



POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

60552

Patent dodatkowy
do patentu _____

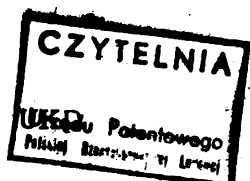
Zgłoszono: 09.III.1967 (P 119 384)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 5.IX.1970

Kl. 42 h, 1/01

MKP G 02 b, 13/00



Twórca wynalazku: Maksymilian Pluta

Właściciel patentu: Centralne Laboratorium Optyki, Warszawa (Polska)

Mikroskopowe urządzenie amplitudowo-kontrastowe

1

Przedmiotem wynalazku jest mikroskopowe urządzenie amplitudowo-kontrastowe, służące do obserwacji preparatów pochłaniających w pewnym stopniu światło, zwłaszcza drobnych szczegółów i struktur w zabarwionych komórkach i tkankach biologicznych.

Do chwili odkrycia i rozpowszechnienia się mikroskopu fazowo-kontrastowego najbardziej skuteczną, chociaż zawierającą poważne ograniczenia, metodą badania mikroobъекtów przezroczystych była metoda sztucznego zabarwiania preparatów. Jeszcze dziś metoda ta stanowi jedną z podstawowych metod mikroskopii, zwłaszcza w medycznych laboratoriach analitycznych, jak również w licznych pracach badawczych cyto i histochemicznych.

W zabarwionych preparatach obok elementów i struktur dobrze barwiących się występują szczegóły miernie i słabo zabarwione, niezbyt dobrze widoczne w zwykłym mikroskopie w jasnym polu. Szczegóły takie wprowadzić mogą być lepiej uwidocznione w mikroskopie fazowo-kontrastowym, ale równocześnie zostałyby sfalszowane lub nawet zagubione obrazy elementów intensywniej zabarwionych. Metoda kontrastu fazowego nie nadaje się bowiem do obserwacji mikroobъекtów w znacznym stopniu pochłaniających światło. Stwierdzono jednak, że obraz przedmiotów amplitudowo-fazowych (tzn. pochłaniających w pewnym stopniu światło i zmieniających jego fazę) może być w mikrosko-

2

pie fazowo-kontrastowym dodatnim dość wierny i kontrastowy, jeśli przesunięcie fazowe światła bezpośredniego (nieugiętego na preparacie) będzie znacznie mniejsze od 90° . Powstała więc myśl wykonywania do celów obserwacji przedmiotów amplitudowych (tzn. pochłaniających w pewnym stopniu światło) urządzeń analogicznych do typowych urządzeń fazowo-kontrastowych, w których na miejscu płytki fazowej, na ogół wykonywanej w postaci pierścienia, znajdowałby się pierścień amplitudowy, osłabiający w pewnym stopniu natężenie światła bezpośredniego bez żadnej zmiany jego fazy.

Znane są próby wykonywania takich pierścieni przez naparowanie w próżni na odpowiedniej soczewce obiektywu mikroskopowego warstwy metalicznej. Warstwa metaliczna osłabia jednak natężenie przechodzącego przez światła w dużej mierze na skutek odbijania się od niej promieni świetlnych, które następnie, ulegając wtórnym odbiciom na powierzchniach elementów optycznych, stają się źródłem szkodliwego światła, tzw. dzikiego lub pasożytniczego, obniżającego w znacznym stopniu kontrastowość obrazu mikroskopowego.

Celem wynalazku jest opracowanie konstrukcji mikroskopowego urządzenia amplitudowo-kontrastowego z pierścieniami amplitudowymi, które nie miałyby powyższych wad pierścieni metalicznych i które osłabiałoby natężenie przechodzącego prze-

zeń światła wyłącznie na skutek jego pochłaniania.

Zgodnie z wytyczonym zadaniem powyższy cel osiągnięto dzięki zastosowaniu pierścienia amplitudowego, składającego się z dwóch na siebie nałożonych warstw: dielektrycznej, całkowicie przezroczystej i warstwy sadzy, zaklejonych między dwiema soczewkami obiektywu, przy czym współczynnik załamania kleiwa i współczynnik załamania warstwy dielektrycznej oraz jej grubość są tak dobrane, aby całkowicie skompensowane było ujemne przesunięcie fazowe warstwy sadzy. Sadze otrzymywane np. ze spalania stearyny, nafty, ksylolu itp. substancji są, powiem idealnymi absorbentami światła, mają jednak duży współczynnik załamania (powyżej 2) i w typowych środowiskach optycznych wywołują ujemne przesunięcie fazowe przechodzącego przez nie światła. To przesunięcie fazowe kompensuje się właśnie za pomocą warstwy dielektrycznej o współczynniku załamania znacznie mniejszym od współczynnika załamania środowiska (kleiwa) otaczającego pierścień sadzowy.

Mikroskopowe urządzenie amplitudowo-kontrastowe według wynalazku oraz przykładowy sposób jego realizacji dokładnie wyjaśniono na rysunku na którym fig. 1 przedstawia schemat układu optycznego urządzenia, fig. 2 pierścień amplitudowy w widoku z góry, fig. 3 pierścień przysłony kondensorowej w widoku z góry, fig. 4 soczewkę z nałożoną nań pomocniczą warstwą sadzy, fig. 5 tę samą soczewkę z wytoczonym w warstwie sadzy przezroczystym kanalikiem pierścieniowym, fig. 6 tą samą soczewkę co poprzednio ale z naparowaną w próżni warstwą dielektryczną o odpowiedniej grubości, fig. 7 tą samą soczewkę co poprzednio z naparowanym pierścieniem dielektrycznym, otrzymanym w wyniku usunięcia pomocniczej warstwy sadzy, fig. 8 tą samą soczewkę co poprzednio z naniesioną warstwą sadzy o określonej przepuszczalności światła, fig. 9 tą samą soczewkę co poprzednio ale po usunięciu spoza pierścienia dielektrycznego warstwy sadzowej, fig. 10 tą samą soczewkę co poprzednio z wykonanym ostatecznie pierścieniem amplitudowym dielektryczno-sadzowym po zaklejeniu go drugą soczewką, stanowiących łącznie odpowiednio wybrany zespół soczewkowy obiektywu mikroskopowego.

Jak uwidoczniło na fig. 1 do 3 podstawowym elementem urządzenia amplitudowo-kontrastowego według wynalazku jest pierścień amplitudowy **A** wykonany z warstwy dielektrycznej **D** i sadzowej **S** zaklejonych za pomocą kleiwa optycznego **B** (na przykład balsamu kanadyjskiego) między dwiema soczewkami **1** i **2** odpowiedniego zespołu soczewkowego obiektywu mikroskopowego **Ob**. Pierścień amplitudowy **A** jest optycznie sprzężony z otworem pierścieniowym **Sz** przysłony aperturowej **P** kondensora **K**, tzn. obraz otworu **Sz** po przejściu światła przez kondensor **K** i obserwowany preparat tworzy się w obiektywie **Ob** na pierścieniu amplitudowym **A**.

Najkorzystniej jest aby pierścień amplitudowy **A** znajdował się w płaszczyźnie ogniskowej obrazowej obiektywu **Ob**, wówczas pierścieniowy otwór **Sz** przysłony kondensorowej **P** powinien się znajdować w płaszczyźnie ogniskowej przedmioto-

wej kondensora **K**. Nie jest to jednak warunkiem koniecznym, pierścień amplitudowy **A** może się znajdować w innym miejscu mikroskopu byle tylko w płaszczyźnie sprzężonej w stosunku do płaszczyzny pierścieniowej przysłony **P**. Pierścień **A** niekoniecznie musi się znajdować między soczewkami obiektywu może on być zaklejony również między dwiema płasko-równoległymi płytkami szklanymi. Światło przechodząc przez preparat umieszczony w płaszczyźnie przedmiotowej **II** obiektywu **Ob** ulega na nim ugięciu, tworząc światło dyfrakcyjne. Światło to wpadając do obiektywu **Ob** w przeważającej mierze przechodzi poza pierścieniem amplitudowym **A** podczas gdy przez pierścień ten przechodzi tylko światło nieugięte na preparacie, zwane światłem bezpośrednim. Natężenie tego światła jest osłabione przez pierścień amplitudowy w 75–80% (jest to optymalna absorpcja pierścienia amplitudowego).

Obydwa rodzaje światła, tzn. dyfrakcyjne i bezpośrednie (o zmniejszonym przez pierścień amplitudowy **A** natężeniu) nakładają się w płaszczyźnie obrazowej obiektywu, dając kontrastowy obraz preparatu, który obserwuje się za pomocą okulara **Ok**, podobnie jak w zwykłym mikroskopie.

Jak już poprzednio wspomniano, sadze otrzymywane ze spalania stearyny, nafty i innych substancji mają duży współczynnik załamania (ponad 2). Warstwa sadzy **S** (fig. 1) o absorpcji kilkudziesięciu procent będzie wywoływała zatem ujemne przesunięcie fazy przechodzącego przez nie światła. To ujemne przesunięcie fazowe może być jednak skompensowane przez nałożenie pod warstwę sadzy **S** podkładu substancji dielektrycznej **D** o współczynniku załamania znacznie mniejszym od współczynnika załamania kleiwa **B**, którym pierścień amplitudowy zakleja się między dwiema soczewkami (lub płytkami) **1** i **2**.

Przykładowo według wynalazku pierścień amplitudowy **A** można wykonać stosując następujące substancje:

- sadze (**S**) z płomienia stearynowego, jako materiał pochłaniający światło,
- kriolit (**D**) jako materiał dielektryczny (przezroczysty) do kompensacji ujemnego przesunięcia fazowego warstwy sadzy,
- balsam kanadyjski (**B**), jako kleiwo zabezpieczające w sposób trwały pierścień amplitudowy między dwiema soczewkami obiektywu.

Ogólnie warstwa sadzy stearynowej **S** o przepuszczalności światła **T** w środowisku balsamu kanadyjskiego **B** wywołuje przesunięcie fazowe φ fali świetlnej, określone następującym wzorem

$$\delta = -2,3 (n_B - n_S) \frac{\log T}{k}$$

gdzie δ – różnica drogi optycznej, n_B – współczynnik załamania balsmu, n_S – współczynnik załamania warstwy sadzy, k – współczynnik absorpcji sadzy.

Miedzy różnicą drogi optycznej δ i przesunięciem fazowym istnieje związek: $\varphi = \frac{2\pi\delta}{\lambda}$, gdzie λ jest

długością fali świetlnej. Współczynnik załamania i absorpcji sadzy z płomienia stearynowego wynoszą: $n_S = 2,32$; $k = 2,01 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$. I tak na przykład dla pierścienia amplitudowego o przepuszczal-

ności światła $T = 0,2$ (tzn. 20%) różnica drogi optycznej δ warstwy sadzowej **S** względem środowiska balsamu kanadyjskiego **B** o współczynniku załamania $n_B = 1,53$ będzie wynosić $\delta = 0,633 \times 10^{-5}$ cm (znak "—" wskazuje na ujemne przesunięcie fazowe).

Dla skompensowania tej różnicy drogi optycznej potrzebna jest warstwa kriolitu **D** o grubości:

$$t = \frac{\delta}{n_B - n_D}$$

gdzie n_D jest współczynnikiem załamania kriolitu. Przyjmując wartość współczynnika $n_D = 1,32$, otrzymuje się grubość $t = 0,3 \mu$. Zatem warstwa kriolitu **D** o grubości $t = 0,3 \mu$ kompensuje ujemne przesunięcie warstwy sadzy **S** o przepuszczalności światła $T = 0,2$ (przy zaklejeniu pierścienia amplitudowego balsamem kanadyjskim o współczynniku załamania $n_B = 1,53$).

Sposób przykładowego wykonania pierścienia amplitudowego przedstawiono na fig. 4–10. Na klejonej powierzchni soczewki **1** nanosi się w znany sposób według patentu nr 47845 pomocniczą warstwę sadzy **PS** (fig. 4), kilkakrotnie przesuwając soczewkę przez płomień lampki stearynowej. Następnie warstwę sadzy **SP** utrzuca się, zwilżając ją alkoholem. Po odparowaniu alkoholu, w warstwie sadzy wycina się w znany sposób według patentu 47845 pierścieniowy kanalik **PK** (fig. 5) o wymiarach pierścienia amplitudowego. Z kolei na powierzchnię soczewki z wytoczonym pierścieniowym kanalikiem naparowuje się w próżni warstwę kriolitu **D** (fig. 6) o odpowiedniej grubości. Po naparowaniu kriolitu pomocniczą warstwę sadzy **PS** wraz z osadzonymi na niej parami dielektryku ściiera się watą i ewentualnie przemywa powierzchnię soczewki eterem. W rezultacie otrzymuje się na soczewce pierścień dielektryczny **D** (fig. 7). Następnie na powierzchnię soczewki z naparowanym pierścieniem dielektrycznym nakłada się w analogiczny sposób jak poprzednio zasadniczą warstwę sadzy stearynowej **S** (fig. 8), o żądanej przepuszczalności światła, którą utrzuca się, zwilżając ją tym razem eterem. Postępuje się przy tym podobnie jak poprzednio przy utrwalaniu warstwy pomocniczej **PS** alkoholem. Następnie wytacza się sadze z obszarów poza pierścieniem dielektrycznym **D**, stosując to samo znane z patentu nr 47845 urządzenie co przy wytaczaniu przezroczystego kanalika **PK** (fig. 5). W rezultacie na soczewce otrzymuje się pierścień amplitudowy **A** (fig. 9), dielektryczno-sadzowy, który ostatecznie zakleja się za pomocą balsamu kanadyjskiego **B** drugą soczewką **2** (fig. 10),

stanowiącą łącznie z poprzednią **1** odpowiednio wybrany zespół soczewkowy obiektywu mikroskopowego **Ob** (fig. 1).

Mikroskop wyposażony w urządzenie amplitudowo-kontrastowe według wynalazku szczególnie dobrze nadaje się do obserwacji preparatów pochłaniających w pewnym stopniu światło, zwłaszcza drobnych szczegółów i struktur w zabarwionych komórkach i tkankach biologicznych, odznaczając się przy tym w stosunku do zwykłego mikroskopu większą zdolnością rozdzielczą, większym kontrastem obrazu oraz większą wyrazistością obrazów drobnych szczegółów występujących obok lub na tle większych mikroobiektywów. Ponadto pole widzenia mikroskopu ma przyjemne dla oka brunatnawo-żółte zabarwienie.

W odmianie urządzenia według wynalazku pierścień amplitudowy i odpowiednio aperturowa przysłona pierścieniowa kondensora zastąpiony jest dwoma lub większą liczbą pierścieni amplitudowych i pierścieniowych przysłon kondensorowych. Pierścień amplitudowy może być wykonany w postaci płytki amplitudowej i sprzężonej z nią przysłony kondensorowej w kształcie krążka, prostokąta itp.

Urządzenie to znajduje zastosowanie nie tylko do badań mikroskopowych w świetle przechodzącym, lecz również do badań w świetle odbitym.

Zastrzeżenia patentowe

1. Mikroskopowe urządzenie amplitudowo-kontrastowe, z pierścieniem amplitudowym w obiektywie, umieszczonym w płaszczyźnie sprzężonej względem pierścieniowej przysłony aperturowej kondensora, stosowane do badań mikroskopowych w świetle przechodzącym jak i odbitym, **znamiennie tym**, że jego pierścień amplitudowy (**A**) dielektryczno-sadzowy, składa się z warstwy sadzy (**S**) pochłaniającej w pewnym stopniu światło oraz z warstwy dielektrycznej (**D**) kompensującej ujemne przesunięcie fazowe warstwy sadzowej, przy czym obydwie warstwy stanowiące pierścień amplitudowy zaklejują się między dwiema soczewkami (**1** i **2**) obiektywu (**Ob**) lub między dwiema płaskorównoległymi płytkami umieszczonymi w dowolnej płaszczyźnie mikroskopu sprzężonej z płaszczyzną przysłony aperturowej kondensora.

2. Odmiana urządzenia według zastrz. 1 **znamiennie tym**, że jest wyposażona w zespół pierścieni amplitudowych i sprzężonych z nimi pierścieniowych przysłon kondensorowych.

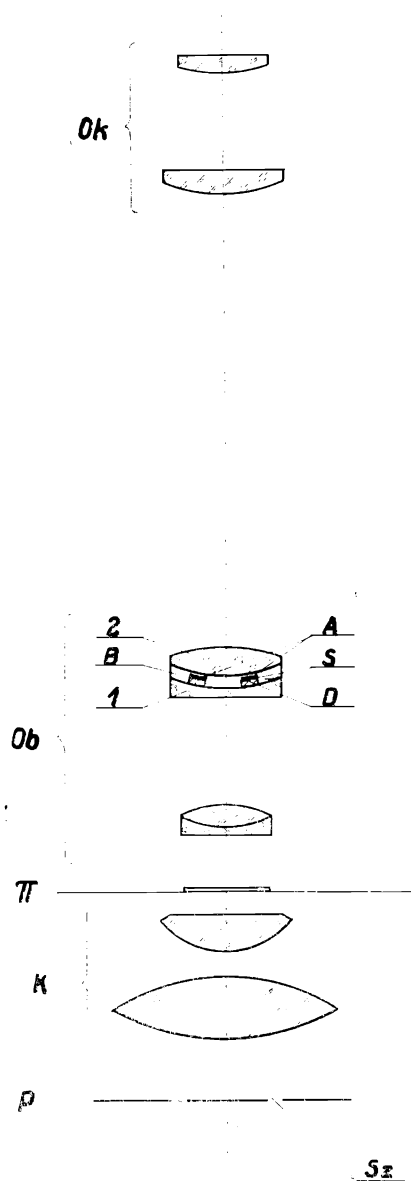


Fig. 1

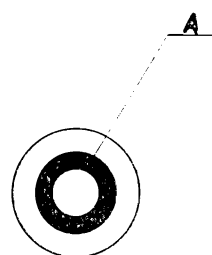


Fig. 2

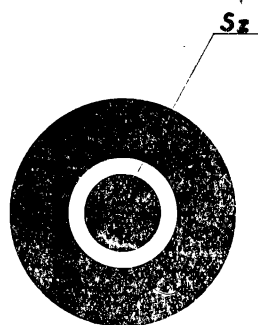


Fig. 3

