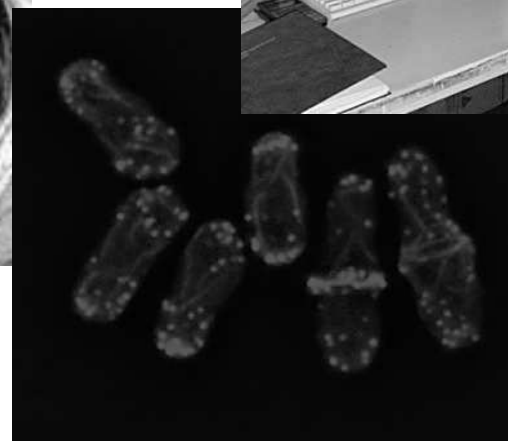
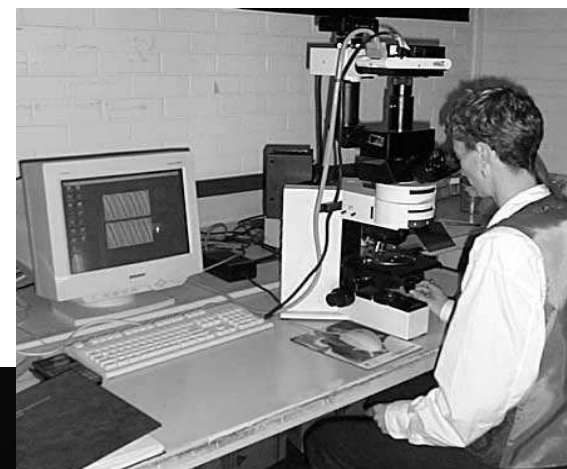
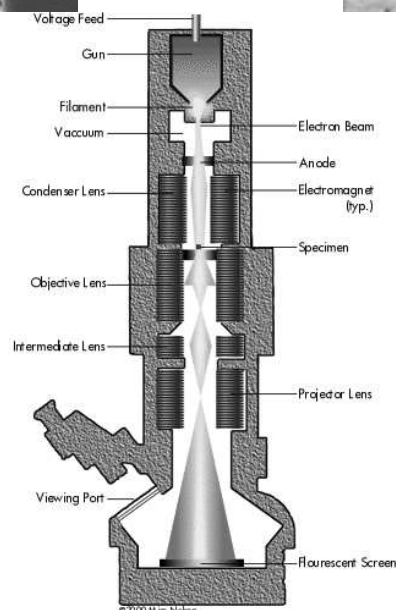
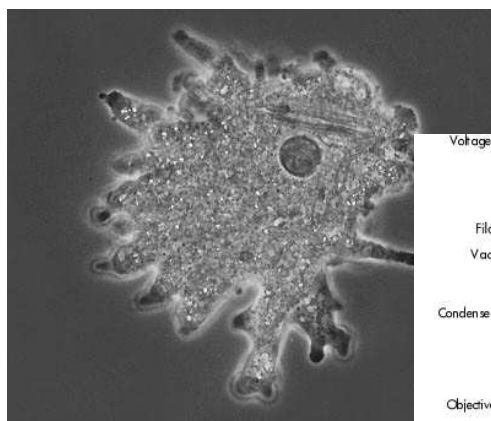


Přednášky z lékařské přístrojové techniky

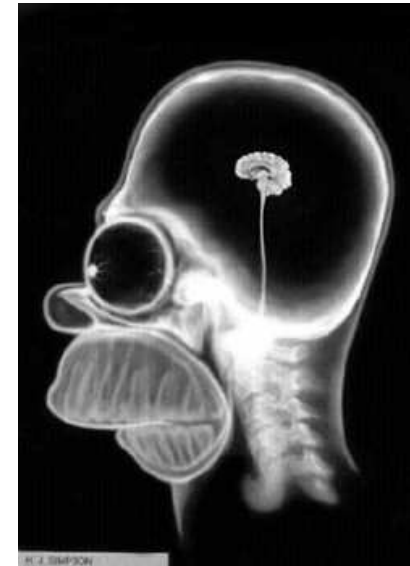
Masarykova univerzita v Brně



Laboratorní optické metody (mikroskopie)

Předpoklady

- Co je třeba znát?
 - Základy geometrické a vlnové optiky!



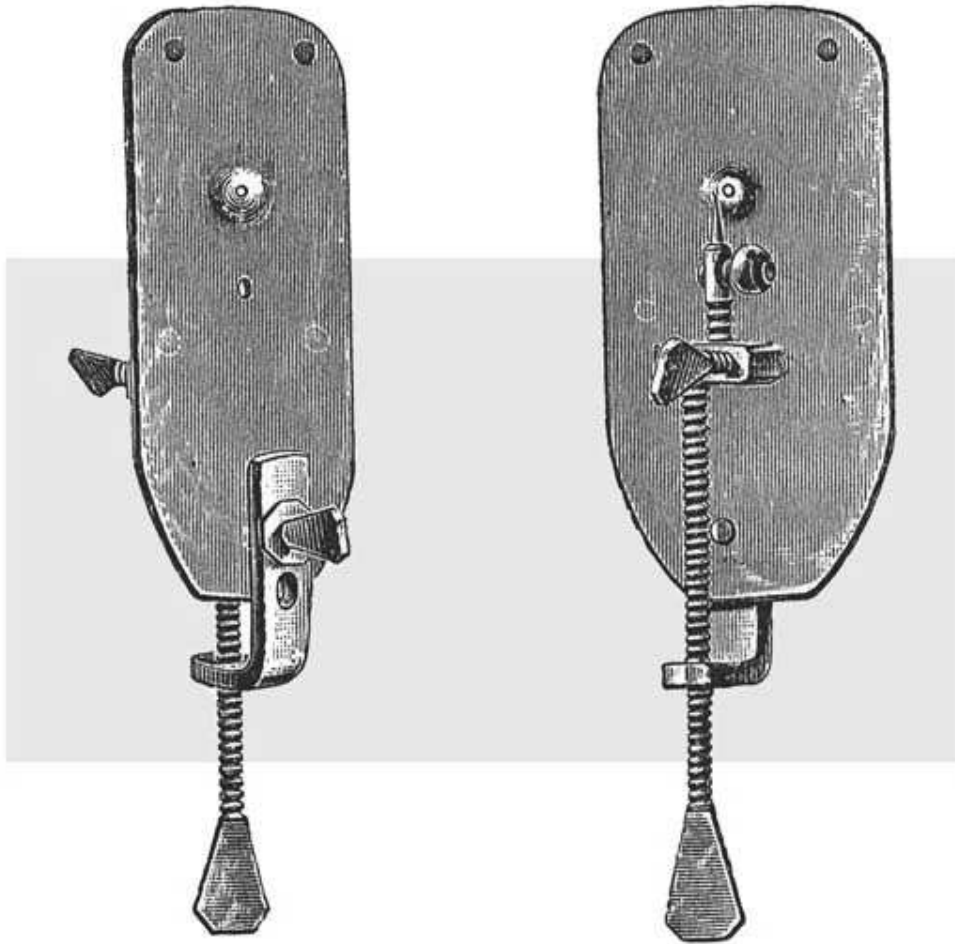
Vybrané laboratorní optické metody

- Spektrofotometrie – praktika
- Refraktometrie – praktika
- Polarimetrie – praktika
- **Mikroskopie – dnešní přednáška**

Metody mikroskopie

- Lidské oko má rozlišovací schopnost jedné obloukové minuty, což odpovídá při pozorování ze vzdálenosti 25 cm bodům vzdáleným od sebe zhruba 0,07 mm.
- Použitím lupy lze tuto vzdálenost zmenšit řádově desetkrát, což však stále neumožňuje studovat mikrostrukturu živé hmoty.
- První mikroskop zkonstruovali koncem 16. stol. v Holandsku, v r. 1650 zdokonalen Anthony van Leuwenhoekem (1632-1723).
- Dalším mezníkem mikroskopie byla konstrukce elektronového mikroskopu ve 30. letech 20. stol. Rozlišovací schopnost se posunula až na úroveň molekul a dnes můžeme pozorovat i struktury atomární.
- V mikroskopii lze v zásadě použít jakékoliv vlnění, jehož vlnová délka je výrazně kratší než rozměry pozorovaného objektu.

První použitelný mikroskop

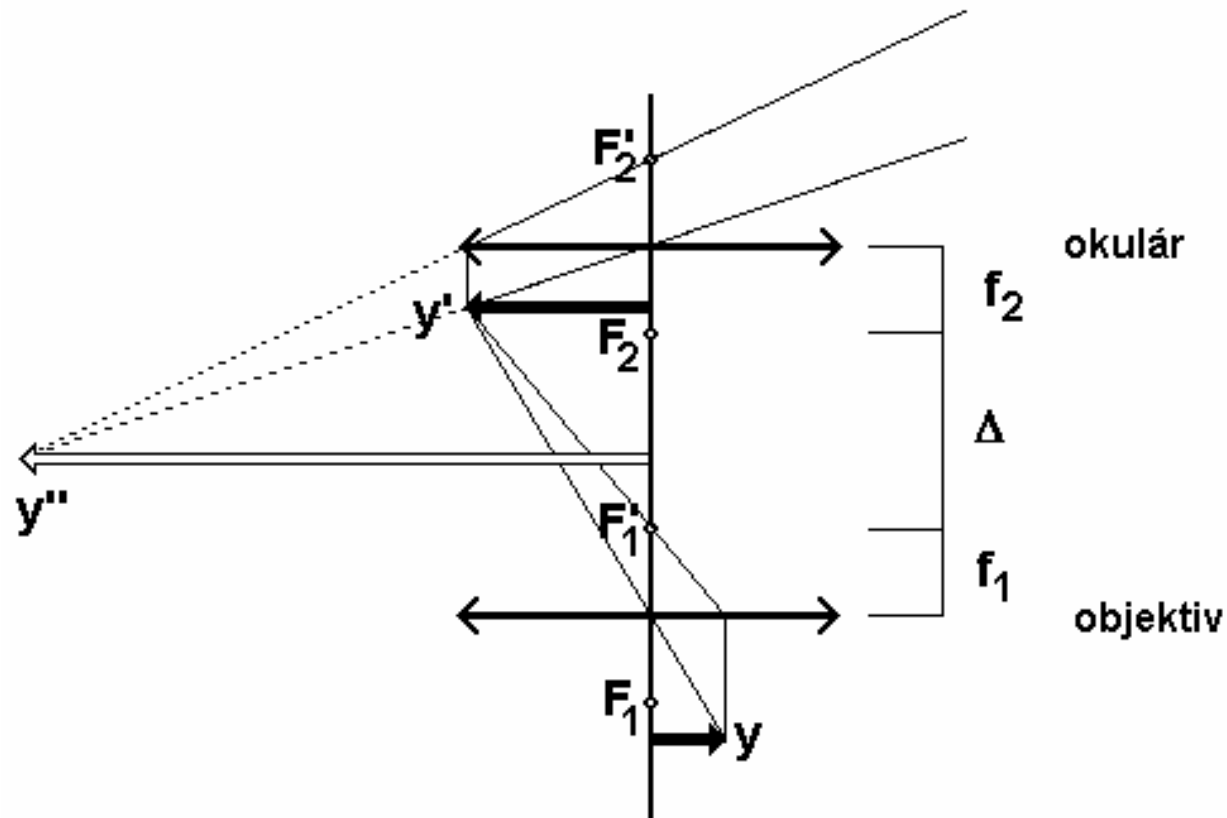


•www.arsmachina.com/images/loeuwenhoek_thmb.jpg.

Schéma optického mikroskopu a vlastnosti jeho optického systému

- Základem jsou dvě soustavy čoček - objektiv a okulár.
- Obě soustavy jsou v prvním přiblížení nahraditelné spojkami. Z hlediska kvality zobrazení je rozhodující **objektiv**, vytvářející skutečný, zvětšený a převrácený obraz. Pozorovaný předmět musí být umístěn mezi předmětovým ohniskem objektivu a jeho dvojnásobnou vzdáleností.
- Mechanická část spojující objektiv s okulárem - **tubus**.
- Obraz tvořený objektivem je pozorován **okulárem** jako lupou, přičemž se musí nacházet těsně za předmětovým ohniskem okuláru. Výsledkem je zvětšený, převrácený a neskutečný obraz.
- Dokonalé osvětlení zajišťuje optická soustava **kondenzoru**, soustřeďující světelné paprsky na pozorovaný objekt.

Schéma optické soustavy mikroskopu



F - ohniska, f - ohniskové vzdálenosti, y - předmět, y' - skutečný obraz předmětu vytvořený objektivem, y'' - neskutečný obraz pozorovaný v okuláru, Δ - optický interval mikroskopu.

Zvětšení mikroskopu

$$Z = Z_{ob} \cdot Z_{ok} = \frac{\Delta \cdot d}{f_{ok} \cdot f_{ob}}$$

d je konvenční zraková vzdálenost (0,25 m), Δ optický interval mikroskopu čili vzdálenost mezi obrazovým ohniskem objektivu a předmětovým ohniskem okuláru a f_{ob} a f_{ok} jsou příslušné ohniskové vzdálenosti.

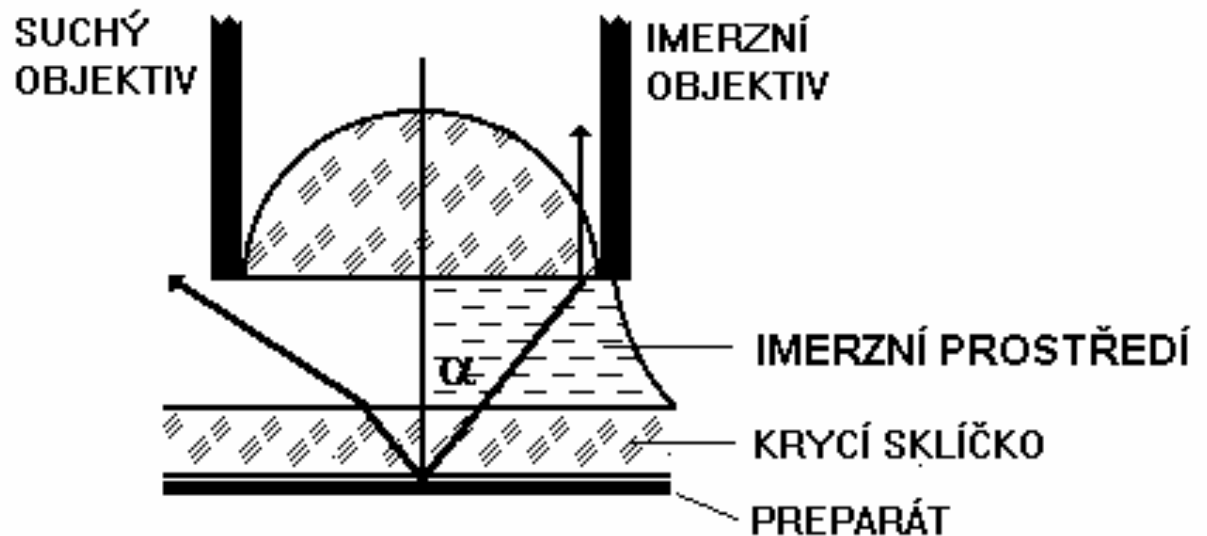
Rozlišovací mez mikroskopu

- Kombinací silných čoček lze vytvořit mikroskop s prakticky libovolným zvětšením – je však prázdné (plané), neumožňuje rozlišit detaily. Místo skutečnosti pozorujeme ohybové jevy a artefakty způsobené optickými vadami. Zvětšení je omezeno rozlišovací mezí mikroskopu. Výpočet rozlišovací meze vychází z interference světla po průchodu zobrazovaným předmětem. Zjednodušeně: do objektivu se musí dostat tzv. paprsky nultého a též alespoň prvního řádu, představíme-li si preparát jako optickou mřížku. Výpočty provedl německý fyzik *Abbe* (1840-1905). Dospěl k výrazu pro rozlišovací mez mikroskopu ve tvaru:

$$\delta = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

- kde δ je mřížková konstanta (vzdálenost dvou ještě rozlišitelných bodů), λ vlnová délka světla, n index lomu prostředí mezi objektivem a krycím sklíčkem a α úhel svíraný optickou osou mikroskopu a pláštěm kuželu paprsků, které z daného místa preparátu mohou vstoupit do objektivu a podílet se na zobrazení. Ve jmenovateli je numerická apertura objektivu (*NA*).

Rozlišovací mez mikroskopu



•Suchý a imersní objektiv. Paprsek vystupující z preparátu pod úhlem α se na rozhraní mezi krycím sklíčkem a vzduchem láme od kolmice a nemůže se již podílet na tvorbě obrazu, týž paprsek přecházející ze skla do imersního prostředí směr nemění a na tvorbě obrazu se podílí.

Cedrový olej ($n = 1,52$). Uvažujme žz světlo o $\lambda = 550 \text{ nm}$.

•Suché objektivy: $n = 1$ a NA kolem $0,95 \Rightarrow$ rozlišovací mez $0,6 \text{ mm}$.

•Imersní objektivy: NA max. $1,4$ a rozlišovací mez v ideálním případě asi $0,4 \text{ mm}$.

Vady objektivů a druhy okulárů

- **Otvorová a barevná vada**
- **Achromáty**
- **Semiapochromáty**
- **Apochromáty**
- **Planachromáty a planapochromáty**

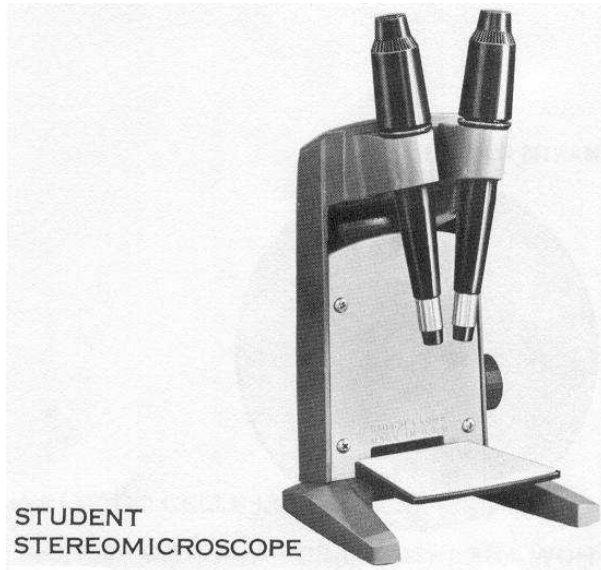
- Okuláry mikroskopů jsou vyráběny v několika druzích:
- **Ortoskopické okuláry**
- **Periplanatické okuláry**
- **Kompenzační okuláry**
- **Projektivy**

Samostudium !!!!

Varianty optického mikroskopu

- Pozorování ve světlém a temném poli
- Stereomikroskop (dva mikroskopy se samostatnými objektivy i okuláry, jejichž optické osy svírají úhel např. 15°) - stereoskopické vidění. V lékařství: operační mikroskop. Požadavek stranové správnosti. Osvětlení operačního pole světlovody. Plynulá změna ohniskové vzdálenosti objektivu čili zvětšení - tzv. „zoom“.
- Moderní badatelské mikroskopy jsou vybaveny zařízením pro mikrofotografii na klasický fotomateriál i digitálními (video)kamerami, umožňujícími pozorovat zvětšený obraz (video) na monitoru a uložit jej do paměti počítače.
- Programy pro úpravu kontrastu a jasu snímků i numericky analyzující zobrazené struktury, schopné vyhledávat charakteristické tvary a pod.
- Výměnou objektivů, okulárů, úpravou kondenzoru nebo vložením dalších optických prvků lze sestavit většinu typů mikroskopů. Významným doplňkem jsou mikromanipulátory, které např. umožňují zavádět elektrody do buněk, separovat organely apod.

Operační stereomikroskop

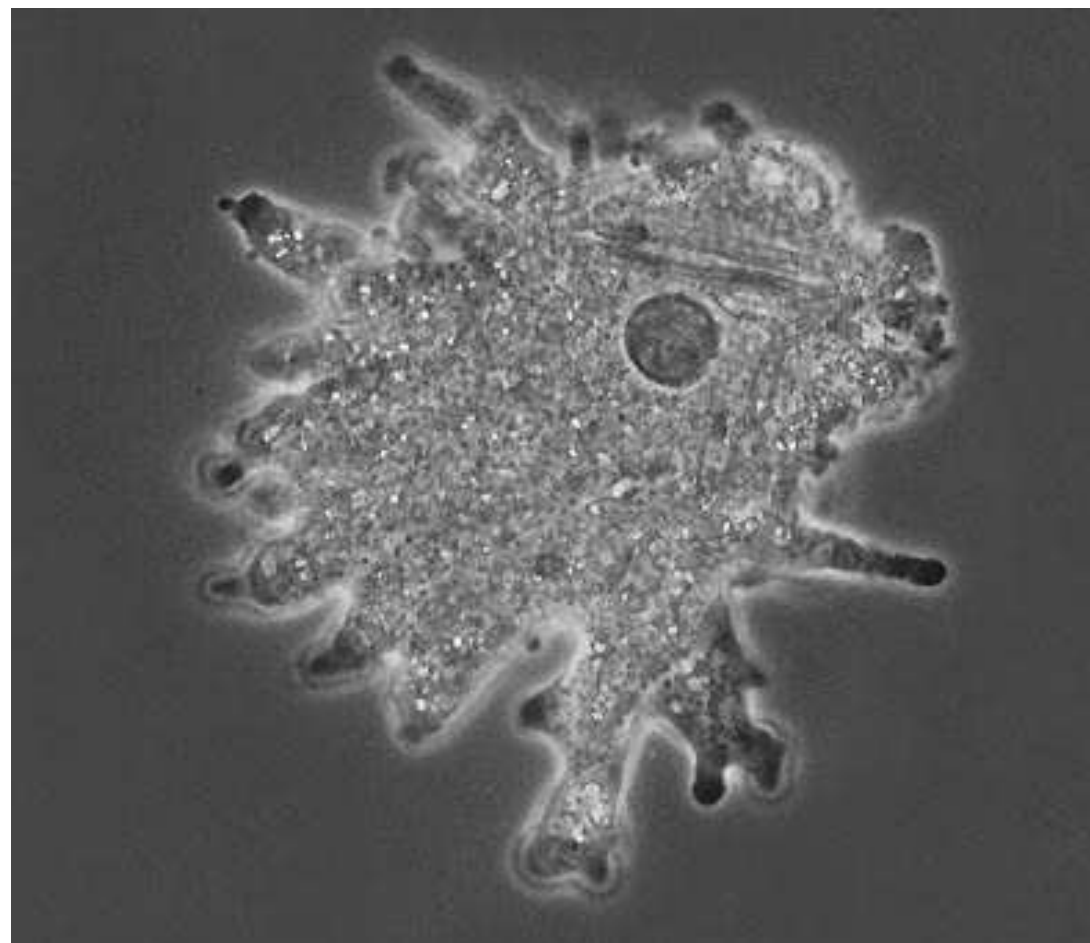
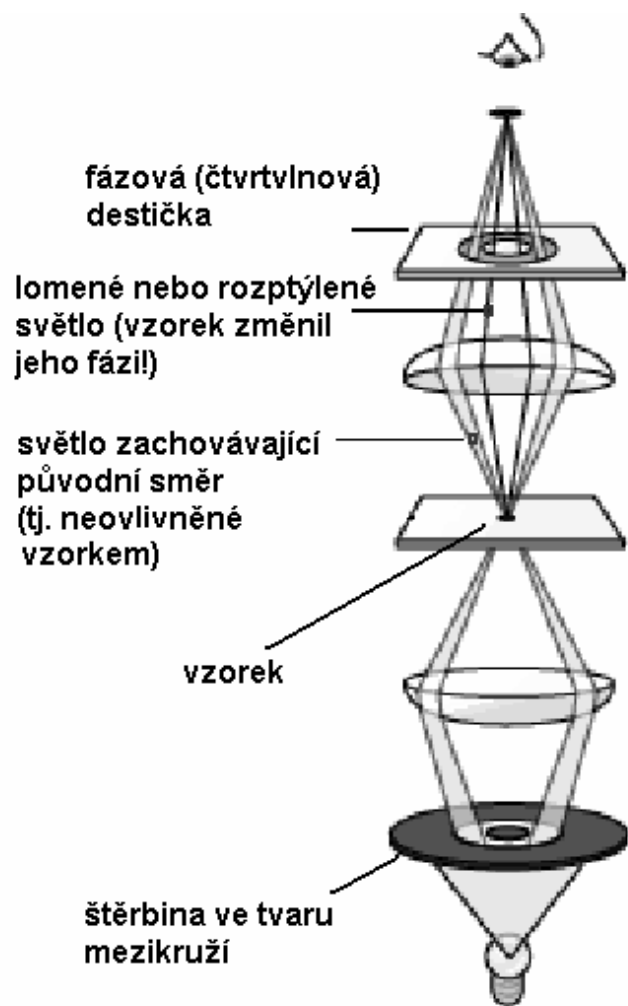


•The **OPMI® Vario/NC 33** surgical microscope

Speciální optické mikroskopy - mikroskop s fázovým kontrastem

- Fázově kontrastní nebo interferenční mikroskopy umožňují zviditelnit objekty, které se od okolí liší indexem lomu - fázové objekty. Při průchodu světelných vln fázovým objektem nedochází ke změně intenzity nýbrž k posunu fáze - v závislosti na rozdílu indexů lomu struktury a jejího okolí, na délce optické dráhy i na vlnové délce světla. Mění se i směr šíření vlny lomem, odrazem a rozptylem.
- Činnost fázově kontrastního mikroskopu: Do optického systému kondenzoru je umístěna kruhová clona se zatemněným středem - světlo prochází jen úzkým mezikružím. Světelné paprsky projdou vzorkem, kde na fázových objektech dojde k odchýlení části paprsků z původního směru. V zadní ohniskové rovině objektivu se nachází tzv. čtvrtvlnová destička (posouvá fázi o $+\pi/2$ nebo $-\pi/2$). Tato destička má opět tvar mezikruží, na které dopadnou ty paprsky, které nezměnily svůj směr při interakci s fázovými objekty. Ostatní paprsky destičku minou - nejsou fázově posunuty. Obraz je vytvářen interferencí paprsků posunutých i neposunutých.
- FKM, podobně jako mikroskopy interferenční, umožňují pozorování živých objektů bez jakéhokoliv barvení. Mikroskopy s diferenčním interferenčním kontrastem podle Nomarského (označují se zkratkou DIC) jsou moderní alternativou mikroskopů s fázovým kontrastem.

mikroskop s fázovým kontrastem



Améba ve fázovém kontrastu – $Z = 250$

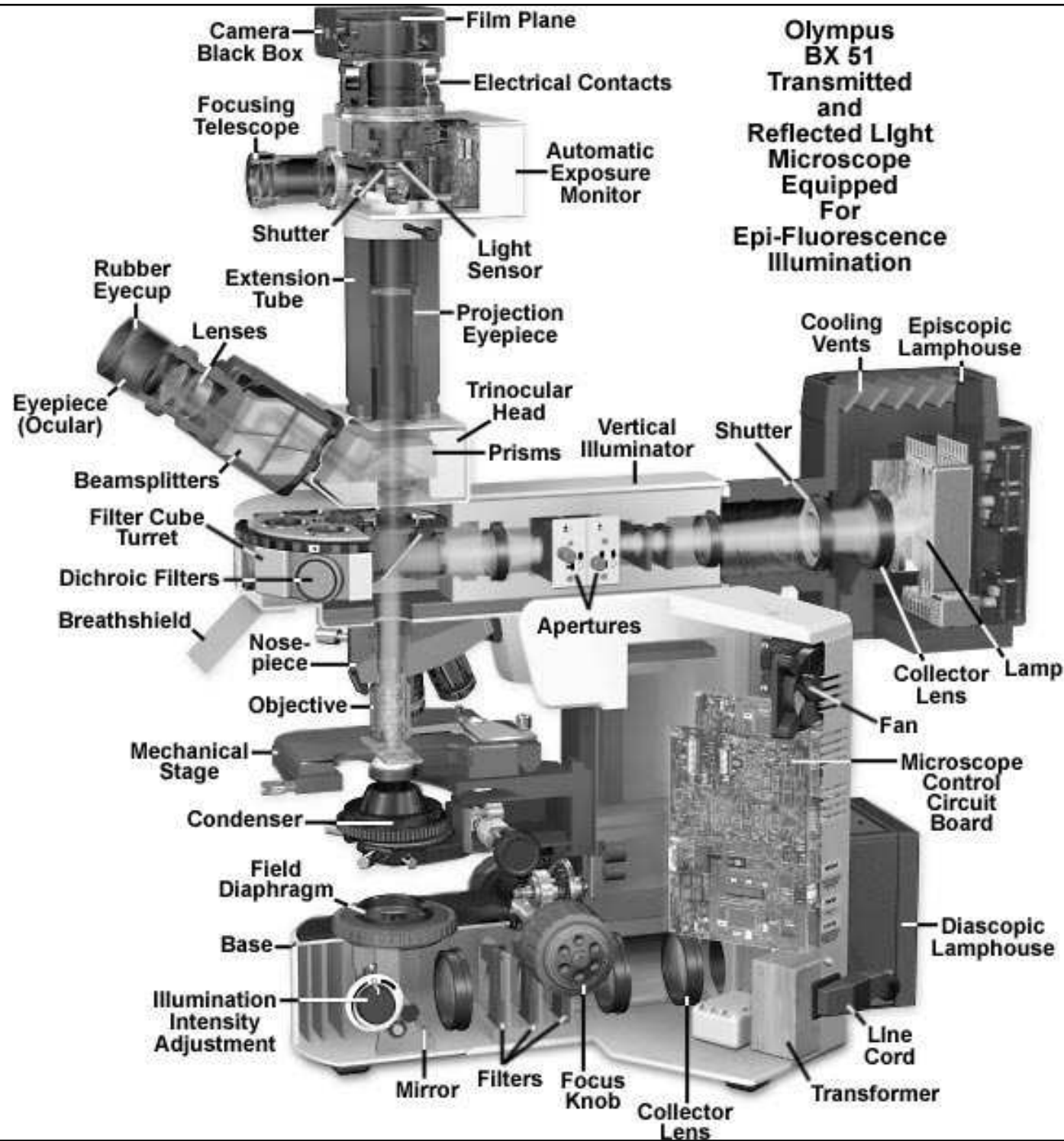
•www.durr.demon.co.uk/colour.html.

Podle
<http://www.nobel.se/physics/educationa/microscopes/phase/>

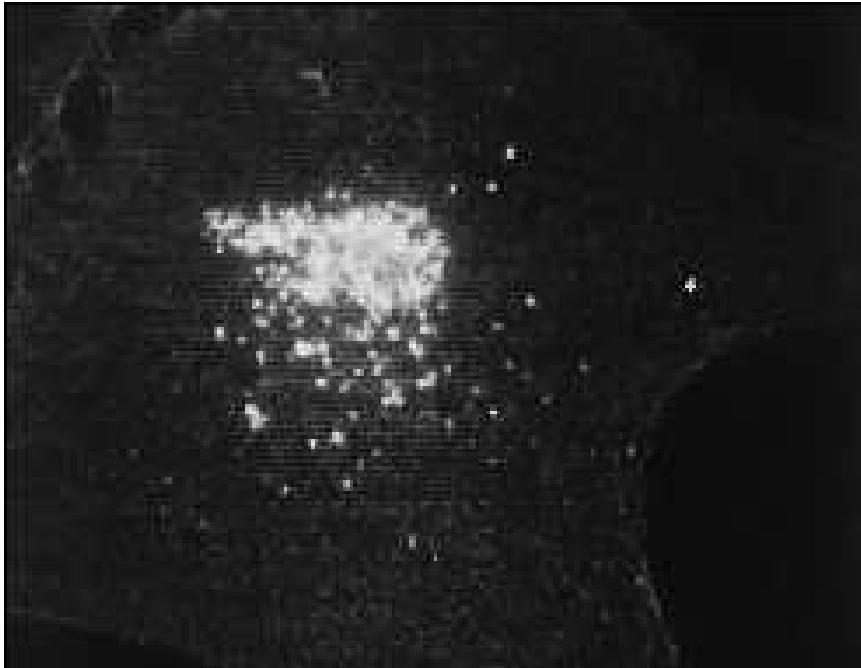
Speciální optické mikroskopy - fluorescenční mikroskop

- Fluorescenční mikroskopy využívají schopnosti některých látek emitovat viditelné světlo po ozáření světlem o kratší vlnové délce. Využívá se dlouhovlnného UV záření a přilehlé oblasti viditelného spektra. UV světlu je přizpůsobena optika kondenzoru nebo je UV světlo přiváděno shora, zbytek optického systému je jako u běžného optického mikroskopu + filtry. Fluorescenci vykazuje např. tryptofan i jiné látky s aromatickým jádrem či heterocyklem. Většinou jsou k preparátům přidávána fluorescenční barviva specificky interagující s různými buněčnými strukturami. Někdy je fluorescenční barvivo (fluorochrom, fl. sonda) navázáno na protilátku specifickou pro některou z bílkovin. Pak lze selektivně zviditelnit např. cytoskelet, chromatin, membránové bílkoviny apod.

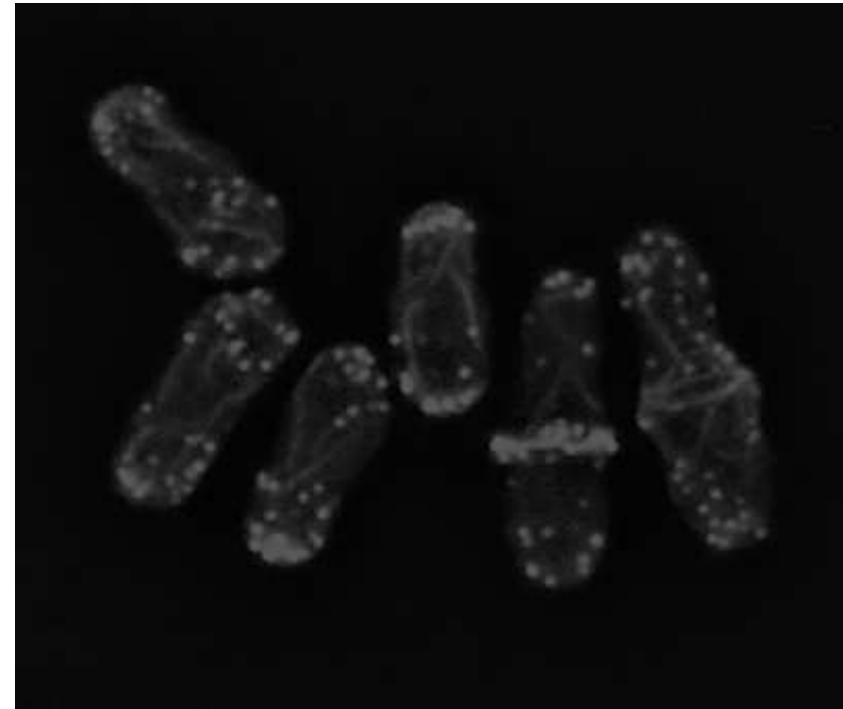
FM



fluorescenční mikroskop



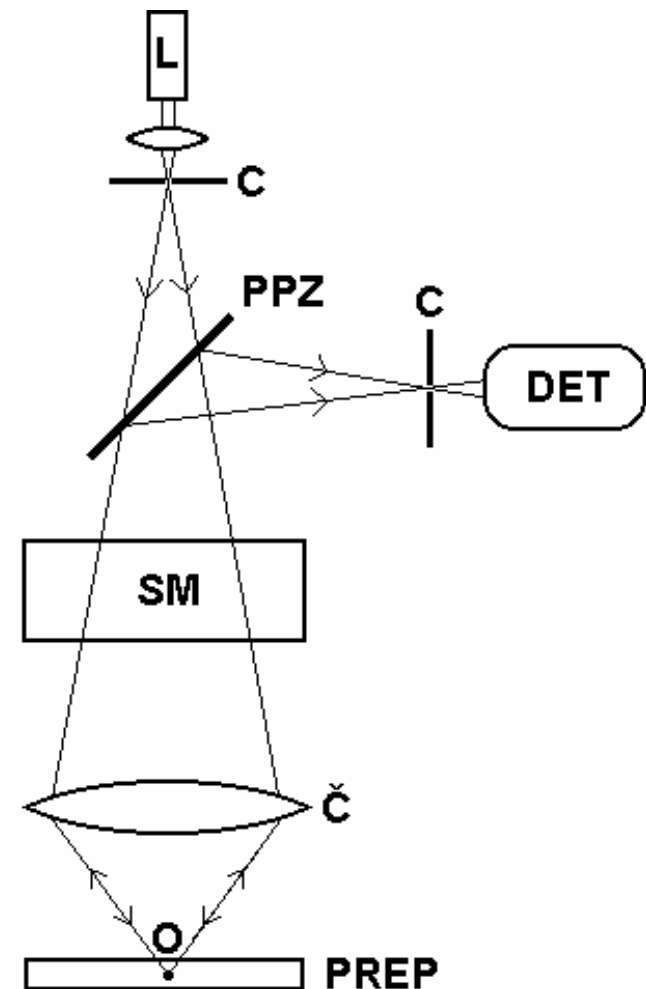
Virové částice v infikované
buňce -
<http://usa.hamamatsu.com/sys-biomedical/slc2400/slc-smpl.htm>



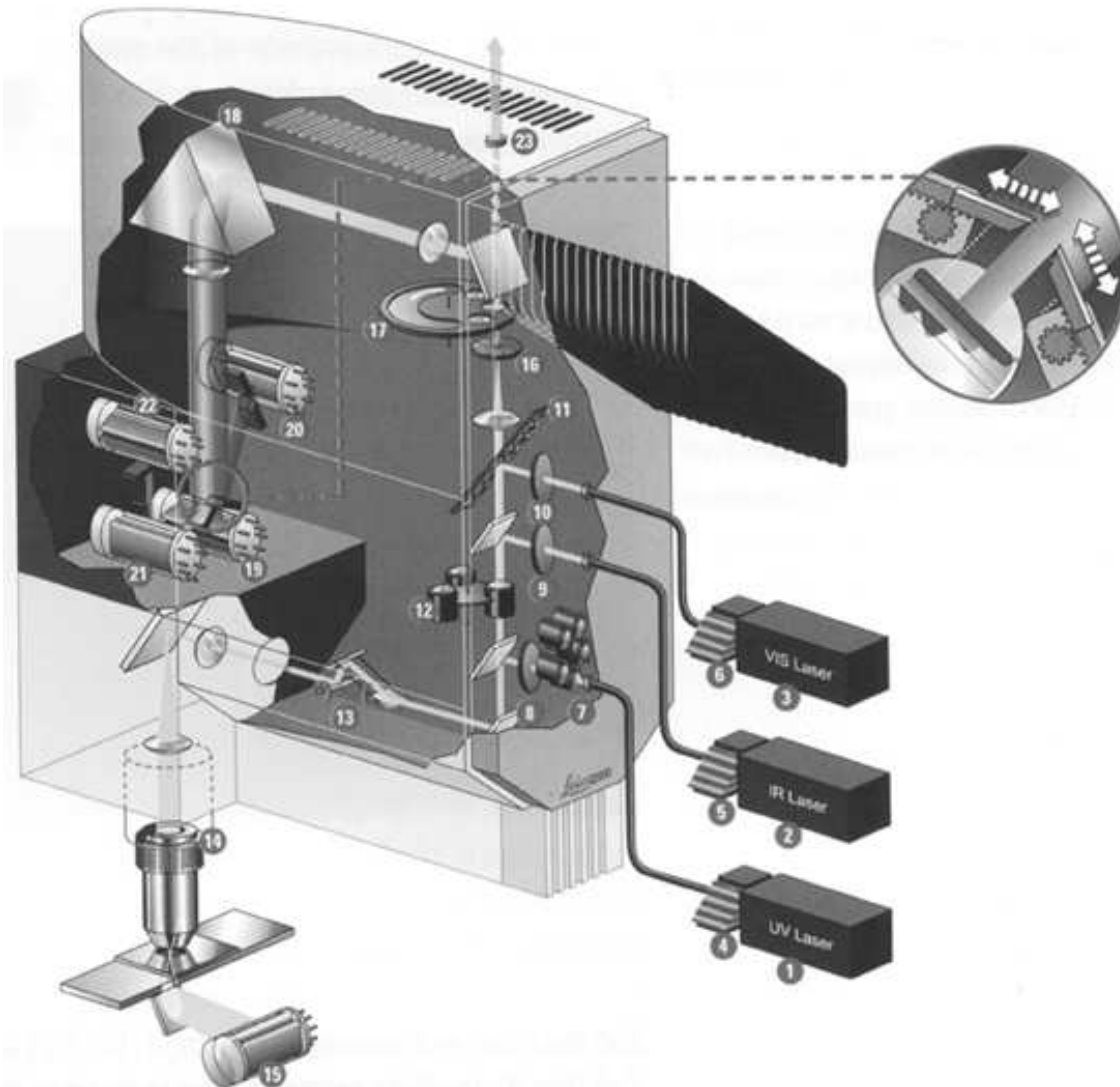
Aktinová vlákna kvasinek zviditelněná
pomocí fluorescenčního mikroskopu –
barvení rhodaminem-phalloidinem
•[www.paulgyoung.com/.../
fission_yeast_actin_cytoskeleton.htm](http://www.paulgyoung.com/.../fission_yeast_actin_cytoskeleton.htm).

Speciální optické mikroskopy - laserový konfokální řádkovací mikroskop

- L - laser, C - clony s kruhovým otvorem, PPZ - polopropustné zrcadlo, DET - detektor světla (fotonásobič), SM - řádkovací (skenovací) mechanismus, Č - objektiv (projektiv), O - bodový objekt, PREP - preparát.
- Otvorem v cloně před detektorem projdou jen paprsky, které se odrazily od bodových struktur v zaostřené rovině. Ostatní paprsky (rozptýlené) jsou clonou zachyceny. Tyto paprsky zhoršují kvalitu zobrazení v běžném mikroskopu, protože zvyšují jas a snižují kontrast. Tímto mikroskopem lze proto zkoumat i poměrně silné nativní preparáty. Řádkovací zařízení je systém otočných zrcadel, která mohou posunovat ohnisko po těsně vedle sebe umístěných řádcích.



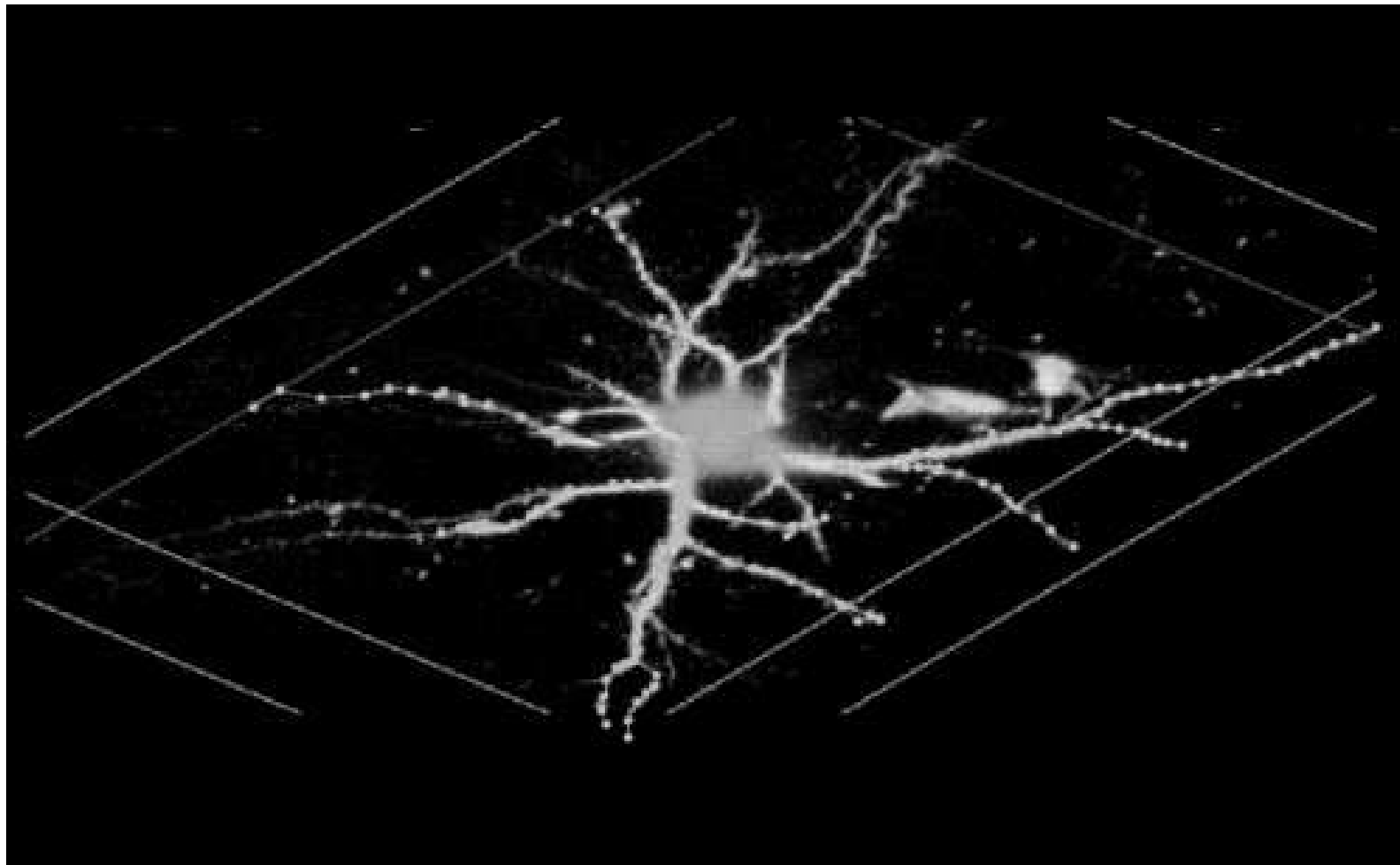
konfokální řádkovací mikroskop



•Konfokální
mikroskop Leica se
spektrofotometrickou
detekcí

•<http://www.cepceb.ucr.edu/facilities/confocal.htm>

konfokální řádkovací mikroskop



3D obraz neuronu, fluorescence - <http://www.cs.ubc.ca/nest/magic/neuron.html>

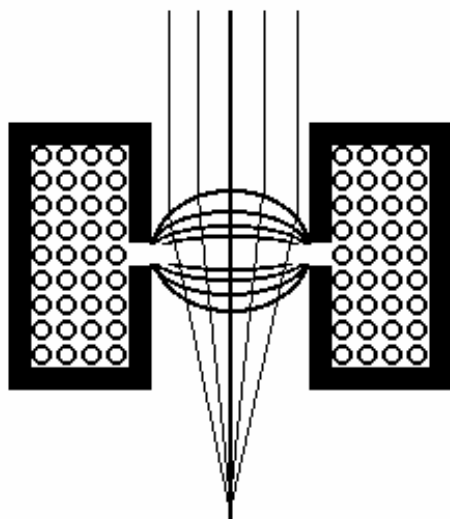
Elektronová mikroskopie

- „Klasické“ elektronové mikroskopy (EM) využívají pro zobrazení urychlených elektronových svazků. I elektronům je možno přisoudit vlnovou délku tzv. **de Broglieových hmotnostních vln**. Elektron o energii 1,5 eV má vlnovou délku 1 nm. Vycházíme přitom z vzorců:

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v} \qquad e \cdot U = \frac{1}{2} m \cdot v^2$$

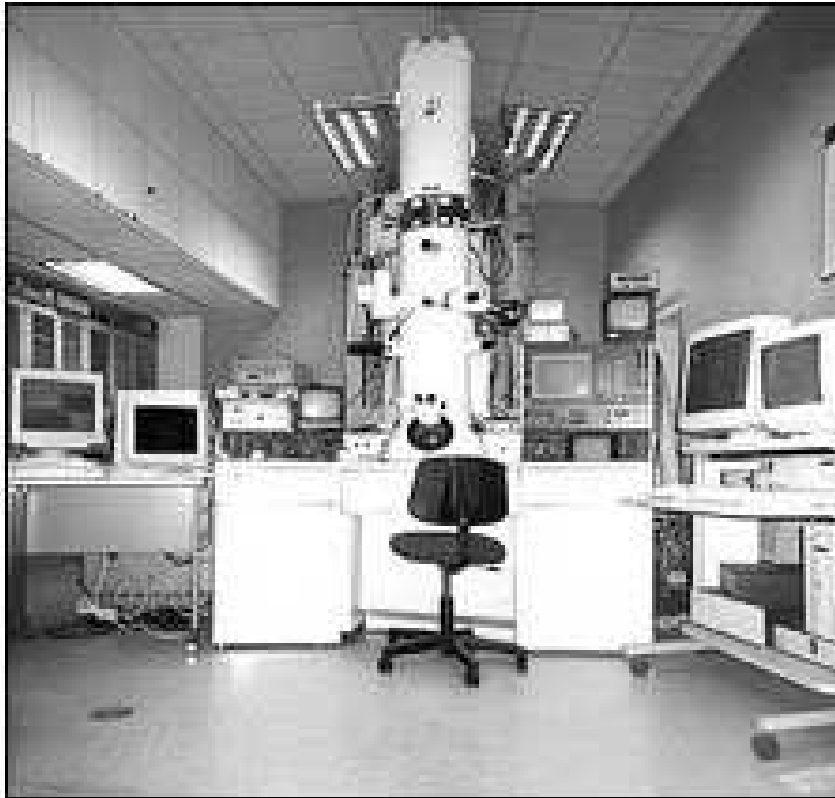
λ je vlnová délka, h Planckova konstanta, m relativistická hmotnost elektronu, v jeho rychlost, e – jeho náboj a U urychlovací napětí. Mají-li zobrazované předměty velikost srovnatelnou s λ , začne docházet k ohybovým jevům, které zobrazení znemožní. Vysokým urychlením elektronů lze dosáhnout řádově 10^5 -krát kratších λ . Viz $\delta = \lambda/n \cdot \sin \alpha$. Vlivem velkých optických vad čoček bude však velmi malá numerická apertura - řádově 10^{-2} . V EM se používají téměř výhradně čočky magnetické. EM mají v praxi rozlišovací mez několika desetin nm.

Magnetická čočka



- Příčný řez cívkou, která je magneticky stíněna pancéřováním. V místě, kde je pancéřování přerušeno, vzniká magnetické pole, jehož ekvipotenciální hladiny (hladiny stejného magnetického potenciálu) jsou jako oblouky znázorněny na obrázku (nejde o siločáry mag. pole, jejichž tečny by určovaly směr vektoru magnetické indukce). Svazek elektronů je fokusován do ohniska. Magnetická čočka se chová jako spojka.

TEM – transmisní elektronový mikroskop

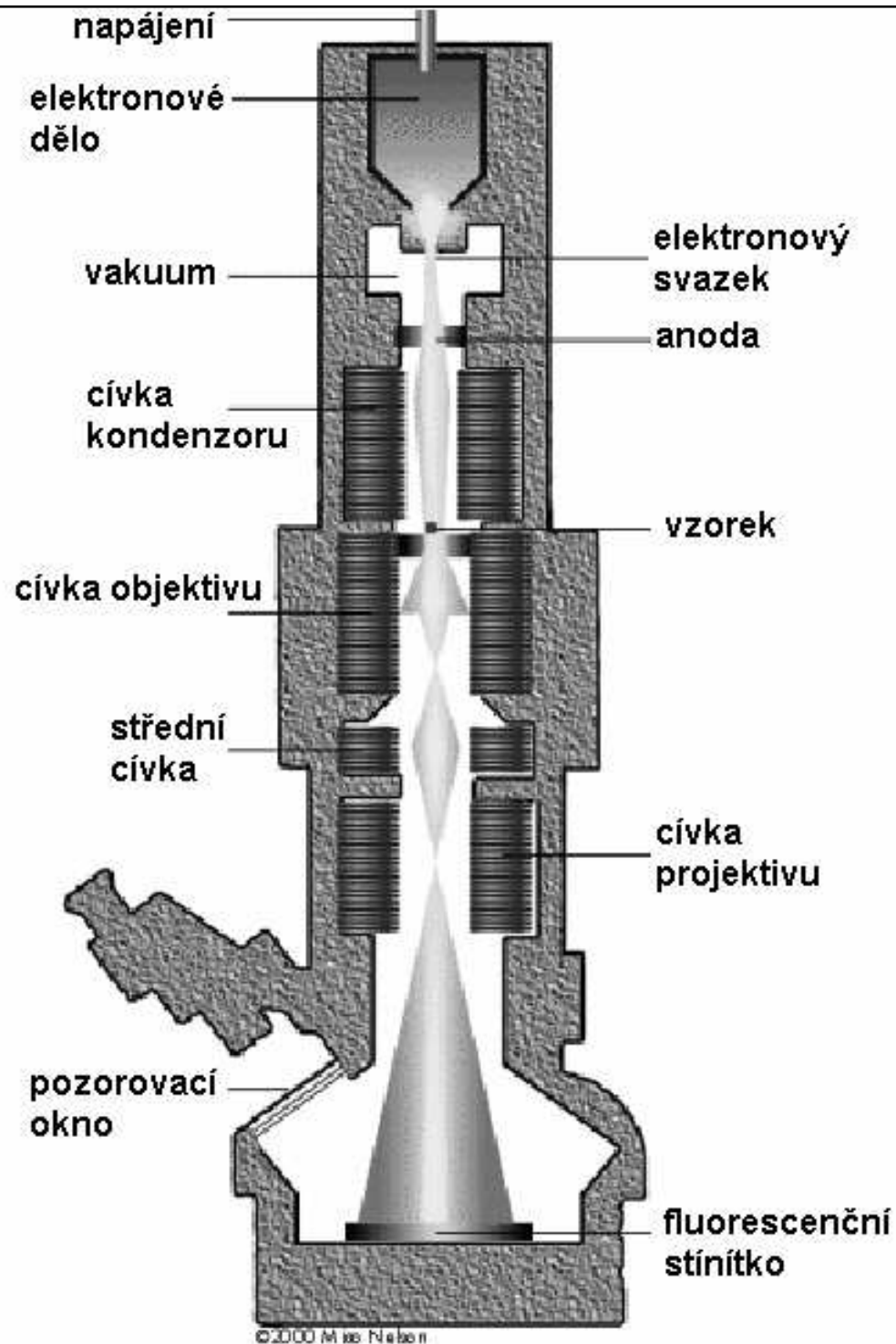


- TEM fy
Brookhaven –
zvětšení 50 000 000x,
rozlišení 0,1 nm, možná
rentgenová spektrometrie
pro chemickou analýzu
vzorků

TEM – transmisní elektronový mikroskop

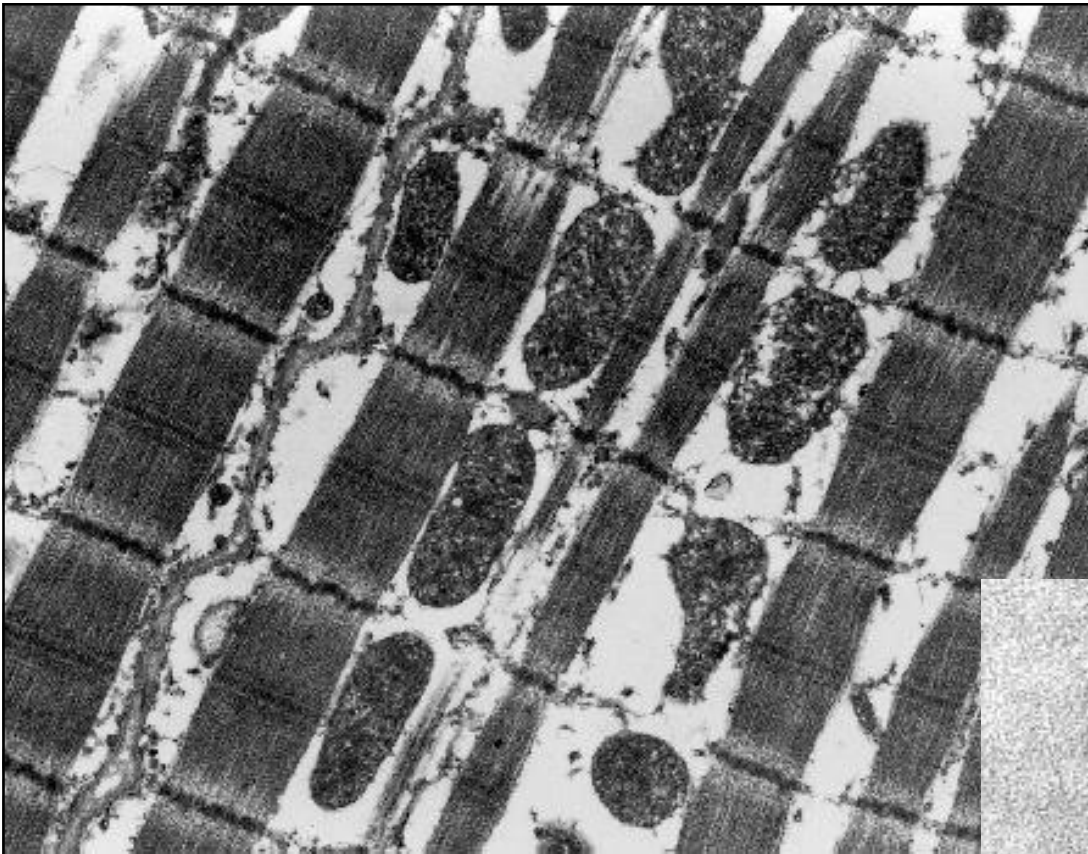
podle:

<http://www.vetref.net/emscope/theorysch.html>



TEM – příprava a barvení preparátů

- Nutnost velmi tenkých řezů (max. stovky nm) a umístování vzorku do vakua klade zvláštní požadavky na přípravu vzorků. Vzorky nativní - vlhké - mohou být pozorovány jen nejmodernějšími, tzv. environmentálními EM, v nichž se preparát nachází v prostředí o relativně vysokém tlaku.
- Zejména biologické materiály musí být připravovány pomocí speciální fixace - před rozřezáním zataveny do různých materiálů aj.
- Nelze použít barviv používaných ve světelné mikroskopii. Biologické objekty bývají pokovovány, čímž vzniká i efekt stínování. Atomy kovu totiž ze svého zdroje přilétají z boku, takže za vyvýšenými místy preparátu vzniká "stín". Pro zvýšení rozptylu elektronů v preparátech se používají i soli nebo oxidy těžkých kovů (osmia, wolframu či uranu).

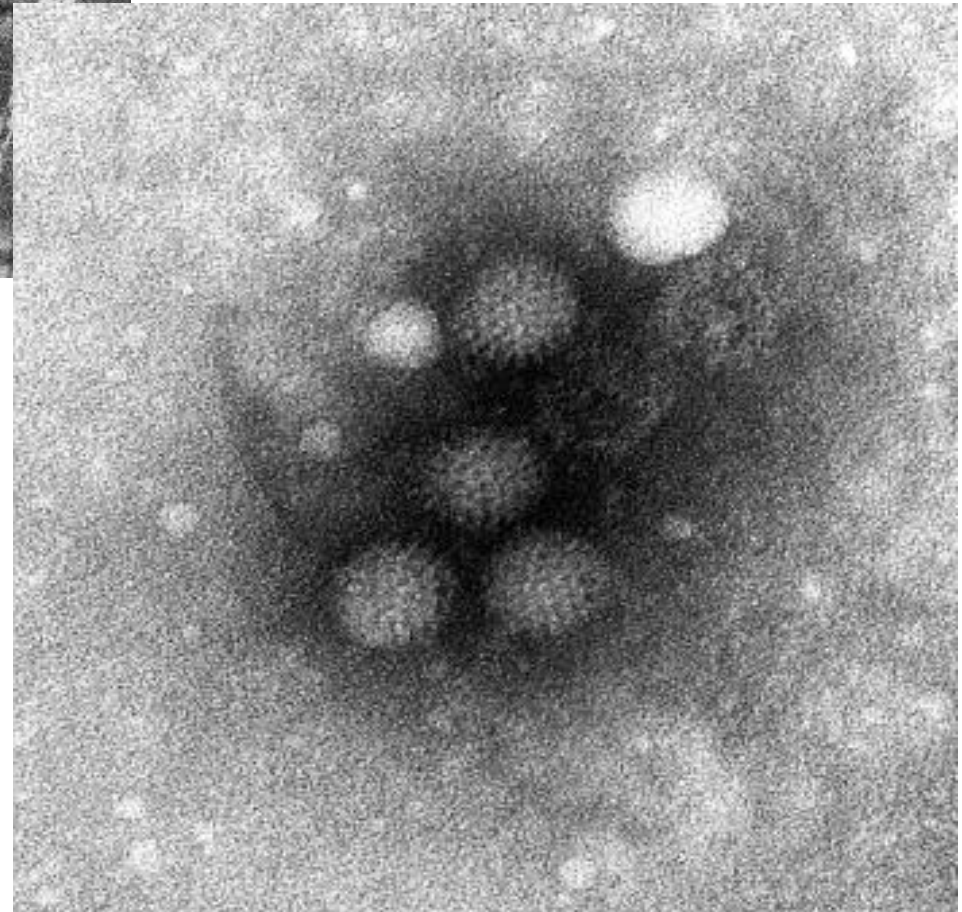


TEM -

<http://www.ualberta.ca/~mingchen/tem.htm>

Buňky břišního svalu ↑

Corona virus v negativním
barvení →



SEM – řádkovací (skenovací) elektronový mikroskop



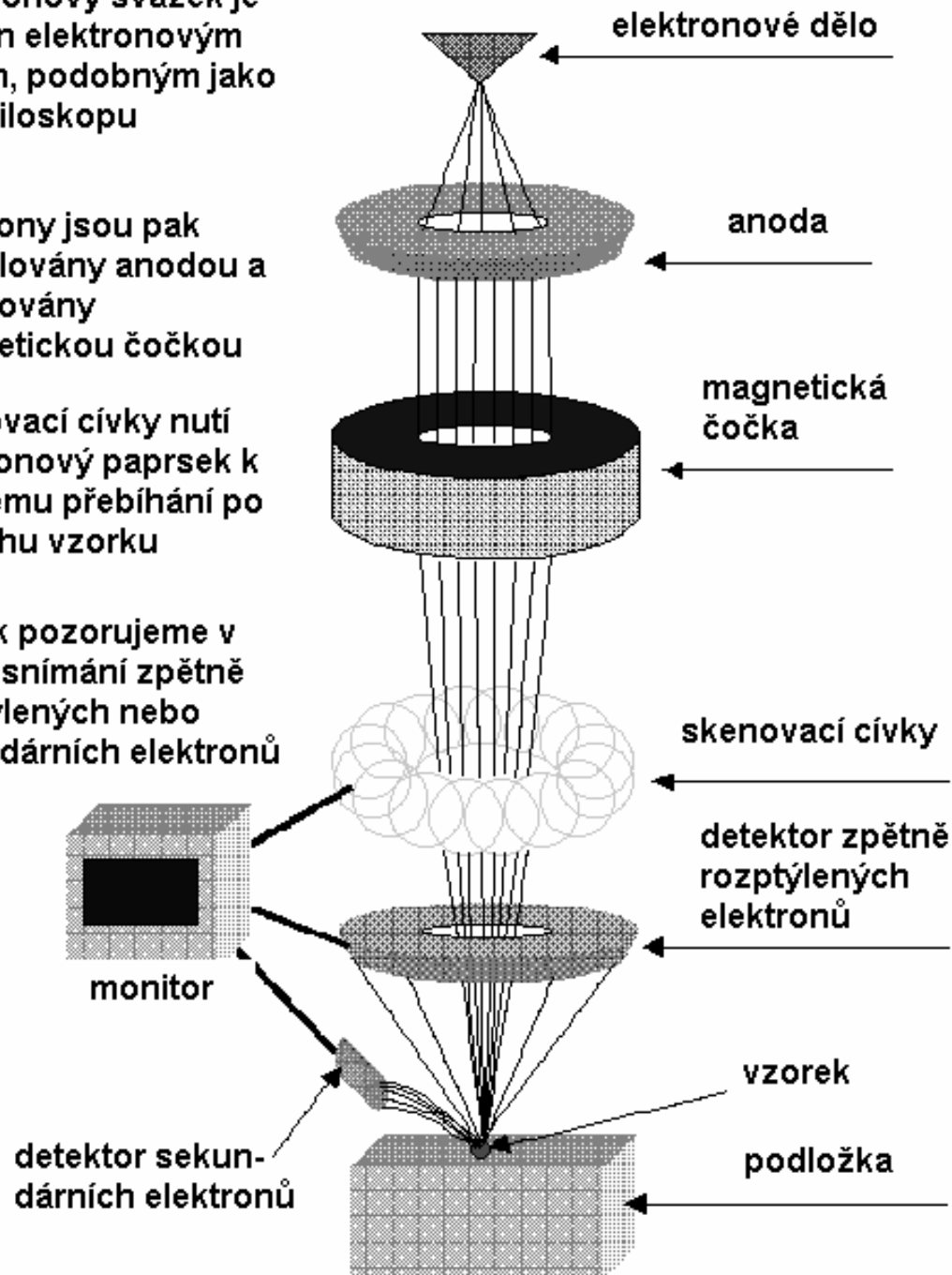
SEM

elektronový svazek je tvořen elektronovým dělem, podobným jako v osciloskopu

elektrony jsou pak urychlovány anodou a fokusovány magnetickou čočkou

skenovací cívky nutí elektronový paprsek k rychlému přebíhání po povrchu vzorku

vzorek pozorujeme v módu snímání zpětně rozptýlených nebo sekundárních elektronů



Podle

<http://www.rpi.edu/dept/materials/COURSES/NANO/shaw/BigSEM.gif>

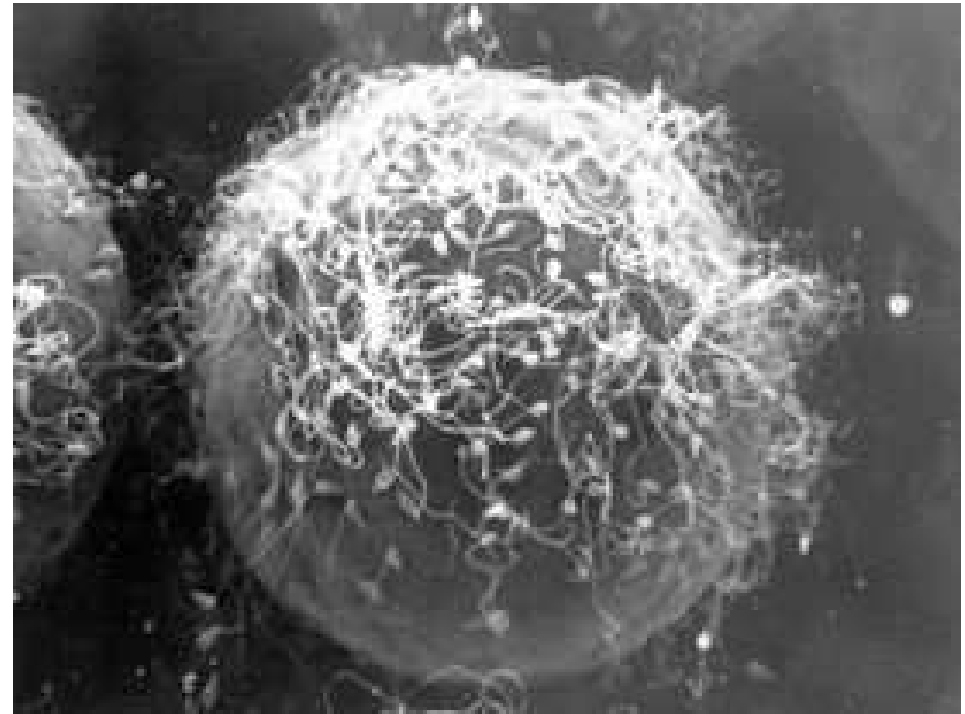


- Detail nohy mravence v SEM -

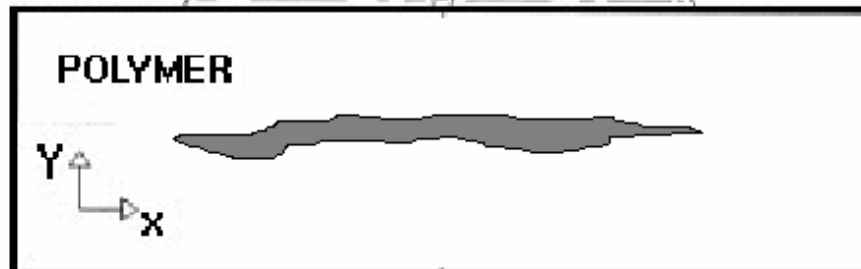
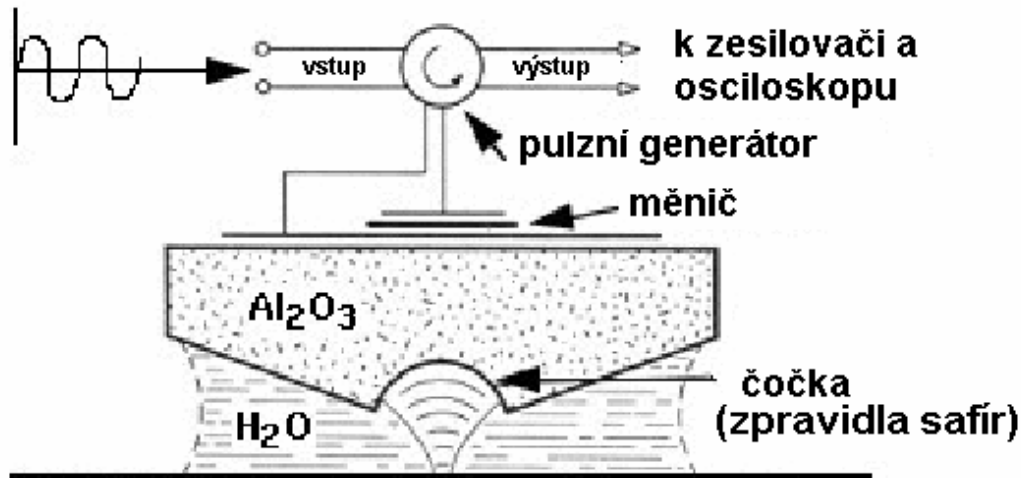
<http://www.wtn.org/ss/story.phtml?storyId=33&type=EdOutreach>

- Vajíčko mořského ježka obklopené spermii, SEM 3000x zvětšeno -

<http://www.stanford.edu/dept/news/report/news/august9/sperm-89.html>



Akustický mikroskop



•Podle
http://www.sv.vt.edu/comp_sim/sam/full.gif



- Neurony rostoucí na podložce z umělé hmoty
<http://transducers.stanford.edu/stl/Projects/ControlledPatt.htm>

Příjemný víkend!!!

