

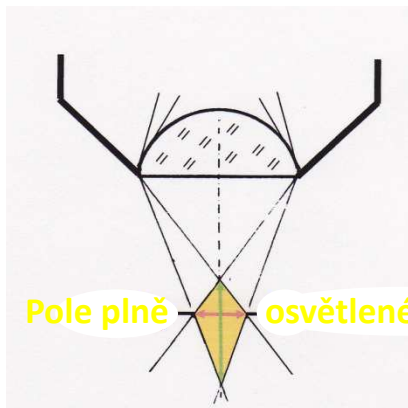
Mojmír Petráň:

MIKROSKOP S DVOJITÝM ŘÁDKOVÁNÍM (Tandem Scanning Microscope, TSM)

Když mluvíme o Mikroskopu s dvojitým řádkováním (Tandem Scanning Microscope, TSM), jehož princip jsem v r. 1964 našel a jeho funkční vzorek potom společně s Milanem Hadravským postavil, vyzkoušel a patentoval, nemůžu se nikdy ubránit filozofování *o náhodě a nutnosti* à la Friedrich Engels o bleše, jež ho v noci *náhodou* kousla: *Náhodou* jsem si už od dětství hrával s čočkami i se stále dokonalejšími dalekohledy a mikroskopy, a zkoušel jsem je dále vylepšovat fázovým kontrastem vlastní výroby. *Náhodou* jsem ve Fyziologickém ústavu pracoval s Janem Burešem, jenž se r. 1963 *náhodou* v Americe setkal s R. Galambosem, a ten se ho u kávy zeptal, zda neví o někom, kdo by mu mohl pomoci s pozorováním živých buněk v živém mozku, a Bureš mu *náhodou* doporučil mě. Přijel jsem tam na jaře 1964 a zkusil jsem všechno možné, co se v laboratoři válelo i co dodavatelé, pan Zeiss a jiní, nabídli k vyzkoušení. Mně to potom u Galambose též dlouho vůbec nešlo, ale *náhodou* jsem dostal nápad, jak by to možná jít mohlo. Za tohoto stavu věci musel jsem se vrátit domů, abych stihl začátek nového školního roku. Jen jsem Galambosovi pověděl, co všechno mě napadlo, a že zkusím až doma, zda by to mohlo jít. On mně zase slíbil, že mi pošle vše, co se nedá sehnat u nás, ale u nich ano.

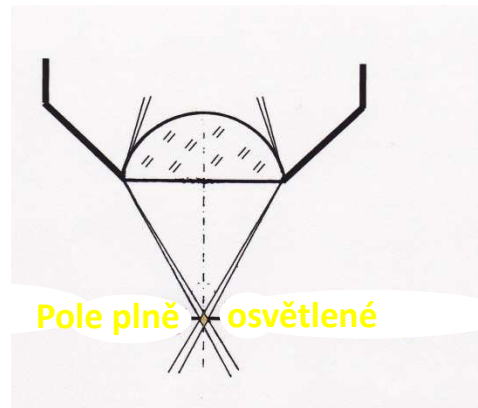
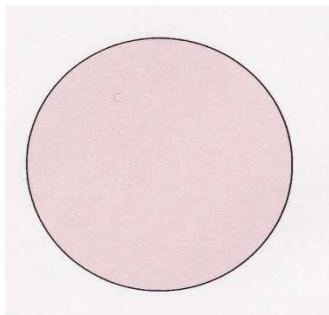
Tento první šťastný nápad, jak upravit mikroskop pro vivisekci, jsem ovšem dostal jen čistou *náhodou*, když jsem ke svým zkouškám bral nejdřív jen kusy fixovaného mozku krysy a prohlížel si je vodními imerzními objektivy: Pojednou jsem spatřil neuron s četnými dendrity i jeho jádro. Ploval u okraje odříznuté části mozku, k níž jej poutaly právě jen ty dendrity, ale hned už jej zas vidět nebylo, to když poodplaval přímo nad tkáň, kam tyto výběžky směřovaly. Tím byla věc jasná: jednotlivý neuron není v kuse mozku vidět, protože je jeho obraz překryt (přezářen) jasnými, ale už neostrými obrazy buněk v hlubších vrstvách. Jak lze mísení obrazů ostrých a neostrých zabránit? Tak, že rušícím neostrým obrazům z hloubi tkáně nedáme vůbec vzniknout – hlubší vrstvy *neosvětlíme*. Zkusíme Leitzovy objektivy Ultropak, v těch je vlastní objektiv obkroužen prstěncovým výřezem osvětlovací čočky, která pak osvětluje předmět jen velmi kosými paprsky, které do hloubi možná už neproniknou. Nepomohly však ani ultropaky.

Vrátil jsem se tedy ke standardnímu vertikálnímu iluminátoru, náležitě jej seřídil podle Köhlerova předpisu, který jsem pedanticky vtoukal studentům stále do hlavy, a zkoušel jsem, jak se rozličné úpravy osvětlení projeví na kvalitě obrazu. Všiml jsem si, že když se podstatně zmenší průměr osvětleného pole, jeho obraz se velice zlepší, kontrast v něm stoupne tak, že je vidět i buňku a její organely (obr. 1). Ale když se polní clona otevře a osvětlené pole se rozšíří, až je jeho obraz v okuláru větší než asi dvacetina průměru celého zorného pole, kontrast obrazu se zas velmi sníží, už se v něm nic nerozezná, vidíme jen cosi jako růžové prádlo. Věc je jasná, obraz nemizí, je jen překryt obrazy hlubšími, už neostrými, jak jsem uvedl. Dá se tomu nějak zabránit? Zkusme hloubku, do níž světlo proniká, omezit nějak radikálně. Tato hloubka závisí především na šířce osvětleného pole, tj. na tom, jak rychle se paprsky za osvětleným polem zase rozběhnou. Ale zúžením pole velmi klesá v obrazu obsah, přestaneme mu rozumět, unikají



Šířka a hloubka
předmětového
pole, určená standardní polní
clonou okuláru

Obraz v okuláru při osvětlení
celého předmětového pole



Šířka a hloubka
předmětového pole při velmi
zúžené polní cloně okuláru

Obraz v okuláru při osvětlení
velmi zúženého pole



Obr. 1 Závislost hloubky zobrazeného pole na jeho šířce

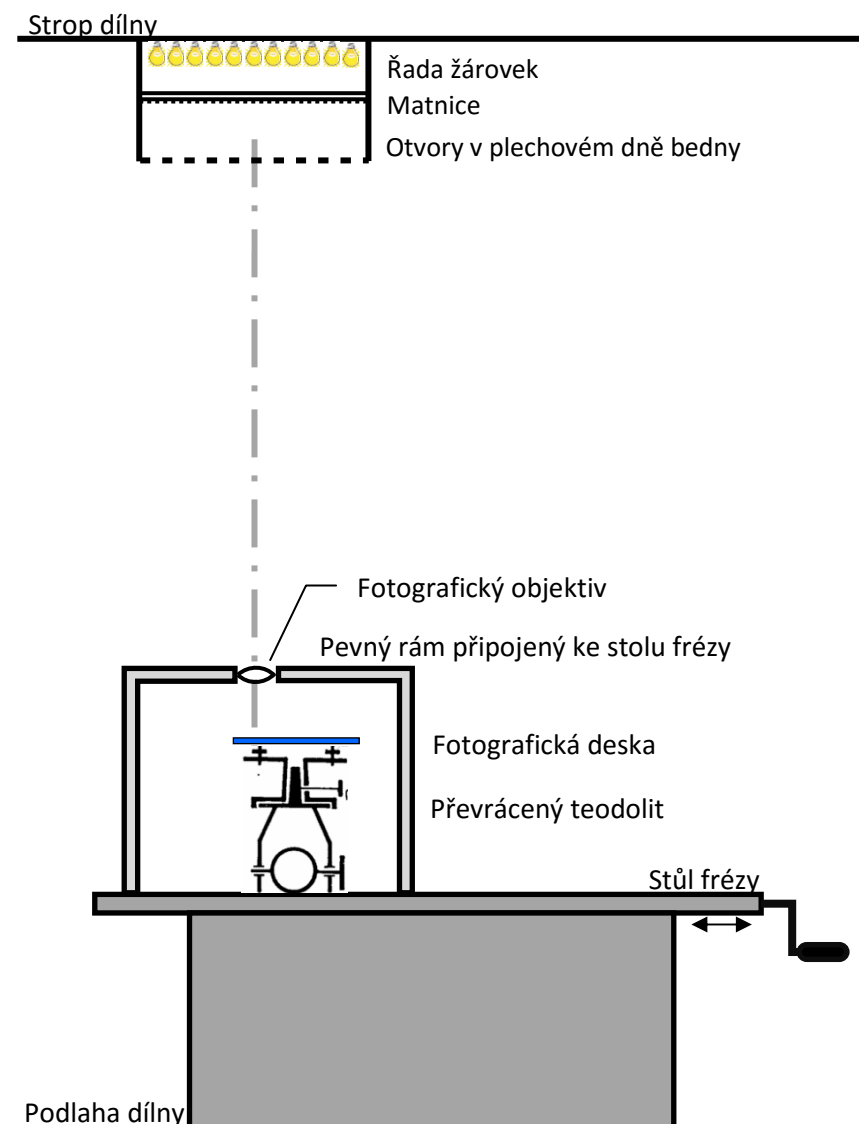
nám jeho vazby k okolí, a to ve všech třech směrech. Mohlo by tu případně pomoci řádkování, tj. zobrazování celého zorného pole obvyklé velikosti nikoli najednou, nýbrž po částech? Asi ne: zmenšené obrazové políčko není od okolí izolováno zcela, je vroubeno širokým polostínem, jenž proniká i do hloubi a svou šíří zastře při řádkování i budoucí ostré obrazy širokého okolí, a obraz tak bude zase víceméně stejný, jako byl obraz v obyčejném mikroskopu bez řádkování.

Jak by se přece jen dalo zachovat dokonalé zobrazení celého pole obvyklého průměru, došlo mi až za několik dní: Nesmíme v okuláru nechat celé jeho obrazové pole stále přístupné všem paprskům, jež k němu míří, ale jen těm, jež vycházejí z onoho ostře osvětleného malého políčka, a všemu světlu, které přišlo odjinud, z jiných míst předmětu, a míří tedy v okuláru do míst, která jsou *vedle* obrazu osvětleného políčka, musíme v další cestě bez milosti zabránit a musíme je zničit, zachytit clonou s tak malým otvorem, jako je v cloně, jež políčko vymezila, a *otvory obou clon musí se posunovat souhlasně*, jedna řádkuje v osvětlení, druhá v zobrazení.

Tedy řádkovat vlastně dvakrát po sobě, v *tandemu*, v osvětlování i v zobrazování. Došel jsem k tomuto závěru až na konci léta 1964, jen několik dní před odjezdem domů. Probrali jsme to s Galambosem a dohodli jsme se, že zkusím až doma, zda je tato cesta schůdná. A když bude, začnu doma. Bob mi k tomu obstará a pošle vše potřebné, co nelze sehnat u nás. Velmi rychle jsem vyřešil základní uspořádání: Na řádkování se použije Nipkowův kotouč, patentovaný již v roce 1884, ale bude jej nutno v několika směrech modifikovat: (1) Aby se dal jediný kotouč použít pro obojí řádkování (v osvětlování i v zobrazování), budou spirály, nesoucí dírky, dvě, sice stejné, ale navzájem pootočené o půl kruhu. (Spirála bude tedy dvouchodá, každou díрку na jedné její větvi lze otočením radiusvektoru o 180° ztotožnit s dírkou s ní sdruženou v druhé větvi dvouchodé spirály.) (2) Aby bylo možno dodržet rozměry dílů mikroskopu, jak je určují normy předních výrobců mikroskopů (firem Zeiss a Leitz), musí se obě dvě pole, předmětové i obrazové, řádkovat ne jen jediným párem dírek, ale mnoha páry dírek simultánně (obr. 3). Tak se zároveň velmi sníží nároky na jas zdroje osvětlení a zkrátí se doba potřebná k reprezentaci celého obrazového pole obvyklé velikosti. (3) Přibude však nový problém: protilehlá pole na kotouči jsou v této jeho modifikaci vůči sobě nejenom posunuta, nýbrž jsou ještě pootočena o π neboli o 180° . Toto pootočení možno však snadno kompenzovat dvojitým vhodným zrcadlením.

Po návratu domů musil jsem hlavně učit; o mikroskopu jsem pouze přemýšlel a myslel jsem i na to, koho připráhnout, aby práce šla co nejrychleji. Rozhodl jsem se ihned pro Milana Hadravského. Milan sice teprve dostudoval, byl však ze všech asistentů daleko nejschopnější. Pracovali jsme spolu na tomto projektu s krátkými pauzami skoro padesát let, až do Milanovy smrti 2012. Do práce jsme se pustili před zimou 1964, a náš přístroj byl připraven ke zkoušce neuvěřitelně brzy, už na podzim 1965, ale nedalo se v něm nic vidět, nebylo dost světla, příliš mnoho jsme ho museli vyplýtvat, aby se pomocí polarizace potlačilo „*stejnoseměrné pozadí*“ tj. světlo zavlečené do obrazu odrazy na rovinných stěnách hranolů a Abbeovy kostky (obr. 3). Rozhodl jsem se proto svítit při zkoušce zdrojem nejjasnějším, Sluncem. To ale v říjnu nebylo v Plzni k mání, a tak jsme si je museli vyžebrot u astronomů na Lomnickém štítě. V tehdejších dobách bylo ostatně téměř nemožné sehnat cokoli jinak nežli pomocí přátel a styků. Takže nás přátelé vpustili do *Observatória Slovenskej Akadémie vied na Lomnickom štíte*. Tam jsme pak koncem října poprvé uviděli buňky „v kuse masa“. S tímto „mikroskopem na sluneční pohon“ jsme potom v r. 1966 odjeli s Milanem Hadravským znovu do Amerky na Yaleovu univerzitu, a postavili tam ještě druhý. S tím po našem odjezdu dále pracoval David Egger. Rychle jsme o tom napsali články do *Science*, do *Journal of the Optical Society of America* a do *Experientia*.

Prototyp TSM jsme dokázali postavit za tak kratičkou dobu, za necelý rok, jen protože jsme stále dodržovali zásadu, nevyrábět nic, co si lze koupit, vypůjčit, či ukrást. I tak toho i na nás zbylo mnoho, ale byla to práce velmi radostná, nutící nás k řešení stále nových problémů i k vynalézání stále dokonalejších a přesnějších optických i mechanických součástí mikroskopu i zařízení a přípravků k jejich výrobě a seřizování. Nelze se ubránit nutkání, říci vám tu také něco o několika problémech a jejich řešení; byla to hlavně konstrukce i výroba modifikovaného Nipkowova kotouče. Vždycky jsem se bál skleněných desek, pro dvojí, a někdy i vícenásobný odraz na jejich dvou stěnách. Proto jsem chtěl vyrobit Nipkowův kotouč z tenké kovové fólie, napnuté mezi kolem na hřídeli a ráfkem, zpevňujícím její obvod. Dírky jsem v ní chtěl vyleptat

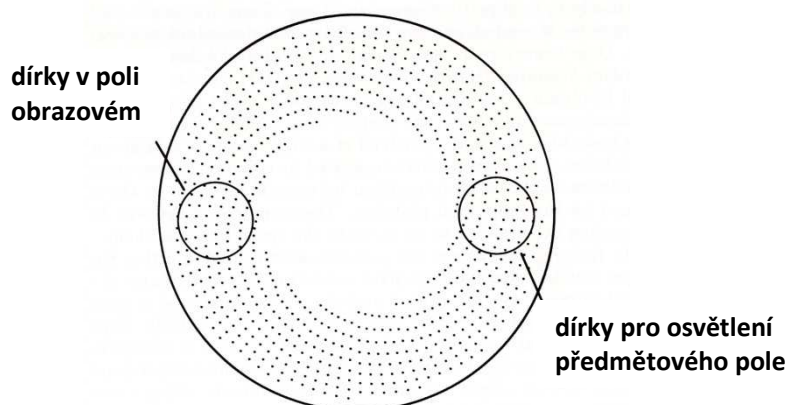


Obr. 2. Výroba funkčního vzorku Nipkowova kotouče pomocí frézy a na ni připevněného na hlavě stojícího teodolitu

byl zvětšený vzor jedné radiální řady dírek budoucího kotouče. To byl plech, kryjící bednu se žárovkami na stropě dílny (obr. 2). Matrice kotouče se vyrobila takto: Na nožičky převráceného teodolitu položila se fotografická deska, a na tu se rozsvícením v bedně na stropě exponoval zmenšený obraz jedné radiální řady dírek. Fotografická deska se pootočila teodolitem, celé zařízení se spolu se stolem frézy posunulo o (zvětšený) krok stoupání spirály, a naexponovala se další radiální řada značek pro díčky, atd. Deska se vyvolala, ustálila, vyprala a usušila a pak se okopírovala do fotorezistu na bronzové fólii. V té se vyleptaly díčky, a tak se z ní vyrobil Nipkowův kotouč (obr. 3, 4), ten se upevnil a vycentroval na ose uložené v přesných ložiskách. Jeho rovinnost zaručila úzká obruč na jeho obvodě a rozdíly v teplotních roztažnostech obruče, fólie a náboje, slepených spolu zatepla. Malý elektromotor poháněl kotouč při mikroskopování.

Teprve po návratu z Ameriky začali jsme svůj mikroskop zdokonalovat a jeho výrobu zpřesňovat. První přišla na řadu bedna na stropě a kříženec frézy a teodolitu, sloužící k výrobě Nipkowových kotoučů. Dokonalý automat pro výrobu kotoučů vymyslel Hadravský a vyrobil

asi jako se dělají štočky tiskařské a tištěné obvody elektrické. Geometrické vzory tvaru a rozmístění dírek chtěl jsem do fólie kopírovat z fotografické předlohy, a tu vyrobil dvěma dělicími stroji: První z nich měl mít na starosti stoupání spirály, to byl stůl frézy, a na něm se upevnil druhý stroj pro dělení kruhové. Tím byl převrácený teodolit, jehož nožičky trčely nahoru, na ně se kladla fotografická deska, na té se ten vzor vytvářel a z ní se potom kopíroval na bronzovou fólii (obr. 3). Aby se pak nepřesnosti v podélném posouvání stolu frézy přenášely do vyráběného Nipkowova kotouče jen v zmenšené míře, fréza se přestavěla ve zmenšovací fotografický přístroj: jeho objektiv se ke stolu frézy připevnil nad teodolitem, a fotografovaný předmět



Obr. 3 Nipkowův kotouč pro funkční vzorek TSM

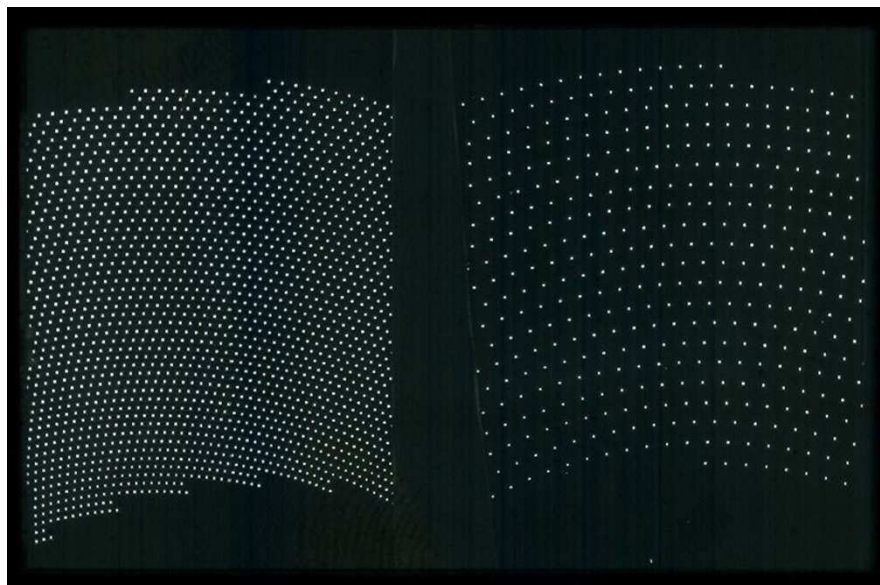
můžeme chtít, tj. v čem se vyznají a co je baví. Také jsme náležitě využívali „tradice vědy“, tj. krámy, které se v každé zavedené laboratoři válejí, už je sice nikdo nepotřebuje, ale všem je líto je vyhodit. A také jsme lacino nakupovali, například krásnou žulovou desku $2\text{m} \times 1\text{m} \times 15\text{cm}$, na které jsme měřili nejpresnější součástky, a kterou jsme pak použili i jako základnu pro zařízení na výrobu přesných Nipkowových kotoučů, jsme pořídili jako „propadlé hrobové zařízení“ za 600 Kčs. Dělicí stroj byl sice hotov asi za rok, ale potom se léta vylepšoval, až se posléze zrušil: lepší šablony začal dělat Dr. F. Matějka z Brna. Jako obvykle, hlavní důvod té zásadní změny byly nové možnosti, jež přinesl pokrok někde úplně jinde, jak se to často stává při revoluci v některém technickém odvětví. V tomhle případě to byla počítačem řízená kresba v křemíkových plátcích s průměrem více než decimetr a s tolerancí v lokalizaci a v rozměru asi desetina mikrometru. Takový stroj a jeho počítačové ovládání postavil v Brně v Ústavu přístrojové techniky Dr. František Matějka s druhy. Ti nám vyrobili v několika skleněných pochromovaných deskách různé vzory značek pro dírký stejně veliké, ležící na závitech dvouchodé spirály ne už po rovných krocích *úhlových*, ale *délkových*. Hlavní nedostatek všech Nipkowových kotoučů, jež jsme dosud vyrobili, byly nestejně veliké dírký: Při otáčení kotouče nevstoupila v zorné pole mikroskopu další dírký po uražení stejné *vzdálenosti*, nýbrž po pootočení o stejný *úhel*, proto se měla šířka dírek kotouče měnit úměrně jejich radiusvektoru, ale toho se dalo dosáhnout jen přibližně, obraz řádky děr v šabloně se při svém záznamu též radiálně posunoval, šířka děr šablony se však při tom měnit nemohla. Mimo to se nedalo ani zaručit, aby díry vyleptané ve fólii byly přesně úměrné šíři děr šablony. Obraz v mikroskopu kazilo též moaré. To sice nezhoršilo rozlišovací schopnost, bylo však kazem na kráse obrazu. Moaré se podařilo odstranit zavedením stejného rozměru všech dírek, jež pak ale musí ležet na spirále i ve stejných vzdálenostech, viz pravou část v obr. 4. To však umožnil až počítač pro řízení Matějкова stroje.

jej spolu s Jaroslavem Zíkou, velice zručným mechanikem ze Škodovky. Přátel, kteří nám při vývoji a výrobě TSM pomohli (většinou za „zaplat' pámbů“) bylo mnoho, vyjmenoval jsem je (doufám všechny) ve svých Pamětech. Dělalí to rádi a ochotně, hlavně proto, že je věc zaujala, i proto, že jsme věděli přesně, co od nich

V rychlém rozvoji je již dlouho fluorescenční mikroskopie, jak klasická, tak v poslední době i pomocí speciálních řádkovacích fluorescenčních mikroskopů. Jejich útroby známe zatím jenom z firemních prospektů a návodů, přesto jsme se však pokusili i s TSM o fluorescenční mikroskopii. Byli jsme však nepříjemně překvapeni: Po fluorescenčním obraze nebylo tu většinou ani potuchy, ačkoli v obvyčejném mikroskopu byl vidět bez obtíží, v témže objektu, a

Vzdálenosti mezi dírkami
jsou konstantní
v radiálním směru

Vzdálenosti mezi dírkami
jsou konstantní
v tangenciálním směru

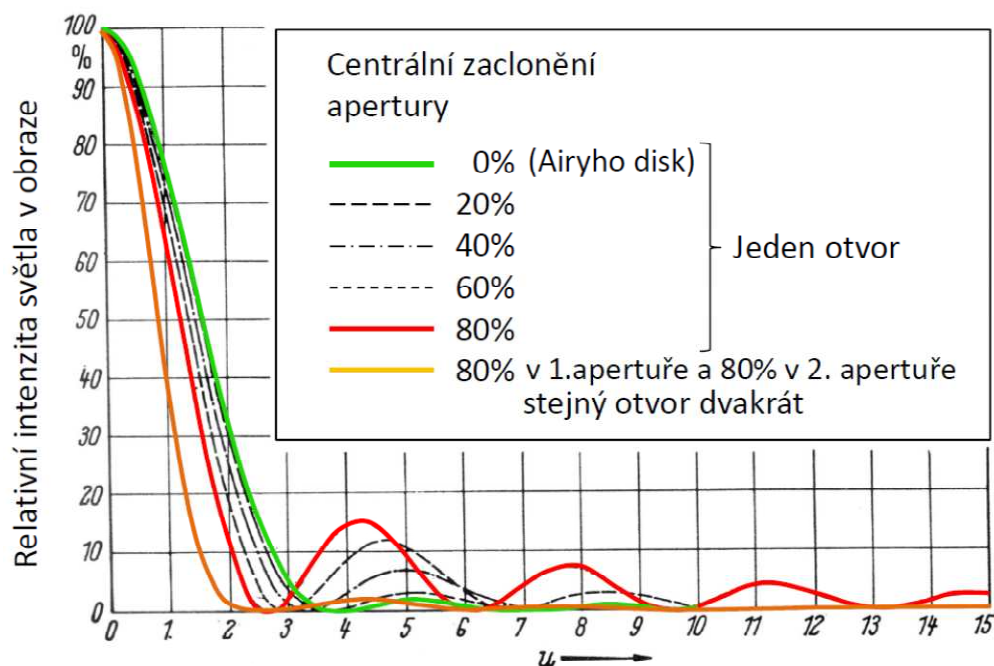


Obr. 4. Dva způsoby rozmístění děr v Nipkowově kotouči: vlevo pomocí Hadravského stroje, sousední jejich radiální řady svírají stejné úhly; vpravo pomocí Matějka stroje, dírký na téže závitě nosné spirály spirále mají mezi sebou stejné vzdálenosti.

není schopen splnit pro jakékoli dvě náhodně dané (avšak přesto určité) délky vln. Důkladná rešerše literatury vědecké i firemní můj dojem potvrdila: S precizností fluorescenčního TSM na barevnou korekci objektivu si autoři nejúspěšnějšího a nejprodávanějšího fluorescenčního mikroskopu s řádkovacím kotoučem poradili radikálně a co nejjednodušeji: mají *dva různé* kotouče; první pro osvětlování předmětu, druhý k filtrování jeho obrazu. A protože jsou dva, nemusí už být v obou stejně veliké dírký – větší dírký v prvním vyřeší problém s nepřesnou achromatizací objektivu, malé dírký v druhém zachovají rozlišení aspoň jako má obyčejný mikroskop. Osvětlení laserem dovolí přidat do osvětlovacích dírek i optickou sílu a tak ještě o trochu zlepšit světelnou propustnost zařízení. Hlavní úlohu v dobrém hospodaření se světlem hrají však lasery, filtry a dichroická zrcadla, a v těchto oborech je firma Yokogawa mistr. Zdálo by se tak, že jeden „soukromý badatel“ nemůže v této oblasti pořídít už vůbec nic, když to zde i Carl Zeiss vzdal, a nakupuje od Japonců. Přesto se domnívám, že by TSM dovedl i na tomto poli ukázat lepší rozlišení (možná až 2× lepší, než mají stroje od Yokogawy), kdyby zůstal jak je a jen se „doachromatizovával“ *ad hoc* pro obě příslušné vlnové délky. Dovedl bych zde též navrhnout několik možností, jak to udělat, nemám však komu, Yokogawě se mi nechce. Ta totiž zatajuje, že zlepšení rozlišovací schopnosti v každém dvakrát řádkujícím mikroskopu závisí na velikosti řádkovacích otvorů *v obou* jeho systémech, úzké dírký jen v jednom z nich ji nezaručí, zůstane asi stejná jako v obyčejném mikroskopu. Jak rozlišení závisí na tom, zda se řádkuje jen v osvětlování (či jen v zobrazování), anebo jak v osvětlování, tak i v zobrazování, je v obr. 5; optimální případ řádkování dvěma systémy stejných limitně malých děr je tu oranžově.

za použití stejné optiky. Té záhadě jsem přišel na kloub, když jsem TSM instaloval na univerzitě v Manchesteru; tam měli různých objektivů plné celé šuple, a tak jsem je vyzkoušel všechny. Skoro žádným nebyla vidět ani stopa po fluorescenci, u několika se dala spíše tušit než vidět, jediným byla vidět docela dobře a pravidelně. Byl to dosti starý apochromát Zeiss, podle zevnějšku se dalo hádat na třicátá léta věku

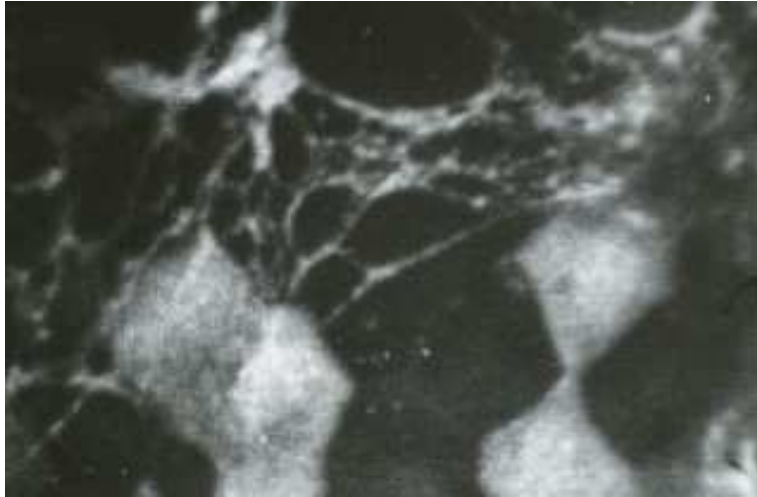
minulého. Pochopil jsem tak, že fluorescenční obraz není nejspíš vidět pro příliš velké požadavky na korekci barevných vad objektivu, jež téměř žádný objektiv



Obr. 5 Relativní rozložení světla po ploše obrazu dírky ve skutečném výstupu různých řádkovacích zařízení. Pro náš TSM platí křivka oranžová, pro Yokogawu nejspíše zelená.

V průběhu našich prací na TSM objevila se řada dalších možností, jak TSM zdokonalit a také specializovat pro různé aplikace v lékařství, v biologii, v paleontologii, v geologii, ale i v průmyslu polovodičovém, v kriminalistice, ve farmakognozii, ve zbožíznalství a jistě i jinde. Z této široké nabídky vyberu jen několik zajímavých příkladů, které jsme již stačili vyzkoušet, a které by se mohly snadno stát pro výrobce mikroskopů dobrým artiklem: v živém (v kuřecím i v lidském) oku mohli jsme snadno vidět a od sebe rozlišit jednotlivé tkáně: deskvamující epitel (obr. 6), rohovkové stroma, buňky endotelu, jejich jádra, vlákna čočky (obr. 7) a jejich jádra, jednotlivé druhy smyslových (obr. 8) a nervových (obr. 9, 10) buněk sítnice i její tapetum. V kůži je vidět epitel, hmatová tělíska (obr. 11) a často i škára. (Pánové od firmy l'Oreal viděli v ní i mnoho jiného.) V mozku se podařilo rozlišit všemožné druhy neuronů i vláken a gliie (obr. 12, 13, 14), i vlasečnice a krvinky v nich, a buňky v pia mater a v arachnoidei. V kosti (obr. 15, 16, 17) a v zubech (obr. 18) je možno pozorovat (i bez preparace) tolik detailů, že Alan Boyde koupil (dosti draho) první TSM, který byla Univerzita Karlova ochotna prodat. U polovodičových struktur (např. u integrovaných obvodů) uplatnil se TSM velice dobře při jejich kontrole (obr. 19, 20). (Pro velký, a případně i komplexní index lomu, germanium a křemík i jiné polovodiče, a kovy dobře odrážejí světlo).

Mám vůbec dojem (a doufám, že nejsem příliš domýšlivý), že se pro TSM otevírá více možností, než dokáží váhaví výrobci dnes využít, a tak o nich povím aspoň tady. Toho, co lze už nyní v TSM pozorovat vlastníma očima, je mnohem více, než ukáže fotografický či televizní záznam. Příčin toho je řada, první je bída o světlo, našemu TSM vlastní, druhá, že konstruktér žádného objektivu nevzal (samozřejmě) v potaz potřeby odvětví teprve se líhnoucího. Takže i optiku pro různé druhy a aplikace TSM je nutno teprve vyvinout. Stále zůstávají nevyužity také některé nové možnosti, jak v TSM o více řádů zvýšit množství informace (a přitom zachovat i jeho rozlišovací schopnost, až dvakrát lepší než má klasický mikroskop). To se nám podařilo ve



Obr. 6 Vnější povrch živé rohovky kuřete v TSM; objektiv: vodní imerze Zeiss



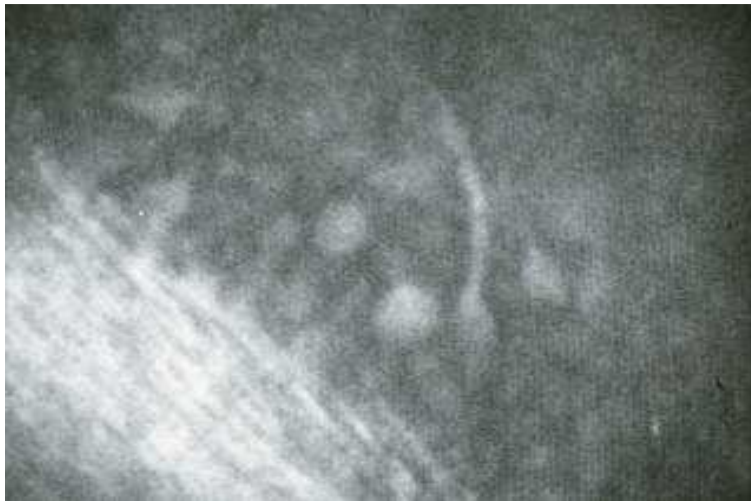
Obr. 7 Vlákna základní hmoty oční čočky v TSM in vivo; vodní imerze 40×; asi 1982



Obr. 8 Tyčinky a čípky kuřího oka (po odstranění rohovky i čočky); vodní imerze



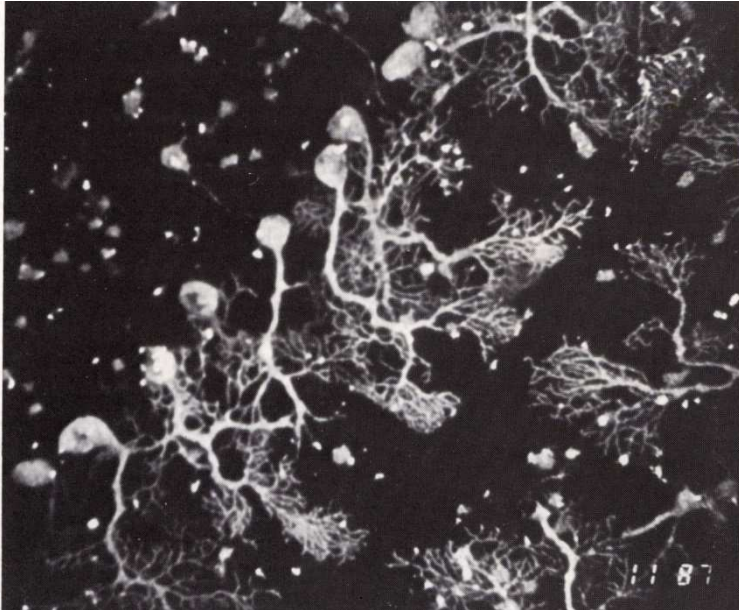
Obr. 9 Kuří oko, gangliové buňky v sítnici a jejich vlákna (1970)



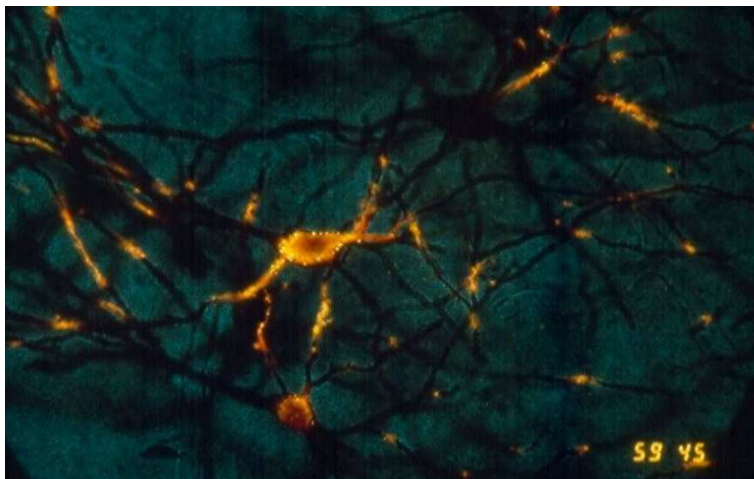
Obr. 10 Kuří oko, nakloněný zadní segment; vpravo gangliové buňky a neurit jedné z nich, v levém dolním rohu vidíme vycházející odtud nervová vlákna



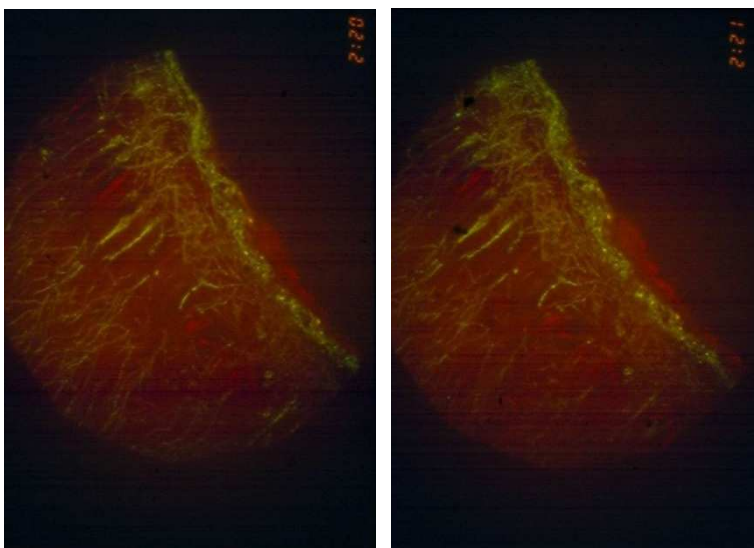
Obr. 11 Hmatové tělísko v kůži, vodní imerze 40×



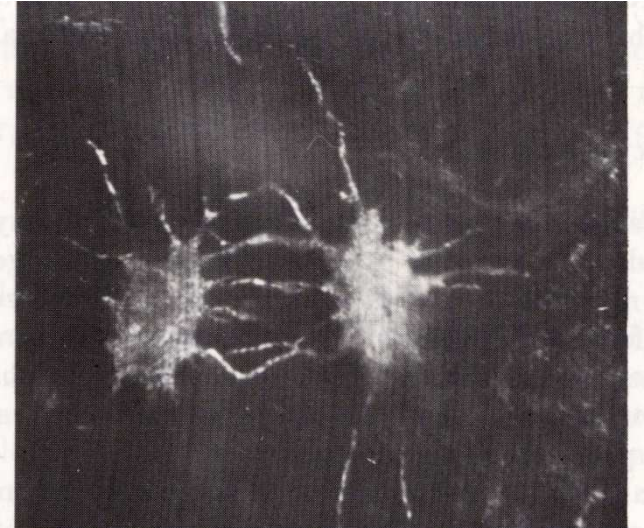
Obr. 12 Purkyňovy buňky v myším mozečku, několik přes sebe naložených expozic při postupných změnách zaostření v témže zorném poli



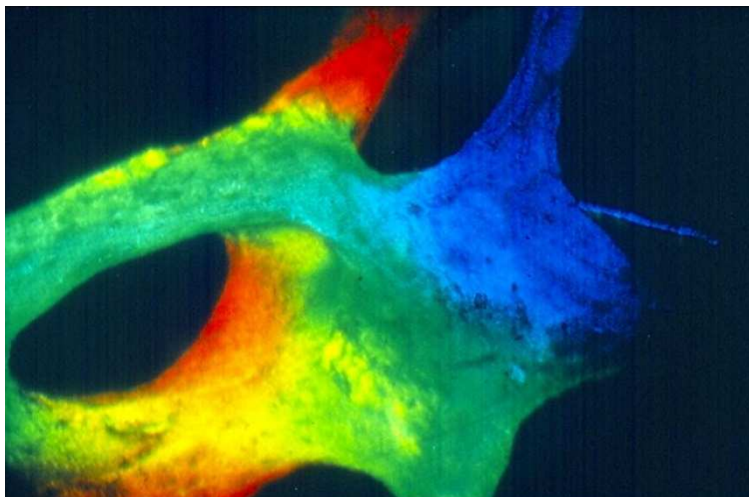
Obr. 13 Spinální ganglion, kombinovaný obraz: žlutě struktury osvětlené jako vždy shora, všechny leží v téže tenké vrstvě; temné čáry jsou stíny vláken vzniklé při podsvícení zdola velmi silně zacloněným kondenzorem. (Tato vlákna by nebyla bez tohoto podsvícení vůbec vidět, celé pole mimo řídké jasně žluté struktury zůstalo by naprosto temné). Alan Boyde, London, asi 1985



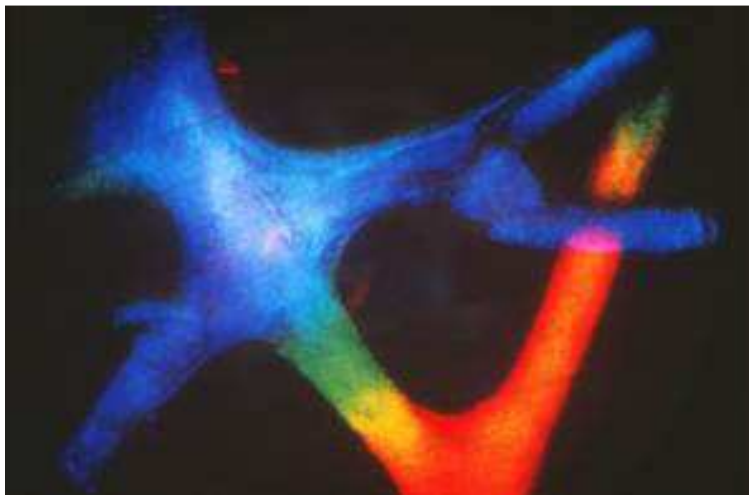
Obr. 14 Dvojice obrazů ukáže ve stereoskopu prostorové uspořádání objektu

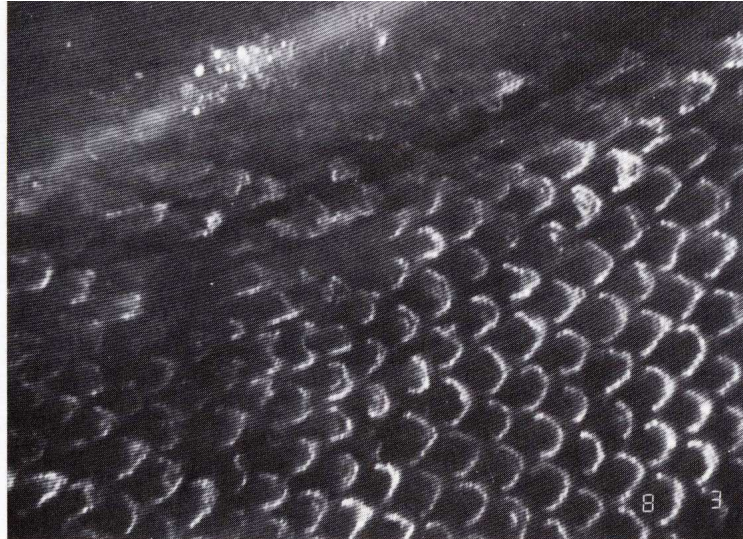


Obr. 15 Otvory v kalvě, v kterých byly zaživa osteocyty. TSM, olejová imerze

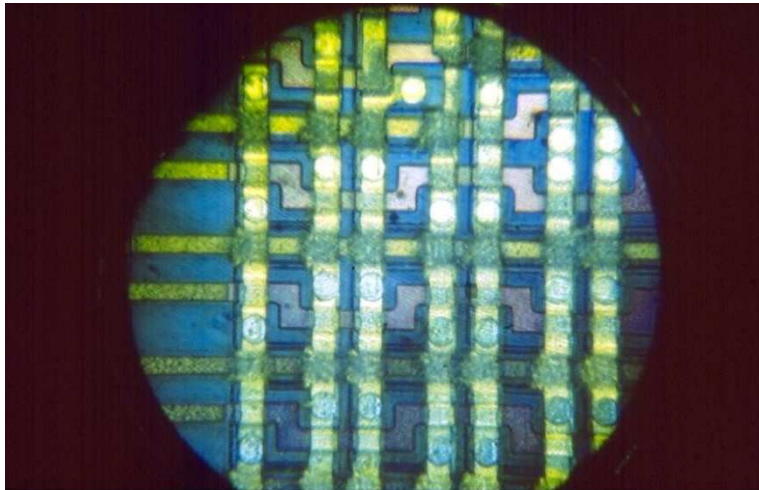


Obr. 16, 17 Obrazy kostní trámčiny hyperchromatickým objektivem. Stereoskopické páry takových obrazů ukáží prostorovou strukturu spongiózní kosti. (Obrazy: Alan Boyde, London; objektiv vypočítal Miroslav Malý a vyrobily Závody průmyslové automatizace Praha Košíře

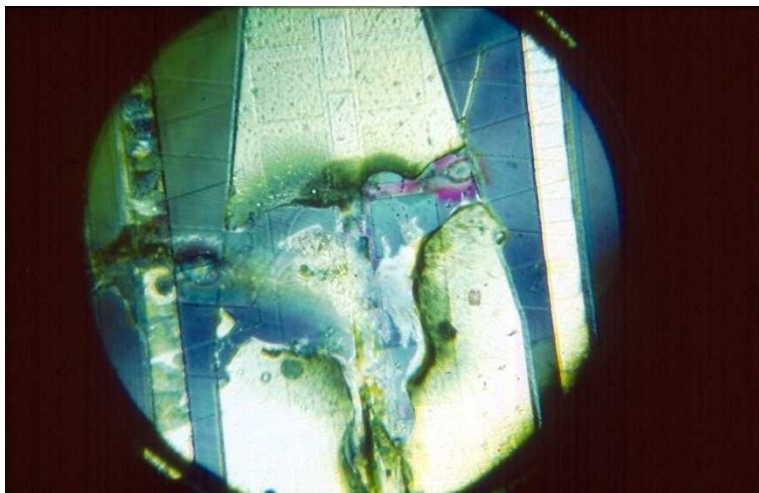




Obr. 18 Zubní sklovina pračlověka (*Paranthropus boisei*) v našem TSM. (Snímek Alan Boyde UC London)



Obr. 19 Integrovaný obvod v křemíku. Obraz suchým málo korigovaným achromátem; je vidět i zklenutí obrazového pole.



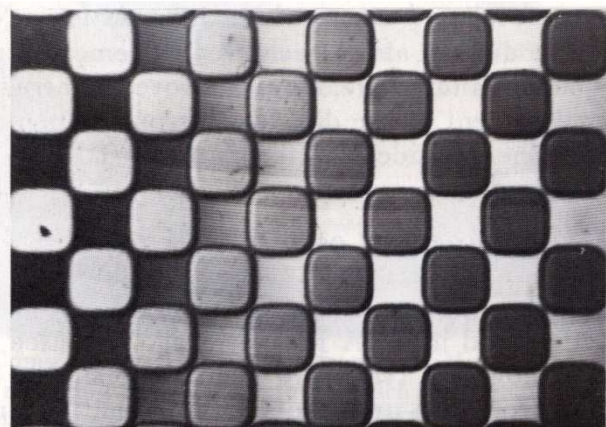
Obr. 20 „Proražený“ výkonový tranzistor, poškození je dobře patrné; suchý achromát 40×

spolupráci s Miroslavem Malým už před více než deseti lety, stále to však zůstává nevyužito, a možná dokonce nepovšimnuto. Právě tady je příležitost zdokonalit mikroskopii i kvalitativně a otevřít jí nové cesty. Ale k tomu je třeba specializovat náš přístroj často pro velmi mnoho velmi různých úzkých oborů, a spojovat jej s dalšími přístroji v manipulátory, někdy až jednoúčelové. Tady však mohou vznikat kompetenční problémy překonatelné pouze ve velkém koncernu.

Různé druhy i odrůdy konfokálních mikroskopů množí se posledním časem jako houby po dešti, a tak přichází vhodná doba utřídit a uspořádat jejich seznam a poradit zájemcům, jaký druh si vybrat k tomu či onomu účelu. To je ale dosti obtížné, právě pro překotnost vývoje; zdá se, že velmi důležitá jsou pro volbu dvě kritéria: Jakou optickou povahu má objekt? (Je černý? kovově lesklý? průsvitný?). Jaké záření tvoří obraz? (Odražené? Procházející? Fluorescenční?). Fluorescence je případ docela zvláštní, nutí ke zcela jiným kompromisům než všechny případy ostatní – viz též s. 4, proto se jí věnuji podrobněji až později. Procházející záření nás nutí splnit tolik vedlejších podmínek, že tento případ není zajímavý. Zbývají tedy jen stroje pro odražené světlo; tady vezmeme v úvahu ⁽¹⁾ rozlišovací schopnost v každém ze čtyř rozměrů, ⁽²⁾ rozsahy zobrazovaných intervalů času a prostoru, ⁽³⁾ rozlišování látek v objektu podle zbarvení i podle fluorescence, ⁽⁴⁾ čas od sběru dat k zobrazení – krátký dovolí použít stroj i k mikromanipulaci, ⁽⁵⁾ způsob dokumentace a nároky na připojená zařízení, a ⁽⁶⁾ rozsah aplikací, tj. univerzálnost. Mně se zdají nejdůležitější tři dělení: (1) podle rozlišovací schopnosti v souřadnicích x , y , z , i t ; (2) podle postiženého intervalu v každé z těchto souřadnic; (3) podle původu zbarvení obrazu: obraz buďto reprodukuje skutečnou barvu objektu (přirozenou či umělou), nebo je jeho pestré zbarvení způsobeno chromatickou vadou objektivu – pak se však barva obrazu mění při změně zaostření, a příčinou barvy obrazu není zde už barva předmětu v zaostřené předmětové rovině, nýbrž zvolená *poloha* obrazové roviny, jíž odpovídá celá množina předmětových rovin, a každá z nich má jinou souřadnici z . Každá se tedy zobrazuje v jiné barvě (viz všechny barevné obrazy v mé přednášce), ale všechny jsou naprosto ostré. Přístroje se však dají dělit i podle zcela jiných kritérií, např. podle toho, zda řádkují sériově či sérioparalelně, či podle účelu, na mikroskopy preparační, operační, fotografické, demonstrační aj.

Hlavní výsledky můžeme shrnout:

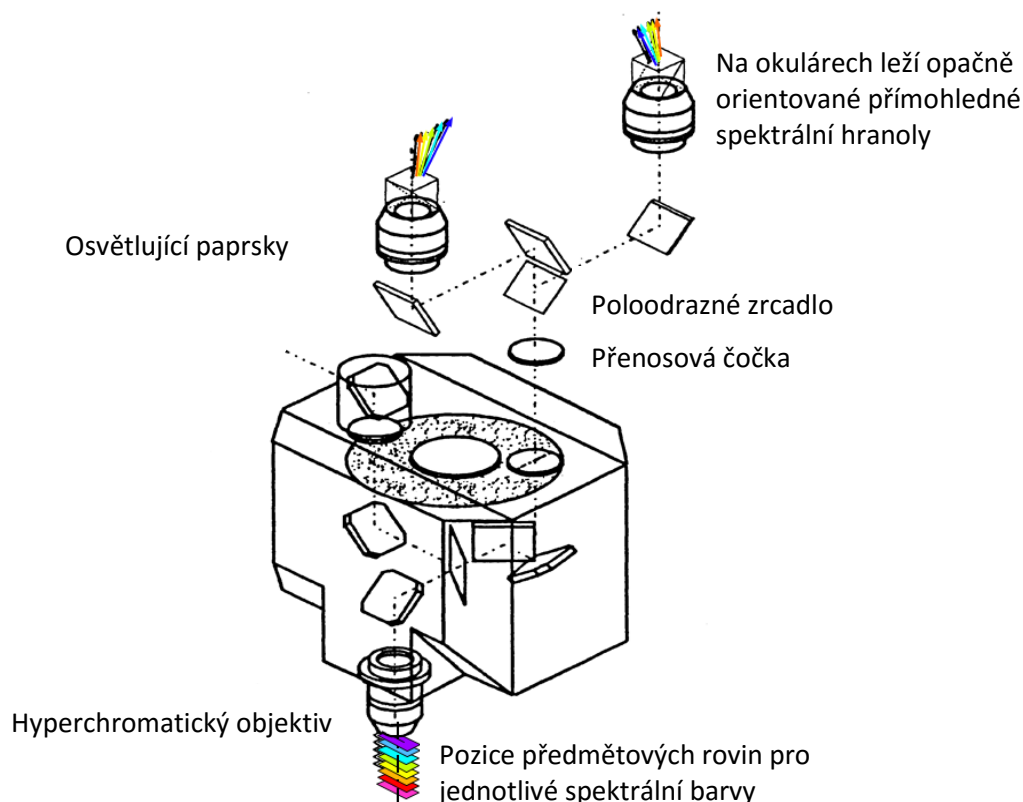
(A) Zobrazíme-li v TSM objektivem se zanedbatelnými aberacemi modelovou množinu prvků limitně malých (podle teorie Abbeovy, Rayleighovy, apod.), ležících v rovině předmětové, do roviny Nipkowova kotouče, proniknou jeho dírkami jenom obrazy těchto předmětů, a bude je možno pozorovat okulárem Ramsdenova typu. Dírkami kotouče proniknou jen ty paprsky, jež se odrazily v předmětové rovině objektivu, všechny jiné však Nipkowův kotouč zadrží. Ale postupně z bodů poskládaný obraz celkový bude tím velmi prázdný, tedy ne dost srozumitelný, a bude dokonce tím prázdnější a nesrozumitelnější, čím dokonaleji je světlo monochromatické i čím větší je apertura a lepší korekce objektivu a čím menší a řidší dírkky má Nipkowův kotouč. Při zvýšení „přísnoti konfokality“ roste tedy informace *en détail*, ale informace *en gros* klesne: *Incidit in Scyllam, qui vult vitare Charybdim*. Názorné příklady toho jsou v obrazech 13 a 21 a zejména v dalších obrazech pestrobarevných. Rozpor mezi rozsahem zobrazeného prostoru a detailností jeho zobrazení vedl teoretiky již dávno k formulaci jakéhosi zákona o konstantním množství informace v obrazu. Při rozboru charakteristik zobrazení v TSM jsme stále nacházeli nové a nové doklady o všeobecné platnosti tohoto pravidla o konstantním množství informace



Obr. 21 Preparát na zkoušení objektivů; „dlaždice“ mají výšku 1,5 μ m a šířku 10 μ m a sklo je nakloněno asi o 1°; olejová imerze 100 \times ; jasně je jen to, co je zaostřeno přesně

zaostřenou se vůbec netvoří, není je tedy nutno odstraňovat. Nevadí příliš ani vrstvy, jež předmětovou rovinu kryjí, pokud se mnoho neliší lomivostí a nemají velkou odraznost, absorpci, tloušťku. Takové podmínky bývají velmi často splněny u zkamenělin, u objektů živých, a také u mnoha jiných, a pak se tu otevírá i možnost pro jakési zobrazování ve vyšší kvalitě, ukazující 2 \times více podrobností než mikroskop klasický (viz obr. 5). To však není vše, u těchto objektů průsvitných se dá uvedená řídkost, tedy malá srozumitelnost obrazu opravit užitím objektivu barevně špatně korigovaného, jenž v jedné dokonalé rovině obrazové (obr. 19) vytvoří při osvětlení bílým světlem množinu obrazů, každý z nich má trochu jinou barvu a každý tak zobrazuje trochu jinou rovinu předmětu, všechny jsou však zcela ostré. Tato množina nezobrazuje tedy v předmětu už jen vrstvu limitně tenkou, ale vrstvu konečné tloušťky, což má dvě veliké výhody: ^(a) lépe pochopíme, co vidíme, ^(b) netřeba při prohledávání preparátu stále přeastřovat, aby nám nic neuniklo. Zde jsme se však nezastavili, ale rozhodli jsme se vrátit se ke svým starým pokusům o stereoskopickou mikroskopii, v nichž společně s přáteli, zejména

(B) S Alanem Boydem a zesnulým Miroslavem Malým jsme asi před dvaceti lety objevili, jak se dá barevná vada využít ke zvýšení obsahu informace o několik řádů při zachování teoreticky předpověděného a experimentálně doloženého lepšího rozlišení (totiž $\sqrt{0,5} \times$ délka, již udávají Rayleigh či Abbe), protáhne-li se původní rovinný prostor ve směru optické osy, a tak se rozšíří na třírozměrný. Barevný obraz tohoto třírozměrného prostoru se však vytvoří v rovině kotouče Nipkowova, jím se „vyčistí“ a je tak už jen dvourozměrný. Jeho barvy nekódují barvu objektu, nýbrž jeho třetí rozměr (jenž má směr optické osy přístroje). V oku ani v mozku nevzbudí sice tento kód představu prostoru, je však snadné obraz přetvořit v dvojici rozdílných obrazů, jeden pro levé oko a druhý pro pravé, jejichž paralaxa už kóduje třetí rozměr fyziologicky vhodně. Barevně odstupňovanou paralaxu zavedou mezi obrazy v levém a v pravém oku přímohledné spektrální hranoly opačně na okulárech orientované (obr. 22). Za spektrálními hranoly okulárů nemá už barva obrazu žádný účel, ten byl už splněn zavedením paralaxy mezi obrazy pro pravé a pro levé oko. Takže když se rozhodneme přidat za okuláry vhodné zesilovače jasu obrazů, nemůže zde už překážet jejich jednobarevný výstup; naopak, jejich barevný obraz mohl by nás spíše mást. Čtvrtý rozměr, čas, je kvantován periodou, v níž se v poli opakuje stejný vzor dírek



Obr. 22 Schéma TSM pro stereoskopii pomocí hyperchromatického objektivu

kotouče v obrazovém poli, a ta je určena dobou otáčky kotouče. Rozlišení v čtvrtém rozměru, času, je tu tedy hrubší a není určeno nějakým jasným pravidlem. Bude jistě stačit, když operátor uvidí výsledek své akce (posunutí v poli, zaostření, zásahu v objektu) včas a nemusí ji už opravovat; bohatě tu postačí rychlost rotace kotouče snadno dosažitelná i bez jeho vyvažování.

(C) Vyloučím-li z úvah fluorescenci, závisí plošná hustota znaků v obraze jen na osvětlení (na jeho barvách), na skutečně využití apertury objektivu, a na jeho kvalitě. V monochromatickém světle zobrazí objektiv tím užší soubor morfologických elementů, čím větší část apertury se skutečně využije, a čím větší je jeho zvětšení. Nebo srozumitelněji: čím podrobnější je obraz a čím je méně zatížen vadami, tím menší je naděje, že se jeho obsah pochopí a využije, viz výše. (Sluší ještě říci, že můžeme dostat zcela stejné rozlišení i kontrast, jako při řádkování *jedinou* dírkou, když clonu zorného pole zúžíme, aby v poli nebylo nikdy víc dírek kotouče než jedna. Za tento jen o málo dokonalejší obraz zaplatíme jen podstatným zmenšením zorného pole, ale to už příliš nevádí, protože k tomuto postupu se uchýlíme jen zřídka, pro kontrolu a upřesnění.)

(D) V živé tkáni je většina objektů bezbarvá, ale výjimečně se barevné obrazy vyskytnou, nebo se zavedou uměle, barvením vitálními či fluorescenčními barvivy, aby se zviditelnily a odlišily důležité znaky. Ale při monochromatickém osvětlení pro fluorescenci je nutno buď velmi slevit z nároků na rozlišení a řádkovat jinak v osvětlování a jinak v obraze, třeba jako u Yokogawy, viz str. 4, nebo barevnou korekci *naladit* přesně na obě délky vlny, té, jež fluorescenci vyvolá a té, kterou má vyvolaná fluorescence. Takových korektorů chromatismu jsem navrhl více, všechny mají lepší rozlišení, než mikroskop obyčejný i TSM s příliš velkými dírkami v kotouči (či v jednom ze dvou kotoučů, je-li jeden v osvětlení a druhý ve výstupu, jako u Yokogawy).

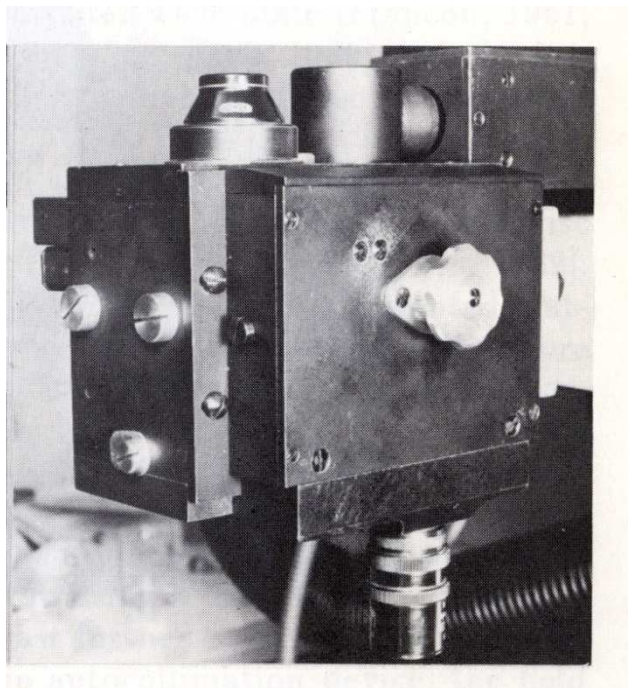
(E) Už v prvních úvahách o TSM jsem se zaměřil na zařízení příhodná pro manipulaci s živou tkání a pro rychlé prohledávání velkých objektů s konečnou tloušťkou, jako jsou třeba prvoci, červi, kultury buněk, průsvitné fosilie, tenké živočišné tkáně, a také různé artefakty. Ve většině těchto případů má velkou důležitost rychlost zobrazování a dobrý jas vytvořeného obrazu. Ale právě dosáhnout dostatečného jasu obrazu se nám dařilo špatně a pouze s velkými náklady, zejména když bylo nezbytné osvětlovat dokonale bílým světlem. Žárovka tu obvykle nestačí a často nestačí ani xenonová vysokotlaká obloukovka. Proto jsme velmi často použili i zdroj nejjasnější, Slunce. To jsme zobrazovali na Nipkowův kotouč, a jeho dírky zobrazil objektiv mikroskopu do své předmětové roviny. (To je tzv. *critical illumination* anglických autorů.) Až později jsme se od Slunce emancipovali za pomoci různých vojenských zesilovačů obrazu, nejdříve německých, z druhé světové války, a v poslední době nám přátelé z průmyslu sem tam na pár týdnů půjčili na zkoušku dokonalý zesilovač moderní. Soudím, že právě nyní přichází doba pro standardní používání elektronických zesilovačů obrazu, a že se tím pro TSM otevrou nové možnosti ve vědě i v technice. Zesilovače obrazu (obvykle jeden pro každé oko či pro každý elektronický snímač obrazu) nemusí zařízení příliš prodražit, protože se jimi zase ušetří na lacinějších a trvanlivějších světelných zdrojích; možná postačí i pouhé halogenové žárovky.

(F) Nesmí se však šetřit na vývoji speciální optiky, především objektivů s maximální aperturou a s co nejdelší volnou pracovní vzdáleností, určených pro různé imerzní kapaliny se stejným indexem, jako má předmět i prostředí, v němž žije, či v němž je uložen (např. voda, glycerol, líh, křemen, vápenec, jantar, kost, zub aj.); některé by měly mít i říditelnou korekci na tloušťku stěny nádoby (skleněné či z nějaké umělé látky). Šetřit se nesmí ani na vývoji zmíněných zvláštních objektivů se zvýšeným chromatismem různého stupně, určených pro stereoskopii (viz (A) na str. 14). Takže budoucnost TSM je už jen v rukách Páně a pánů Zeisse, Leitze, Olympuse, Nikona atd. Mám však tušení, že možnosti principů, na nichž je TSM založen, nejsou naší dnes už klasickou konstrukcí zdaleka vyčerpány, a že četní naši přátelé už brzy přijdou (možná dokonce z naší iniciativy) s konstrukcemi zcela novými, na které nebude už platit slavný apokryf o Galileovi: *Eppure si muove!* (*A přeci se točí*), ale budou se v ní měnit pouze adresy hardware, na které se mají fotony a elektrony posílat, aby se obrazy po svých proměnách mohly stále znova a znova reprodukovat, aniž by se v přístroji něco fyzicky otáčelo.

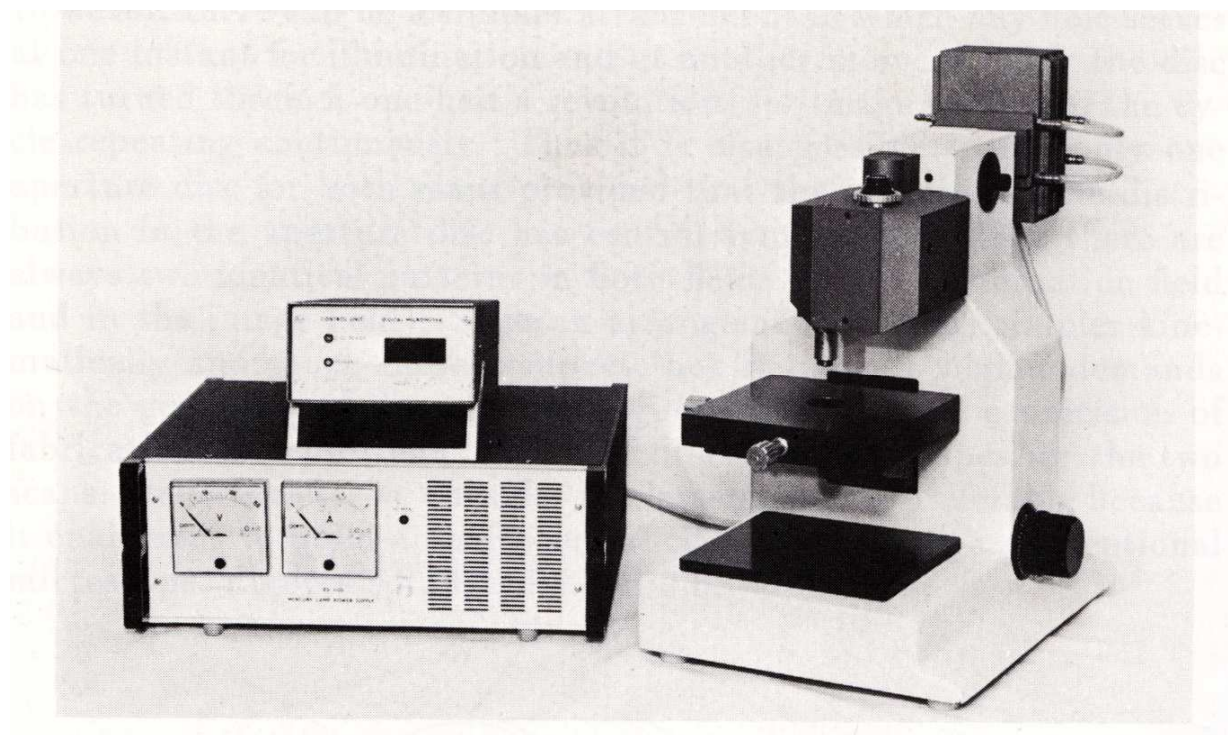
Nakonec mi zbývá už jen poděkovat všem přátelům, kteří nám v práci na tomto tématu pomohli, a z nichž valná většina už odešla, a poděkovat i těm institucím, jež podporovaly mou práci. Byla to nejdřív ČSAV, potom *Univerzita Karlova*, jež mě dosud stále podporuje prostřednictvím Ústavu buněčné biologie a patologie, 1. LF UK v Praze granty *UNCE 204022*, *Prvok/ILF/1*, a *GAČR P302/12/G157*. V letech 1964 – 1967 to bylo také vícero dalších grantů z *National Science Foundation* a z *Yale University*, a po r. 1983 i britské granty z *MRC* i *SERC*; ty nás podpořily prostřednictvím přátel a spoluautorů v USA (*Robert Galambos*) a ve Velké Británii (*Alan Boyde*).

U nás (v Plzni, v Praze, v Olomouci) zase bylo pár dobrodinců, kteří mi dlouhých dvacet let, 1970–1989, zakazovali dokonce i publikovat nová vydání starších prací, jež pak vycházela anonymně! Z těch se smutně proslavil zejména *prof. MUDr. Jiří Lukeš*, emeritní děkan plzeňské lékařské fakulty a místopředseda *Levé fronty*.

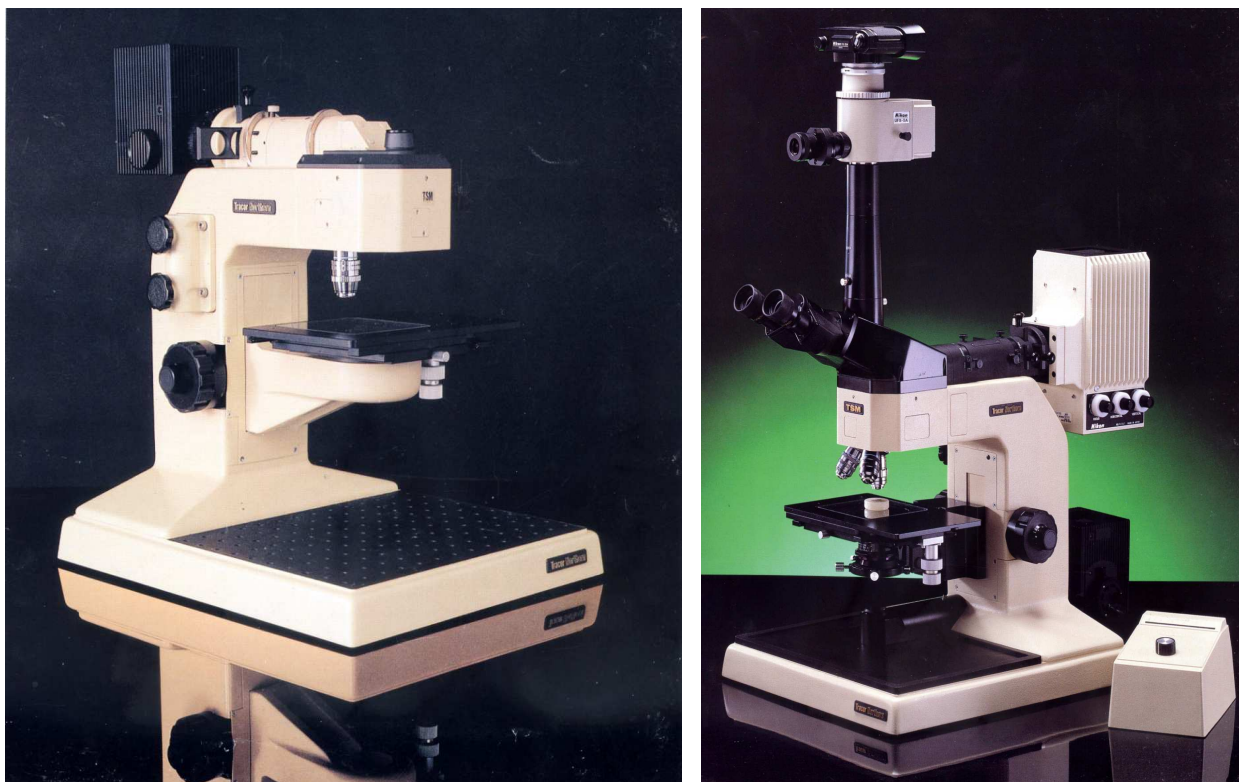
Vzhled některých komerčně vyráběných TSM



TSM se zrcadly pro University College v Londýně (první prodaný kus), konstrukce Milan Hadravský 1985



TSM vyráběný v JZD Komorno 1985-1995



Starší a novější TSM firmy Tracor Northern, Madison, Wisconsin, USA; osmdesátá léta

Na úplný závěr pokusím se věštit, kudy se budou v příštích letech ubírat hlavní proudy vývoje optických mikroskopů a mikroskopování. V nejbližších letech bude pokračovat boom řádkovací mikroskopie, zejména jejího využití pro rychlou diagnostiku během operačních zákroků, tedy k rychlému prohlížení excizí (nativních i barvených barvivy fluorescenčními a vitálními) nebo i povrchů vnějších, výstelek dutin, průhledných tkání v oku atd. Bude se klást důraz na rychlost, tj. na minimální úpravu a preparaci, a na rychlost práce. Pracné metody pro zlepšení rozlišení (viz např. letošní Nobelovu cenu za chemii) sotva najdou větší rozšíření. Bude také pokračovat vývoj objektivů pro zlepšení rozlišení a pro rozšíření využívaného pásma vlnových délek. Začnou se vyrábět hyperchromatické objektivy pro mikroskopii čtyřrozměrnou a stereoskopickou, a vůbec objektivy vhodné pro prohlížení větších hloubek v živých tkáních. Vyvinou se bílé světelné zdroje s větším jasnem a s delší životností. Ale nejdůležitější bude nepochybně další vývoj dobrých zesilovačů obrazu s velkým ziskem, s minimálním šumem, s velkým dynamickým rozsahem a se širokým vlnovým rozsahem, se širokým zorným polem a s dostatečně velkým počtem pixelů v něm. Už teď panuje v této oblasti čilý ruch, těžko se však dá předvídat, standard na kterém se vývoj ustálí na delší čas.

Po zvládnutí problémů se zesilováním jasu obrazu nepochybně se začne vyrábět optika vhodná pro stereoskopii a pro práci v hlubokých polích, a to jak v biologii a v medicíně, tak i v technice, zejména pak v mikroelektronice a v oborech příbuzných, např. v zařízeních pro pátrání po stopách průletů elementárních částic fotografickou emulzí i jinými citlivými látkami, poruch v krystalové mřížce, atp., atd.