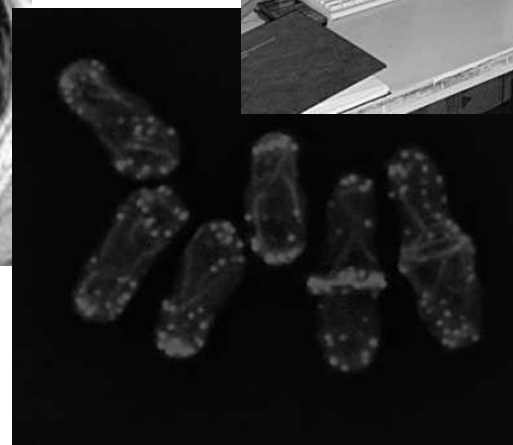
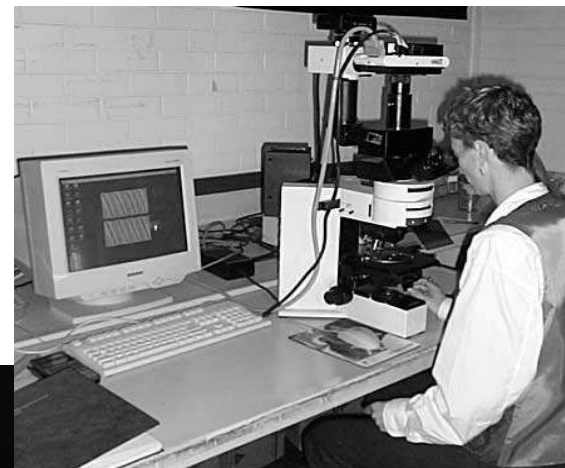
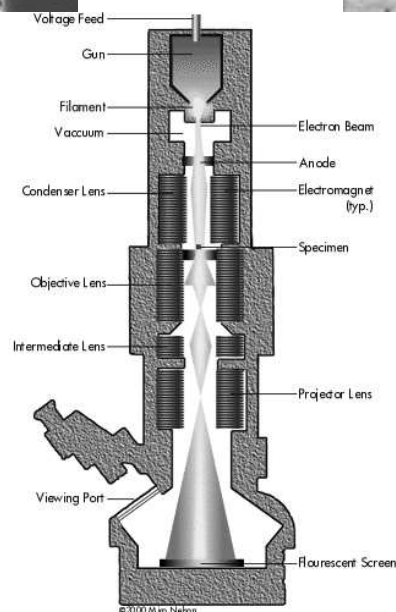
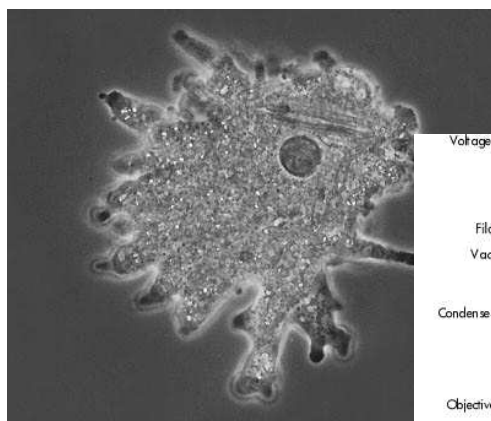


# Přednášky z lékařské přístrojové techniky

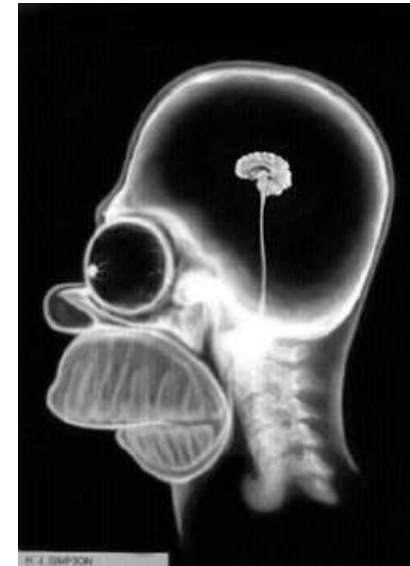
Masarykova univerzita v Brně



## Laboratorní optické metody (mikroskopie)

# Předpoklady

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



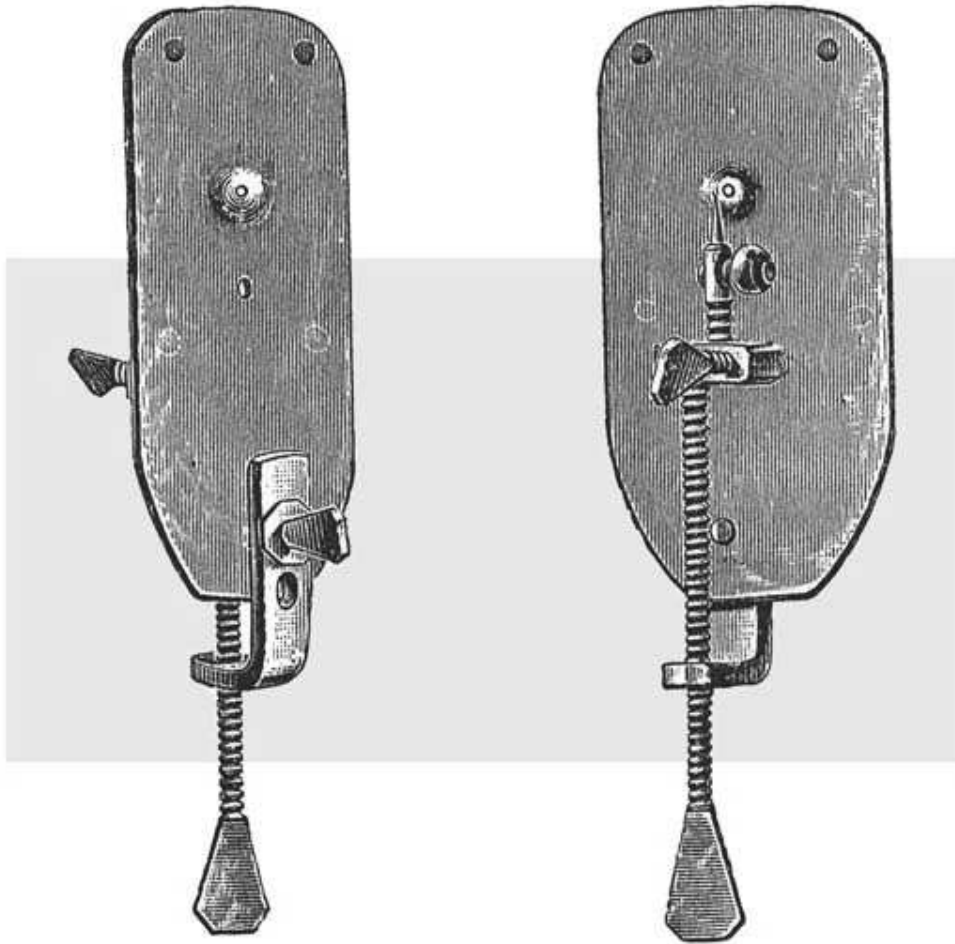
# Vybrané laboratorní optické metody

- 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

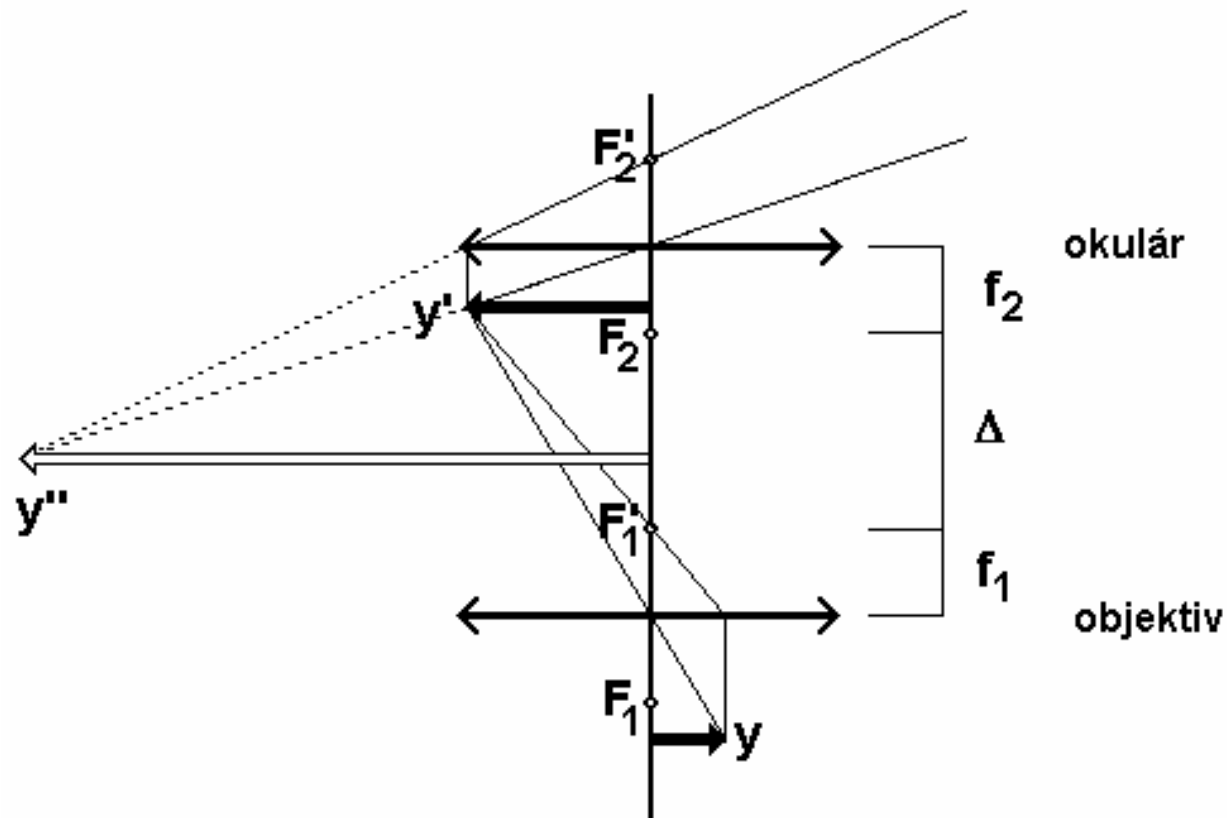


•[www.arsmachina.com/images/loeuwenhoek\\_thmb.jpg](http://www.arsmachina.com/images/loeuwenhoek_thmb.jpg).

# 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,  $\Delta$  - 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),  $\Delta$  optický interval mikroskopu čili vzdálenost mezi obrazovým ohniskem objektivu a předmětovým ohniskem okuláru a  $f_{ob}$  a  $f_{ok}$  jsou příslušné ohniskové vzdálenosti.



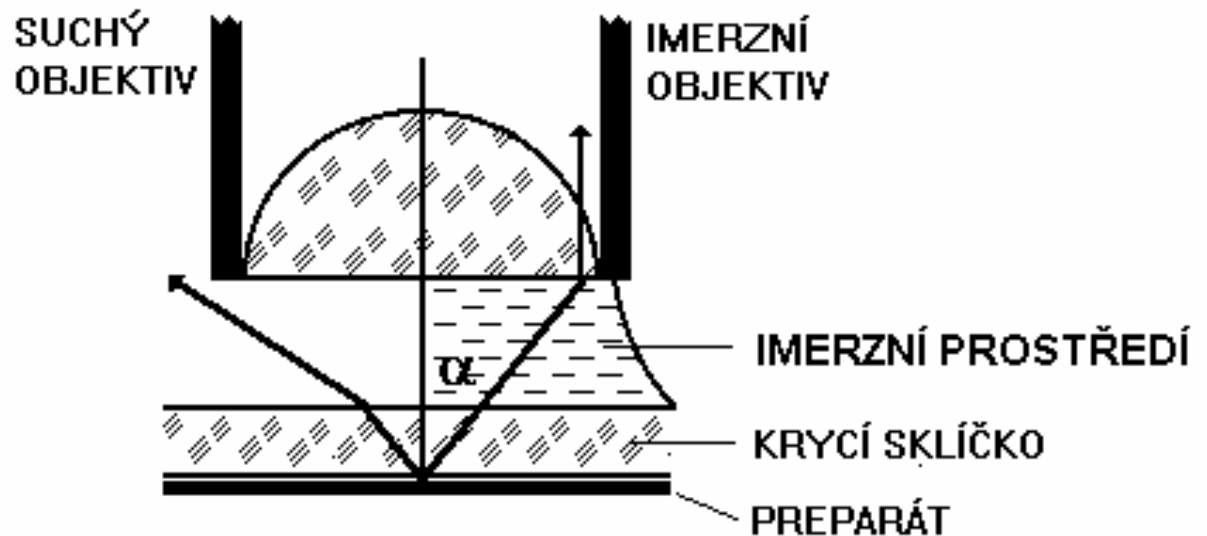
# Rozlišovací mez mikroskopu

- 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  $\delta$  je mřížková konstanta (vzdálenost dvou ještě rozlišitelných bodů),  $\lambda$  vlnová délka světla,  $n$  index lomu prostředí mezi objektivem a krycím sklíčkem a  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\lambda = 550$  nm.

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

•Imersní objektivy: NA max. 1,4 a rozlišovací mez v ideálním případě asi 0,4 mm.

# Vady objektivů a druhy okulárů

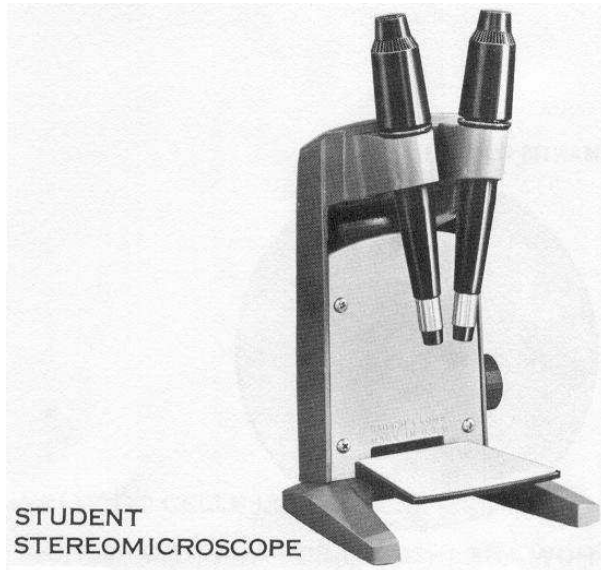
- **Otvorová a barevná vada**
- **Achromáty**
- **Semiapochromáty**
- **Apochromáty**
- **Planachromáty a planapochromáty**
  
- Okuláry mikroskopů jsou vyráběny v několika druzích:
- **Ortoskopické okuláry**
- **Periplanatické okuláry**
- **Kompenzační okuláry**
- **Projektivy**

**Samostudium !!!!**

# Varianty optického mikroskopu

- Pozorování ve světlém a temném poli
- Stereomikroskop (dva mikroskopy se samostatnými objektivy i okuláry, jejichž optické osy svírají úhel např.  $15^\circ$ ) - 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

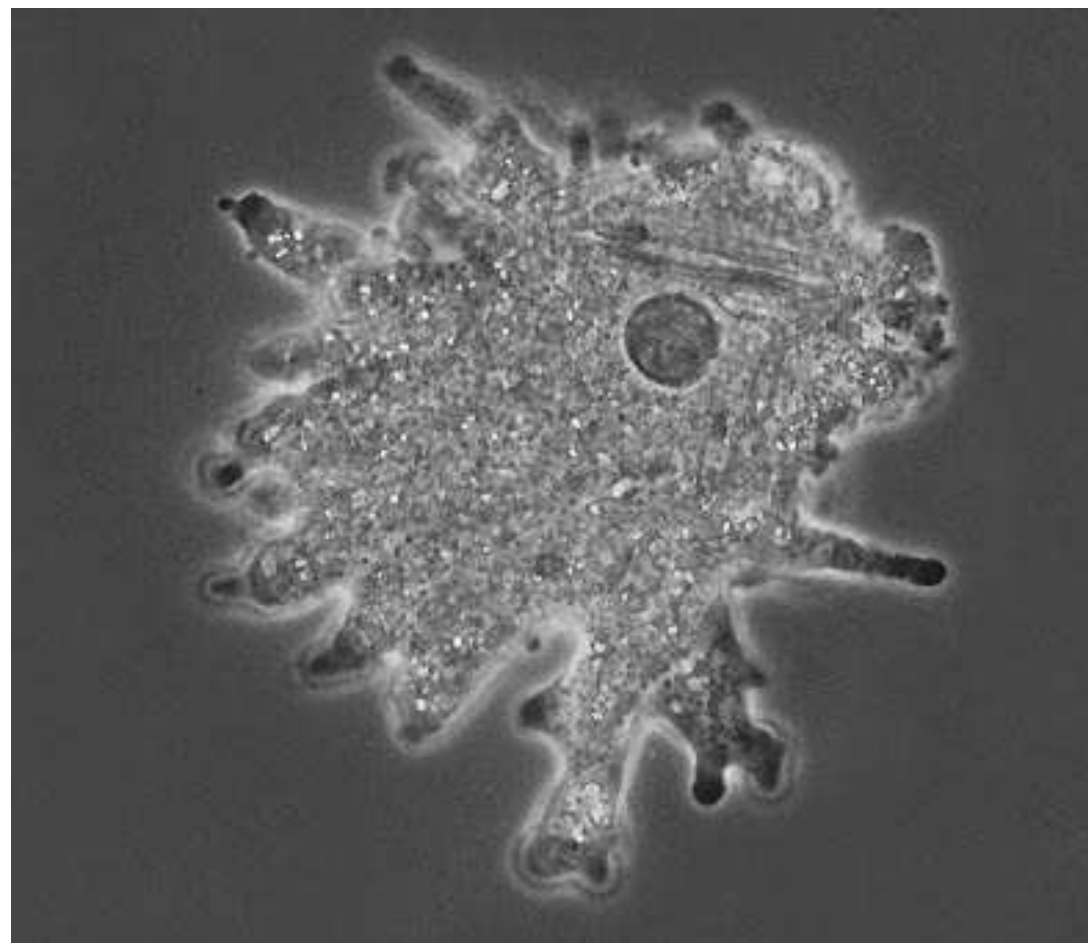
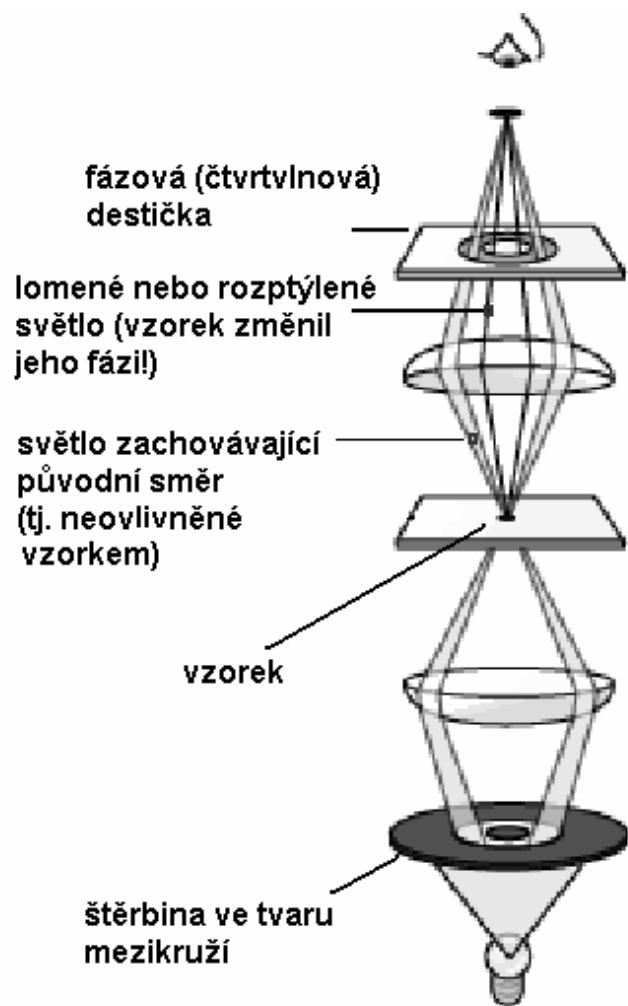


•The **OPMI® Vario/NC 33** surgical microscope

# 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](http://www.durr.demon.co.uk/colour.html).

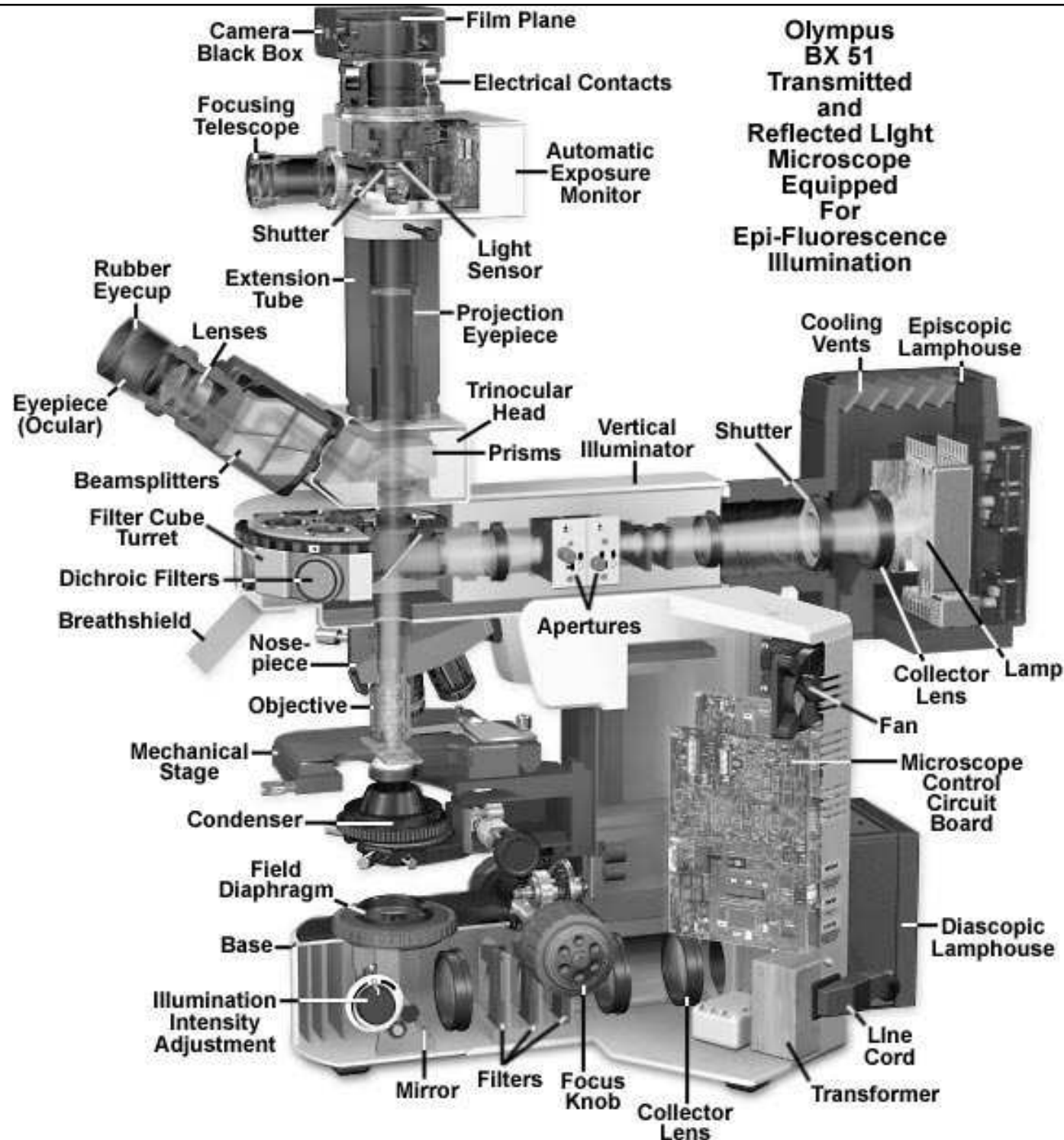
Podle  
<http://www.nobel.se/physics/educationa/microscopes/phase/>

# Speciální optické mikroskopy - fluorescenční mikroskop

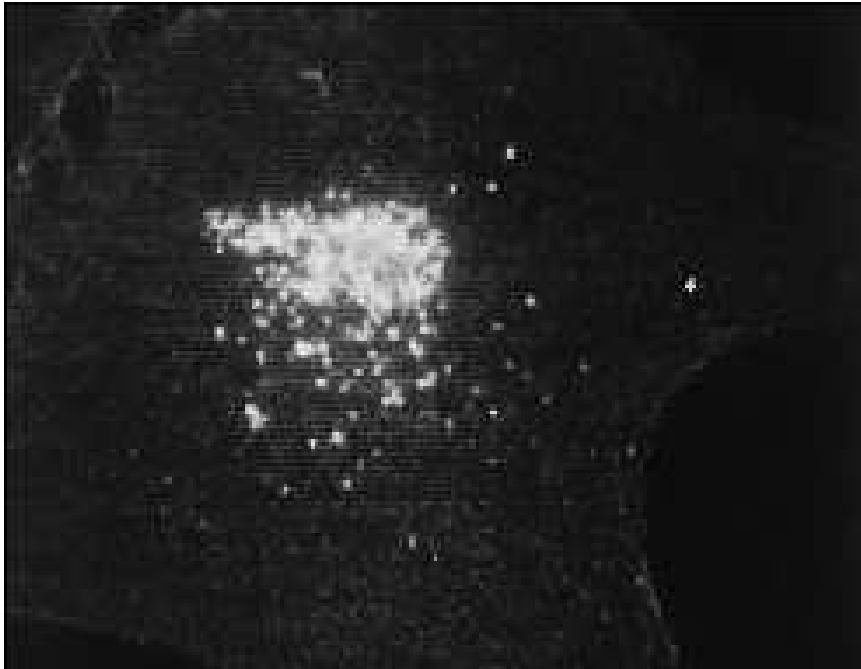
- Fluorescenční mikroskopy využívají schopnosti některých látek emitovat viditelné světlo po ozáření světlem o kratší vlnové délce. Využívá se dlouhovlnného UV záření a přilehlé oblasti viditelného spektra. UV světlu je přizpůsobena optika kondenzoru nebo je UV světlo přiváděno shora, zbytek optického 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.



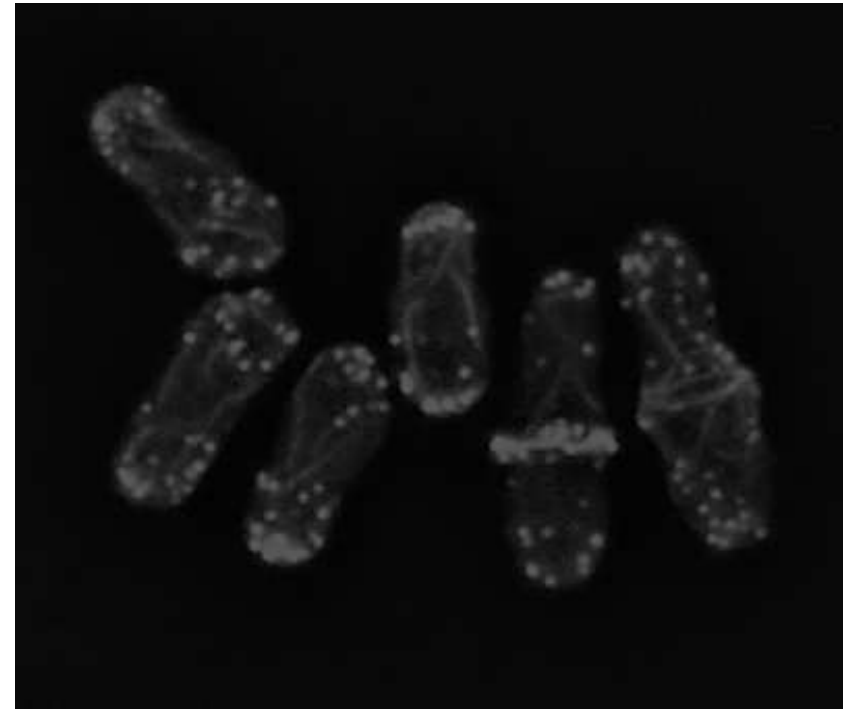
# FM



# fluorescenční mikroskop



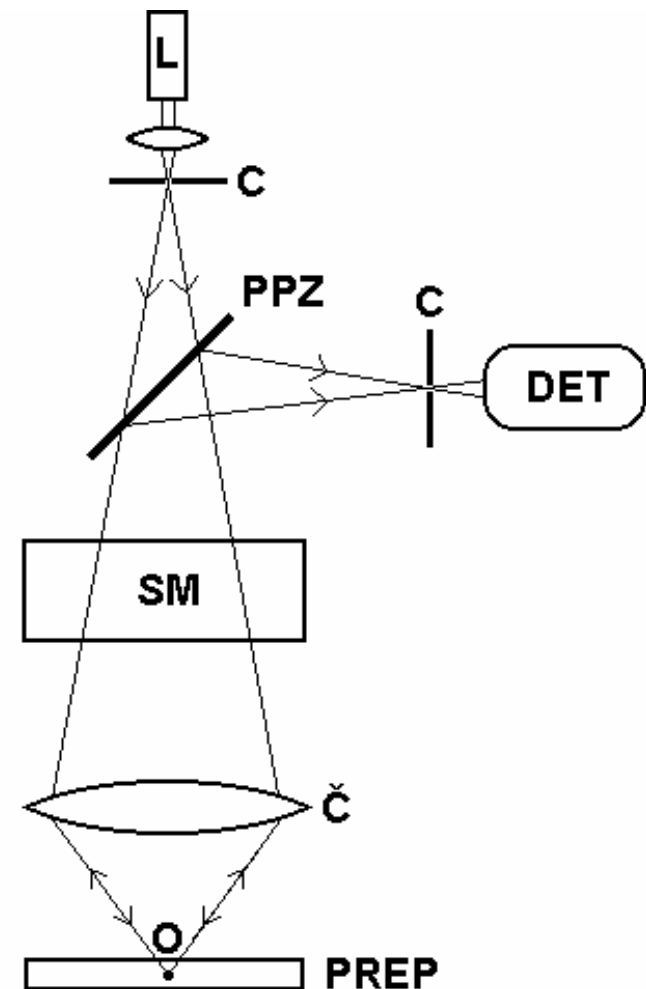
Virové částice v infikované  
buňce -  
<http://usa.hamamatsu.com/sys-biomedical/slc2400/slc-smpl.htm>



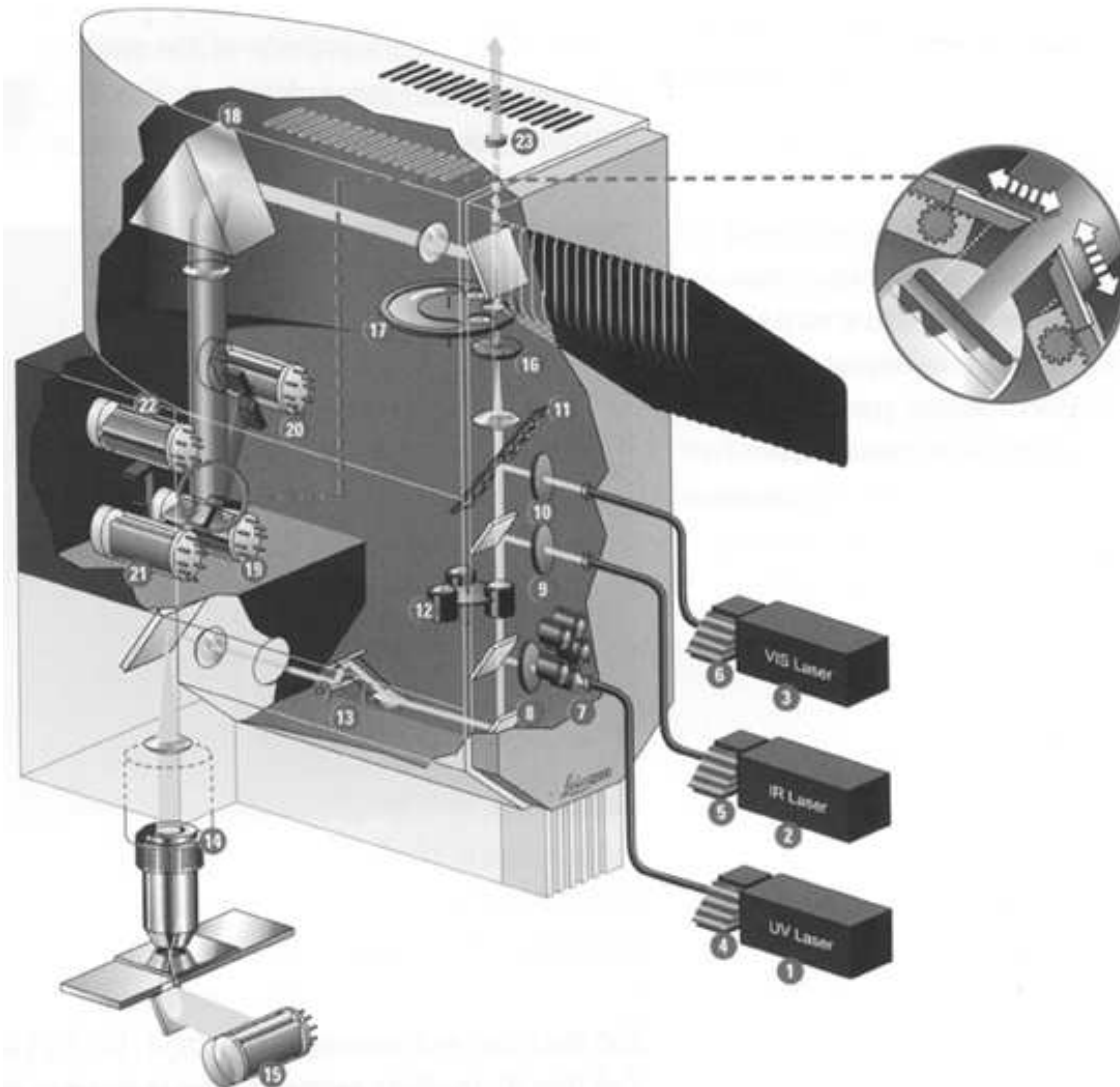
Aktinová vlákna kvasinek zviditelněná  
pomocí fluorescenčního mikroskopu –  
barvení rhodaminem-phalloidinem  
•[www.paulgyoung.com/.../  
fission\\_yeast\\_actin\\_cytoskeleton.htm](http://www.paulgyoung.com/.../fission_yeast_actin_cytoskeleton.htm).

# 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.



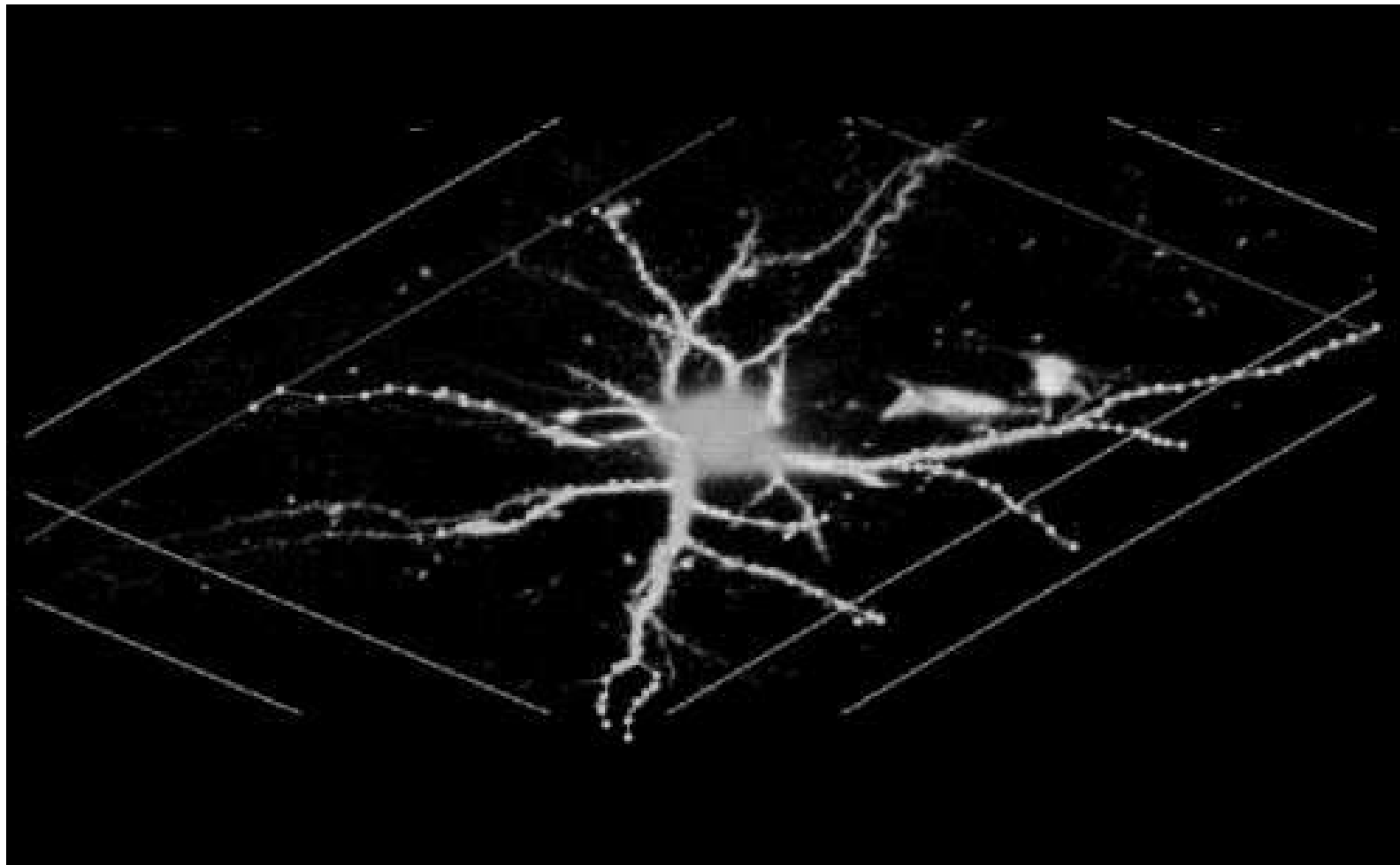
# konfokální řádkovací mikroskop



•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>

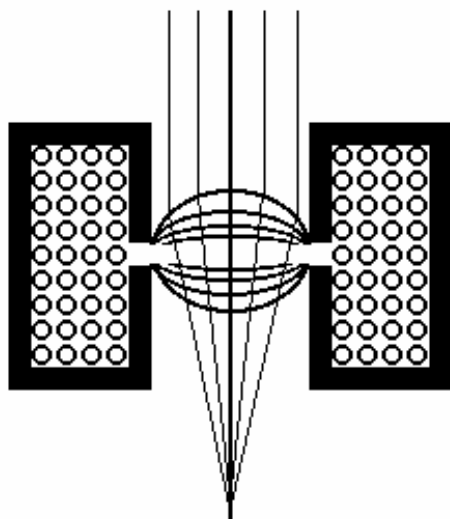
# Elektronová mikroskopie

- „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:

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

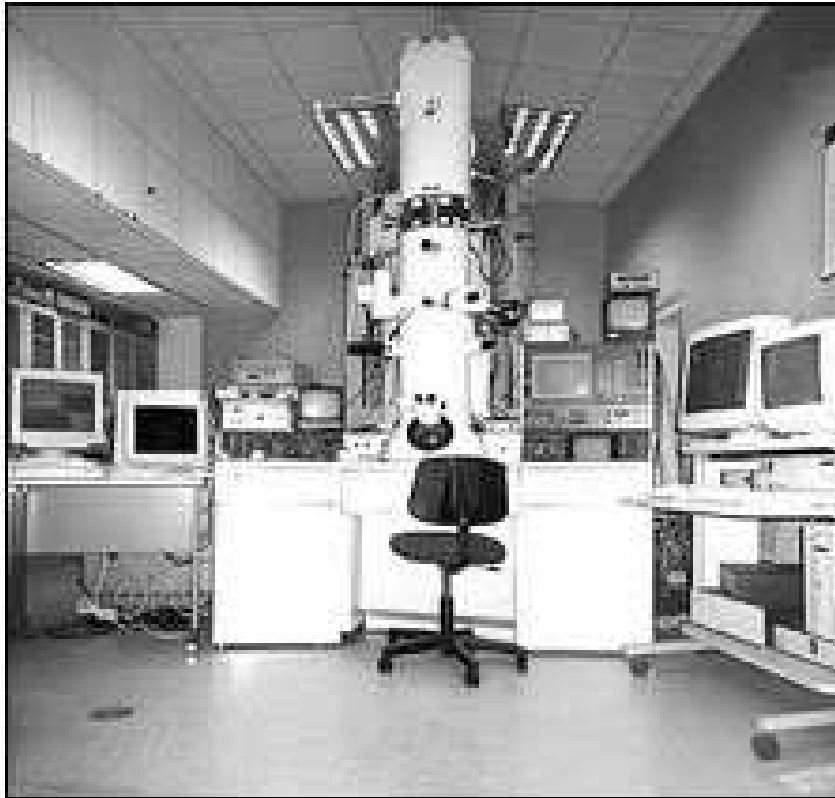
$\lambda$  je vlnová délka,  $h$  Planckova konstanta,  $m$  relativistická hmotnost elektronu,  $v$  jeho rychlost,  $e$  – jeho náboj a  $U$  urychlovací napětí. Mají-li zobrazované předměty velikost srovnatelnou s  $\lambda$ , začne docházet k ohybovým jevům, které zobrazení znemožní. Vysokým urychlením elektronů lze dosáhnout řádově  $10^5$ -krát kratších  $\lambda$ . 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



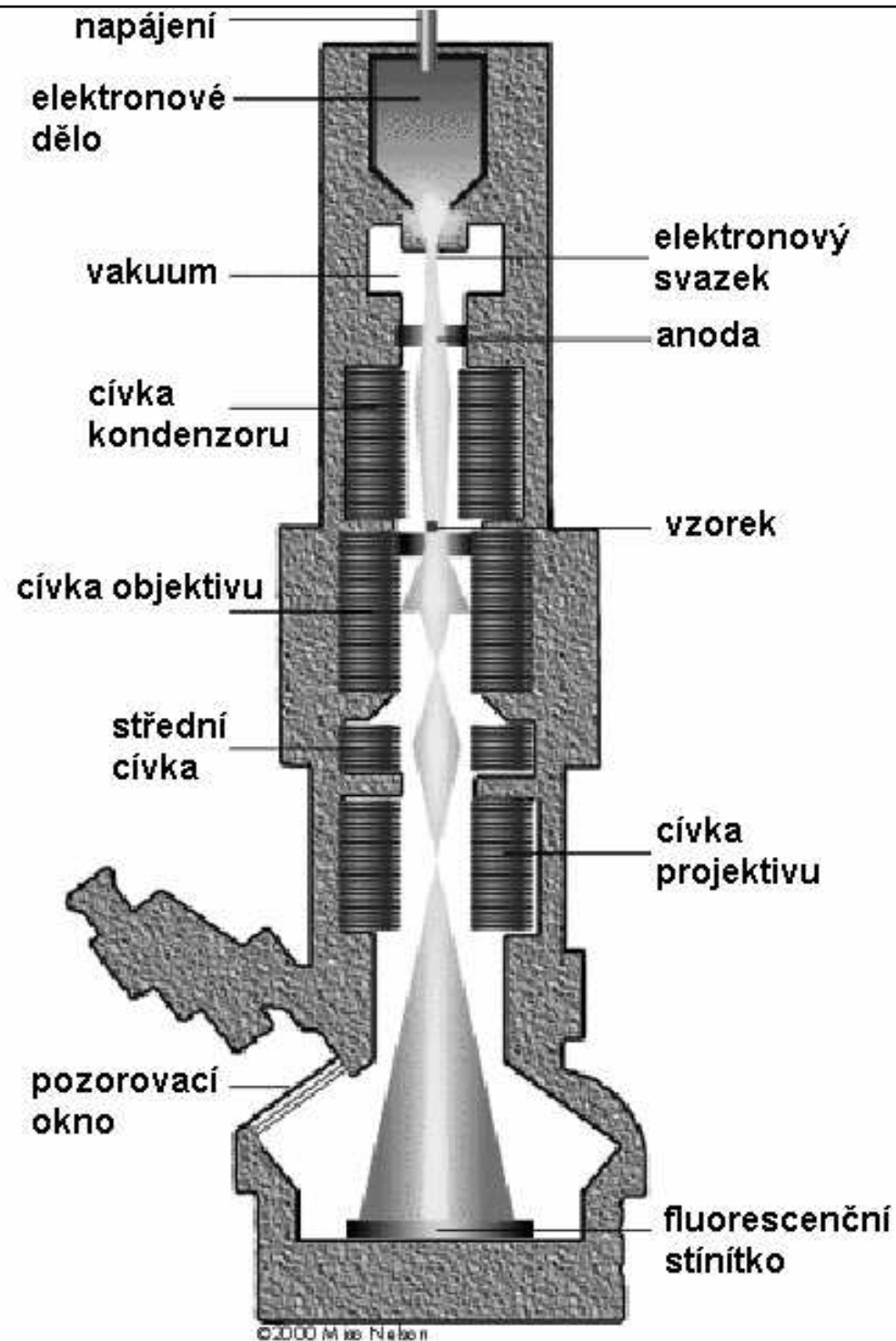
- TEM fy  
Brookhaven –  
zvětšení 50 000 000x,  
rozlišení 0,1 nm, možná  
rentgenová spektrometrie  
pro chemickou analýzu  
vzorků



# TEM – transmisní elektronový mikroskop

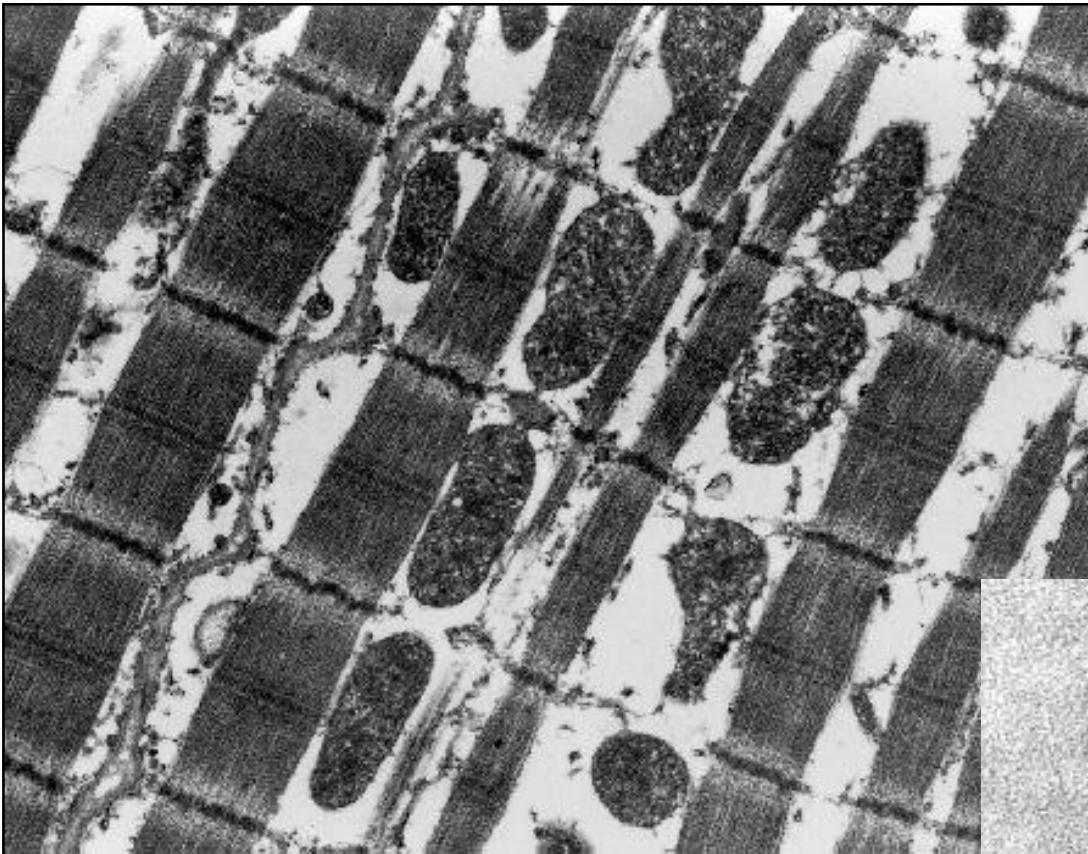
podle:

<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).

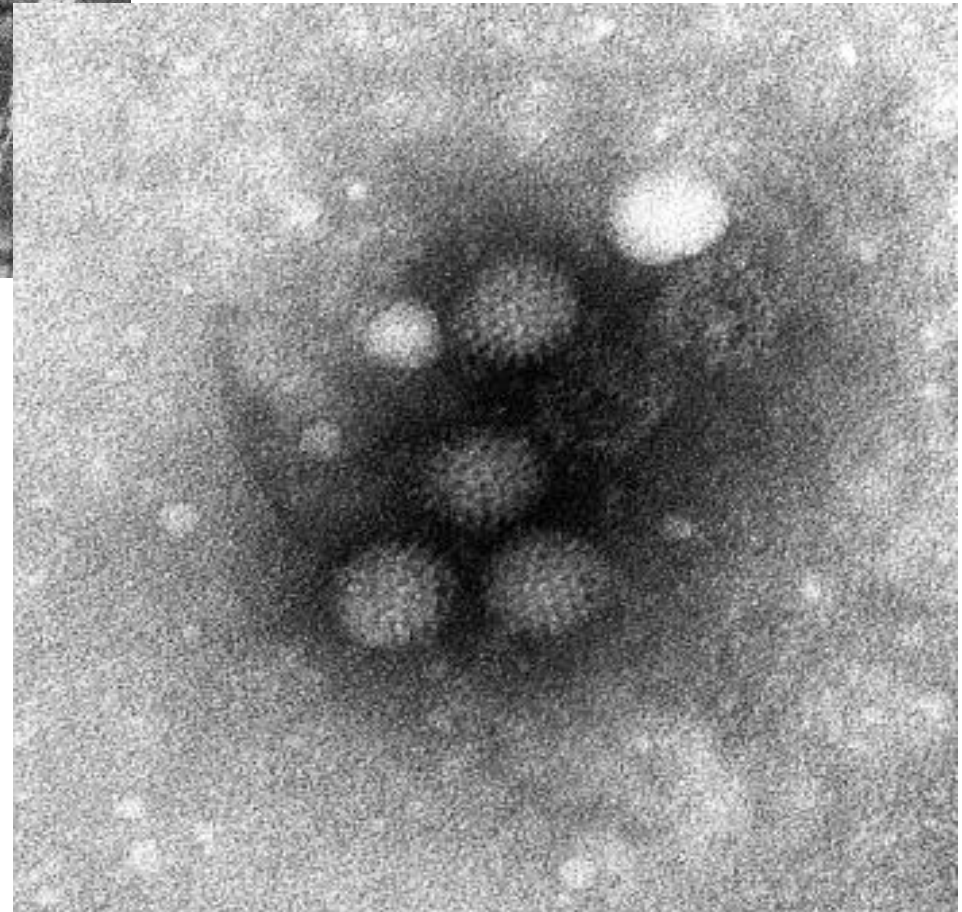


# TEM -

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

Buňky břišního svalu ↑

Corona virus v negativním  
barvení →



# SEM – řádkovací (skenovací) elektronový mikroskop



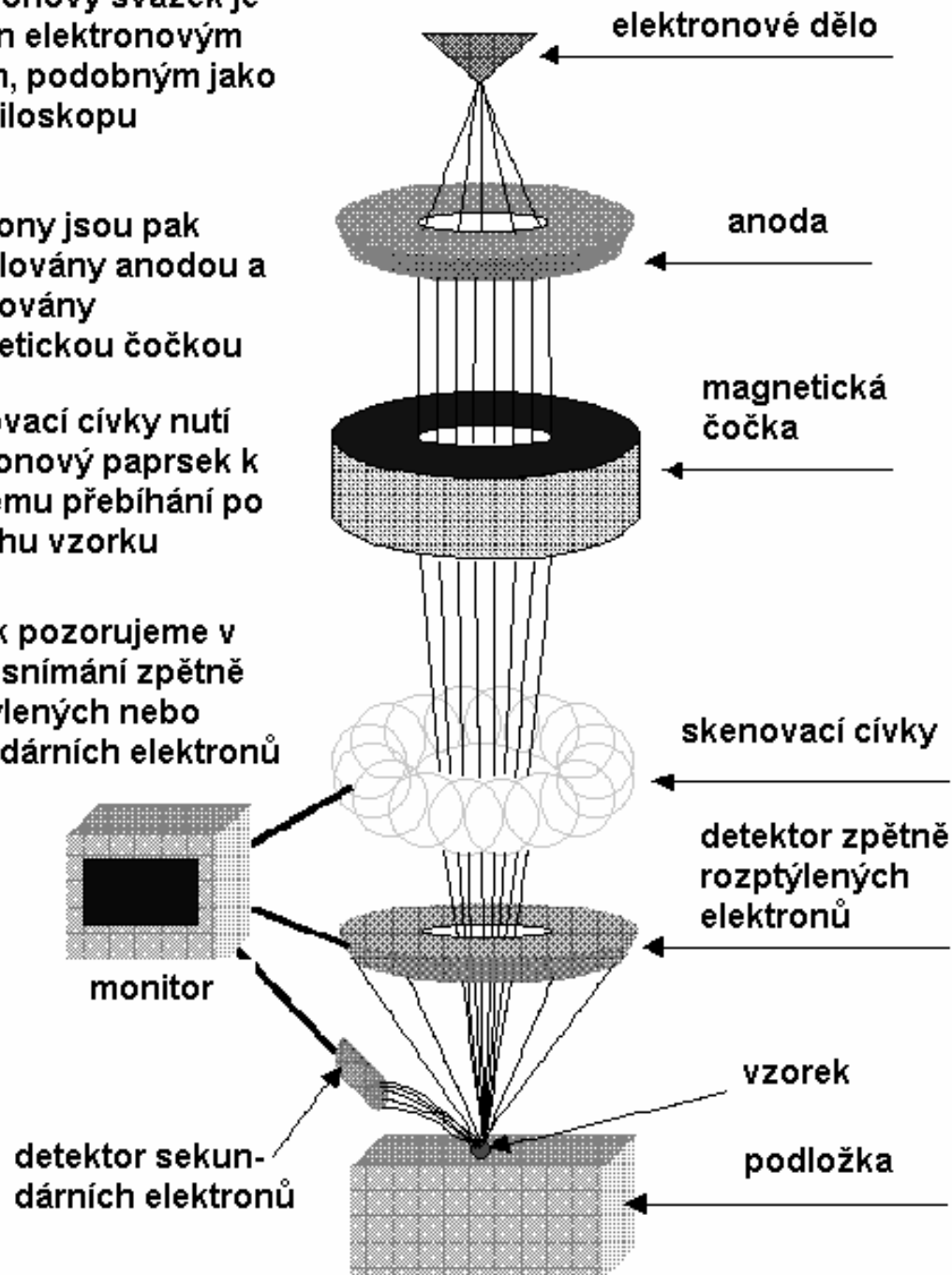
# SEM

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>

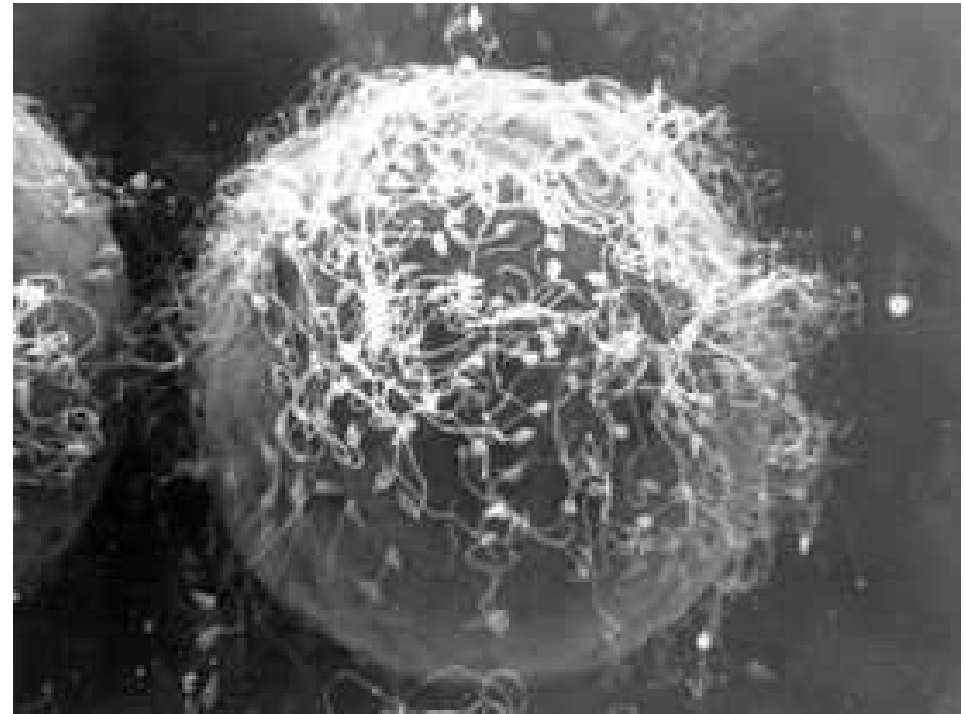


- Detail nohy mravence v SEM -

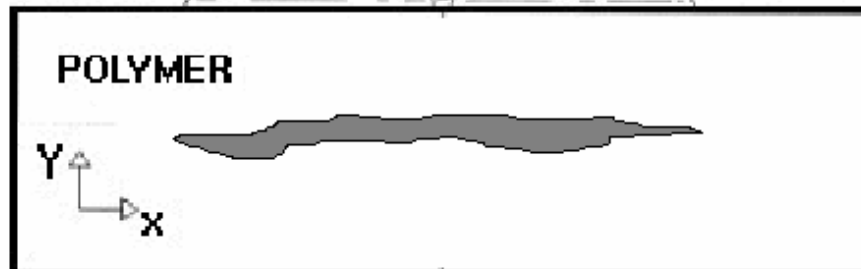
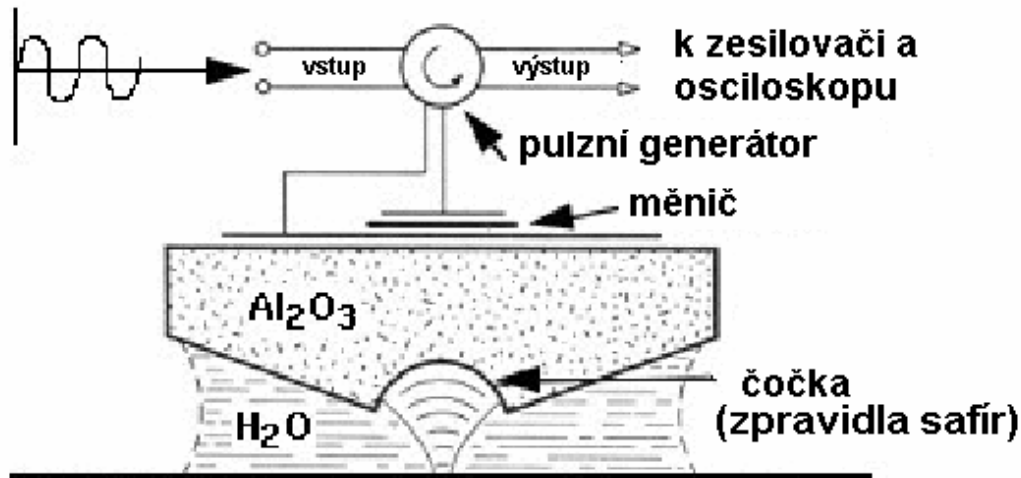
<http://www.wtn.org/ss/story.phtml?storyId=33&type=EdOutreach>

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

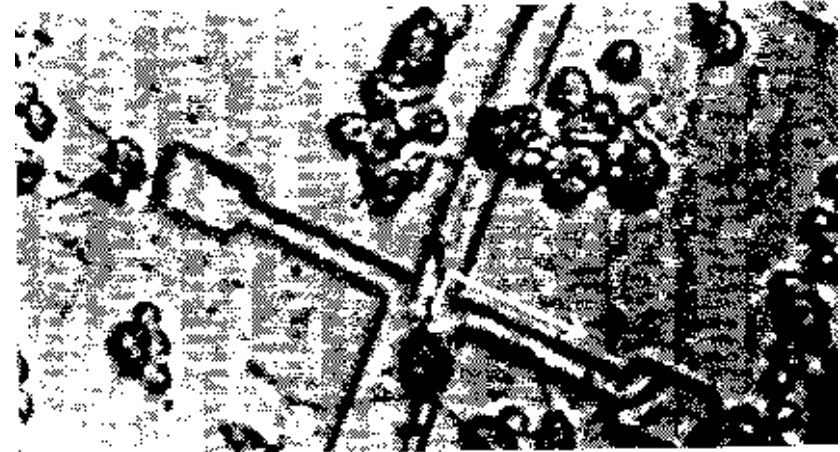
<http://www.stanford.edu/dept/news/report/news/august9/sperm-89.html>



# Akustický mikroskop



•Podle  
[http://www.sv.vt.edu/comp\\_sim/sam/full.gif](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!!!**

