

Ćwiczenie nr 1 Obrazowanie tkanek w świetle spolaryzowanym

ZAGADNIENIA WSTĘPNE:

- Stany polaryzacji światła
- Stopień polaryzacji liniowej światła (definicja, technika pomiaru)
- Prawo Malusa i jego wykorzystanie
- Współczynnik odbicia i transmisji
- Układ polaryskopowi
- Podstawy mikroskopii optycznej

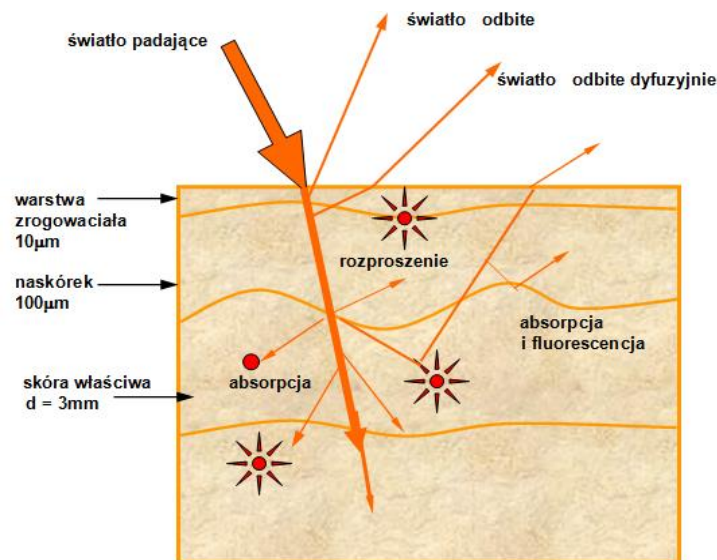
CEL ĆWICZENIA:

- *Eksperymentalna analiza zmiany stanu polaryzacji światła w wyniku propagacji wiązki świetlnej przez tkankę.*
- *Zapoznanie się z techniką obrazowania preparatów tkankowych w układzie polaryskopowym.*
- *Obserwacja struktur powierzchniowych tkanek w świetle obitym z wykorzystaniem układu polaryskopowego.*
- *Analiza właściwości transmisyjno-odbiciowych preparatów tkankowych .*

1. WPROWADZENIE

Oddziaływanie światła ze strukturami biologicznymi jest w gruncie rzeczy podobne do oddziaływania z materią nieżywioną. W każdym przypadku mamy do czynienia z występowaniem klasycznych zjawisk optycznych takich, jak odbicie, załamanie, absorpcja czy rozpraszanie światła, które towarzyszą propagacji promieniowania świetlnego przez różnego rodzaju ośrodki materialne (patrz **Rys. 1**). Właściwości optyczne tkanek zależą od długości fali promieniowania świetlnego np. warstwa zrogowaciała naskórka dla promieniowania UV-C ma współczynnik absorpcji na poziomie 6000 cm^{-1} , co powoduje zmniejszenie głębokości

penetracji podczas, gdy wewnętrzne struktury tkankowe pozbawione absorberów UV –C charakteryzują się dość wysokim poziomem transmisji tego rodzaju promieniowania. Z tych też powodów uzyskanie informacji na temat właściwości optycznych tkanek (np. współczynnika transmisji, odbicia, rozpraszania, absorpcji lub tłumienia) umożliwi dobór odpowiednich parametrów w celu osiągnięcia zamierzonych efektów terapeutycznych lub diagnostycznych.



Rys. 1 Schematyczne przedstawienie procesów oddziaływania światła z tkanką [1].

Na granicy ośrodków o różnych współczynnikach załamania następuje odbicie promieniowania, zatem światło propagujące w powietrzu o współczynniku załamania równym $n \cong 1$, podając na powierzchnię tkanki o współczynniku załamania $n \cong 1,38$ ulega odbiciu. Współczynnik załamania tkanek miękkich wynosi około $1,38 - 1,41$, a tkanek bogatych w tłuszcz $n=1,45$. W zależności od stanu powierzchni obserwujemy dwa rodzaje tego zjawiska: odbicie zwierciadlane, wówczas, gdy mamy do czynienia z gładką powierzchnią, i/lub odbicie dyfuzyjne powstające w wyniku wielokrotnych odbić i rozpraszania światła na niejednorodnościach w objętości tkanki i na jej powierzchni. W wyniku odbicia zwierciadlanego tracimy bezpowrotnie od kilku do kilkunastu procent natężenia padającej wiązki świetlnej. Proces ten wynika z odbicia Fresnela wskutek różnicy współczynników załamania pomiędzy powietrzem a tkanką. Ilościowo zjawisko to można określić przez stosunek amplitudy fali odbitej A_o do amplitudy fali padającej A_p w następujący sposób:

$$\left(\frac{A_o}{A_p}\right)^2 = \left[\frac{\operatorname{tg}(\alpha - \beta)}{\sin(\alpha + \beta)}\right]^2 \cdot [\cos^2 \varphi \cos^2(\alpha + \beta) + \sin^2 \varphi \cos^2(\alpha - \beta)]$$

gdzie kąty α i β oznaczają odpowiednio kąt padania i załamania. Kąt załamania może być wyznaczony zgodnie z prawem załamania $\sin\beta/\sin\alpha=n_1/n_2$. Dla światła niespolaryzowanego $\cos^2\varphi=\sin^2\varphi=0,5$. Parametry n_1 oraz n_2 oznaczają natomiast współczynniki załamania odpowiednio powietrza i tkanki. Współczynnik odbicia charakteryzujący ilościowo zjawisko odbicia jest zdefiniowany w następujący sposób

$$R = \left(\frac{A_o}{A_p}\right)^2.$$

Eksperymentalnie wyznaczyć go można za pomocą bezpośrednich pomiarów gęstości mocy wiązki oświetlającej tkankę oraz gęstości mocy wiązki wyjściowej. Często parametr ten wyraża się w procentach.

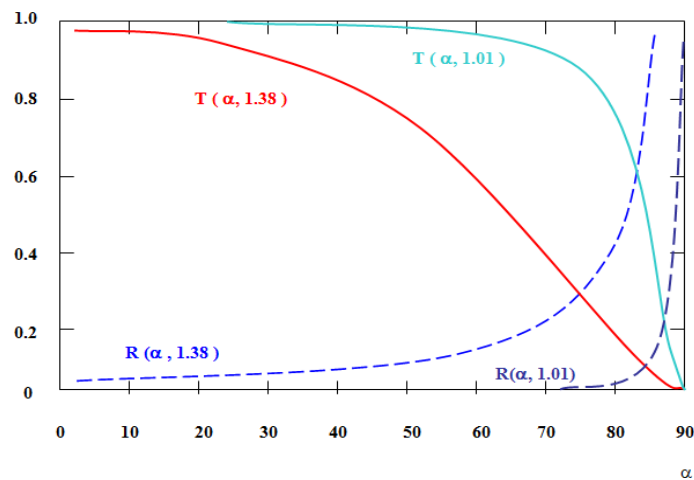
Jeżeli światło propagujące w ośrodku o współczynniku załamania n_1 pada na powierzchnię tkanki o współczynniku załamania n_2 , w wyniku istnienia różnicy współczynników załamania ośrodków ($n_2 \neq n_1$), mamy do czynienia z załamaniem się wiązki świetlnej na granicy ośrodków, co prowadzi do zmiany kierunku rozchodzenia się promieniowania. Zjawisko to jest szczególnie dobrze widoczne w ośrodkach przezroczystych takich, jak np. gałka oczna. Ilościowo to zjawisko opisać można poprzez stosunek amplitudy fali załamanej A_z do amplitudy fali padającej A_p zgodnie z relacjami Fresnela:

$$\left(\frac{A_z}{A_p}\right)^2 = \left[\frac{4\cos\alpha \cdot \sin\beta}{\sin(\alpha + \beta)\cos(\alpha - \beta)}\right]^2 \cdot [\cos^2 \varphi + \sin^2 \varphi \cos^2(\alpha - \beta)]$$

Do opisu tego zjawiska przydatny jest też współczynnik transmisji

$$T = n \left(\frac{A_z}{A_p}\right)^2$$

gdzie n jest względnym współczynnikiem załamania światła. Współczynnik transmisji można również wyznaczyć eksperymentalnie poprzez bezpośredni pomiar gęstości mocy wiązki oświetlającej tkankę oraz wiązki wyjściowej transmitowanej przez nią. Jednocześnie należy zauważyć, że współczynnik transmisji światła przez tkankę znacznie spada wraz ze wzrostem kąta nachylenia padającej wiązki świetlnej. Osiąga on wartość zerową dla prostopadłego oświetlenia powierzchni tkanki (90 stopni w stosunku do normalnej do powierzchni tkanki), ponieważ wówczas natężenie wiązki wyjściowej zbliża się do wartości minimalnej (patrz Rys. 2).

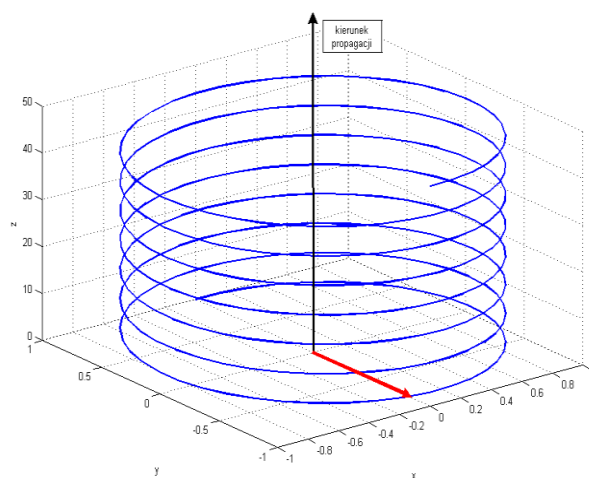


Rys. 2 Zależność współczynnika transmisji $T(\alpha)$ i odbicia $R(\alpha)$, jako funkcji kąta padania α względem normalnej do powierzchni oświetlanej tkanki. Założone wartości współczynników załamania wynoszą w pierwszym przypadku : $n_1=1$ $n_2=1,38$ (wartość typowa dla tkanki), a w drugim przy znacznie mniejszej różnicy między nimi $n_1=1$ i $n_2=1.01$ (na podstawie [1])

Uwzględnienie tych zjawisk, jak również rozpraszania i absorpcji światła, jest niezwykle istotne z punktu widzenia zastosowania światła w diagnostyce i terapii medycznej, gdzie konieczne jest zachowanie odpowiedniej kierunkowości oraz parametrów energetycznych wiązki świetlnej, która musi dotrzeć do rozważanych struktur anatomicznych tkanek.

Jak wiadomo światło jest promieniowaniem elektromagnetycznym o długościach fali należących do widzialnego zakresu spektralnego, czyli dostrzegalnego przez oko ludzkie. Jednak w optyce do tej kategorii zalicza się również promieniowanie ultrafioletowe oraz podczerwone. Fala świetlna jest falą poprzeczną tzn. wektor natężenia pola elektrycznego oraz natężenia pola magnetycznego drgają we wzajemnie prostopadłych kierunkach

i jednocześnie w płaszczyźnie prostopadłej do kierunku propagacji. W przypadku występowania regularności oraz okresowości w odniesieniu do kierunku i sposobu drgań wektora natężenia pola elektrycznego, możemy mówić o różnych stanach polaryzacji światła. Wyróżniamy między innymi: polaryzację eliptyczną (patrz **Rys. 3**) oraz jej szczególne przypadki, czyli polaryzację kołową lub liniową. Z kolei, gdy wektor natężenia pola elektrycznego drga w sposób losowy we wszystkich możliwych kierunkach, spośród których żaden nie jest w jakikolwiek sposób wyróżniony, mamy wówczas do czynienia z światłem niespolaryzowanym.



Rys. 3 Fala świetlna spolaryzowana eliptycznie (czerwona strzałka oznacza początkowy wektor natężenia pola elektrycznego).

W ogólnym przypadku wektor natężenia pola elektrycznego można przedstawić, jako sumę jego dwóch składowych względem osi x i y :

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_X + \mathbf{E}_Y$$

gdzie

$$\mathbf{E}_X(z, t) = \mathbf{E}_{OX} \exp(i[\omega t - (kz + \delta_{OX})]) = \mathbf{E}_{OX} \exp(i[\omega t - \delta_x]),$$

$$\mathbf{E}_Y(z, t) = \mathbf{E}_{OY} \exp(i[\omega t - (kz + \delta_{OY})]) = \mathbf{E}_{OY} \exp(i[\omega t - (kz + \delta_Y)]).$$

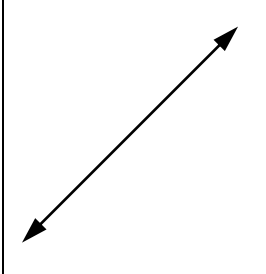
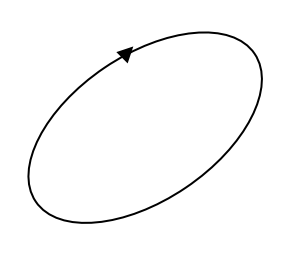
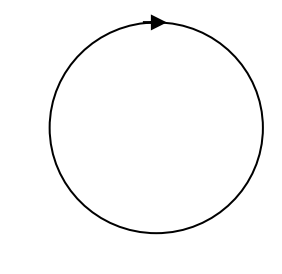
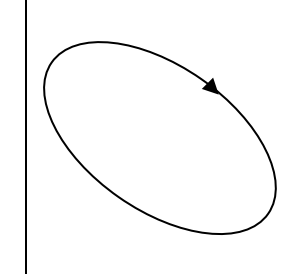
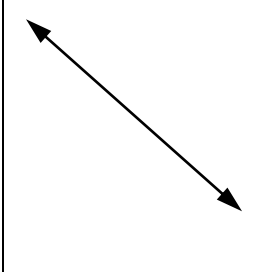
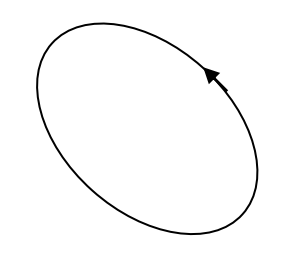
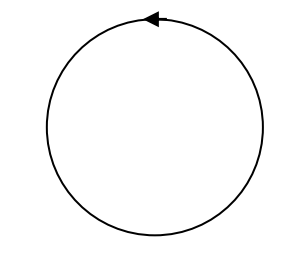
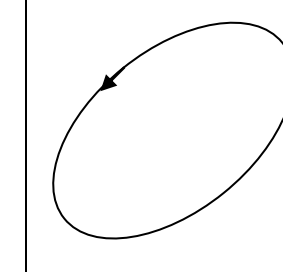
\mathbf{E}_{OX} , \mathbf{E}_{OY} oznaczają amplitudy wektora natężenia pola elektrycznego względem osi x i y , δ_{OX} , δ_{OY} , fazy w początku układu współrzędnych dla $t=0$, natomiast δ_x , δ_Y fazy w tym samym

czasie, ale w płaszczyźnie $z = \text{const}$. Po cofnięciu początku biegu czasu o $T\delta_x / 2\pi$ (T- okres) uzyskujemy

$$\mathbf{E}_x = \mathbf{E}_{0x} \cos(\omega t),$$

$$\mathbf{E}_y = \mathbf{E}_{0y} \cos(\omega t + \delta),$$

gdzie $\delta = \delta_x - \delta_y$. W zależności od wartości różnicy faz δ pomiędzy dwiema składowymi wektora natężenia pola elektrycznego możemy uzyskać różne stany polaryzacji światła .

$\delta = 0$ lub $\delta = 2\pi$	$0 < \delta < \pi/2$	$\delta = \pi/2$	$\pi/2 < \delta < \pi$
			
$\delta = \pi$	$\pi < \delta < 3\pi/2$	$\delta = 3\pi/2$	$3\pi/2 < \delta < 2\pi$
			

Rys. 4 Zmiana polaryzacji światła wraz ze wzrostem wartości różnicy faz δ .

Wiązki świetlne generowane przez rezonatory laserowe charakteryzują się liniową polaryzacją, dlatego analiza liniowych stanów polaryzacyjnych odgrywa szczególnie ważną rolę w wykorzystaniu światła laserowego w diagnostyce medycznej. Często liniową polaryzację wiązek laserowych wykorzystuje się w obrazowaniu struktur biologicznych. Gdy liniowo spolaryzowana wiązka świetlna pada na powierzchnię zrogowaciała naskórka, część światła odbitego od tej powierzchni (ok. 5% natężenia wiązki wejściowej) zachowuje swój stan polaryzacji, również część światła (ok. 2% natężenia wiązki wejściowej) odbitego na granicy warstw na granicy naskórka i skóry właściwej zachowuje wysoki stopień polaryzacji. Pozostała część wnika w skórę właściwą, lecz staje się całkowicie niespolaryzowana lub

pozostaje częściowo spolaryzowana. Efekt ten jest często wykorzystywany w dermatoskopach służących do diagnostyki stanu skóry.

Wykorzystując układ polaryskopowy, składający się z pary polaryzatorów liniowych (odpowiednio polaryzatora i analizatora), pomiędzy którymi umieszcza się badaną próbkę, możliwy jest pomiar właściwości wierzchnich warstw skóry, znamion barwnych, rumieni itp. przy równoległym ustawieniu osi transmisji polaryzatora. Natomiast przy prostopadle ustawionych osiach polaryzatora (krzyż polaryzacyjny) możliwa jest obserwacja struktur pod powierzchnią naskórka bez zmarszczek i porów.

Układ taki pozwala między innymi na wyznaczenie kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego wiązki laserowej, jej stopnia polaryzacji liniowej, jak również dokładnego scharakteryzowania gęstości mocy poszczególnych składowych stanów polaryzacji wiązki wejściowej. Natężenie – gęstość mocy I wiązki świetlnej po przejściu przez polaryzator liniowy można wyznaczyć na podstawie znajomości gęstości mocy wiązki wejściowej I_0 oraz kąta θ pomiędzy osią transmisji polaryzatora oraz kierunkiem drgań wektora natężenia pola elektrycznego wiązki padającej na polaryzator, z prawa Malusa, które opisuje poniższa zależność:

$$I = I_0 \cos^2 \theta.$$

Oczywistym jest, iż wiązka światła niespolaryzowanego padająca na polaryzator liniowy ulega polaryzacji, gdyż polaryzator przepuszcza tylko tę składową wiązki wejściowej dla której kierunek drgań wektora natężenia pola elektrycznego jest zgodny z jego osią transmisji. Tym samym korzystając z polaryzatora możemy spolaryzować każdą wiązkę świetlną.

W celu określenia P_L stopnia polaryzacji wiązki laserowej spolaryzowanej liniowo przechodzącej przez dany ośrodek optyczny wykorzystać można następującą zależność:

$$P_L = \left| \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \right|,$$

gdzie I_{\parallel} oznacza gęstość mocy wiązki laserowej, gdy osie transmisji dwóch polaryzatorów są równoległe (uzyskujemy maksymalną gęstość mocy promieniowania laserowego), a I_{\perp} oznacza gęstość mocy wiązki laserowej, gdy osie transmisji polaryzatorów są prostopadłe (tzn. uzyskujemy minimalną wartość gęstości mocy).

2. PROGRAM ĆWICZENIA

Studenci będą mieli za zadanie zapoznać się z jedną z głównych technik obrazowania optycznego opartego na mikroskopii optycznej częściowo transparentnych preparatów tkankowych oraz analizie światła odbitego w układzie polaryskopowym, która jest powszechnie wykorzystywana w diagnostyce medycznej, szczególnie dermatologii (dermatoskopii). Prowadzący udostępni Studentom próbki preparatów tkankowych, które należy umieścić w odpowiednich oprawach. Następnie należy przeprowadzić pomiary zgodnie z przedstawionym poniżej harmonogramem ćwiczenia.

ZESTAW PRZYRZĄDÓW

Studenci w tej części ćwiczenia korzystać będą z następujących elementów:

- mikroskop optyczny,
- lampa halogenowa,
- oświetlacz pierścieniowy,
- układu dwóch polaryskopów,
- kamera CCD USB 2.0 wraz z obiektywem
- zestaw polaryzatorów liniowych

ZADANIA POMIAROWE I OPRACOWANIE WYNIKÓW

(A) Obserwacja wybranych preparatów tkankowych w mikroskopie optycznym

Schemat mikroskopu oraz objaśnienie poszczególnych jego elementów składowych zostały przedstawione na **Rys. 5**. Na stoliku należy ułożyć szkiełko nakrywkowe, a na nim otrzymane do Prowadzącego preparaty tkankowe, które będą analizowane. Studenci będą mieli za zadanie uzyskać ostry obraz badanych próbek tkanek poprzez odpowiednią regulację pokręteł przesuwu pionowego i poziomego w obu trybach pracy mikroskopu tzn. transmisyjnym oraz odbiciowym (w zależności od przezroczystości próbki). Obserwacja tkanek wykonywana będzie za pomocą mikroskopu optycznego Bresser Biolux wyposażonego w kamerę USB, która umożliwi zachowywanie obrazu preparatu oraz

nagranie filmu. Mikroskop pozwala na obserwację w świetle przechodzącym i odbitym oraz na wykonywanie zdjęć pojedynczych lub seryjnych (co 5 sekund). Trzy obiektywy (4x, 10x i 40x) w połączeniu z okulem (10x) pozwalają uzyskać powiększenia 40x, 100x i 400x. Maksymalna rozdzielczość uzyskiwanych zdjęć to: 2048 x 1536 (inne dostępne rozdzielczości zdjęć: 640 x 480, 800 x 600, 1024 x 768, 1280 x 960, 1600 x 1200, 2048 x 1536).



Rys. 5 . Mikroskop optyczny Bresser.

Budowa mikroskopu optycznego Bresser:

1. Okular
2. Tubus.
3. Uchwyt obiektywów.
4. Obiektywy.
5. Oświetlenie górne LED.
6. Pokrętko ustawiania ostrości.
7. Pokrętko przesuwu stolika do przodu i tyłu.
8. Pokrętko przesuwu stolika w lewo i prawo.
9. Zespół oświetlacza.
10. Oświetlacz transmisyjny.
11. Zespół oświetlacza.
12. Podstawa.
13. Zestaw kolorowych filtrów.
14. Przełącznik wyboru trybu oświetlenia.
15. Pokrętko regulacji natężenia oświetlenia.

Oświetlenie próbek (górne i dolne) zapewniają diody LED emitujące światło białe. Natężenie promieniowania emitowanego przez diody może być regulowane za pomocą odpowiednich pokręteł. Przełącznik wyboru oświetlenia umożliwia przeprowadzanie badań w świetle:

- **przechodzącym** - w tym trybie dokonuje się obserwacji przedmiotów przezroczystych. Podczas takiej obserwacji światło pada na preparat od spodu. Obraz uzyskany po przejściu światła przez próbkę zostaje powiększony przez soczewki obiektywu i matrycę okularu, a następnie dostaje się do oka. Wiele mikroorganizmów żyjących w wodzie, części roślin i najmniejszych części organizmów zwierzęcych charakteryzuje się naturalną przejrzystością, inne wymagają jednak specjalnego spreparowania.
- **odbitym** - w tym trybie dokonuje się obserwacji przedmiotów nieprzezroczystych. Podczas takiej obserwacji światło pada na obserwowany przedmiot, zostaje od niego odbite, a następnie po przejściu przez układ optyczny mikroskopu dostaje się do oka.
- **przechodzącym i odbitym jednocześnie** - w tym trybie dokonuje się obserwacji semi-kolorowych preparatów. Ten tryb nie jest zalecany dla przepuszczających światło obiektów na szkiełkach mikroskopowych, gdyż powoduje odbijanie światła od preparatu.

Ustawienia przełącznika trybu oświetlenia:

- położenie "I" - podświetlenie preparatu od dołu (światło przechodzące)
- położenie "II" - oświetlenie górne (światło odbite)
- położenie "III" - oświetlenie górne i dolne jednocześnie.

Różne tryby oświetlenia z regulacją natężenia każdego z nich umożliwiają dobór odpowiednich dla danego preparatu warunków oświetlenia.

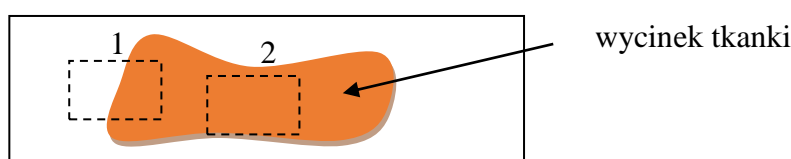
Obrotowy zestaw kolorowych filtrów poniżej stolika mikroskopu jest użyteczny podczas oglądania jasnych, barwionych preparatów. W osi optycznej mikroskopu należy ustawić odpowiedni rodzaj filtra dobrany od obserwowanego obiektu.

Po przygotowaniu mikroskopu do pracy należy włączyć komputer i przez port USB podłączyć do niego umieszczoną w mikroskopie kamerę. Następnie na pulpicie należy utworzyć swój folder (np. Imię_Nazwisko) i uruchomić program Webcam VideoCap (skrót na pulpicie). Po uruchomieniu programu należy ustawić ścieżkę zapisu rejestrowanych obrazów.

W tym celu należy z zakładki File wybrać Set Capture File Folder, następnie wybrać swój folder i zatwierdzić.


Rejestracji obrazów dokonuje się poprzez wybór opcji SnapShot z zakładki Capture. Obraz w postaci pliku JPG zostanie zapisany w wybranym wcześniej folderze.

Należy zarejestrować obrazy tkanek w dwóch trybach pracy mikroskopu: w świetle przechodzących oraz odbitym, co pozwoli na analizę jakościową ich właściwości transmisyjno-odbiciowych. Zgodnie z rysunkiem poniżej należy zarejestrować obrazy wycinków wybranych preparatów tkankowych na krawędzi (1) oraz wewnątrz obszaru zajmowanego przez tkankę (2).




Rys. Rejestracja obrazów preparatów tkankowych

W sprawozdaniu należy zamieścić te zdjęcia oraz opisać, z czym związane są różnice pomiędzy obrazami zarejestrowanymi w obu trybach pracy mikroskopu.

Dodatkowo korzystając z programu ImageJ, który można pobrać ze strony <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), należy przygotować trójwymiarową reprezentację wybranych struktur tkankowych na podstawie zdjęć zarejestrowanych na mikroskopie w trybie (2). W tym celu należy wybrać zakładkę **Plugins**, a następnie opcję **3D** oraz **Interactive 3D Surface Plot**. W ten sposób utworzone zdjęcia powierzchni tkanek należy również zamieścić w sprawozdaniu oraz dokładnie opisać. Reprezentują one przestrzenny rozkład współczynnika transmitancji oraz refleksyjności tkanek. W przypadku transparentnych preparatów tkankowych na podstawie transmisyjnych zdjęć mikroskopowych należy scharakteryzować właściwości transmisyjne tkanek. W tym celu należy pamiętać o takim zarejestrowaniu obrazu tkanki, aby widoczne było również jej tło. Następnie w programie ImageJ należy opracować przekrój poprzeczny zdjęcia tkanki. W tym celu należy zaznaczyć ikonę  dostępną na Pasku Narzędzi Programu ImageJ, a następnie na zdjęciu zaznaczyć odpowiedni kierunek przekroju. Przeciągając kursor od jednej krawędzi


tkanki do drugiej, w taki sposób, aby linia przechodziła przez tkankę oraz obejmowała również pewien niewielki obszar tła poza nią, wyznaczamy kierunek, wzdłuż którego analizować będziemy profil komórki. Po zaznaczeniu tej linii, należy w zakładce **Analyze** wybrać opcję **Plot Profile**, która pozwoli na określenie profilu obrazu transmisyjnego tkanki. Profile należy zamieścić w sprawozdaniu i za ich pomocą scharakteryzować właściwości transmisyjne analizowanych rodzajów tkanek.

(B) Jakościowa analiza właściwości transmisyjnych wybranych preparatów tkankowych

W przypadku transparentnych preparatów tkankowych na podstawie transmisyjnych zdjęć mikroskopowych należy scharakteryzować właściwości transmisyjne tkanki. W tym celu należy pamiętać o takim zarejestrowaniu obrazu tkanki u ustawieniu (1), aby widoczne było również jej tło (szkiełko przez które światło jest transmitowane w całości). Następnie w programie ImageJ należy opracować przekrój poprzeczny zdjęcia tkanki. W tym celu należy zaznaczyć ikonę  dostępną na Pasku Narzędzi Programu ImageJ, a następnie na zdjęciu zaznaczyć odpowiedni kierunek przekroju. Przeciągając kursor od jednej krawędzi tkanki do drugiej, w taki sposób, aby linia przechodziła przez tkankę oraz obejmowała również pewien niewielki obszar tła poza nią, wyznaczamy kierunek, wzdłuż którego analizować będziemy profil komórki. Po zaznaczeniu tej linii, należy w zakładce **Analyze** wybrać opcję **Plot Profile**, która pozwoli na określenie profilu obrazu transmisyjnego tkanki. Profile należy zamieścić w sprawozdaniu i za ich pomocą scharakteryzować właściwości transmisyjne analizowanych rodzajów tkanek względem szkiełka mikroskopowego, które jest w pełni transparentne dla światła. Należy unormować wykres współczynnika transmitancji względem jego maksymalnej wartości w obszarze niezajmowanym przez tkankę. Oznacza to, iż dostaniemy zależność współczynnika transmisji przyjmującego wartości od 0 do 1, gdzie wartość 1 odpowiada całkowitej transmisji światła przez szkiełko mikroskopowe, a wartości pośrednie transmisji światła przez tkankę.

(C) Jakościowa analiza właściwości odbiciowych wybranych preparatów tkankowych


W przypadku odbiciowych/ nieprzeźroczystych preparatów tkankowych na podstawie odbiciowych zdjęć mikroskopowych należy scharakteryzować właściwości odbiciowe tkanki.

W tym celu należy pamiętać o takim zarejestrowaniu obrazu tkanki u ustawieniu (1), aby widoczne było również jej tło- czarny obszar (obszar szkiełka przez które światło jest transmitowane w całości). Następnie w programie ImageJ należy opracować przekrój poprzeczny zdjęcia tkanki. W tym celu należy zaznaczyć ikonę  dostępną na Pasku Narzędzi Programu ImageJ, a następnie na zdjęciu zaznaczyć odpowiedni kierunek przekroju. Przeciągając kursor od jednej krawędzi tkanki do drugiej, w taki sposób, aby linia przechodziła przez tkankę oraz obejmowała również pewien niewielki obszar tła poza nią, wyznaczamy kierunek, wzdłuż którego analizować będziemy profil komórki. Po zaznaczeniu tej linii, należy w zakładce **Analyze** wybrać opcję **Plot Profile**, która pozwoli na określenie profilu obrazu transmisyjnego tkanki. Profile należy zamieścić w sprawozdaniu i za ich pomocą scharakteryzować właściwości odbiciowe analizowanych rodzajów tkanek względem szkiełka mikroskopowego, które jest w pełni transparentne dla światła. Należy unormować wykres współczynnika odbicia względem jego maksymalnej wartości w obszarze zajmowanym przez tkankę. Oznacza to, iż dostaniemy zależność współczynnika przyjmującego wartości od 0 do 1, gdzie wartość 1 odpowiada maksymalnemu, całkowitemu odbiciu światła przez tkankę, wartość 0 odpowiada całkowitej transmisji, a wartości pośrednie odpowiadają częściowemu odbiciu światła przez tkanki.

(D) Obserwacja wybranych preparatów tkankowych w układzie polaryskopowym w świetle odbitym w zależności od kąta pomiędzy osiami transmisji polaryzatora i analizatora.

Udostępnione przez prowadzącego preparaty tkankowe należy umieścić odpowiednim mocowaniu. Korzystając z lampy halogenowej należy w jednorodny sposób oświetlić powierzchnię tkanki. Pomiędzy źródło światła a badana tkankę należy umieścić polaryzator liniowy. W ten sposób tkanka zostanie oświetlona wiązką światła spolaryzowanego liniowo. Studenci powinni w pierwszej kolejności określić taką konfigurację układu polaryzatorów liniowych (polaryzatora i analizatora), aby uzyskać krzyż polaryskopowi, czyli minimalne natężenie wiązki wyjściowej po przejściu przez polaryzator. Analizator wyposażony jest w podziałkę kątową, które pozwala określić w dokładny sposób kątowe położenie jego osi transmisji. W pierwszej kolejności należy ustawić podziałkę

kątową w pozycji 90 stopni, a następnie obracać sam analizator, aż do momentu uzyskania minimalnego natężenia wyjściowej wiązki świetlnej lub też jej całkowitego wygaszenia. Po uzyskaniu tego warunku, podczas obrazowania w świetle odbitym, należy obracać jedynie oprawą analizatora z podziałką kątową- sam analizator powinien pozostać w niezmienionej pozycji. Obracając analizator obserwujemy powierzchnię tkanki w świetle odbitym i sporządzamy notatki opisujące różnice pomiędzy obrazami tkanki w różnych położeniach analizatora. Za pomocą kamery CCD rejestrujemy obrazy tkanek w świetle odbitym dla trzech położenia osi transmisji analizatora: 0, 45 i 90 stopni względem osi transmisji polaryzatora.. W ten sam sposób analizujemy wszystkie dostępne rodzaje tkanek. Dodatkowo, powyższe pomiary należy przeprowadzić dla różnych zakresów spektralnych wiązki oświetlającej poprzez zastosowanie pasmowych filtrów spektralnych udostępnionych przez Prowadzącego.

W sprawozdaniu należy umieścić wszystkie notatki z obserwacji różnych rodzajów tkanek w świetle odbitym w układzie polaryskopowym, jak również zarejestrowane zdjęcia. Należy skomentować możliwość obserwacji poszczególnych struktur powierzchniowych tkanki w świetle spolaryzowanym. Zarejestrowane zdjęcia badanych próbek należy poddać obróbce w programie ImageJ. W tym celu należy jak najwierniej obrysować oświetlony wycinek tkanki za pomocą funkcji , a następnie wyznaczyć histogram zaznaczonej powierzchni i określić średni stopień szarości obrazu powierzchni tkanki, który może odpowiadać dyskretniej wartości natężenia oświetlenia tej powierzchni. Następnie w tabeli należy przedstawić wartość średniego stopnia szarości oraz jego odchylenia standardowego w zależności od kąta pomiędzy osiami transmisji polaryzatora i analizatora dla wszystkich badanych tkanek. Należy wyjaśnić zmiany wartości średniego stopnia szarości. Dodatkowo, porównać obrazy preparatów tkankowych uzyskanych dla różnych zakresów spektralnych wiązki oświetlającej.

(D) Obserwacja powierzchni skóry w układzie polaryskopowym w świetle odbitym.

Studenci mają za zadanie dokonać obserwacji powierzchni własnej powierzchni skóry w układzie polaryskopowym w świetle odbitym. W tym celu należy skorzystać z układu

optycznego oświetlaczem pierścieniowym. Zgodnie z instrukcjami Prowadzącego należy zarejestrować za pomocą kamery zdjęcia:

- wewnętrznej powierzchni skóry dłoni;
- skóry nadgarstka
- grzbietowej powierzchni skóry dłoni
- wybranych preparatów tkankowych

dla 3 ustawień osi transmisyjnych analizatora i polaryzatora (0, 45 i 90 stopni). W szczególności należy się skupić na wszelkiego rodzaju znamionach pigmentowych, siniakach, wylewach podskórnych, ranach, bliznach itp., jeżeli możliwa jest obserwacja takich stanów.

Wszystkie obserwowane obrazy należy scharakteryzować i opisać w należyty sposób. Wszystkie wyniki analizy należy zamieścić w sprawozdaniu i w odpowiedni sposób skomentować.

3. LITERATURA

- [1] „*Optyka biomedyczna: wybrane zagadnienia*”, red. H. Podbielska, Oficyna Wydawnicza PWr, 2011
- [2] „*Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*”, red. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk, Wyd. Urban&Partner, 2004
- [3] „*Metody optyczne w fizyce środowiska*”, H. Podbielska, Oficyna Wydawnicza PWr, 1996
- [4] „*Wstęp do optyki*”, M. Zajac, J. Nowak, Oficyna Wydawnicza PWr (dot. polaryzacji)
- [5] „*Optyka ośrodków anizotropowych*”, F. Ratajczyk, Wyd. PWN, 1994
- [6] <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/anatomy/nikone200cutaway.html>

Opracowanie: dr inż. Igor Buzalewicz

Katedra Inżynierii Biomedycznej Wydziału PPT Politechniki Wrocławskiej