

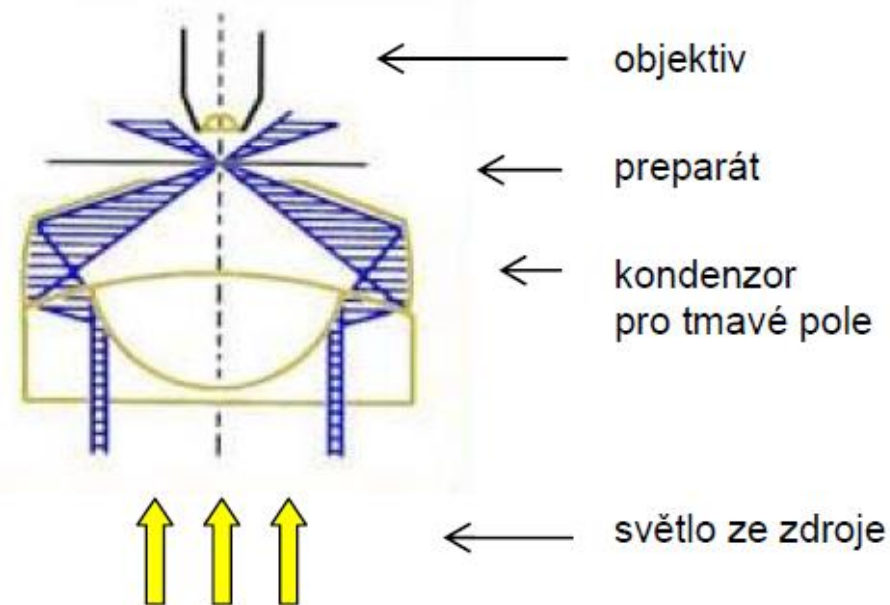
Kontrastní metody v mikroskopii

- Slouží k zvýšení kontrastu obrazu tak, aby byl dobře pozorovatelný.
- Nejpoužívanější metody:
 - Temné pole
 - Fázový kontrast
 - Polarizované světlo
 - Reliéfní kontrast – Hoffmanův modulační kontrast
 - Diferenciální interferenční kontrast (DIC)

Mikroskopie tmavého pole

- Součástí kondenzoru je stínítko – disk, který zabraňuje průchodu světla středem
- Vzorek je osvětlován z boku - šikmé osvětlení
- Pozadí je tmavé, jelikož světlo neproniká do objektivu
- Pozorované objekty však rozptylují světlo, tudíž jsou viditelné

Obrázek ukazuje chod paprsků kondenzorem v úpravě pro pozorování v tmavém poli při osvětlení procházejícím světlem



Borelie zobrazené v mikroskopii tmavého pole

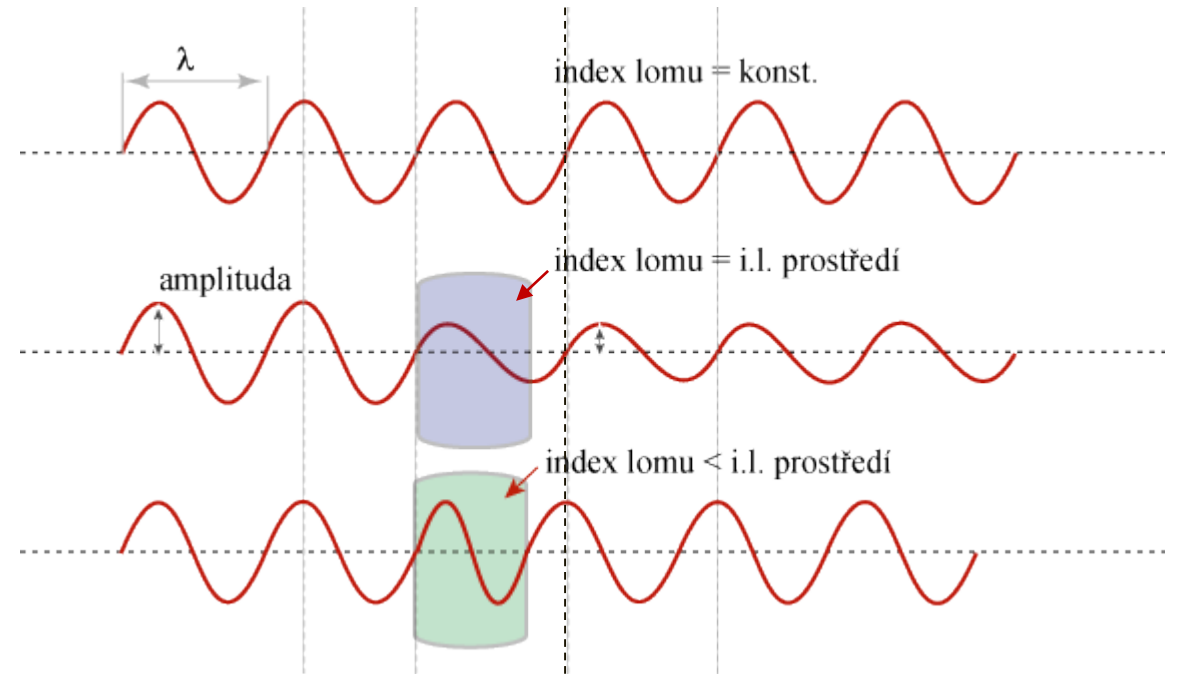


Fázový kontrast

U fázového kontrastu se využívá poznatku posunu vlny při průchodu průhlednými objekty s rozdílným indexem lomu.

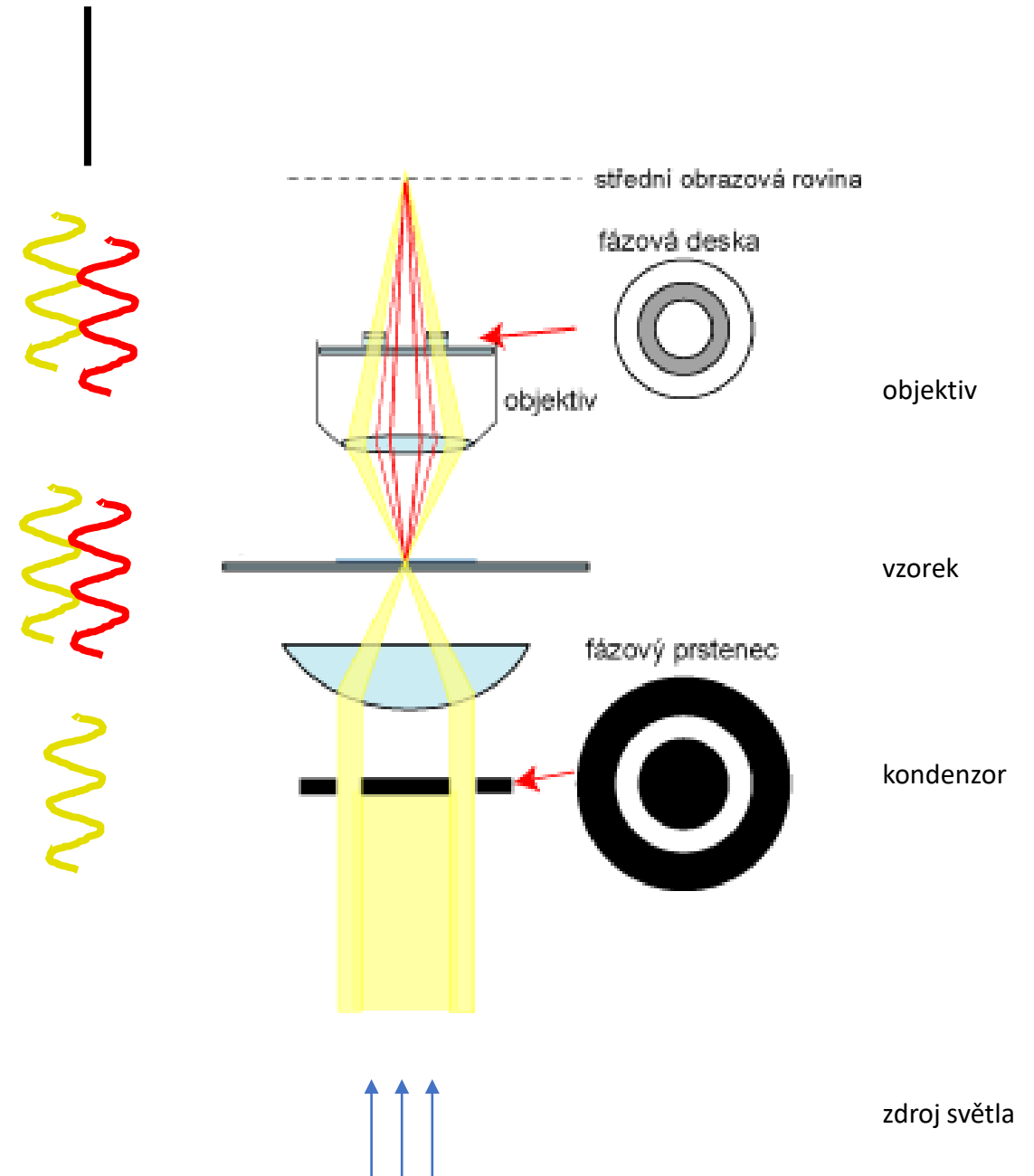
Většina biologických vzorků nemění amplitudu vlny (intenzita světla), ale fázi.

Posun fáze lze však převést na změnu amplitudy světla, kterou je oko schopné vnímat

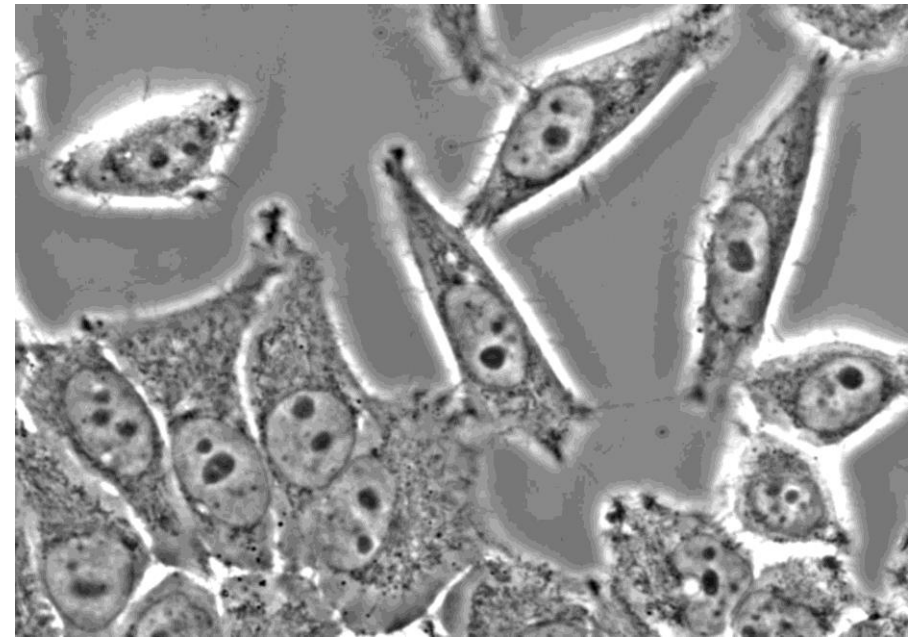
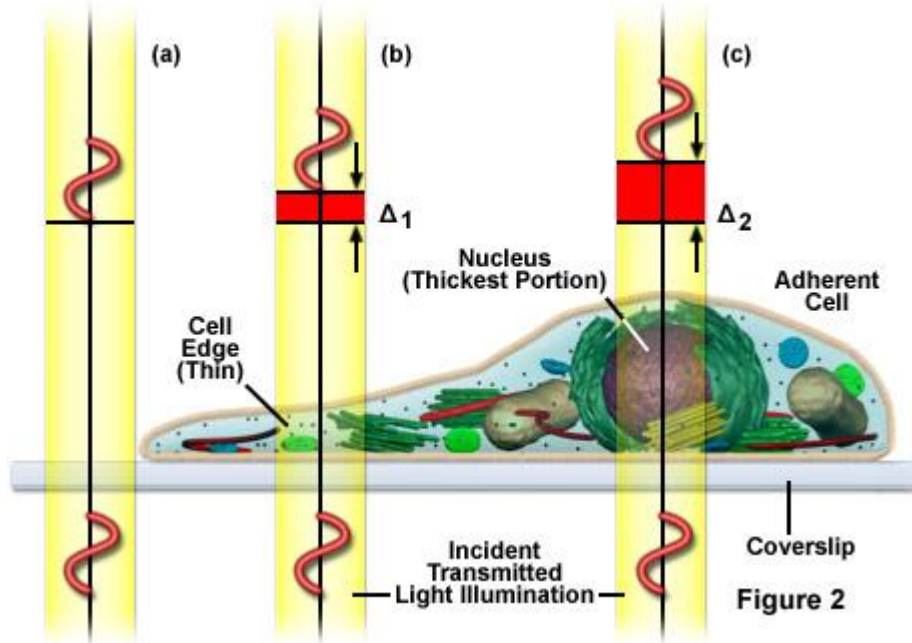


Fázový kontrast

- V kondenzoru se nachází fázový prstenec - napařená vrstva se štěrbinou, kterou prochází světlo na vzorek.
- Na vzorku dochází k fázovému posunu a změně dráhy vlivem jiného indexu lomu vzorku (červeně)
- Světlo poté prochází objektivem, ve kterém je umístěna fázová maska, prstenec na fázové desce, který posunuje fázi světla putujícího ze zdroje (žlutě) o čtvrtinu vlnové délky. Světlo posunuté průchodem vzorku nejde přes zpožďující prstenec.
- Světlo, které vzorkem projde (červeně), tak putuje vlivem ohybu mimo prstenec v objektivu a interferuje se původním světlem (žlutě) v obrazové rovině = sčítání, odečítání vln = změna intenzity světla. Tím dojde k zviditelnění obrysů vzorku.



Phase Contrast Imaging of Transparent Thin Specimens



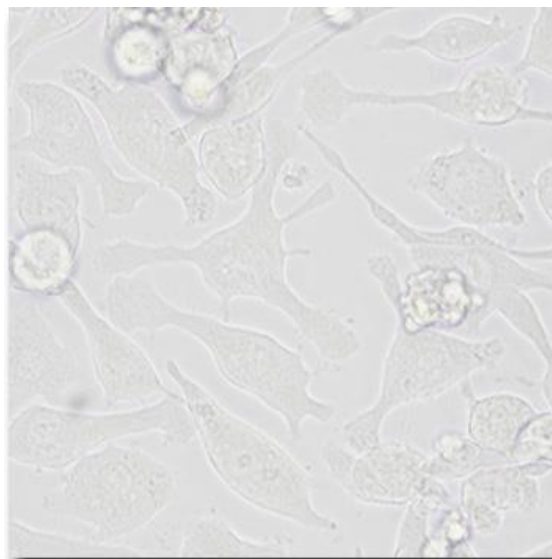
HeLa buňky v petriho misce

<https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html>

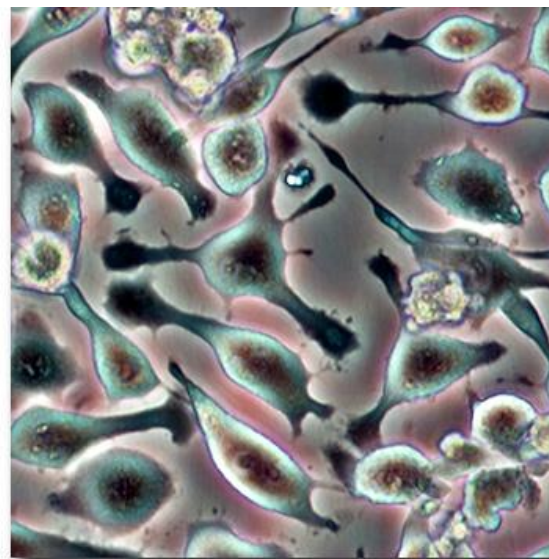
<https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/news/hela-a-human-bauplan-in-the-petri-dish>

Buňky viděné mikroskopy bez fázového kontrastu a s fázovým kontrastem

Procházející světlo



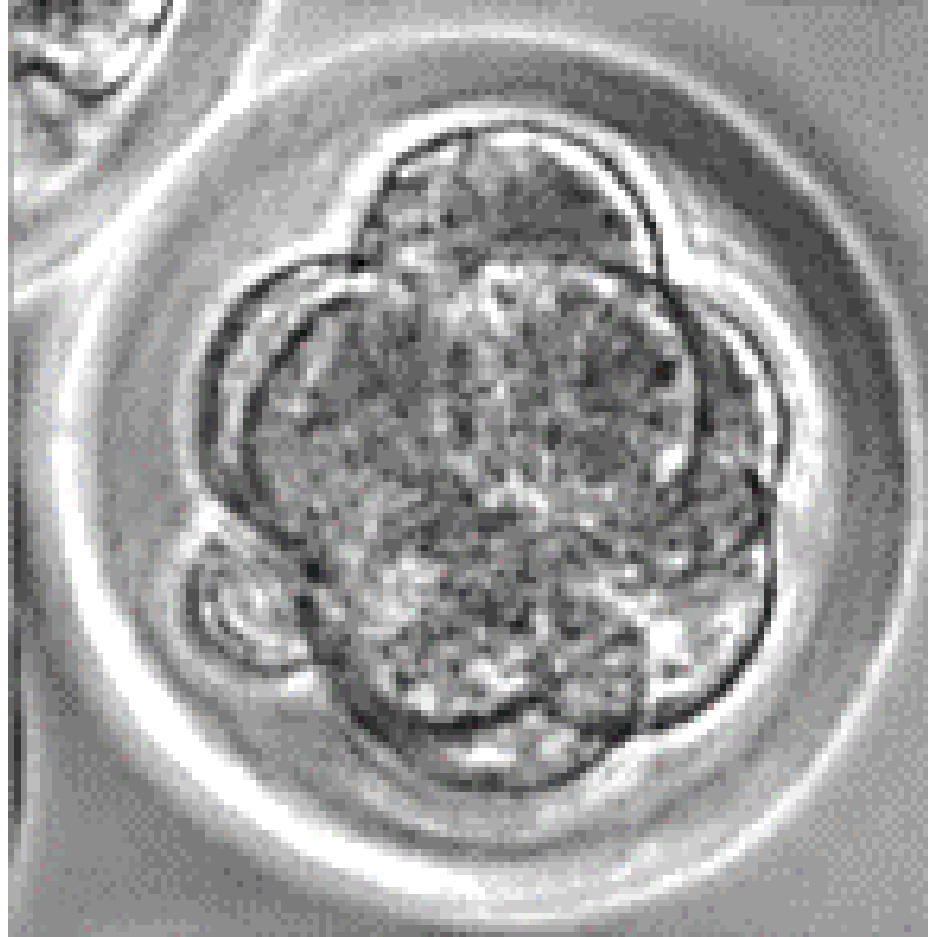
Fázový kontrast



Pro fázový kontrast je typická aureola (světlý obrys) okolo buněk – tzv. halo efekt.

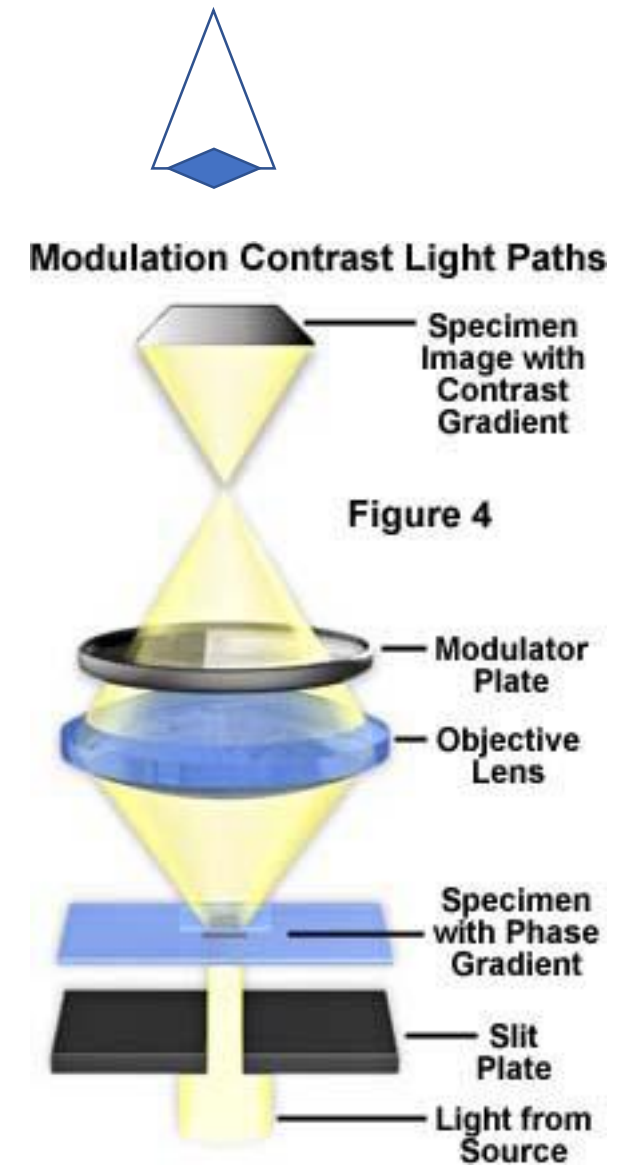
Pokud se chceme vyhnout tomuto halo efektu, musíme použít Hoffmanův modulační kontrast nebo diferenciální interferenční kontrast (DIC).

Fázový kontrast - embryo



Hoffmanův modulační kontrast

- **Hoffmanův modulační kontrast** je další metodou, která umožňuje dosáhnout zvýšení kontrastu obrazu pozorovaného předmětu.
- Lze přirovnat k verzi tmavé mikroskopie, při které je však šikmého osvětlení dosaženo pomocí mimoosově umístěné štěrbinové apertury v kondenzoru. Pomocí speciální clony nacházející se v předmětové ohniskové rovině kondenzoru a amplitudového modulátoru v obrazové ohniskové rovině objektivu je ovlivňováno (modulováno) množství přímého světla propuštěného objektivem.
- Kdyby tento modulátor byl z nepropustného materiálu, tak se výsledek podobá pozorování v tmném poli.
- Pro své unikátní vlastnosti zobrazení se často využívá v IVF praxi



Imaging Phase Gradients

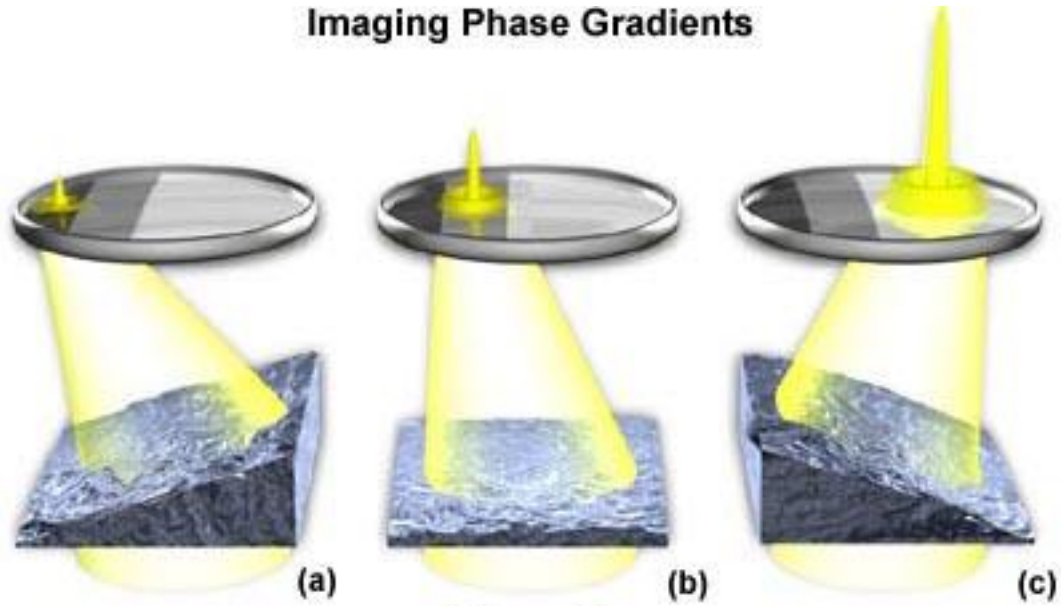


Figure 5



Modulation Contrast Light Paths

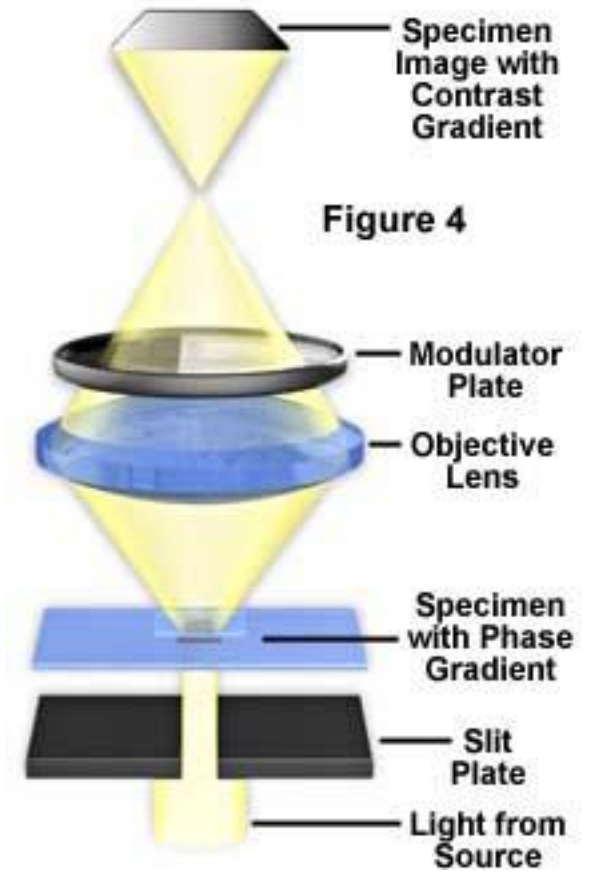
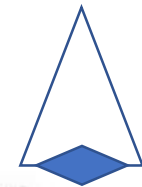
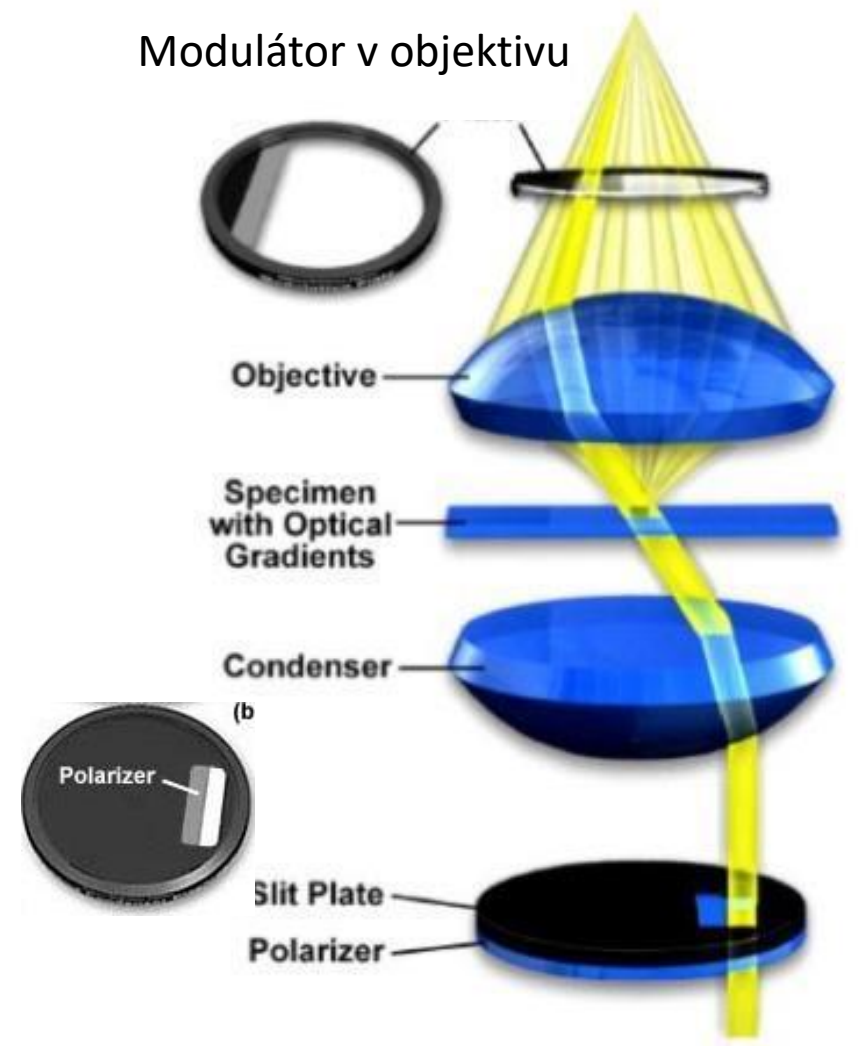
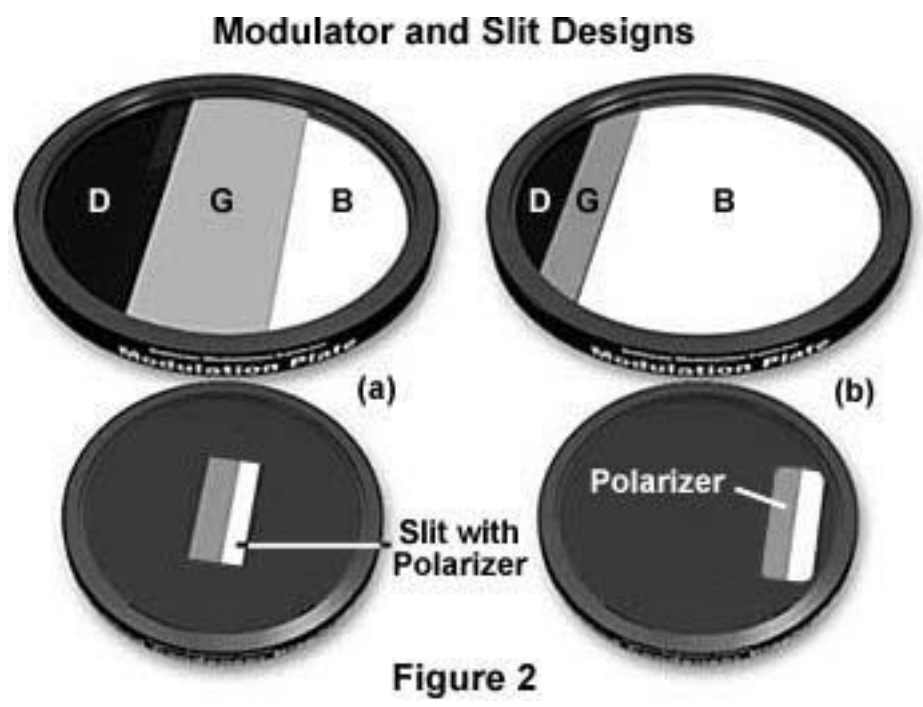


Figure 4

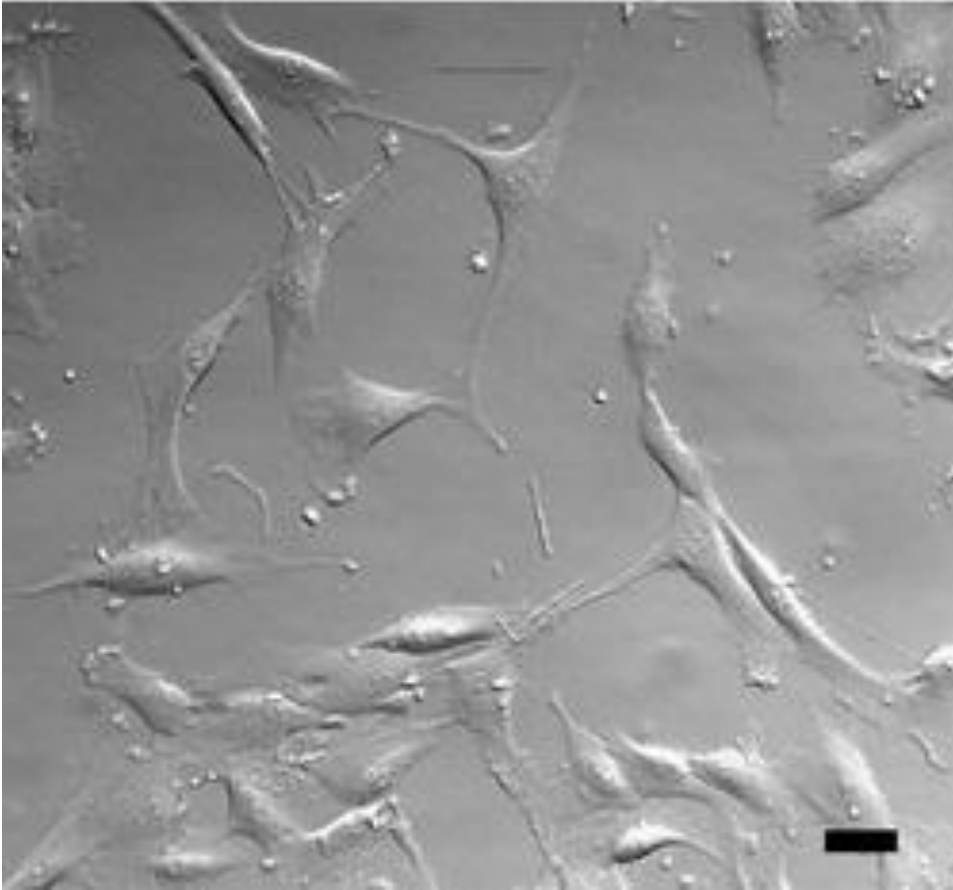


Hoffman Modulation Contrast Microscopy

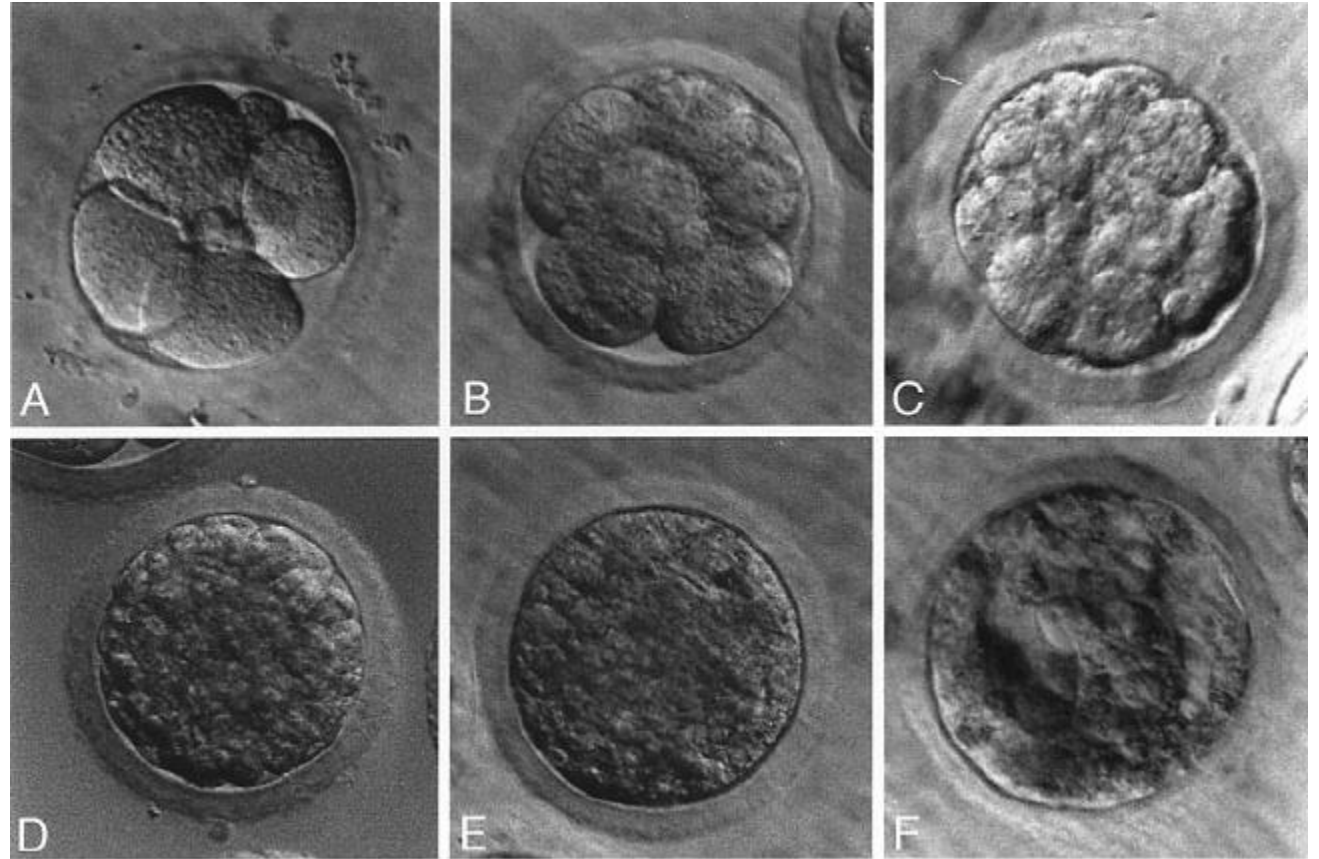
Modulátor v objektivu



Hoffmanův modulační kontrast



Buňky lidského menisku (fibrochondrocyty)
Měřítko = 10 μm

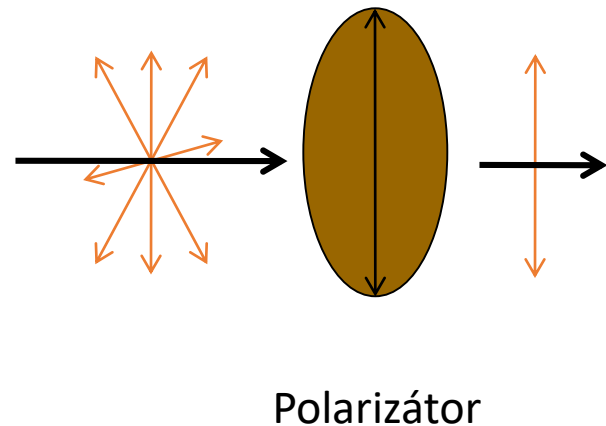
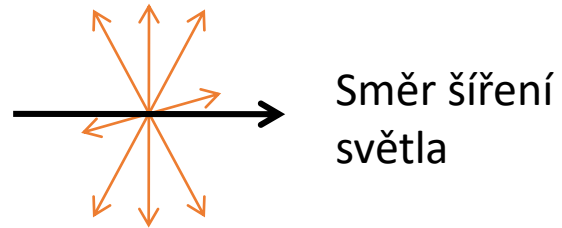


Příklad použití osvětlení Hofmannovým kontrastem je na klinikách pro umělé oplodnění, což umožňuje zobrazení jednotlivých buněk a plasticitu zobrazení embrya. Při pozorování ve světlém poli je téměř průhledný oocyt obtížně viditelný.

Polarizační mikroskop

- Polarizační mikroskop je oproti běžnému biologickému mikroskopu vybaven polarizačním zařízením, které umožňuje studovat i ty vlastnosti vzorků, které nejsou patrné (zanikají) v nepolarizovaném (obyčejném) světle.
- Světlo, které prochází vzorkem je ovlivněno různě v různých směrech – anizotropní materiál
- Nejdůležitější součástí polarizačního mikroskopu je **polarizační zařízení** sestávající ze dvou komponent. První z nich, tzv. **polarizátor**, je obvykle zabudován v kondenzoru, u modernějších mikroskopů bývá součástí osvětlovacího zařízení. Druhý, **analyzátor**, je umístěn pod objektivem, nebo v tubusu mikroskopu a je zkonstruován tak, že ho lze z tubu vysunout a tím odstranit z optické soustavy mikroskopu.

Polarizace světla



- Znázornění nepolarizovaného světla
- oranžová šipka reprezentuje orientaci pouze elektrické složky světla, pro zjednodušení je kolmá magnetická vynechána. Každá šipka/orientace odpovídá jednomu paprsku.
- Většina světelných zdrojů produkuje nepolarizované světlo – bez preferovaného úhlu polarizace
- Polarizátor propouští jen jeden směr polarizace světla

Použití polarizátoru (polarizačního filtru) – eliminuje světlo odražené od hladiny



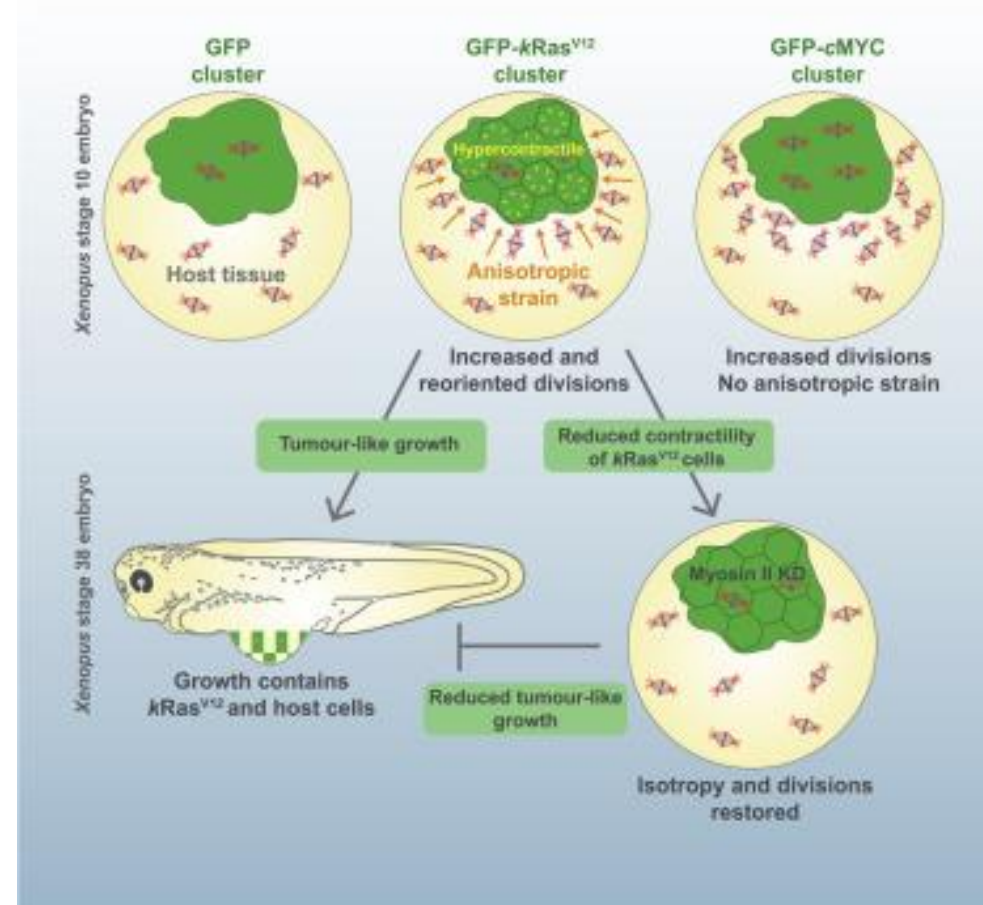
Biologické vzorky



Co je v buňkách anizotropní

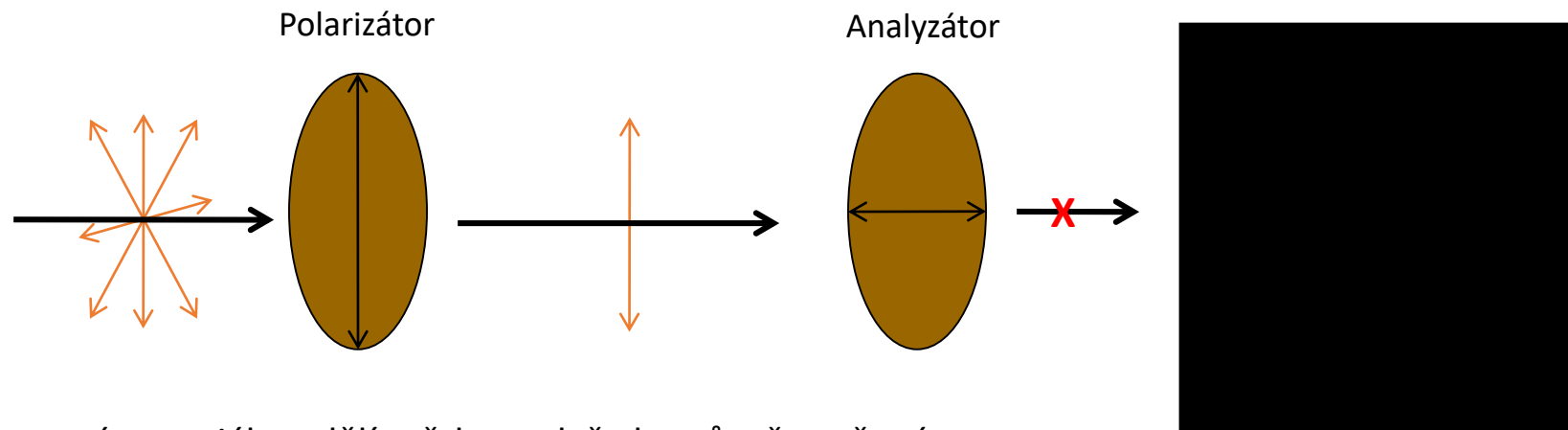
Polymery: DNA, aktin, mikrotubuly

Membrány

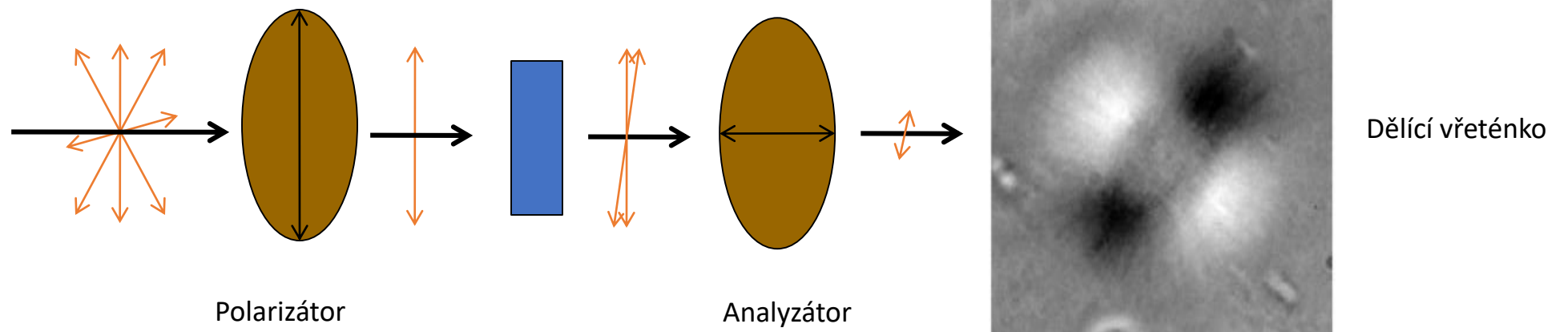


Polarizátory

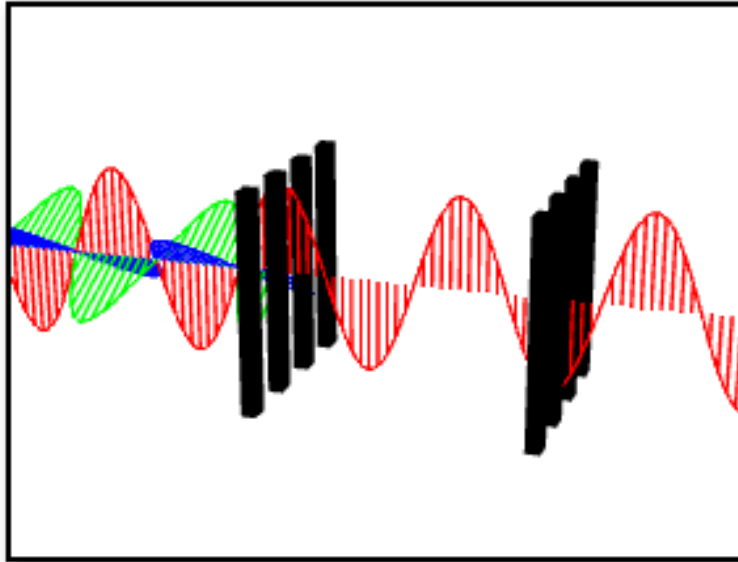
- Propouštějí jeden směr polarizace světla
- Když jsou dva, kolmo otočené, pak světlo neprojde



- Anizotropní materiál rozdělí světlo na dvě vlny různě otočené



Polarization of Light (3-D Version)



First Polarizer Angle: 0°



Second Polarizer Angle: 0°



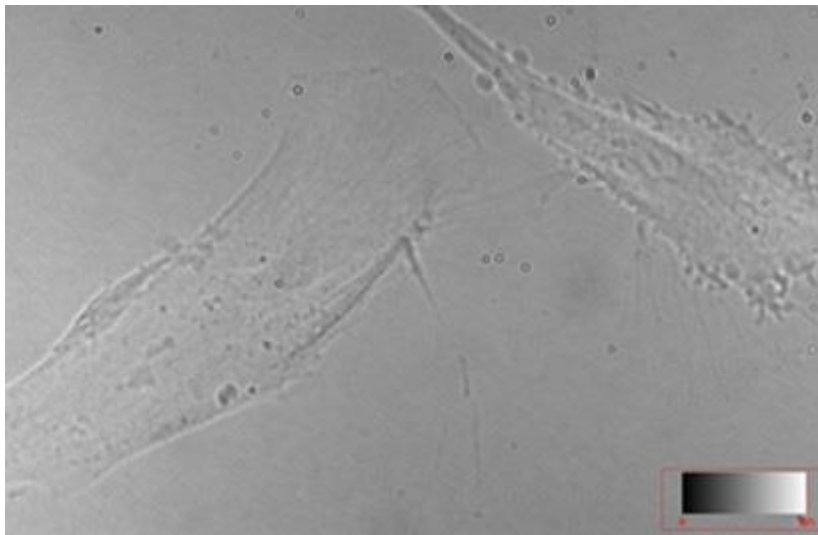
<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/polarizedlight/3dpolarized/index.html>

Polarizační mikroskopie

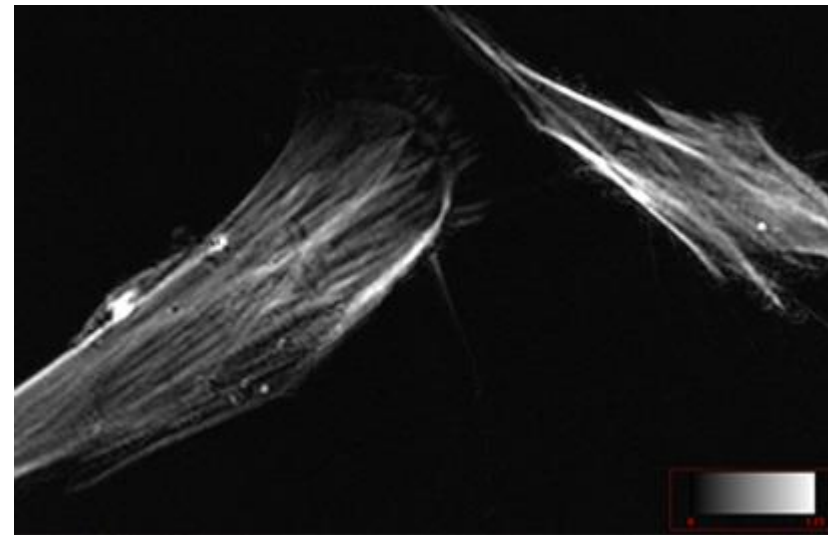
- Využívá se pro
 - zviditelnění uspořádání struktur
 - Dělicí vřetenko
 - Cytoskeletální struktury
 - Membrány
 - Kolagen
- Netřeba barvení/značení vzorků

Příklady

– astrocyty



Procházející světlo



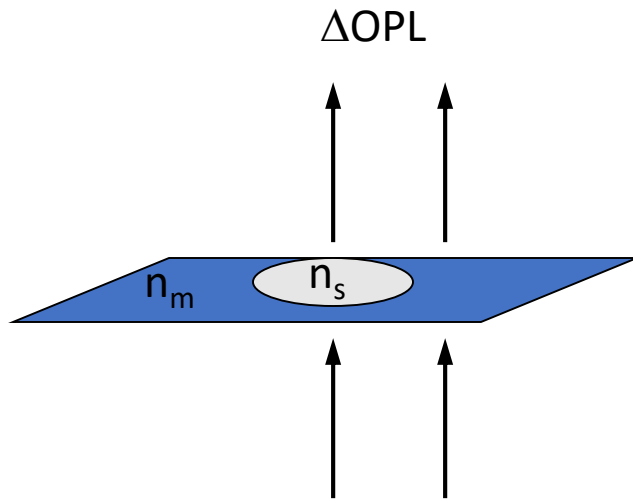
Polarizační mikroskopie

Spermatoocyty jeřábové mušky



Rudolf Oldenbourg and James LaFountain

Diferenciální interferenční kontrast - DIC



Idea:

Interferencí dvou paprsků jsme schopni určit jejich rozdílnou délku dráhy

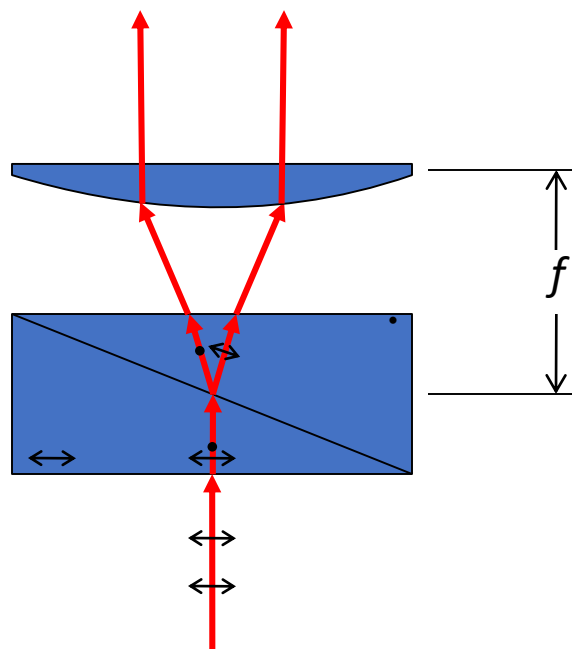
Optický systém pak vytváří obraz s objektem, který se jeví jako černý až bílý na šedém pozadí. Tento obrázek je podobný tomu, který lze získat pomocí mikroskopie fázového kontrastu ale bez difrakční halo. Tato technika byla vyvinuta polským fyzikem Georges Nomarskim v roce 1952

Hranol - dvojlomný materiál



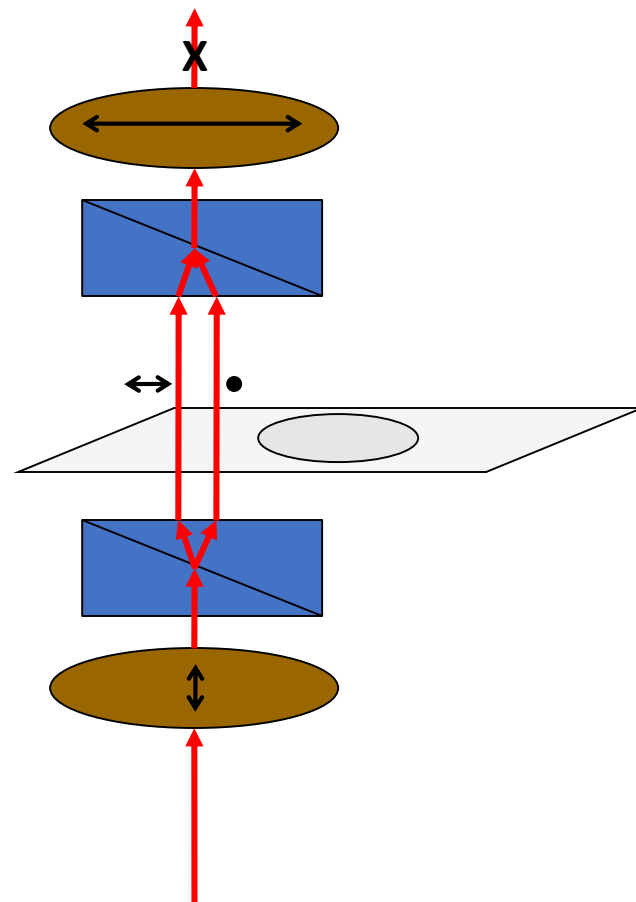
- Pro DIC je potřebný hranol - dvojlomný materiál, který má rozdílné indexy lomu pro světlo polarizované v kolmých směrech.
- Jsou tedy vytvořeny dva paprsky - obrazy objektu
- Toho je využíváno pro DIC mikroskopii

Nomarského hranol



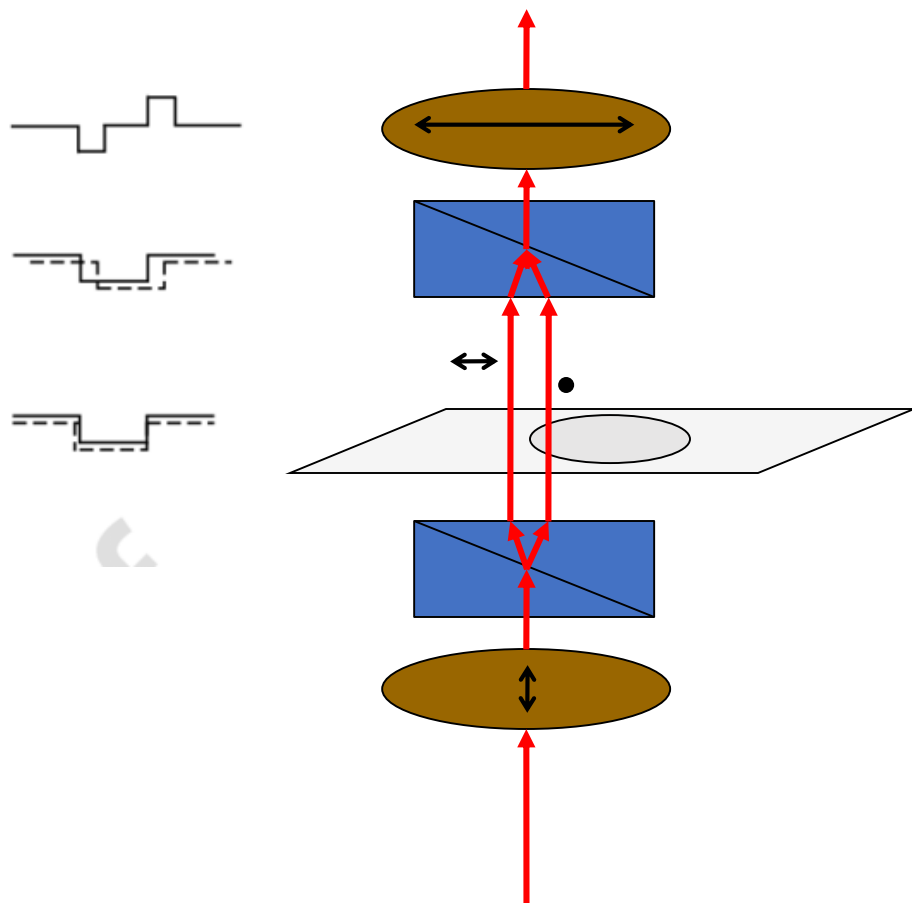
- Hranol umožňuje rozdělit polarizovaný paprsek na paprsky dva kolmo polarizované
 - Označuje kmitání dopředu-dozadu
- ↔ Označuje kmitání zleva doprava

Jak DIC tvoří kontrast



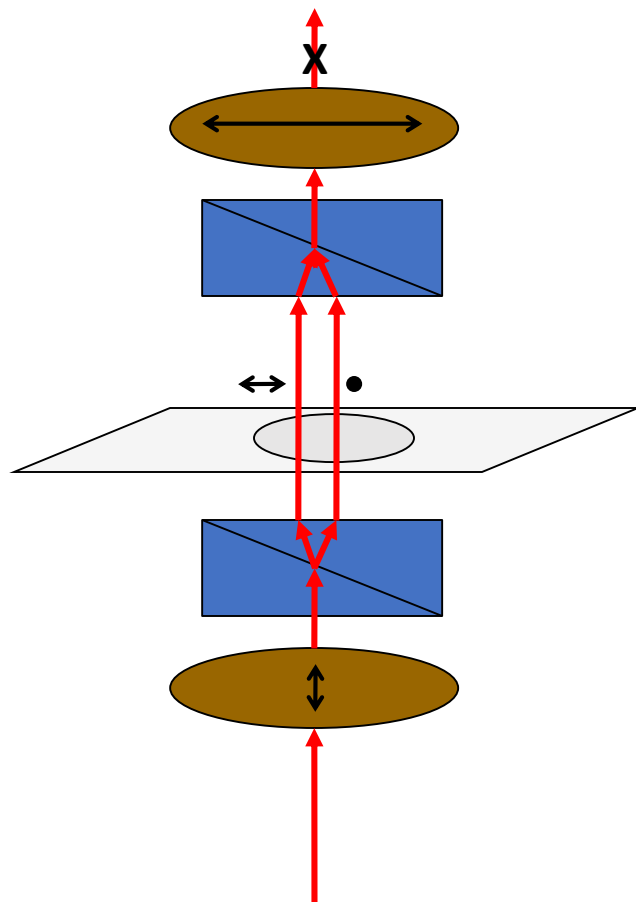
- Světlo projde přes polarizátor
- Jsou vytvořeny dva paprsky s kolmou polarizací
- Projdou bez změny rovinou vzorku
- Na dalším hranolu jsou zpět spojeny a otočeny se stejnou polarizací
- Přes analyzátor neprojdou

Jak DIC tvoří kontrast



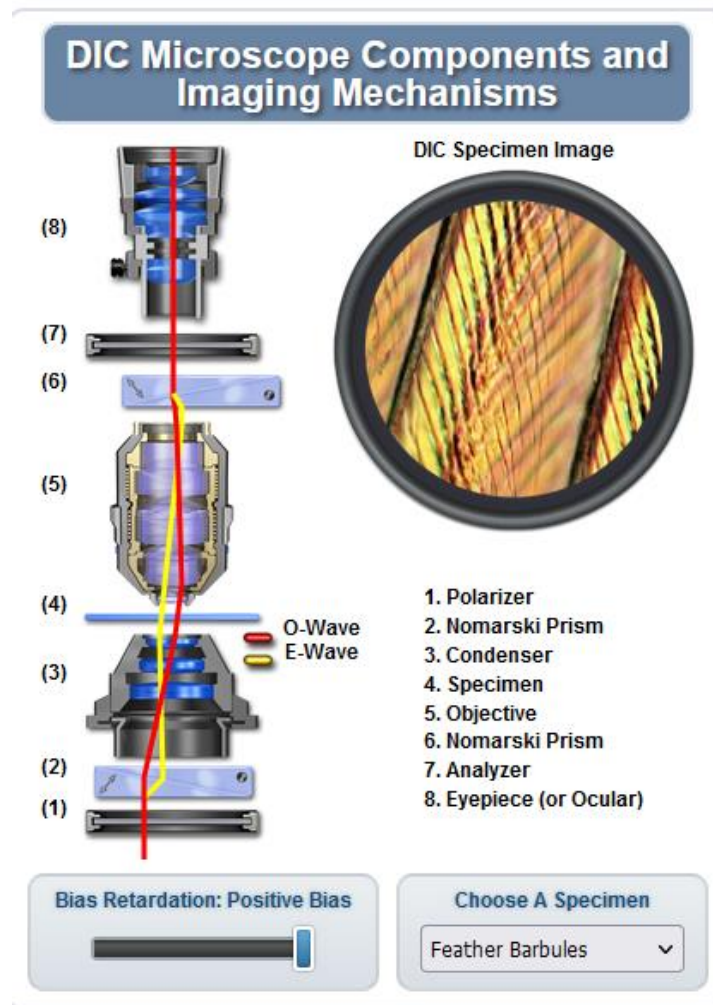
- Pravý paprsek je ovlivněn vzorkem
- Dojde k vytvoření eliptické polarizace
- Světlo projde přes analyzátor

Jak DIC tvoří kontrast



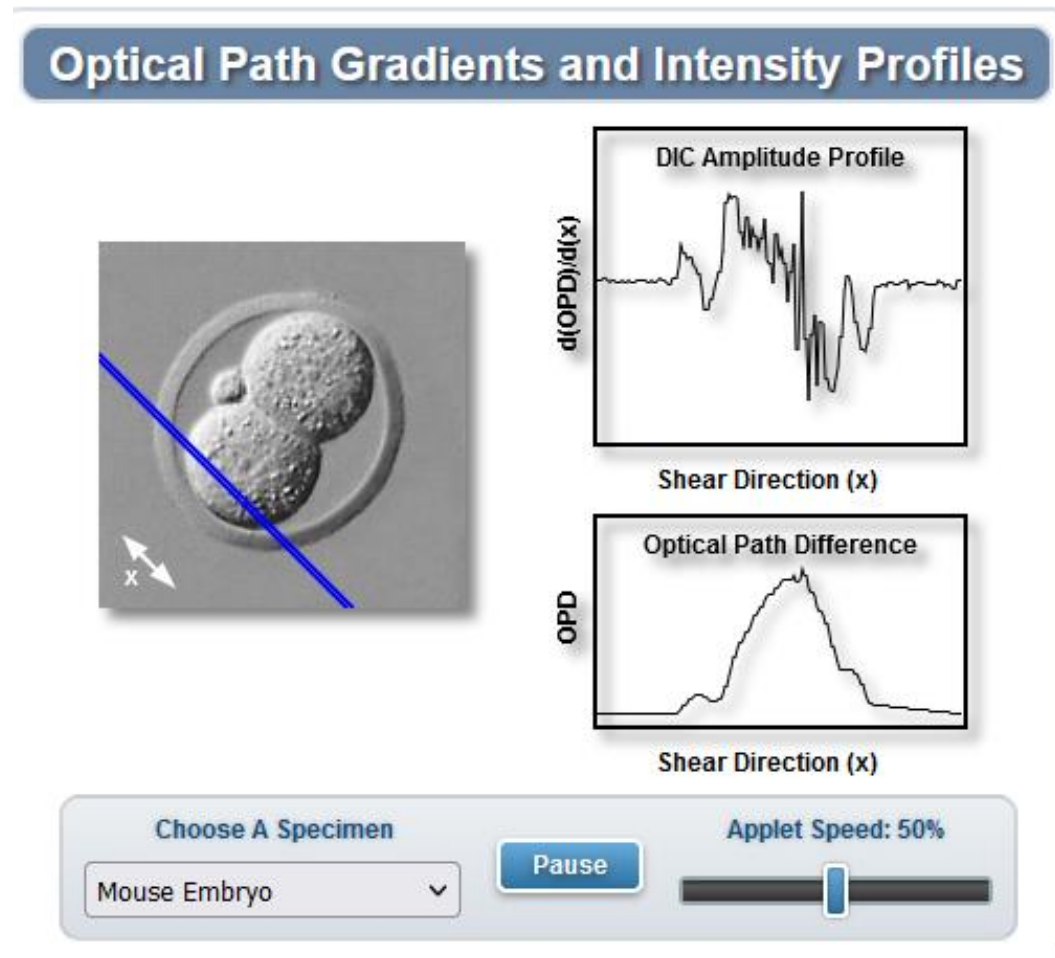
- Oba paprsky projdou vzorkem se stejným otočením
- Na dalším hranolu jsou zpět spojeny a otočeny se stejnou polarizací
- Přes analyzátor neprojdou

DIC ukázky



<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/dic/lightpaths/index.html>

DIC embryo



<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/dic/dicintegration/index.html>

Porovnání fázového kontrastu a DIC

Halos in Phase Contrast and DIC Microscopy

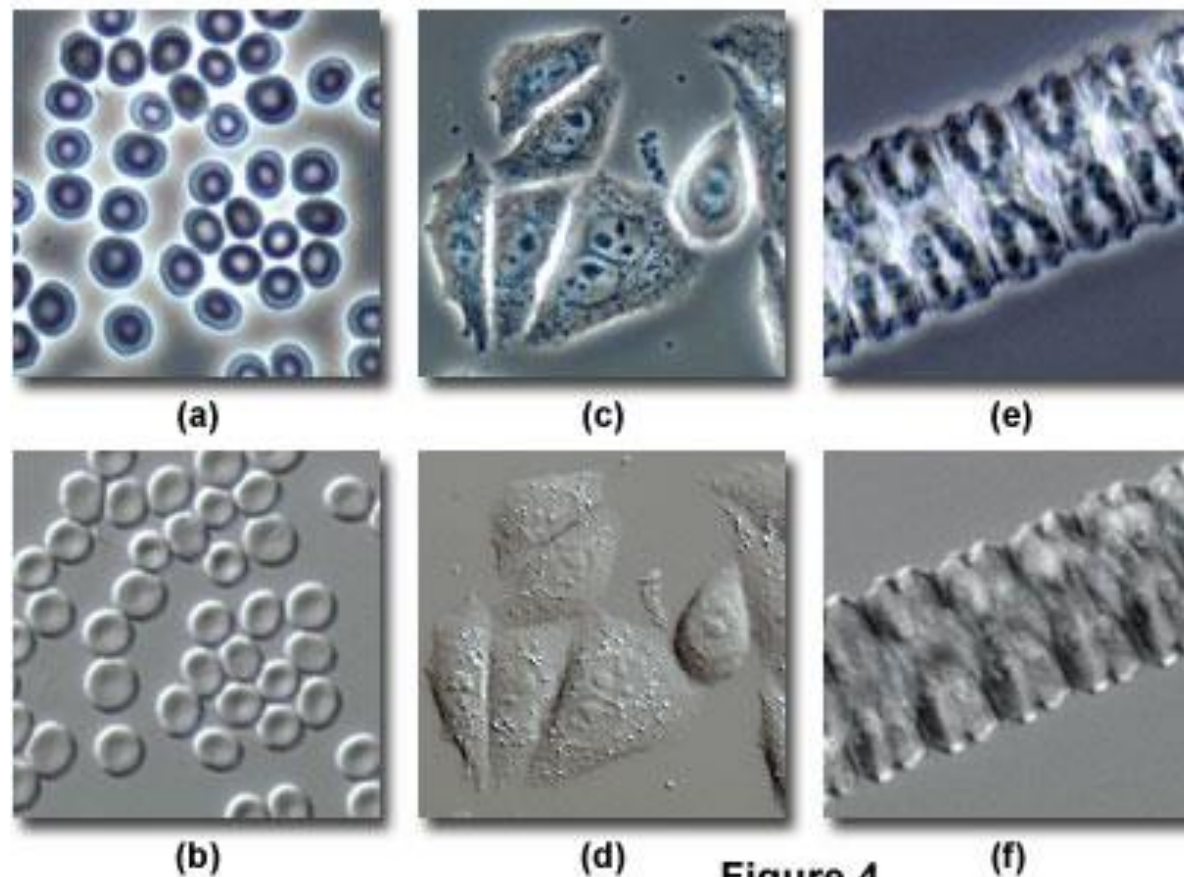


Figure 4

Caenorhabditis elegans v DIC



<https://www.youtube.com/watch?v=M2ApXHhYbaw>