливного или имбибиционного материала не может быть устранена из-за технических трудностей, а также снимки, изготовленные контрастно-флуоресцентным способом (цветн. иллюстр. X/3—6).

Опыт показывает, что в действительности очень редко встречаются технически совершенные цветные флуоресцентномикроскопические снимки.

Некоторые авторы часто прибегают к тому, что фон фотографий, прилагаемых к публикациям, ретушируют в черное; даже «подправляют» в более яркие цвета объекты, представляющие наиболее важные части изображения. Если с дидактической точки зрения это полезно, то в этом нет никакой беды, хотя отличные источники света, микроскопы и цветные материалы в настоящее время уже позволяют изготовлять цветные флуоресцентномикроскопические снимки, безупречные во всех отношениях.

МЕТОДЫ ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Большинство медицинских и биологических цветных микроснимков готовится с окрашенных, так называемых амплитудных объектов; с помощью поляризационного микроскопа, однако, цветные микрофотографии могут быть изготовлены и с неокрашенных препаратов при условии, если подлежащие исследованию или фотографированию объекты являются анизотропами.

Анизотропы — субстанции, структура которых ориентирована в определенном направлении, тогда как субстанции с беспорядочно ориентированной структурой представляют собой изотропы. Явление анизотропии лучше всего демонстрируют различные кристаллические материалы (цветн. иллюстр. XI/1). Часть медицинских и биологических объектов имеет упорядоченную структуру, поэтому они также являются анизотропами. Таковы, например, коллагеновые и эластические волокна, мышечная, хрящевая и костная ткани (цветн. иллюстр. XI/2 — 4). Анизотропные субстанции называются материалами с двойным преломлением, коротко — двоякопреломляющими материалами; они хорошо исследуемы в поляризованном свете.

В связи с двойным преломлением важно знать, что отдельные объекты могут быть изотропами несмотря на то, что их субмикроскопические частицы сами по себе являются анизотропами. При этом частицы располагаются беспорядочно. В противоположность этому двойным преломлением обладает всякий материал, который содержит упорядоченно ориентированные частицы вытянутой формы, не располагающие сами по себе двойным преломлением, если между частицами и промежуточной субстанцией имеет место разница в показателях преломления (внешнее двойное преломление). Если же и сами субмикроскопические частицы обладают двойным преломлением (внутреннее двоякопреломление) и располагаются упорядоченно,

то в системе при образовании заметного двойного преломления одинаковую роль играет как внутреннее, так и внешнее двойное преломление.

Двойное преломление особенно хорошо может быть изучено на некоторых минералах. Изображение точки или линии, нанесенных на бумагу, при наблюдении, например, через кальцит, представляется двойным. Причина заключается в том, что в оптически анизотропном кальците входящие снаружи лучи плоской волны разлагаются на два поляризованных луча, идущих с различной скоростью, плоскости колебаний которых перпендикулярны друг к другу. Луч, обладающий меньшей скоростью, преломляется сильнее; слабее преломляется луч с бóльшей скоростью. За счет разницы в скорости распространения двух световых векторов после их прохождения через субстанцию возникает некоторое фазовое различие. Две волны, выходящие из двоякопреломляющего объекта, могут принять новое вибрационное положение, известное как эллиптическая или циркулярная поляризация. Это осуществляется таким образом, что световой вектор двух выходящих колебаний суммируется, однако конечная точка происходящего вектора не колеблется вдоль прямой линии (как в случае линейно поляризованного света), а образует эллипс или круг.

Для понимания явления световой поляризации следует знать, что две волны света с одинаковой длиной, одинаковой амплитудой, а также с идентичной фазой могут различаться между собой с точки зрения их пространственного направления вибрации. Естественный свет колеблется во всех плоскостях, перпендикулярных направлению распространения (рис. 77,1), тогда как поляризованный свет — лишь в одной плоскости. «Растровый» поляризационный фильтр пропускает свет (соответственно его плоскости колебания) только в одном направлении колебания (рис. 77,2), в результате чего естественный свет становится поляризованным (рис. 77,3). Возникший таким образом линейно поляризованный свет проходит через следующий поляризационный фильтр (так называемый анализатор) только тогда, когда его плоскость колебаний («растровая ориентация») параллельна таковой предыдущего фильтра и плоскости колебания поляризован-

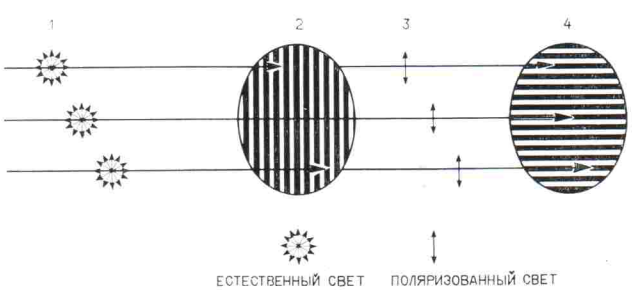


Рис. 77. Естественный и поляризованный свет. Действие поляризационных фильтров (подробное изложение см. в тексте)

ного света. При так называемом «скрещенном» положении плоскостей поляризации поляризованный свет через фильтр не проходит (77,4). Поляризационный фильтр, таким образом, своей «системой растра» пропускает лучи параллельных колебаний, а лучи, колеблющиеся в перпендикулярном направлении, не проходят через него. И даже в отношении эллиптически поляризованного света пропускает только тот его компонент, плоскость колебаний которого согласуется с поляризационным фильтром.

В анизотропных объектах можно обнаружить и такие направления (так называемые оптические оси), в которых свет проходит не преломляясь.

Сущность имбибиционного процесса, широко применяемого для поляризационной микроскопии в медицинской и биологической практике, состоит в том, что исследуемую ткань пропитывают бесцветным индифферентным раствором, показатель преломления которого соответствует показателю преломления упорядоченно ориентированных частиц, ответственных за двойное преломление. Разница между показателями преломления частиц, расположенных упорядоченно, и имеющейся между ними среды таким способом может быть выравнена, и чисто кристаллическое, или внешнее, двойное преломление устранимо. Однако пропитывающая жидкость не проникает между молекулами, из которых строятся частицы, следовательно, сохраняется их собственное, или молекулярное, двойное преломление. Пропитывающая жидкость не изменяет молекулярных показателей преломления.

Возможны поляризационно-оптические исследования не только бесцветных и неокрашенных анизотропных объектов. При определенных методах окрашивания молекулы краски могут иметь направленную ориентацию. Если в структуре, окрашенной таким способом, линейно поляризованный свет параллелен оси, то можно наблюдать в одном направлении меньшее, а в другом — бóльшее поглощение света. В этом случае имеет место явление дихроизма — двойной абсорбции света.

Ориентированные ассоциации на анизотропных структурах не только могут усиливать или ослаблять первоначальное двойное преломление, но вызывать и его инверсию. В поляризованном свете с различной длиной волны могут появляться так называемые аномальные цветоэффекты, меняющиеся со степенью компенсации.

Методы оценки и фиксирования изложенных явлений: проведение количественных измерений и изготовление цветных микроснимков.

Получение поляризованного света в старых поляризационных микроскопах достигается с помощью призм Николя, а в более новых аппаратах — посредством поляризационных фильтров. Изотропные объекты, помещенные между фильтрами, находящимися в скрещенном положении, остаются темными; однако при исследовании анизотропных объектов можно наблюдать в микроскопе световое явление. При этом анизотропные (с двойным преломлением) объекты (в зависимости от толщины слоя и воз-

никающей разницы в пути) «светятся» серым, белым и другими цветами. На основе наблюдаемого таким способом светового феномена и «интерференционных цветов» можно получить ценные данные относительно микроструктуры исследуемых объектов.

Так как гипсовую пластину можно легко расколоть, из нее можно легко изготовить пластинку, интерференционный цвет которой между скрещенными поляризационными фильтрами будет фиолетово-красным, соответствующим разнице в пути в 551 ммк.

Кроме гипса, препараты для подобной цели могут изготовляться и из кварца. Обозначение упомянутых гипсовых или кварцевых вспомогательных препаратов — компенсационная гипсовая или кварцевая пластинка первого порядка.

Вследствие того, что свет проходит с различной скоростью через гипсовую или кварцевую пластинку в направлениях колебаний, перпендикулярных друг другу, на компенсаторной оправе отмечается плоскость колебания луча света, проходящего с меньшей скоростью. С помощью компенсационной пластинки первого порядка упорядоченное направление анизотропных частиц может быть установлено у большей части биологических объектов. Для этой цели при скрещенных поляризационных фильтрах компенсатор приводят в соответствующее диагональное положение, и тогда поле микроскопа становится фиолетово-красным. Объект с неизвестной субмикроскопической структурной ориентацией при таком способе исследования в одной из диагоналей может усиливать двойное преломление компенсатора, а в другом положении (перпендикулярно предыдущему) — ослаблять. Если двойное преломление усиливается (сложение), то наблюдается синий цвет, если ослабляется (вычитание) — желтый. По появлению поляризационных цветов в зависимости от положения исследуемой структуры можно установить положительное или отрицательное двойное преломление относительно ее определенного направления.

Слюдяной компенсатор, обозначенный $\lambda/4$, в случае скрещенных поляризационных фильтров имеет серый цвет. С его помощью достигается ориентация при исследовании препаратов, дающих небольшую степень замедления.

Кроме упомянутых неизменных компенсаторов существуют и компенсаторы с изменяемым двойным преломлением, из которых, например, с помощью соответствующим образом отшлифованного кварцевого клина можно постоянно получать интерференционные цвета I—III порядка. Они могут быть использованы как для качественных, так и для количественных исследований.

Тогда как, главным образом, для минералогических исследований выпускаются специальные поляризационные микроскопы, снабженные многочисленными принадлежностями, для исследования и фотографирования медицинских и биологических объектов применяются обычные микроскопы с определенным дополнением.

В основном для цветного фотографирования целесообразно использовать источники света, цветовая температура и световая плотность которых выше обычных. Идеальной можно назвать ксеноновую лампу непрерывного света, хотя применимы также мощные низковольтные лампы накаливания (100 вт), с конверсионными фильтрами. Установка освещения осуществляется по принципу Кёлера.

Требования к механическому устройству штатива микроскопа и его дополнительному оборудованию совпадают с обычными условиями микрофотографирования. Для поляризационной микроскопии и фотографирования рекомендуется использовать подвижной центрируемый предметный столик. Для облегчения центральной установки выпускаемые современные поляризационные микроскопы снабжены центрируемыми объективами. От оптических элементов поляризационного микроскопа требуется, чтобы они были свободны от напряжений и не содержали таких компонентов, которые обладают деполяризующими свойствами. Для этой цели лучше всего подходят, главным образом, ахроматические объективы, изготовляемые и монтируемые с особой тщательностью. В случае исследования и фотографирования препаратов с небольшим двойным преломлением упомянутое требование особенно важно.

Современные поляризационные микроскопы вместо старой призмы Николя оснащены поляризационным фильтром. Так называемый поляризатор помещается вблизи конденсатора, тогда как анализатор устанавливается между объективом и окуляром или над окуляром. Исследуемый объект, таким образом, находится между двумя поляризационными фильтрами. Поляризационные фильтры могут быть повернуты, и угол поворота обозначен в градусах. Если плоскости колебаний двух поляризационных фильтров перпендикулярны одна другой (скрещенное положение), то поле зрения в микроскопе представляется темным, и вышеупомянутый световой феномен наблюдается исключительно в отношении анизотропных объектов. Различными фирмами выпускаются различные поляризационные приспособления, с применением которых и обычные микроскопы (если они соответствуют изложенным выше общим требованиям) пригодны для поляризационномикроскопического фотографирования.

Простое поляризационное приспособление состоит из двух поляризационных фильтров и компенсационной пластинки первого порядка (рис. 78). Направления колебания обозначаются на оправах, что позволяет легко установить перекрестное положение.

Для биологических исследований и измерений в связи с этим небольших замедлений, а также для фотографирования препаратов особенно пригодно поляризационное приспособление В. Шмидта. Оно выпускается фирмой Э. Лейц (Вецлар) (рис. 79). В верхней части тубуса имеется вращающийся анализатор с градуировкой от 0 до 180°, 8 × окуляр с крестом нитей, и $\lambda/4$ слюдяная пластинка. В отверстие под анализатором может быть вставлена компенсационная пластинка первого порядка. Поляризатор располагается



Рис. 78. Простое поляризационное приспособление к штативам «Стандарт Юниор», «Стандард ГФЛ» и «Стандард ВЛ». В ящике слева направо: анализатор, кольцо, необходимое для ввинчивания анализатора, кварцевая компенсационная пластинка первого порядка и поляризатор. Выпускает К. Цейс (Оберкохен)

под конденсором, тут же по пути лучей можно поместить $\lambda/16$ слюдяную пластинку.

Фотографирование поляризационномикроскопических препаратов на цветной фотоматериал является благородной, но не всегда простой задачей. Яркие интерференционные цвета объектов с сильным двойным преломлением обычно запечатлеваются без особых трудностей. В случае биологических объектов, однако, двойное преломление часто является довольно слабым. При использовании компенсационной пластинки первого порядка на фиолетово-красном фоне появляются тонкие оттенки синего и желтого цветов. При применении источников света высокой цветовой температуры или низковольтных ламп с синим конверсионным фильтром хороший результат можно получить с цветным фотоматериалом дневного типа. Опыт показывает, что наибольшие трудности причиняет достоверное воспроизведение оттенков желтого цвета, так как большая часть цветных фотоматериалов критически реагирует на оттенки желтого, встречающегося в этом

→

Рис. 1—4. Поляризационномикроскопические снимки

Рис. 1. Кристаллы витамина С (аскорбиновой кислоты). Скрещенное положение фильтров + компенсационная гипсовая пластинка первого порядка. *Объектив:* ахромат 10/0,22. Увеличение = 180 : 1. *Фотоматериал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17»

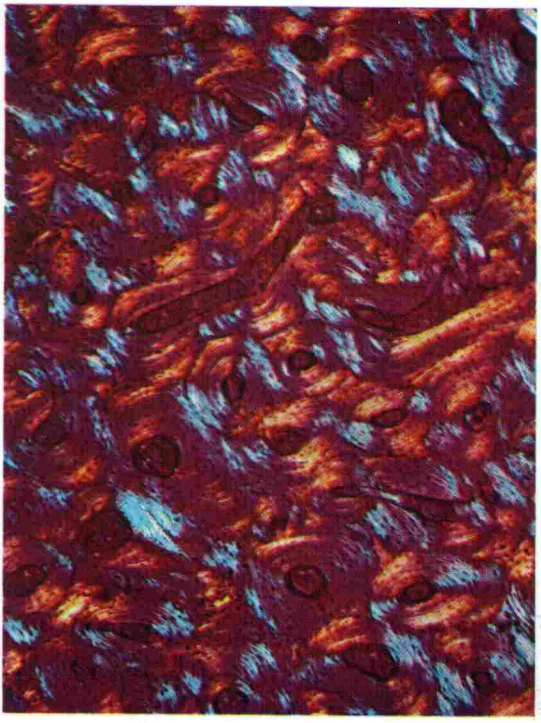
Рис. 2. Шлиф бедренной кости. Скрещенное положение фильтров + компенсационная гипсовая пластинка первого порядка. *Объектив:* планапохромат 4/0,16. Увеличение = 50 : 1. *Фотоматериал:* негативная плоская пленка «Агфаколор CN 17»

Рис. 3. Коллагеновое волокно (сухожилие крысиного хвоста). Скрещенное положение фильтров + компенсационная гипсовая пластинка первого порядка. *Объектив:* планапохромат 6,3/0,16. Увеличение = 100 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16»

Рис. 4. Снимок изготовлен с препарата, видимого на рис. 3, при скрещенном положении фильтров



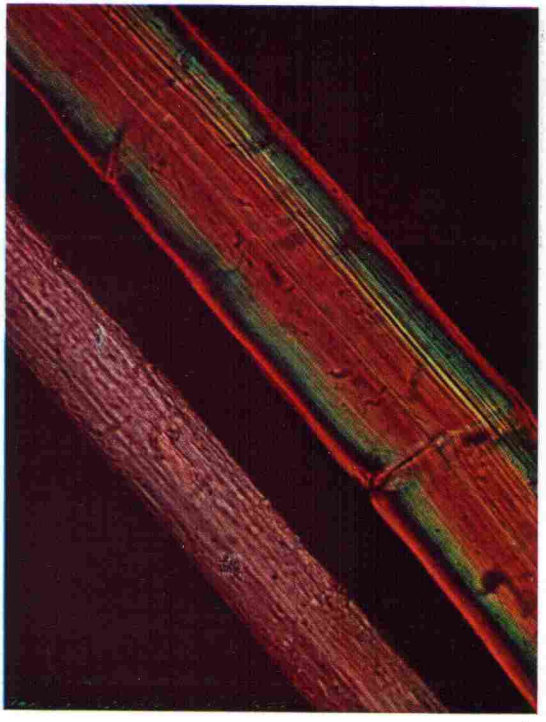
1



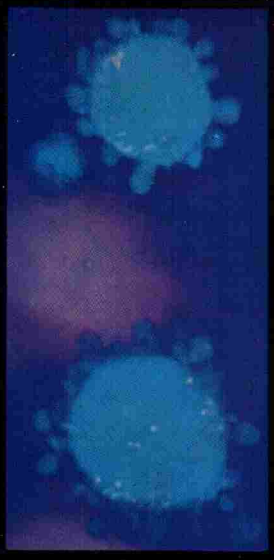
2



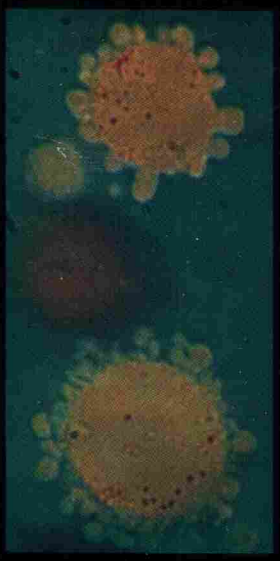
3



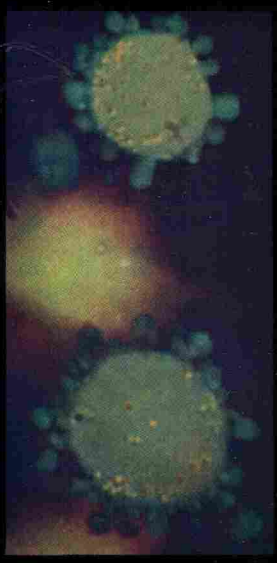
4



1



2



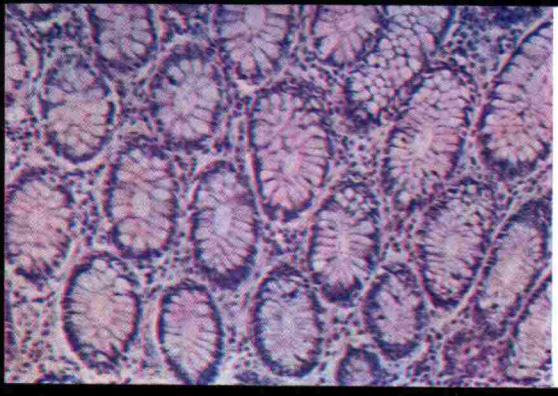
3



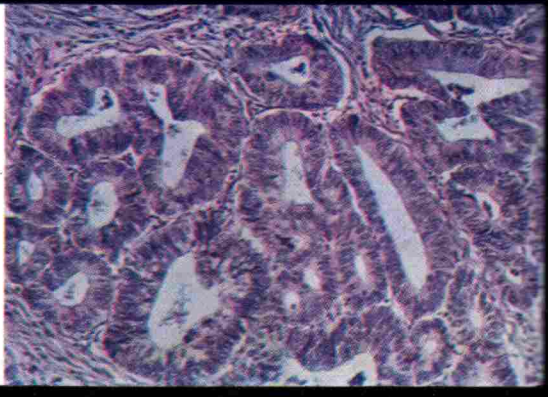
4



5



6



7

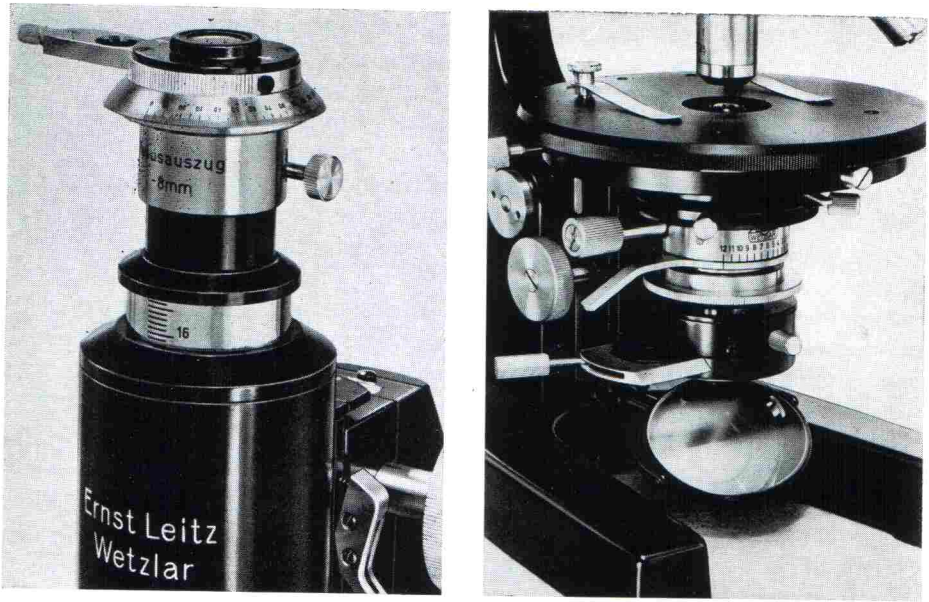


Рис. 79. Поляризационное устройство Шмидта для биологических исследований — выпускает Э. Лейц (Вецлар)

случае. Наилучший результат достигается с цветными фотоматериалами, содержащими маску, у которых цветоизбирательность остается удовлетворительной даже в отношении упомянутых критических цветов.

Для фотографирования слабоконтрастных цветных препаратов следует применять цветные фотоматериалы низкой чувствительности, дающие высокую степень контраста. При фотографировании препаратов со слабым

←

Рис. 1—3. Интерференционномикроскопические снимки, изготовленные с неокрашенных объектов. В зависимости от положения анализатора можно достигнуть различный цветоконтраст. *Объект:* ЛВК асцитическая саркома (потоцитоз). *Объектив:* ахромат 40/0,70. Увеличение = 500 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Истмен-Колор» тип 5251

Рис. 4—5. Стереомикроскопический снимок. Снимки с правой и левой стороны изготовлены под различным углом зрения. *Объект:* человеческий костный мозг. *Окрашивание:* судан III и импрегнация серебром. *Объектив:* ахромат 2,5/0,08. Увеличение = 75 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16»

Рис. 6—7. Снимок изготовлен через сравнительный окуляр с препаратов, помещенных в двух микроскопах, расположенных один около другого. В поле зрения одного из микроскопов можно наблюдать эпителиальные клетки здоровой железы слизистой оболочки прямой кишки (6), в другом — гистологическую картину карциномы, происходящей из железистого эпителия (7). Оба изображения проецируются сравнительным окуляром одно около другого. *Окрашивание:* гематоксилин-эозин. *Объектив:* флуорит 10/0,30. Увеличение = 100 : 1. *Фотоматериал:* негативная пленка «Орвоколор NC 16»

двойным преломлением система призм (как деполяризующий элемент), имеющаяся в тубусе или микрофотонасадке, может быть помехой, поэтому в таких случаях надо заботиться о ее устранении.

Если частицы с двойным преломлением объекта, подлежащего фотографированию, заполняют лишь небольшую часть поля зрения (например кристаллическая субстанция тонкой дисперсности), при определении времени экспозиции надо учитывать указания, изложенные на странице 81.

При скрещенных поляризаторах цветные микроснимки могут быть изготовлены как при использовании компенсатора, так и без него. На поляризационном микроснимке двух пучков коллагеновых волокон видно, что скрещенное положение поляризационных фильтров обусловливает темный фон (цветн. иллюстр. XI/4). По интерференционным цветам можно установить, что более толстый пучок волокон по сравнению с тонким показывает более сильное двойное преломление. Направление ориентации частиц, дающих двойное преломление, можно уяснить на основе цветной иллюстрации XI/3, которая сделана с того же поля зрения, как и предыдущая иллюстрация, при использовании компенсационной пластинки первого порядка. При данном положении компенсатора интерференционные цвета волокон, расположенных в так называемом конвенциональном направлении, показывают, что анизотропные частицы в синем пучке волокон ориентированы по оси, а в желтом — перпендикулярно последней.

Формации с сильным двойным преломлением хорошо видны и тогда, когда поляризационные фильтры находятся в положении неполного перекрещивания или когда применяются компенсаторы, дающие небольшое замедление. Преимущество снимков, изготовленных таким способом, заключается в том, что становятся видными частицы не только анизотропных, но и изотропных препаратов. Этот факт может быть выгодным с точки зрения установления локализации определенных формаций.

Поляризационные фильтры используются и для фотографической работы при падающем свете. Однако для фотографирования медицинских или биологических объектов этот метод применяется довольно редко.

МЕТОДЫ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Посредством усовершенствованных в последние годы интерференционных микроскопов, использующих проходящий свет и пригодных для биологических исследований, можно изготовить цветные фотографии с неокрашенных фазовых объектов. В то время как в поляризационном микроскопе условием появления цветного интерференционного изображения является анизотропность исследуемого объекта, с помощью интерференционного микроскопа можно получить цветное изображение и с изотропных препаратов (цветн. иллюстр. XII/1—3).

Интерференционным микроскопом можно с большой точностью определить толщину, вес, содержание сухого вещества и показатель преломле-

ния частиц исследуемого объекта; этим способом, например, можно косвенно регистрировать клеточный метаболизм, изменение условий проницаемости, активность энзимов. Интерференционный микроскоп (рис. 80) производства Бекера (Лондон), работающий по так называемой double focus system (рис. 81) или shearing system (рис. 82), является одним из тех типов микроскопа, который позволяет осуществить интерференционное микроскопическое исследование и фотографирование медицинских и биологических препаратов.



Рис. 80. Интерференционный микроскоп для проходящего освещения — выпускает К. Бекер (Лондон)

Сравнивая ход света в поляризационном микроскопе, оснащенном $\lambda/4$ компенсатором (рис. 83,А), с таковым в интерференционном микроскопе Бекера (рис. 83,Б), можно отчетливо установить взаимосвязь и разницу между этими двумя принципами. Свет, линейно поляризованный поляризатором (П), в поляризационном микроскопе (двоякопреломляющим объектом ОБ'), в интерференционном микроскопе (системой конденсора К) разлагается на два компонента, перепендикулярно поляризованных один к другому. Эти два компонента конденсорной системой интерференционного микроскопа также сдвигаются один к другому. Между двумя компонентами, перепендикулярными друг к другу, возникает разность фаз, причина которой в случае поляризационного микроскопа кроется в двойном преломлении объекта, а в случае интерференционного микроскопа в том, что один из компонентов проходит через объект, тогда как второй идет около последнего. В объективе интерференционного микроскопа (О) два компонента опять локализуются в их первоначальном положении. После объектива два луча света, поляризованные перепендикулярно один другому и имеющие разность фаз, проходят в обоих микроскопах в направлении $\lambda/4$ компенсатора. Затем в обоих микроскопах луч света, поляризованный в

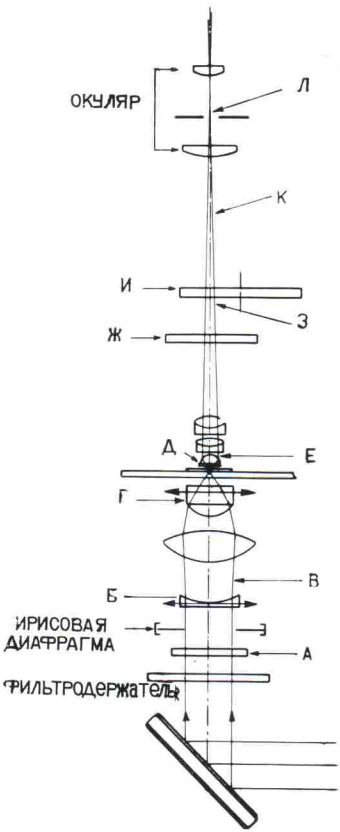


Рис. 81. Принципиальный рисунок 100 х двухфокусной системы

А) Откидывающийся поляризатор. Его вращение регулирует отношение интенсивности лучей с двойным преломлением и тем самым делает возможным формирование изображения вне фокуса в случае обычного проходящего света

Б) Двоякопреломляющая негативная линза

В) Вход лучей с двойным преломлением в конденсор Аббе

Г) Двоякопреломляющая пластинка, превращающая фронтальную линзу конденсора в бифокальную

Д) Двоякопреломляющая пластинка, превращающая объектив в бифокальный

Е) Рекомбинированные лучи с двойным преломлением

Ж) ¼-волновая пластинка

З) Рекомбинированные лучи, циркулярно поляризованные в противоположном направлении ¼-волновой пластинкой

И) Вращающийся анализатор, калиброванный в градусах

К) Циркулярно поляризованные лучи. Их фазовые связи могут быть установлены на анализаторе

Л) Объединение внефокусного и внутрифокусного изображений объекта дает окончательное изображение

двух взаимно перпендикулярных плоскостях и имеющий разность фаз, $\lambda/4$ компенсатором преобразуется в прямой, линейно поляризованный луч, плоскость которого (в зависимости от разности фаз) отклоняется под определенным углом от направления, первоначально установленного поляризатором. Определение этого угла осуществляется посредством вращающегося анализатора (А).

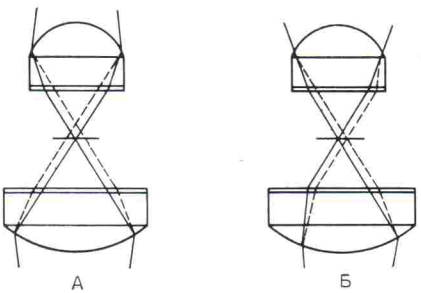


Рис. 82. Сравнение между двухфокусной и разделенной лучевой системами

А) Двухфокусная система. Исходный луч фона (пунктирная линия) идет вокруг объекта. Сплошная линия — объектный луч

Б) Разделенная лучевая система. Исходный луч (пунктирная линия) перемещается на сторону фокуса объектного луча (сплошная линия)

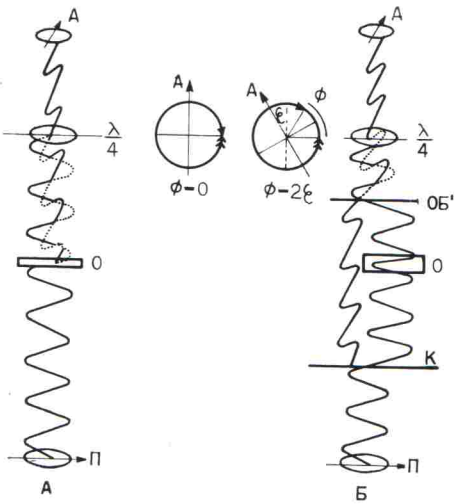


Рис. 83. Сравнение между ходом лучей в поляризационном микроскопе, снабженном $\lambda/4$-компенсатором (А), и в интерференционном микроскопе фирмы К. Бекер (Лондон) (Б). (П) поляризатор, (К) система конденсора, (ОБ') объект, (О) объектив, (А) анализатор (схема д-ра Куруца)

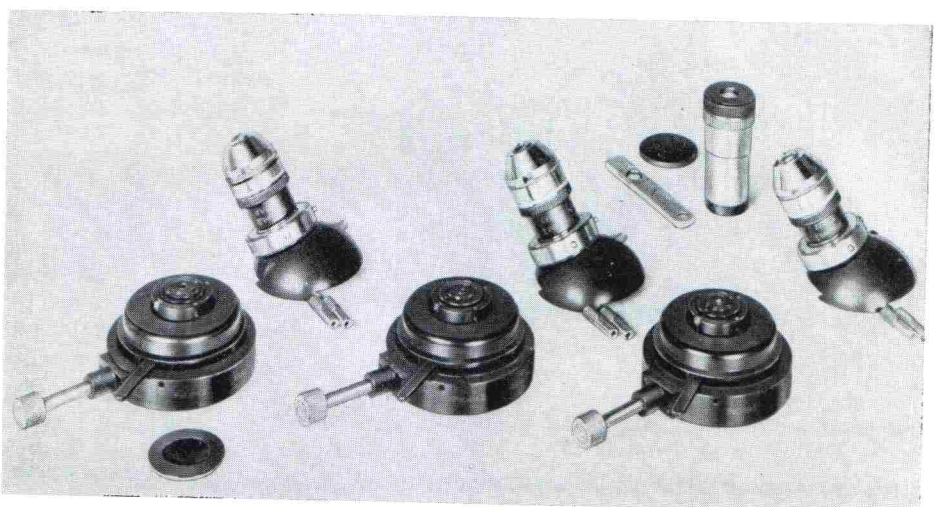
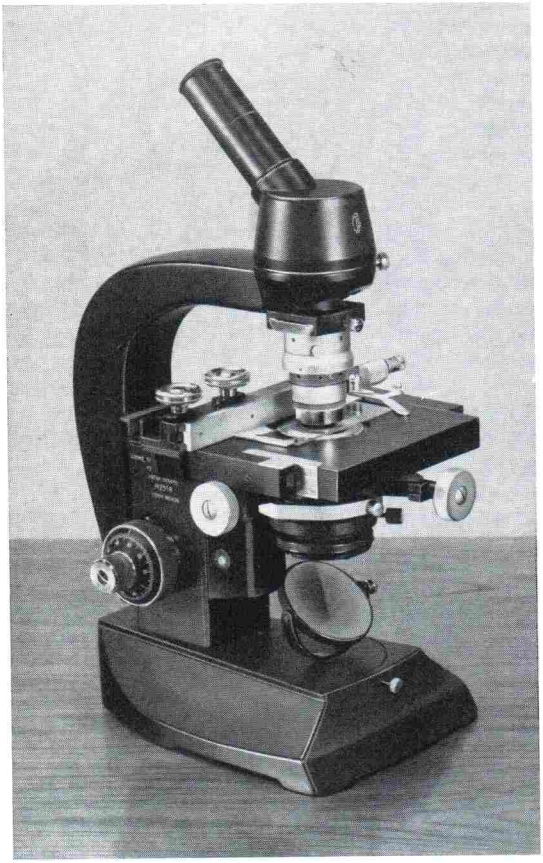


Рис. 84. Интерференционное приспособление, действующее в проходящем свете. Выпускает К. Цейс (Оберкохен); слева направо: Интерференционная насадка — Int. Pol. I 10/0,22 ахроматический объектив. Int. Pol. I конденсор; интерференционная насадка — Int. Pol. II 40/0,65 ахроматический объектив. Int. Pol. II конденсор; интерференционная насадка — Int. Pol. III 100/1,0 масляно-иммерсионный ахроматический объектив. Int. Pol. III конденсор

Для проведения интерференционномикроскопических исследований может быть применено большинство обычно используемых микроскопов, дополненных интерференционным приспособлением фирмы К. Цейс (Оберкохен), работающим при освещении проходящим светом (рис. 84).



Интерферометрический микроскоп Дайзона (рис. 85) производства фирмы Кук, Трогтон и Симс также пригоден для исследования медицинских и биологических объектов.

В связи с изготовлением интерференционномикроскопических цветных снимков (с точки зрения цветов и степени контраста) надо принимать во внимание точки зрения, изложенные при описании поляризационномикроскопического фотографирования.

Рис. 85. Интерферометрический микроскоп Дайзона — выпускает Кук, Трогтон и Симс (Йорк)

МЕТОДЫ СТЕРЕОМИКРОСКОПИИ

Результатом оптических, физиологических и психологических процессов, протекающих в глазах и мозге, является пространственное, так называемое стереоскопическое видение. Благодаря ему предметы, расположенные на различной глубине, высоте, расстоянии, представляются нам лежащими не в одной плоскости.

С помощью стереомикроскопа, как при непосредственном визуальном наблюдении микроскопических препаратов, так и при фотографировании их, может быть получено стереоскопическое изображение.

Некоторые из стереомикроскопов, имеющихся в обращении, построены на основе принципа Гриноуга, соответственно которому пути лучей, сформированные двумя объективами и двумя окулярами, проходят косо в отношении друг к другу и полностью отделены (рис. 86).

В другой группе стереомикроскопов используется общая линза, начиная от которой свет идет двумя отдельными ходами, параллельными друг другу (рис. 87).

Известны и другие типы, из которых заслуживают внимания конструкции, дающие два изображения посредством поляризационных фильтров.

Наибольшее увеличение стереомикроскопов слабее такового обычных микроскопов. Расстояние между объективом и объектом больше привычного, поэтому стереомикроскопы особенно успешно применимы для препаративных целей. Изменение увеличения у некоторых типов стереомикроскопов происходит с помощью диска, смонтированного вместе с тубусом. В стереомикроскопе препараты могут быть с одинаковым успехом исследованы как в проходящем, так и в падающем свете.

Стереоскопическую съемку можно произвести различными способами:

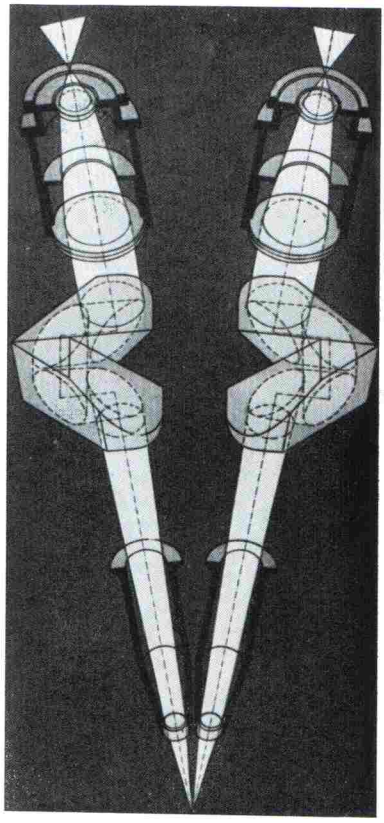


Рис. 86. Ход лучей в стереомикроскопе «Мак», построенном по принципу Гриноуга — выпускает К. Рейхерт (Вена)

а) С помощью обычной насадочной камеры, монтирующейся на тубус стереомикроскопа, через оба окуляра изготовляется отдельно каждый снимок.

б) Помещением сдвижного стереотубуса (рис. 89), посредством насадочной камеры делается отдельный снимок с обоих ходов лучей.

в) При применении стереоокуляра снимок изготовляется с двух ходов лучей только при одной экспозиции.

г) Специальным приемником, например специальной фотографической насадочной камерой «Контарекс» (рис. 88), с двух ходов лучей можно сделать снимок единственной экспозицией.

Методами, изложенными в пунктах а и б, используя полный размер кадра, соответственно изображениям частей каждый снимок готовится при двух отдельных экспозициях.

Применяя методы, упомянутые в пунктах в и г, разделив пополам кадр, можно изготовить снимок с изображений частей единственной экспозицией.

В связи с выбором и использованием цветных фотоматериалов следует учитывать принципы, описанные в отношении обычных микроскопов.

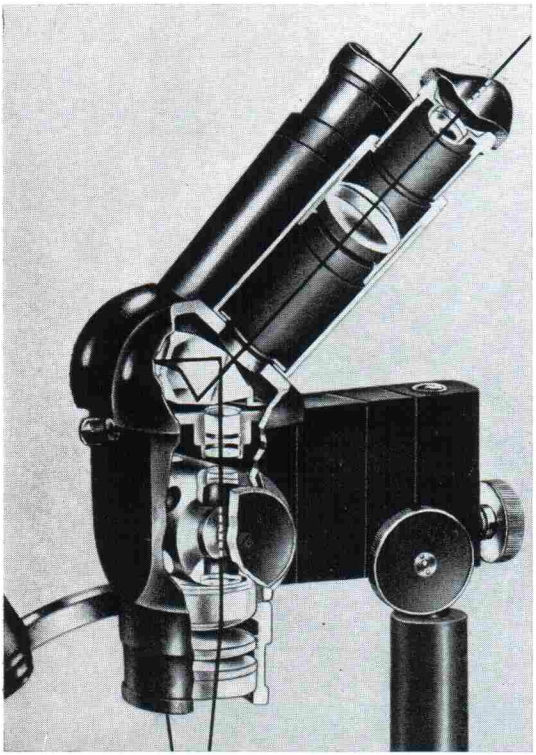


Рис. 87. Стереомикроскоп SMXX с общими фронтальными линзами — выпускает К. Цейс (Йена). Схема поперечного разреза и ход лучей

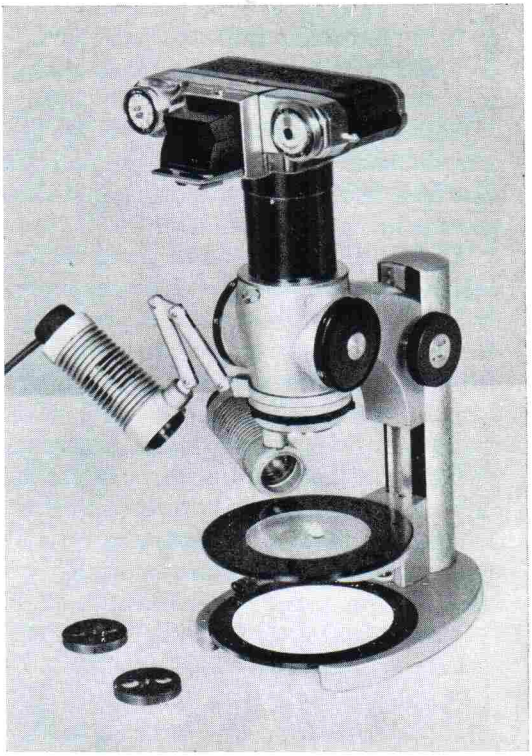
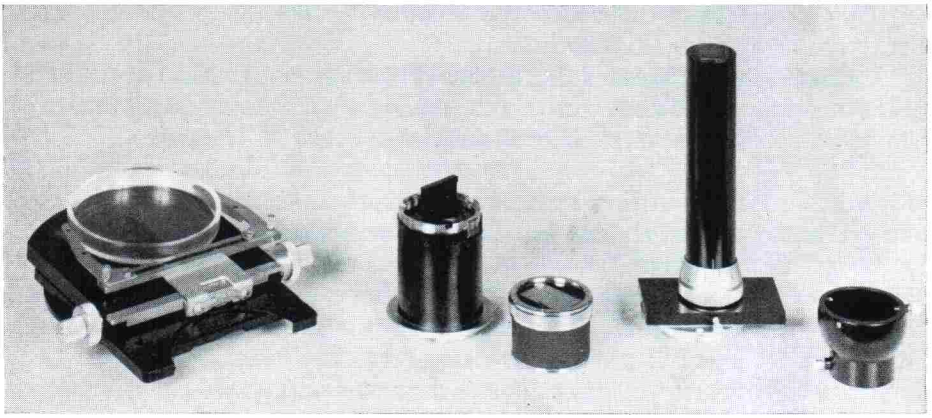


Рис. 88. «Стереомикроскоп II» — выпускает К. Цейс (Оберкохен) — со специальной фотографической насадочной камерой «Контарекс»

Рис. 89. Сдвижной стереофототубус — выпускает К. Цейс (Оберкохен)



Важно, чтобы изготовленные и приложенные друг к другу стереопары согласовывались по цвету и тону (цветн. иллюстр. XII/4, 5).

Для демонстрации цветных стереомикроснимков успешно применяется поляризационная проекционная техника. Суть этого метода состоит в том, что стереопары проектируются одна на другую отдельными проекторами на экран с металлической поверхностью через поляризационные фильтры. Проектируемое изображение наблюдается через поляризационные фильтры. Для достижения ощущения объемности изображения важно адекватно приспособить поляризационные фильтры перед проектором и внутри хромоскопа.

Наблюдение цветных стереоснимков возможно также с помощью так называемого бинокулярного стереоскопа.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Сравнительный окуляр (рис. 90) позволяет в одном поле одновременное наблюдение и фотографирование изображений (цветн. иллюстр. XII/6, 7), сформированных двумя поставленными рядом микроскопами.

При проведении наблюдения с исследовательской, криминалистической или прочей целью важно, чтобы технические условия, связанные с освещением, увеличением и цветовоспроизведением, были идентичными.

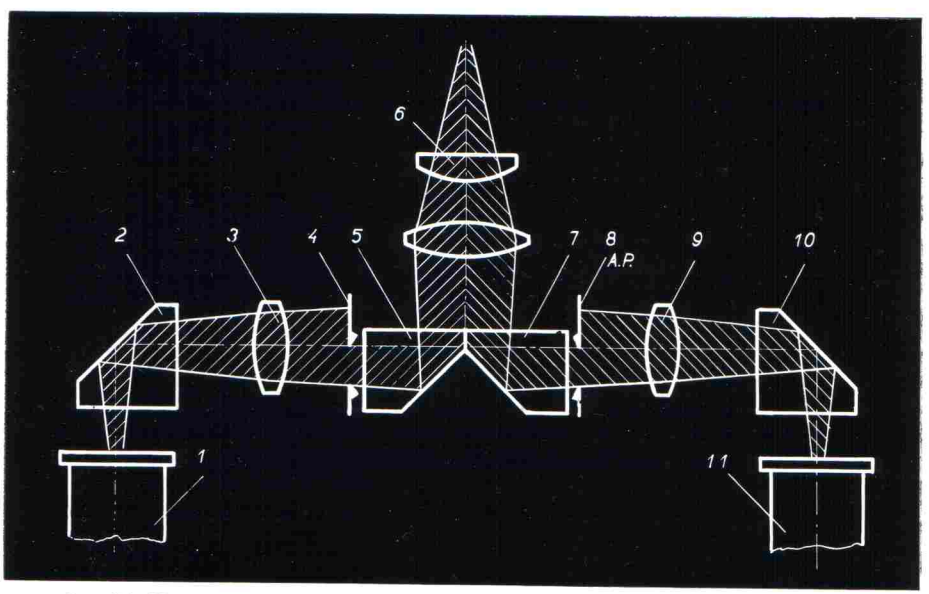


Рис. 90. Ход лучей в сравнительном окуляре — выпускает К. Цейс (Йена)
1 и 11 — окуляры микроскопа, 2 и 10 — призмы, 3 и 9 — транспозиционные линзы; 4 и 8 — диафрагмы; 5 и 7 — призмы; 6 — регулируемый окуляр; А. Р. — выходной зрачок

В интересах выполнения изложенных требований выпускают сравнительные микроскопы, целесообразно подобранное механическое и оптическое оснащение которых делает возможным их применение для проведения исследований, требующих большой точности. Упомянутой цели служит и сравнительный микроскоп фирмы Э. Лейц (Вецлар), используемый в криминалистике.

Детали изображений, полученные с помощью сравнительного окуляра, фотографируются обычно используемой микрофотографической аппаратурой.

УХОД ЗА МИКРОФОТОГРАФИЧЕСКИМ ОБОРУДОВАНИЕМ. ПРОТОКОЛ СЪЕМКИ

Оптические и механические элементы микроскопа, а также все приборы, используемые для микрофотографирования, требуют постоянного заботливого содержания в исправности. Особенно важно содержать в чистоте оптические элементы. Загрязнение объектива и окуляра дает неясную, дымчатую фотографию, испещренную иногда точками и палочкообразными образованиями. Для удаления грязи со стеклянной поверхности линз всегда следует применять соответствующий растворитель (например воду, бензин, ксилол, эфир, хлороформ и т. д.). Для чистки линз можно применять мягкую, неворсистую и чистую ткань.

Для установки расстояния между объектом и объективом служат макроскопический и микроскопический винты. Последние обычно зубчатыми колесиками приводят в действие присоединенную зубчатую планку. Тоже очень важно заботиться об их содержании, так как вследствие изнашивания или неправильной их установки заданное расстояние объект — объектив спонтанно или под действием перегрузки может изменяться, результатом чего является потеря резкости.

Вне использования приборы и дополнительные приспособления следует держать в закрытых ящиках, свободных от пыли или накрыть колпаком из стекла или пластмассы.

В процессе изготовления цветных микроснимков нужно считаться с многочисленными факторами, которые могут быть важными и при оценке готового изображения. По этой причине, а также с точки зрения «выявления» возможных ошибок съемки целесообразно вести протокол съемки.

Протокол съемки содержит следующие данные:

№ снимка
Объект съемки
Метод подготовки объекта
Окрашивание обьекта
Название источника света
Напряжение питания *(в)*
Сила тока *(а)*
Положение полевой диафрагмы

Фильтр
Способ освещения
Конденсор
Положение апертурной диафрагмы

Штатив
Длина тубуса
Объектив
Окуляр
Длина камеры
Камера

Негативный фотоматериал
Время экспозиции
Время проявления
Температура проявления
Масштаб снимка

Позитивный фотоматериал
Время экспозиции
Фильтрация
Время проявления
Температура проявления
Увеличение

Место изготовления снимка
Дата изготовления снимка
Лицо, изготовившее снимок

ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ В ПРОЦЕССЕ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЦВЕТНЫХ ФОТОГРАФИЙ

Таблица VII

Ошибки, возможные в процессе изготовления цветных фотографий (не связанные с качеством и обработкой фотоматериалов)

Ошибка	Причина
Проявленный фотоматериал неадекватного покрытия	
Обратимый материал слишком светлый	Слишком продолжительное время экспозиции
Обратимый материал слишком темный	Слишком короткое время экспозиции
Негативный материал слишком светлый	Слишком короткое время экспозиции
Негативный материал слишком темный	Слишком продолжительное время экспозиции
Обратимый материал совершенно темный, изображение отсутствует	Экспозиция не была произведена
Обратимый материал совершенно прозрачен, изображение отсутствует	Вся поверхность изображения получила свет
Негативный материал совершенно темный, изображение отсутствует	Вся поверхность изображения получила свет
Негативный материал совершенно прозрачен, изображение отсутствует	Экспозиция не была произведена

Таблица VII (продолжение)

Ошибка	Причина
На обработанном фотоматериале может наблюдаться равномерная цветная дымка:	
Сине-фиолетовая дымка	При изменении высоты конденсора возникает различная цветная дымка (см. цветн. иллюстр. I/1)
	Применение источника света с цветовой температурой выше 3200°К в случае использования пленки для искусственного света (см. цветн. иллюстр. II/3)
Оранжево-красная дымка	При измении высоты конденсора возникает различная цветная дымка (см. цветн. иллюстр. I/2)
	Применение источника света с цветовой температурой ниже 5500—6000°К в случае использования пленки дневного типа (см. цветн. иллюстр. II/1)
Неравномерно покрытый фотоматериал:	
Покрытие от одной стороны изображения, распространяясь в другом направлении, постепенно изменяется	Освещающий лучевой пучок неправильно установлен и центрирован
Резкообозначенные полоскообразные или размытые области на обратимом материале — светлые, на негативном — темные	Просачивание света
Нерезких границ дискообразное или кольцевидное пятно в центре изображения; на обратимом материале — светлое, на негативном материале — темное	Трубчатые части прибора (тубусы), которые располагаются вокруг лучевого хода, изнутри не окрашены соответствующим образом в «матовый черный» цвет. Вследствие этого возникает светорефлекс
Пятна, несколько меньшие таковых, упомянутых в предыдущем пункте; на обратимом материале — светлые, на негативном — темные	Светорефлексы системы линз микроскопа
Различной формы и величины точки, диски и палочкообразные формирования, не существующие на объекте и наблюдаемые лишь на снимке	Загрязненность отдельных линз прибора, которая чаще всего наблюдается при слишком затянутой апертурной диафрагме
Нерезкий снимок	Неправильная установка. В течение экспозиции: прибор сотрясается, объект сдвигается, изменяется расстояние между объективом и предметом (опускаются тубус или предметный столик)
Снимок резкий, но беден контрастом	Загрязнение поверхности линз
Снимок слишком контрастный	Чересчур затянутая апертурная диафрагма