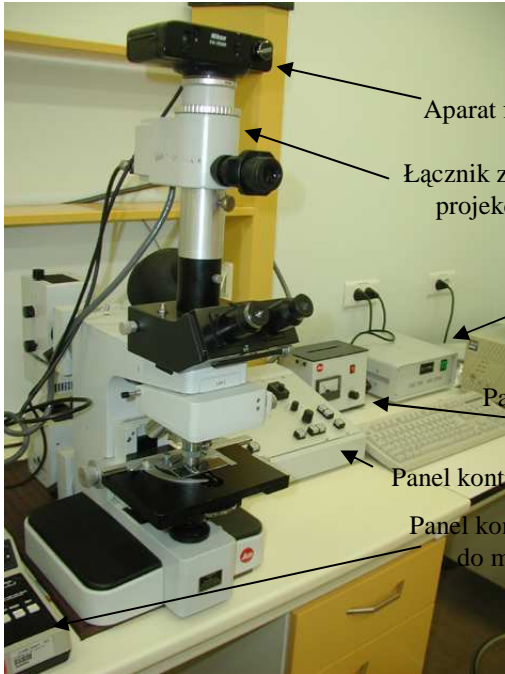


Mikroskop Leitz Orhoplan z przystawką do mikrofotografii Nikon



Aparat fotograficzny

Łącznik z okulem projekcyjnym

Panel kontrolny lampy rtęciowej

Panel kontrolny lampy halogenowej

Panel kontrolny mikroskopu

Panel kontrolny przystawki do mikrofotografii

Panel kontrolny przystawki do mikrofotografii



Czytnik czasu ekspozycji

Klawisz korekty czasu ekspozycji

Klawisz kontroli ISO

Klawisz przewijania

Klawisz zwalniający migawkę

Aparat fotograficzny



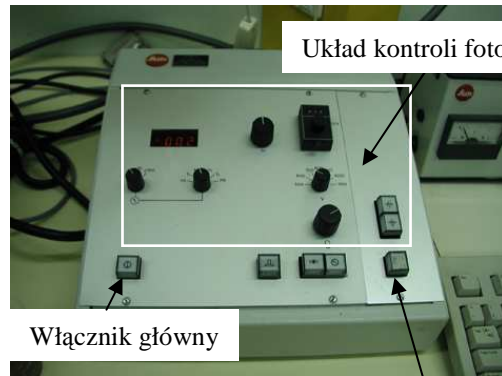
Zwolnienie blokady przewijania

Przełącznik auto/manual

Licznik klatek

Śruba do przewijania filmu

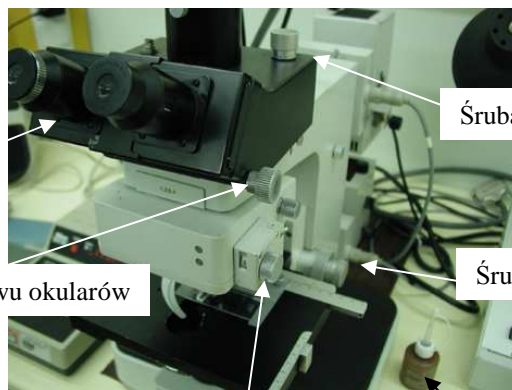
Panel kontrolny mikroskopu



Układ kontroli fotopowielacza

Włącznik główny

Klawisz zmiany trybu epi/jasne pole



Okular

Śruba zmiany biegu światła

Śruba zmiany rozstawu okularów

Śruba mikro/makrometryczna

Śruba zmiany kanałów optycznych

Olejek imersyjny

Zastosowanie mikrofotografii w biologii komórki

I. Wstęp

Podstawowym medium percepcji otaczającego świata jest dla człowieka zmysł wzroku, czyli percepcja fal elektromagnetycznych o długości od ok. 460 nm do 650 nm. W praktyce powoduje to, że do naszej wiadomości i wyobraźni najbardziej przemawiają obrazy. Wystarczy przypomnieć, że czym innym jest wyłącznie słowny opis wakacji, a czym innym opis taki poparty stosownymi zdjęciami. Reguła ta ma oczywiste przełożenie na zasady rządzące prezentacją wyników naukowych. Odpowiednia wizualizacja danych doświadczalnych ma decydujące znaczenie dla ich prezentacji i odbioru. Faktem jest bowiem, że, tak jak w życiu powszednim, nic tak nie przemawia do naszej wyobraźni jak „utrwalony” obraz zjawiska, które chcemy naukowo opisać. Z tego powodu, techniki fotograficzne mające na celu utrwalenie obserwacji naukowych mają tak duże znaczenie.

Fotografia jest **metodą rejestracji informacji** definiowaną jako **odwzorowanie obrazu na nośniku otrzymanego w zakresie widma widzialnego**. Z definicji tej wynika konieczność zapewnienia urządzenia optycznego odwzorowującego obraz i przygotowanie odpowiedniego nośnika. Najpowszechniej stosowanym urządzeniem odwzorowującym obrazy jest oczywiście aparat fotograficzny, jednak w naukach biomedycznych podstawowym narzędziem wizualizującym pozostaje mikroskop (mikrofotografia). Ze względu na nośnik fotografię podzielić można na kilka kategorii, wśród których najważniejsze to:

- fotografia czarno-biała wykorzystująca jako nośnik materiały światłoczułe oparte na halogenkach srebra generujące obraz w odcieniach szarości.
- fotografia barwna wykorzystująca jako nośnik materiały światłoczułe oparte na halogenkach srebra generujące obraz w naturalnych kolorach.
- fotografia cyfrowa wykorzystująca jako detektor układu CCD, a jako nośnik pamięć elektroniczną.

Inne klasyfikacje: fotografia w podczerwieni, nadfiolecie itp.

1. Fotografia czarno-biała a fotografia barwna

Mimo lawinowego rozwoju technik fotografii kolorowej i cyfrowej, klasyczna fotografia czarno-biała pozostaje wciąż bardzo użyteczna w naukach doświadczalnych. Wynika to z jej stosunkowej prostoty, a co za tym idzie możliwości przeprowadzenia całego procesu fotograficznego (w tym wywołania filmu i zrobienia odbitek) w warunkach prostego laboratorium, bez konieczności korzystania z usług specjalistycznych firm jak to ma miejsce w przypadku fotografii barwnej. Oprócz aspektu finansowego, pozwala to uniknąć żmudnych prób mających na celu optymalizację uzyskanego obrazu (pracownicy firm fotograficznych znają zwykle standardowe oczekiwania klientów chcących wywołać zdjęcia z wakacji lub ślubu, natomiast trudno im utrafić w oczekiwania (dotyczące np. jasności odbitki, równowagi kolorów itp.) osoby, która chce uzyskać barwne zdjęcia struktur subkomórkowych). Ponadto, obecnie dostępne techniki digitalizacji obrazów pozwalają na efektywną obróbkę obrazów czarno-białych, w tym na ich koloryzację. Z tego względu zastosowanie klasycznej fotografii barwnej, w tym „barwnych” kamer CCD, ogranicza się do analizy preparatów wybarwionych klasycznie np. preparatów histochemicznych, które ze względu na mniejszą rozdzielczość mają dość ograniczone zastosowanie w biologii komórki (szczególnie w technikach immunocytochemicznych).

2. Kryteria użyteczności materiałów fotograficznych w mikrofotografii

W mikrofotografii (w znacznie większym stopniu niż w fotografii amatorskiej) decydujące znaczenie ma odpowiedni dobór parametrów układu optycznego i nośnika fotograficznego. Wynika to ze współzależności m. in.

- (a) między aperturą numeryczną obiektywu a zdolnością rozdzielczą i głębią ostrości obrazu, a także:
- (b) zależności między czułością filmu, wielkością jego ziaren (wpływającą na zdolność rozdzielczą) i kontrastowością. Parametry te powinny być dobrane przede wszystkim ze względu na wielkość fotografowanego obiektu, jego kontrastowość a także na sposób wizualizacji poszczególnych struktur (np. barwienie fluorescencyjne)

ad. a. Zwykle obiektywy o wysokim powiększeniu (40-100x) charakteryzują się wysoką aperturą numeryczną dochodzącą w przypadku obiektywów imersyjnych do $N=1.55$. Z tego powodu charakteryzują się one wysoką zdolnością rozdzielczą, natomiast głębia ostrości w przypadku tego typu obiektywów jest niska. Z kolei obiektywy niskoaperturowe (zwykle o mniejszym powiększeniu (2-20x) mają mniejszą zdolność rozdzielczą, ale większą głębie ostrości.

Oznacza to, że, jeśli chcemy sfotografować obiekt o wymiarach poniżej kilku mikrometrów, powinniśmy korzystać z obiektywów wysokoaperturowych. Musimy jednak pamiętać, że preparat musi się charakteryzować niewielką grubością, w przeciwnym razie obiekty znajdujące się poza (wąskim!!!) pasmem ostrości będą zaburzały obraz interesującej nas struktury. W przypadku konieczności sfotografowania większych struktur np. komórek lub ich zespołów lepiej jest korzystać z obiektywów o mniejszym powiększeniu, gdyż dysponujemy wtedy większym polem widzenia, obraz jest ostrzejszy ze względu na większą głębie ostrości, a zdolność rozdzielcza nie ma znaczenia decydującego.

ad. b. W przypadku fotografowania obiektów fluorescencyjnych np. uzyskanych techniką barwienia immunofluorescencyjnego, bardziej przydatne wydają się filmy wysokoczułe. Wynika to z faktu, iż intensywność emisji fluorescencji interesujących nas struktur jest zwykle o wiele rzędów wielkości mniejsza niż w klasycznej mikroskopii jasnego pola, co prowadzi do konieczności długotrwałego (nierzadko minutowego) naświetlania błony fotograficznej. Ponieważ barwniki fluorescencyjne ulegają fotodegradacji, zbyt długi czas naświetlania może skutkować niewystarczającym zaciemnieniem błony fotograficznej. Z tego względu w takim układzie używa się filmów wysokoczułych (ISO 800-3200), dzięki czemu czasy te można znacznie skrócić. Ponadto filmy wysokoczułe charakteryzują się większą kontrastowością, co dodatkowo pomaga w wizualizacji struktur subkomórkowych, a ich zdolność rozdzielcza, mimo, że niższa niż filmów niskoczułych jest wciąż wystarczająca. Warto również nadmienić, że w mikroskopii fluorescencyjnej istotne pozostaje wykorzystywanie obiektywów wysokoaperturowych, które oprócz wysokiej zdolności rozdzielczej pozwalają na zebranie znacznie większej ilości emitowanego światła, co z kolei pozwala dodatkowo skrócić czas naświetlania błony fotograficznej.

3. Proces fotograficzny

Na proces fotograficzny składa się pięć podstawowych etapów:

- a) naświetlenie kliszy fotograficznej (powstanie obrazu utajonego)
- b) wywoływanie filmu
- c) utrwalanie filmu
- d) płukanie i suszenie
- e) przygotowanie odbitek pozytywowych

ad. a. Błona fotograficzna składa się zwykle z 4 komponentów: żelatynowej warstwy ochronnej, emulsji światłoczułej, folii podłożowej (zwykle z trójoctanu celulozy bądź pochodnych) i warstwy przeciwodblaskowej. Z punktu widzenia techniki fotograficznej najistotniejszą funkcję pełni emulsja światłoczuła, która jest zwykle zawiesiną kryształków halogenków srebra w roztworze żelatyny. Są to substancje światłoczułe, które pod wpływem krótkofalowego światła widzialnego i ultrafioletu wydzielają metaliczne srebro (proces fotolizy). Już krótkotrwałe naświetlenie błony wywołuje niewidoczne dla oka zmiany, które określa się jako powstanie obrazu utajonego.

ad. b. W procesie wywoływania następuje dalsze wydzielanie srebra pod wpływem tzw. wywoływacza tj. substancji redukującej, która działa szybko w miejscach naświetlonych, a nie działa wcale bądź działa wolno w miejscach nie naświetlonych. W miejscach silnego naświetlenia wywołany obraz cechuje obecność ziaren czystego srebra, które w zależności od siły naświetlenia jawią się jako ciemniejsze bądź jaśniejsze plamki. Wywołany obraz nosi nazwę negatywu, który cechuje się odwróceniem skali tonalnej w stosunku do obrazu rzeczywistego.

ad. c. W powstawaniu obrazu negatywowego bierze udział zwykle ok. $\frac{1}{4}$ halogenków zawartych w emulsji fotograficznej. Reszta, która nie brała udziału w powstawaniu obrazu jest zbędna a nawet szkodliwa, gdyż mogłaby pod wpływem ekspozycji na światło dalej wydzieląć metaliczne srebro, tym samym zamazując obraz negatywowo. W kolejnym etapie obróbki fotochemicznej należy więc usunąć niepotrzebne halogenki srebra. Proces ten nazywamy utrwalaniem, a substancje powodujące zmianę nierozpuszczalnych halogenków srebra w formy rozpuszczalne noszą nazwę utrwalaczy. Najpowszechniej wykorzystywanym utrwalaczem jest wodny roztwór tiosiarczanu sodowego ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)

ad. d. Płukanie ma za zadanie usunięcie resztek wywoływacza i utrwalacza. Odbywa się ono zwykle w wodzie bieżącej, w czasie ok. 20 min., w temperaturze pokojowej, po czym klisze są suszone na wolnym powietrzu bądź w specjalnych suszarkach.

ad. e. W celu otrzymania zdjęcia o tonach zgodnych z tonami fotografowanego obiektu wykonuje się odbitki pozytywowe. Przejście do pozytywu wykonuje się przez kopiowanie stykowe lub optyczne z wykorzystaniem powiększalnika, który umożliwia zmianę wielkości obrazu fotograficznego. Zwykle do tego celu używa się papierów fotograficznych o różnej czułości i kontrastowości. Wywoływanie i utrwalanie odbitek pozytywowych odbywa się w sposób analogiczny do wywoływania błon.

4. Fotografia cyfrowa

W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój technik fotografii cyfrowej. Amatorskie aparaty cyfrowe stają się coraz tańsze, a elektroniczne układy detekcji obrazu (CCD) coraz czulsze i dysponujące coraz większą liczbą elementów światłoczułych co przekłada się na

rozdzielczość. Z tego względu, aparaty i kamery cyfrowe zyskują również coraz większe zastosowanie w mikrofotografii. Ich zaletą jest możliwość bezpośredniego uzyskania łatwego w obróbce obrazu cyfrowego, bez konieczności digitalizacji, która zwykle prowadzi do utraty części informacji; wysoka czułość umożliwiająca skrócenie czasu ekspozycji; oraz możliwość praktycznie natychmiastowej oceny uzyskanego obrazu. Istotnym ograniczeniem zastosowania tej techniki pozostają wciąż ceny. Koszt nowoczesnej, chłodzonej (w celu redukcji szumów termicznych) kamery CCD z oprogramowaniem przystosowanym do pracy z mikroskopem w dalszym ciągu przekracza 50 000 złotych.

Celem ćwiczenia będzie zaznajomienie się z podstawowymi technikami mikrofotografii czarno-białej.

II. Przebieg ćwiczenia

1. Przygotować preparaty ze skórki cebuli lub naczynie z dowolnymi komórkami z hodowli *in vitro*

(punkty 2-7 wykonuje Zespół I, w tym czasie zespół II, wykonuje punkty 8-12)
2. Omówienie funkcji i właściwości układu opartego na kamerze CCD podłączonej do odwróconego mikroskopu epifluorescencyjnego Olympus IMT-2 i sprzężonej z komputerowym układem akwizycji obrazu.
3. Umieścić preparat ze skórki cebuli lub naczynie z komórkami na stoliku mikroskopu i ustawić ostrość przy obiektywie 10x w kontraście faz.
4. Przy pomocy programu komputerowego „Pstryk” zebrać obrazy kilku regionów preparatu w kontraście faz, a następnie w jasnym polu.
5. Operacje powtórzyć stosując inne powiększenia (10 x 1,5 i 20x lub 40x)
6. Porównać jakość i wartość informacyjną uzyskanych zdjęć.
7. Zrobić zdjęcie szkiełka mikrometrycznego przy takich powiększeniach przy jakich sfotografowano komórki.
8. Omówienie funkcji i właściwości układu do mikrofotografii firmy Nikon (FX-35-DX) sprzężonego z mikroskopem Leitz Orthoplan. (wykonuje najpierw Zespół II)
9. Umieścić preparat wybranych, utrwalonych i wybarwionych uprzednio komórek (HSF, HBF, XC, B16) na stoliku mikroskopowym i ustawić ostrość wykorzystując obiektyw 25x w kontraście faz
10. Przy pomocy układu do mikrofotografii Nikon sfotografować wybrane fragmenty preparatu w układzie kontrastu faz.
11. Przetawić układ w tryb epifluorescencji.
12. Wykorzystując różne kanały optyczne sfotografować wybrany region preparatu w kontraście faz i we fluorescencji wzbudzonej UV oraz światłem zielonym.

13. Zrobić zdjęcie szkiełka mikrometrycznego przy obiektywie 25x.
14. Po wykonaniu czynności opisanych w punktach 8-13, zespół II wykonuje czynności w punktach 1-7
15. Uzyskany film wywołać w ciemni fotograficznej i sporządzić odbitki pozytywowe.
16. Określić długość lub średnicę sfotografowanych komórek oraz średnice jąder komórkowych.