

Optika v medicíně

Přednáška č. 07

OBSAH PŘEDNÁŠKY

Teoretická optika	<u>3</u>
--------------------------	-----------------

Fotometrie	<u>13</u>
-------------------	------------------

Mikroskopy	<u>32</u>
-------------------	------------------

Očí optika	<u>45</u>
-------------------	------------------

Terapie viditelným světlem	<u>71</u>
-----------------------------------	------------------

Teoretická optika

- **Geometrická (paprsková) optika**

- na světlo pohlíží jako na svazek paprsků, zanedbává jeho vlnovou povahu.
- zkoumané jevy: odraz světla, lom světla.

- **Vlnová optika**

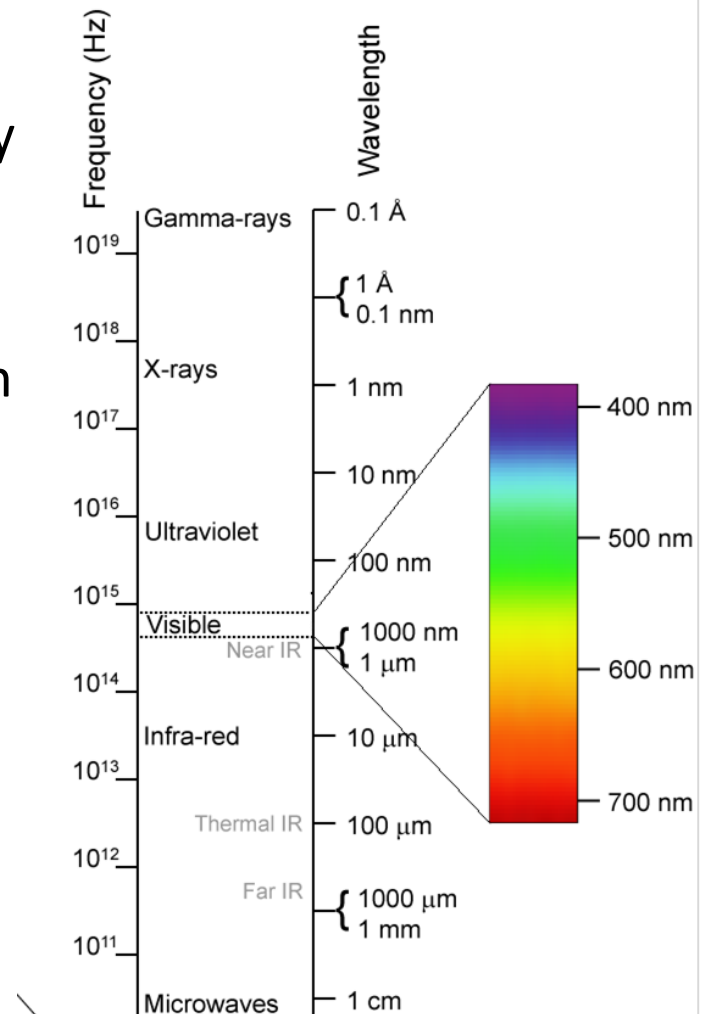
- vychází z vlnové povahy světla jako elektromagnetického záření.
- zkoumané jevy: interference, difrakce (ohyb), polarizace

- **Kvantová optika**

- též nazývaná fotonová, zkoumá děje, při kterých se projevuje kvantový charakter světla - to se nešíří spojitě, ale jako proud částic s určitou energií = fotonů.
- vysvětluje např. fotoelektrický jev, Comptonův jev

VIDITELNÉ SVĚTLO

- Viditelné světlo je elektromagnetické záření v rozmezí vlnových délek 380–760 nm.
- Tyto vlnové délky mají tu vlastnost, že při dopadu na fotoreceptory lidského oka (tyčinky a čípky) vyvolávají zrakový vjem, odtud název.
- V celém spektru elektromagnetického záření se viditelné světlo nachází mezi infračerveným a ultrafialovým zářením (s delšími respektive kratšími vlnovými délkami).
- Vlastnosti viditelného světla zkoumá obor fyziky zvaný **optika**.
- Rychlost světla (**c**):
 - Vakuum: přesně 299,792,458 m/s
 - Sklo: cca 200 000 km/s.



VIDITELNÉ SVĚTLO

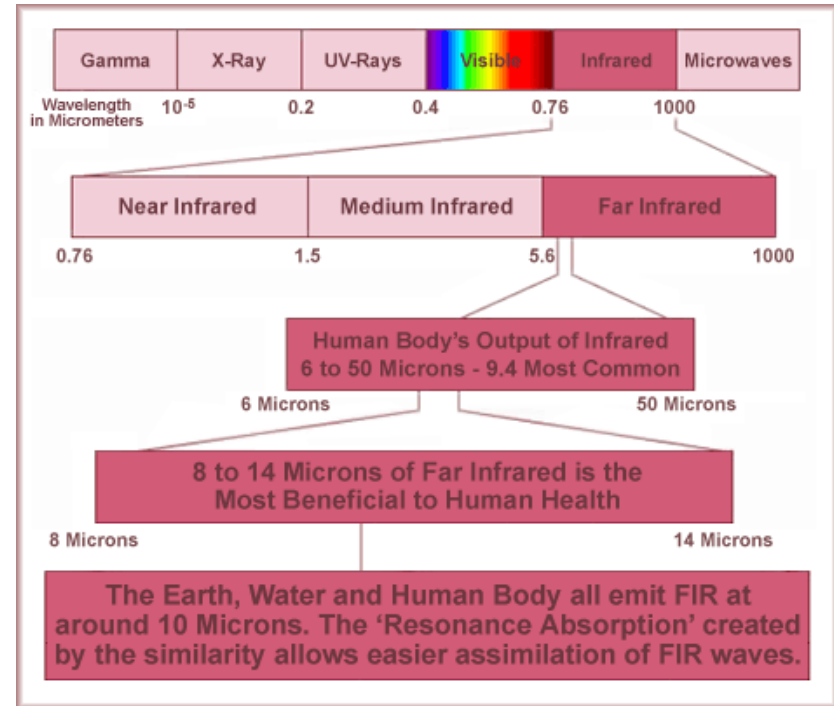
- Viditelné světlo se skládá z několika barev, které do sebe plynule přecházejí.
- Podle stoupající vlnové délky jsou to: fialová, modrá, zelená, žlutá, oranžová a červená.



- Mezi fialovou a modrou je indigová barva, ale protože je na rozlišení těchto barev lidské oko málo citlivé, obvykle se neuvádí.
 - Pokud má nějaký objekt určitou barvu, znamená to, že pohlcuje všechny barvy spektra kromě té (těch), které my vidíme.
 - Je to díky tomu, že se od povrchu objektu viditelné barvy odráží.
- Vedle spektrálních barev, které odpovídají barvám spektra, existují i nespektrální barvy, které vznikají jako vjem smíšení několika barev.
- Nespektrální barvy jsou např. šedá vč. bílé a černé, růžová nebo tyrkysová.

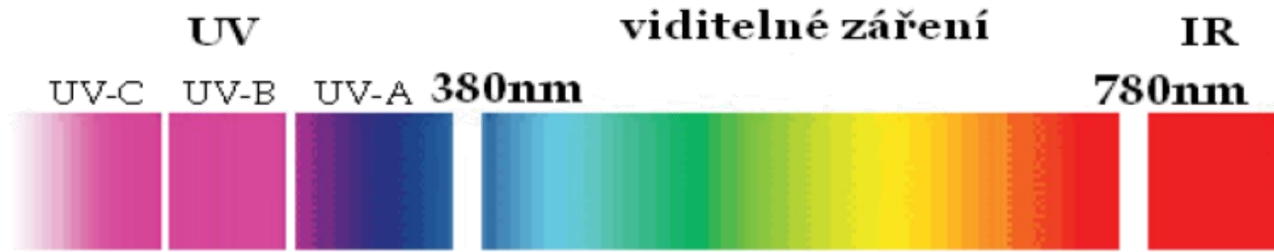
INFRAČERVENÉ SVĚTLO (ZÁŘENÍ)

- IR je elektromagnetické vlnění o vlnové délce v intervalu 760 nm až 1 mm.
- Ve vakuu se šíří rychlostí světla.
- Zdrojem jsou tělesa zahřátá na vyšší teplotu, při pohlcování tohoto záření se těleso zahřívá.
- **Termografie** - zobrazovací metoda, jež umožňuje analyzovat a graficky znázornit teplotu na povrchu sledovaného objektu.
 - **Emisivita** je poměr mezi vyzařováním reálného tělesa a černého tělesa při stejné teplotě.
- **Využití v medicíně:**
 - Tepelné účinky -vasodilatace, prohřívání tkání.
 - Diagnostika – Termografie, měření tepelné distribuce povrchu.



ULTRAFIALOVÉ SVĚTLO

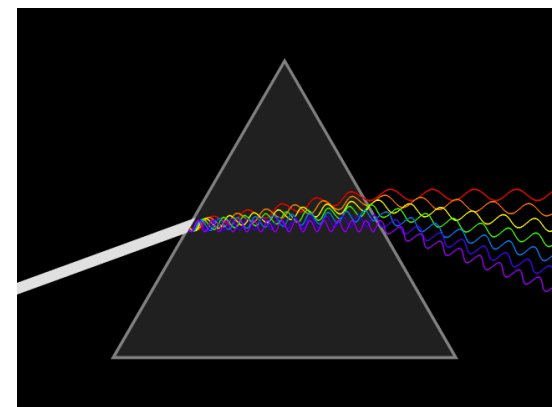
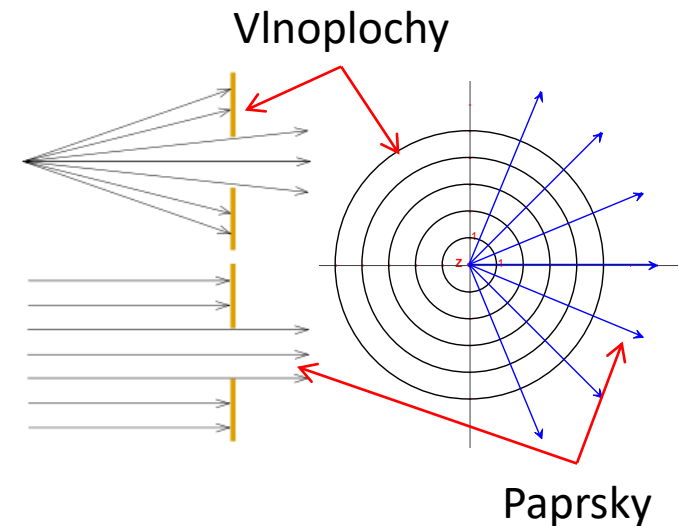
- UV je EM o vlnové délce kratší než má viditelné světlo, a delší než má rentgenové záření – tedy asi 400–10 nm.



- Zdrojem jsou např. tělesa zahřátá na vysokou teplotu, nebo výbojky naplněné parami rtuti.
- Škodlivě působí na zrakový orgán.
- Na ozáření tělo reaguje tvorbou prekurzorů vitamínu D.
- Používá se při dezinfekci a sterilizaci, ničí patogenní mikroorganismy.
 - Sterilizaci umožňuje schopnost UV záření porušovat DNA mikroorganismů.
 - Ve vzduchu i vodě dokáže ultrafialové záření ničit viry a plísně.
- Výrazně je pohlcováno ozonoférou a úplně např. sklem.

GEOMETRICKÁ OPTIKA

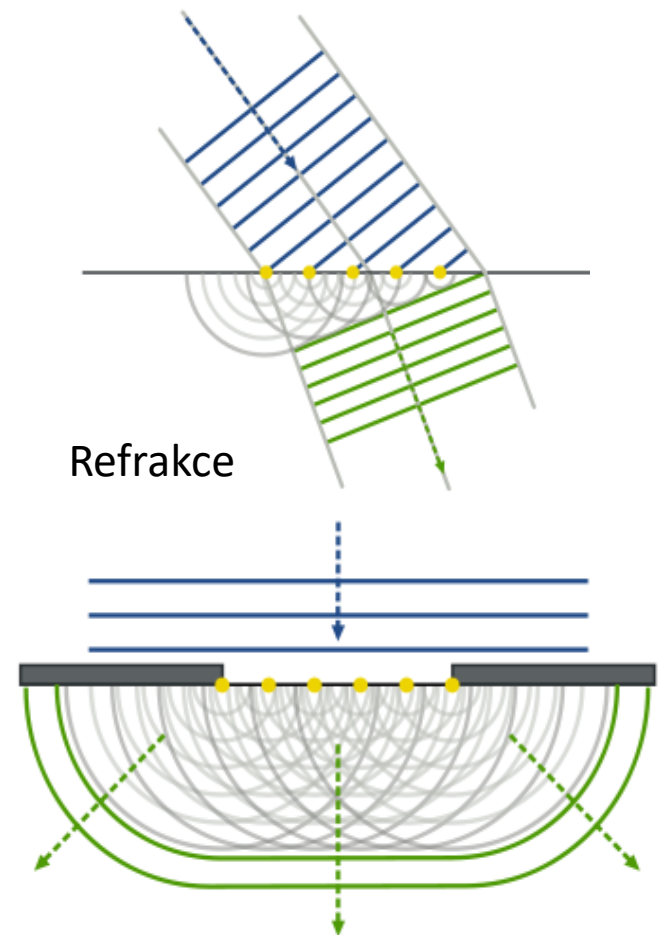
- Zabývá se studiem šíření světla v prostředí, jehož rozměry jsou velké ve srovnání s vlnovou délkou světla.
- Geometrická optika si tedy nevšímá vlnových vlastností světla.
- Je postavena na několika principech:
 - princip přímočarého šíření světla
 - princip vzájemné nezávislosti paprsků
 - princip záměnnosti chodu paprsků
 - zákon odrazu a lomu (Snellův zákon)
- Geometrická optika položila základy pro tvorbu optického zobrazení, např. pomocí čoček a zrcadel.
- Znalost optického zobrazení posloužila pro pochopení a konstrukci optických systémů.



Difrakce (lom)

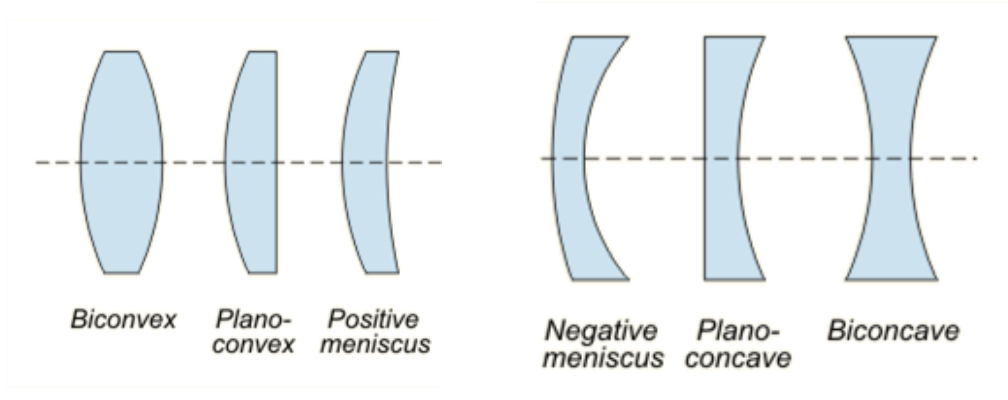
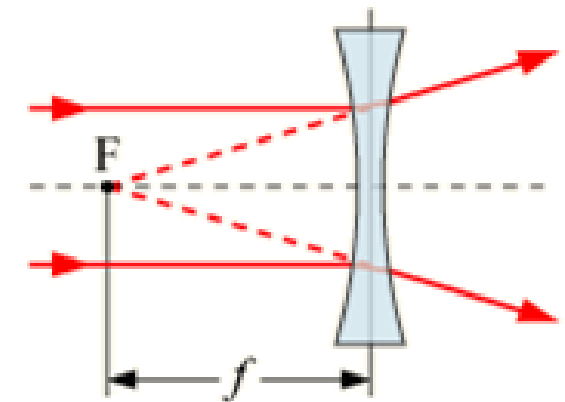
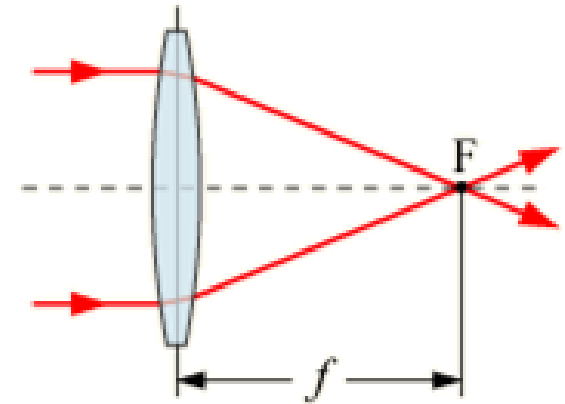
VLNOVÁ OPTIKA

- Vlnová optika respektuje vlnový charakter světla, je však přiblížením, v němž je světlo popsáno pomocí skalární funkce.
- Vlnová optika studuje jevy, které souvisí s vlnovým charakterem záření, jako např. *interference*, *difrakce (ohyb)* a *polarizace*.
- Při popisu lze použít **Huygensův princip**.
 - Předpokládá, že v každém okamžiku lze každý bod na čele šířící se vlny chápat jako nový zdroj vlnění (sekundárních vln).
- Díky Huygensovu principu můžeme zkonstruovat vlnoplochu v určitém okamžiku, je-li známá její poloha a tvar v některém předcházejícím okamžiku.
- Lze také podle něj odvodit princip odrazu a lomu vlnění.

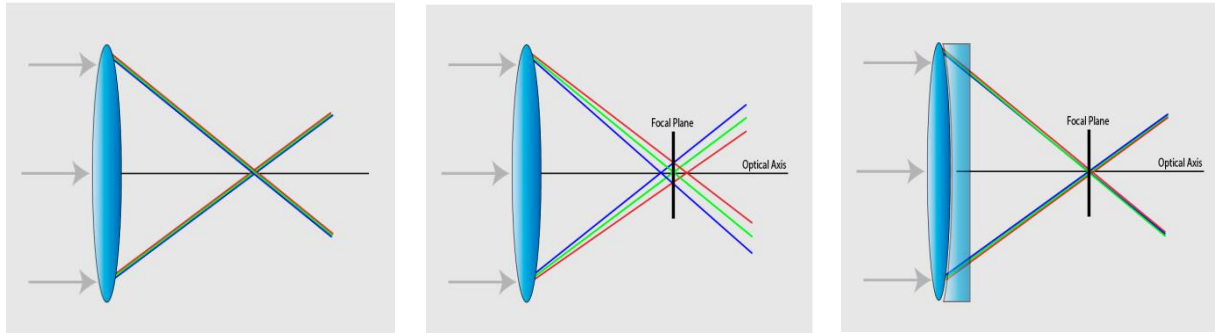


OPTICKÁ ČOČKA

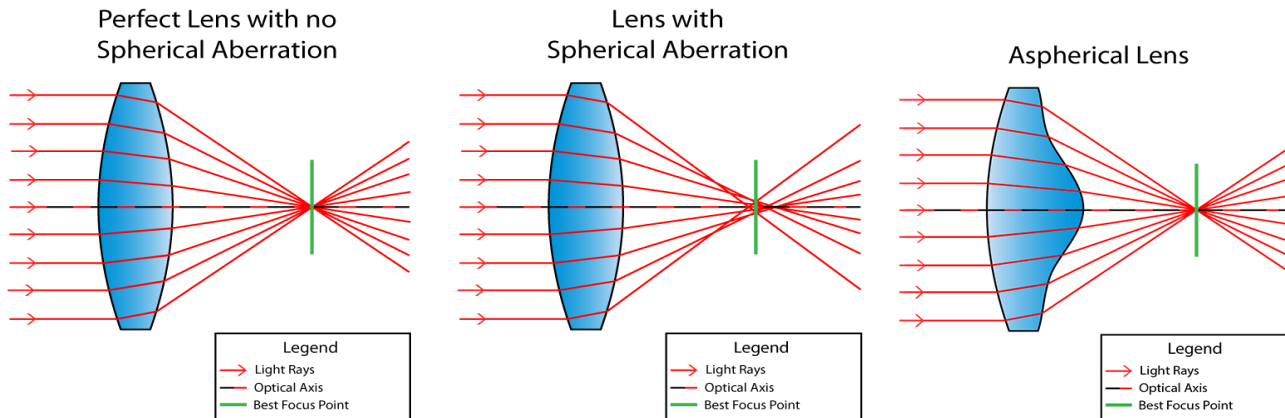
- Optická soustava dvou centrovaných ploch, nejčastěji kulových, popř. jedné kulové a jedné rovinné plochy.
- Materiál čočky je charakterizován indexem lomu, který je vždy větší než jedna, a indexem absorpce, který je pro vlnové délky v rozsahu použitelnosti čočky blízký nule.
- Paprsek, dopadající na libovolné místo povrchu čočky se uvnitř čočky láme podle Snellova zákona a podle stejného zákona se lomí na protilehlém povrchu a malá část světla se odráží zpět.



- **Chromatická aberace** barevná vada čočky způsobená závislostí ohniskové vzdálenosti čoček na vlnové délce světla, protože čočky lámou světlo každé barvy jinak (červená nejméně, fialová nejvíce).



- **Sférická aberace** je optická vada zobrazení, kdy se světelné paprsky na okraji čočky lámou víc, než poblíž optické osy.



Fotometrie

- Fotometrie je oblast optiky popisující světlo a jeho účinky na lidské oko a definice fotometrie je „měření světla, které je detekováno lidským okem“.
- Pomocí fotometrických veličin určuje vlastnosti světelných zdrojů a osvětlených ploch.
- Do fotometrie spadají následující témata:
 - Radiometrické a fotometrické veličiny a jednotky a jejich vzájemná souvislost
 - Spektrofotometrie - Absorpce světla; Beerův zákon; Lambert-Beerův zákon.
- Zdroje a detektory optického záření:
- Typy světelných zdrojů – žárovky, luminiscenční zdroje záření, výbojky, luminiscenční diody, lasery – vzájemné srovnání a charakter jejich spekter
- Detektory optického záření

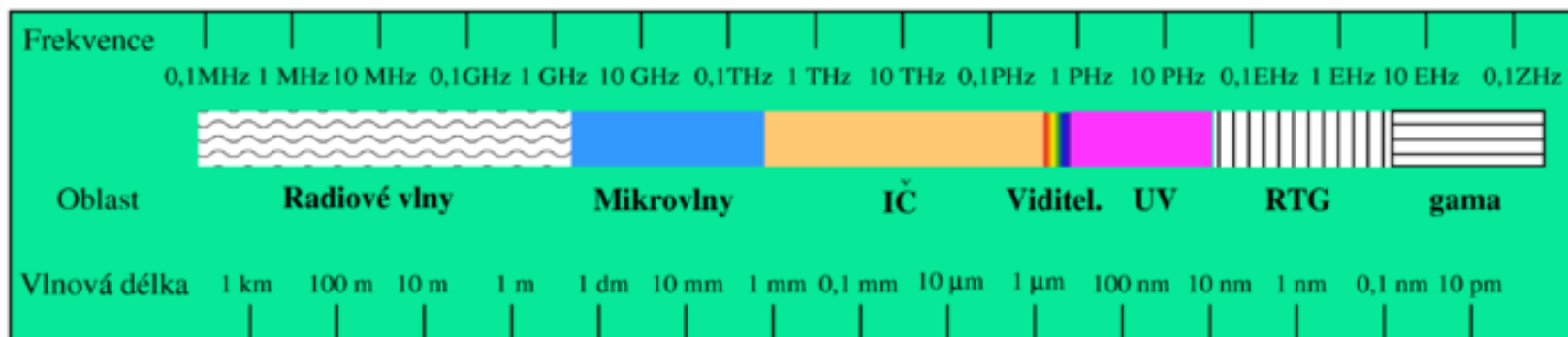
FOTOMETRICKÉ JEDNOTKY

- Fotometrické veličiny jsou veličiny vztažené k elektromagnetickému záření, které je viditelné lidským okem a kvantitativně hodnotí tohoto záření velikostí možného vizuálního vjemu.

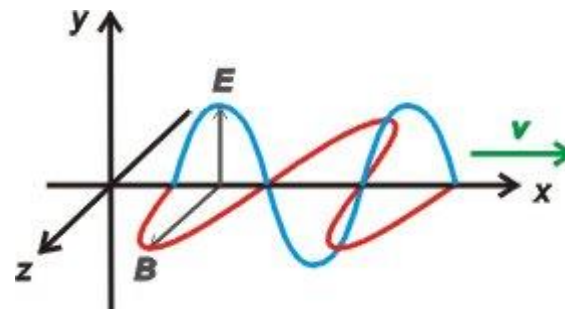
Veličina	Symbol	SI unit	Zkr.
Světelný tok	Φ_v	lumen (= cd·sr)	lm
Svítivost	I_v	candela (= lm/sr)	cd
Světelná energie	Q_v	lumen second	lm·s
Osvětlení	E_v	lux (= lm/m ²)	lx
Jas	L_v	candela per m ²	cd/m ²

ELEKTROMAGNETICKÉ SPEKTRUM

- V následujícím přehledu stručně charakterizujeme jednotlivé druhy elektromagnetického záření.
- Podle vlnových délek (od nejdelších po nejkratší) se spektrum elektromagnetického vlnění dělí na:



- Každá elektromagnetická vlna má dvě složky: elektrickou složku, kterou představuje vektor intenzity elektrického pole E , a magnetickou složku, kterou tvoří vektor magnetické indukce B .
- Obě složky jsou na sebe navzájem kolmé a ještě navíc jsou obě kolmé na směr šíření vlnění.



VZNIK SPEKTRA

- Spektra látek vznikají buď vyzařováním světla (mluvíme o tzv. emisních spektrech) nebo pohlcováním světla (potom mluvíme o tzv. absorpčních spektrech).

Emisní spektrum spojité



- Souvislý barevný pruh, v němž jednotlivé barvy plynule přecházejí jedna v druhou, je vysíláno zejména rozžhavenými látkami v pevném a kapalném skupenství (např. vlákno žárovky, roztavené kovy,...) a je u všech látek stejné.
- Rozložení energie mezi jednotlivé barvy se řídí zákony černého tělesa.

Emisní spektrum čárové



- Vyzařují ho atomy plynů zahřátých na vysoké teploty nebo spektra plynů zářících ve výbojových trubicích.
- Skládá se z jednotlivých barevných čar (úzkých a ostrých) oddělených od sebe tmavými mezerami a jsou charakteristická pro každý prvek.

Emisní spektrum pásové



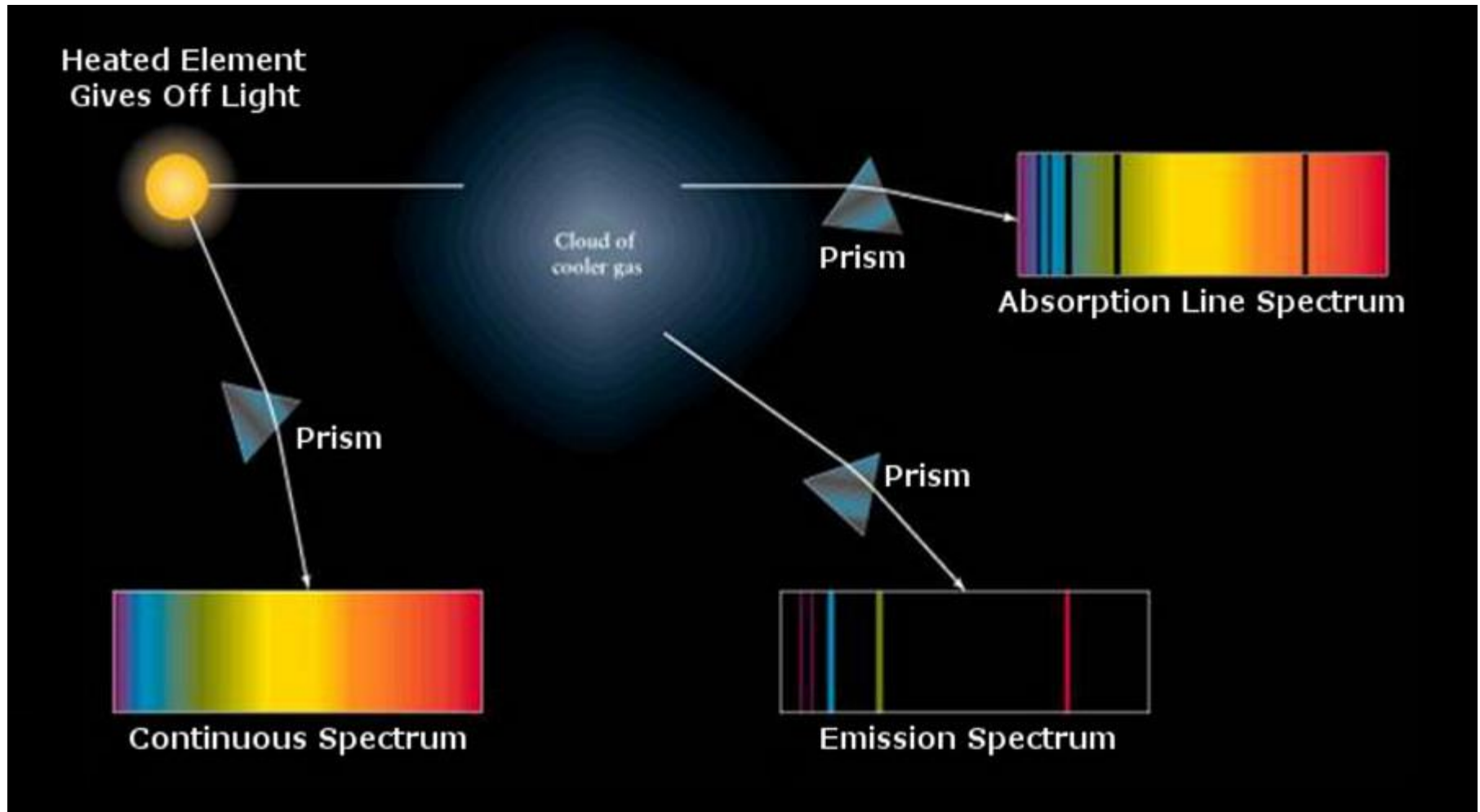
- Jsou tvořeny velkým množstvím velmi blízkých čar; tyto skupiny vytvářejí charakteristické pásy oddělené temnými pásy; jsou charakteristická pro zářící molekuly látek.

Absorpční spektrum



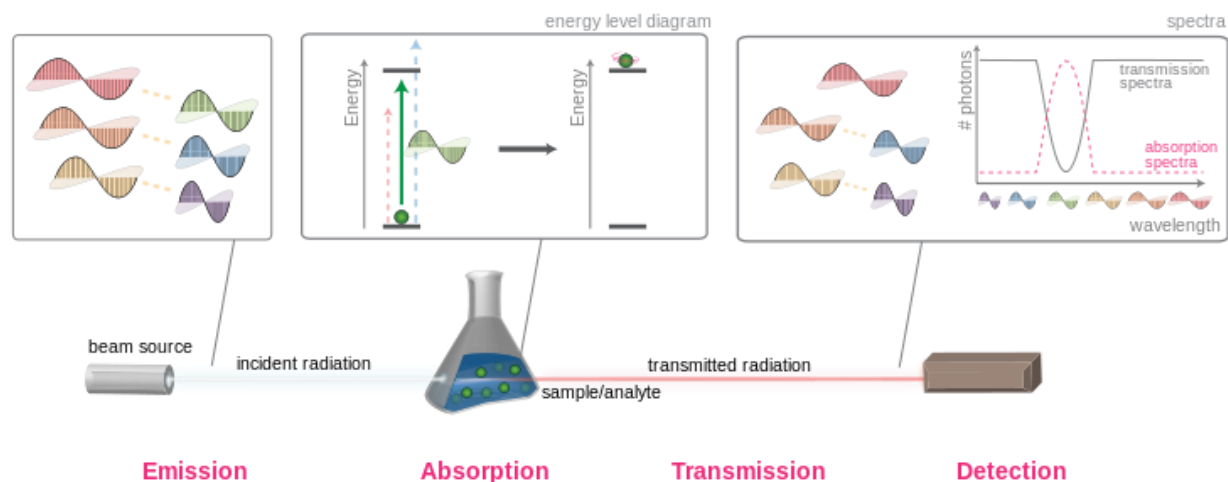
- Opakem emisních spekter jsou spektra absorpční, která vznikají při průchodu spojitého záření látkou.
- Každá látka je schopna pohlcovat záření, které sama vyzařuje.
- Absorpční spektrum je charakteristické tím, že se na pozadí spojitého záření objevují černé čáry, opět charakteristické pro každý prvek.
- Na rozdíl od emisních spekter nemusíme vzorek látky rozžhavit na velmi vysokou teplotu.
- Dělíme je na dvě skupiny: **čárová** a **pásová**
- Sloučíme-li emisní a absorpční spektrum stejné látky, získáme spektrum spojitě.

VZNIK SPEKTRA



SPEKTROSKOPIE

- Elektromagnetická **spektroskopie** zkoumá, jak se mění u elektromagnetického záření intenzita záření s vlnovou délkou záření (tzv. spektrální rozdělení). Změny spektrálního rozdělení mohou nastat např při:
 - průchodu prostředím: absorpční spektrum
 - odrazu na rozhraní dvou prostředí: reflexní spektrum
 - vyzařování světla prostředím: luminiscenční nebo fluorescenční spektrum
- Spektroskopie umožňuje bezkontaktně a nedestruktivně získávat informace o dané látce (složení, teplotě apod.).



Absorpční spektroskopie

- Změna spektrálního rozdělení při průchodu látkou.
- Látka je prosvětlena zdrojem světla (často se používají halogenové lampy a lasery) a zkoumá se změna spektrálního rozdělení po průchodu látkou.
- Míra absorpce se nejčastěji udává jako absorbance

Emisní spektroskopie

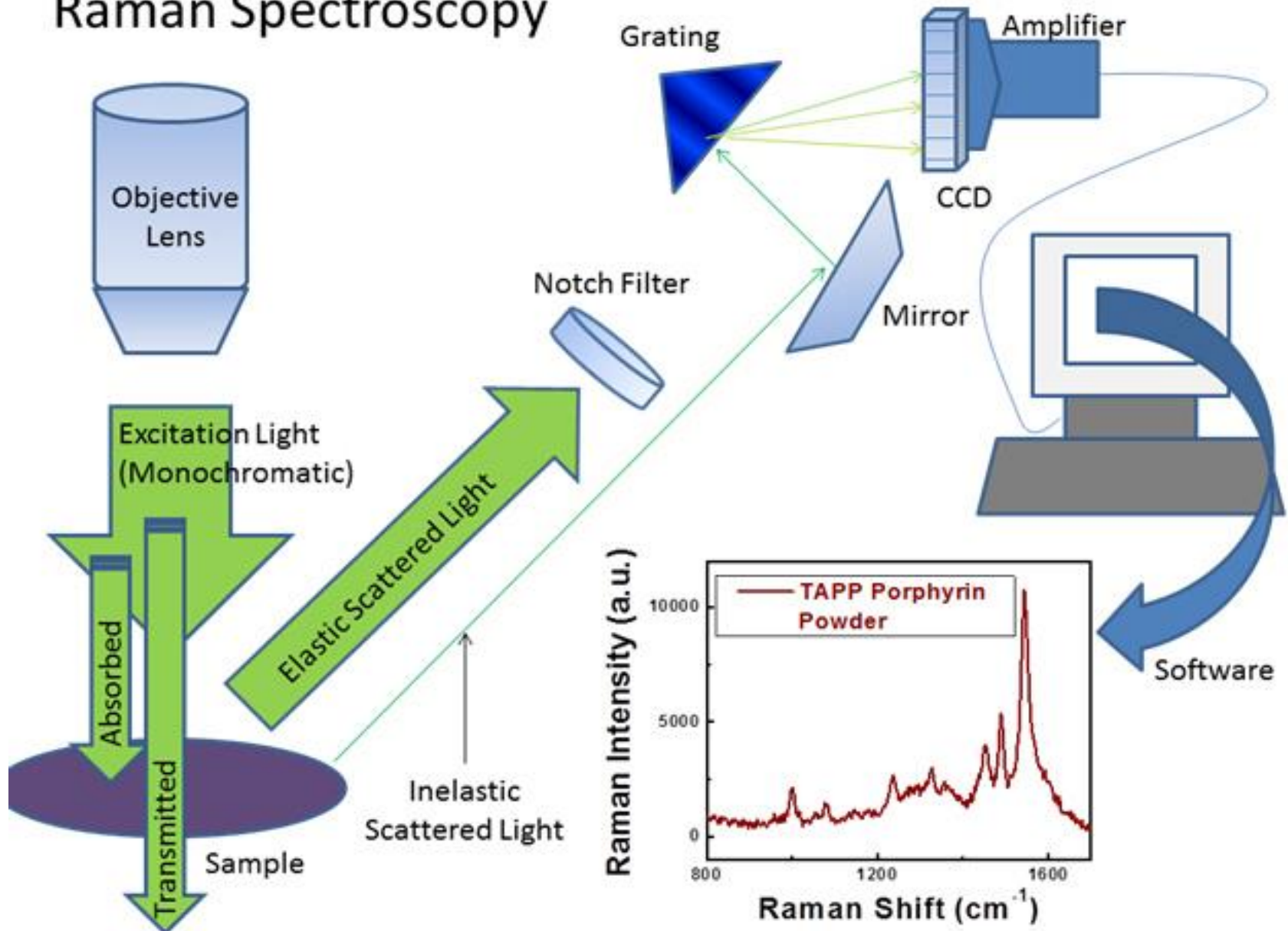
- Látka je excitována světelným zdrojem, teplem, elektrickým proudem apod. a kvůli tomuto vybuzení emituje EM záření.
- Toto záření se nazývá luminiscence (fluorescence či fosforescence, což jsou staré a dnes již ve fyzice málo používané termíny).
- Podle druhu buzení se luminiscence dělí na:
 - elektroluminiscenci (buzení el. proudem)
 - fotoluminiscenci (buzení světlem, dnes nejčastěji laserem)
 - tepelnou luminiscenci (tepelné záření)

Ramanova spektroskopie

- Detekuje záření, které je rozptýleno kmity krystalické mřížky nebo kmity v molekule.
- Látka je prosvětlena většinou kontinuálním laserem s úzkou spektrální čarou (světlo laseru nemusí být látkou vůbec absorbováno), kdy laserové záření interaguje s krystalovou mřížkou látky nebo s molekulou a tím se mění jeho vlnová délka.
- Fyzikálně se toto popisuje jako neelastický rozptyl na fononech a pomocí této změny pak lze určit o jakou látku se jedná, případně o jakou její fázi.
- Je to moderní odvětví spektroskopie, které umožňuje dobře identifikovat jednotlivé materiály v látce.
- *Dokáže např. rozlišit, zda je v křemíkovém materiálu přítomna krystalická nebo amorfní fáze křemíku.*
- Nově se Ramanova spektroskopie používá například pro určování poloměru nanokrystalů v nanokrystalickém materiálu.

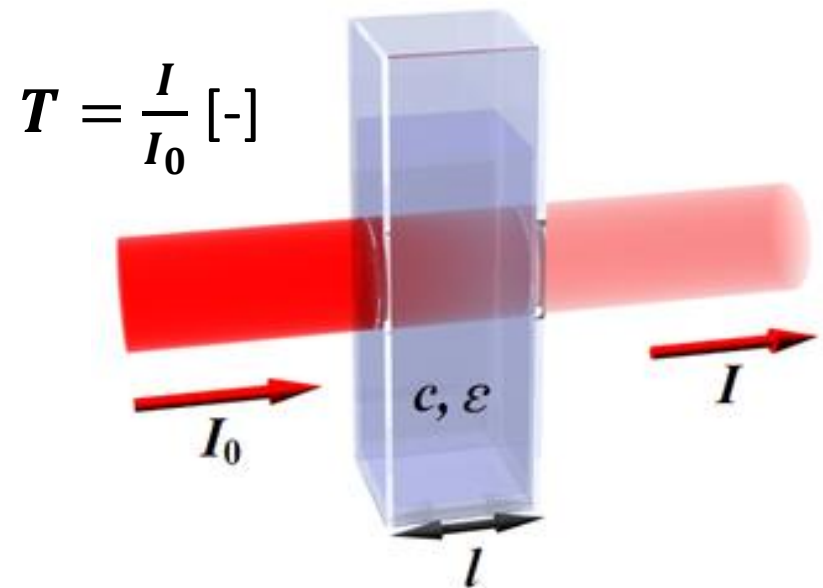
RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

Raman Spectroscopy



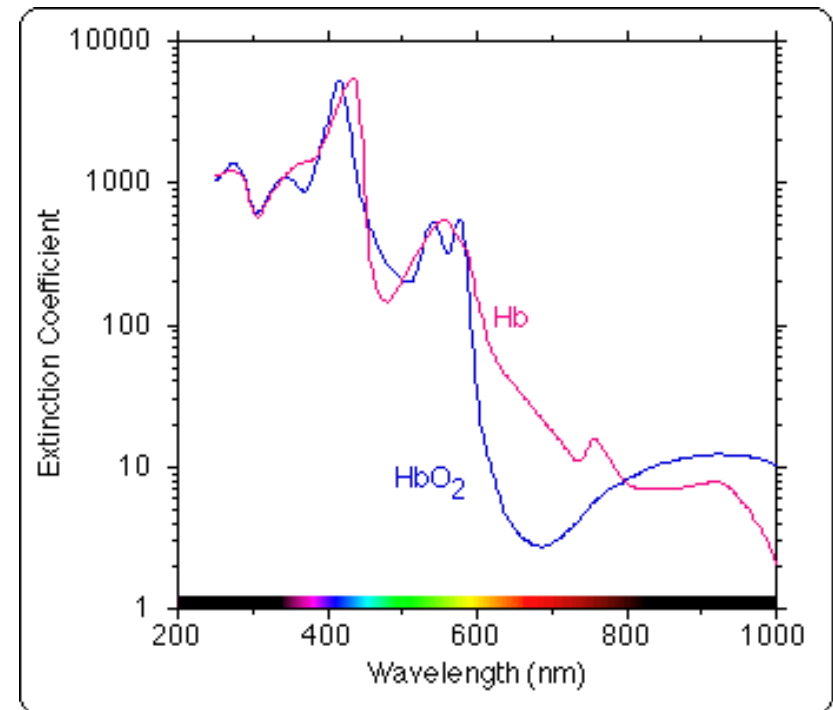
SPEKTROFOTOMETRIE

- Metoda založená na interakci EM záření s analyzovaným roztokem, kdy je část záření absorbována částicemi vzorku.
- Absorpcí fotonu vzniká excitovaný atom, kdežto část záření projde roztokem a je následně detekována přístrojem.
- Množství světla propuštěného, odraženého nebo pohlceného jistou látkou je závislé na vlnové délce záření a na koncentraci zkoumané látky.
- Intenzita prošlého světla (I_0) je vždy menší než intenzita světla na látku dopadajícího (I)
- Veličina **transmittance** (T) toto zeslabení popisuje.
- Může nabývat hodnot 0 (veškeré záření pohlceno) až 1 (veškeré záření prošlo)



SPEKTROFOTOMETRIE

- **Absorbance (A)** - záporný dekadický logaritmus transmittance.
 - Vyjadřuje schopnost molekul látky pohlcovat elektromagnetické záření určité vlnové délky.
 - Logaritmická funkce je ve vzorci použita z důvodu exponenciálního úbytku intenzity světla průchodem látkou.
- **Výsledkem** spektrofotometrického měření je tzv. **absorpční spektrum**, které charakterizuje vlastnosti prostředí.
- Jedná se o grafickou závislost absorbance nebo energie na vlnové délce.
- Zobrazené křivky jsou charakteristické svým tvarem a polohou maxima.



- Spektrofotometrie je založena na **Lambert-Beerově zákoně**, který popisuje **vztah** mezi **koncentrací látky** v roztoku a její **absorbancí**:

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

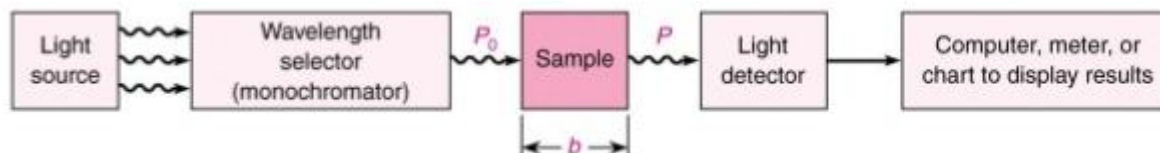
- Vyplývá z něho, že při dané vlnové délce je absorbance přímo úměrná koncentraci látky (**c**) a tloušťce absorbující vrstvy (**l**), tedy šířce kyvety.
- Molární extinkční (absorpční) koeficient (**ε**) je konstanta úměrnosti, která je specifická pro danou látku a vlnovou délku.
- Jeho hodnoty můžeme zjistit z fyzikálně-chemických tabulek nebo změřením absorbance roztoků o známých koncentracích a vytvořením kalibrační křivky, případně stanovením kalibračního koeficientu.
- Díky Lambert-Beerovu zákonu jsme při spektrofotometrických měřeních schopni zjistit neznámou koncentraci roztoků látek.

- Lambert-Beerův zákon dokážeme aplikovat při použití monochromatického světla, konstantní délky kyvety, stejného rozpouštědla a konstantní koncentraci látky během celého měření.
- V praxi je platnost tohoto zákona limitovaná:
 - Rozptylem světla v důsledku jemných nečistot ve vzorku,
 - fosforescencí anebo fluorescencí vzorku,
 - malým množstvím procházejícího světla při vysokých koncentracích,
 - změnami hodnot absorpčního koeficientu
 - posunem chemické rovnováhy způsobeným vysokou koncentrací látky ve vzorku.
- UV/VIS spektroskopie a fotometrie jsou disciplíny využívající světlo z UV oblasti (vlnová délka 10–390 nm), viditelné oblasti (vlnová délka 390–790 nm) a přilehlé infračervené oblasti (vlnová délka 770 nm–1 mm) ke zkoumání spektroskopických vlastností

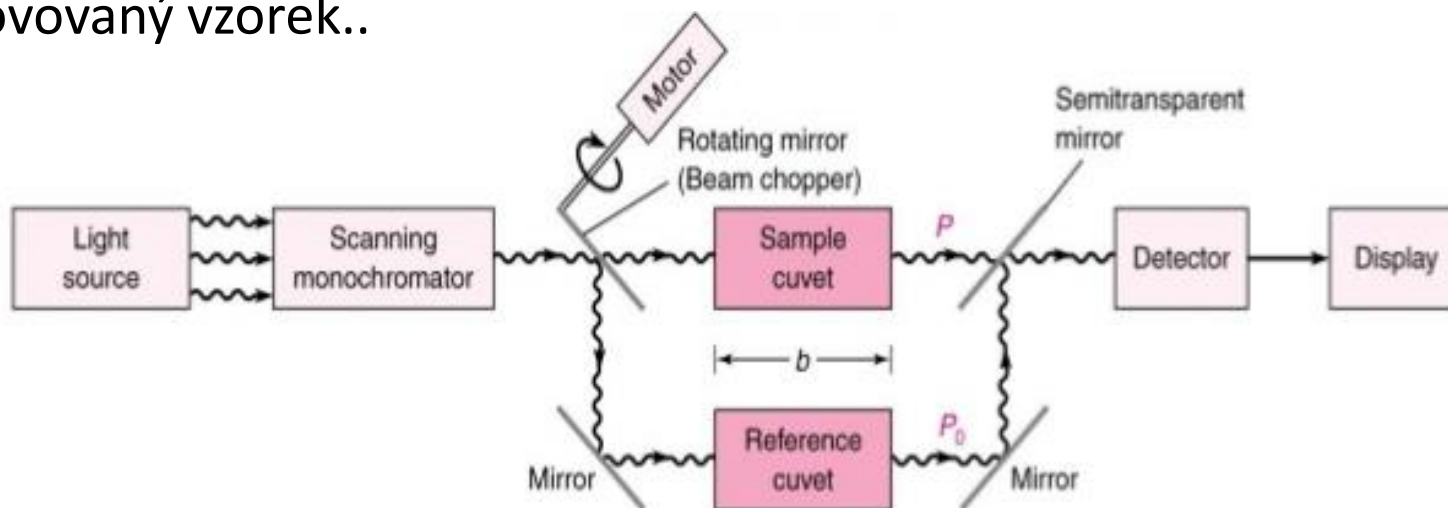
- Spektrofotometry jsou technicky složité přístroje plně ovladatelné pomocí počítače pro spektrofotometrická stanovení.
- Umožňují vlnovou délku monochromatického světla libovolně nastavit nebo měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek.
- Využívají se k měření absorpčních spekter anebo ke stanovení kvantitativních měření, ale umožňují také měření kinetiky jednoduchých, například enzymových reakcí.
- Nacházejí široké uplatnění v oborech chemie, fyziky, biochemie, biologie i medicíny.
- UV/VIS spektroskopie a fotometrie jsou disciplíny využívající:
 - Světlo z UV oblasti (vlnová délka 10–390 nm)
 - Viditelné oblasti (vlnová délka 390–790 nm)
 - Přilehlé infračervené oblasti (vlnová délka 770 nm–1 mm) ke zkoumání spektroskopických vlastností

SPEKTROFOTOMETRIE

- Spektrofotometry se dělí podle počtu paprsků na:
- **Jednopaprskové spektrofotometry** měří pouze vystupující tok záření, proto se nejprve musí provést referenční měření rozpouštědla a teprve potom se může měřit vzorek.

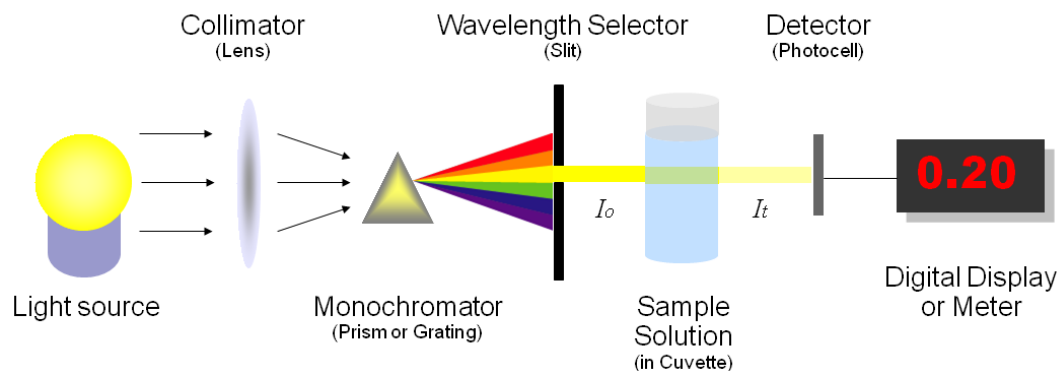


- **Dvoupaprskové spektrofotometry** měří jedním paprskem slepý vzorek, tzv. blank (rozpouštědlo bez stanovované látky), zatím co druhým měří stanovovaný vzorek..



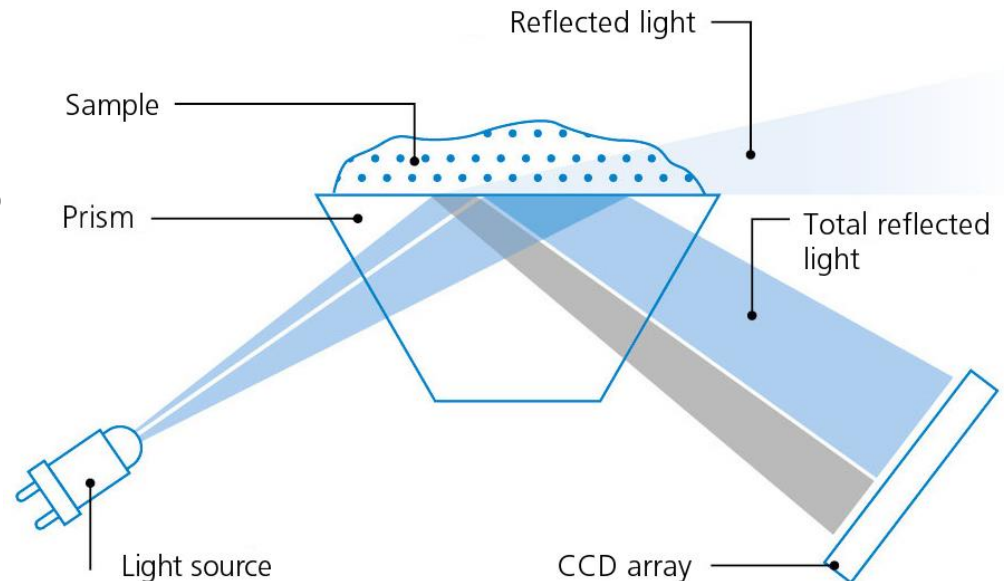
SPEKTROFOTOMETR

- **Zdroj záření** – žárovka nebo halogenová lampa pro VIS a deuteriová lampa pro UV oblast
- **Čočky a zrcadla** – usměrňují paprsek světla
- **Monochromátor** – zařízení propouštějící pouze světlo určité vlnové délky (vytvoří z polychromatického záření monochromatické); rozkladným prvkem může být hranol nebo optická mřížka (pro viditelnou oblast spektra se nejčastěji používá hranol ze skla)
- **Kyvetový prostor** – prostor pro vzorky v kyvetách; používá se skleněná optika (pro VIS oblast), křemenná optika (pro UV oblast), solná optika (pro IR oblast) nebo kyvety z plastu
- **Detektor** – CCD kamera nebo fotodioda
- **Výstupní zařízení** – software na analýzu dat



REFRAKTOMETRIE

- Metoda pro měření indexu lomu látek pevných, kapalných i plyných, při které se využívá mezního úhlu lomu, respektive úplného odrazu světla.
- **Index lomu** je charakteristickou veličinou látek, je znakem jejich čistoty a pomocí něho lze určit také **koncentraci**.
- Přístroje určené k měření indexu lomu se nazývají refraktometry a mohou pracovat v procházejícím i odraženém světle.
- Lze je dělit podle několika hledisek a to podle konstrukce, účelu, jemuž slouží, nebo podle použitého záření (monochromatického nebo polychromatického).
- Rozhraní mezi osvětlenou a neosvětlenou částí je sledováno v dalekohledu refraktometru – po nastavení zorného pole přesně na střed lze na stupnici odečíst index lomu.



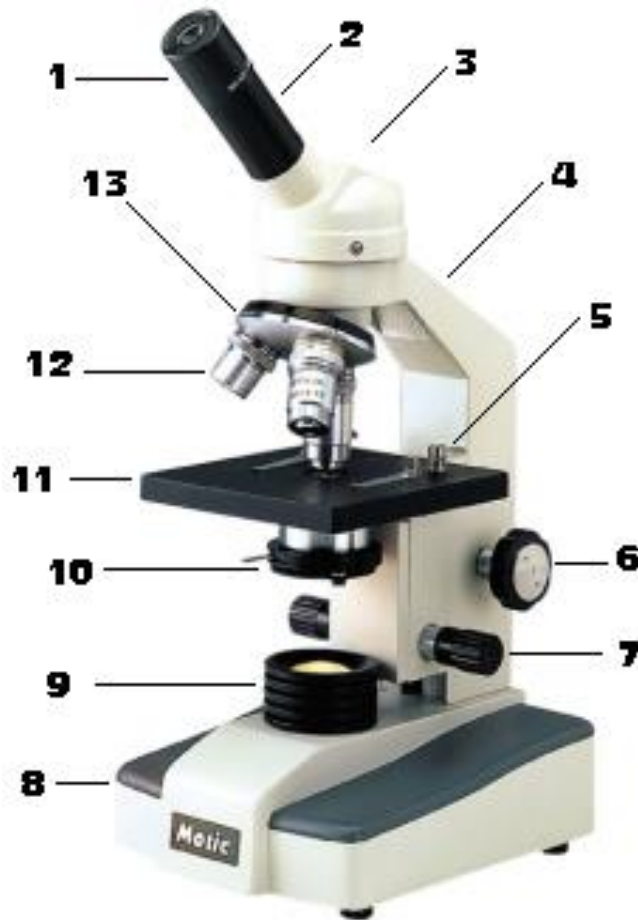
Mikroskopy

MIKROSKOP

- Mikroskop je optický přístroj pro zobrazení malého sledovaného objektu ve větším zvětšení.
- Pod označením mikroskop je obvykle myšlen optický mikroskop, který pro zobrazení využívá světelných paprsků, existují však i jiné mikroskopy, např. elektronový mikroskop.
- Běžný mikroskop se skládá z:
 - **optické části**, která zajišťuje vznik a promítání obrazu
 - **mechanické části**, která chrání optickou část a tvoří tělo mikroskopu.



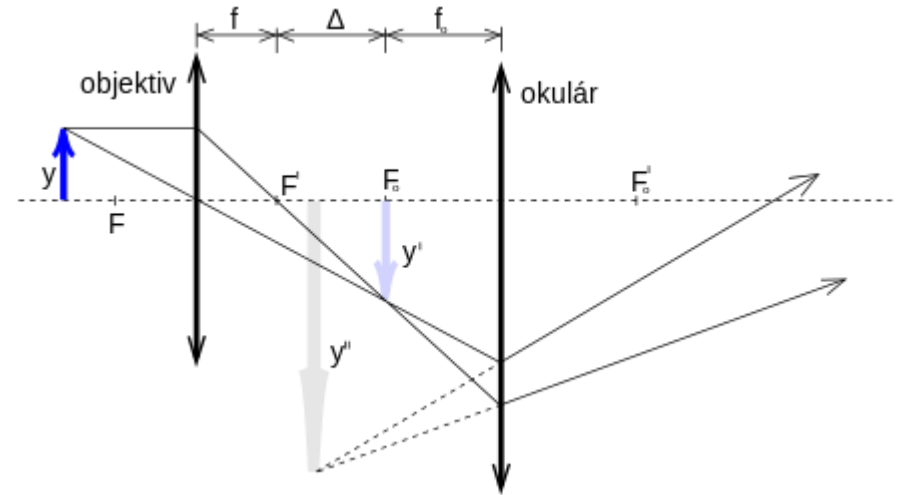
KONSTRUKCE MIKROSKOPU



1. **Okulár** - optický člen pro vhled do mikroskopu. Může mít různé hodnoty zvětšení nebo být i vybaven motivem (ukazovací jehla, kříž, kříž se stupnicí, síťka apod.). Obvykle bývá mikroskop vybaven okulárem WF 10x.
2. **Tubus okuláru** - slouží ke vložení okuláru do správné pozice.
3. **Hlavice** - v tomto případě monokulární (jeden vhled).
4. **Rameno mikroskopu**
5. **Držák preparátu** - v tomto případě pérový. Některé modely bývají vybaveny buď křížovým vodičem preparátu nebo přímo křížovým stolem, které zajistí pohodlný a přesný posun preparátu pod objektivem a zlepši orientaci v preparátu.
6. **Makro zaostřování** - zajistí hrubé zaostření preparátu.
7. **Mikro zaostřování** - umožní precizní doostření preparátu (některé modely mají makro i mikro zabudováno v jedné ose, v tom případě mluvíme o koaxiálním makro a mikro zaostřování).
8. **Základna** (noha) mikroskopu
9. **Kolektor osvětlení** - soustřeďuje paprsky světla
10. **Kondenzor** - pomáhá měnit kontrast obrazu (může být vybaven clonou a držákem pro vkládání filtrů).
11. **Pracovní stolek**
12. **Objektivy** - optické členy s různými hodnotami zvětšení.
13. **Otočná hlavice pro objektivy** - nosič objektivů, slouží k jejich snadné záměně

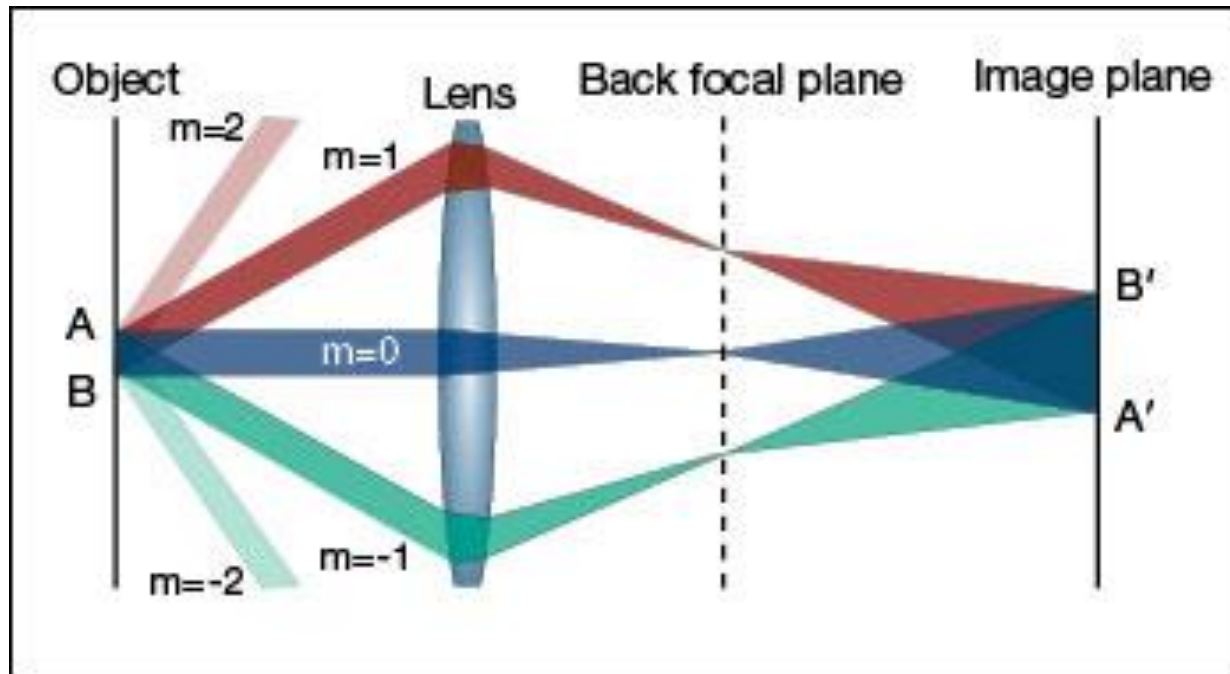
OPTICKÁ SOUSTAVA MIKROSKOPU

- Jednoduchý mikroskop je složen ze dvou spojných soustav čoček, které mají společnou optickou osu.
- Část mikroskopu, která je nazývána **objektiv**, má malou ohniskovou vzdálenost (řádově v milimetrech).
- Pozorovaný předmět se umísťuje blízko předmětové ohnisko, takže vzniká skutečný, zvětšený a převrácený obraz.
- Tento obraz vzniká mezi druhou částí mikroskopu, tzv. **okulárem**, a jeho předmětovým ohniskem.
- Vzniklý obraz pak pozorujeme okulárem podobně jako lupou, čímž získáváme další zvětšení.
- Ohnisková vzdálenost okuláru se pohybuje v řádech centimetrů.
- Obrazové ohnisko objektivu a předmětové ohnisko okuláru nesplývají, ale jsou od sebe vzdáleny o hodnotu optického intervalu, jehož hodnota se u mikroskopu pohybuje mezi 15 cm a 20 cm



ABBÉHO TEORIE MIKROSKOPU

- Abbe stated that to form a good microscopical image as many of the diffracted rays as possible should be intercepted by the objective.
- With closely ruled lines, his theory is easily demonstrated by observing the back lens of the objective, for here the diffracted rays can be observed directly if the aperture diaphragm is closed.
- It can be shown that, when the illumination is arranged to exclude the diffracted images, resolution is lost.



MEZ ROZLIŠENÍ MIKROSKOPU

- Je taková vzdálenost dvou bodů objektu, kdy je ještě rozlišíme, tzn. nesplynou v bod jeden.
- Mez rozlišení ovlivňují: Ohyb a interference světla, Numerická apertura, Kondenzor, Vady čoček

Abbeho kritérium rozlišitelnosti

- Pro vznik rozlišeného sekundárního (skutečného) obrazu optické mřížky musí primární obraz obsahovat nejen maximum nultého řádu, ale navíc alespoň maximum prvního řádu.
- Obraz vzniká superpozicí svazků různých ohybových maxim – tzn. obraz je tím kvalitnější, čím větší množství ohybových maxim se jeho vzniku účastní.
- Pokud jsou dva objekty tak blízko sebe, že jejich rozptylové kroužky se zčásti překrývají, nebudou rozlišeny a budou zobrazeny jako jeden.

NUMERICKÁ APERTURA (NA)

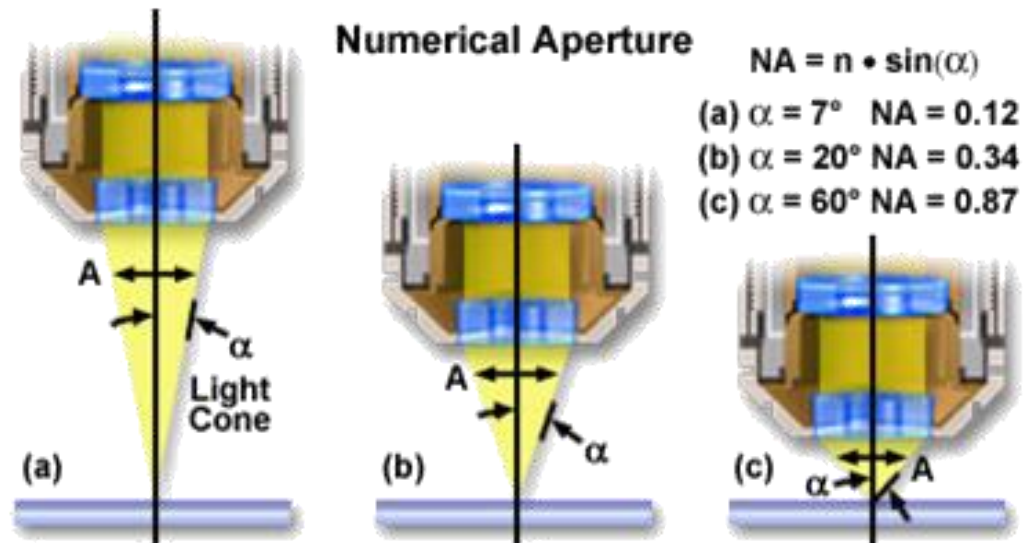
- Vyjadřuje v mikroskopii účinnou světelnost objektivu.
- Jedná se o bezrozměrné číslo, které je číselným měřítkem pro schopnost mikroskopické optiky zachycovat informace, obsažené v pozorovaném objektu.
- Platí, že lepší kvalitu má ten objektiv (při totožném zvětšení), který má vyšší numerickou aperturu.
- Numerická apertura je proto nejvýznamnějším hlediskem pro srovnávání jakosti objektivů a cílem výrobců je mikroskop s co největší numerickou aperturou.

$$NA = n \cdot \sin \alpha$$

n is the index of refraction of the medium in which the lens is working

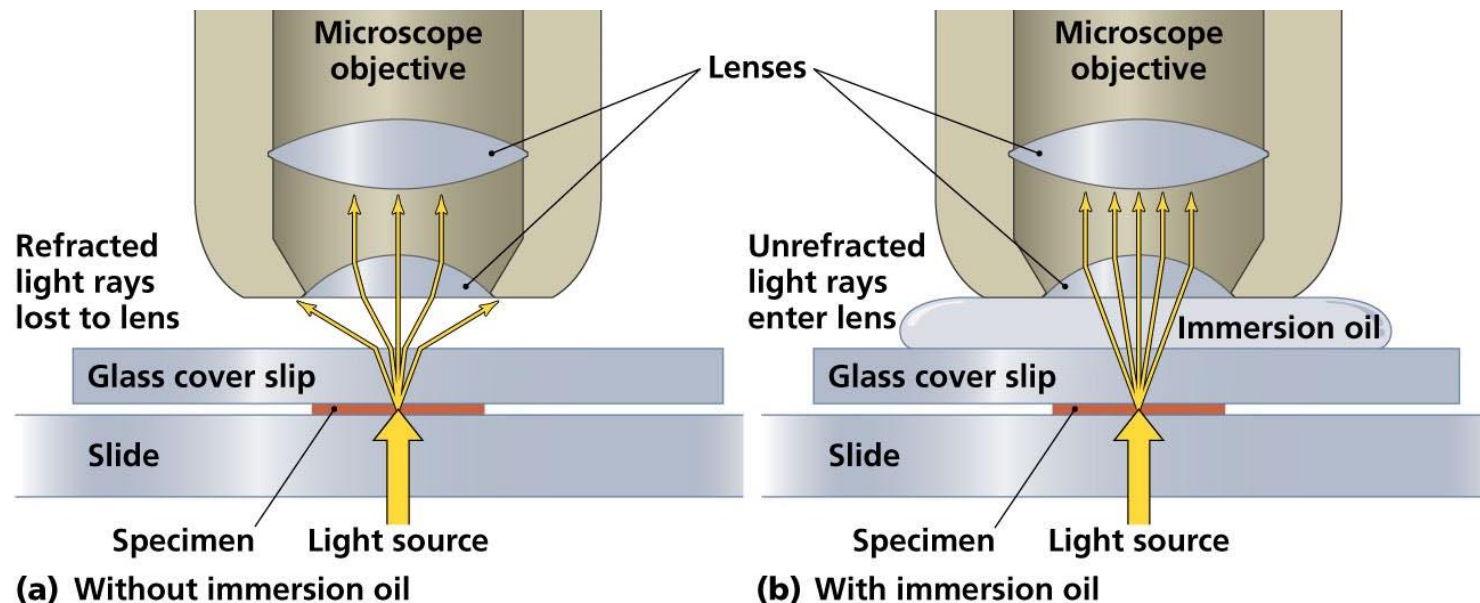
(1.0 for air, 1.33 for pure water, and up to 1.56 for oils)

α is the half-angle of the maximum cone of light that can enter or exit the lens.

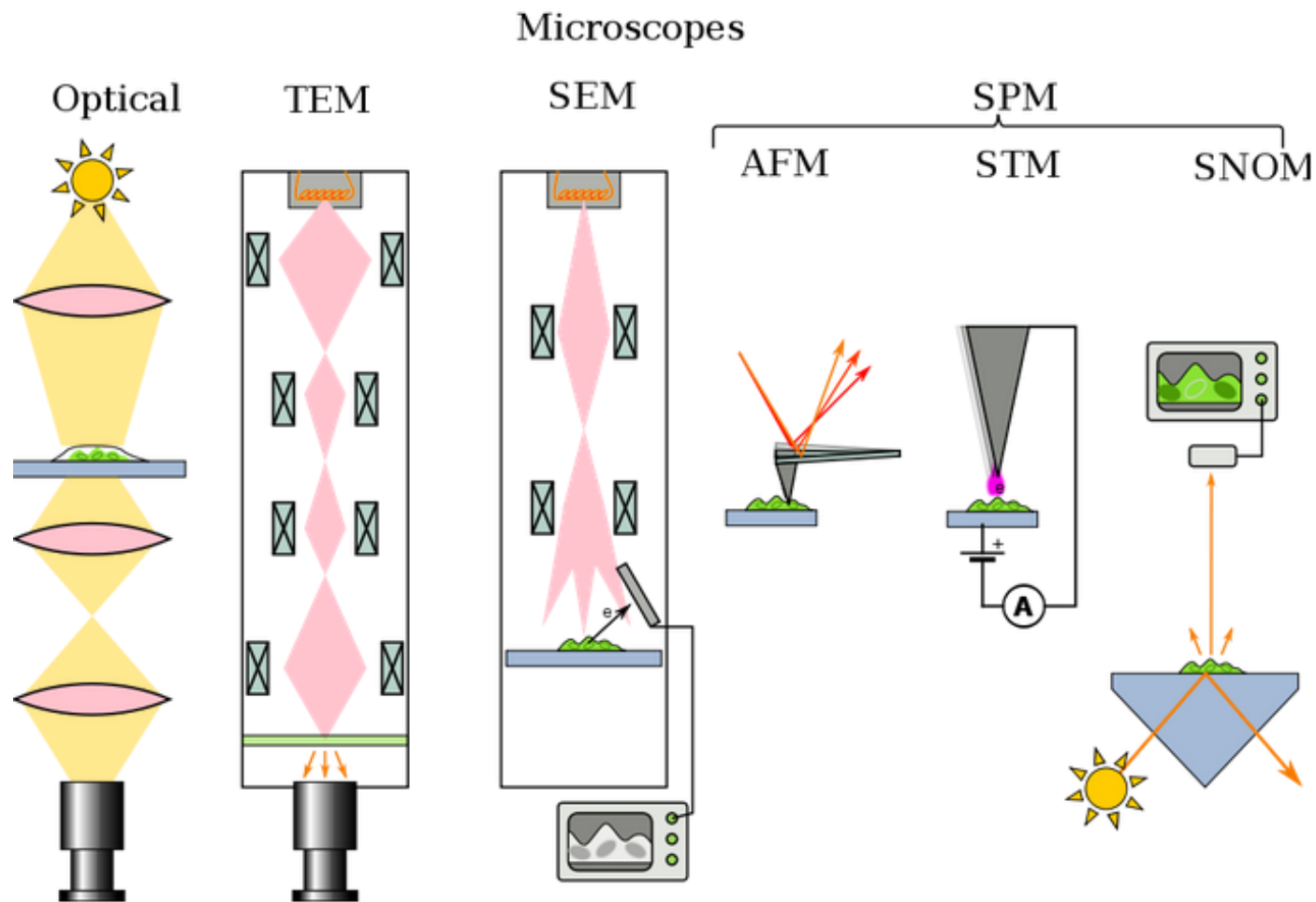


IMERZNÍ MIKROSKOPIE

- Imerze je v optické mikroskopii technika, kterou se zvětšuje účinná numerická apertura objektivu tím, že se na krycí sklíčko preparátu kápne imerzní tekutina a objektiv se do ní ponoří.
- Zároveň se tím omezí rušivé odrazy na krycím sklíčku i na povrchu objektivu, takže se zvýší i kontrast zobrazení.
- Imerzní tekutina je tekutina s indexem lomu (n) větším než 1.
- Tato tekutina může být olej (např. cedrový olej $n = 1,515$), voda či glycerin.



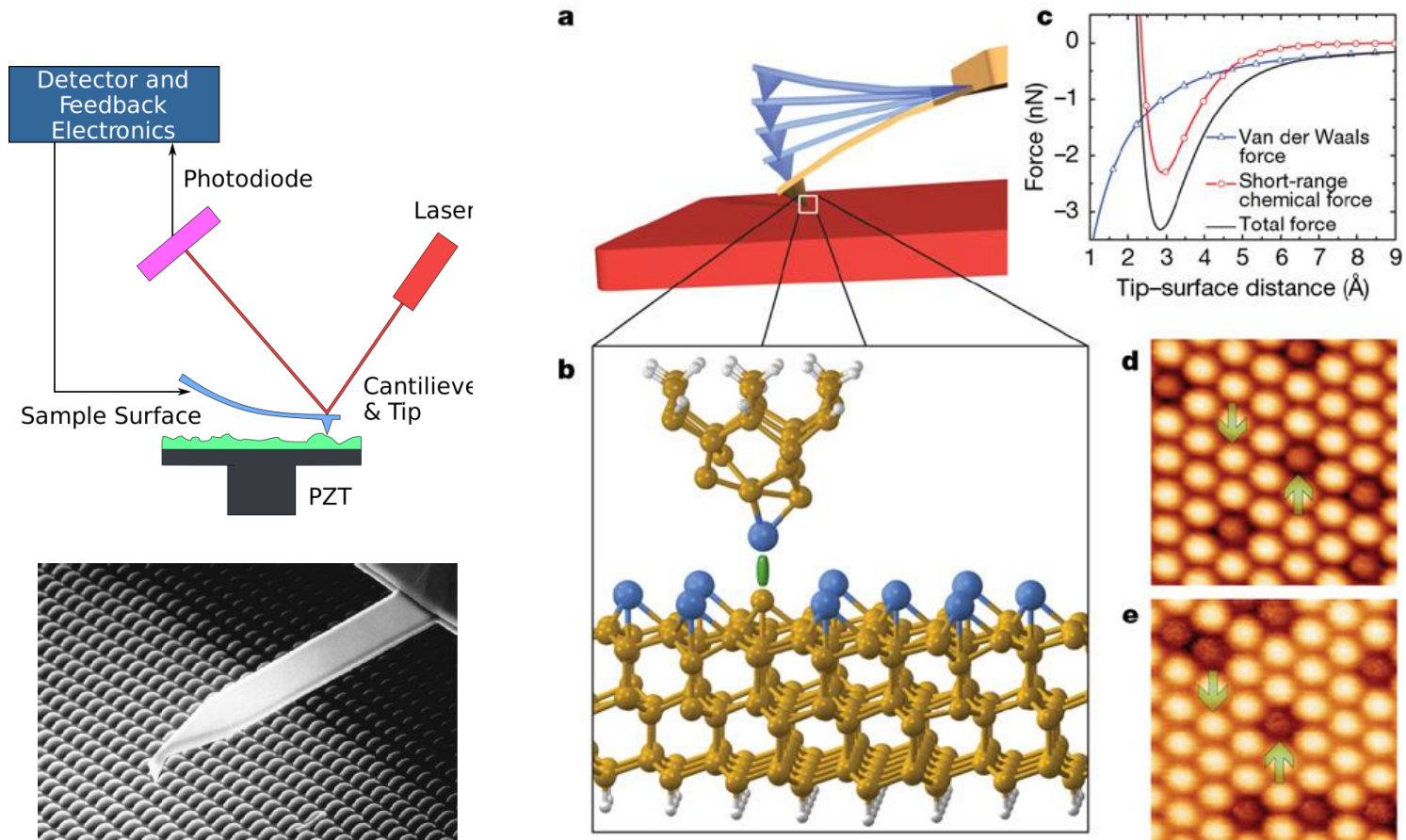
DRUHY MIKROSKOPŮ



TEM (Transmission electron microscope); **SEM** (Scanning electron microscope)
SPM (Scanning probe microscope); **AFM** (Atomic force microscope);
STM (Scanning tunneling microscope); **SNOM** (Scanning Near-Field Optical Microscopy)

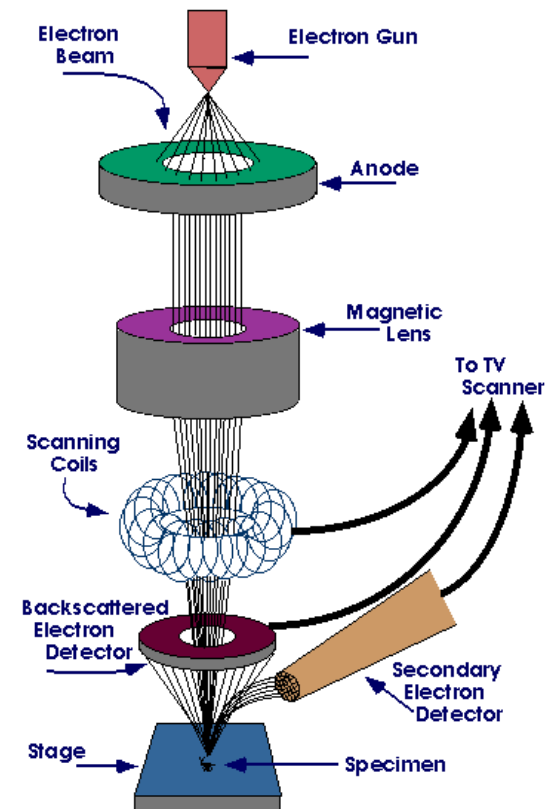
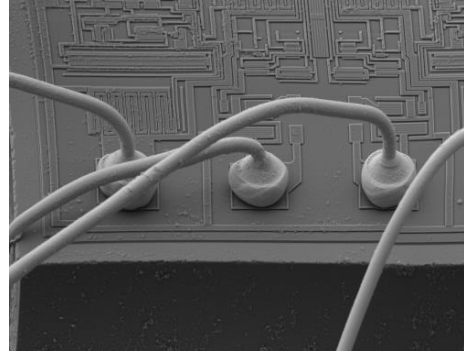
MIKROSKOP ATOMÁRNÍCH SIL (AFM)

- K detekci slouží vzájemná meziatomová přitažlivost.
- Detekuje se pohyb zkoumacího hrotu při průchodu nad vzorkem.
- Umí zobrazovat i nevodivé vzorky.
- Základem AFM je velmi ostrý hrot, který je upevněn na ohebném nosníku



ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP

- Fotony jsou nahrazeny elektrony a skleněné čočky EM čočkami.
- Elektrony mají podstatně kratší vlnovou délku než má viditelné světlo, má elektronový mikroskop mnohem vyšší rozlišovací schopnost a může tak dosáhnout mnohem vyššího efektivního zvětšení (až 1 000 000×) než světelný mikroskop.
- **Transmisní elektronový mikroskop (TEM)**
zobrazení vnitřní struktury vzorku pomocí prošlých elektronů.
- **Rastrovací elektronový mikroskop (SEM)**
zobrazení povrchu vzorku nejčastěji pomocí sekundárních elektronů (SE)



KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP

- Druh optického mikroskopu, jehož výhodou je vyšší rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu.
- **Rastrující konfokální mikroskop** - skenující zařízení zařizuje posun ohniska excitujícího laserového paprsku
- **Konfokální mikroskop s rotujícím diskem** - místo skenujícího zařízení obsahuje rotující Nipkowův kotouč, na kterém je mnoho navzájem oddělených clonek (*Původci z LFP UK – prof. Petrůň & doc. Hadravský*)

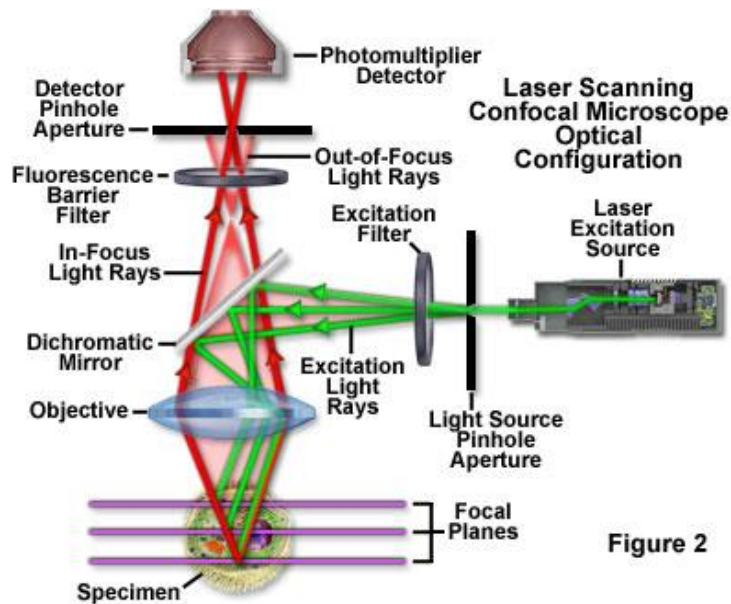


Figure 2

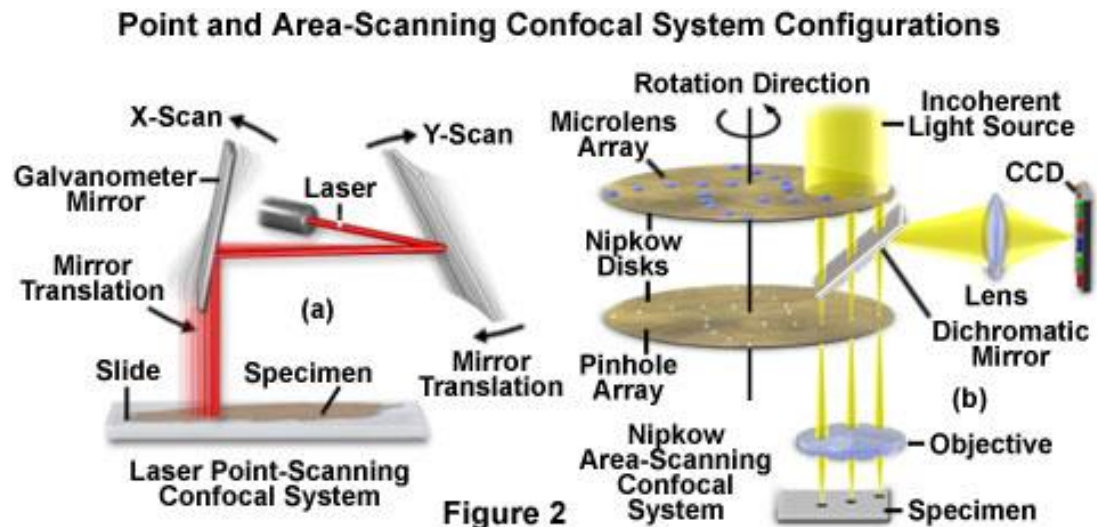
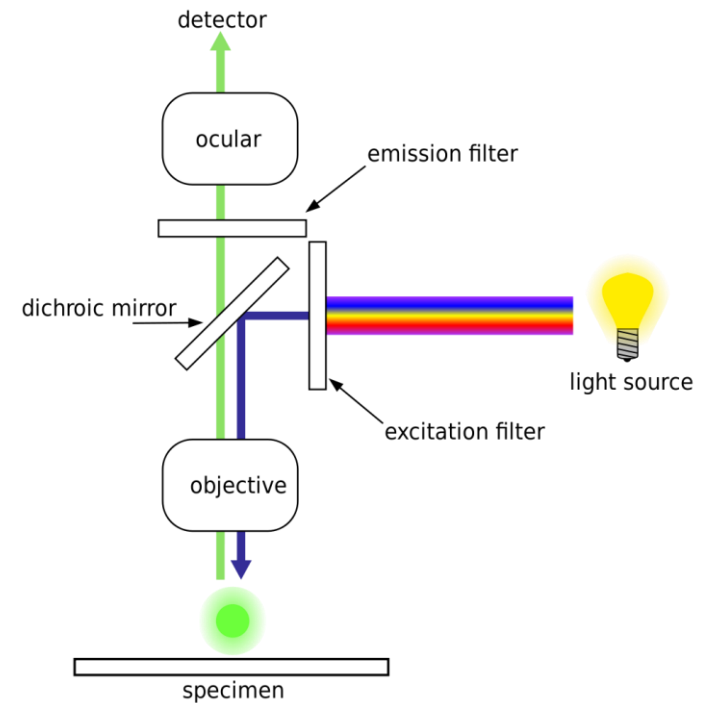
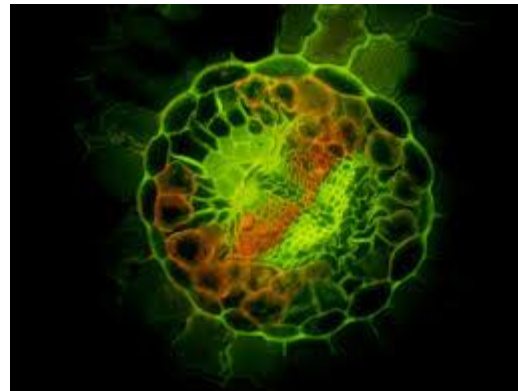
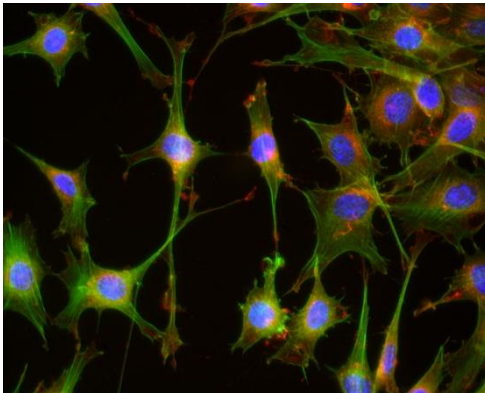
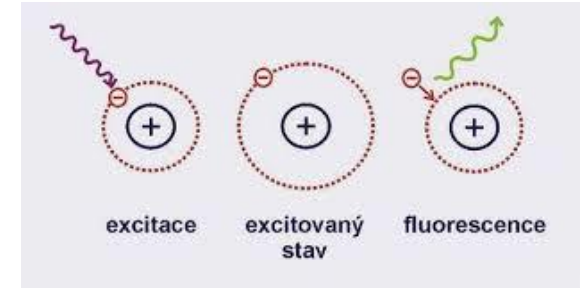


Figure 2

FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

- Světelný mikroskop umožňující detekci a pozorování fluoreskujících látek ve vzorku.
- Fluorescence vzniká ozářením vzorku zářením o patřičné vlnové délce, což vede k vybuzení molekul fluorescenční látky (fluoroforu) a k následnému návratu na původní energetickou hladinu za současného vyzáření fotonů světla.
- Fluorescenční mikroskopie je v současnosti jednou ze základních metod zkoumání mikrosvěta v experimentální biologii.

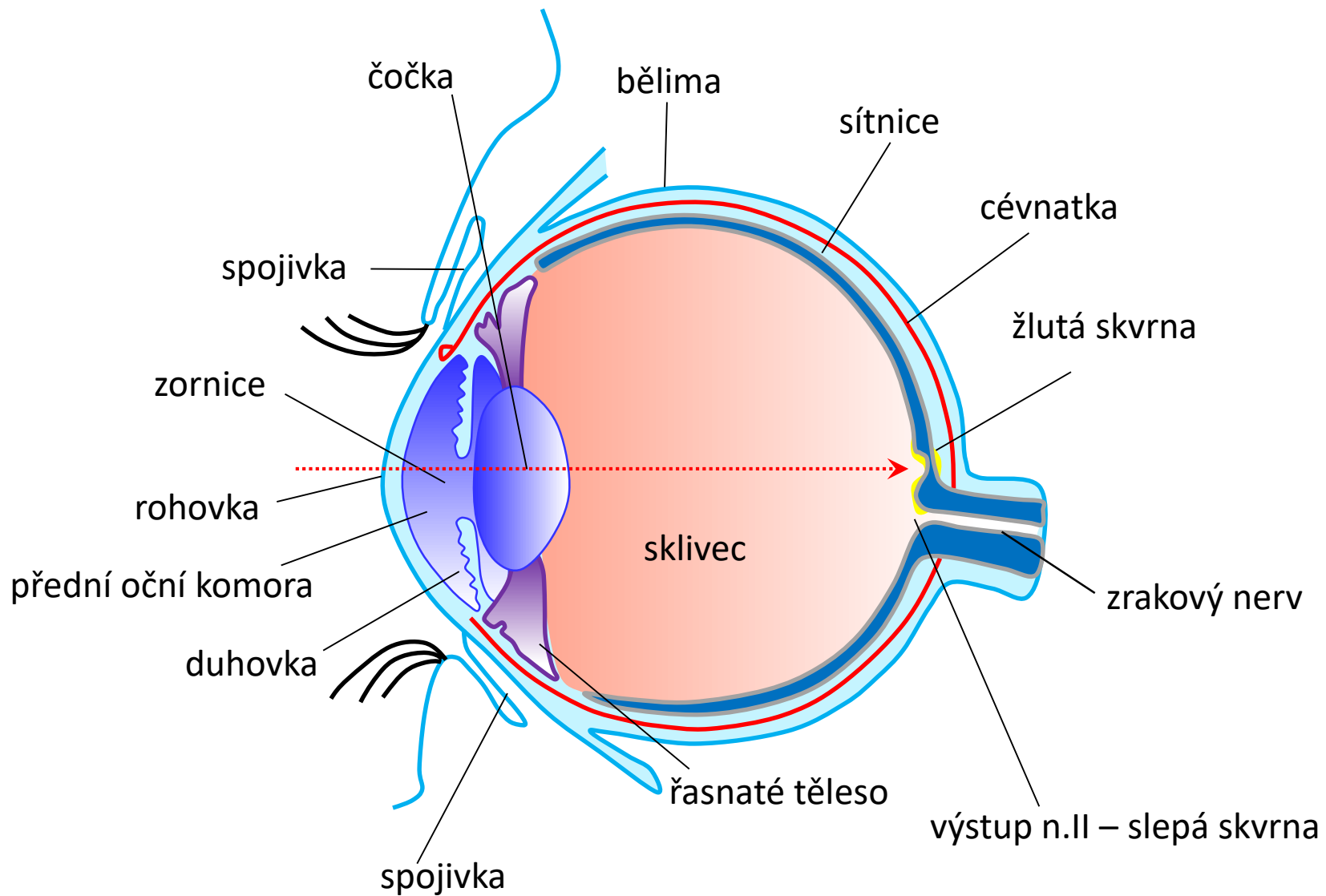


Oční optika

ZRAK A LIDSKÉ OKO

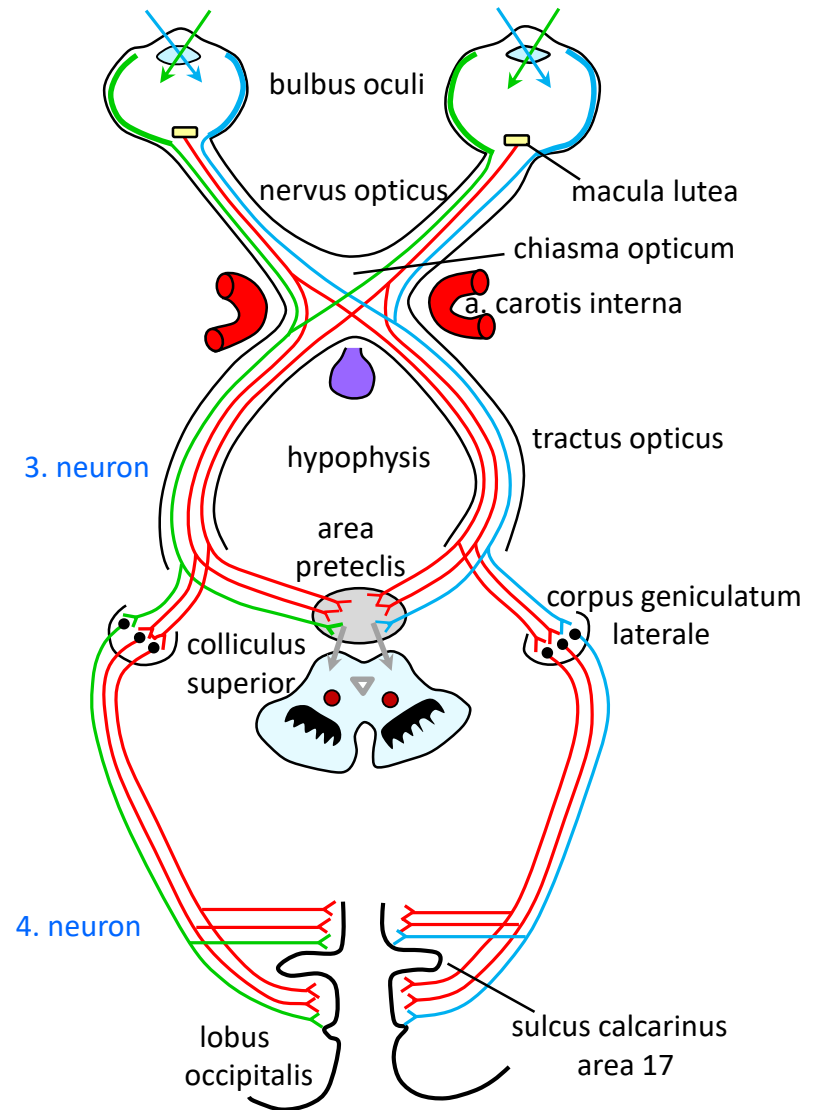
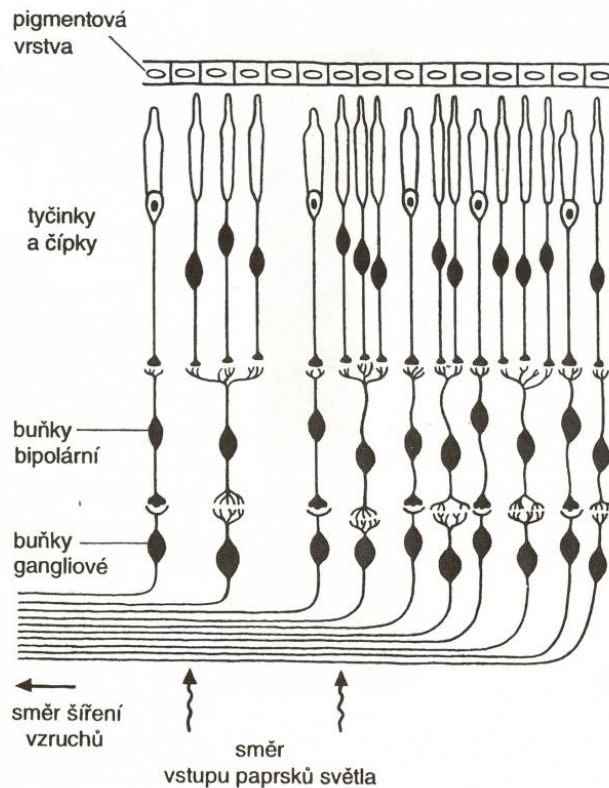
- Zrak je smysl, který umožňuje živočichům vnímat světlo, různé barvy, tvary.
- Pro člověka je to smysl nejdůležitější, asi 80 % všech informací vnímáme zrakiem.
- Zrak je zaměřen především na vnímání kontrastu, proto dovoluje vidění kontur předmětů, jejich vzdálenost a významně se podílí na orientaci v prostoru.
- Vnímání elektromagnetické světelného záření o vlnové délce 400-760 nm (viditelné světlo) → rozsah určen citlivostí fotoreceptorů sítnice
- Převod informace ve formě fotonů viditelného světla na bioelektrické podněty
- Vlastní světločivná vrstva oka, sítnice, obsahuje fotoreceptory, vysoce specializované světločivé buňky, tyčinky a čípky.
- Vnímání barev zajišťují čípky.

ANATOMIE OKA



ZRAKOVÁ DRÁHA

- Zraková dráha je multisynaptická, 4 neuronová a částečně zkřížená
- Hlavní funkcí zrakové dráhy je převod obrazu zachyceného světločivnými buňkami na elektrický signál

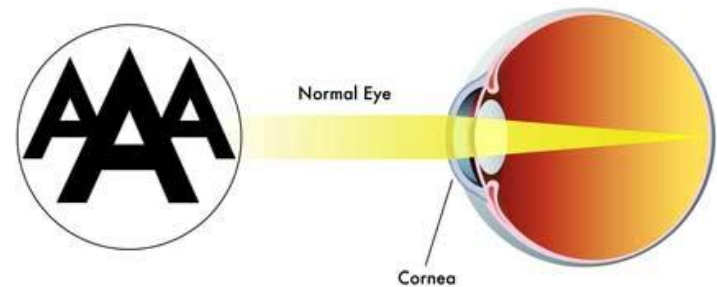
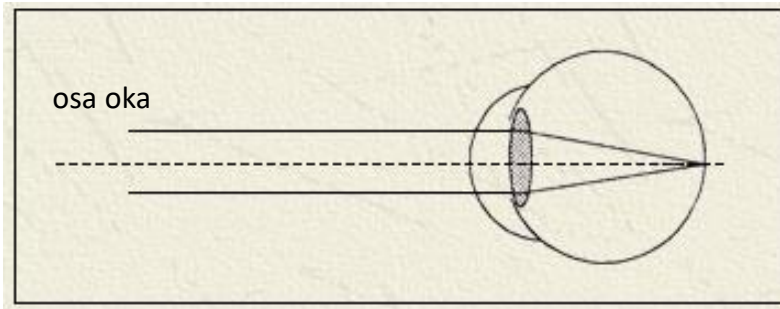


AKOMODACE

- Akomodace je proces, který zvětšuje zakřivení čočky a pomáhá k zaostření blízkých předmětů na sítnici oka.
- **BLÍZKÝ BOD (= punctum proximum)**
 - bod ležící nejbližší oku, který lze při maximální akomodaci vidět ostře, u dětí několik cm od oka, s věkem se vzdaluje od oka
- **DALEKÝ BOD (= punctum remotum)**
 - nejvzdálenější bod od oka, který lze ještě vidět ostře bez akomodace, leží ve vzdálenosti více než 6 m od oka
- **Akomodační šíře (AŠ)**
 - rozdíl optické mohutnosti neakomodované a plně akomodované čočky, tedy rozdíl hodnot vzdáleností blízkého (PP = punctum proximum) a vzdáleného bodu (PR = punctum remotum)
 - jednotkou je dioptrie (D)
 - vliv věku → s věkem se zmenšuje (po 40.-50. roce života se rovná 0 – oko přestane akomodovat)

ZDRAVÉ (EMETROPICKÉ) OKO A OČNÍ VADY

- U zdravého oka se paprsky rovnoběžné s osou oka protínají v ohnisku na sítnici, aniž by docházelo k akomodaci.

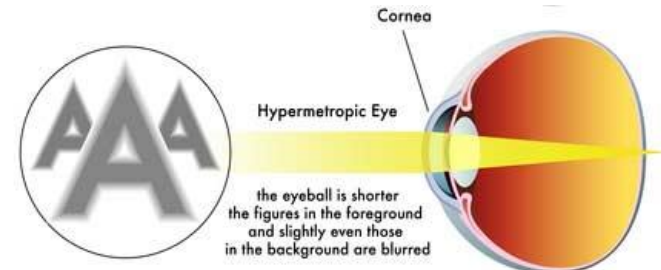
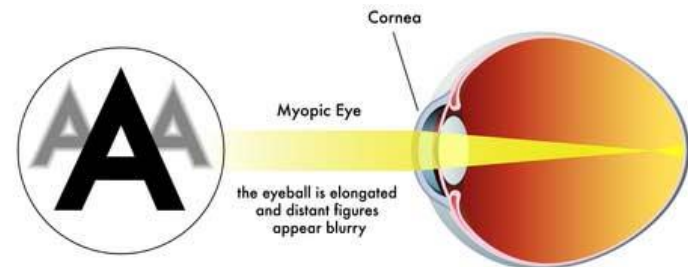


- Nerovnováha mezi délkou bulbu a optickou mohutností oka:

- Krátkozrakost
- Dalekozrakost

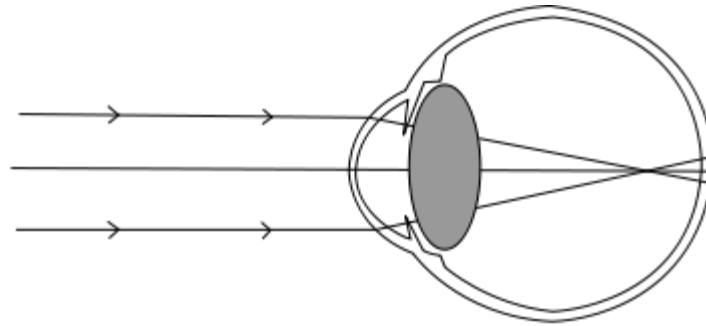
- Jiné příčiny:

- stařecké vidění, vetchozrakost
- astigmatismus

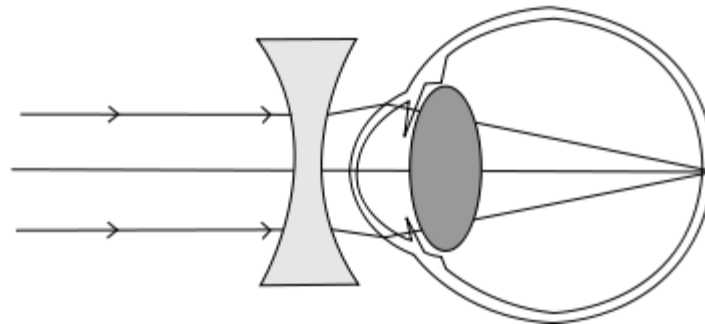


KRÁTKOZRAKOST (MYOPIE)

- Příliš dlouhý bulbus nebo velká lomivost optické soustavy
- Rovnoběžné paprsky ze vzdáleného objektu se protínají v ohniskové rovině před sítnicí → obraz na retině je proto rozostřen

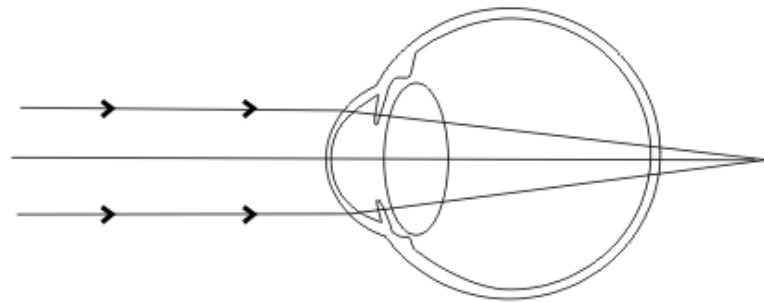


- Pro vznik ostrého obrazu musí být paprsky dopadající do oka nikoli rovnoběžné, ale rozbíhavé (divergentní) → **korekce rozptylkami** (paprsky poté dopadají na sítnici)

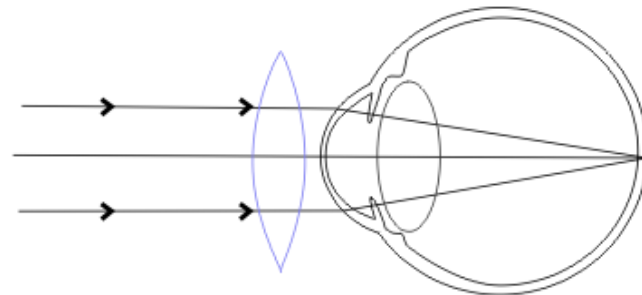


DALEKOZRAKOST (HYPERMETROPIE)

- Příliš krátký bulbus nebo malá lomivost optické soustavy
- Rovnoběžné paprsky ze vzdáleného objektu se bez akomodačního úsilí protínají v ohniskové rovině, která leží teoreticky za sítnicí → obraz na retině je proto rozostřen

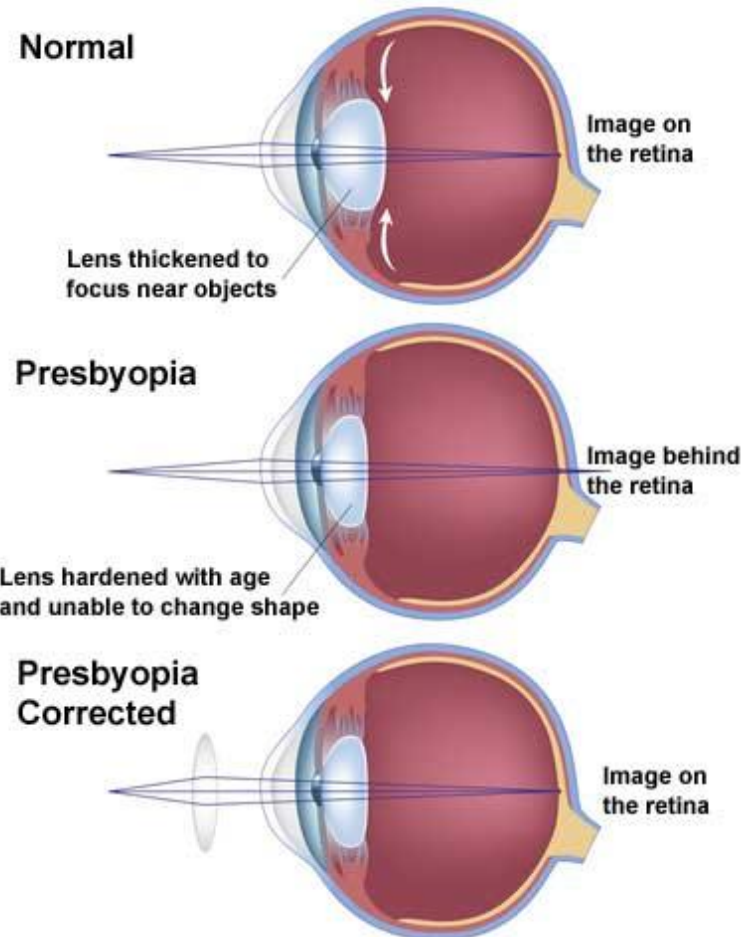
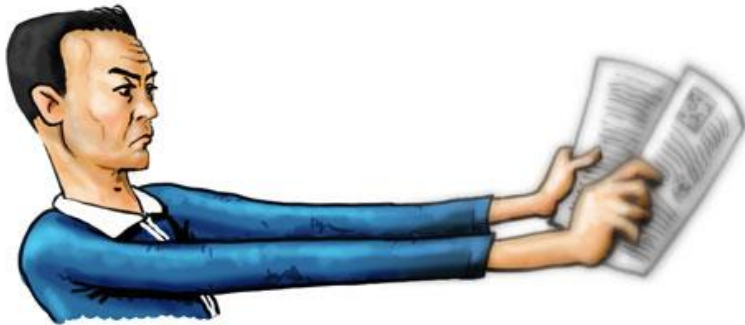


- Pro vznik ostrého obrazu musí být paprsky dopadající do oka nikoli rovnoběžné, ale sbíhavé (konvergentní) → **korekce pomocí čočky** s takovou optickou mohutností, aby blízké předměty byly viděny ostře bez akomodačního úsilí

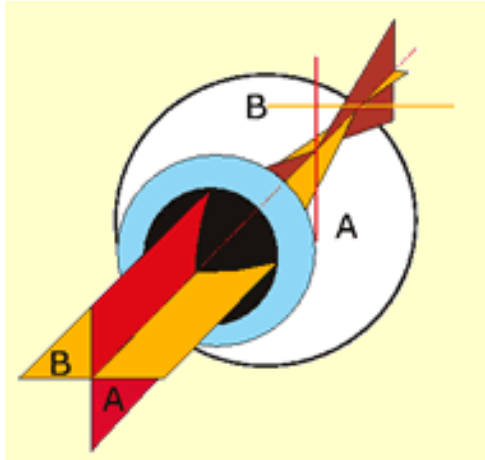


VETCHOZRÁKOST (PRESBYOPIE)

- ztráta akomodační schopnosti (optické pružnosti) čočky související se stářím → první příznaky se objevují po 40. roce života
- korekce spojkami

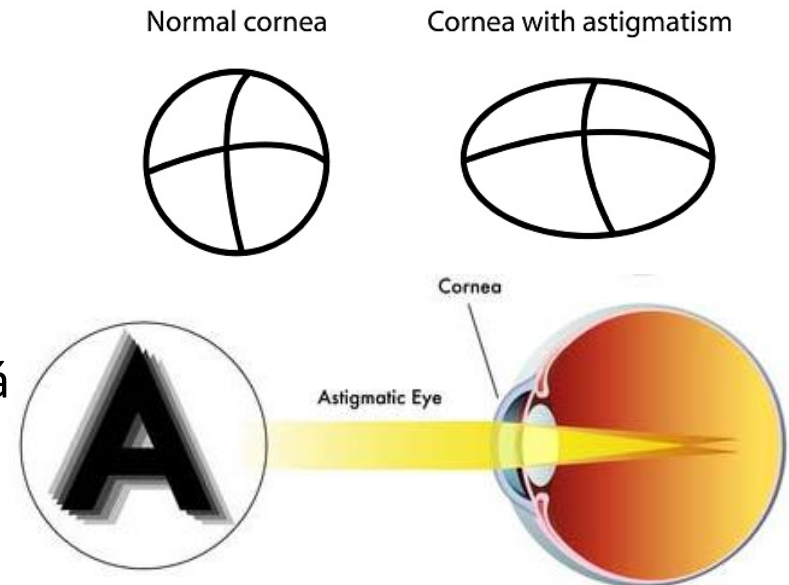


ASTIGMATISMUS



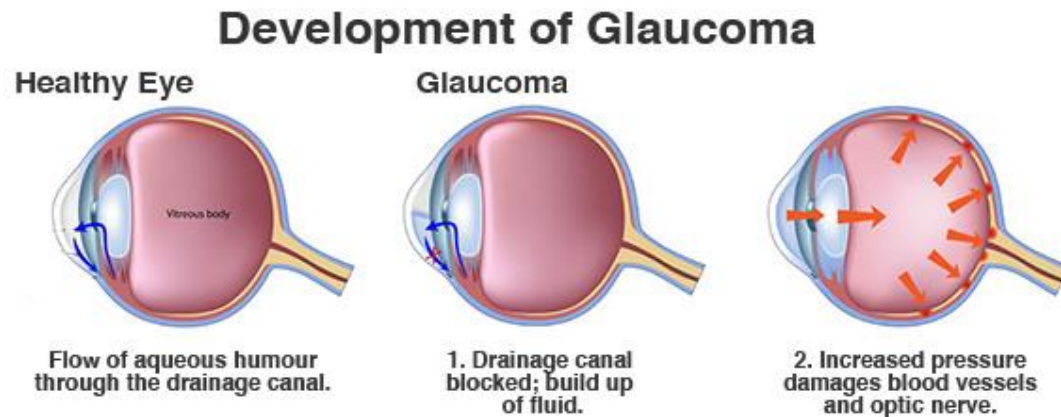
- Oko nemá ve všech poledníkových rovinách stejnou optickou mohutnost → nerovnoměrné zakřivení rohovky
- Rohovka je v 1 rovině více zakřivena (A vertikála) než ve druhé (B horizontála) → různá optická mohutnost jednotlivých rovin → tím jsou rovnoběžné paprsky dopadající do oka lámány do různých ohnisek

- Fyziologický astigmatismus
 - lomivost rohovky ve vertikále je až o 0,5D větší než v horizontále
 - nekoriguje se
- astigmatismus větší než 1D
 - korekce cylindrickými čočkami (čočka, která láme paprsky v 1 rovině)
- příčina: vrozené, po úrazech, operacích, zánětech



GLAUKOM – ZELENÝ ZÁKAL

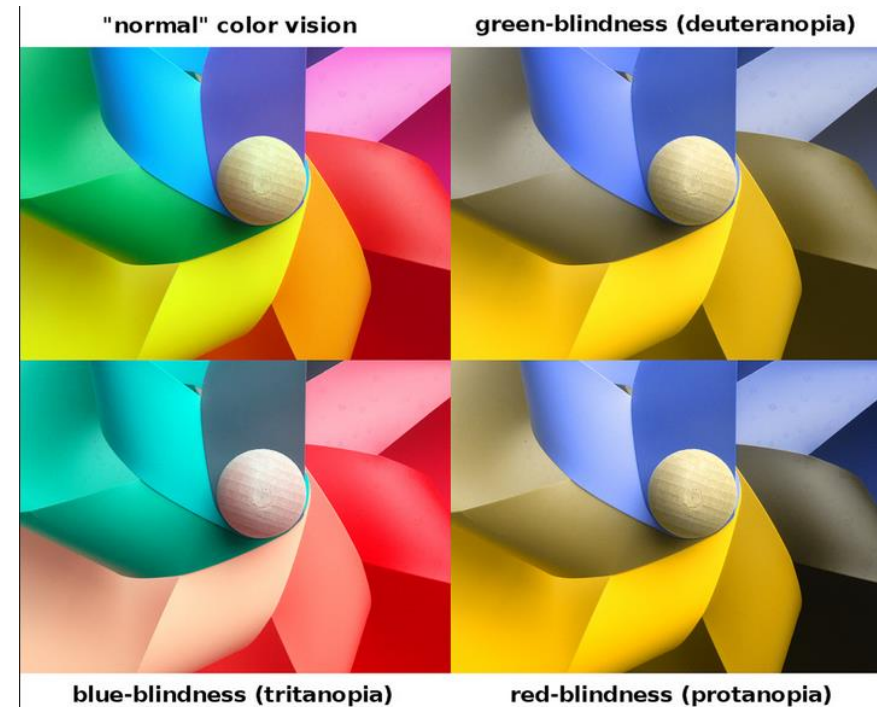
- Glaukom je skupina klinicky odlišných onemocnění různé etiologie, která způsobují neuropatii zrkového nervu a vedou k ireverzibilnímu poškození zrakových funkcí.
- Je to onemocnění multifaktoriální, pro jehož rozvoj je důležitým rizikovým faktorem zvýšený nitrooční tlak.



- **Diagnostika:** zobrazení zrkového nervu 3D přístrojem HRT3; spektrální OCT - vyšetření vrstvy nervových vláken a komplexu gangliových buněk v oblasti makuly
- **Terapie:** Farmakologická nebo Iridotomie (odstranění části duhovky)-laserová nebo chirurgická

PORUCHY BARVOCITU

- Daltonismus = porucha barevného vnímání
- Celkem v populaci trpí daltonismem 9 % mužů a 0,4 % žen
- Podle závažnosti se dělí na:
 - úplnou barvoslepost: člověk vnímá pouze odstíny šedi
 - částečnou barvoslepost: porucha vnímání jen některé z barev (částečná nebo úplná)
- Trichromat – normální vidění
- Anomálie - porušené vnímání
- Anopie - úplná ztráta vnímání:
 - **červené barvy – protanopie**
 - **zelené barvy – deuteranopie**
 - **modré barvy - tritanopie**



PORUCHY BARVOCITU



Normal



Deuteranop



Protanop



Tritanop

NORMAL VISION



GREEN



YELLOW



RED

COLORBLIND EXAMPLE



GREEN



YELLOW



RED

Vyšetřovací metody v očním lékařství

ANAMNÉZA A ZÁKLADNÍ VYŠETŘENÍ

- **Osobní:** prodělaná oční onemocnění, úrazy, používání korekčních pomůcek (brýle, čočky, lupa) ..
- **Rodinná:** výskyt šedého a zeleného zákalu, vrozené vývojové vady, šilhání, refrakční vady ..
- **Nynější onemocnění:** bolest, poruchy vidění, červené oko ..

Základní vyšetření

- **Fyzikální vyšetření:** pohled!!
- **Fotoreakce:** reakce zornice na světlo, lékař nasvítí oko baterkou (zdravé oko –mióza)
- **Konvergence:** zkouška sbíhavosti oka, z 1m přibližuje lékař prst do 10cm k oku N (zdravé oko –mióza)
- **Zakrývací test (Cover test):** slouží k posouzení vzájemného postavení očí při diagnostice šilhání

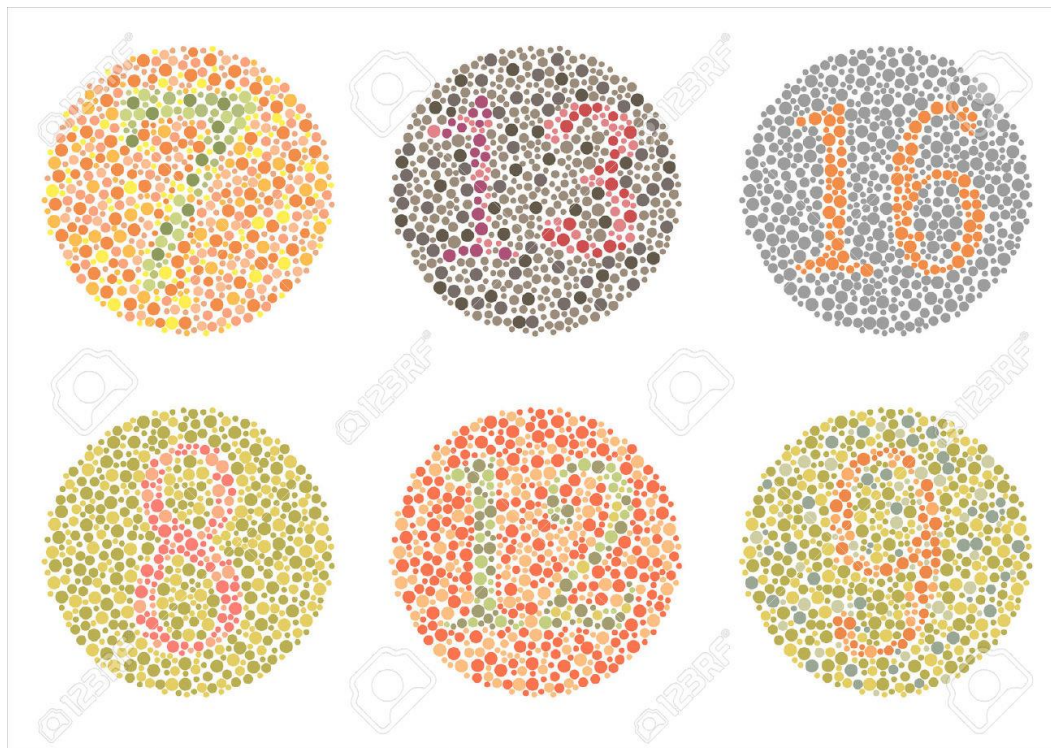
VYŠETŘENÍ ZRAKOVÉ OSTROSTI

- **Zraková ostrost (visus)** = schopnost oka rozeznávat kontrastní detail
- vyšetřuje se čtením písmen (textu) od větších postupně k malým
 - nejdříve oko pravé, pak levé, nakonec obě
 - při vyšetření jednoho oka je druhé oko zakryté
 - hodnotí se visus do dálky a do blízka
- **Diagnostika krátkozrakosti**
- optotypy → tabulky s obrazci čtené ze vzdálenosti 3 nebo 5 metrů
 - s písmeny (Snellenovy optotypy), s čísly, vzorci, pro děti s obrázky, s prosvícením nebo bez;
 - zápis zrakové ostrosti se udává ve zlomku
- čitatel udává vzdálenost vyšetřovaného, ze které optotyp čte
- jmenovatel udává číslo přečteného řádku na optotypu
 - *příklad: $5/8$ = z 5 metrů přečten řádek čitelný u zdravého oka z 8 metrů*

VISUS	
E C	$\frac{6}{36} = 0,17$
B T Z	$\frac{6}{24} = 0,25$
F C L B O	$\frac{6}{18} = 0,33$
T O E B H F C	$\frac{6}{12} = 0,5$
Z E B H C L F O B	$\frac{6}{9} = 0,67$
C B F Z E T F B O C Z E	$\frac{6}{6} = 1$
E Z C O B F C H E L B Z	$\frac{6}{5} = 1,2$

VYŠETŘENÍ BARVOCITU

- zhodnocení defektů vnímání barev
- zdravé oko vnímá 3 barvy – červenou, zelenou, modrou
- Stilingovy pseudochromatické tabulky
- **Ishiharovy barevné testy**
 - body různých barev a jasu vytvářející obrazce
 - barvoslepé oko není schopné rozeznat obrazec od pozadí



ŠTĚRBINOVÁ LAMPA

- Speciální mikroskop pro vyšetření přední části oka
- Příklad složen z několika částí: křeslo pro P, rám s okuláry a pro opření hlavy P, stolek s nástroji + přídatná zařízení (např. aplanační tonometr)
- Po zapnutí světelného zdroje a pomocí zúženého paprsku mířícího přímo do oka lékař prohlédne binokulárním mikroskopem celý přední segment oka
- Lze měnit průřez a intenzitu světelného paprsku
- **vyšetřuje:**
 - usazení čočky,
 - její pohyb na rohovce,
 - usazeniny na čočce,
 - onemocnění spojivky, rohovky, zornice, slzných kanálků



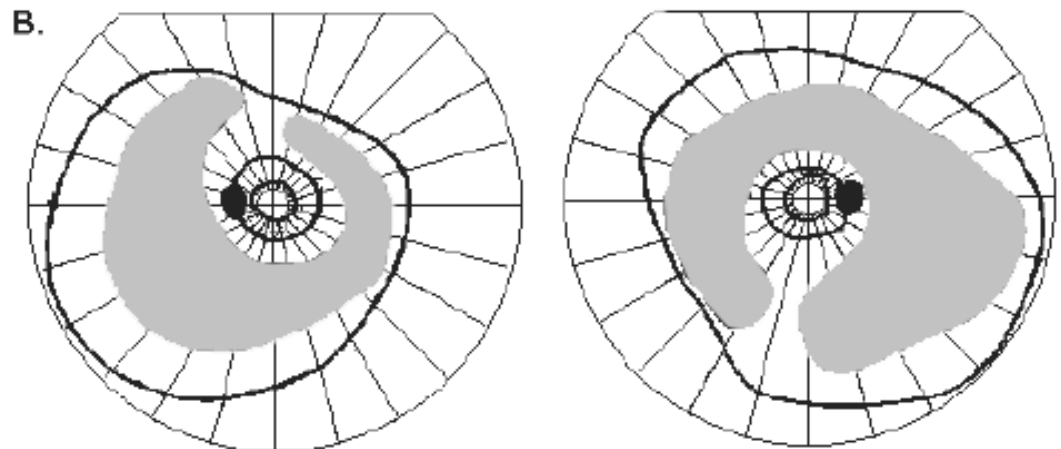
OFTALMOSKOPIE

- Vyšetření očního pozadí
- **Oftalmoskop**: přístroj k vyšetření vnitřních struktur oka
- Světelný paprsek proniká do oka a umožňuje jej prohlédnout
- Lze sledovat změny na cévách očního pozadí
- Vyšetření cévnatky, sítnice, výstupu zrakového nervu
- Provádí se přímou či nepřímou metodou
- **Přímá oftalmoskopie:**
 - oční pozadí P sledujeme přímo zorničkou ze vzdálenosti 5 až 7 cm před okem vyšetřovaného
 - zvětšení 14x-16x
 - vidíme neobrácený obraz očního pozadí
 - vyšetření monokulární
 - lze nastavit dioptrie vyšetřovaného



PERIMETRIE

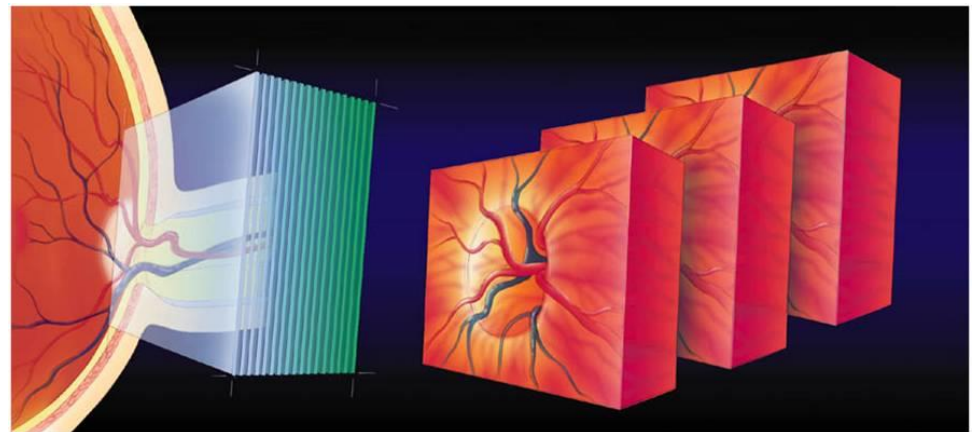
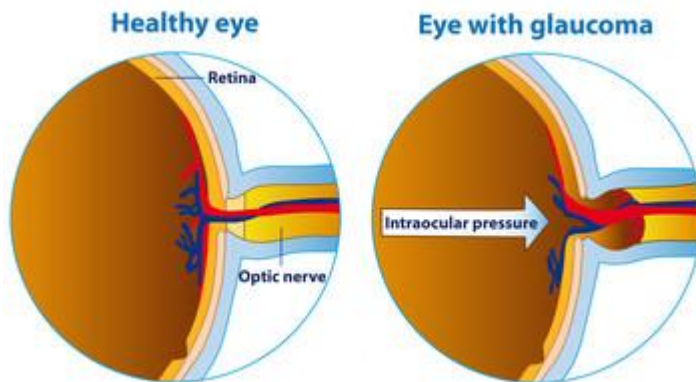
- Vyšetření rozsahu zorného pole a jeho event. výpadků (skokomů)
- Zjišťuje schopnost oka rozlišit dva podněty v zorném poli
- Podněty jsou světelná značka a její pozadí
- **Typy perimetrie:**
 - **kinetická** -jednodušší, méně přesné vyšetření
 - **statická** -počítačové zpracování
- Obě vyšetření jsou na principu fixace oka na centrální bod za současného periferního sledování promítaných světelných značek –různé barevnosti a intenzity



- Vyšetření nitroočního tlaku (NOT) = výsledek poměru mezi tvorbou a odtokem nitrooční tekutiny a je důležité pro diagnostiku glaukomu
- Fyziologické je mírné kolísání nitroočního tlaku s maximem ráno a minimem v noci; norma NOT je 10-20 mmHg
- Zjišťuje se odpor oka než dojde ke stlačení (aplanaci) oční koule
- Typy tonometrie závislé na druhu přístroje:
 - **Kontaktní tonometr:**
 - Aplanační Goldmannův tonometr → měří sílu potřebnou k zploštění (aplanaci) centra rohovky tělískem o průměru 3 mm
 - Schiötzův impresní tonometr → měří impresi na rohovce po zatížení definovanou hmotností
 - **Bezkontaktní tonometr** – pro P neinvazivní vyšetření
 - využívá přesně dávkovaného vzduchu vrženého na rohovku -odrážený vzduch, jehož množství závisí na tvrdosti bulby, se přesně změří

HRT (HEIDELBERG RETINA TOMOGRAPH)

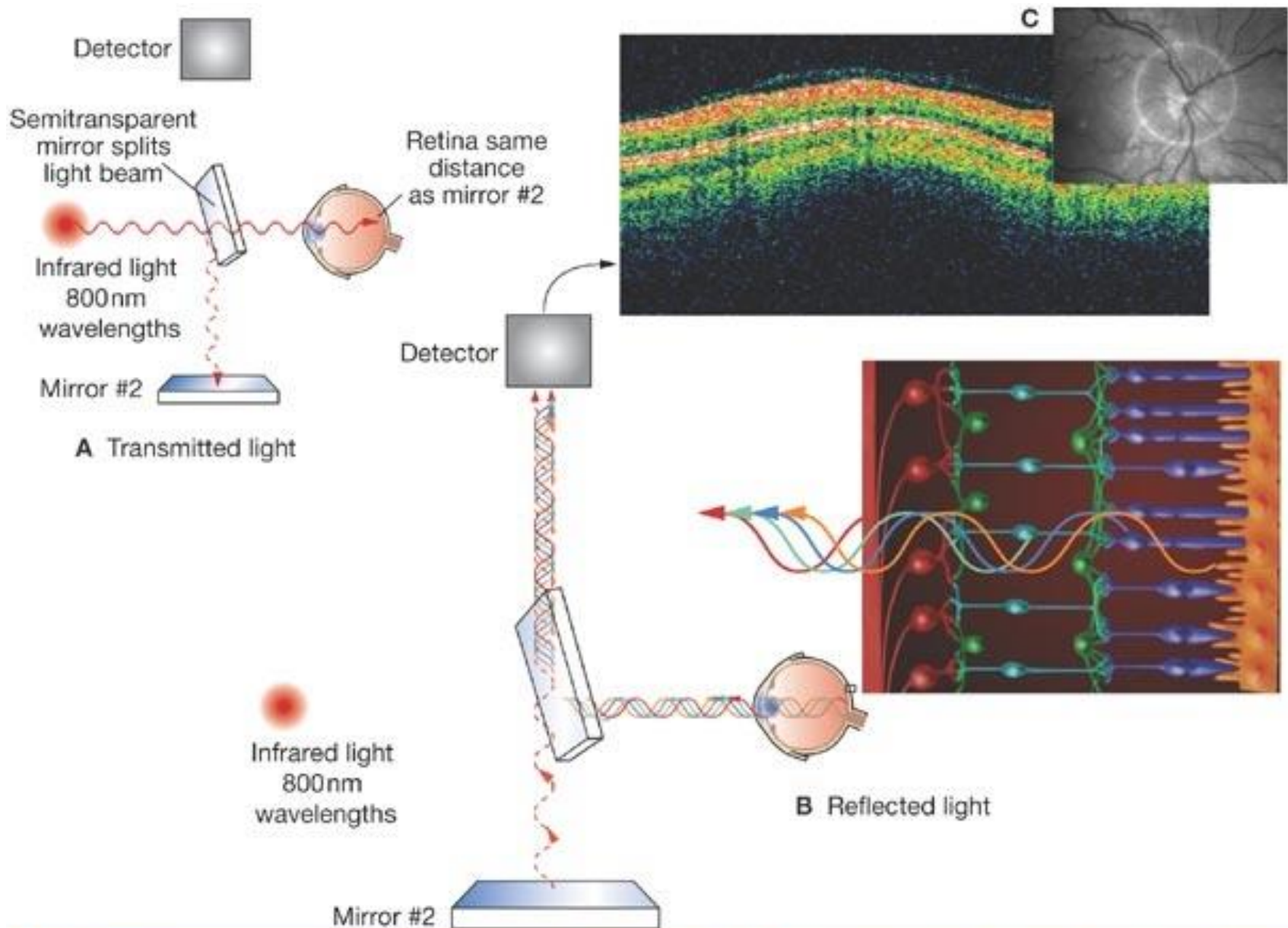
- HRT jedním z nejúčinnějších nástrojů preventivní kontroly onemocnění velmi nebezpečného **zeleného zákalu** - Glaukomu.
- Jedná se o laserový skenovací systém poskytující kvantitativní popis topografie terče zrakového nervu a posouzení jeho změn v čase.
- Zjišťuje přítomnost glaukomových změn a umožňuje sledování jejich případného nárůstu.
- Vyšší pravděpodobnost rozvoje glaukomového onemocnění mají lidé s vysokou krátkozrakostí, kolísavým krevním tlakem, lidé trpící migrénami či studenými končetinami, také pacienti s cukrovkou.



OCT (OPTICKÁ KOHERENTNÍ TOMOGRAFIE)

- Neinvazivní, nekontaktní, transpupilární zobrazovací diagnostická metoda, která umožňuje provést a znázornit řezy sítnicí s vysokou rozlišovací schopností.
- Používá se především při poruchách sítnice, diagnostice makulárních chorob, tedy u pacientů s cukrovkou, vysokým krevním tlakem, závažným dědičným očním onemocněním, věkem podmíněnou makulární degenerací.
- OCT tomograf je přesný optický přístroj vytvářející obrazy, průřezy (tomogramy) sítnice s osovým (axiálním) rozlišením méně než 10 mikronů.
- V podstatě se vyšetření OCT podobá ultrazvukovému jednorozměrnému A-skenu, místo zvuku se zde ale využívá světla.
- Přístroj využívá optickou měřicí techniku známou pod názvem nízkokoherentní interferometrie.
- Interferometr měří časové rozdíly v odrazu kontrolního paprsku (odraz od referenčního zrcadla) a paprsku odraženého od jednotlivých vrstev.

OCT (OPTICKÁ KOHERENTNÍ TOMOGRAFIE)



ULTRAZVUK OKA

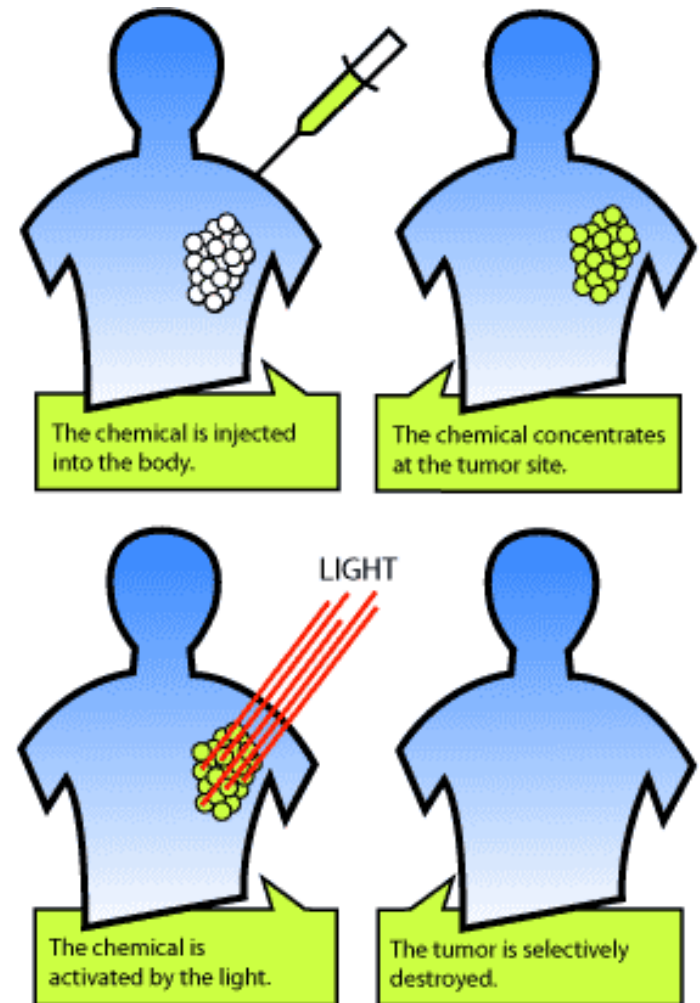
- Ultrazvukové vyšetření oka je založeno na stejném principu jako celostní diagnostický ultrazvuk.
- Nejčastěji se používá zobrazení A a zobrazení B.
- Zobrazení A (A scan) poskytuje jednorozměrný, lineární způsob zobrazení ve směru vysílaných ultrazvukových vln
- Jedná se o metodu popisnou, která poskytuje informaci především o přítomnosti, velikosti a druhu léze.
- Zobrazení B poskytuje dvourozměrný obraz vyšetřované oblasti.
- Podává informaci především o poloze, tvaru a velikosti patologické léze.



Terapie viditelným světlem

FOTODYNAMICKÁ TERAPIE (PDT)

- Fotodynamická terapie je diagnostická a léčebná metoda využívaná zejména při léčbě tumorů.
- Je založená na aplikaci fotosenzitivní látky, jež se po aplikaci hromadí přednostně v nejrychleji proliferujících (tedy nádorových) buňkách.
- Po ozáření světlem určitého spektra způsobí smrt odpovídajících buněk.
- Následně je aplikováno světlo specifické vlnové délky, látka světlo absorbuje a produkuje reaktivní (singletový) kyslík, který nádor ničí.
- Používá se v urologii, onkologii, dermatologii, pneumologii, gynekologii, atd.



THE END!