

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Katedra Biofotoniki i Inżynierii Optycznej



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

mgr inż. Agnieszka Zielińska

Metoda pobudzania oka ludzkiego w eksperymentach
psychofizycznych z widzeniem dwufotonowym

Rozprawa doktorska napisana pod kierunkiem:

dr. hab. Macieja Szkulmowskiego, prof. UMK
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

dr inż. Katarzyny Komar
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń 2023

Z całego serca dziękuję moim Promotorom – dr inż. Katarzynie Komar i dr. hab. Maciejowi Szkulmowskiemu, prof. UMK za wsparcie w rozwijaniu moich naukowych skrzydeł, dzielenie się swoją wiedzą i doświadczeniem, wyrozumiałość i przykład bycia rodzinnym naukowcem. Dziękuję również wszystkim członkom zespołu za każdą pomoc i przyjazną atmosferę pracy. Wyrazy mojej wdzięczności kieruję też do moich Rodziców za zaszczepienie ciekawości świata i niecenione wsparcie podczas powstawania rozprawy. Mojemu mężowi Tomkowi i dzieciom – Jasiowi, Łucji i Rozalce dziękuję za wiarę we mnie, wyrozumiałość i kibicowanie mi w mojej drodze.

Spis treści

Wstęp.....	7
Lista stosowanych oznaczeń i symboli.....	10
1. Widzenie jednofotonowe.....	11
1.1 Budowa oka.....	11
1.1.1 Rogówka.....	12
1.1.2 Ciecz wodnista.....	13
1.1.3 Tęczówka i źrenica.....	13
1.1.4 Soczewka i akomodacja.....	16
1.1.5 Ciało szkliste.....	19
1.1.6 Siatkówka.....	19
1.1.7 Fotoreceptory.....	20
1.1.8 Warstwa nabłonka barwnikowego.....	24
1.1.9 Warstwa neurosensoryczna.....	26
1.1.10 Obraz dna oka i obszary siatkówki.....	27
1.2 Oko jako układ optyczny.....	30
1.2.1 Definicja podstawowych pojęć.....	30
1.2.2 Układ optyczny oka.....	36
1.2.3 Wady refrakcji.....	39
1.3 Biochemia widzenia.....	40
1.3.1 Czułość spektralna oka.....	40
1.3.2 Widzenie skotopowe, fotopowe i mezopowe.....	41
1.3.3 Krzywa luminancji.....	43
1.3.4 Rozróżnianie kolorów.....	44
1.3.5 Cykl widzenia.....	45
1.3.6 Fototransdukcja.....	47
1.3.7 Pola recepcyjne.....	50
1.3.8 Sumowanie przestrzenne i czasowe sygnałów z fotoreceptorów.....	53
1.4 Wybrane zagadnienia psychofizyki widzenia.....	55
1.4.1 Psychofizyka i prawo Webera-Fechnera.....	55
1.4.2 Progi widzenia.....	57
1.4.3 Krzywe adaptacji do ciemności.....	60
1.4.4 Zdolność fiksacyjna oka.....	62

2.	Widzenie dwufotonowe	63
2.1	Absorpcja dwufotonowa	63
2.2	Wydajność absorpcji dwufotonowej	65
2.3	Widzenie dwufotonowe w Zespole Fizyki Medycznej	69
2.4	Pierwsze obserwacje i próba interpretacji	70
2.5	Generacja drugiej harmonicznej czy absorpcja dwufotonowa?	73
2.6	Współczesne badania widzenia dwufotonowego	75
2.7	Potencjalne zastosowania	79
3.	Metodologia	81
3.1	Układ eksperymentalny	81
3.1.1	Źródła światła w układzie	82
3.1.2	Tor doprowadzający wiązki pobudzające	86
3.1.3	Tor diody fiksacyjnej	90
3.1.4	Tor tła	91
3.1.5	Tor kamery	93
3.1.6	Wyciemnienie systemu	94
3.1.7	Oprogramowanie systemu	95
3.1.8	Kalibracja wielkości kątowej bodźca od napięcia na skanerach	95
3.1.9	Kalibracja podziału mocy P_{in}/P_{out} – współczynnik podziału	97
3.1.10	Kalibracja przesuwu soczewki i dioptrii	98
3.1.11	Kalibracja kamery	101
3.2	Procedury pomiarowe i przetwarzanie danych	102
3.2.1	Korekcja wad refrakcji badanego oka	102
3.2.2	Adaptacja do ciemności	103
3.2.3	Ustawienie oka pacjenta i rejestracja obrazu źrenicy	104
3.2.4	Dobieranie jasności bodźca	104
3.2.5	Analiza danych dopasowania jasności bodźców	105
3.2.6	Pomiary reakcji źrenicy na bodźce podczerwony i widzialne	105
3.2.7	Analiza danych z eksperymentu reakcji źrenicy	107
3.2.8	Badanie progów widzenia (4-2-1, MoA)	111
3.2.9	Uczestnicy badań	112
3.2.10	Normy bezpieczeństwa w pomiarach widzenia dwufotonowego	112

4.	Przeprowadzone badania i otrzymane wyniki.....	117
4.1	Badania reakcji źrenicy na bodziec podczerwony postrzegany dwufotonowo.	117
4.1.1	Motywacja i cel badań.....	117
4.1.2	Badana grupa.....	118
4.1.3	Procedura pomiarowa i metodologia badania	118
4.1.4	Wyniki	119
4.1.5	Dyskusja	126
4.1.6	Wnioski	130
4.2	Wpływ rozmiaru i zbieżności wiązki pobudzającej na progi widzenia.....	130
4.2.1	Motywacja i cel badania.....	130
4.2.2	Badana grupa.....	131
4.2.3	Procedura pomiarowa i metodologia badania	131
4.2.4	Wyniki	133
4.2.5	Dyskusja	141
4.2.6	Wnioski	142
4.3	Krzywe adaptacji do ciemności.....	142
4.3.1	Motywacja i cel badania.....	142
4.3.2	Badana grupa.....	143
4.3.3	Procedura pomiarowa i metodologia badania	143
4.3.4	Wyniki	146
4.3.5	Dyskusja	151
4.3.6	Wnioski	154
4.4	Krzywa czułości widzenia dwufotonowego.....	154
4.4.1	Motywacja i cel badania.....	154
4.4.2	Badana grupa.....	155
4.4.3	Procedura pomiarowa i metodologia badania	155
4.4.4	Wyniki	156
4.4.5	Dyskusja	162
4.4.6	Wnioski	162
5.	Podsumowanie.....	163
	Dodatek – Metody pomiaru jasności bodźców.....	165
	Podstawowe wielkości radiometryczne.....	165
	Konwersja między jednostkami radiometrycznymi.....	167
	Trolandy.....	169

Publikacje naukowe.....	171
Prezentacje na konferencjach.....	172
Doświadczenie w pracy w zespołach naukowo-badawczych	173
Udział w konferencjach naukowych.....	174
Literatura	175

Wstęp

Niniejsza rozprawa dotyczy nowoodkrytego sposobu postrzegania światła, tzw. widzenia dwufotonowego. Polega ono na percepcji podczerwonej impulsowej wiązki laserowej zachodzącej dzięki dwufotonowej absorpcji w pigmentach wzrokowych. Widzenie dwufotonowe jest oparte o nieliniowy proces optyczny i charakteryzuje je kwadratowa zależność jasności od natężenia, co pozwala na precyzyjną lokalizację bodźca pobudzającego siatkówkę.

Widzenie dwufotonowe zostało odkryte stosunkowo niedawno, a badania nad jego naturą i potencjalnymi zastosowaniami ciągle trwają. Ponieważ układ wzrokowy jest pobudzany w wyniku innego procesu fizycznego, niż w normalnym, jednofotonowym widzeniu, badania psychofizyczne wymagają stworzenia lub modyfikacji dotychczas stosowanych procedur. Istotne jest zdefiniowanie optymalnych warunków stymulacji siatkówki, które ułatwią konstruowanie układów laboratoryjnych i urządzeń wykorzystujących ten proces w diagnostyce medycznej oraz w innych obszarach. Prace nad widzeniem dwufotonowym są podejmowane przez kolejne grupy badawcze, jednak stan wiedzy o tym procesie nadal wymaga rozszerzenia.

W pracy zweryfikowano doświadczalnie szereg problemów badawczych dotyczących porównania widzenia dwufotonowego z jednofotonowym. Zaprojektowano i przeprowadzono eksperymenty z zastosowaniem prototypowych optycznych układów pomiarowych.

W szczególności skoncentrowano się na następujących pytaniach badawczych:

1. Czy źrenica reaguje na wiązkę podczerwoną postrzeganą dwufotonowo? Jeśli tak, to jak silna jest to reakcja oraz czy, i w jaki sposób, różni się od reakcji na wiązkę widzialną o takiej samej jasności i podobnym kolorze?
2. Czy ze względu na nieliniową naturę, widzenie dwufotonowe w porównaniu do jednofotonowego cechuje się silniejszą zależnością progu widzenia od średnicy wiązki wchodzącej do oka jak również silniejszą zależnością progów widzenia od zbieżności wiązki pobudzającej?
3. Czy względne odpowiedzi czopków i pręcików wywołane widzeniem dwufotonowym różnią się od wywołanych widzeniem jednofotonowym?
4. Jaka jest spektralna krzywa czułości dla widzenia dwufotonowego? Dla jakiego zakresu długości fal zachodzi ten rodzaj percepcji?

Rozprawa składa się z pięciu rozdziałów. Pierwszy z nich koncentruje się na widzeniu jednofotonowym. Przedstawiono najpierw najważniejsze elementy anatomiczne oka (1.1)

ze szczególnym uwzględnieniem warstwy neurosensorycznej. Następnie przybliżono budowę oka jako układu optycznego (1.2) wprowadzając definicje podstawowych pojęć. W kolejnym podrozdziale skupiono się na zagadnieniach z zakresu biochemii widzenia (1.3) – wyjaśniono z czego wynika zakres czułości spektralnej oka, zdefiniowano reżimy postrzegania zależne od warunków oświetlenia, przybliżono definicję krzywych luminancji, zagadnienie rozróżniania kolorów oraz opisano procesy fototransdukcji i cyklu widzenia. Podrozdział kończy się opisem działania pól receptyjnych i zagadnienia sumowania czasowego i przestrzennego sygnałów z fotoreceptorów. W ostatnim podrozdziale dotyczącym widzenia jednofotonowego (1.4) poruszone są wybrane aspekty psychofizyki widzenia – począwszy od prawa Webera-Fechnera, po definicję i metody pomiaru progów widzenia, jak również opis krzywych adaptacji do ciemności i zdolności fiksacyjnej oka.

Drugi rozdział dotyczy nowoodkrytego sposobu postrzegania światła: widzenia dwufotonowego. Zaczyna się on od opisu zjawiska leżącego u jego podstaw – absorpcji dwufotonowej (2.1) oraz jej wydajności (2.2). W podrozdziale 2.3 krótko przybliżono początki badań widzenia dwufotonowego prowadzonych na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Kolejną część (2.4) stanowi przegląd prac historycznych dotyczących pierwszych obserwacji i analiz efektu postrzegania impulsowych wiązek podczerwonych. W podrozdziale 2.5 omówiono pierwszą pracę o nowym sposobie postrzegania, która dostarczyła licznych dowodów na to, że ten sposób percepcji powodowany jest przez absorpcję dwufotonową zachodzącą w pigmentach wzrokowych. W dalszej części (2.6) dokonano przeglądu współczesnych badań widzenia dwufotonowego i przybliżono jego potencjalne zastosowania (2.7)

W trzecim rozdziale omówiono metodologię eksperymentów opisanych w rozprawie doktorskiej. W pierwszym podrozdziale (3.1) zaprezentowano poszczególne moduły zbudowanego systemu optycznego do badań widzenia jedno- i dwufotonowego i ich kalibrację oraz omówiono autorskie oprogramowanie służące do jego obsługi. W drugim podrozdziale (3.2) opisano procedury pomiarowe (3.2.1-3.2.4, 3.2.6, 3.2.8) oraz przetwarzanie danych otrzymanych z eksperymentów (3.2.5 i 3.2.7). Zawiera on również informację o uczestnikach badań (3.2.9) oraz obliczenia norm bezpieczeństwa stosowanych w pomiarach (3.2.10).

W czwartym rozdziale zestawiono przeprowadzone badania i otrzymane wyniki. Składa się on z czterech podrozdziałów odpowiadających problemom badawczym zdefiniowanym powyżej i czterem eksperymentom, tj.: 4.1 Badania reakcji źrenicy na bodziec podczerwony postrzegany dwufotonowo, 4.2 Wpływ rozmiaru i zbieżności wiązki pobudzającej na progi widzenia, 4.3 Krzywe adaptacji do ciemności oraz 4.4 Krzywa czułości widzenia

dwufotonowego. Każdy z nich składa się z sześciu części: motywacja i cel badań, badana grupa, procedura pomiarowa, wyniki, dyskusja i wnioski.

Rozdział piąty stanowi podsumowanie pracy.

Lista stosowanych oznaczeń i symboli

APD – bezwzględna średnica źrenicy w danej chwili czasu (ang. *Absolute Pupil Diameter*)

BPD – bazowa średnica źrenicy policzona z 2 s przed bodźcem (ang. *Baseline Pupil Diameter*)

DA – adaptacja do ciemności (ang. *Dark Adaptation*)

fot – fotony (skrót używany w jednostkach)

LA – adaptacja do światła (ang. *Light Adaptation*)

λ_c – centralna długość fali

FWHM – szerokość połówkowa (ang. *Full Width at Half Maximum*)

ipRGC – wewnętrznie światłoczułe komórki zwojowe siatkówki (ang. *Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell*)

MoA – metoda dopasowania (ang. *Method of Adjustment*)

MPE – maksymalna dopuszczalna ekspozycja (ang. *Maximum Permissible Exposure*)

PD_{differ} – różnica w minimalnej średnicy źrenicy

PD_{min} – minimalna średnica źrenicy

PIRP – zmniejszenie średnicy źrenicy po wyłączeniu bodźca (ang. *Post-Illumination Pupil Response*)

PLR – odruch źreniczny na światło (ang. *Pupillary Light Reflex*)

PP – płaszczyzna źrenicy (ang. *Pupil Plane*)

RPD – względna średnica źrenicy (ang. *Relative Pupil Diameter*)

SD – odchylenie standardowe (ang. *Standard Deviation*)

SE – błąd standardowy (ang. *Standard Error*)

SPA – absorpcja jednofotonowa (ang. *Single-Photon Absorption*)

t_{constr} – czas maksymalnego zwężenia

t_{lat} – czas latencji

TPA – absorpcja dwufotonowa (ang. *Two-Photon Absorption*)

v_{constr} – średnia prędkość zwężenia

1. Widzenie jednofotonowe

Percepcja wzrokowa jest podstawowym źródłem informacji, które pozwala ludziom interpretować i nadawać sens otaczającemu ich światu. Zmysł wzroku jest biologicznie preferowany i dostarcza nam większość wszystkich docierających do mózgu bodźców – 70 % całego zestawu receptorów czuciowych ciała znajduje się na siatkówce, a dwie trzecie impulsów nerwowych na sekundę w mózgu pochodzi bezpośrednio z kory wzrokowej [1]. Ludzkie oko jest złożonym narządem a widzenie – bardzo skomplikowanym, aktywnym procesem definiowanym jako „zdolność dostrzegania i rozróżniania przez organizm człowieka i wyższych kręgowców wielkości, kształtu, barwy i ruchu obiektów oraz odległości między nimi w wyniku odbioru promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym lub bardzo do niego zbliżonym” [2]. Oko może wydawać się stosunkowo prostym instrumentem optycznym, jednak jego działanie nie jest związane jedynie z optyką – obraz tworzony na siatkówce musi zostać w niej przekształcony na impuls nerwowy, który niesie ze sobą informacje zrozumiałe dla naszego mózgu. W pierwszych dwóch podrozdziałach omówiono pokrótce anatomię oka (1.1) i jego optykę (1.2), w kolejnym (1.3) przybliżono wybrane zagadnienia z biochemii widzenia, a w ostatnim (1.4) niektóre zagadnienia psychofizyki widzenia.

1.1 Budowa oka

Nie jest to przesadą, żeby powiedzieć, że jeśli optyk chciałby sprzedać mi instrument, który miałby wszystkie te wady, uważałbym się za całkiem usprawiedliwionego w obwinianiu jego niedbalstwa w najmocniejszych słowach i oddaniu mu jego instrumentu. Oczywiście, nie zrobię tego z moimi oczami i będę bardzo zadowolony, że mogę je zatrzymać tak długo, jak tylko będę mógł – ze wszystkimi ich wadami.

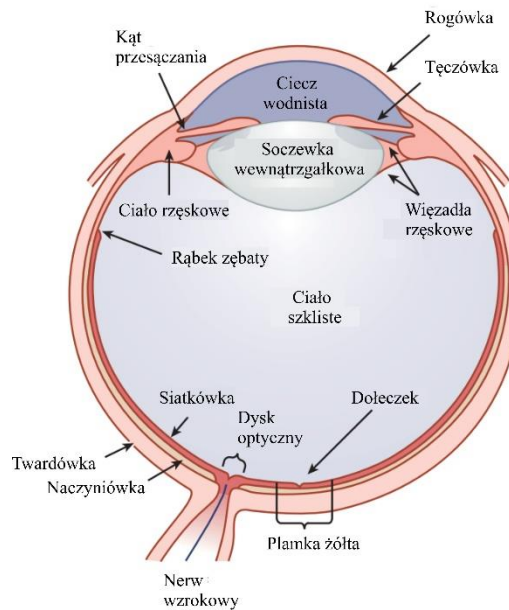
Hermann Helmholtz „Popular Lectures on Scientific Subjects”

(tłumaczenie własne na podstawie [3])

W skali makro kształt oka możemy określić jako lekko spłaszczoną kulę. Oko miarowe (emetropowe) osoby dorosłej ma w przybliżeniu wymiary: 24,2 mm horyzontalnie, 23,7 mm wertykalnie i 22,0 – 24,8 mm osiowo [4]. W badaniach przeprowadzonych przez Bekermana i współpracowników [4] nie wykazano istotnych statystycznie różnic pomiędzy rozmiarami oka a płciami i grupami wiekowymi.

Najważniejsze elementy budowy oka przedstawiono na schemacie przekroju poprzecznego gałki ocznej na Rys. 1.1.1. Oko otoczone jest trzema błonami. Najbardziej zewnętrzną warstwę tworzy biała gruba twardówka, która w przedniej części oka przechodzi w przezroczystą cieńszą rogówkę. Zadaniem tej błony jest nadanie kształtu gałce ocznej

i ochrona przed urazami. Drugą warstwą jest silnie unaczyniona naczyniówka dostarczająca składniki odżywcze i tlen do komórek oka i zabierająca produkty przemiany materii. Naczyniówka w przedniej części przechodzi w pierścieniową tęczówkę oraz tworzy mechanizm ciała rzęskowego umożliwiający akomodację soczewki. Ostatnią warstwą jest warstwa włókien nerwowych – siatkówka, która zawiera między innymi wyspecjalizowane komórki czułe na światło - fotoreceptory. To w tej warstwie sygnał optyczny (obraz tworzony na siatkówce) ulega konwersji na sygnał elektryczny (nerwowy).



Rys. 1.1.1 Schemat przekroju poprzecznego gałki ocznej człowieka. Na podstawie [5].

W oku wyróżniamy dwa odcinki: przedni i tylny. Odcinek przedni (przód oka) jest małą asymetryczną przestrzenią gałki ocznej wypełnioną cieczą wodnistą. Składa się z komory przedniej (od rogówki do tęczówki włącznie) i komory tylnej (obszar od tęczówki do soczewki włącznie). Odcinek tylny obejmuje ciało szkliste, tylną część twardówki, naczyniówkę, siatkówkę i nerw wzrokowy.

1.1.1 Rogówka

Rogówka jest pierwszą powierzchnią refrakcyjną i umożliwia przepuszczenie światła do kolejnych struktur oka. Ma asferyczny kształt i wystaje poza obrys kulisty oka. Współczynnik załamania rogówki jest mniejszy niż soczewki (w powietrzu wynosi 1,38 vs. 1,44). Mimo tego, fakt umieszczenia jej na granicy ośrodków powietrze – płyn o wysokim współczynniku refrakcji powoduje, że to ona zawiera główną moc załamującą w oku i najsilniej ugina światło [6]. Powierzchnia rogówki w zdrowym oku zwilżona jest warstwą filmu łzowego, który pełni funkcję odżywczą i ochronną [7]. Ponadto odgrywa ważną rolę

optyczną – wygładza nierówny nabłonek rogówki, dzięki czemu zmniejsza aberracje obrazu powstającego na siatkówce [8].

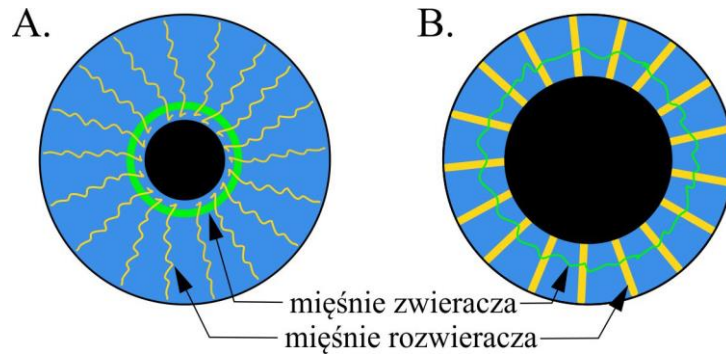
1.1.2 Ciecz wodnista

Ciecz wodnista ma skład zbliżony do osocza krwi. Bierze udział w metabolizmie rogówkowym i soczewkowym, zapewnienia wytrzymałość i stały kształt powłok gałki ocznej. Ponadto jest częścią drogi optycznej dla promieni, które zmierzają do siatkówki. Zdrowa ciecz wodnista jest przezroczysta i czysta. Wytwarzana przez wyrostki rzęskowe w komorze tylnej krąży przez źrenicę do komory przedniej. Drogę odpływu cieczy do krwioobiegu stanowi kąt przesączania utworzony przez podstawę tęczówki i obwodową część sklepienia rogówki [7]. Kąt przesączania pozwala na zachowanie odpowiedniego poziomu ciśnienia w gałce ocznej.

1.1.3 Tęczówka i źrenica

Kolejną strukturą za rogówką jest kolorowa tęczówka. Posiada mięśnie kontrolujące rozmiar źrenicy, która jest regulowanej wielkości otworem w tęczówce. Źrenica stanowi, pod względem optycznym, przysłonę, przez którą światło wchodzi do układu optycznego oka. Pozornie czarny kolor źrenicy wynika z tego, że widać przez nią ciemne wnętrze oka. Efekt „czerwonych oczu” na zdjęciach z lampą błyskową to skutek oświetlenia wnętrza oka i odbicia światła lampy od czerwonych naczyń krwionośnych.

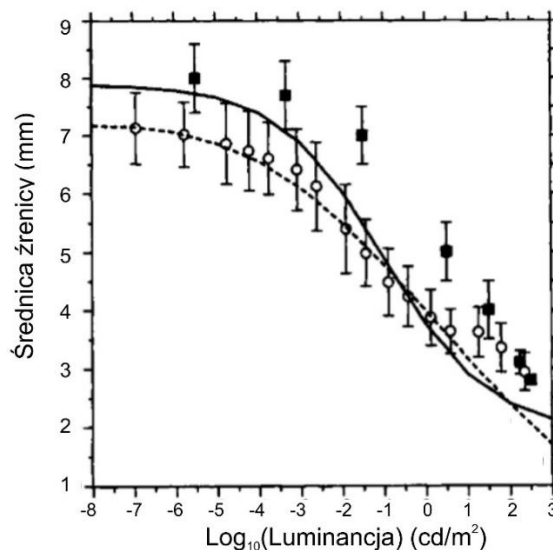
Tęczówka przytwierdzona jest do ciała rzęskowego (Rys. 1.1.1) i wyposażona w dwa rodzaje mięśni (Rys. 1.1.2): biegnące promieniście rozwieracze unerwione przez układ współczulny i otaczający źrenicę zwieracz zaopatrywany przez układ przywspółczulny. Rozmiar źrenicy jest ustalany przez stan równowagi zależnej od antagonistycznego działania współczulnego (sympatycznego) i przywspółczulnego (parasympatycznego) autonomicznego układu nerwowego. Zwężenie źrenicy (mioza) powoduje ograniczenie ilości światła docierającego do kolejnych struktur oka, a rozszerzenie źrenicy (mydriaza) do zwiększenia jego ilości.



Rys. 1.1.2 Mięśnie tęczówki regulujące rozmiar źrenicy: A. gdy źrenica jest zmniejszona zwieracz (kolor zielony) jest naprężony, a rozszeracze (kolor żółty) zrelaksowane, B. gdy źrenica jest rozszerzona zwieracz jest zrelaksowany, a rozszeracze naprężone. Rysunek własny na podstawie [7], [9].

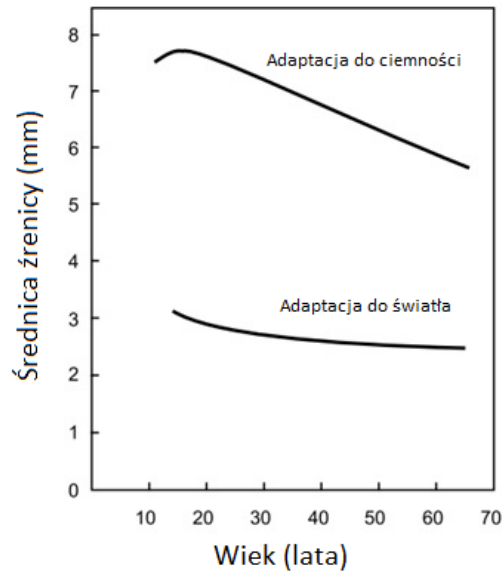
Obie źrenice u większości populacji są jednakowej wielkości w danych warunkach oświetlenia. Jeśli występują różnice mówimy o anizokorii, której powodem może być całkowite lub częściowe uszkodzenie drogi nerwowej. Średnica źrenicy zmienia się w zakresie od 2 do 8 mm nie tylko w zależności od poziomu oświetlenia, ale również od stanu pobudzenia, zmęczenia czy substancji chemicznych [9]. Na przykład źrenica jest większa, kiedy się boimy, a mniejsza – kiedy jesteśmy skupieni.

Pod względem optycznym źrenica odgrywa istotną rolę. Po pierwsze reguluje ilość światła docierającego do siatkówki. W związku z zakresem zmienności rozmiaru źrenicy (promień 1 – 4 mm) ilość światła wchodzącego do oka przez okrągłą źrenicę może być regulowana o czynnik 16. Na Rys. 1.1.3 widać, że zmiana natężenia oświetlenia o 11 rzędów wielkości powoduje zmianę średnicy źrenicy z 8 mm na 2 mm.



Rys. 1.1.3 Rozmiar średnicy źrenicy w funkcji logarytmu natężenia poziomu oświetlenia. Dane eksperymentalne: Reeves [10], [11] (czarne kwadraty) i Crawford [12] (okręgi) oraz uśrednione krzywe Moon i Spancer [12] (linia ciągła) i De Groot i Gebhard [13] (linia przerywana). Wykres z [14].

Z wiekiem zdolność źrenicy do zmiany średnicy znacznie się zmniejsza (Rys. 1.1.4). W warunkach adaptacji do światła średnica źrenicy ma podobną wartość zarówno dla osób młodszych jak i starszych (2 – 3 mm), natomiast w ciemności źrenica osób starszych nie jest w stanie rozszerzyć się tak bardzo jak u osób młodych (5,5 mm vs. 8 mm).



Rys. 1.1.4 Zdolność źrenicy do rozszerzania się zmniejsza się wraz z wiekiem. Rysunek przedstawia średnicę źrenicy jako funkcję wieku dla dwóch różnych poziomów adaptacji. Na podstawie [15].

Drugą ważną funkcją źrenicy jest umożliwienie tworzenia ostrego obrazu na siatkówce. Zmniejszenie rozmiaru przysłony powoduje zmniejszenie liczby promieni pozaosiowych, które biorą udział w formowaniu obrazu, przez co zmniejsza się liczba aberracji odwzorowywanego obrazu. Wpływ rozmiaru źrenicy na jakość obrazu tworzonego na siatkówce zostanie omówiony w dalszej części rozprawy (podrozdział 1.2.11.2.2).

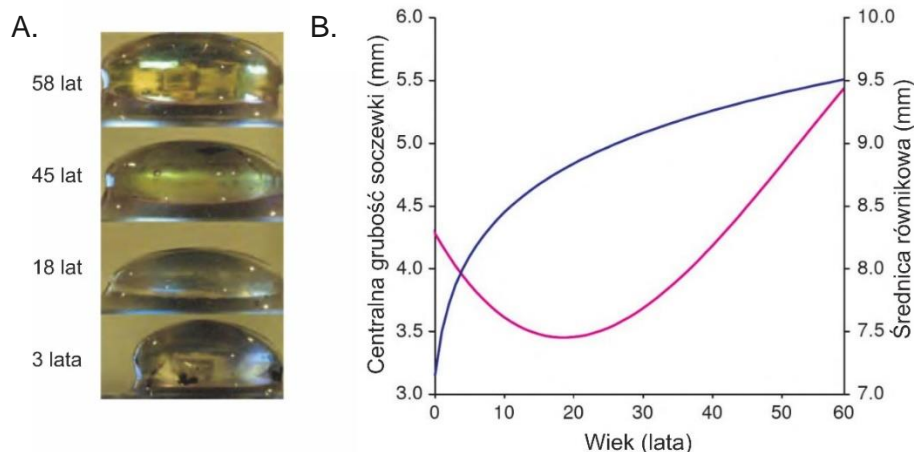
Pomiarem rozmiaru i reaktywności źrenicy oka w odpowiedzi na bodźce psychofizjologiczne zajmuje się pupillometria [16]. Pionierami w badaniach nad źrenicą, którzy zaprojektowali pierwszy zautomatyzowany instrument (podczerwony wideo pupillometr) byli Lowenstein i Loewenfeld [17]. Działanie wielu substancji chemicznych, jak również uszkodzenie mózgu objawiają się w reakcji źrenicy. Pupillometria jako metoda prosta, nieinwazyjna, szybka i powtarzalna jest użytecznym narzędziem w okulistyce klinicznej pozwalającym na wykrycie wielu nieprawidłowości [18]. Odruch źreniczny na światło (ang. *Pupillary Light Reflex*, PLR) charakteryzuje reakcję źrenicy po pojawieniu się bodźca świetlnego. Po czasie latencji, określającym bezwładność oka od pojawienia się bodźca do rozpoczęcia skurczu źrenicy, następuje zmniejszenie średnicy źrenicy aż do osiągnięcia minimum, po czym źrenica rozszerza się. Przebieg ten charakteryzowany jest przez szereg parametrów m.in. średnicę bazową, średnicę minimalną, maksymalną

prędkość skurczu, czas do maksymalnego skurczu oraz czas latencji [18], [19]. Wybrane parametry zostaną zdefiniowane w podrozdziale 3.2.7.

1.1.4 Soczewka i akomodacja

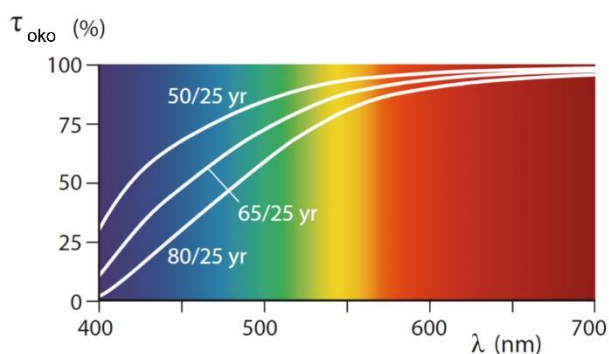
Ludzka soczewka wewnątrzgałkowa jest przezroczystym elementem o złożonej budowie umiejscowionym tuż za tęczęwką (Rys. 1.1.1). Umożliwia ona ostre widzenie przedmiotów będących zarówno blisko, jak i daleko, poprzez mechanizm akomodacji. Przystosowanie oka do różnych odległości od obiektu opiera się na różnorodnych mechanizmach wśród gatunków, np. przegrzebek ma dwie siatkówki – jedną dla bliskich i drugą dla odległych obiektów, ryby poruszają kulistą, sztywną soczewką oka i w ten sposób zmieniają odległość do siatkówki, ptaki i żółwie mają elastyczną soczewkę, a naczelnice (w tym człowiek) mogą zmieniać promień krzywizny elastycznej soczewki i w ten sposób dobierać miejsce, w którym tworzy się ostry obraz [15].

Soczewka w 66 % składa się z wody, a w 33 % z białek (protein) [20]. Koncentracja białek w soczewce jest dwukrotnie wyższa niż w innych tkankach i wynosi około 300 mg/ml [21]. W soczewce wyróżnić możemy trzy warstwy: torebkę będącą elastyczną błoną otaczającą soczewkę, znajdujący się tuż pod nią śródbłonek i istotę właściwą (korę i jądro). Śródbłonek jest pojedynczą warstwą komórek, które mają zdolność rozrastania się i podczas całego życia człowieka tworzą kolejne warstwy istoty właściwej. W ciągu życia kolejne warstwy soczewki cały czas narastają wewnątrz torebki – materiał komórkowy nie jest w żaden sposób usuwany [7], co prowadzi z biegiem czasu do coraz większego zagęszczenia i zeszczywnienia soczewki. Soczewka wewnątrzgałkowa jest elementem oka najbardziej zmieniającym się z wiekiem pod względem właściwości optycznych - zmienia się jej kształt, rozmiar i masa przez co zmienia się też jej zdolność do zmiany kształtu jak to ma miejsce w procesie akomodacji [14]. Na Rys. 1.1.5 zobaczyć możemy w części A. zmianę kształtu soczewki wyizolowanej z oczu ludzi w różnym wieku, a w części B. zależność centralnej grubości soczewki i średnicy równikowej od wieku.



Rys. 1.1.5 A. Fotografie soczewek oka ludzi w różnym wieku. Zauważalny jest wzrost średnicy równikowej wraz z wiekiem oraz zmniejszanie centralnej grubości (między 3 a 18 rokiem życia) i wzrost centralnej grubości (między 18 a 53 rokiem życia). B. Zmiany w centralnej grubości soczewki (kolor różowy) i w średnicy równikowej soczewki (kolor fioletowy) w funkcji wieku. Na podstawie [22].

Ponadto przepuszczalność soczewki dla światła również ulega zmniejszeniu – soczewka żółknie wraz z wiekiem i przez to zmniejsza się jej transmisja w zakresie krótszych długości fal. Na Rys. 1.1.6 pokazano zmianę w transmisji oka dla osób w różnym wieku w odniesieniu do osoby 25 – letniej.



Rys. 1.1.6 Transmisja oka ludzkiego τ_{oko} w funkcji długości fali λ dla 50-, 65- i 80- latka w odniesieniu do 25- latka. Na podstawie [23].

Promienie świetlne przechodzą przez kolejne warstwy różniące się współczynnikami załamania (jądro ma 1,406 a najbardziej zewnętrzna część 1,386). Soczewka ludzkiego oka stanowi więc element typu GRIN, czyli element optyczny, w którym występuje gradient współczynnika załamania światła [24].

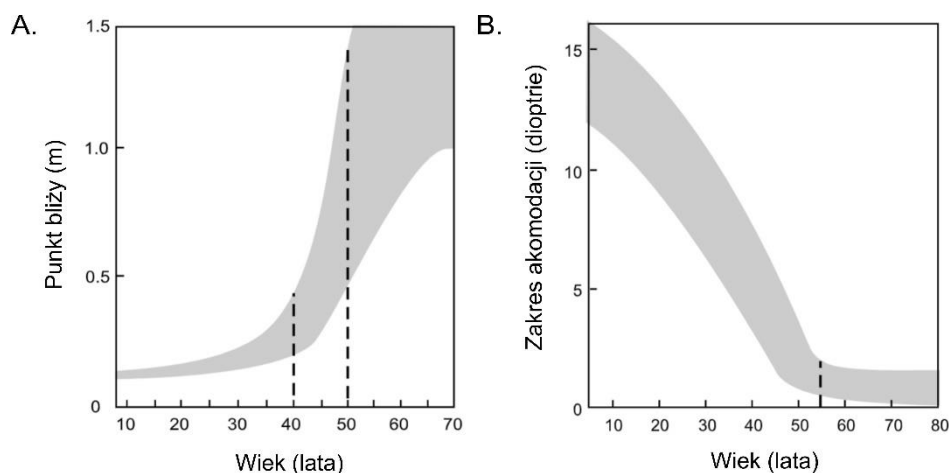
Soczewka zawieszona jest w komorze tylnej na licznych więzadełkach (zonulach) przyczepionych do mięśnia rzęskowego. Dla zrelaksowanego oka emetropowego, czyli patrzącego w dal, krzywizna powierzchni łamiącej soczewki jest taka, że skolimowana wiązka światła jest skupiana na siatkówce. W takim przypadku mięsień rzęskowy jest rozluźniony, włókienka obwodowe są napięte, a soczewka jest ścięciona.

Kiedy obserwowany obiekt znajduje się bliżej, to soczewka zmienia promień krzywizny skracając swoją ogniskową. By to umożliwić mięsień rzęskowy jest skurczony przy jednoczesnym rozluźnieniu włókienek obwódkowych. Soczewka jest wtedy wypuklona i dzięki temu ma większą moc optyczną umożliwiającą utworzenie ostrego obrazu bliskiego przedmiotu na siatkówce [22].

Mówiąc o akomodacji jako zmianie ogniska soczewki z nieskończoności na krótszą odległość, korzystamy z pojęcia „dioptrii”. Dioptria (moc optyczna) definiowana jest jako odwrotność ogniskowej soczewki f wyrażonej w metrach, co określa wzór [25]:

$$1 (D) = \frac{1}{f} \left(\frac{1}{m} \right) \quad (1-1)$$

Zdolność soczewki do akomodacji zmienia się wraz wiekiem. Małe dzieci, które naturalnie mają za krótką gałkę oczną w porównaniu do tej, którą osiągną po okresie dojrzewania, mają bardzo elastyczną i kulistą soczewkę o dużych możliwościach zmiany kształtu – dużym zakresie akomodacji. Dzięki temu widzą wyraźnie przedmioty znajdujące się bardzo blisko. Prezbiopia (starczowzroczność, syndrom długiej ręki) to nieunikniony proces pogarszania się widzenia z bliskiej odległości – upośledzenie mechanizmu akomodacji. Przyczyną jest starzenie się soczewki oka ludzkiego i utrata jej naturalnej elastyczności związana ze wspomnianym wcześniej narastaniem przez całe życie kolejnych warstw soczewki. U większości osób między 40. a 50. rokiem życia zaczynają występować trudności z wyraźnym widzeniem z mniejszych odległości i pojawia się potrzeba odsuwania np. przedmiotu z drobnym drukiem na dalszą odległość, by móc odczytać szczegóły. Na Rys. 1.1.7.A widzimy, że punkt bliży (najmniejsza odległość, dla jakiej oko potrafi utworzyć ostry obraz [24]) rośnie wraz z wiekiem. Przykładowo osoba około 50 r. ż. widzi ostro dopiero z odległości 50 cm – 140 cm. By ułatwić codzienne funkcjonowanie używa się wtedy okularów „do czytania”, które dodają brakujących dioptrii i umożliwiają ostre widzenie z mniejszych odległości. Punkt dali definiowany jest jako największa odległość, dla jakiej oko potrafi utworzyć ostry obraz. Na Rys. 1.1.7.B widzimy malejącą zależność głębokości akomodacji w dioptriach (obliczanej jako różnicę między punktem dali i punktem bliży) w funkcji wieku. Dla osób powyżej 25 r. ż. zakres akomodacji spada poniżej 10 D.



Rys. 1.1.7 A. Odległość punktu bliży i B. głębokość akomodacji w funkcji wieku. Szary obszar ilustruje naturalną wariację w populacji. Na podstawie [15].

Używane powszechnie w okulistyce krople Tropicamidum 1 % służą do rozszerzania źrenicy i porażenia akomodacji. Dzieje się tak dzięki działaniu substancji czynnej – tropikamidu, która paraliżuje mięsień rzęskowy i zwieracz źrenicy. Porażenie akomodacji występuje w czasie od 25 min do 50 minut od zakroplenia leku. Stosowane jest m.in. po to, by naturalna akomodacja nie utrudniała pomiaru wady refrakcji. Rozszerzenie źrenicy natomiast występuje w ciągu 15 min do 30 min po podaniu leku i utrzymuje się do 3 godzin [26].

1.1.5 Ciało szkliste

Przejrzyste, nieunaczynione ciało szkliste wypełniające przestrzeń oka za soczewką (Rys. 1.1.1) składa się w 99 % z wody [7]. Galaretowatą konsystencję zawdzięcza niewielkiej ilości kolagenu. Pod względem optycznym jest przezierne (powinno być idealnie przezroczyste, jednak zdarza się, że znajdują się w nim jakieś wytrącenia) i umożliwia promieniom świetlnym dotarcie z soczewki do siatkówki. Dodatkowo nadaje kształt i objętość gałce ocznej. Co ważne, po zakończeniu okresu dorastania jest w pełni uformowane i nie jest odbudowywane w ciągu życia. Wraz z wiekiem obkurcza się, mogąc powodować oderwanie siatkówki, do której przylega. Powstające wolne przestrzenie wypełniane są przez płyny powodujące większe uwodnienie, a tym samym zmianę żelowej konsystencji ciała szklistego. Procesy te mogą wywoływać wrażenia wzrokowe w postaci mętów (przymgleń wynikających z grupowania barwnika lub protein) czy błysków światła [7].

1.1.6 Siatkówka

Siatkówka jest przezroczystą tkanką nerwową o grubości około 0,5 mm wyścielającą około 2/3 tylnej części gałki ocznej. Rąbek zębaty jest miejscem przedniego zakończenia

siatkówki (Rys. 1.1.1) i jest połączony z płaską częścią ciała rzęskowego. Drugim miejscem mocowania siatkówki do oka jest tarcza nerwu wzrokowego (Rys. 1.1.1). Pod względem anatomicznym i funkcjonalnym siatkówka oka ludzkiego jest integralną częścią ośrodkowego układu nerwowego [27], często określana wręcz wprost jako część mózgu [28]. Zachodzące w siatkówce przemiany metaboliczne cechują się szybkim tempem, a wskaźnik konsumpcji tlenu na jednostkę masy tkanki w organizmie ma największą wartość [27]. Komórki zaopatrywane są w tlen i składniki odżywcze przez dwa systemy naczyń krwionośnych – siatkówkowy i naczyniówkowy (choroidalny) [27].

Siatkówka składa się z wielu warstw. W ogólnym podziale wyróżnić możemy dwie podstawowe: zewnętrzną warstwę nabłonka barwnikowego znajdującą się od strony twardówki oraz wewnętrzną warstwę neurosensoryczną po stronie wnętrza gałki ocznej, w której wyróżniamy trzy warstwy neuronów i dwie synapsy. Fotoreceptory ludzkiego oka (czopki i pręciki) są wysoce wyspecjalizowanymi komórkami czułymi na światło i zdolnymi do przetwarzania energii świetlnej na impuls nerwowy. Zawierają molekuly czułe na światło i są połączone w złożone sieci neuronów, które służą do odpowiedniego zorganizowania przychodzących informacji wizualnych w informacje, które mogą być przekazywane do kory wzrokowej i interpretowane przez mózg [29].

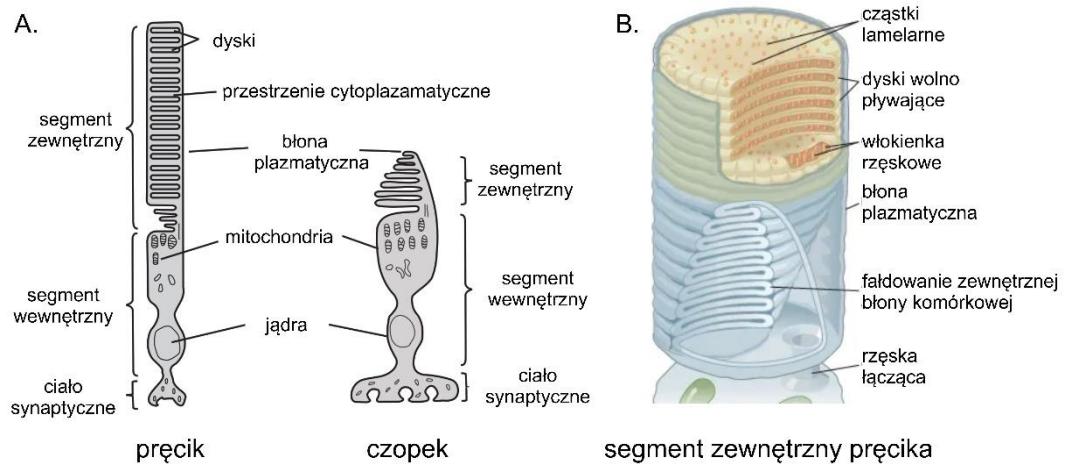
1.1.7 Fotoreceptory

Czopki i pręciki różnią się w budowie kształtem, rozmiarem i ułożeniem dysków błonowych w segmencie zewnętrznym (Rys. 1.1.8.A). Cząsteczki pigmentów wzrokowych są gęsto upakowane i osadzone w błonach dysków prostopadle do biegu promieni świetlnych, co podwyższa prawdopodobieństwo absorpcji światła [15]. Pojedynczy pręcik zawiera kilkaset dysków otoczonych zewnętrzną błoną w segmencie zewnętrznym, natomiast w czopkach dyski tworzone są z fałdy membrany (Rys. 1.1.8.B).

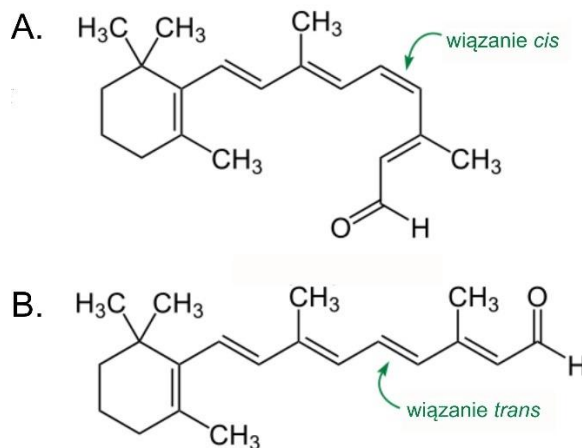
Cząsteczka barwnika (pigmentu) wzrokowego składa się z części absorbującej światło - chromoforu (retinalu), który jest aldehydową pochodną witaminy A oraz z przyłączonej zasadą Shiffa części nieabsorbującej światła - białka (opsyny) osadzonego w błonie dysku, różnego dla czopków i pręcików. Retinal może przyjmować różne konformacje izomeryczne, przy czym budowa dwóch najbardziej istotnych (11-cis-retinalu i all-trans-retinalu) została przedstawiona na Rys. 1.1.9.

W wyniku oddziaływania kwantu światła z cząsteczką pigmentu dochodzi do jej rozpadu – retinal zmienia konformację (z cis na trans) i odłącza się od opsyny zapoczątkowując kaskadę procesów prowadzących do powstania impulsu nerwowego. Proces ten zostanie szczegółowo omówiony w dalszej części rozprawy (podrozdział 1.3.61.3.5). Im większe natężenie światła tym więcej pigmentów wzrokowych ulegnie rozpadowi. Dzięki

mechanizmowi wyposażania fotoreceptorów w świeży pigment wzrokowy (podrozdział 1.3.5) możliwy jest ciągły proces widzenia.



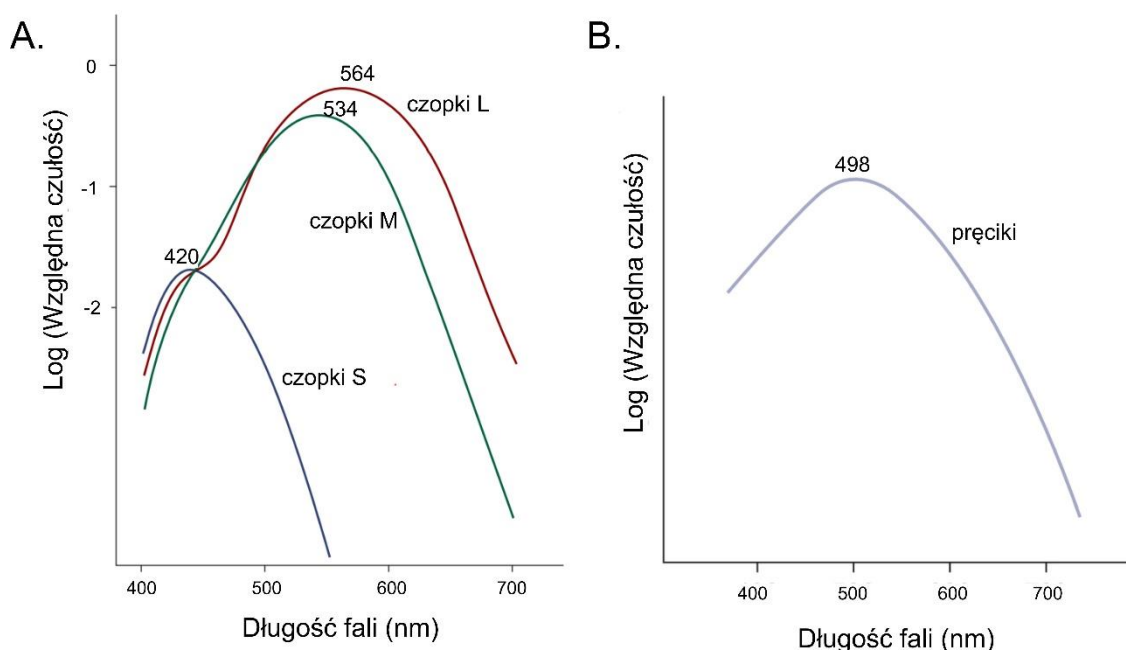
Rys. 1.1.8 A. Budowa czopka i pręcika (na podstawie [15]) B. Trójwymiarowy przekrój przez segment zewnętrzny pręcika (z [30]).



Rys. 1.1.9 Dwa izomery retinalu istotnie w cyklu widzenia A. 11-cis-retinal oraz B. all-trans-retinal. Na podstawie [31].

Jak wspomniano wcześniej, barwniki wzrokowe czopków i pręcików różnią się w budowie zawartymi opsynami. To sekwencja genów kodujących aminokwasy w opsynach decyduje o tym, w których miejscach widma promieniowania elektromagnetycznego przyłączy do niej retinal zaabsorbuje światło[15]. Barwnik wzrokowy pręcików to rodopsyna (składająca się z opsyny pręcika i retinalu), natomiast czopki mogą zawierać trzy różne barwniki, co wiąże się z występowaniem trzech rodzajów czopków: czopki wrażliwe na długie fale (L) zawierające erythrolabe, czopki wrażliwe na średniej długości fale (M) – chlorolabe i czopki wrażliwe na krótkie długości fal (S) – cyanolabe. Widma absorpcji poszczególnych barwników przedstawia Rys. 1.1.10. Maksima absorpcji promieniowania

elektromagnetycznego wynoszą 498 nm dla pręcików, 420 nm (barwa fioletowa) dla czopków S, 534 nm (barwa żółtawo-zielona) dla czopków M i 564 nm (barwa zielono-żółta) dla czopków L [15]. Indywidualne różnice w tych maksimach mogą wynosić kilka nanometrów [15]. Pręciki są połączone po kilka do komórek dwubiegunowych, co skutkuje większą wrażliwością na światło. Do pobudzenia pręcika teoretycznie wystarczy jeden kwant światła, podczas gdy pobudzenie czopka prowadzące do uzyskania porównywalnej odpowiedzi wymaga około 100 takich kwantów [15]. Czopki są połączone pojedynczo do komórek dwubiegunowych (zwłaszcza te w dołku plamki żółtej), przez co zapewniają lepszą rozdzielczość przestrzenną w przetwarzaniu sygnałów niż pręciki [15].



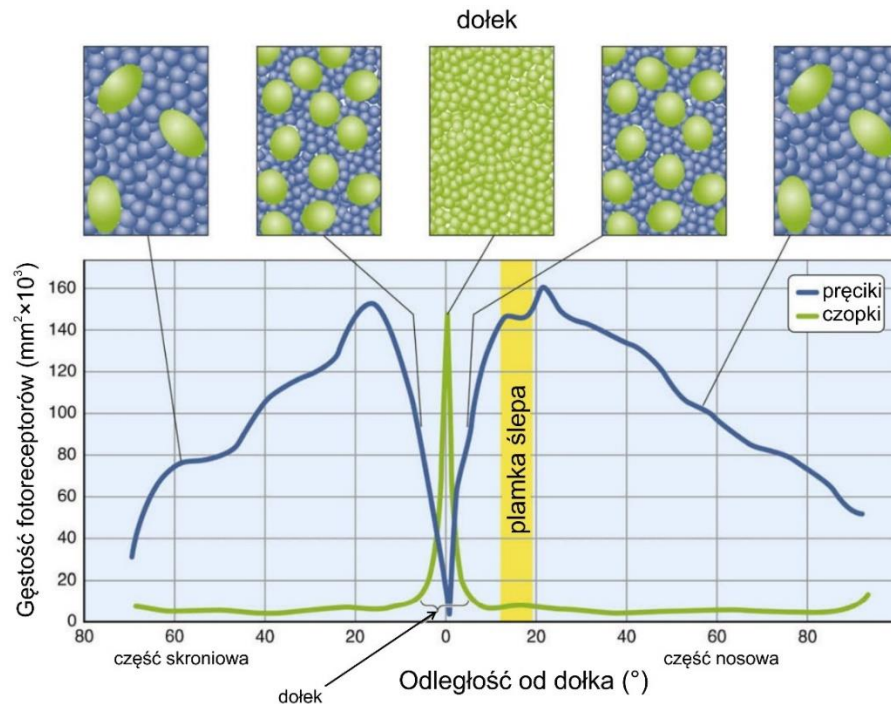
Rys. 1.1.10 Przybliżone widma absorpcyjne A. barwników czopków: cyjanolabu (czopek S), chlorolabe (czopek M) i erythrolabe (czopek L) oraz B. rodopsyny zawartej w pręcikach; z [5].

Pręciki stanowią większość naszych fotoreceptorów – jest ich około 92 milionów [32]. Są odpowiedzialne za widzenie przy słabym oświetleniu. Jest to tzw. widzenie skotopowe (nocne, zmierzchowe). Podczas dnia pręciki są nieaktywne (wyłączone). Nie pośredniczą w widzeniu kolorów i mają niską rozdzielczość. Pręciki odpowiadają wolniej na stymulację światłem (czas integracji wynosi około 100 ms). Dzięki temu są one bardziej wrażliwe na słabe światło. Kosztem jest częstość modulacji wynosząca 10 – 15 Hz [15]. Tinsley ze współpracownikami [33] pokazali, że w warunkach pełnej adaptacji do ciemności możliwa jest detekcja przez ludzkie oko pojedynczego fotonu osiągającego rogówkę, z prawdopodobieństwem znacznie większym niż przypadek.

Czopki są aktywne przy wyższych natężeniach światła (widzenie fopowe, podrozdział 1.3.2) i odpowiadają za wysoką ostrość widzenia. Ich liczebność jest mniejsza – około

4,6 milionów [32]. Ponadto ich odpowiedź na stymulację światłem jest szybsza niż pręcików – czas integracji dla czopków wynosi około 10 – 20 ms, co umożliwia śledzenie migających bodźców o częstotliwości nawet do 80 – 90 Hz [15].

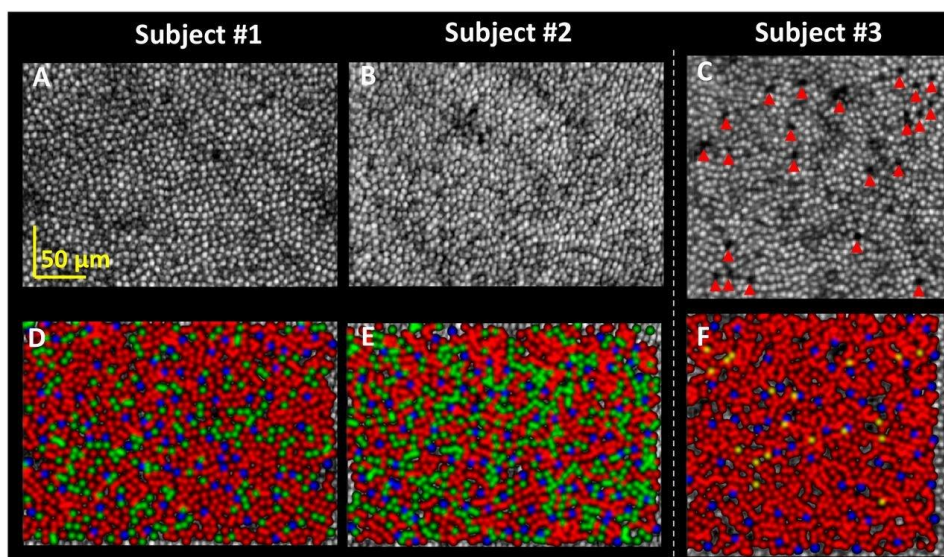
Fotoreceptory nie są rozłożone równomiernie na siatkówce. Ich gęstość zmienia się w zależności od odległości od centrum plamki jak to przedstawiono na Rys. 1.1.11.



Rys. 1.1.11 Gęstość czopków i pręcików w siatkówce naczelnego w funkcji odległości od dołka. W górnej części schematyczna ilustracja zmieniających się wielkości fotoreceptorów w różnych odległościach od dołka; z [34].

W samym dołeczku (Rys. 1.1.1) obecne są tylko czopki, które są tak gęsto upakowane, że mają mniejszą ($1,6 - 2,2 \mu\text{m}$) [35] niż w dalszych częściach siatkówki średnicę. Wielkości czopków i pręcików w różnych odległościach od dołka zilustrowano schematycznie w górnej części Rys. 1.1.11. W plamce żółtej przeważają czopki i w miarę oddalania się od centrum plamki ich liczba ustępuje pręcikom.

Przez długi czas zakładano, że proporcje liczebności pomiędzy czopkami L, M i S są stałe i wynoszą około 32:16:1 [15]. Jednak późniejsze badania Williamsa i Roordy [36] czy Zhanga i współpracowników [37] pokazują, że relatywne liczebności poszczególnych rodzajów czopków i ich rozmieszczenie są bardzo osobniczą cechą (Rys. 1.1.12).



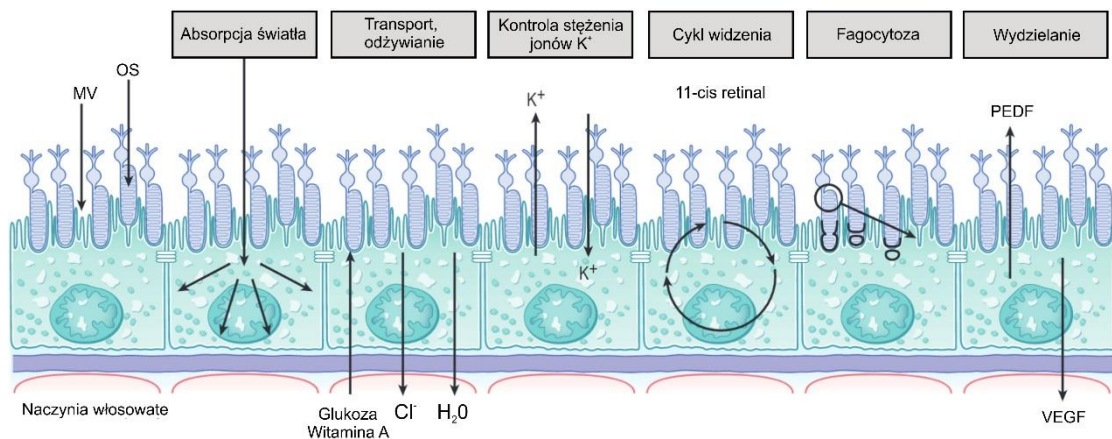
Rys. 1.1.12 Mozaika czopków w odległości 3.7 stopnia od plamki. Dwie pierwsze mapy (Subject #1 i #2) pochodzą z oczu zdrowych, posiadających 3 rodzaje czopków, trzecia mapa (Subject #3) pochodzi od osoby cierpiącej na deuteranopię - dysfunkcję w rozróżnianiu barwy zielonej spowodowaną brakiem czopków wrażliwych na średnie długości fal; z [37].

Stosunek pobudzenia poszczególnych rodzajów czopków umożliwia widzenie trójbarwne. Brak jednego z czopków powoduje dichromatyzm – upośledzenie widzenia barw polegające na nierozróżnianiu niektórych kolorów, np. w przypadku braku czopków M – kolorów czerwonego i zielonego [15].

1.1.8 Warstwa nabłonka barwnikowego

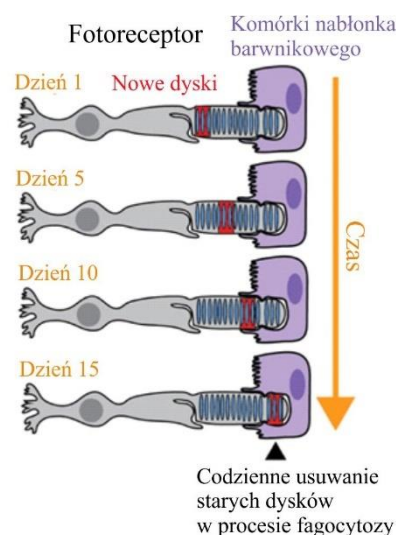
W warstwie nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. *retinal pigment epithelium*, RPE) zawarte są liczne cząsteczki ciemnego barwnika, którego kolor i ilość są uwarunkowane genetycznie. Zanurzone w RPE światłoczułe końcówki zewnętrznych segmentów fotoreceptorów otoczone przez wierzchołkowe mikrokosmki RPE (Rys. 1.1.13) tworzą kompleks ścisłej interakcji strukturalnej [38]. Proporcja liczby fotoreceptorów do komórek nabłonka barwnikowego wynosi średnio 23 [39]. Warstwie RPE przypisuje się liczne funkcje zobrazowane na Rys. 1.1.13. Po pierwsze pochłaniania ona nadmiar promieniowania świetlnego i zapobiega zacieraniu konturów tworzonego obrazu (poprzez uniemożliwienie odbijania światła wewnątrz oka). Ponadto jako szczelna warstwa komórek na granicy krwiobiegu – warstwa fotoreceptorów bierze udział w transporcie przeznabłonkowym składników odżywczych, wody, jonów i innych substancji przemian metabolicznych [38]. Dodatkowo komórki RPE wytwarzają siłę przylegania na styku RPE – fotoreceptory [40]. W wyniku oświetlenia siatkówki zmienia się stężenie jonów regulowane przez fotoreceptory (szczegółowe omówienie w rozdziale 1.3.6) i zwiększa się objętość podsiatkówkowa. Obie te zmiany są kompensowane w momencie ich wystąpienia

poprzez modulację transportu jonów potasu przez RPE [38]. Nabłonek barwnikowy siatkówki odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu funkcji wzrokowej – zachodzi w nim reizomeryzacja powstającego w wyniku absorpcji fotonu all-trans-retinalu do 11-cis-retinalu, co zostanie szczegółowo omówione w dalszej części pracy (podrozdział 1.3.5). Warstwa komórek RPE produkuje i wydziela m.in. różne czynniki wzrostu jak również substancje niezbędne do utrzymania integralności strukturalnej siatkówki [38].



Rys. 1.1.13 Funkcje nabłonka barwnikowego RPE. Oznaczenia: MV - mikroskopki wierzchołkowe warstwy RPE, OS - segment zewnętrzny fotoreceptora, PEDF - czynnik wzrostu pochodzący z nabłonka pigmentowego, VEGF - czynnik wzrostu nabłonka naczyniowego; z [41].

Warstwa RPE jest krytyczna dla prawidłowego funkcjonowania komórek światłoczułych - bierze udział w fagocytowaniu zużytych dysków (Rys. 1.1.14) [40].



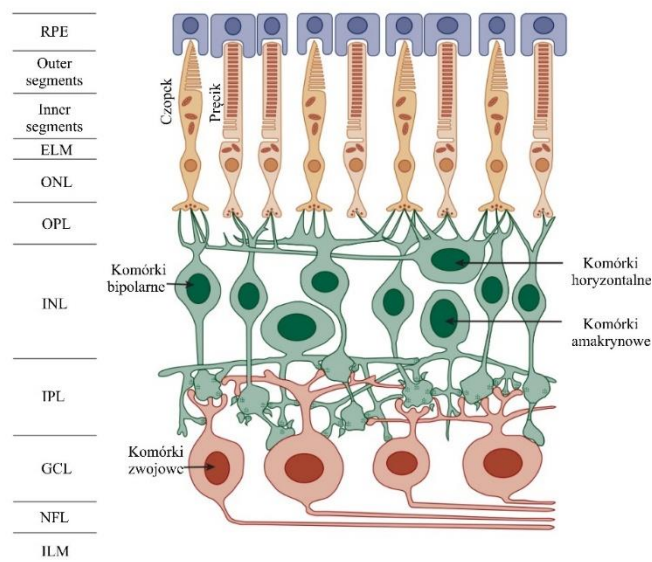
Rys. 1.1.14 Komórki nabłonka barwnikowego siatkówki w procesie fagocytozy. Na podstawie [40].

Opsyny zawarte w błoniastych dyskach fotoreceptorów są podatne na uszkodzenia fototoksyczne. Najstarsze dyski znajdują się właśnie na końcu segmentu zewnętrznego, od strony nabłonka barwnikowego i są dzięki niemu usuwane. Proces od powstania nowych

dysków do ich fagocytozy trwa około dwóch tygodni [40]. Dyski pręcików są fagocytowane w tempie około 10 % dziennie – każda komórka nabłonka barwnikowego pochłania i niszczy około 2000 – 4000 dysków segmentu zewnętrznego pręcika na dzień [42]. W ciągu dnia zachodzi fagocytoza dysków pręcików, a nocą – czopków [5], [42].

1.1.9 Warstwa neurosensoryczna

W neurosensorycznej części siatkówki możemy wyróżnić trzy warstwy komórek nerwowych kluczowych pod względem przekazywania impulsu nerwowego do mózgu i dwie warstwy połączeń synaptycznych. Zaczynając od leżącej w najbardziej zewnętrznej części siatkówki są to: warstwa fotoreceptorów, warstwa komórek dwubiegunowych oraz warstwa komórek zwojowych z warstwą włókien nerwowych (ang. *Nerve Fiber Layer*, NFL) [7]. Uproszczony schemat organizacji siatkówki przedstawia Rys. 1.1.15. Błona graniczna wewnętrzna (ang. *Inner Plexiform Layer*, ILM) oddziela siatkówkę od ciała szklanego.



Rys. 1.1.15 Uproszczony schemat organizacji siatkówki. RPE (ang. *Retinal Pigment Epithelium*) – nabłonek barwnikowy siatkówki, Outer segments (ang. *Outer Segment Junction*) – linia łącząca zewnętrzne segmenty fotoreceptorów, Inner segments (ang. *Inner Segment Junction*) – linia łącząca wewnętrzne segmenty fotoreceptorów, ELM ang. (*External Limiting Membrane*) – błona graniczna zewnętrzna, ONL (ang. *Outer Nuclear Layer*) - zewnętrzna warstwa jądrista, OPL (ang. *Outer Plexiform Layer*) - zewnętrzna warstwa splotowata, INL (ang. *Inner Nuclear Layer*) – wewnętrzna warstwa jądrista, IPL (ang. *Inner Plexiform Layer*) – wewnętrzna warstwa splotowata, GCL (ang. *Ganglion Cell Layer*) – warstwa komórek zwojowych, NFL (ang. *Nerve Fibre Layer*) – warstwa włókien nerwowych, ILM (ang. *Internal Limiting Membrane*) – błona graniczna wewnętrzna. Na podstawie [5].

Warto zwrócić uwagę na kierunek biegu promienia świetlnego przez siatkówkę. Docierające tu kwanty światła przechodzą najpierw „niezauważone” przez warstwy

komórek nerwowych i są absorbowane na „dnie” siatkówki przez fotoreceptory. Przekształcone na impuls nerwowy promieniowanie odbywa niejako drogę powrotną przez komórki nerwowe i jest wysyłane nerwem wzrokowym do mózgu. Wyjątek stanowią duże natężenia światła (powyżej $11 \log \text{ fot}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ dla 480 nm [43]), – w takim przypadku fotony są również częściowo absorbowane przez światłoczułe komórki zwojowe, które zostaną omówione poniżej.

Pierwsza warstwa zawierająca fotoreceptory (omówione w podrozdziale 1.1.7) łączy się ze środkową warstwą siatkówki przez warstwę splotowatą zewnętrzną (OPL).

Środkową warstwę siatkówki – komórki dwubiegunowe – traktować możemy jako złącze pomiędzy fotoreceptorami a komórkami zwojowymi. Wyróżnia się tu (Rys. 1.1.15) komórki dwubiegunowe, komórki amakrynowe i poziome oraz komórki Müllera. Pierwsze stanowią główne komórki przekaźnikowe z fotoreceptorów do komórek zwojowych. Rolą komórek amakrynowych i poziomych jest pomoc w integracji całego układu. Komórki Müllera pełnią rolę podporową i odżywczą [7] jak również biorą udział w regeneracji pigmentów wzrokowych czopków (podrozdział 1.3.5). Kolejne połączenie synaptyczne stanowi warstwa splotowata wewnętrzna (IPL).

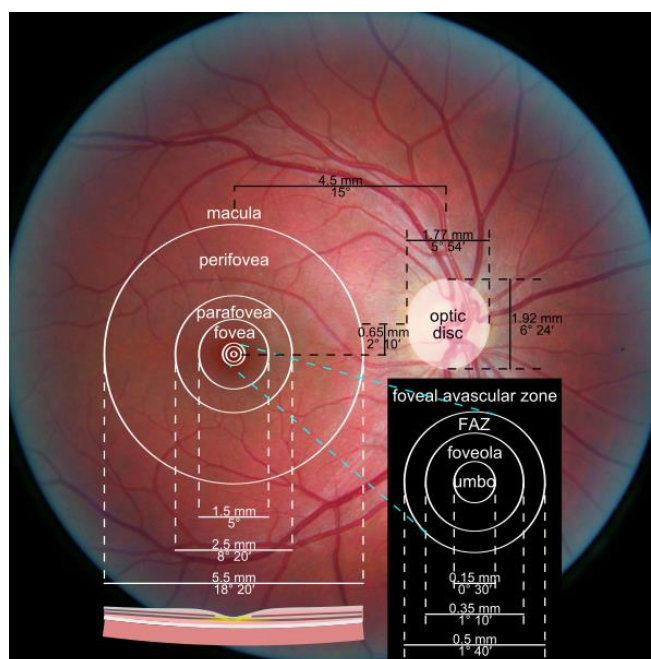
Warstwa komórek zwojowych (1,2 miliona) stanowi ostatnią grupę neuronów w siatkówce. Część z nich (0,2 % [43]) zawiera światłoczuły barwnik – melanopsynę, której maksimum czułości spektralnej przypada na 482 nm [33]. Komórki te nazywamy wewnątrznie światłoczułymi komórkami zwojowymi siatkówki (ang. *Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell*, ipRGC). Odpowiadają one za niewizualne procesy, m.in. za odruch źreniczny przy dużych natężeniach światła i za regulację rytmu dobowego. Komórki ipRGC same są zdolne do wykrywania światła przez melanopsynę jak również zbierają sygnały zewnętrzne od czopków i pręcików i decydują o odruchu źrenicznym [19] (podrozdział 1.1.3). W przypadku stymulacji komórek ipRGC przez światło padające na siatkówkę, w przebiegach reakcji źrenicy obserwujemy dodatkowo utrzymujące się w czasie zmniejszenie średnicy źrenicy po wyłączeniu bodźca (ang. *Post-Illumination Pupil Response*, PIRP [44]).

Aksony komórek zwojowych łączą się ze sobą tworząc warstwę włókien nerwowych (NFL). Wszystkie zbiegają się w jednym miejscu tworząc tarczę nerwu wzrokowego i nerw wzrokowy.

1.1.10 Obraz dna oka i obszary siatkówki

W 1850 roku Niemiecki badacz Hermann von Helmholtz pracujący nad rozwikłaniem zagadki dotyczącej źrenic, które w pewnych warunkach były jaskrawoczerwone i świecące, jako pierwszy skonstruował oftalmoskop [45]. Przyrząd ten pozwalał zajrzeć do wnętrza

oka i zobaczyć jego dno – pomarańczowy obraz poprzecinany sieciami naczyń krwionośnych. Rys. 1.1.16 przedstawia zdjęcie dna oka z oftalmoskopu z zaznaczonymi istotnymi obszarami.



Rys. 1.1.16 Zdjęcie dna oka z zaznaczonymi istotnymi obszarami siatkówki: dysk optyczny (optic disc), plamka żółta (macula), fovea (dołek środkowy), dołeczek (foveola), strefa awaskularna dołka (foveal avascular zone, FAZ); z [46].

Plamka żółta (macula lutea) obejmuje obszar o średnicy około 5,5 mm (18° 20') pomiędzy arkadami naczyniowymi. Określenie „żółta” zawdzięcza obecności żółtego barwnika ochronnego – ksantofilu, który podczas oglądania dna oka oftalmoskopem powoduje powstawanie żółtawego refleksu w tym obszarze [7]. Pigment ten pochłania światło niebieskie i wspomaga widzenie poprzez zmniejszenie rozprożeń i efektów aberracji chromatycznej [5], [47]. Plamka żółta na zdjęciach z oftalmoskopu jest ciemniejsza niż reszta siatkówki, bo nabłonek barwnikowy w obszarze plamki zawiera większe ilości ciemnego barwnika – melaniny [7]. Występuje tu największe zagęszczenie czopków. Plamka umiejscowiona jest 3,0 mm skroniowo i 0,8 mm poniżej środka tarczy nerwu wzrokowego. Perifovea jest pierścieniem o szerokości około 1,5 mm zaczynającym się od zewnętrznej granicy plamki żółtej a kończącym na najbardziej zewnętrznej granicy parafovea. Parafovea to pierścień o szerokości około 0,5 mm otaczający dołek (fovea). Warstwa komórek zwojowych, wewnętrzna warstwa jądrowa i warstwa splotowata zewnętrzna są w tym obszarze grube, tzn. siatkówka jest najbardziej ciasna, „zbita”. Dołek środkowy (fovea centralis) to wklęsłe centralne zagłębienie w wewnętrznej części siatkówki o średnicy około 1,5 mm, czyli 5° (średnica podobna do średnicy tarczy nerwu wzrokowego), w którym widzenie jest najostrzejsze [7]. Wyróżnić tu możemy brzeg, zbocze

i dno. Zagłębienie utworzone jest przez odsunięcie elementów neuronalnych siatkówki wewnętrznej (komórki dwubiegunowe i zwojowe [15]) na boki, co umożliwia padanie światła bezpośrednio na zewnętrzne segmenty czopków [5]. Istotę dołka środkowego dobrze pokazuje jego reprezentacja w korze mózgowej. Centralna część dołka środkowego obejmuje tylko około 0,01 % całkowitej powierzchni siatkówki, a zajmuje około 8 % powierzchni pierwotnej kory wzrokowej [48]. Dołeczek (foveola) to dno dołka środkowego o średnicy około 0,35 mm (1 stopnia 10 min) zawierające wyłącznie czopki, których gęstość upakowania jest największa. W centrum dna dołeczka (umbo) o średnicy około 0,15 – 0,2 mm gęsto upakowane czopki są ustawione wzdłużnie. Obszar ten pozbawiony jest krótkofalowych czopków niebieskich (centralna ślepotą niebieską) [15]. Obszar plamki zwany dołeczkową strefą beznacyniową (foveal avascular zone) większy od dołeczka o około 0,5 stopnia jest pozbawiony sieci naczyń krwionośnych i warstwy włókien nerwowych [7]. Umożliwia to zwiększenie rozdzielczości widzenia dołka środkowego przez eliminację rozprożeń światła pochodzących od naczyń krwionośnych [5].

Po prawej stronie (Rys. 1.1.16) widzimy zaznaczony jaśniejszy, żółtawy obszar dysku optycznego, do którego zbiegają aksony komórek zwojowych tworząc nerw optyczny. Jest to obszar całkowicie niewrażliwy na światło, ponieważ nie zawiera w sobie komórek światłoczułych. Nazywany jest przez to „plamką ślepą”. Prosty eksperyment na istnienie plamki ślepej można przeprowadzić korzystając z Rys. 1.1.17



Rys. 1.1.17 Należy zasłonić lewe oko, prawym patrzeć na kropkę po lewej stronie rysunku, przybliżyć się do monitora/kartki i stopniowo oddalać się od ekranu. W pewnym momencie zobaczymy znikanie serca znajdującego się po prawej stronie. Stanie się tak dla odległości, w której serce zobrazuje się na siatkówce w odległości około 15 stopni od plamki żółtej. Praca własna.

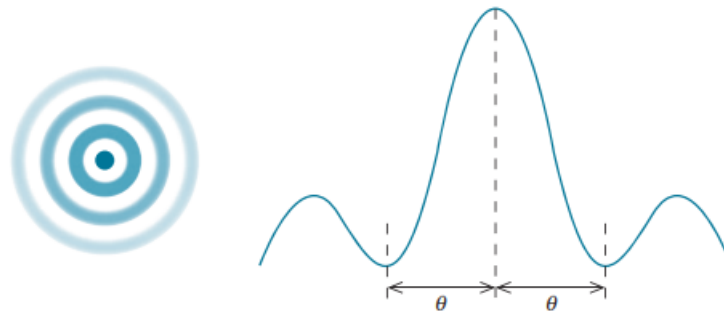
Wiadomym jest jednak, że nasze pole widzenia jest w całości zapełnione przez obraz, mimo że część siatkówki przypadająca na plamkę ślepą nie może go przetworzyć na impulsy nerwowe. Mózg jednak kompensuje ten brak sygnału i dzięki ruchom oka uzupełnia i zapamiętuje brakujące informacje.

1.2 Oko jako układ optyczny

1.2.1 Definicja podstawowych pojęć

Dysk Airy'ego

Światło przechodząc przez mały otwór ulega dyfrakcji. W związku z tym, na ekranie znajdującym się za beazaberracyjnym układem optycznym zawierającym kołową przysłonę aperturową, powstaje obraz, który jest utworzony z plamki otoczonej pierścieniami (Rys. 1.2.1) – jest to wzór dyfrakcyjny tzw. dysk lub plamka Airy'ego.



Rys. 1.2.1 A. Wzór dyfrakcyjny dysku Airy'ego B. Profil intensywności wzoru dyfrakcyjnego; z [49].

Promień dysku Airy'ego (w radianach) θ dany jest wzorem [49]:

$$\theta = 1,22 \frac{\lambda}{d}$$

(1-2)

gdzie:

d – średnica źrenicy,

λ – długość fali.

Gdy średnica wiązki (źrenicy ograniczającej jej aperturę) maleje, to średnica dysku Airyego rośnie. Widzimy więc, że żeby otrzymać jak najmniejszą wiązkę na siatkówce należy używać dużych wiązek. Zjawisko dyfrakcji ogranicza ostrość widzenia.

Rozdzielczość widzenia – kryterium Rayleigha

Zdolność rozdzielcza systemu obrazującego jest ograniczona przez zjawisko dyfrakcji i definiuje się ją jako najmniejszą odległość między dwoma dyskami Airy'ego, dla której

dyski mogą być postrzegane jako oddzielne. Kryterium rozdzielczości Rayleigha ustala granicę rozdzielczości dwóch obiektów świecących, gdy środek pierwszej tarczy dysku Airy'ego znajduje się w minimum wzoru Airy'ego drugiego źródła. Kątowa granica rozdzielczości $(\Delta\varphi)_{min}$ (wyrażona w radianach) jest opisana przez wzór [24]:

$$(\Delta\varphi)_{min} = \Delta\theta = \frac{1,22\lambda}{D} \quad (1-3)$$

gdzie:

$\Delta\theta$ – miara kątowa dysku Airy'ego,

λ – długość fali,

D – średnica otworu.

Przykładowo przyjmując średnicę źrenicy jako równą około 2 mm (Rys. 1.1.3) przy jasnym dziennym oświetleniu, dla długości fali 550 nm kątowa granica rozdzielczości $(\Delta\varphi)_{min} \approx 1'$. Wielkość ta odpowiada rozdzielaniu dwóch punktów odległych od siebie o 2,5 cm z odległości 90 m. Granicę rozdzielczości równą 1' uznaje się za odpowiadającą normalnej ostrości wzroku w badaniu ostrości wzroku za pomocą tablic Snellena i określa się ją jako 20/20. Podczas takiego badania pacjent znajduje się w odległości 6 m od tablicy i posiadając normalną ostrość widzenia rozróżni elementy rozdzielone od siebie o 1,7 mm. Granica rozdzielczości $(\Delta l)_{min}$ dana jest wzorem [24]:

$$(\Delta l)_{min} = \Delta\theta = \frac{1,22f\lambda}{D} \quad (1-4)$$

gdzie:

f – ogniskowa soczewki.

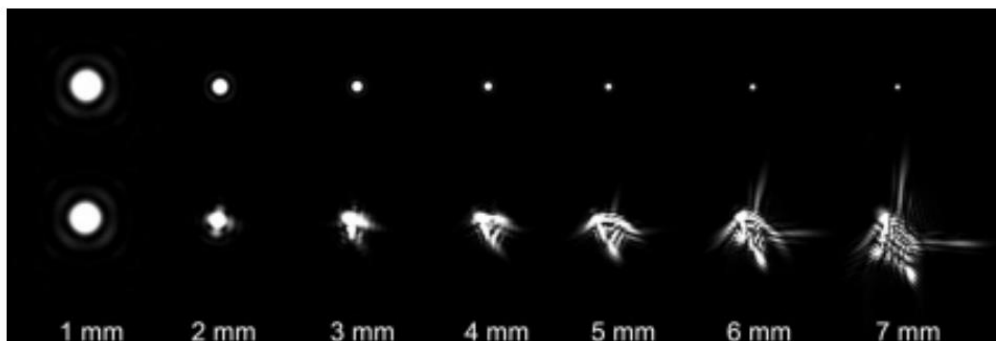
Zdolność rozdzielcza systemu definiowana jest jako odwrotność kątowej granicy rozdzielczości lub granicy rozdzielczości [24]. Przy założeniu ogniskowej soczewki w oku $f = 20$ mm wartość granicy rozdzielczości wynosi $(\Delta l)_{min} = 6,7 \mu m$ na powierzchni siatkówki.

Jakość systemu wzrokowego i funkcja rozmycia punktowego w oku

Jakość całego systemu wzrokowego człowieka zależy zarówno od czynników optycznych jak i neuronalnych. Czynniki optyczne decydujące o jakości obrazu można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej zaliczamy czynniki zależne od długości fali i rozmiaru źrenicy: wady refrakcji, aberracje oka i dyfrakcje. Drugą grupę stanowią czynniki zależne od poziomu i charakteru zaburzeń ośrodka wzrokowego (rozproszenie światła) [14].

Elementy optyczne oka nie są idealne. Zaburzenia wprowadzane głównie przez rogówkę i soczewkę powodują, że mały punkt widziany przez oko jest odwzorowywany na siatkówce jako rozmyty. Do opisu jakości odwzorowania obrazu punktu przez soczewkę używa się funkcji rozmycia punktowego (ang. *Point Spread Function*, PSF).

Rys. 1.2.2 przedstawia wygląd funkcji PSF dla oka bez aberracji i dla oka z typowymi aberracjami dla różnej wielkości źrenicy. Obserwujemy, że dla oka idealnego (bez aberracji) wraz ze wzrostem rozmiaru źrenicy funkcja PSF zmniejsza się zapewniając potencjalnie większą rozdzielczość. Jednak dla oka z aberracjami funkcja PSF dla większych źrenic ulega rozmazaniu i zniekształceniu. Kompromisowym rozmiarem źrenicy dla osiągnięcia najlepszej rozdzielczości poprzecznej jest średnica wiązki między 2 mm a 4 mm.



Rys. 1.2.2 Funkcja PSF dla oka A. bez aberracji B. z typowymi aberracjami, dla różnej średnicy źrenicy podanej na dole rysunku. Zaczernięto z [50], [51].

Apertura numeryczna oka

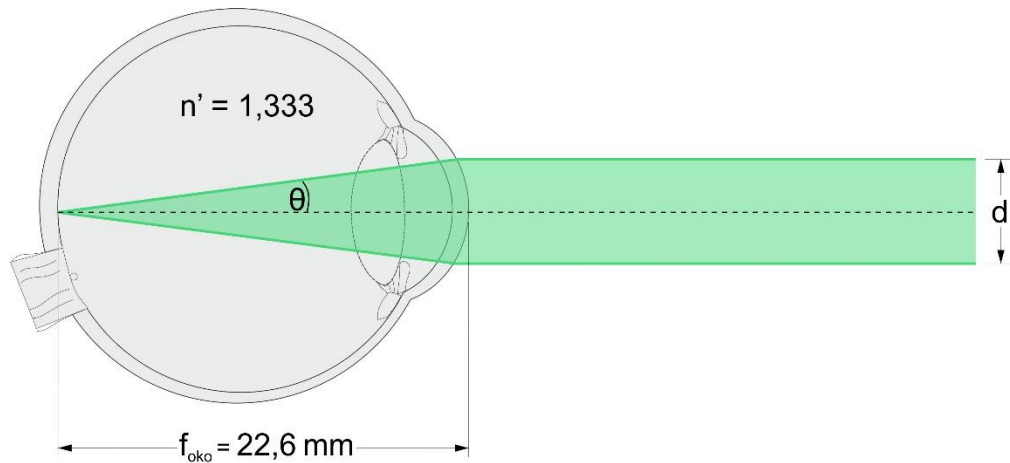
Apertura numeryczna (ang. *numerical aperture*, NA) zgodnie z definicją [52] określona jest wzorem:

$$NA = n \cdot \sin \theta \quad (1-5)$$

gdzie:

n – współczynnik załamania ośrodka między soczewką obiektywu a obiektywem,

θ – połowa apertury kątowej soczewki obiektywu.



Rys. 1.2.3 Schematyczne przedstawienie wiązki laserowej wchodzącej do oka modelowego. Oznaczenia: n' - uśredniony współczynnik załamania oka, f_{oko} - ogniskowa oka, d - średnica wiązki na rogówce, θ - połowa apertury kątowej oka.

Przyjmując dla całego oka uśredniony współczynnik załamania $n' = 1,333$ oraz ogniskową oka modelowego $f_{oko} = 22,6$ mm (Rys. 1.2.3), możemy obliczyć wartości NA w zależności od średnicy wiązki na rogówce d (mm). Maksymalna apertura numeryczna oka zakładająca 8-milimetrową średnicę wiązki całkowicie wypełniającą źrenicę wynosi $NA_{max} = 0,23$ (Tab. 1.2-1).

Rozmiar plamki na siatkówce

Zakładając pomijalny wpływ aberracji (oko idealne) i ograniczenie jedynie limitem dyfrakcyjnym możemy oszacować rozmiar plamki na siatkówce ($d_{siatkowka}$) jako:

$$d_{siatkowka} = \frac{4\lambda_{w\ oku} f_{oka}}{\pi d_{rogowka}} \quad (1-6)$$

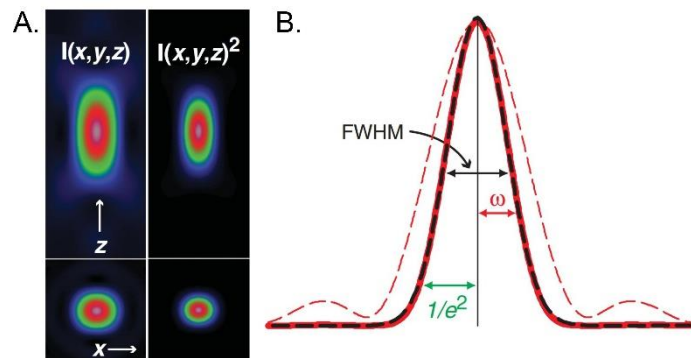
gdzie:

$\lambda_{w\ oku}$ - długość fali w oku (uwzględniająca współczynnik załamania),

f_{oka} - ogniskowa oka,

$d_{rogowka}$ - średnica wiązki na rogówce.

Z kolei dla przypadku wiązki postrzeganej dwufotonowo objętość procesu wzbudzenia dwufotonowego możemy oszacować korzystając z opisu stosowanego w mikroskopii dwufotonowej [53]. Objętość wzbudzenia dwufotonowego ilustruje Rys. 1.2.4.



Rys. 1.2.4 Objętość wzbudzenia dwufotonowego A. osiowy i boczny rzut IPSF i $IPSF^2$. Podniesienie do kwadratu IPSF skutkuje zminimalizowaniem skrzydeł bocznych w stosunku do środka. B. Profil osiowy $(0,0,z)$ IPSF (przerywana czerwona linia) i $IPSF^2(0,0,z)$ (ciągła linia czerwona). Funkcja Gaussa oznaczona czarną przerywaną linią; FWHM – szerokość połówkowa, ω – promień profilu kwadratowej intensywności bocznej $IPSF^2$; IPSF – natężeniowa funkcja rozmycia punktowego (ang. Illumination Point Spread Function); z [53].

Ognisko dwufotonowe określa się zgodnie z równaniami z pracy [53] dotyczącymi wyznaczania profili kwadratowej intensywności bocznej $1/e^2$ (xy) ω_{xy} . Zgodnie ze wzorem obowiązującym dla apertury numerycznej $NA \leq 0,7$ – pamiętając, że maksymalna apertura numeryczna oka wynosi 0,23 stosujemy zależność:

$$\omega_{xy} = \frac{0,320\lambda}{\sqrt{2} NA} \quad (1-7)$$

Profil kwadratowej intensywności osiowej (z) ω_z określa równanie:

$$\omega_z = \frac{0,532\lambda}{\sqrt{2}} \left[\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right] \quad (1-8)$$

Obliczenia apertury numerycznej dla różnych rozmiarów wiązki wchodzącej do oka (zgodnie z wzorem (1-5)) oraz średnice wiązek na siatkówce dla długości fali 1040 nm (wzór (1-7)) i 520 nm (wzór (1-6)) zestawiono w Tab. 1.2-1.

Tab. 1.2-1 Apertura numeryczna oka NA w zależności od rozmiaru wiązki d na rogówce oraz średnice wiązek na siatkówce $d_{\text{siatkówka}}$. Przyjęto uśredniony współczynnik załamania oka modelowego ($n' = 1,333$). Pozostałe oznaczenia zgodnie z powyższym tekstem

Średnica wiązki na rogówce	Sinus połowy apertury kątowej oka	Apertura numeryczna oka	Połowa apertury kątowej	Średnica wiązki na siatkówce		
				1040 nm jednofotonowa	1040 nm dwufotonowa	520 nm jednofotonowa
d (mm)	$\sin \theta$	NA	θ (°)	$d_{\text{siatkówka},1\text{ph}} (\mu\text{m})$	$d_{\text{siatkówka},2\text{ph}} (\mu\text{m})$	$d_{\text{siatkówka},1\text{ph}} (\mu\text{m})$
8	0,174	0,23	10,0	2,8	2,0	1,4
6	0,132	0,18	7,6	3,7	2,7	1,9
4	0,088	0,12	5,1	5,6	4,0	2,8
3	0,066	0,09	3,8	7,5	5,3	3,7
2	0,044	0,06	2,5	11,2	8,0	5,6
1	0,022	0,03	1,3	22,5	16,0	11,2

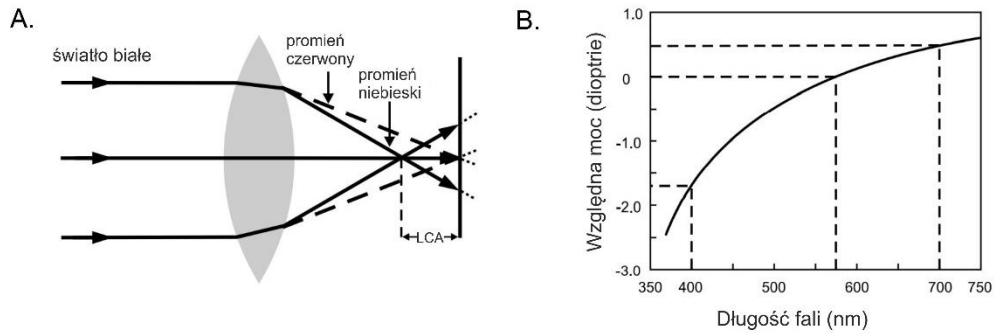
Aberracje chromatyczne

Nawet idealny system optyczny wprowadza aberracje, które wpływają negatywnie na jakość odwzorowywanego obrazu obniżając ją. Wyróżniamy aberracje monochromatyczne (wytwarzane przez pojedynczą długość fali, aberracje Seidela wyrażane najczęściej przez wielomiany Zernika) i chromatyczne [49].

Aberracje chromatyczne (ang. *chromatic aberrations*, CA) związane są z zależnością wartości współczynnika załamania od długości fali. Różne długości fali przechodzą przez układ wzdłuż różnych dróg optycznych i tak np. przechodząc przez soczewkę ogniskować się będą w różnych miejscach wzdłuż osi optycznej układu. Wartość współczynnika załamania zmniejsza się wraz ze wzrostem długości fali w zakresie światła widzialnego, tak więc światło czerwone będzie ogniskowało się na dalszej płaszczyźnie niż światło niebieskie (Rys. 1.2.5.A). Różnica pomiędzy odległościami ogniskowymi nazywana jest wzdłużną (osiową) aberracją chromatyczną (ang. *Longitudinal (Axial) Chromatic Aberration*, LCA (ACA)).

W związku z zależnością wartości współczynników załamania dla poszczególnych ośrodków oka od długości fali, ludzkie oko nie ma takiej samej mocy optycznej dla całego spektrum promieniowania - posiada wadę wzdłużnej aberracji chromatycznej. Jej średnia

wartość wynosi około 1,75 D dla zakresu 420 nm – 660 nm[15]. Rys. 1.2.5.B przedstawia moc potrzebną do skorygowania LCA dla zakresu długości fal 370 nm – 750 nm.

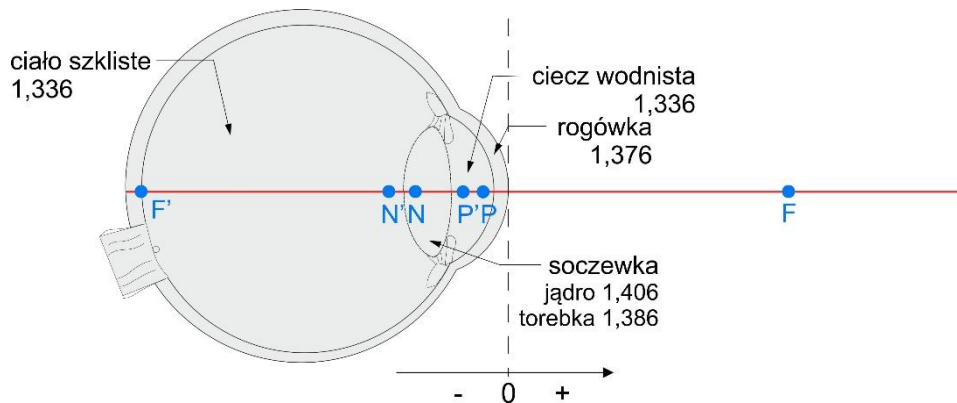


Rys. 1.2.5 A. Wzdłużna aberracja chromatyczna (LCA) między promieniem czerwonym a niebieskim, B. Moc soczewki potrzebna do skorygowania LCA dla monochromatycznych długości fal z zakresu 370 nm – 750 nm względem ogniska 575 nm. Na podstawie [15].

1.2.2 Układ optyczny oka

Cztery główne struktury tworzą układ optyczny oka: rogówka, ciecz wodnista komory przedniej, soczewka i ciało szkliste. Jak wspomniano wcześniej, źrenica pełni rolę regulowanej przysłony aperturowej, a siatkówka jest detektorem formowanego na jej powierzchni obrazu [54].

Układ optyczny oka jest upraszczany i przybliżany przez różne modele. Najbardziej znanym jest uhonorowany nagrodą Nobla w 1911 r. model oka Gullstranda (Rys. 1.2.6). Rys. 1.2.6 Parametry optyczne modelu oka schematycznego wg Gullstranda: współczynniki załamania ośrodków optycznych i położenie punktów kardynalnych stosowanych w obliczeniach optycznych. Liniją przerywaną oznaczono położenie przedniej powierzchni rogówki. Objasnienia symboli punktów w poniższej tabeli (Tab. 1.2-2). Rysunek własny na podstawie [14], [55].



Rys. 1.2.6 Parametry optyczne modelu oka schematycznego wg Gullstranda: współczynniki załamania ośrodków optycznych i położenie punktów kardynalnych stosowanych w obliczeniach optycznych. Liniją przerywaną

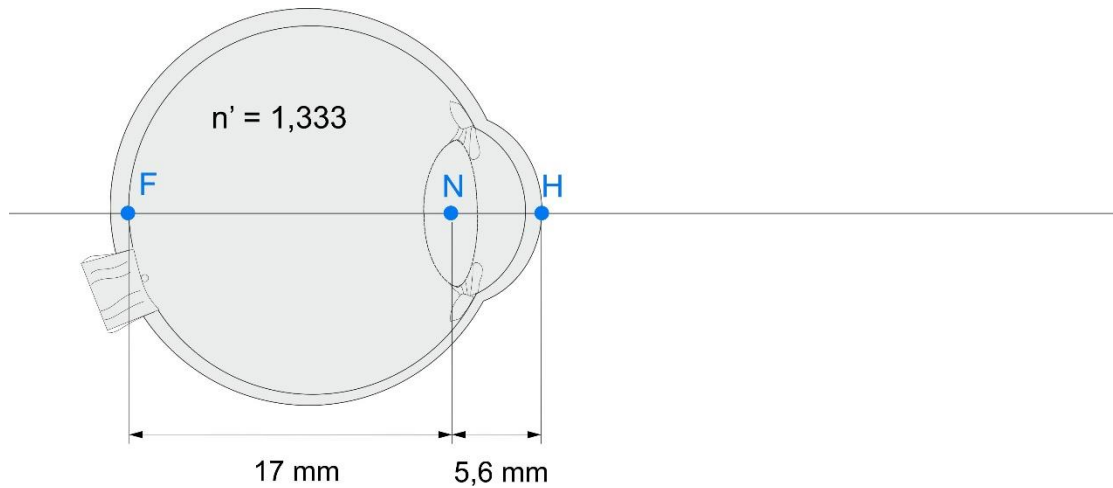
oznaczono położenie przedniej powierzchni rogówki. Objaśnienia symboli punktów w poniższej tabeli (Tab. 1.2-2). Rysunek własny na podstawie [14], [55].

Położenie powierzchni łamiących i punktów kardynalnych w tym modelu oka zestawiono w Tab. 1.2-2. Linia przerywana na Rys. 1.2.6 stanowi odniesienie dla pozostałych elementów układu optycznego oka, przy czym odległości na lewo mają wartości dodatnie, a na prawo – ujemne.

Tab. 1.2-2 Model optyczny oka schematycznego wg Gullstranda - całościowy układ optyczny oka. Na podstawie [55].

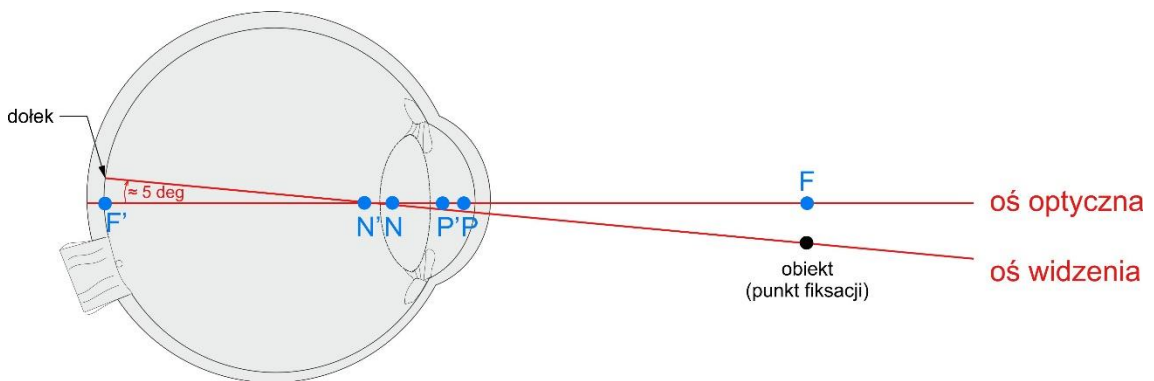
Element układu optycznego oka	Akomodacja rozluźniona	Akomodacja maksymalna
Moc łamiąca	58,64	70,57
Położenie pierwszego punktu głównego (P)	1,348	1,772
Położenie drugiego punktu głównego (P')	1,602	2,086
Położenie pierwszego ogniska (F)	-15,707	-12,397
Położenie drugiego ogniska (F')	24,387	21,016
Pierwsza ogniskowa	-17,055	-14,169
Druga ogniskowa	22,785	18,930
Położenie pierwszego punktu węzłowego (N)	7,078	
Położenie drugiego punktu węzłowego (N')	7,332	
Położenie dołka środkowego siatkówki	24,0	24,0
Refrakcja osiowa	-1,0	-9,6
Położenie punktu bliży		-102,3

Często stosuje się uproszczenie modelu oka wg Gullstranda nazywane modelem zredukowanym oka schematycznego. Model zredukowany przedstawiony jest na Rys. 1.2.7.



Rys. 1.2.7 Zredukowany model optyczny oka: H - przednia powierzchnia rogówki, N - uproszczony punkt węzłowy oka, F - dołek; n' - uproszczony współczynnik załamania oka. Odległości między uproszczonymi punktami węzłowymi zaznaczono na rysunku. Rysunek własny na podstawie [55].

W literaturze wyróżnia się kilka osi oka [14] m.in. widzenia, źreniczną, optyczną, główną linię widzenia. Rys. 1.2.8 przedstawia dwie najważniejsze z nich: oś optyczną i oś widzenia. W optyce geometrycznej oś optyczna jest zwykle definiowana jako linia łącząca środki krzywizn powierzchni załamujących. Oko nie jest jednak idealnie symetryczne obrotowo – nawet gdyby cztery powierzchnie załamujące, były idealnie symetryczne obrotowo, środki krzywizn nie byłyby współliniowe. Dlatego w przypadku oka oś optyczną definiuje się jako linię najlepszego dopasowania przechodzącą przez niewspółliniowe punkty optycznych środków rogówki, soczewki i dołka. Oś widzenia jest definiowana jako linia łącząca obiekt zainteresowania i dołek.



Rys. 1.2.8 Oś optyczna i oś widzenia oka (rysunek własny na podstawie [14], [55]). Oznaczenia punktów kardynalnych zgodne z modelem Gullstranda.

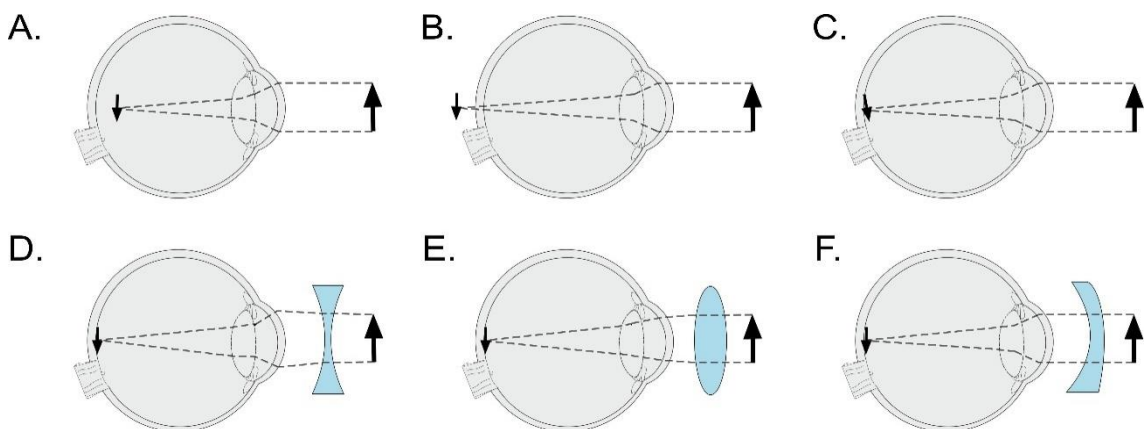
Promienie przyosiowe to z definicji promienie idące tak blisko osi optycznej, że zastosowanie przybliżenia $\sin \theta = \theta$ powoduje pomijany błąd (kąty wyrażone w radianach) [14]. Promienie takie traktujemy jak promienie bez aberracji. Stosowane w optyce równanie przyosiowe zakłada, że padające promienie światła tworzą mały kąt

z powierzchnią refrakcyjną, co umożliwia przybliżenie sinusa kąta tym kątem. Jest ono słuszne dla małych kątów tj. do około 30 stopni, dla których to błąd przybliżenia nie przekracza 2 %. Należy jednak pamiętać, że jakość obrazu ulega pogorszeniu [49].

Sytuacja komplikuje się, kiedy rozważane promienie nie mogą być przybliżone w taki sposób. Aberracje rosną i nie potrafimy ich w prosty sposób określić.

1.2.3 Wady refrakcji

Podstawowymi typami wad związanymi z płaszczyzną powstawania obrazu na siatkówce są krótkowzroczność (myopia), nadwzroczność (hyperopia) oraz astygmatyzm. Schematyczna ilustracja tych wad oraz sposób ich korekcji za pomocą soczewek zostały przedstawione na Rys. 1.2.9. W oku krótkowzrocznym płaszczyzna obrazu obiektu znajdującego się w nieskończoności tworzona jest przed siatkówką (Rys. 1.2.9.A). Sytuacja taka może być wynikiem za dużej mocy optycznej oka, zbyt długiej gałki ocznej lub kombinacji tych dwóch czynników. Na każde zwiększenie długości osiowej oka o 1/3 mm oko staje się o 1,0 D bardziej krótkowzroczne. Myopię koryguje się stosując soczewki rozpraszające (o ujemnych dioptriach), które przesuwają płaszczyznę obrazową na płaszczyznę siatkówki [49] (Rys. 1.2.9.D). W oku dalekowzrocznym obraz tworzony jest za siatkówką (Rys. 1.2.9.B), co może być powodowane za słabą mocą optyczną oka, zbyt krótką gałką oczną lub oboma czynnikami. Wadę tę koryguje się soczewkami skupiającymi (o dodatnich dioptriach) - Rys. 1.2.9.E. Astygmatyzm może wynikać np. z nieregularnego (niekulistego) kształtu powierzchni rogówki lub soczewki, co prowadzi do innego załamania światła w płaszczyznach poziomej i pionowej (Rys. 1.2.9.C). Wadę tę koryguje się za pomocą soczewek cylindrycznych (Rys. 1.2.9.F).



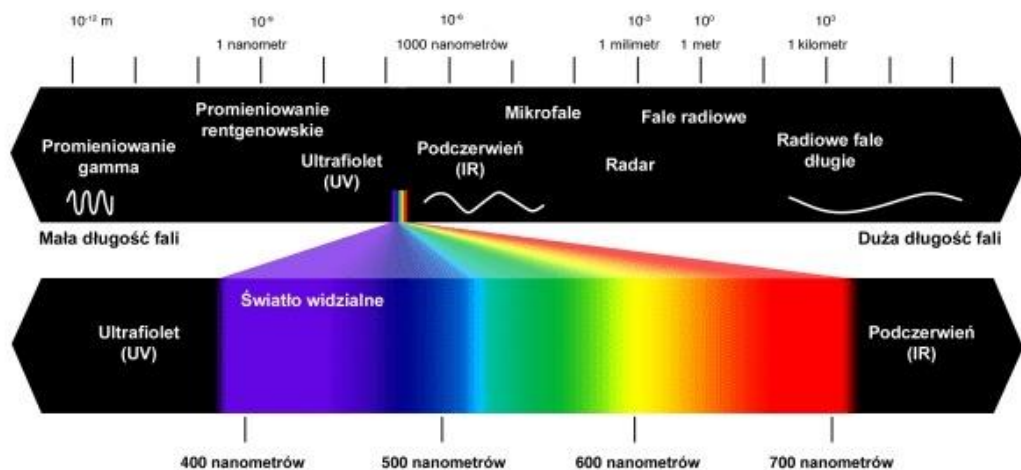
Rys. 1.2.9 Wady (A) krótkowzroczności, (B) nadwzroczności i (C) astygmatyzmu oraz sposoby ich korekcji za pomocą soczewek (D)-(F). Praca własna (na podstawie [56]).

1.3 Biochemia widzenia

Obraz na siatkówce utworzony przez układ optyczny oka musi zostać następnie przekonwertowany na sygnał elektryczny (nerwowy). W niniejszym podrozdziale zostanie dokonana ogólna analiza konwersji sygnału optycznego na elektryczny i nerwowy przez komórki siatkówki.

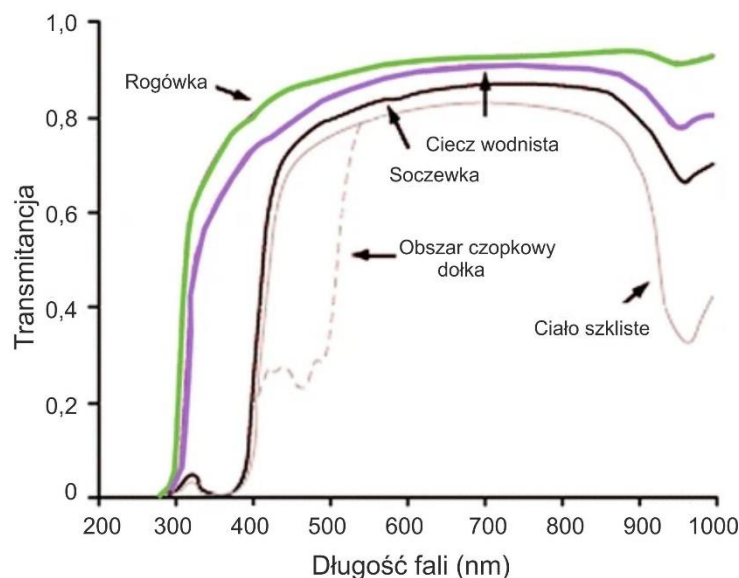
1.3.1 Czulość spektralna oka

Wycinek zakresu promieniowania elektromagnetycznego (Rys. 1.3.1) postrzegany przez ludzkie oko nazywany jest światłem widzialnym i określany jest zazwyczaj na długości fal od 380 nm do 780 nm. O zakresie widzialnym ludzkiego oka decydują zarówno jego struktura jak i czulość komórek fotoreceptorów.



Rys. 1.3.1 Zakres widzialny promieniowania elektromagnetycznego [57].

Krytyczne dla oka jest blokowanie promieniowania krótkofalowego (ultrafioletowego), które niesie ze sobą większe energie. Rogówka blokuje większość promieniowania elektromagnetycznego z zakresu ultrafioletu poniżej 280 nm jak widać na Rys. 1.3.2. chroniąc soczewkę przed ekspozycją na krótkie fale. Kolejną strukturą odcinającą dużą część promieniowania krótkofalowego jest soczewka wewnątrzgałkowa.

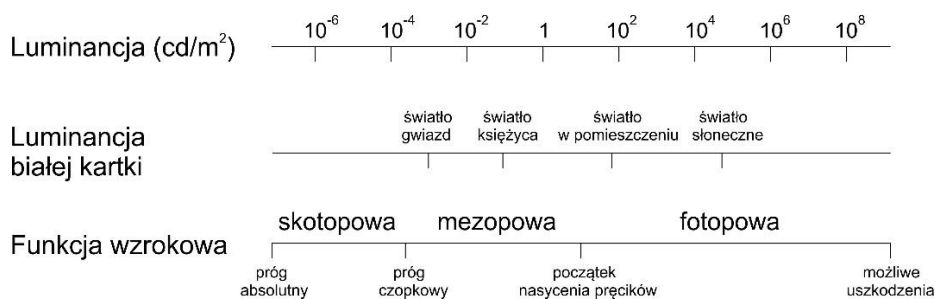


Rys. 1.3.2 Widmo transmisji mierzone na tylnej powierzchni kolejnych ośrodków oka: rogówki, cieczy wodnistej, soczewki, ciała szklistego i obszaru czopkowego dołka. Dane pochodzą z badań prowadzonych na świeżo wyłuszczonych oczach. Na podstawie [58].

Promieniowanie docierające do siatkówki oddziałuje z barwnikami zawartymi w fotoreceptorach. Widma absorpcji poszczególnych barwników przedstawiono w powyższym podrozdziale (Rys. 1.1.10).

1.3.2 Widzenie skotopowe, fotopowe i mezopowe

Zakresy luminancji, w których aktywne są fotoreceptory i związane z nimi reżimy widzenia: skotopowy, mezopowy i fotopowy przedstawia Rys. 1.3.3.



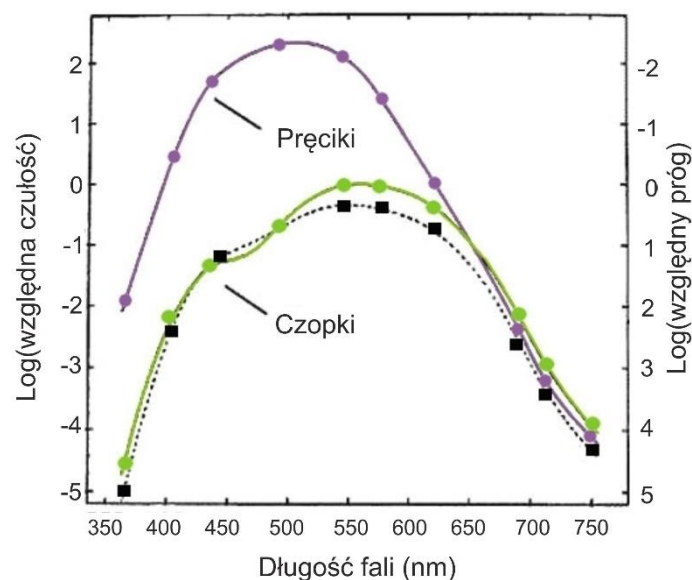
Rys. 1.3.3 Zakres dynamiczny działania oka obejmuje około 14 jednostek logarytmicznych natężenia światła. Pręciki działają od poziomu progów widzenia do około 6 rzędów wielkości luminancji więcej, natomiast czopki są aktywne w wyższych 8 – 10 rzędach wielkości. Pokrywający się obszar, w którym aktywne są oba rodzaje fotoreceptorów obejmuje około 4 jednostki logarytmiczne luminancji. Na podstawie [15].

O widzeniu fotopowym mówimy w jasnych (dziennych) warunkach oświetlenia, tj., kiedy poziom luminancji przekracza 5 cd/m². Jest to granica, przy której pręciki przestają być aktywne, a w procesie widzenia uczestniczą już tylko czopki [23]. Charakteryzuje się ono małą wrażliwością na słabe światło, doskonałą ostrością widzenia (20/20) i możliwością

rozróżniania kolorów [5]. Obniżaniu poziomu oświetlenia do tak zwanych warunków zmierzchowych towarzyszy coraz większy udział pręcików w widzeniu. Zakres luminancji, przy których oba typy fotoreceptorów biorą czynny udział w procesie widzenia nazywamy widzeniem mezopowym. Maksimum czułości pręcików przypada na wartość luminancji około $0,005 \text{ cd/m}^2$ i jest to dolna granica widzenia mezopowego [23]. Poniżej tej wartości czułość czopków jest już niewystarczająca i rolę w widzeniu odgrywają już tylko pręciki. Jest to widzenie skotopowe – aktywne w warunkach przyciemnionego (nocnego) oświetlenia, charakteryzujące się wrażliwością na bardzo słabe światło, monochromatyczne, o niskiej ostrości widzenia (20/200) [5].

Czułości czopków i pręcików w funkcji długości fali wykreślone względem maksymalnej czułości dołka przedstawia Rys. 1.3.4. W warunkach ciemności i bardzo słabego oświetlenia światło docierające do siatkówki nie jest w stanie przekroczyć progu pobudzenia czopków. Przykładowo bardzo słabe natężenie światła o długości fali 500 nm będzie najpierw postrzegane jako achromatyczne przez pręciki, a w miarę wzrostu jego natężenia i zaangażowania w proces widzenia czopków – zacznie być postrzegane jako zielone. Czułość czopków dla tej długości fali jest prawie trzy rzędy wielkości mniejsza niż czułość pręcików. Reżim widzenia skotopowego obejmuje 2 rzędy wielkości.

Dla długości fal powyżej 650 nm w warunkach adaptacji do ciemności bezwzględna czułość pręcików jest nieco niższa niż czułość czopków. Fakt ten pozwala wykorzystywać podczas badań w ciemności czerwone światło fiksacji, ostro widziane przez czopki przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej czułości pręcików [15].



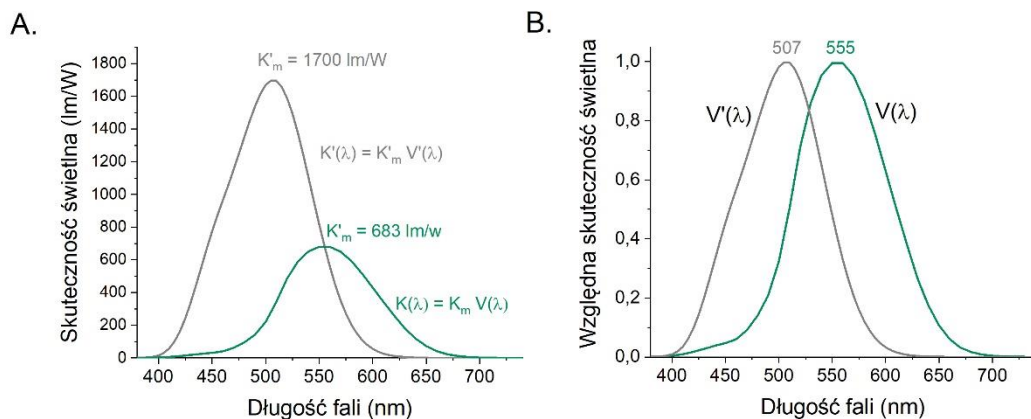
Rys. 1.3.4 Czułości spektralne zaadaptowanych do ciemności czopków dołka (zielony), czopków 8° nad dołkiem (czarny) i pręcików 8° nad dołkiem (fioletowy). Czułości wykreślone są względem maksymalnej czułości dołka; z [59].

Maksimum czułości występuje dla 507 nm, gdy oko jest zaadaptowane do ciemności (widzenie pręcikowe) i 555 nm w warunkach adaptacji do światła (widzenie czopkowe). Różnica między maksimumami czułości pręcików i czopków jest około 100-krotna na korzyść pręcików.

Efekt Purkiniego związany jest z większą wrażliwością pręcików w warunkach słabego oświetlenia na krótsze długości fal (niebieską i zieloną) niż na widzenie barw o dłuższych długościach fal (pomarańczową i czerwoną). W miarę zapadania zmroku obserwujemy zmieniającą się jasność czerwieni, która staje się dużo ciemniejsza, podczas gdy błękit wydaje się być dużo jaśniejszy niż w warunkach oświetlenia fotopowego. Dzieje się tak, ponieważ w mezopowym zakresie jasności, proporcje udziału pręcików i czopków w postrzeganiu zmieniają się – pręciki zaczynają dominować wraz ze wzrostem ciemności. Następuje przejście od widzenia czopkowego do pręcikowego, a skala jasności pręcików przeważa nad skalą jasności czopków [29].

1.3.3 Krzywa luminancji

Uogólnioną czułość widmową ludzkiego oka opisuje empiryczna krzywa luminancji. Względne reakcje widmowe oka nazywane są funkcjami spektralnej wydajności (skuteczności) świetlnej – krzywymi luminancji. Te empiryczne krzywe opublikowane przez Międzynarodową Komisję ds. Oświetlenia (fr. *Commission Internationale de l'Éclairage*, CIE) wyznaczone są dla przeciętnej percepcji ludzi o zdrowych oczach w ściśle określonych warunkach eksperymentalnych. Definiuje się krzywe dla widzenia fotopowego $V(\lambda)$ i skotopowego $V'(\lambda)$. Krzywa w widzeniu fotopowym nie jest prostą sumą czułości trzech typów czopków, ponieważ fotoreceptory te nie są równoliczne i równomiernie rozmieszczone na siatkówce (Rys. 1.1.11). Czopki S nie są obecne w dołku, stanowią jedynie około 5 – 10 % wszystkich czopków, a ich czułość jest znacząco mniejsza niż czopków M i L (Rys. 1.1.10). Dodatkowo maksima absorpcji pigmentów fotoreceptorów wypadają w różnych miejscach widma (Rys. 1.1.10). W związku z tym oko nie widzi jednakowo efektywnie wszystkich długości fal. Rys.1.3.5.A. przedstawia krzywe luminancji nieznormalizowane, w części B. krzywe zostały znormalizowane do maksimumów. W zakresie mezopowym odpowiedź spektralna oka jest złożona i nie została jeszcze scharakteryzowana.



Rys. 1.3.5 Krzywe luminancji skotopowa $V'(\lambda)$ i fotopowa $V(\lambda)$ A. nieznormalizowane i B. znormalizowane (na podstawie danych CIE (1951) z [60] oraz [61]).

Maksimum fotopowej krzywej luminancji $V(\lambda)$, która jest określona w zakresie od 380 nm do 780 nm, przypada na długość fali 555 nm (żółty) – bodziec o tej długości fali będzie postrzegany jako jaśniejszy niż inne monochromatyczne bodźce o takiej samej energii. Z kolei wartość szczytowa krzywej $V'(\lambda)$ przypada dla długości fali 507 nm. Dla krzywej fotopowej (Rys. 1.3.5) możemy odczytać, że dla dwóch bodźców o takiej samej mocy (np. 1 W) i przykładowych długości fali 400 nm i 600 nm wytwarzane jest odpowiednio 0 i około 420 lumenów światła. Mimo takiej samej mocy obu bodźców ich wpływ na układ wzrokowy jest różny z powodu różnej skuteczności świetlnej – wrażenie jasności jest ściśle związane z fotopową funkcją luminancji.

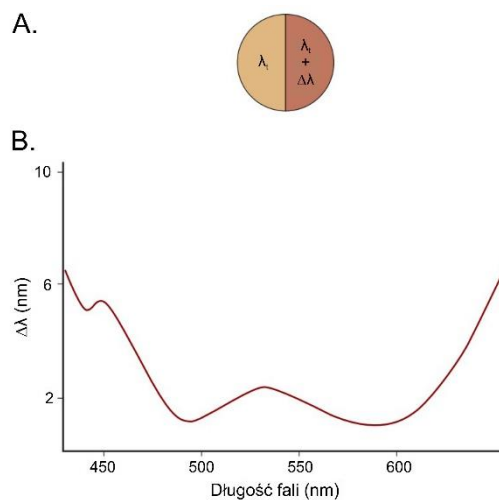
Współcześnie wykorzystywaną metodą wyznaczania funkcji jasności jest heterochromatyczna fotometria migotania (ang. *heterochromatic flicker photometry*) polegająca na dostosowaniu przez osobę badaną mocy jednego migotającego sygnału do ustalonej mocy drugiego, o innej długości fali tak, by wrażenie migotania bodźców ustało [62], [63]. Brak migotania oznacza równość luminancji obu bodźców. Procedura przeprowadzana jest w całym widmie.

Krzywe czułości widmowej są wykorzystywane jako funkcje wagowe do przeliczania jednostek energetycznych na jednostki fotometryczne, co zostanie omówione w dodatku *Konwersja między jednostkami radiometrycznymi*.

1.3.4 Rozróżnianie kolorów

Widzenie całej gamy barw kolorów, a nie jedynie trzech, kodowane jest w stosunkach pobudzeń różnych typów fotoreceptorów. Rys. 1.3.6 przedstawia tzw. „krzywą W” dyskryminacji barw. Ludzkie oko ma dwa maksima zdolności rozróżniania barw dla długości fal około 495 nm i 590 nm. Wtedy możliwe jest dostrzeżenie różnicy w barwie

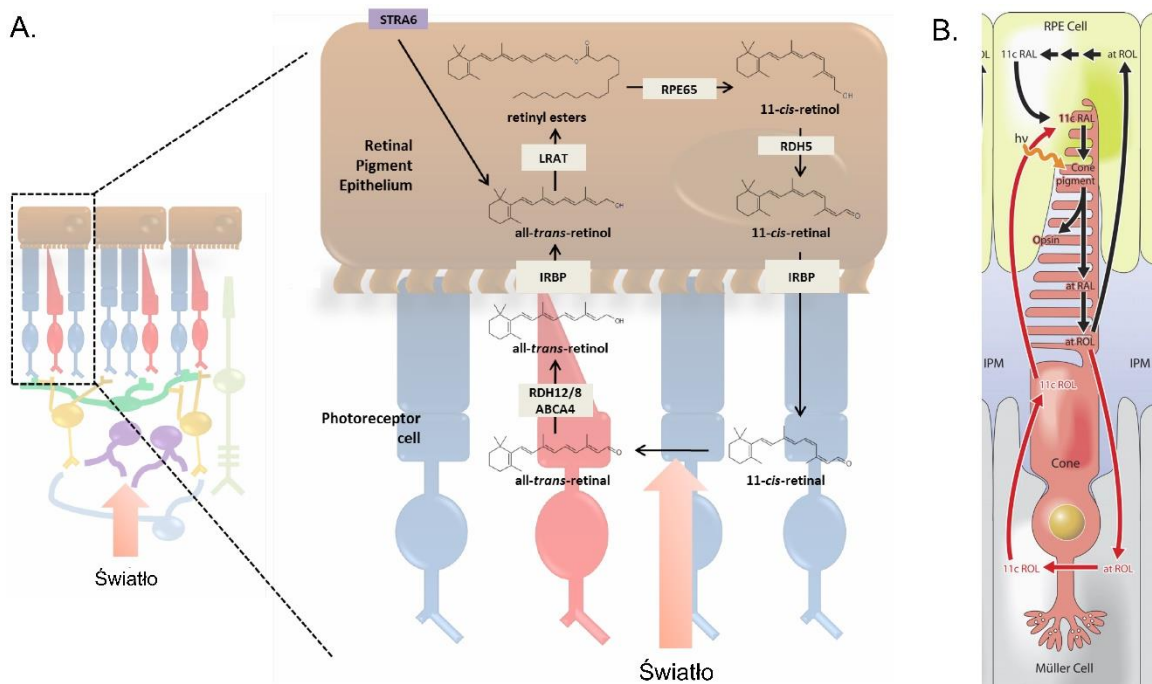
nawet dla przesunięcia długości fal o kilka nanometrów. W zakresie krótszych fal zdolność do rozróżniania jest słabsza. Hipoteza wyjaśniająca to zjawisko podaje, że dyskryminacja kolorów jest najlepsza tam, gdzie nachylenia widm absorpcji czopków zmieniają się najszybciej względem siebie (Rys. 1.1.10) [64].



Rys. 1.3.6 Rozróżnianie długości fal ($\Delta\lambda$) wykreślone w funkcji długości fali. W części A. pokazano sposób konstrukcji bodźca do uzyskania wykresu na B., który jest przybliżeniem [65]. Rysunek z [64].

1.3.5 Cykl widzenia

Absorpcja światła przez pigmenty wzrokowe powoduje izomeryzację 11-cis-retinalu do all-trans-retinalu, co uruchamia kaskadę fototransdukcji opisaną w kolejnym podrozdziale (1.3.6). Po absorpcji kwantu światła i wzbudzeniu cząsteczki rodopsyny, szybka izomeryzacja chromoforu prowadzi do utworzenia serii stanów pośrednich rodopsyny. W rezultacie rodopsyna rozpada się na all-trans-retinal i opsynę, w wyniku czego cząsteczka barwnika wzrokowego traci swój kolor i staje się przezroczysta – mówimy o wybieleniu rodopsyny (ang. *bleaching*). Opsyna pozostaje w błonie komórkowej i jest gotowa do przyłączenia nowego retinalu. Regeneracja pigmentu wzrokowego jest możliwa dzięki cyklowi widzenia, czyli łańcuchowi reakcji biochemicznych prowadzących do powrotu po ekspozycji na światło all-trans-retinalu, do konfiguracji 11-cis-retinalu. Rys. 1.3.7.A ilustruje szereg przemian klasycznego cyklu widzenia zachodzącego w RPE. Produkt końcowy tych reakcji transportowany jest z powrotem do fotoreceptorów w celu przyłączenia do opsyny i tym samym regeneracji pigmentu wzrokowego.



Rys. 1.3.7 A. Klasyczny cykl widzenia w warstwie RPE [66] – objaśnienia w tekście B. Siatkówkowy cykl widzenia [67]; 11c RAL – 11-cis-retinal, 11c ROL – 11-cis-retinal, at RAL – all-trans-retinal, at ROL – all-trans-retinal, cone pigment – pigment czopkowy, hv – foton światła, opsin – opsyna, Müller Cell – komórka Müllera, IPM – macierz międzyfotoreceptorowa.

All-trans-retinal uwolniony z rodopsyny jest wypompowywany do cytozolu fotoreceptora przez cząsteczkę transportera ABCA4, a następnie jest redukowany do all-trans-retinolu przez cząsteczki RDH8 i RDH12, które są dehydrogenazami all-trans-retinalu. W kolejnym kroku all-trans-retinol poprzez wiązanie się z międzyfotoreceptorowym białkiem wiążącym retinoidy (IRBP) jest transportowany do komórek RPE, gdzie jest estryfikowany przez acylotransferazę retinolu lecytyny (LRAT) do estrów all-trans-retinyłowych, które są magazynowane w retinosomach – ciałkach lipidowych komórek RPE magazynujących metabolity. Estry all-trans-retinyłowe są następnie izomeryzowane przez białko RPE65 do 11-cis-retinolu. Cząsteczka RDH5 utlenia 11-cis-retinol do 11-cis-retinalu, który jest z powrotem transportowany do fotoreceptora z pomocą białka IRBP. W końcowym etapie dochodzi do rekombinacji 11-cis-retinalu z opsyną i regeneracji barwnika wzrokowego, który jest gotowy do stymulacji [40], [66].

Regeneracja pigmentów wzrokowych ma znacznie szybszy przebieg w fotoreceptorach czopkowych niż pręcikowych. Ala-Laurilla ze współpracownikami [68], prowadzący badania nad siatkówkami salamander podają trzy główne powody tej różnicy: szybsze tempo rozpadu barwnika wzrokowego czopków, szybsze tempo reakcji redukcji retinalu do retinolu w czopkach niż w pręcikach oraz szybsze wydalenie retinolu z czopków w porównaniu do pręcików z powodu większego stosunku powierzchni do objętości czopków. Okazuje się jednak, że dla czopków obok klasycznego cyklu widzenia w RPE,

istnieje drugi tzw. siatkówkowy cykl widzenia obejmujący komórki Müllera zdolne do przekształcania all-trans-retinolu do postaci 11-cis-retinolu [69]–[71]. Ten siatkówkowy szlak izomeryzacji retinolu przedstawiony na Rys. 1.3.7.B jest możliwy tylko w czopkach ze względu na ich zdolności do utleniania 11-cis-retinolu (produktu powstającego w komórce Müllera) do 11-cis-retinalu oraz możliwość transportowania chromoforu między segmentem wewnętrznym, komórką Müllera i segmentem zewnętrznym, w którym znajduje się opsyna [67].

1.3.6 Fototransdukcja

Fototransdukcja z definicji jest procesem, w którym energia świetlna pochłaniana przez pigmenty znajdujące się wewnątrz dysków błonowych zewnętrznych segmentów fotoreceptorów siatkówki jest przekształcana w sygnał biochemiczny, który prowadzi do hiperpolaryzacji fotoreceptorów i zmiany ilości wydzielanego neurotransmitera [72]. W przypadku obu rodzajów fotoreceptorów mechanizm fototransdukcji opiera się na rozpadzie pod wpływem światła barwnika wzrokowego na opsynę (różną w czopkach i pręcikach) i all-trans-retinal. Mechanizm fototransdukcji zostanie omówiony na przykładzie pręcików, przy czym proces ma analogiczny przebieg w czopkach.

W pręcikach wrażliwym na światło barwnikiem jest rodopsyna składająca się z białka opsyny (siedmiu 7 alfa-helis), wewnątrz których zlokalizowana jest część barwnikowa – 11-cis-retinal, który jest aldehydem pochodzącym z witaminy A. Pod wpływem działania światła dochodzi do przekształcenia (izomeryzacji) 11-cis-retinalu w all-trans-retinal. Prowadzi to do rozpadu rodopsyny na retinal i opsynę.

W ciemności, w wyniku przepływu jonów potasu (K^+), sodu (Na^+) i wapnia (Ca^{2+}) w części zewnętrznej i wewnętrznej pręcika, fotoreceptor jest zdepolaryzowany (około -40 mV). Powoduje to stały wypływ neurotransmitera (glutaminianu) z błony synaptycznej fotoreceptora w kierunku synapsy z komórkami dwubiegunowymi.

Padający na pręcik kwant światła powoduje kaskadę zdarzeń białkowych co ilustruje schemat pokazany na Rys. 1.3.8. Wyróżnia się pięć etapów [73]:

Etap 1: Aktywacja rodopsyny – absorpcja fotonu powoduje izomeryzację rodopsyny (R) z formy 11-cis do all-trans i aktywuje cząsteczkę rodopsyny (R^*) [73]

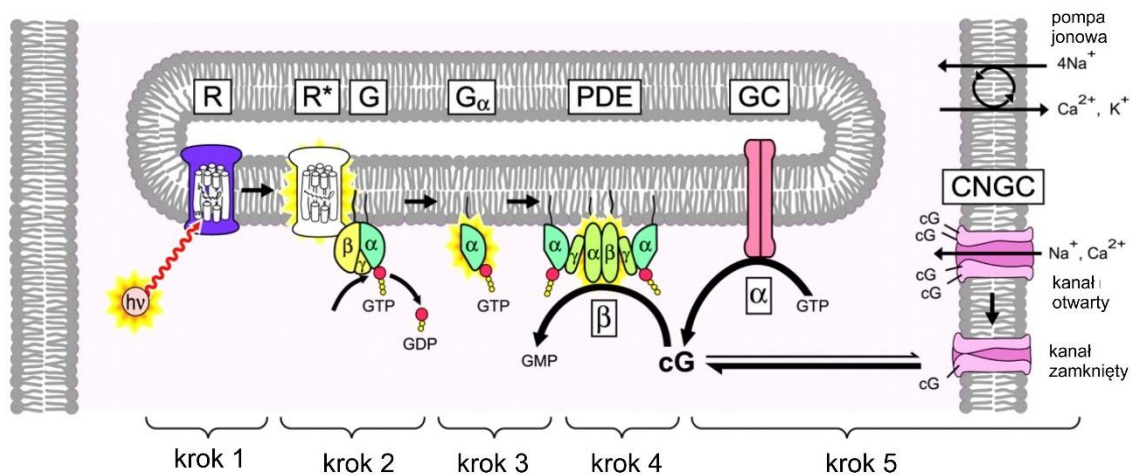
Etap 2: Aktywacja białka G (transducyny) – aktywowana cząsteczką rodopsyny wiąże się chwilowo z białkami przekaźnikowymi G. Następuje aktywacja transducyny, która jest złożona z trzech podjednostek: α , β i γ . Aktywacja polega na rozpadzie tego trimery i wymianie nukleotydu będącego nośnikiem energii guanozyno-5'-trifosforanu (GDP) na guanozyno-5'-difosforan (GTP) z cytoplazmy w podjednostce α . Tak aktywowane białko

transducyny α odłącza się od aktywnej rodopsyny, która zdolna jest do aktywacji kolejnych białek transducyny. Aktywacja ma charakter amplifikacji [73].

Etap 3: Aktywacja fosfodiesterazy (PDE) – podjednostka α transducyny (α -GTP) wchodzi w kontakt z fosfodiestrazą PDE i wiąże się z nią powodując jej aktywację (oznaczenie PDE*). Ta aktywacja nie ma charakteru amplifikacji: pojedyncze wzbudzone białko G^* może aktywować co najwyżej jedną podjednostkę katalityczną PDE [73].

Etap 4: Hydroliza cyklicznego GMP (cGMP) – aktywacja enzymu fosfodiesterazy (PDE*) zwiększa tempo hydrolizy wewnętrznego przekaźnika cGMP do GMP i obniża jego stężenie wewnątrz komórki cGMP [73].

Etap 5: Zamknięcie kanałów jonowych – w wyniku redukcji koncentracji cGMP w segmencie zewnętrznym pręcika, odłącza się on od bramkowanych kanałów jonowych i powoduje ich zamknięcie. Wywołuje to odpowiedź elektryczną komórki - zmniejszenie prądu sodowego. Wpływ pozytywnych ładunków przez kanały potasowe poza komórkę jest szybszy niż wpływ dodatnich ładunków do komórki – kationy sodu i wapnia nie wpływają przez zamknięte kanały jonowe bramkowane przez cGMP. Ma miejsce hiperpolaryzacja komórki, która w konsekwencji prowadzi do spadku wydzielania neurotransmitera [73].



Rys. 1.3.8 Schemat kaskady fototransdukcji. R – rodopsyna, R^* – wzbudzona cząsteczka rodopsyny, G – białko G (transducyny), G_α – aktywowane białko α -transducyny, PDE – fosfodiesteraza, GC – cyklaza gualynowa. Na podstawie [73].

Niezwykłą cechą procesu fototransdukcji jest ogromne wzmocnienie sygnału. Szacuje się, że jedna cząsteczka rodopsyny, która została aktywowana przez absorpcję kwantu światła może prowadzić do aktywacji około 800 cząsteczek transducyny. Cząsteczki transducyny aktywują cząsteczki enzymu fosfodiesterazy bez amplifikacji (w stosunku 1:1), ale już jedna cząsteczka fosfodiesterazy potrafi skatalizować rozpad sześciu cząsteczek cGMP. Podsumowując aktywowanie jednej cząsteczki rodopsyny powoduje zamknięcie około 200

kanałów jonowych, co stanowi około 2 % otwartych w ciemności kanałów w pręciku i powoduje zmianę netto potencjału błonowego o około 1 mV [72].

By możliwe było ciągłe widzenie wymagane jest odświeżanie obrazu, które wiąże się z przywracaniem układu fotoreceptora do stanu początkowego. W związku z tym istnieją mechanizmy ograniczające czas trwania kaskady wzmacniającej poprzez wygaszanie sygnału na każdym etapie i przywracanie molekuł do stanu nieaktywnego. Aktywowana rodopsyna jest fosforylowana przez kinazę rodopsyny i wiązana białkiem arestina, uniemożliwiając aktywowanie transducyny, co efektywnie skraca kaskadę fototransdukcji. Z kolei aktywowana transducyna (α -GTP) w formie kompleksu z fosfodiestrą PDE hydrolizuje związaną cząsteczkę GTP do GDP. W takiej postaci odłącza się od PDE i ponownie odtwarza cząsteczkę nieaktywnej transducyny, a fosfodiesteraza pozbawiona podjednostki α transducyny również się dezaktywuje [72].

Przez wielokrokową ścieżkę cyklu widzenia komórka przekształca nieaktywną rodopsynę z powrotem do formy mogącej absorbować światło, co opisano szczegółowo w kolejnym podrozdziale. Recykling rodopsyny jest niezwykle ważny dla zachowania wrażliwości fotoreceptorów na światło. Nawet przy intensywnym oświetleniu tempo regeneracji jest wystarczające do utrzymania znacznej liczby aktywnych cząsteczek pigmentu wzrokowego [72].

Enzym cyklaza guanylowa (GC) z powrotem podnosi poziom stężenia cGMP, które otwierają kanały jonowe umożliwiając dopływ jonów i depolaryzację komórki [72].

W stanie spoczynku (ciemności) istnieje stała równowaga pomiędzy syntezą w procesie katalizy cGMP z GTP przez GC i powolną hydrolizą cGMP przez resztkową aktywność PDE. Ten stan równowagi zapewnia stałe stężenie cGMP.

Ponadto istnieją mechanizmy dostosowujące wrażliwość siatkówki do poziomu oświetlenia, w związku z czym wielkość wspomnianego wyżej wzmocnienia zależna jest od poziomu oświetlenia (adaptacja świetlna). Przy niskim poziomie oświetlenia fotoreceptory są najbardziej wrażliwe na światło. Czulość ta maleje wraz ze wzrostem poziomu oświetlenia, by zapobiec nasyceniu receptorów i rozszerzyć zakres ich działania. Na kaskadę fototransdukcji regulacyjny wpływ mają jony Ca^{2+} , ale wkład w ten proces mają również neuronalne interakcje pomiędzy komórkami horyzontalnymi a zakończeniami fotoreceptorów. Jony Ca^{2+} w zewnętrznym segmencie biorą udział w modulacji wrażliwości fotoreceptorów. Kanały bramkowane przez cGMP w segmencie zewnętrznym są przepuszczalne zarówno dla Na^+ jak i Ca^{2+} . Zamknięcie tych kanałów pod wpływem światła prowadzi do spadku netto wewnętrznego stężenia Ca^{2+} , co z kolei wywołuje szereg zmian w kaskadzie fototransdukcji, z których wszystkie mają na celu zmniejszenie wrażliwości receptora na światło. Spadek stężenia Ca^{2+} m.in. zwiększa aktywność enzymu GC

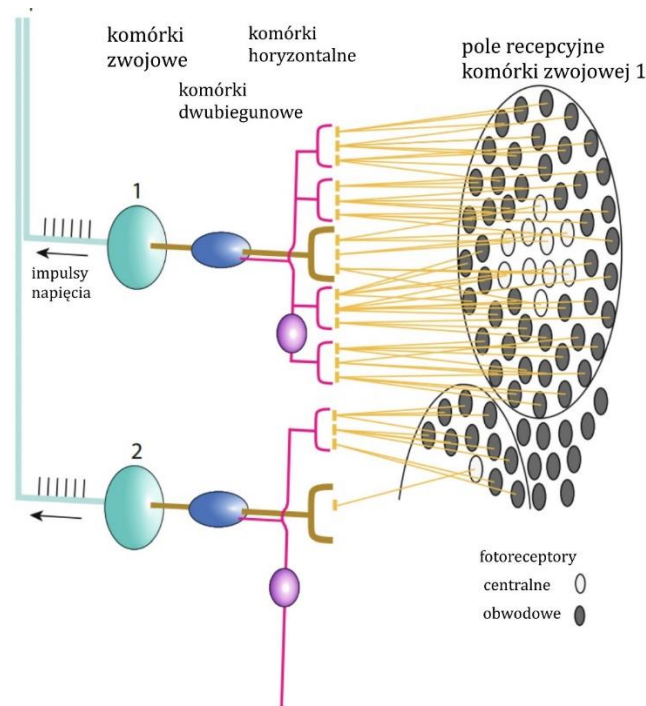
syntetyzującego cGMP, co prowadzi do wzrostu stężenia cGMP. Podobnie, obniżenie poziomu Ca^{2+} zwiększa powinowactwo kanałów bramkowanych cGMP do cGMP, zmniejszając wpływ wywołanego przez światło obniżenia poziomu cGMP. [72]

Glutaminian wydzielany przez pręciki w ciemności ma dwojakie działanie zależne od rodzaju komórki dwubiegunowej która z nim sąsiaduje. W przypadku komórki dwubiegunowej typu OFF docierający neuroprzekaźnik powoduje depolaryzację komórki dwubiegunowej i wzrost ilości wydzielanego przez tę komórkę neuroprzekaźnika (glutaminianu) do synapsy z komórką zwojową, która w takim przypadku daje sygnały o większej częstotliwości. Dla komórki dwubiegunowej typu ON wydzielany przez fotoreceptor glutaminian powoduje hiperpolaryzację komórki, zmniejszenie wydzielania glutaminianu przez komórkę dwubiegunową i hamowanie (zmniejszenie częstotliwości) serii impulsów komórek zwojowych.

1.3.7 Pola recepcyjne

Jak wspomniano, komórki zwojowe nie tylko przesyłają sygnał do mózgu, ale przeprowadzają również jego obróbkę. Polem recepcyjnym komórki zwojowej nazywamy obszar pokryty przez wszystkie zbiegające się w niej fotoreceptory [23].

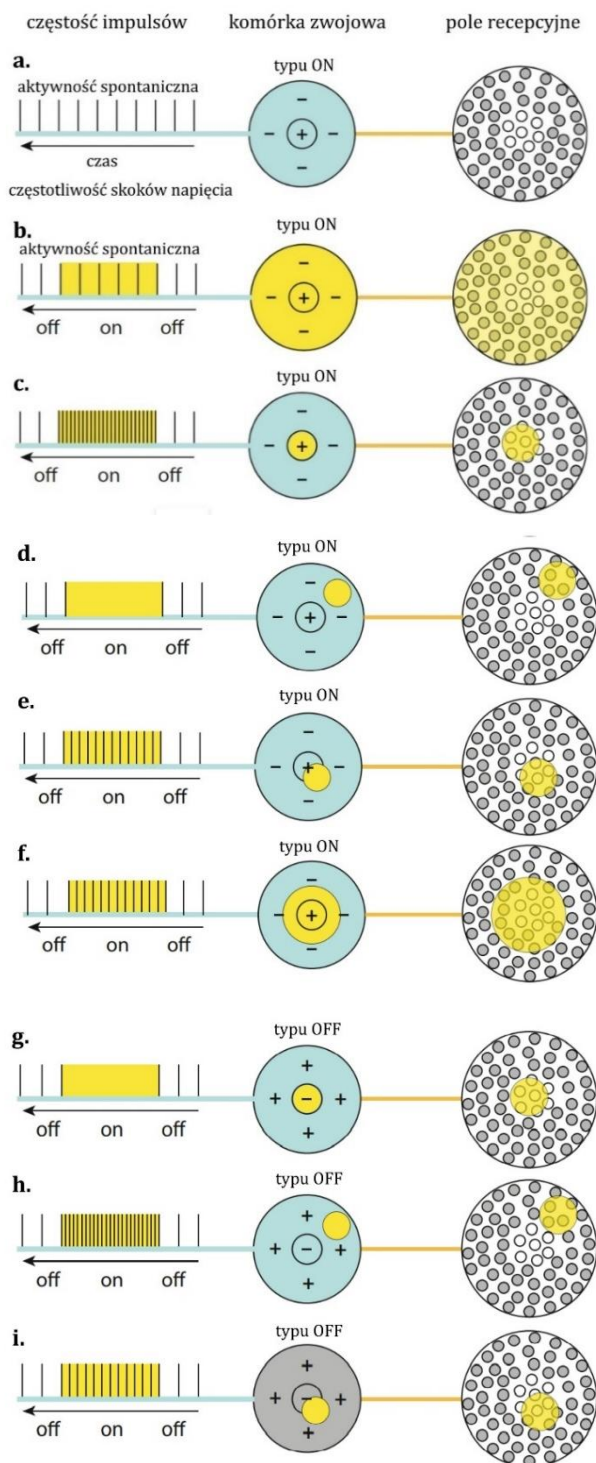
Sygnałem wyjściowym komórki zwojowej jest seria potencjałów czynnościowych, które wędrują nerwem wzrokowym do mózgu i są przetwarzane w celu powstania wrażenia wzrokowego. Wartość sygnału zależy od częstości skoków napięcia, a nie od ich wartości. Rys. 1.3.9 przedstawia szkic pól recepcyjnych dwóch różnych komórek zwojowych.



Rys. 1.3.9 Pola recepcyjne dwóch komórek zwojowych. Na podstawie [23].

Komórki dwubiegunowe łączą środkową część pola recepcyjnego bezpośrednio z komórką zwojową (Rys. 1.3.9). Fotoreceptory z obszaru obwodowego pola recepcyjnego łączą się z komórką zwojową za pośrednictwem komórek horyzontalnych i komórki dwubiegunowej [23].

Przetwarzanie sygnału przez komórki zwojowe ułatwia interpretację sceny (kontrasty światło-ciemność) i polega na porównaniu sygnałów docierających z centralnej części pola recepcyjnego z sygnałami docierającymi z obwodowego obszaru tego samego pola recepcyjnego. Wyróżniamy komórki zwojowe typu ON-center i typu OFF-center. Pierwsze zwiększą częstotliwość wysyłanych impulsów, gdy oświetlony jest centralny obszar pola recepcyjnego, a zmniejszą ją, gdy oświetlony jest obszar obwodowy. Drugie działają dokładnie odwrotnie – oświetlenie środka powoduje zmniejszenie częstotliwości generowania impulsów, a oświetlenie części obwodowej – zwiększenie częstotliwości sygnałów. Rys. 1.3.10 przedstawia schematycznie sygnały generowane przez komórki zwojowe obu typów w zależności od obszaru oświetlenia pola recepcyjnego. Liczba komórek zwojowych ON-centrum i OFF-centrum jest mniej więcej taka sama [23].



Rys. 1.3.10 Szybkość wyzwalania napięcia komórek zwojowych typu ON-centre i OFF-centre w zależności od plamki świetlnej (żółte koło) w różnych obszarach pola odbiorczego komórki. Na żółto podświetlono skoki napięcia podczas włączenia bodźca. (a) Sytuacja spoczynkowa (bez światła) – spontaniczna aktywność (b – f) komórki zwojowe typu ON: b. światło całkowicie pokrywające środek i obwodowy obszar pola recepcyjnego – spontaniczna aktywność, c. oświetlenie środkowej części pola – duża szybkość impulsów wysyłanych do mózgu, d. oświetlenie części obwodowej - brak generowania impulsów podczas trwania bodźca (reakcja OFF), e. częściowe oświetlenie centrum i części obszaru obwodowego oraz f. oświetlenie centrum i części obszaru obwodowego – szybkość impulsów większa niż przy reakcji spontanicznej, (g – i) komórki zwojowe typu OFF. Na podstawie [23].

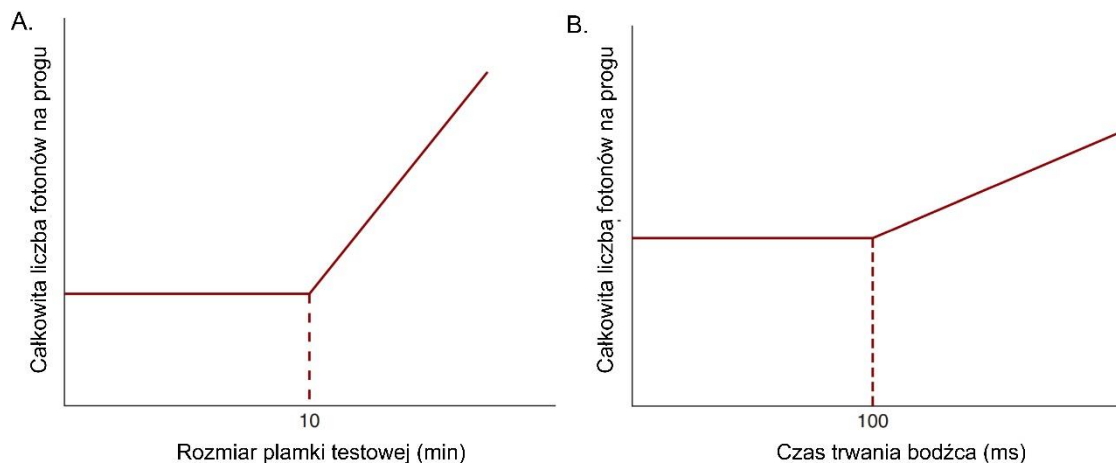
Przetwarzanie informacji przez komórki zwojowe siatkówki umożliwia wykrywanie krawędzi jasnych obiektów. Jeśli pole recepcyjne komórki jest całkowicie pokryte przez źródło światła, to wysyła sygnały związane z aktywnością spontaniczną. Komórki pokrywające się z krawędziami obiektu wysyłają większe sygnały do mózgu – wykrywana jest krawędź obiektu i tylko ta informacja jest przekazywana do kory wzrokowej. Z racji gęstego upakowania komórek zwojowych i ich dużej liczby krawędzie obiektów lub źródeł światła są ostro zaznaczone.

1.3.8 Sumowanie przestrzenne i czasowe sygnałów z fotoreceptorów

W widzeniu fotopowym czułość na kontrast jest wyższa niż w widzeniu skotopowym, a zdolność do rozpoznawania szczegółów jest lepsza. Zdolność do wykrywania bodźców (czułość bezwzględna) jest znacznie lepsza w warunkach skotopowych, np. bodziec o $\lambda = 500$ nm wykryty w warunkach fotopowych, musi mieć intensywność 100 razy większą niż w warunkach skotopowych (Rys. 1.3.4).

Kompromis między rozdzielczością i czułością widzenia wynika w dużej mierze ze sposobu, w jaki pręciki i czopki są połączone z kolejnymi elementami siatkówki. Pręciki są połączone w taki sposób, aby sumować informacje w przestrzeni – wiele pręcików komunikuje się z pojedynczym włóknem nerwowym [28]. Daje to dużą czułość, ale niską rozdzielczość przestrzenną widzenia skotopowego. Odwrotnie jest w widzeniu fotopowym, ponieważ czopki wykazują połączenia, które maksymalizują rozdzielczość widzenia kosztem czułości (wykazują mniejszą sumację przestrzenną) [74]. Mniejsza liczba pręcików komunikuje się z kolejnymi komórkami nerwowymi, np. w dołku pojedyncze, silnie skoncentrowane czopki łączą się z jednym włóknem nerwowym [28].

Wykres na Rys. 1.3.11.A pokazuje, że całkowita liczba kwantów potrzebnych do detekcji światła tworzącego plamkę na siatkówce jest stała, aż do rozmiaru plamki osiągającego średnicę krytyczną. Dla systemu skotopowego wynosi ona około 10 minut kątowych [75]. Dostarczając progową liczbę kwantów nie ma różnicy jak duży jest rozmiar plamki na siatkówce, aż do osiągnięcia średnicy krytycznej 10 minut kątowych – system skotopowy wykazuje całkowite sumowanie przestrzenne dla bodźców, które mieszczą się w tej średnicy.



Rys. 1.3.11 Klasyczne wyrażenie praw A. Ricco dla sumowania przestrzennego i B. Blocha dla sumowania czasowego w warunkach skotopowych. Na podstawie [5].

Prawo Ricco matematycznie opisuje zjawisko całkowitego sumowania przestrzennego i dane jest wzorem [5]:

$$IA = K \quad (1-9)$$

gdzie:

I – intensywność bodźca (fot/powierzchnię),

A – powierzchnia bodźca na siatkówce,

K – stała.

Wielkość obszarów sumowania zależy m.in. od poziomu światła [75], odległości od centrum plamki [76] czy wieku [77]. System fotopowy ma mniejszą zdolność sumowania przestrzennego, przez co średnice krytyczne systemu fotopowego są mniejsze niż dla systemu skotopowego. W warunkach fotopowych dla obszaru plamki w pracy [78] określono rozmiary obszarów Ricco na 2,2 – 11,7 min². Badano również wpływ aberracji oka na wielkość obszarów Ricco w plamce [79]. Średnie wielkości pól dla trzech badanych wynosiły 12,2 min² bez użycia optyki adaptacyjnej vs. 5,0 min² z zastosowaniem korekcji aberracji oka.

Czasowym odpowiednikiem prawa Ricco jest prawo Blocha. W tak zwanym czasie krytycznym zachodzi całkowite sumowanie czasowe (Rys. 1.3.11.B). Wszystkie progowe kwanty światła dostarczane w czasie krytycznym nie są rozdzielane i widziane są jako jeden błysk.

Matematycznie prawo Blocha zapisujemy jako [5](1-10):

$$It = K$$

(1-10)

gdzie:

I – intensywność bodźca (fot/czas),

t – czas trwania bodźca,

K – stała.

Dla widzenia skotopowego charakteryzującego się większym stopniem sumowania czasowego, krytyczny czas trwania bodźca wynosi około 100 ms, a dla widzenia fopowego około 10 – 50 ms [5]. Oznacza to, że dwa impulsy nadprogowe rozdzielone przerwą czasową 50 ms są rozróżnialne jako dwa błyski przez system fopowy, a nierozróżnialne dla systemu skotopowego, który ma za wysoki stopień sumowania czasowego zgodny z jego większą czułością bezwzględną. Sumuje on informacje zarówno w przestrzeni jak i w czasie dając w rezultacie doskonałą czułość. Natomiast system fopowy wykazuje ograniczoną sumację przestrzenną i czasową, co zapewnia mu doskonałą rozdzielczość przestrzenną i czasową [5].

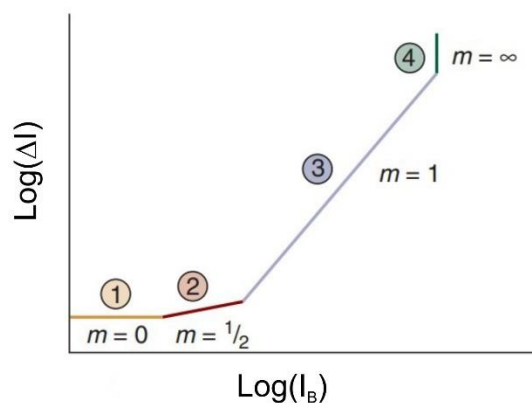
1.4 Wybrane zagadnienia psychofizyki widzenia

1.4.1 Psychofizyka i prawo Webera-Fechnera

Psychofizyka zajmuje się badaniem relacji ilościowych między zdarzeniami psychologicznymi (reakcjami, wrażeniami) a zdarzeniami fizycznymi (bodźcami), które je wywołują [80]. Pojęcie to wprowadził niemiecki naukowiec Gustav Teodor Fechner [81], który zapoczątkował badania psychofizyczne opracowując podstawowe metody i przeprowadzając liczne eksperymenty. Obecnie przedmiotem psychofizyki jest rozwój nowych technik psychofizycznych i nowych metod analizy danych psychofizycznych w odniesieniu do słuchu, wzroku, dotyku, smaku i zapachu [82]. Natomiast psychofizyka widzenia jest techniką badającą związek między fizycznymi pomiarami bodźca a percepcją wzrokową [83].

Inny niemiecki badacz, fizjolog Ernst Heinrich Weber, zauważył stały stosunek między wielkością zmiany bodźca niezbędną do wywołania zauważalnej zmiany w odczuciu do całkowitej wielkości bodźca. Zależność ta została nazwana prawem Webera-Fechnera (Fechner wykorzystał obserwację do pomiarów wrażenia w odniesieniu do bodźca) i mówi ono, że geometryczne (a nie liniowe) zwiększenie bodźca powoduje liniowy wzrost wielkości odczucia.

Obszar obowiązywania prawa Webera-Fechnera stanowi znaczącą część zakresu postrzegania bodźca wzrokowego. Dobrze ilustruje to wynik eksperymentu adaptacji do światła (procesu dostosowywania systemu wzrokowego do zmiany poziomu oświetlenia). Na tle o różnych intensywnościach poszukiwany jest przyrost, który jest zauważalny dla osoby badanej (próg). Przykładową krzywą adaptacji do światła ilustruje Rys. 1.4.1. Wyróżniamy tu cztery charakterystyczne obszary. Pierwszy odzwierciedla zakres poziomów światła, w którym bodziec nie jest wykrywany z powodu szumu neuronowego, którego poziom jest zbliżony do poziomu światła. W drugim obszarze, w którym współczynnik nachylenia jest równy $\frac{1}{2}$, określenie progu jest determinowane przez fluktuacje ciemnego tła – obszar odzwierciedla fluktuacje kwantowe w tle. Prawo Webera-Fechnera obowiązuje na odcinku 3, ze współczynnikiem nachylenia równym 1, obejmującym zakres 4 jednostek logarytmicznych. Ostatni odcinek na omawianej krzywej obowiązuje w przypadku wyższych przyrostów poziomów natężenia światła (ekstremalnej stymulacji) i obrazuje nasycenie pręcików. Prawo Webera obowiązuje również w warunkach fotopowych [5].



Rys. 1.4.1 Przykładowa uproszczona krzywa adaptacji do światła w warunkach skotopowych z zaznaczonymi charakterystycznymi obszarami; ΔI – przyrost natężenia progowego, I_B – natężenie tła. Na podstawie [5].

Stała Webera K definiowana jest jako stosunek intensywności przyrostu do intensywności tła [5]:

$$K = \frac{\Delta I}{I_B} \tag{1-11}$$

gdzie:

ΔI – przyrost natężenia progowego

I_B – natężenie tła

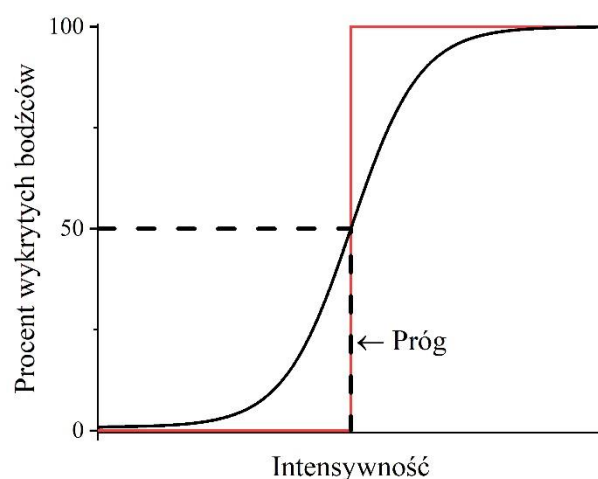
Dla widzenia skotopowego stała Webera wynosi około 0,14 [5], a dla fotopowego 0,015 [5]. Oznacza to, że dla tła o intensywności 100 jednostek minimalny zauważalny przyrost bodźca musi wynosić 14 jednostek. w przypadku widzenia skotopowego, natomiast tylko 1,5 jednostki w przypadku widzenia fotopowego. Widzimy więc po wartości tych stałych, że układ fotopowy jest bardziej wrażliwy na kontrast, jednak jego czułość bezwzględna jest mniejsza – słaby, ciemny bodziec będzie wykryty przez system skotopowy, a nie będzie zauważony w warunkach fotopowych.

Zgodnie z powyższymi rozważaniami, w badaniach psychofizycznych obowiązuje logarytmiczna relacja między bodźcem a jego percepcją.

1.4.2 Progi widzenia

Próg widzenia, tak jak inne wielkości psychofizyczne, definiowany jest przez funkcję psychometryczną, która wyraża relację między charakterystyką fizyczną bodźca a reakcją organizmu na ten bodziec [82]. Gdyby istniał idealny obserwator, to próg widzenia byłby mocą, powyżej której bodziec zawsze byłby dostrzegany, a poniżej – nigdy nie byłby widziany. Sytuację taką zilustrowano czerwonym wykresem na Rys. 1.4.2. Człowiek nie jest jednak idealnym obserwatorem i określenie mocy progowej nie jest prostym zero-jedynkowym zadaniem. Progu widzenia poszukuje się wykonując serię pomiarów prezentujących bodźce o różnym poziomie intensywności. Próg na Rys. 1.4.2 zdefiniowano jako 50-cio procentowe prawdopodobieństwo wykrycia bodźca przez obserwatora. Czarny wykres na Rys. 1.4.2 ilustruje przypadek dla obserwatora rzeczywistego. Istotnym jest, że dla realnego obserwatora nie jest to jedna, ściśle określona wartość, a przedział określany z pewnym prawdopodobieństwem. Tak więc próg widzenia zdefiniować możemy jako bodziec o takiej intensywności, przy której jest wykrywany z arbitralnie określonym prawdopodobieństwem w danych warunkach.

Ze względu na sumowanie czasowe sygnału przez komórki siatkówki, w warunkach skotopowych stosuje się czasy trwania bodźców powyżej 100 ms (poniżej tej wartości próg zależy od czasu trwania bodźca), a w warunkach fotopowych – powyżej 50 ms (podrozdział 1.3.8).



Rys. 1.4.2 Funkcja psychometryczna: na czerwono wykreślono funkcję psychometryczną dla hipotetycznego obserwatora idealnego, na czarno przykładowa funkcja dla obserwatora rzeczywistego. Linia przerywaną oznaczono poziom 50 % wykrycia bodźców i odpowiadającą mu wartość intensywności – wartość progową. Na podstawie [5].

Istnieje wiele metod wyznaczania progu widzenia stosowanych w praktyce diagnostycznej i badaniach naukowych. Dwie wybrane metody wyznaczania progu, które będą używane w badaniach w ramach niniejszej rozprawy, będą metoda dopasowania oraz metoda 4 -2 -1.

Metoda dopasowania (ang. *Method of Adjustment*, MoA [82]) to metoda polegająca na znajdowaniu progu widzenia przez osobę badaną, która zmienia intensywność bodźca ze stałym krokiem np. 0,33 dB.

Przyjmuje się dwie strategie znajdowania progu metodą MoA:

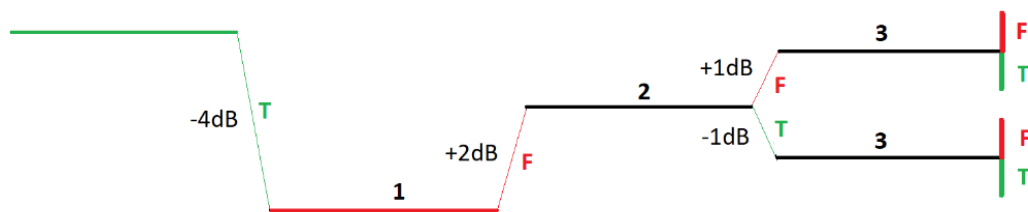
- MoA od góry – osoba badana zaczyna poszukiwania progu od poziomu intensywności bodźca dobrze widocznego i zmniejsza intensywność do momentu kiedy przestanie widzieć bodziec. Moc przy której pacjent przestał widzieć bodziec jest progiem wyznaczonym metodą MoA od góry (T_{up});
- MoA od dołu – osoba badana zaczyna poszukiwanie progu od poziomu intensywności bodźca, która nie jest widziana. Pacjent zwiększa intensywność bodźca aż do momentu, w którym go zobaczy. Moc ta jest progiem wyznaczonym metodą MoA od dołu (T_{down}).

Progi wyznaczone metodą MoA od góry są niższe niż progi wyznaczone od dołu. By zrównoważyć te wady stosuje się zazwyczaj dwie strategie naprzemiennie otrzymując próg z dołu i z góry. Dla progów widzenia wyrażonych w czułościach liczy się następnie średnią arytmetyczną. Dla progów wyrażonych w mocach, wiedząc, że jasność bodźca zależy od natężenia w skali logarytmicznej, szukamy punktu równoodległego od progu

mierzonego od dołu i od góry, więc liczymy średnią geometryczną z par progów otrzymując próg absolutny:

$$T = \sqrt{T_{up} \cdot T_{down}} (W) \quad (1-12)$$

Metoda 4-2-1 (4-2-1 strategy) to metoda znajdowania progu klasyfikowana jako należąca do grupy metod adaptywnych schodkowych (ang. *adaptive staircase*) [82]. Polega na stopniowym obniżaniu intensywności bodźca o 4 dB, prezentacji go osobie badanej i czekaniu na odpowiedź, że pacjent widzi przez określoną ilość czasu. W momencie, kiedy osoba badana przestanie widzieć bodziec, intensywność jest zwiększana o 2 dB. W zależności od odpowiedzi badanego „widzę”/”nie widzę” kolejna intensywność prezentowanego bodźca to odpowiednio -/+ 1 dB. Po tej odpowiedzi procedura się kończy, a próg widzenia jest obliczany jako średnia geometryczna z najniższej mocy bodźca widzianej i najwyższej niewidzianej. Schemat metody ilustruje poniższy Rys. 1.4.3.



Rys. 1.4.3 Schematyczne przedstawienie metody poszukiwania progu 4-2-1. Początkowo intensywność bodźca jest obniżana o 4 dB aż do momentu, kiedy pacjent nie udzieli odpowiedzi „widzę” – odpowiedź nr 1. Wtedy następuje zwiększenie intensywności bodźca o 2 dB. Zależnie od odpowiedzi nr 2 moc jest zwiększana lub zmniejszana o 1 dB. Po odpowiedzi nr 3 procedura wyznaczenia progu metodą 4 – 2 – 1 kończy się.

Wszystkie możliwe kombinacje odpowiedzi w omawianej metodzie oraz sposoby obliczania wartości progów wyznaczonych tą metodą zależnie od tych odpowiedzi są zestawione w poniższej tabeli.

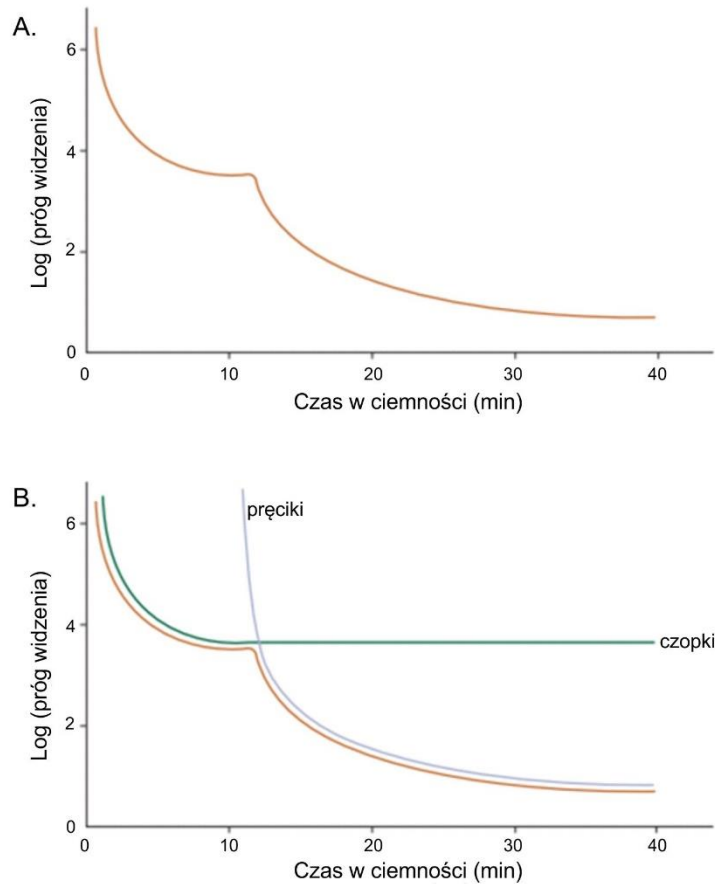
Tab. 1.4-1 Sposób obliczania progu metodą 4 - 2 - 1 zależnie od ścieżki odpowiedzi uczestnika badania.

Odpowiedź po prezentacji bodźca o intensywności				Obliczenie progu
I_0	$I_1 = I_0 - 4 \text{ dB}$	$I_2 = I_1 \pm 2 \text{ dB}$	$I_3 = I_2 \pm 1 \text{ dB}$	
T	F	T	T	$\sqrt{I_1 \cdot I_3}$
T	F	T	F	$\sqrt{I_2 \cdot I_3}$
T	F	F	T	$\sqrt{I_0 \cdot I_3}$
T	F	F	F	$\sqrt{I_1 \cdot I_3}$

1.4.3 Krzywe adaptacji do ciemności

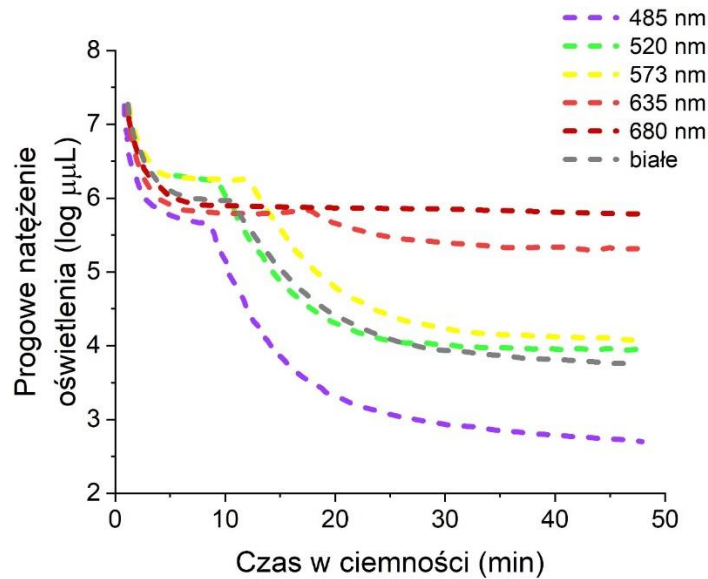
Po ekspozycji na światło czopki i pręciki odzyskują swoją czułość w różnym tempie. W pomiarach adaptacji do ciemności wyraźnie uwidacznia się dynamika tego procesu. Doświadczalne uzyskanie krzywej adaptacji do ciemności polega na wystawieniu osoby badanej na działanie jasnego światła w postaci krótkotrwałego błysku lub serii błysków, co ma na celu wybielenie części barwnika wzrokowego zawartego w fotoreceptorach. Po wyłączeniu światła adaptacyjnego, w warunkach całkowitej ciemności określany jest próg widzenia w funkcji czasu dla migającego bodźca na całkowicie ciemnym tle. Odzyskanie czułości, które następuje podczas adaptacji do ciemności, jest związane z regeneracją barwnika wzrokowego.

Typowa krzywa adaptacji do ciemności przedstawiona jest na Rys. 1.4.4.A [64]. Przebieg ma charakter dwufazowy: pierwsza część determinowana jest przez progi czopkowe, druga - przez progi pręcikowe. Krzywa adaptacji do ciemności reprezentuje najniższy próg w danym punkcie czasu, obojętnie czy określony jest on przez czopki czy przez pręciki. We wczesnym etapie adaptacji do ciemności próg dla pręcików jest nieskończenie wysoki. W przytoczonym przykładzie, na początku widoczne jest gwałtowne obniżenie progu aż dookoła 10 minut, gdzie krzywa osiąga plateau – jest to plateau czopków, które jest minimalnym progiem czopkowym dla danego bodźca. Po około 12 minutach, następuje druga gwałtowna zmiana w nachyleniu krzywej – jest to załamanie pręcikowo–czopkowe (ang. *rod–cone break*), po której widoczne jest powolne obniżenie progu do około 35 minuty, kiedy krzywa ponownie osiąga plateau (plateau pręcików), reprezentujące minimalny próg pręcikowy dla tego samego bodźca [84]. Załamanie pręcikowo–czopkowe następuje w momencie, gdy pręciki stają się bardziej wrażliwe niż czopki. Do tego momentu to czopki odpowiedzialne są za wykrycie bodźca. Po nim bodźce są wykrywane przez pręciki. Różnica pomiędzy plateau czopków a plateau pręcików nazywana jest interwałem fotochromatycznym i dla przypadku przedstawionego na Rys. 1.4.4 wynosi około 3 jednostki logarytmiczne. Jest to parametr, który można odczytać bezpośrednio z wykresu krzywej adaptacji do ciemności. Widzimy również, że dla rozważanej przykładowej krzywej adaptacji, po około 35 minutach od oślepienia próg zmniejszył się o około 5 rzędów.



Rys. 1.4.4 A. Przykładowa krzywa adaptacji do ciemności. Centralnie fiksowany bodziec 420 nm miał rozmiar 10 stopni. B. Diagram pokazujący progi dla czopków i pręcików podczas adaptacji do ciemności. Na podstawie [64].

Dla bodźców o różnych długościach fal krzywe adaptacji do ciemności zmieniają swój kształt. Jest to spowodowane różnicą w czułości między czopkami a pręcikami dla danej długości fali (Rys. 1.3.4). Na Rys. 1.4.5 pokazano krzywe otrzymane dla długości fal od fioletu do czerwieni oraz dla światła białego. Używano bodźca o rozmiarze 3° prezentowanego w odległości 7° nosowo od centrum plamki. Dla pobudzania dłuższymi długościami fal (680 nm) nie zauważamy załamania pręcikowo-czopkowego. Jest to spowodowane podobną czułością czopków i pręcików na światło o długich falach (Rys. 1.3.4). Dla krótszych fal (485 nm, 520 nm, 573 nm) załamanie pręcikowo-czopkowe jest bardziej widoczne z powodu większej różnicy w czułości między fotoreceptorami – pręciki wykazują większą czułość na krótkie długości fal podczas adaptacji do ciemności.



Rys. 1.4.5. Krzywe adaptacji do ciemności otrzymane przy użyciu bodźców (o rozmiarze 3° prezentowanych w odległości 7° nosowo od centrum plamki) dla różnych długości fal. Badani byli adaptowani przez 5 minut do 2000 mL. Wykres z [59]

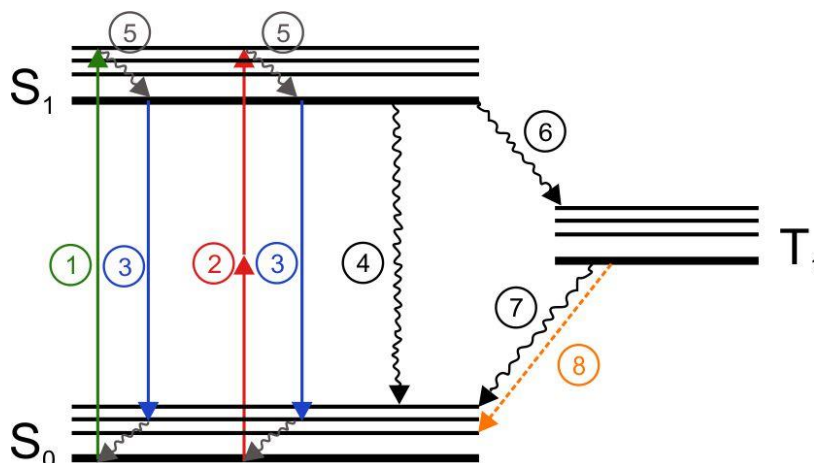
1.4.4 Zdolność fiksacyjna oka

Zdolność fiksacyjna oka odgrywa ważną rolę podczas pomiarów psychofizycznych – ma zapewnić względną stabilność pozycji oka jak również umożliwić testowanie różnych miejsc pola widzenia. Z definicji podanej przez American Psychological Association punkt fiksacyjny to punkt w przestrzeni, na którym pacjent skupia wzrok [85]. W prawidłowych warunkach obraz tego obiektu powinien być odwzorowany na dołku plamki żółtej siatkówki [86]. Inna definicja to zdolność do kierowania oka na dany obiekt. Badania różnych kształtów fiksacji i ich wpływu na stabilność oka przedstawiono w pracy [87]. W przypadku naszych badań zastosowano czerwony punkt fiksacyjny o małych rozmiarach i dobrej ostrości (podrozdział 3.1.3).

2. Widzenie dwufotonowe

2.1 Absorpcja dwufotonowa

Aleksander Jabłoński w 1933 roku [88] przedstawił schemat poziomów energetycznych cząsteczki fluoroforu (molekuły absorbującej promieniowanie) nazywany dziś diagramem Jabłońskiego. Rozbudowaną wersję tego diagramu przedstawia Rys. 2.1.1.



Rys. 2.1.1 Diagram Jabłońskiego dla cząsteczki o singletowym podstawowym stanie elektronowym S_0 : 1- wzbudzenie jednoPhotonowe, 2 - wzbudzenie dwufotonowe, 3- fluorescencja, 4 - relaksacja nieradiacyjna, 5 - konwersja wewnętrzna (relaksacja wibracyjna), 6, 7 - konwersja międzysystemowa, 8 - fosforescencja. Oznaczenia strzałek: proste - przejścia promieniste, faliste - przejścia bezpromieniste. Więcej szczegółów w tekście (na podstawie [89], [90]).

Cząsteczka fluoroforu znajdująca się początkowo w singletowym podstawowym stanie elektronowym S_0 w wyniku oddziaływania z promieniowaniem zostaje wzbudzona do wyższego poziomu wibracyjnego elektronowego stanu wzbudzonego S_1 - następuje absorpcja promieniowania $S_0 \rightarrow S_1$ oznaczona na Rys. 2.1.1 jako (1). W wyniku przejść bezpromienistych (5), tzw. konwersji wewnętrznej, cząsteczka wraca do najniższego poziomu wibracyjnego w elektronowym stanie wzbudzonym S_1 . Proces emisji fluorescencji (3) $S_1 \rightarrow S_0$ polega na przejściu molekuly z najniższego energetycznie poziomu wibracyjnego elektronowego stanu wzbudzonego S_1 do elektronowego stanu podstawowego S_0 [90].

Absorpcja światła przez molekuly niefluoryzujące i fotochemicznie trwałe cząsteczki w roztworach prowadzi do bezpromienistego przejścia z elektronowego stanu wzbudzonego S_1 na wysoki poziom wibracyjny stanu S_0 . Jest to proces relaksacji nieradiacyjnej $S_1 \rightsquigarrow S_0$ (4) [90].

Inną możliwą ścieżką energetyczną prowadzącą do dezaktywacji wzbudzonej molekuly jest konwersja spinu i bezpromieniste przejście elektronu ze wzbudzonego stanu singletowego do metastabilnego pierwszego stanu trypletowego $S_1 \rightsquigarrow T_1$ (6). Z tego poziomu możliwe są

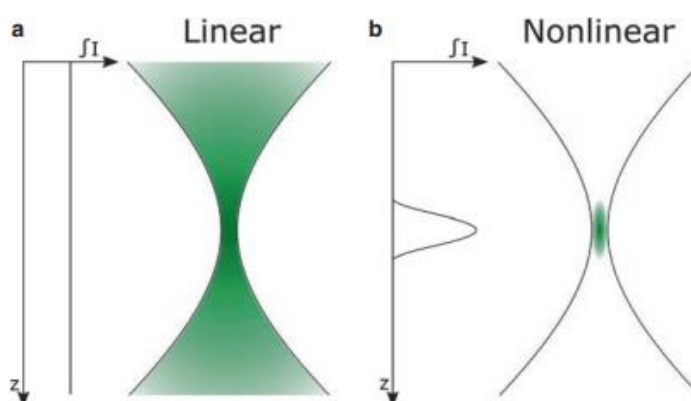
dwie drogi powrotu do podstawowego stanu singletowego: bezpromienista konwersja międzysystemowa $T_1 \rightsquigarrow S_1$ (7) albo fosforescencja (8), która jest promienistym przejściem elektronowym z trypletowego stanu do podstawowego stanu singletowego $T_1 \rightarrow S_0$. Jest to przejście międzysystemowe, wzbronione spinowymi regułami wyboru, o dłuższych stałych szybkości, przesunięte zazwyczaj ku dłuższym falom w stosunku do fluorescencji $S_1 \rightarrow S_0$ [90].

W procesie dwufotonowej absorpcji (ang. *two-photon absorption*, TPA) oznaczonej na Rys. 2.1.1 jako (2) cząsteczka przechodzi z podstawowego stanu singletowego S_0 do stanu wzbudzonego S_1 poprzez jednoczesne oddziaływanie z dwoma fotonami padającego promieniowania laserowego o energii dwa razy mniejszej niż różnica poziomów energetycznych [91]. Jest to przejście zachodzące bez zachowania energii (przejście wirtualne), zachowana jest jedynie energia sumaryczna. Proces TPA może być interpretowany w taki sposób, że absorpcja jednego fotonu o częstości ω powoduje przejście do stanu wirtualnego (pośredniego), a absorpcja kolejnego – przejście do stanu wzbudzonego.

Absorpcja dwufotonowa została przewidziana teoretycznie przez młodą badaczkę, późniejszą noblistkę (nagroda została przyznana za inne prace) Marię Göppert-Mayer w jej pracy doktorskiej [92] w 1931 r. Dla uhonorowania jej niezaprzeczalnych osiągnięć jednostkę dla dwufotonowego przekroju absorpcyjnego nazwano jednostką Goepfert-Mayer (GM) [93]. Po trzydziestu latach, kiedy technologia maserów „dogoniła” teorię, Kaiser i Garrett [94] jako pierwsi dokonali eksperymentalnej obserwacji absorpcji dwufotonowej na kryształach fluorku wapnia domieszkowanego europem ($\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$). Cienkie płytki kryształu oświetlane były czerwonym światłem masera rubinowego o długości fali 694.3 nm. Jony europu przechodziły ze stanu podstawowego do wzbudzonego, o czym świadczyła fluorescencja światła niebieskiego. Wzbudzenie $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ światłem pochłoniętym w tym zakresie długości fali daje błękitną fluorescencję o szerokości pasma 30 nm, która powstaje na poziomach około 420 nm i kończy się w stanie podstawowym. Eksperyment ten potwierdził jednoczesną absorpcję dwóch fotonów czerwonych, która umożliwiła fluorescencję światła niebieskiego.

TPA jest użytecznym narzędziem w dwufotonowej mikroskopii fluorescencyjnej [95] jak również w spektroskopii do określania położenia poziomów energetycznych, które nie są związane z atomowym stanem podstawowym przez jednofotonowe przejście [96]–[98]. Zjawisko opisane przez Marię Göppert-Mayer okazało się użyteczne także dla medycyny – wykorzystuje się je w dermatologii m.in. w wielofotonowej tomografii, terapii fotodynamicznej czy mikroskopii powierzchni skóry wykorzystującej zjawisko emisji dwufotonowej [93].

Absorpcja dwufotonowa zachodzi jedynie w bardzo małej objętości, w pobliżu ogniska wiązki, gdzie natężenie promieniowania jest najwyższe, co ilustruje Rys. 2.1.2. Uwidacznia on również różnicę w obrazowaniu fluorescencyjnym jedno- i dwu-fotonowym. W przypadku jednofotonowym fotony są absorbowane i emitowane w całym oświetlanym obszarze. W przypadku dwufotonowym emisja występuje tylko w obszarze blisko ogniska, gdzie gęstość energii jest wystarczająca do zajścia procesu absorpcji dwufotonowej, która pozwala na emisję światła fluorescencyjnego. Prawdopodobieństwo zajścia procesu absorpcji jedno- i dwufotonowej różni się o kilkadziesiąt rzędów wielkości, co zostanie omówione w dalszej części pracy.



Rys. 2.1.2 A. W obrazowaniu fluorescencyjnym jednofotonowym występuje liniowa zależność między padającym a emitowanym fotonem prowadzącą do generacji fluorescencji w całym obszarze oświetlenia. B. W obrazowaniu fluorescencyjnym wzbudzonym dwufotonowo fluorescencja jest generowana w pobliżu płaszczyzny ogniskowej ze względu na nieliniową zależność między natężeniem sygnału a natężeniem oświetlenia. Rysunek z [89].

2.2 Wydajność absorpcji dwufotonowej

Przekrój czynny absorpcji dwufotonowej σ_2 jest własnością fizyczną charakteryzującą daną molekułę. Przekrój czynny absorpcji σ opisujący ten proces rośnie liniowo z natężeniem I lasera zgodnie z zależnością:

$$\sigma = \sigma^{(2)}I \tag{2-1}$$

gdzie $\sigma^{(2)}$ jest współczynnikiem określającym prawdopodobieństwo zajścia procesu dwufotonowego (dla procesów w optyce liniowej σ jest stałe) [91, s. 16].

Szybkość przejścia atomowego R określona jest wzorem:

$$R = \frac{\sigma^{(2)}I^2}{\hbar\omega} \tag{2-2}$$

$\sigma^{(2)}$ – przekrój czynny określający prawdopodobieństwo zajścia procesu dwufotonowego,
 \hbar - stała Plancka,

ω – częstość promieniowania.

Jednoczesność absorpcji dwóch fotonów to odstęp czasowy rzędu 10^{-18} s [89]. Prawdopodobieństwo takiej absorpcji jest funkcją przekroju czynnego i właściwości przestrzenno–czasowych światła. Intensywność absorpcji dwufotonowej zależy od kwadratu natężenia światła laserowego.

Pomijając zjawisko nasycenia i stosując przybliżenie osiowe liczba n_a fotonów zaabsorbowanych na molekułę na impuls zależy od czasu trwania impulsu τ_p , częstotliwości repetycji f_p , średniej mocy lasera p_0 i apertury numerycznej NA soczewki lub obiektywu skupiających wiązkę zgodnie ze wzorem [95]:

$$n_a \approx \frac{p_0^2 \delta}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{NA^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2$$

(2-3)

Gdzie:

c – prędkość światła,

\hbar - stała Plancka,

λ – długość fali,

δ – przekrój poprzeczny absorpcji dwufotonowej.

Zgodnie z powyższym wzorem, generacja sygnału dwufotonowego jest odwrotnie proporcjonalna do czasu trwania impulsu. Warto tu wspomnieć, że profil czasowy impulsu laserowego jest bezpośrednio powiązany z jego szerokością spektralną. Krótsze impulsy są bardziej podatne na zjawisko dyspersji (czyli podziału prędkości fazowej fali ze względu na jej częstotliwość), które, przy braku jego kompensacji, prowadzi do rozszerzenia impulsów i mniejszej wydajności dwufotonowej [89].

Brakenhoff ze współpracownikami w swojej pracy dotyczącej mikroskopii fluorescencyjnej [99] opierając się na wartościach przekrojów czynnych na absorpcję jednofotonową i dwufotonową wykazują, że absorpcja jednofotonowa (SPA) wymaga co najmniej jednego rzędu wielkości mniejszej całkowitej ekspozycji w porównaniu do absorpcji dwufotonowej (TPA), aby otrzymać równoważną generację fluorescencji. Wg autorów często nie daje to żadnej przewagi TPA w odniesieniu do uszkodzeń indukowanych podczas obrazowania fluorescencji materiałów biologicznych [99]. Autorzy zwracają jednak uwagę na takie zalety TPA jak (1) możliwość obrazowania trójwymiarowego bez konieczności stosowania układu

konfokalnego, dzięki kwadratowej zależności od intensywności wzbudzenia, (2) możliwość większej głębokości penetracji w głąb próbki ze względu na odwrotną zależność czwartej potęgi od długości fali prawdopodobieństwa rozpraszania sprężystego oraz (3) wzbudzenie próbki tylko w płaszczyźnie ogniskowej.

Porównanie wydajności wzbudzeń jedno- i dwufotonowych Brakenhoff [99] przeprowadził obliczając dawki wzbudzenia – liczbę fotonów potrzebnych do wzbudzenia cząsteczki z określonym prawdopodobieństwem, które przechodzą przez płaszczyznę, w której znajduje się molekula.

Prawdopodobieństwo wzbudzenia cząsteczki (β) dane jest wzorem [99]:

$$\beta = 1 - e^{-kt} \approx kt \quad (2-4)$$

gdzie:

k – szybkość absorpcji (fot/s)

t – czas naświetlania molekuly (s)

Zastosowane przybliżenie dozwolone jest dla $kt \ll 1$

Szybkość przejścia dla SPA określa równanie [99]:

$$k_1 = \Phi_1 \cdot \sigma \quad (2-5)$$

gdzie:

σ – przekrój czynny SPA (m^2)

Φ_1 – strumień wzbudzenia SPA (fot/ m^2 /s)

Strumień wzbudzenia Φ_1 przechodzący przez molekulę w czasie t spowoduje więc SPA z prawdopodobieństwem β_1 określonym jako [99]:

$$\beta_1 = k_1 t = \Phi_1 \cdot \sigma \cdot t_1 = \sigma \cdot D_1 \quad (2-6)$$

gdzie:

D_1 – dawka wzbudzenia SPA ($D_1 = \Phi_1 \cdot t_1$) (fot/ m^2)

Stąd dawka wzbudzająca SPA, na której ekspozycję powinna zostać wystawiona molekula, by z prawdopodobieństwem β_1 zaabsorbować energię wynosi [99]:

$$D_1 = \frac{\beta_1}{\sigma} \quad (2-7)$$

Natomiast w przypadku TPA przy założeniu prostokątnego kształtu impulsu optycznego (czasowo) szybkość procesu będzie dana wzorem [99]:

$$k_2 = \delta \cdot (\Phi_2)^2 = \delta \cdot \left(\frac{D_2}{t_p}\right)^2 \quad (2-8)$$

gdzie:

δ – przekrój czynny TPA ($\text{m}^4 \cdot \text{s} / \text{fot}$)

Φ_2 – strumień wzbudzenia TPA $\Phi_2 = \frac{D_2}{t_p}$ ($\text{fot} / \text{m}^2 / \text{s}$)

t_p – czas trwania impulsu (s)

D_2 – dawka wzbudzenia TPA (fot / m^2)

Prawdopodobieństwo absorpcji TPA cząsteczki wystawionej na taki impuls będzie równe [99]:

$$\beta_2 = k_2 t_p = \delta \cdot \frac{D_2^2}{t_p} \quad (2-9)$$

Dla tego prawdopodobieństwa TPA cząsteczka powinna zostać poddana dawce pobudzającej wynoszącej [99]:

$$D_2 = \sqrt{\frac{t_p \cdot \beta_2}{\delta}} \quad (2-10)$$

W celu porównania wydajności wzbudzeń SPA i TPA założono, że prawdopodobieństwa wzbudzenia molekuly są równe $\beta = \beta_1 = \beta_2$. Dodatkowo uwzględniono fakt, że fotony wzbudzenia SPA mają dwukrotnie większą energię w stosunku do TPA. Miara względnej sprawności wzbudzenia R dla osiągnięcia prawdopodobieństwa wzbudzenia zdefiniowana została jako stosunek wielkości dawek wymaganych w SPA i TPA [99]:

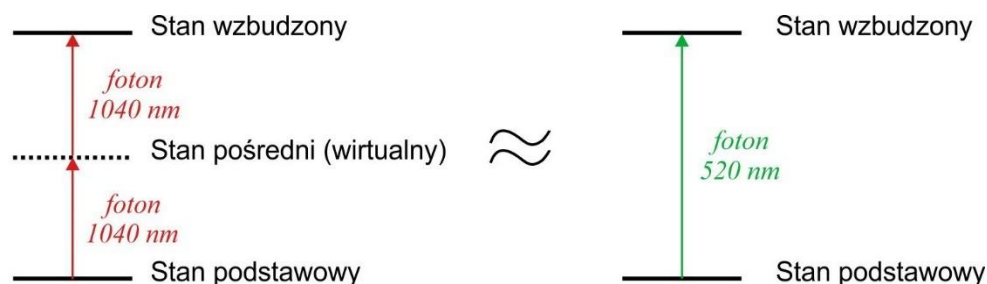
$$R = \frac{2D_1}{D_2} = \frac{2}{\sigma} \sqrt{\frac{\delta \cdot \beta}{t_p}} \quad (2-11)$$

Wzór ten pokazuje, że wyższa względna wydajność TPA względem SPA może mieć miejsce w przypadku wzbudzania z mniejszym przekrojem SPA lub przy stosowaniu krótszych impulsów (t_p).

Tak więc prawdopodobieństwo zajścia procesów dwufotonowych jest o wiele rzędów wielkości mniejsze niż jednofotonowych. Wzbudzenie dwufotonowe jest bardzo rzadkim zdarzeniem. Ciekawe i bardzo dobrze obrazujące porównanie wydajności absorpcji jedno- i dwufotonowej przedstawia w swojej prezentacji o mikroskopii wielofotonowej firma Leica. W jasnym świetle dziennym dobry jedno- i dwufotonowy materiał pochłaniający absorbuje – w procesie jednofotonowym jeden raz na sekundę, w procesie dwufotonowym – jeden raz na 10 milionów lat. Tak więc, by możliwa była obserwacja w skali makro efektów tak rzadkiego zjawiska jakim jest absorpcja dwufotonowa – by TPA zachodziła wystarczająco często i żeby uzyskać odpowiednio gęsty strumień fotonów ($\text{fot}/\text{m}^2\text{s}$), należy zastosować impulsowe źródło promieniowania laserowego – poniżej ps (upakowanie czasowe), które zapewniają wysoką moc szczytową i skupić je stosując wysoką aperturę numeryczną (NA) obiektywu lub soczewki (upakowanie przestrzenne), która powoduje małe objętości ogniskowe i przez to wysokie intensywności pików.

2.3 Widzenie dwufotonowe w Zespole Fizyki Medycznej

W 2010 roku w Zespole Fizyki Medycznej na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu naukowcy pracujący nad metodami OCT zauważyli podczas swoich badań dodatkowe zjawisko polegające na percepcji wiązek podczerwonych leżących poza zakresem widzialnym ($\approx 1060 \text{ nm}$). Czułość w plamce dla promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni (do 1000 nm) analizowali w swoich pracach zespołowych Griffin [47](1947) oraz Walraven [100] (1963). Możliwe jest więc zobaczenie np. promieniowania emitowanego przez diodę LED o długościach fali 860 nm lub nawet 940 nm (po adaptacji do ciemności), jeśli emitowane promieniowanie ma wystarczającą moc, by pobudzić czopki czerwone. Czułość dla długości fali 900 nm jest o blisko 8 rzędów wielkości mniejsza niż dla 600 nm [100]. Widzialność wiązek stosowanych w OCT była jednak odrębnym zjawiskiem, gdyż wiązki te nie miały koloru czerwonego, a zielony (Rys. 2.3.1). Percepcja ta, na tyle zaintrygowała naukowców z zespołu, że postanowili zbadać dokładniej naturę tego postrzegania.



Rys. 2.3.1 Schematyczne przedstawienie postrzegania wiązki dwufotonowej jako widzialnej przez proces dwufotonowej absorpcji dwóch fotonów podczerwonych. Praca własna.

2.4 Pierwsze obserwacje i próba interpretacji

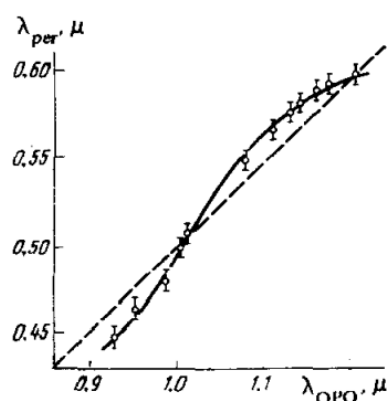
Pierwsze doniesienia o postrzeganiu podczerwonej wiązki lasera impulsowego jako kolorowej opisane zostały w pracach Vasilenko i współautorów [101] z roku 1965. W eksperymentach autorzy używali lasera gazowego wodorowo – neonowego i monochromatora. Impulsy miały długość 5 μ s. Emisyjne długości fali i obserwowane kolory były następujące: 948,6 nm postrzegany był jako czerwony 1114,3 nm i 1117,7 nm jako zielono-żółte, 1152,5 nm jako żółte, a 1179 nm jako pomarańczowe. Wrażenia wzrokowe powodowane były promieniowaniem podczerwonym. Autorzy wnioskowali, że obserwowana emisja w podczerwieni odpowiada harmonicznej promieniowania.

Ważny wkład w rozumienie zaobserwowanego zjawiska wnieśli Fine i Hansen [102] (1971), którzy badali generacje drugiej harmonicznej w tkankach biologicznych (in vivo) przy użyciu lasera rubinowego (694 nm). Naświetlali próbki materiałów biologicznych pochodzących od psa i królika. Zaobserwowali emisję promieniowania drugiej harmonicznej 347 nm w tkankach kolagenowych m.in. rogówki i twardówki. Generacja nie zachodziła natomiast w badanych tkankach soczewki, siatkówki i naczyńówki.

Sliney i współpracownicy [103] (1976) w swojej pracy badali progi widzenia używając różnych źródeł promieniowania z zakresu 441.6 nm – 1150 nm. Czasy ekspozycji źródeł zawierały się w przedziale 1 – 10 s oraz 30 ms, 3 ms, 0,2 ms i 20 ns. Pobudzenia źródłami od długości fali 694,3 nm i wyższych, o czasach trwania impulsu 0,1 s i dłuższych postrzegane były jako czerwone. Impulsy krótsze niż 1 ms nigdy nie były postrzegane jako czerwone, a jako białe, zielone lub niebieskie. Pobudzenie parafovea siatkówki dawało zawsze wrażenie koloru białego, mimo że odpowiedzialne za odpowiedź były prawdopodobnie czopki czerwone. Co ciekawe większość badanych zauważyła, że obraz punktowy lasera neodymowego postrzegany był jako mniejszy w porównaniu do innych źródeł, podczas gdy średnica wiązki wchodzącej do oka dla każdego źródła była utrzymywana na stałej wartości około 3 mm poprzez sztuczną źrenicę. Wiązka laserowa ciągła o długości fali 1064 nm postrzegana była jako czerwona, a impulsowa 1060 nm

punktowa jako biała, zielona lub czerwona, natomiast wiązka rozbieżna 6-stopniowa postrzegana była jako zielona. Według autorów kolor ten sugerował generację drugiej harmonicznej w siatkówce, co stoi w sprzeczności z przywołanymi powyżej wynikami Fine'a i Hansen'a, w których nie udało się wzbudzić drugiej harmonicznej w siatkówce *in vivo*. Zauważalnie mniejszy rozmiar postrzeganej punktowej wiązki impulsowej 1064 nm może być argumentem za dwufotonowością procesu odpowiedzialnego za percepcję tej wiązki.

Dwufotonowa absorpcja impulsowych wiązek laserowych w pigmentach komórek światłoczułych jako hipoteza wyjaśniająca zjawisko postrzegania wiązek podczerwonych została zaproponowana po raz pierwszy przez Dmitriev'a i współpracowników [104] (1979). Przeprowadzili oni badania dopasowania kolorów wiązek podczerwonych generowanych z użyciem przestrajalnego źródła OPO dla długości fal w zakresie 800 nm – 1355 nm i widzialnych wiązek z monochromatora. Czas trwania impulsów był równy 10 ns, częstotliwość repetycji wynosiła 25 Hz. Rys. 2.4.1 przedstawia wynik eksperymentu.



Rys. 2.4.1 Zależność dopasowanego koloru λ_{per} postrzeganej długości fali od podczerwonej długości fali generowanej przez OPO λ_{OPO} . Przerywana linia odpowiada drugiej harmonicznej dla długości fali OPO. Wykres z pracy [104].

Z wykresu tego wynika, że postrzegana długość fali dla większości punktów pomiarowych różni się od długości fali odpowiadającej drugiej harmonicznej (linia przerywana). Dla fal generowanych przez źródło z zakresu 900 nm – 1000 nm postrzegane długości fal są krótsze niż druga harmoniczna (przesunięcie w stronę koloru niebieskiego), natomiast dla zakresu 1000 nm – 1200 nm są dłuższe (przesunięcie w stronę koloru czerwonego). Autorzy zaproponowali wyjaśnienie tego zjawiska innym niż generacja drugiej harmonicznej procesem. Wyszunęli tezę o dwufotonowej absorpcji promieniowania podczerwonego przez pigmenty fotoreceptorów, powodującej, jak w widzeniu jednofotonowym, izomeryzację molekuł barwnika wzrokowego i generację sygnału nerwowego. Autorzy zasugerowali, że stopień pobudzenia barwników wzrokowych jest

uzależniony od widm absorpcji dwufotonowej tych barwników. Stąd subiektywne określenie koloru podczerwieni postrzeganej w procesie dwufotonowym może różnić się znacznie od znanego nam z widzenia jednofotonowego liniowego postrzegania światła[104].

W pracy Zaidi i Pokorny [105] (1988) autorzy obszernie dyskutują różne hipotezy wyjaśniające zjawisko postrzegania wiązek podczerwonych jako kolorowych. Jako dwie główne wymieniają generację drugiej harmonicznej na którejś ze struktur oka oraz absorpcję dwufotonową promieniowania podczerwonego w pigmentach wzrokowych. Ich zdaniem bardziej prawdopodobną jest ta, opierająca się o generację drugiej harmonicznej w rogówce, w której wygenerowane promieniowanie jest postrzegane przez komórki fotoreceptorów. W obu dyskutowanych zjawiskach nieliniowych ich wydajność jest proporcjonalna do kwadratu natężenia pola lokalnego (wzbudzającego). Autorzy odrzucają hipotezę o absorpcji dwufotonowej w pigmentach wzrokowych, ponieważ uważają, że wiązałyby się ona z fluorescencją długości fali większej niż druga harmoniczna, co według autorów nie zgadza się z danymi doświadczalnymi. Jednak badania Dmitriewa [104] dla długości fal promieniowania wzbudzającego 900 nm – 1000 nm są sprzeczne z tym wnioskiem. W tym miejscu warto zwrócić uwagę na różnicę między samą absorpcją dwufotonową a mikroskopią fluorescencyjną, w której fluorescencja jest następstwem absorpcji dwóch fotonów. Zgodnie z obecnym rozumieniem zjawiska widzenia dwufotonowego w fotoreceptorach nie dochodzi do generacji światła widzialnego. Podczerwone impulsy są absorbowane przez pigmenty a sam fakt pochłaniania promieniowania powoduje izomeryzację pigmentu i uruchamia kaskadę fototransdukcji i postrzeganie podczerwieni.

Autorzy wyjaśnili też zależność wrażenia barwnego od długości impulsu podczerwonego poprzez oszacowanie wydajności procesu nieliniowego. Wydajność drugiej harmonicznej rośnie wraz z mocą szczytową padającej wiązki laserowej. Tak więc dla impulsów o krótszym czasie trwania próg widzialności pojawi się przy krótszej długości fali, np. wiązki o długości fali około 950 nm mogą być postrzegane jako czerwone dla impulsów o czasie trwania 5 us[101] a jako niebieskie dla impulsów 10 ns [104]. Wiązki dłuższe niż 1000 nm będą postrzegane jako zielone dla wydajności drugiej harmonicznej większej niż 10^{-10} , co zgadza się z wydajnością procesu szacowaną przez Slineya 10^{-8} przy 20 ns wiązki 1064 nm [103]. Warto zaznaczyć, że te rozważania są prawdziwe również dla procesu absorpcji dwufotonowej, który także jest zjawiskiem nieliniowym, zależnym od mocy szczytowej.

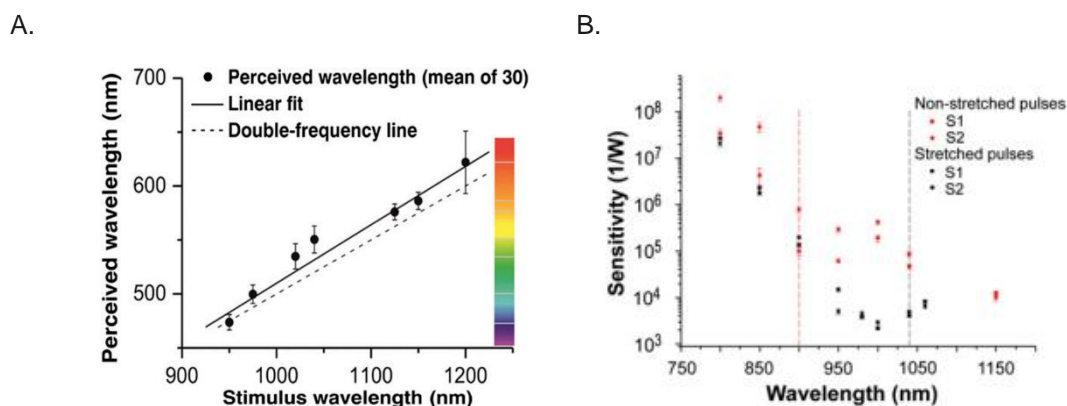
Dwie kolejne prace w tematyce percepcji wiązek podczerwonych pochodzą od grup wykorzystujących lasery Nd:YAG o impulsach ns rozpraszanych na próbkach chropowatych

powierzchni [106], [107]. Autorzy obserwowali wzory plamek postrzeganych na zielono, pochodzących od wiązki podczerwonej. Obie grupy badawcze tłumaczyły percepcję podczerwieni generacją drugiej harmonicznej na rogówce [106] lub w periodycznych strukturach siatkówki [107].

Wyjaśnienie zjawiska widzenia wiązki podczerwonej poprzez generację drugiej harmonicznej (wiązki światła widzialnego) w rogówce, która jest ogniskowana na siatkówce jak każde inne światło docierające ze świata zewnętrznego nie wnosi żadnych potencjalnych korzyści możliwych do wykorzystania w praktyce klinicznej czy innych zastosowaniach. Po 40 latach pojawiły się jednak badania potwierdzające dwufotonową naturę zjawiska postrzegania impulsowej wiązki podczerwonej [108] i tematyka widzenia dwufotonowego znalazła się z powrotem w kręgu zainteresowań wielu grup badawczych.

2.5 Generacja drugiej harmonicznej czy absorpcja dwufotonowa?

Wieloaspektowa praca Palczewskiej i współpracowników [108] (2014) rzuciła nowe światło i wniosła wiele argumentów za dwufotonową izomeryzacją pigmentów wzrokowych stojącą za percepcją promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni. Na grupie 30 osób przeprowadzono badania psychofizyczne potwierdzające, że człowiek postrzega wiązkę podczerwoną z zakresu bliskiej podczerwieni jako barwną. Wyniki eksperymentów z dopasowaniem barw wiązek podczerwonych (moc na oko 1 mW) i światła monochromatora przedstawia Rys. 2.5.1.A.



Rys. 2.5.1. A. Wynik eksperymentu dopasowania kolorów wiązek podczerwonych postrzeganych dwufotonowo do światła z monochromatora przeprowadzony na grupie 30 osób. B. Wyniki pomiarów czułości widzenia dwufotonowego dla różnych długości impulsów. Szczegóły w tekście; z [108].

Wynik tego eksperymentu pokazuje, że dla większości długości fal dopasowany kolor był przesunięty w kierunku podczerwieni. Autorzy tłumaczą to widmami absorpcji dwufotonowej innymi niż jednofotonowej oraz możliwą dodatkową emisją spowodowaną wzbudzeniem pręcików. U dwóch osób zbadano również czułość widzenia dla krótszych

(0,5 – 1,25 ps) i dłuższych impulsów, rozciągniętych przez światłowód (0,3 – 0,6 ns). Wyniki tego badania przedstawia Rys. 2.5.1.B do długości fali około 900 nm różnice między czułością widzenia dla długich i krótkich impulsów są niewielkie a postrzegany kolor to czerwony. W tym obszarze dominuje widzenie jednofotonowe. Dla długości fali około 1000 nm krótkie impulsy postrzegane były jako zielone, a dłuższe nadal jako czerwone. Różnica mocy potrzebnej do wywołania wrażenia wzrokowego była 100 – krotnie większa dla dłuższych impulsów. Potwierdza to udział procesów nieliniowych w percepcji bliskiej podczerwieni. Barwne widzenie potwierdziło udział czopków w postrzeganiu podczerwieni. Dodatkowo pokazano poprzez badanie osoby z udokumentowanych schorzeniem autosomalną recesywną achromatopsją polegającą na upośledzeniu czopków i przez to barwnego widzenia, że pręciki również są zdolne do postrzegania podczerwieni – pacjent monochromatycznie widział wiązkę.

Dzięki pracom w dziedzinie technik obrazowania mikroskopią wielofotonową wykazano, że do generacji drugiej harmonicznej w rogówce potrzebny jest strumień fotonów rzędu 10^6 - 10^8 W/cm² [109]–[112], a przekroje czynne σ_2 dla procesów dwufotonowych są zwykle rzędu 10^{-50} cm⁴s [95], [113]. W przypadku eksperymentów psychofizycznych w pracy Palczewskiej [108] stosowana była wiązka skolimowana 1040 nm o średnicy na rogówce 2 mm, średniej mocy 1 mW, długości impulsu na rogówce równej 1 ps i częstotliwości repetycji lasera 76 MHz.

Energia pojedynczego impulsu wynosi:

$$E_{peak} = \frac{P_{avg}}{f_{laser}} = \frac{1 \text{ mW}}{76 \text{ MHz}} = 13,2 \text{ pJ} \quad (2-12)$$

Moc szczytowa impulsu jest równa:

$$P_{peak} = \frac{E_{peak}}{t_{peak}} = \frac{13,2 \text{ pJ}}{1 \text{ ps}} = 13,2 \text{ W} \quad (2-13)$$

Przeliczając moc szczytową na strumień fotonów na rogówce otrzymujemy wartość 420 W/cm². W eksperymentach z progiem czułości [108] średni próg widzialności dla wiązki 1040 nm wynosił $24 \pm 6 \mu\text{W}$, co daje moc szczytową impulsu około 0,32 W i szczytową gęstość mocy na rogówce rzędu 10 W/cm². Te szacunkowe kalkulacje jasno pokazują, że przy tak małych mocach stosowanych w eksperymentach z widzeniem dwufotonowym nie jest możliwe wyjaśnienie tego zjawiska generacją drugiej harmonicznej w rogówce, która wymaga gęstości mocy o co najmniej 7 rzędów wielkości wyższych niż zastosowane. Średnica wiązki zogniskowanej przez układ optyczny oka na siatkówce wynosiła około 15 – 20 μm . Pomijając straty w oku szacowana szczytowa gęstość mocy na siatkówce była

równa $4,2 \cdot 10^6 - 7,5 \cdot 10^6 \text{ W/cm}^2$ dla średniej mocy 1 mW i $0,5 \cdot 10^6 \text{ W/cm}^2$ w warunkach progu widzialności. Liczby te pokazują, że proces dwufotonowy na poziomie siatkówki jest możliwy dla stosowanych warunków stymulacji.

Oprócz badań psychofizycznych ludzi, w pracy [108] przedstawiono również wyniki eksperymentów elektrofizjologicznych z mysich siatkówek, w których fotoreceptory były bezpośrednio stymulowane światłem, co wyklucza wpływ drugiej harmonicznej z rogówki czy soczewki. Pokazano, że aktywacja procesów dwufotonowych następuje pomiędzy 800 a 900 nm.

Badania biochemiczne na próbkach wyizolowanej rodopsyny [108], pigmentu czopkowego i modelowym związku chromoforowym wykazały, że równoczesna absorpcja dwóch niskoenergetycznych fotonów podczerwonych prowadzi do tego samego procesu izomeryzacji co absorpcja jednofotonowa, w wyniku której powstaje all - trans - retinal. Dowodzi to, że nieliniowy proces optyczny może aktywować fotoreceptory. Dodatkowo jest bezpiecznym, odwracalnym procesem, który wytwarza takie same produkty reakcji jak w przypadku izomeryzacji wywołanej przez światło w procesie jednofotonowym. Wybielony pigment może być regenerowany w cyklu widzenia.

Wyniki symulacji [108] dodatkowo potwierdziły dane uzyskane z eksperymentów na ludziach i myszach, że absorpcja dwufotonowa na tych długościach fal jest możliwa i rzeczywiście powoduje izomeryzację pigmentu. Z przeprowadzonych obliczeń wynikało również, że mechanizmem dominującym nad ewentualną izomeryzacją rodopsyny w wyniku jej fluorescencji po zaabsorbowaniu fotonów jest jej bezpośrednia fotoizomeryzacja z procesu absorpcji dwufotonowej. Rozważano też wkład zjawisk termicznych w postrzeganiu podczerwieni i uznano, że nie mają one znaczącej roli.

Autorzy pracy [108], [114] zwrócili również uwagę na fakt, że percepcja wzrokowa przez absorpcję dwufotonową w pigmentach fotoreceptorów ma miejsce przy mocy zaledwie 1 mW wiązki podczerwonej, co ich zdaniem „może mieć wpływ na rozwój technologii wykorzystujących to zjawisko” oraz być wykorzystane „do głębokiej penetracji tkanek w celu ekspresji różnych sond optogenetycznych” [108].

2.6 Współczesne badania widzenia dwufotonowego

Właściwości przestrzenne widzenia dwufotonowego i jednofotonowego były badane przez Artalą i współpracowników [115] (2017). Za pomocą skanerów wyświetlano na siatkówce litery E w różnych orientacjach, by określić rozdzielczość widzenia (Visual Acuity). Do wzbudzenia dwufotonowego użyto impulsowego lasera femtosekundowego HighQ-2 o długości fali 1043 nm (FWHM = 6 nm), częstotliwości repetycji 63 MHz, szerokości

czasowej impulsu w płaszczyźnie źrenicy oka równej 435 fs. Źródłem światła widzialnego był laser ciągły He-Ne emitujący światło o długości 543 nm. Obie wiązki miały prawie nierozróżnialny kolor. Sześciu ochotników z porażoną Tropicamidum 1 % akomodacją miało badaną ostrość widzenia w zakresie $\pm 3 D$ przy użyciu soczewek testowych (0,5 D) umieszczanych przed okiem. Każdy pomiar był wykonywany trzykrotnie.

Otrzymane wyniki ostrości wzroku uśredniono i znormalizowano do wartości maksymalnej i wykreślono w funkcji zbieżności. Rozdzielczość przestrzenna widzenia okazała się być taka sama dla światła widzialnego jak dla podczerwieni postrzeganej dwufotonowo. Najlepsza ostrość widzenia dla wiązki podczerwonej była przesunięta o 1,5 D względem światła widzialnego, co zgadzało się przesunięciem wynikającym z aberracji chromatycznej między używanymi długościami fal.

Autorzy wskazują na potencjalne zastosowania postrzegania dwufotonowego, które może umożliwić widzenie w przypadkach ośrodków optycznych nieprzezroczystych dla widzialnych długości fal (dzięki temu, że dla podczerwieni zachowują one przezroczystość) i mogą być pomocne w wykrywaniu chorób siatkówki poprzez badanie progów widzenia impulsowych wiązek podczerwieni.[115]

Możliwość absorpcji dwufotonowej w czopkach siatkówki badali Vinberg i współpracownicy[116] (2019). Użyto próbek siatkówek mysich, które miały wyłączoną transdukcję sygnałów z pręcików. Wbrew oczekiwaniom zgodnym z wzorcem jednofotonowej krzywej czułości spektralnej pigmentu czopków, czułość czopków mysich spada do 800 nm, ale następnie wzrasta przy 900 nm i 1000 nm. Drugimi użytymi próbkami były siatkówki makaka, w których badano rejon parafovea. W tym przypadku czułość spektralna czopków również odbiegała od przewidywanej po przekroczeniu 800 nm.

Dla obu próbek efektywna detekcja światła podczerwonego zależała od zminimalizowania dyspersji ultrakrótkich impulsów świetlnych, co popierało tezę o nieliniowym procesie aktywacji dwufotonowej. Badania dowiodły, że czopki ssaków mogą być aktywowane przez nieliniowe wzbudzenie dwufotonowe do światła z zakresu bliskiej podczerwieni.

Autorzy stwierdzili, że uzyskane wyniki stanowią podstawę do stworzenia nowatorskiego narzędzia do diagnozy i leczenia różnych zaburzeń wzroku – dwufotonowego oftalmoskopu z jednoczesną funkcją obrazowania i badania funkcjonalnego ludzkiej siatkówki[116].

W krótkiej pracy Zielińskiej i współpracowników[117] (2019) przedstawiono budowę systemu stosowanego do badań psychofizycznych widzenia dwufotonowego i jednofotonowego u ludzi. Przedstawiony w pracy układ umożliwia przeprowadzenie badań krzywych adaptacji do ciemności, wyznaczanie progów widzenia czy określanie reakcji źrenicy na bodźce podczerwone i widzialne. Treści zawarte w artykule, w rozbudowanej formie, zostaną omówione w dalszej części rozprawy (3.1), gdyż opisany

w artykule system był pierwotną i rozwijaną później wersją układu użytego do uzyskania wyników w niniejszej rozprawie.

Pierwsze użycie mikroperymetru dwufotonowego do badań czułości siatkówki zademonstrował Rumiński ze współpracownikami [118] (2019). W pracy zostały też przedstawione wyniki badań adaptacji do ciemności w widzeniu dwufotonowym, z których wynika, że różnica czułości między czopkami i pręcikami jest mniejsza w widzeniu dwufotonowym niż jednofotonowym. Eksperyment ten zostanie bardziej szczegółowo omówiony w części rozprawy dotyczącej wyników (4.3). Ponadto w pracy porównano rozrzut progów czułości dla wiązki widzialnej i podczerwonej (nachylenie krzywej psychometrycznej) – mniejszy okazał się być w widzeniu dwufotonowym. Przeprowadzono również badania potwierdzające lepszą penetrację przez ośrodki nieprzezroczyste promieniowania podczerwonego niż widzialnego. Umieszczono soczewki dawców (45-letnią i 64-letnią), między układem a okiem osoby badanej i zmierzono progi widzenia dla jednego ochotnika. Uzyskane wyniki potwierdziły, że zmętnienia soczewki mają mniejszy wpływ na progi podczerwone w porównaniu z progami mierzonymi w świetle widzialnym. Dodatkowo przeprowadzono badania progów czułości wiązek widzialnej i podczerwonej na tłach o różnej wartości luminancji. Aproksymacje liniowe wykreślonych w skali log-log zależności progowych mocy dla wiązki widzialnej od progowych mocy dla wiązki podczerwonej miały nachylenia (współczynniki kierunkowe) równe 1,7, 2,0 i 2,0, które to wartości korespondują z zależnością kwadratową i potwierdzają nieliniowość procesu postrzegania podczerwieni.

W pracy Gholami i współpracowników (2019) [119] mechanikę kwantową z *rozszerzoną wieloskładnikową quasi-degeneracyjną teorią perturbacji* przeprowadzono symulacje teoretyczne widma dwufotonowego rodopsyny bydlęcej jako modelu ludzkiego fotoreceptora. Uzyskane wyniki są teoretycznym potwierdzeniem możliwości wykrywania przez pręciki promieniowania 950 nm i potwierdzają dwufotonową naturę percepcji podczerwieni.

Wpływ długości impulsu i częstotliwości repetycji na progi widzenia dwufotonowego był badany przez dwie niezależne grupy w podobnym czasie [120], [121]. Mazanzera i współpracownicy (2020) [121] mierzyli czułość spektralną (długości fal z zakresu 850 nm - 1100 nm) dla dwóch różnych częstotliwości repetycji lasera (1.98 kHz i 9.91 kHz) dla 4 ochotników po 15 minutowej adaptacji do ciemności. Moce progowe dla lasera o niższej częstotliwości były mniejsze niż dla lasera o wyższej częstotliwości dla wszystkich badanych długości fal. Opracowali również model teoretyczny eksperymentu przewidujący stosunki między mocami progowymi przy stosowanych w doświadczeniu częstotliwościach. Stosunek obliczony był równy 0,45 dla procesu nieliniowego

i 1 dla procesu liniowego, a uzyskany z eksperymentu wynosił $0,53 \pm 0,07$, co stanowi argument wspierający hipotezę o nieliniowej naturze zjawiska widzenia dwufotonowego. Autorzy zaznaczają jednak, że przeprowadzony eksperyment nie pozwala stwierdzić, czy powodem jest bezpośrednia absorpcja dwufotonowa czy jednak generacja drugiej harmonicznej.

Marzejon ze współautorami (2021) [120] przeprowadzili za pomocą laboratoryjnego perymetru badania na grupie 16 zdrowych ochotników i porównywali mapy czułości siatkówki badając zmiany progów widzenia dla dwóch źródeł – lasera półprzewodnikowego emitującego impulsy subpikosekundowe ($\lambda_c = 1043.3$ nm, $\tau_p = 0,253$ ps, $f_{rep} = 62.65$ MHz) i lasera światłowodowego generującego impulsy pikosekundowe ($\lambda_c = 1028.4$ nm, $\tau_p = 12.2$ ps, $f_{rep} = 19.17$ MHz). Wyniki pokazały niewielki spadek czułości dwufotonowej siatkówki ($5,9 \pm 2,8$ dB) lasera światłowodowego w porównaniu do półprzewodnikowego. Według autorów przyczyna tej różnicy tkwi w zmianie czasu trwania i częstotliwości repetycji impulsów obu laserów. Średnia moc optyczna potrzebna do percepcji w widzeniu dwufotonowym dla lasera światłowodowego była czterokrotnie większa niż dla lasera półprzewodnikowego, co jest zgodne z opisem absorpcji dwufotonowej. Praca ta pokazała, że tańsze i prostsze do zaimplementowania w układach optycznych lasery światłowodowe mogą być używane w badaniach widzenia dwufotonowego.

Seria prac klinicznych Łabuza i współpracowników (2020-2022)[122]–[125] dotyczy użycia mikroperymetru dwufotonowego (1045 nm) w grupie ochotników zdrowych i dotkniętych różnymi schorzeniami siatkówki.

W pierwszej pracy klinicznej Łabuza i współpracowników [122] (2020) u 45 zaadaptowanych do ciemności badano mapy czułości siatkówki na bodźce dwufotonowe. Przedstawione wyniki pokazały, że czułość na podczerwień postrzeganą dwufotonowo nie wykazywała istotnych zmian w funkcji wieku, mimo że dodatkowe badania rozproszeń w oku wykazały ich wzrost wraz z wiekiem. Progi czułości u 10 osób z patologiami siatkówki były niższe niż w grupie kontrolnej, co pozwala na zastosowanie mikroperymetrii dwufotonowej w ocenie patologii siatkówki. W pracy zaproponowano również poziom odniesienia dla progów podczerwieni jako $400\mu W$.

Kolejna praca Łabuza i współpracowników [126] (2021) dotyczyła progów widzenia dwufotonowego u pacjentów z retinopatią cukrzycową. Wykazano znaczący spadek czułości dwufotonowej ($P < 0,001$) u osób cierpiących na to schorzenie. Średnia czułość siatkówki na bodźce podczerwone dla grupy kontrolnej ($N = 28$) i grupy z retinopatią cukrzycową ($N = 34$) wynosiły odpowiednio $15,5 \pm 1,3$ dB i $11,6 \pm 2,0$ dB.

Następna praca Łabuza i współpracowników (w tym autorki niniejszej rozprawy)[124] (2022) dotyczyła progów czułości badanych u pacjentów ze zwyrodnieniem plamki żółtej (AMD) badanych dwoma urządzeniami: mikroperymetrem dwufotonowym i mikroperymetrem komercyjnym ze światłem białym. Czułość zarówno na światło podczerwone ($p < .001$) jak i białe ($p < 0,001$) była istotnie niższa w grupie AMD ($N = 23$) niż w grupie kontrolnej ($N = 23$). Autorzy pokazali, że metoda dwufotonowa cechuje się mniejszym rozrzutem danych, co może poprawić dokładność badania i stanowić dodatkowy parametr diagnostyczny do oceny funkcji siatkówki.

Ostatnia praca Łabuza i współpracowników [125] (2022) dotyczyła badania mikroperymetrami dwufotonowym i widzialnym pacjentów z jaskrą. Dodatkowo za pomocą optycznej tomografii koherencyjnej (OCT) mierzono grubość ścięzionej w jaskrze ($p < 0,001$) warstwy włókien nerwowych w obszarach, gdzie mierzone były progi czułości siatkówki. Czułość widzenia dwufotonowego u pacjentów z jaskrą różniła się istotnie ($p = 0,003$) od grupy kontrolnej, natomiast dla światła widzialnego różnica ta nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej. Czułość w podczerwieni istotnie korelowała z grubością warstwy włókien nerwowych w trzech z czterech ocenianych kwadrantów, podczas gdy dla światła widzialnego korelacja wystąpiła tylko w jednym kwadrancie. Badania sugerują, że mikroperymetria dwufotonowa może być wykorzystana do wspomaganego wykrywania neuropatii jaskrowej.

Stachowiak i współpracownicy (2022) zaprezentowali przestrajalny (872 nm – 1075 nm), femtosekundowy (230 fs) laser światłowodowy, którego moce wyjściowe (0,68 – 1,24 mW odpowiadające energiom impulsu 13,2–24,1 pJ) pozwalają na użycie go do badań widzenia dwufotonowego. Zamieszczone są tam również pierwsze wyniki dotyczące pomiaru krzywej luminancji w widzeniu dwufotonowym dla trzech osób, które zostaną przywołane w dalszej części rozprawy dotyczącej wyników (podrozdział 4.4. Krzywa czułości widzenia dwufotonowego).

2.7 Potencjalne zastosowania

Zachodząca w barwnikach fotoreceptorów oka ludzkiego absorpcja dwufotonowa impulsowych wiązek laserowych z zakresu podczerwieni ma potencjalnie wiele korzyści. Dzięki temu, że efekt absorpcji zachodzi jedynie w obrębie ogniska, a światło rozproszone nie podlega percepcji w innych miejscach siatkówki, widzenie dwufotonowe może umożliwić dokładniejszą lokalizację miejsc pobudzania siatkówki. Wiąże się z tym potencjalnie lepsza ostrość i kontrast bodźca. Dodatkową zaletą jest fakt, że światło z zakresu bliskiej podczerwieni jest w mniejszym stopniu rozpraszane [118], [127] przez

ośrodki oka niż światło o krótszych długościach fal. Przezroczystość ośrodków optycznych oka z wiekiem się zmniejsza (zaćma), co daje przewagę w czułości mikroperymetrii dwufotonowej nad jednofotonową.

Związki występujące w cyklu widzenia (1.3.5) mają pasmo absorpcji w zakresie promieniowania UV, które jest blokowane przez rogówkę (Rys. 1.3.2). Ocena procesów metabolicznych występujących w tym cyklu mogłaby nieść ze sobą przydatne informacje diagnostyczne i pomóc w leczeniu chorób siatkówki. Dzięki dostarczeniu promieniowania podczerwonego, które jest dwufotonowo absorbowane przez produkty pośrednie cyklu widzenia i toksyczne produkty uboczne możliwe jest wzbudzenie fluorescencji przy niskich mocach i ich ilościowa ocena. Demonstrację dwufotonowego skaningowego oftalmoskopu laserowego w połączeniu z zastosowaniem technik pomiaru bardzo słabych sygnałów fluorescencji zawarto w pracy Bogusławskiego i współpracowników [128] (2022) dotyczącej obrazowania dwufotonowego. Autorzy uważają, że otrzymane wyniki mogą w przyszłości umożliwić rozwój metod do monitorowania wczesnych stadiów chorób oczu zanim dojdzie do uszkodzeń strukturalnych siatkówki.

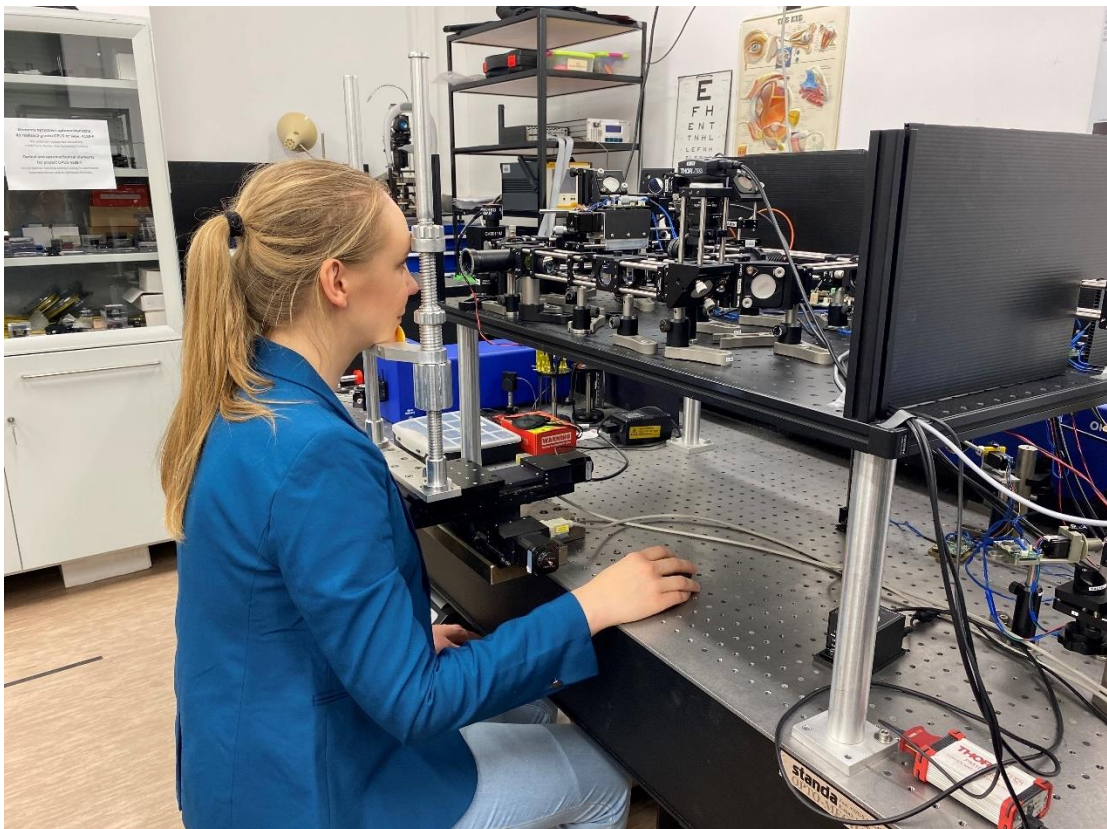
Obok zastosowań diagnostycznych i obrazowania dwufotonowego potencjalną, jeszcze nieeksplorowaną dziedziną zastosowań są wyświetlacze w technikach Augmented / Virtual Reality (AR/VR).

3. Metodologia

3.1 Układ eksperymentalny

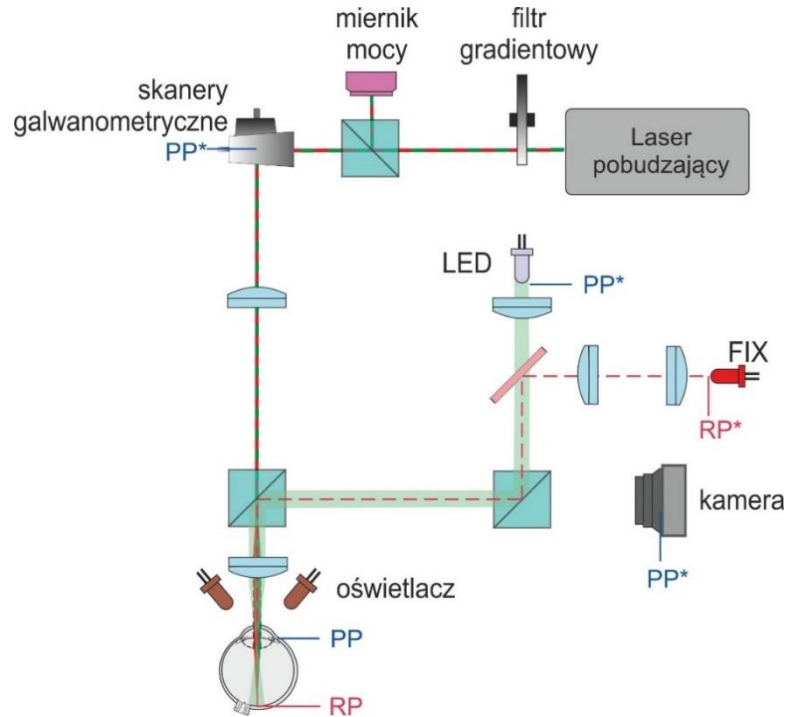
Do przeprowadzenia badań psychofizycznych widzenia dwufotonowego i jednofotonowego użyto skonstruowanego w laboratorium Katedry Biofotoniki i Inżynierii Optycznej prototypowego systemu optycznego. Główna część układu zbudowana została na platformie konstrukcyjnej, by umożliwić komfortową pozycję ochotnika podczas badania. Elementy doprowadzenia laserowych źródeł światła do układu umieszczono przed platformą, na stole optycznym.

Osoba badana siadała przed stołem optycznym na stołku z możliwością regulacji wysokości i umieszczała głowę przed układem na zmotoryzowanym w dwóch osiach podbródku (silniki krokowe umożliwiały zmianę położenia głowy badanego w kierunkach przód-tył oraz lewo-prawo). Zmiany wysokości głowy badanego dokonywał ręcznie operator poprzez przekręcanie góra-dół podpórki podtrzymującej głowę. Broda i czoło pacjenta oparte były o podbródek. Pacjenta siedzącego przed układem przedstawia poniższa fotografia (Rys. 3.1.1)



Rys. 3.1.1 Pozycja pacjenta podczas badania. Pacjent siedział przed układem na stołku opierając głowę o podbródek. Niebadane oko było zasłonięte opaską. Jeśli wymagała tego procedura, pacjent preferowaną ręką operował myszką komputerową. Na potrzeby zdjęcia zdjęto przednią, boczną i wierzchnią część obudowy. (fot. S. Tamborski)

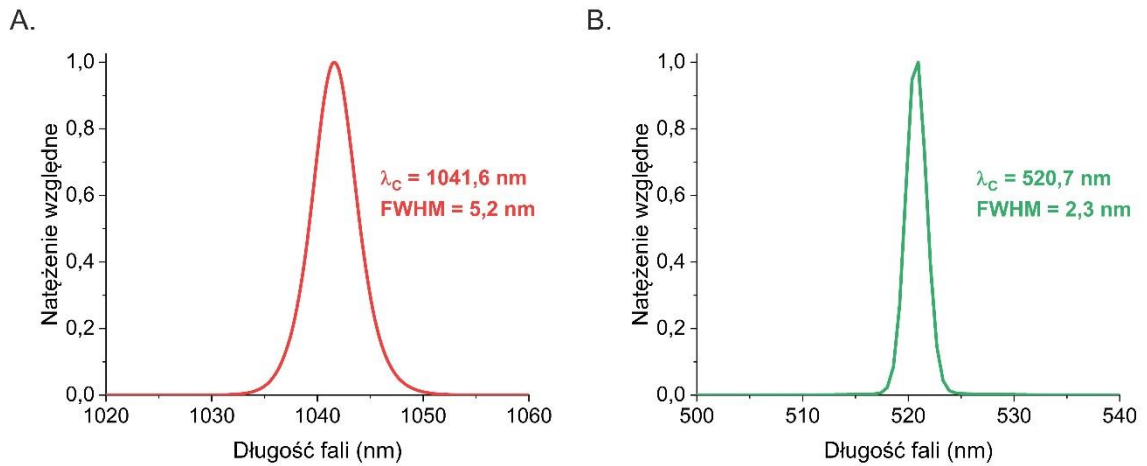
Schemat ideowy systemu optycznego pokazano na Rys. 3.1.2. Układ składał się z czterech głównych modułów: toru doprowadzającego wiązki pobudzające, toru fiksacji, toru LED oraz toru kamery. Poszczególne moduły opisane zostaną szczegółowo w kolejnych podrozdziałach.



Rys. 3.1.2 Schemat ideowy układu optycznego do badań psychofizycznych widzenia dwufotonowego; LED – źródło światła LED, FIX – dioda fiksacji, PP – płaszczyzna źrenicy, RP – płaszczyzna siatkówki, PP* – płaszczyzna sprzężona z płaszczyzną źrenicy, RP* – płaszczyzna sprzężona z płaszczyzną siatkówki.

3.1.1 Źródła światła w układzie

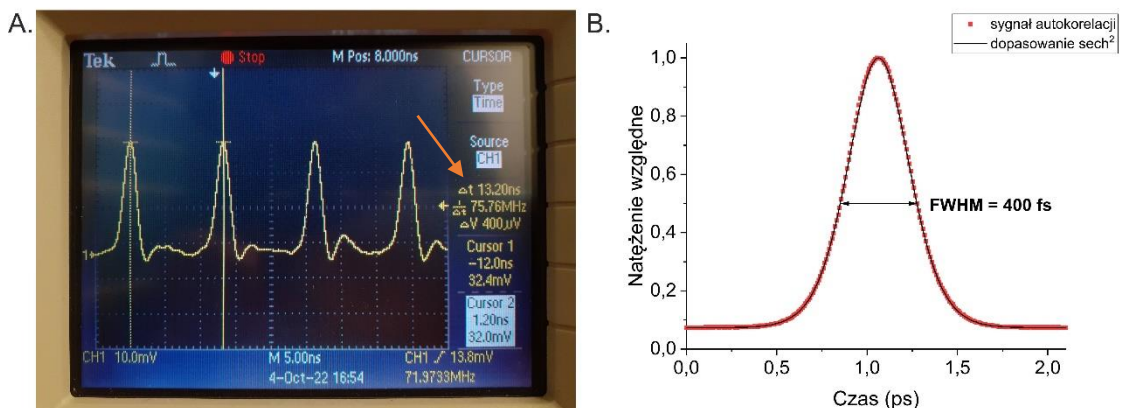
Głównymi źródłami światła używanymi w eksperymentach opisanych w niniejszej pracy były gaussowskie wiązki laserowe generowane przez impulsowy laser femtosekundowy femtoTRAIN IC-495 firmy HighQ Laser. Podstawowa wiązka tego lasera miała długość fali z zakresu podczerwieni – 1042 nm, a jej druga harmoniczna to wiązka zielona o długości fali 521 nm. Zmierzone widma wiązek generowanych przez laser femtosekundowy przedstawia Rys. 3.1.3. W dalszej części rozprawy dla uproszczenia zaokrąglono długości fal używanych wiązek i tak wiązka 1042 nm będzie określana jako wiązka 1040 nm, a wiązka 521 nm jako wiązka 520 nm.



Rys. 3.1.3 Widma wiązek laserowych generowanych przez laser femtosekundowy HighQ Laser używanych w eksperymentach psychofizycznych: A. wiązka podczerwona, B. zielona wiązka widzialna.

Częstotliwość generowania impulsów lasera (częstotliwość repetycji, F_{rep}) wynosi 76 MHz (Rys. 3.1.4.A), a FWHM długości impulsu sygnału autokorelacji wynosiła 400 fs dla wiązki 1040 nm (Rys. 3.1.4.B). Dla sygnału prostokątnego FWHM czasu trwania impulsu ($\tau_{impulsu}$) jest równy szerokości sygnału autokorelacji. Dla innych kształtów impulsów sygnał ten należy przemnożyć przez odpowiedni współczynnik [129]. Uwzględniając kształt impulsu $sech^2$ generowanej wiązki laserowej, współczynnik ten jest równy 0,647 [129], a FWHM czasu trwania impulsu ($\tau_{impulsu}$) wynosi około 260 fs.

W tym miejscu warto uzmysłowić sobie, że używane wiązki są w rzeczywistości bardzo „puste” w środku – co 13,2 ns pojawia się impuls trwający 260 fs, czyli 5 rzędów wielkości krótszy. Skalując do łatwiejszych do wyobrażenia wielkości, jeśli impuls rozciągnęlibyśmy w skali czasowej tak, by trwał 1s, to przerwa do pojawienia się kolejnego impulsu trwałaby ponad 18 h.



Rys. 3.1.4 A. Pomiar częstotliwości repetycji oscyloskopem - pomarańczowa strzałka wskazuje pomierzony czas między impulsami $\Delta t = 13,20$ s, co po przeliczeniu na częstotliwość repetycji daje wartość 76 MHz. Do pomiaru autokorelacji użyto autokorelatora pulseCheck SM 1600 firmy APE, którego działanie opiera się na detekcji drugiej harmonicznej [130]. B. FWHM czasu autokorelacji impulsu 1040 nm pomierzony autokorelatorem wynosił 400 fs,

co uwzględniając czasowy kształt impulsu badanego lasera ($sech^2$) przekłada się na FWHM czasu trwania impulsu około 260 fs.

W przypadku laserów impulsowych, w których między impulsami nie jest generowana moc, energię impulsu ($E_{impulsu}$) liczymy znając moc średnią ($P_{średnia}$) i częstotliwość repetycji impulsów zgodnie ze wzorem [131]:

$$E_{impulsu} = \frac{P_{średnia}}{F_{rep}} \quad (3-1)$$

Obliczenie mocy szczytowej impulsu ($P_{szczytowa}$) o znanym kształcie (w omawianym przypadku $sech^2$), mocy i czasie trwania przeprowadzamy zgodnie ze wzorem [132]:

$$P_{szczytowa} \approx 0,88 \cdot \frac{E_{impulsu}}{\tau_{impulsu}} \quad (3-2)$$

Wzór (3-2) dla przypadku impulsu gaussowskiego różni się zamianą czynnika 0,88 na 0,94 [132].

Impulsowe źródło światła jest konieczne do zajścia absorpcji dwufotonowej w fotoreceptorach (uzyskania odpowiednio dużej gęstości mocy przy zachowaniu bezpiecznego poziomu mocy średniej), co obszerniej wyjaśniono w podrozdziale 2.2.

Drugim źródłem światła generującym wiązki używane w eksperymentach był Optyczny Oscylator Parametryczny (ang. *Optical Parametric Oscillator*, w skrócie OPO). Działanie tego źródła opiera się na zjawisku mieszania częstotliwości wiązek w nieliniowym dielektryku. W wyniku zdudniania na kryształ nieliniowym silnej wiązki światła pompującego ω_p (ang. *pump light*) ze słabą falą sygnałową o niższej częstotliwości ω_s , światło pompujące jest konwertowane na światło sygnałowe ω_s i falę różnicową, tzw. światło jałowe [24] (tłumaczone również w polskiej nomenklaturze jako bierne [133]), którego częstotliwość określona jest wzorem:

$$\omega_i = \omega_p - \omega_s \quad (3-3)$$

Zdudnianie światła jałowego z pompującym prowadzi do generacji dodatkowej ilości światła jałowego i sygnałowego. W ten sposób wzmacniane są fale sygnałowa i jałowa.

Efektywność tego procesu zależy od dopasowania fazowego tych trzech fal (tej samej prędkości propagacji przez kryształ). Dyspersję kryształu możemy zmieniać wykorzystując jego naturalną dwójłomność [134]

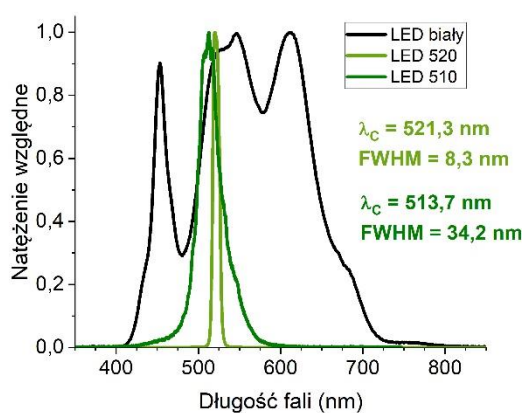
OPO jest źródłem światła spójnego przestrajalnym w szerokim zakresie [24, s. 646] – w naszym przypadku od 690 nm do 990 nm dla wiązki sygnałowej i od 1150 nm

do 2300 nm dla wiązki jałowej [134]. Poprzez temperaturową zmianę współczynnika załamania kryształu możliwe jest przestrajanie oscylatora i ustawienie pożądanej długości fali. Wiązkę pompującą ω_p stanowiła wiązka zielona 520 nm z wspomnianego wcześniej lasera femtoTRAIN. Światło generowane przez OPO wykorzystywane było do eksperymentów opisanych w podrozdziale 4.4. Przykładowe charakterystyki widmowe wiązek generowanych przez OPO pomierzone za pomocą OSA (Rys. 3.1.6) zestawiono w Tab. 3.1-1. Wiązki jałowe charakteryzowały się około dwukrotnie większymi wartościami szerokości połówkowych (10 nm – 13 nm) niż wiązki sygnałowe (5 nm – 7 nm).

Tab. 3.1-1 Przykładowa charakterystyka widmowa wiązek generowanych przez OPO

Pożądana długość fali	Centralna długość generowanej fali λ_c (nm)	SD λ_c (nm)	FWHM (nm)	$\delta\lambda_c = \sqrt{(SD \lambda_c)^2 + FWHM^2}$ (nm)
750 nm	750,5	0,4	5,3	5,3
770 nm	769,7	0,5	4,8	4,9
790 nm	790,2	1,2	5,8	5,9
810 nm	810,3	1,0	4,6	4,7
830 nm	829,2	0,9	5,1	5,2
850 nm	851,5	1,0	6,0	6,1
870 nm	870,8	0,2	5,3	5,3
890 nm	890,4	0,1	5,4	5,4
910 nm	910,2	0,5	5,6	5,7
930 nm	931,3	0,1	5,9	5,9
950 nm	949,9	2,0	6,5	6,8
970 nm	966,6	2,3	7,1	7,5
990 nm	990,5	0,0	7,0	7,0
1100 nm	1094,7	1,1	5,1	5,2
1125 nm	1126,1	1,0	10,1	10,1
1160 nm	1161,3	0,1	10,7	10,7
1180 nm	1179,0	1,4	13,2	13,3
1200 nm	1198,5	0,1	9,9	9,9
1200 nm	1201,0	1,1	11,0	11,1
1220 nm	1218,3	0,3	11,7	11,7
1240 nm	1239,1	0,5	10,0	10,0
1260 nm	1259,4	0,3	13,1	13,1
1280 nm	1279,1	0,1	13,1	13,1
1300 nm	1300,0	0,6	12,5	12,6

Trzecim, ostatnim źródłem światła były LED. Biała dioda (MWWHL3, Thorlabs), której widmo przedstawia Rys. 3.1.5 używana była do wybielania pigmentów wzrokowych pacjenta podczas pomiarów krzywych adaptacji do ciemności opisanych w podrozdziale 4.3. Umieszczenie za diodą zielonego filtra umożliwiło wycięcie części widma i otrzymanie światła zielonego – LED 520 (Rys. 3.1.5) tworzył zielony bodziec eksperymentach reakcji źrenicy na bodziec podczerwony postrzegany dwufotonowo (podrozdział 4.1) i zielone jednorodne tło podczas eksperymentów opisanych w podrozdziale 4.2. Inna dioda – LED 510 (Rys. 3.1.5, M505L4, Thorlabs) była wykorzystywana do wybielenia pigmentów (podrozdział 4.3), Szczegółowy opis tworzenia jednorodnego oświetlenia siatkówki (tła) znajduje się w podrozdziale 3.1.4.

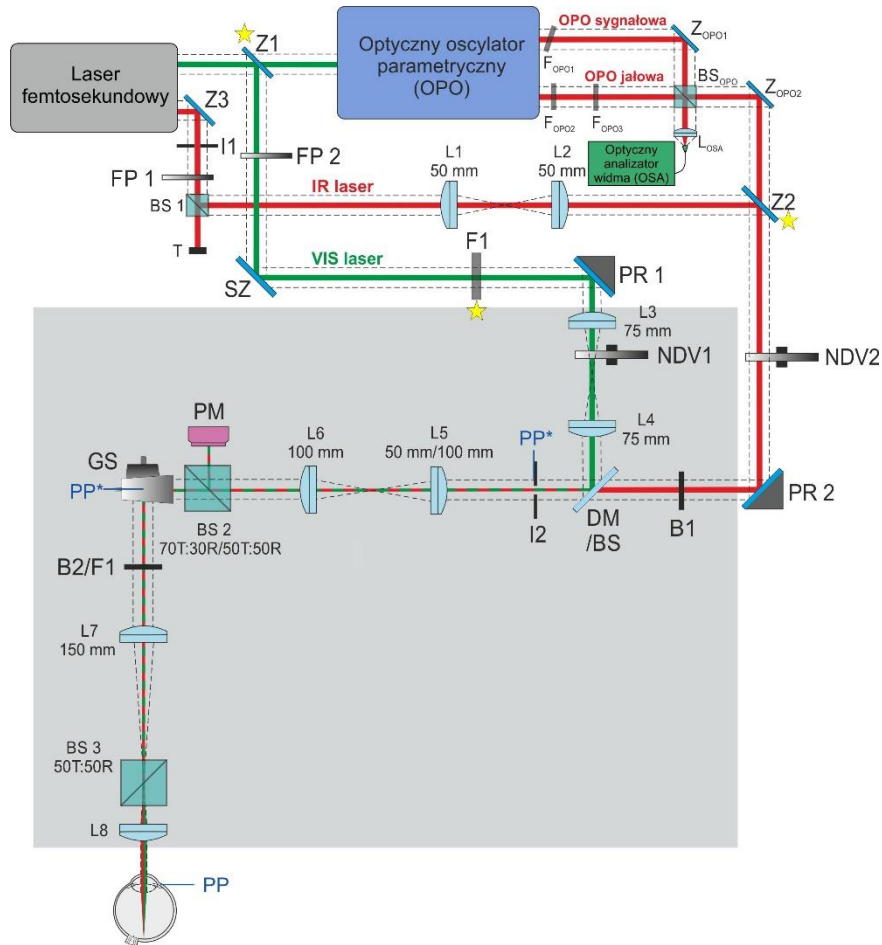


Rys. 3.1.5 Widma szerokopasmowego źródła LED białego, widma LED zielonego 520 nm uzyskanego po umieszczeniu w torze białej diody filtra zielonego oraz źródła LED zielonego 510 nm.

3.1.2 Tor doprowadzający wiązki pobudzające

Rys. 3.1.6 przedstawia szczegółową budowę toru doprowadzającego wiązki pobudzające. Wiązka podczerwona generowana przez laser femtosekundowy odbijana była od zwierciadła Z3, a następnie przechodziła przez przysłonę I1 wycinającą nieosiowe promienie wiązki wychodzące ze źródła laserowego. Kolejny element w torze – filtr paskowy FP1 pozwalał na wstępną regulację mocy wiązki (ustawienie odpowiedniego zakresu mocy wykorzystywanej w badaniach). Część wiązki transmitowana przez dzielnic wiązki BS 1 była tłumiona tłumikiem T, natomiast część odbita była kierowana na teleskop 1:1, który umożliwiał korekcję jej rozbieżności. Po przejściu przez teleskop wiązka odbijała się od uchylnego zwierciadła Z2 (oznaczenie gwiazdką na rysunku). Kolejnym elementem był regulowany filtr gradientowy NDV2, który umożliwiał ustawienie mocy wiązki podczerwonej docierającej do oka. Filtr paskowy FP1 ustawiano w takiej pozycji, by maksymalna moc wiązki docierającej do oka przy przezroczystym ustawieniu filtra

NDV2 spełniała normy bezpieczeństwa. Następnie wiązka kierowana była na platformę główną układu przez peryskop PR 2 złożony z dwóch zwierciadeł w ruchomych oprawkkach. Kolejnym elementem w torze był bloker wiązki B1, który przy zamknięciu uniemożliwiał przejście wiązki do dalszej części układu. W zależności od eksperymentu zwierciadło dichroiczne DM (T800lpxrt, Chroma) lub dzielnik wiązki BS kombinowały tory optyczne wiązki podczerwonej z widzialną.



Rys. 3.1.6 Tory doprowadzające wiązkę do oka. Objaśnienia skrótów w tekście.

Druga generowana przez laser wiązka o długości fali 520 nm była odbijana od uchylonego zwierciadła Z1 (oznaczenie gwiazdką na rysunku). Po odbiciu wiązka zielona przechodziła przez filtr paskowy FP2 umożliwiający regulację zakresu jej mocy, a następnie część wiązki była odbijana do peryskopu przez szkło mikroskopowe SZ ustawione pod kątem 45 stopni. W zależności od wariantu badania filtr osłabiający wiązkę F1 (NDF 4.0A-A, Thorlabs) znajdował się albo na stole optycznym przed peryskopem albo między skanerami a soczewką L7. Zadaniem tego filtra było osłabienie mocy wiązki zielonej docierającej do oka

o blisko 4 rzędy wielkości. Na platformie wiązka przechodziła przez teleskop 1:1 złożony z soczewek L3 i L4 o ogniskowych 75 mm. Soczewkę L4 zamontowano na zmotoryzowanej oprawce poruszanej przez silnik krokowy. Element ten umożliwiał regulację położenia soczewki w zakresie 12 mm wzdłuż kierunku propagacji wiązki. Dzięki oprogramowaniu LabView możliwe było poruszanie soczewką przy pomocy rolki myszy komputerowej i przez to dopasowanie rozbieżności wiązki do wady oka pacjenta. Tuż za soczewką L3 znajdował się okrągły filtr gradientowy NDV 1, który umożliwiał zmianę mocy wiązki docierającej do oka.

W dalszej części toru obie wiązki propagowały współosiowo przez teleskop złożony z soczewek L5 (o ogniskowej 50 mm lub 100 mm) i L6 (o ogniskowej 100 mm). Regulowana przysłona I2 wraz z drugą przysłoną tworzoną przez aperturę skanerów, były używane do monitorowania toru wiązki w długich okresach czasu pomiędzy eksperymentami (kontrola położenia wiązki, czy układ nie rozjustował się). Przed skanerami część wiązki (około 70 % lub 50 %) była wyprzęgnięta przez dzielnik wiązki BS1 i skierowana na miernik mocy PM (miernik PM100USB, Thorlabs) z głowicami pomiarowymi zależnie od długości fal używanych w badaniach (S130C, Thorlabs stosowana do długości fal 1100 nm lub S132C, Thorlabs dla długości fal powyżej 1100 nm). Skanery galwanometryczne SG (8320K, Cambridge Technology) umożliwiały projekcję różnych kształtów (krzyżyk, kółko, punkt, donat) na siatkówce w różnych jej miejscach. Możliwym było również wyświetlanie bodźca przez określony czas i ustalenie odstępu czasowego między kolejnymi projekcjami poprzez zaprojektowanie odpowiedniego przebiegu napięć podawanych na skanery (np. 200 ms wyświetlania bodźca na siatkówce i 400 ms przerwy, podczas której skanery kierowały wiązkę w tło). Skolimowana wiązka odbijająca się od pary skanerów galwanometrycznych była następnie kierowana do oka pacjenta przez teleskop pomniejszający złożony z soczewek L7 o ogniskowej 150 mm i L8 (o ogniskowej 30 mm lub 50 mm lub 100 mm). Wiazka załamywana początkowo przez rogówkę i komorę przednią przechodziła przez otwór źreniczny, a następnie była skupiana na siatkówce przez soczewkę. Soczewka L7 była zamontowana na zmotoryzowanej oprawce osiowo poruszającej soczewką w zakresie do 36 mm, co umożliwiało korekcję zbieżności wiązki pobudzającej w zależności od wady refrakcji pacjenta.

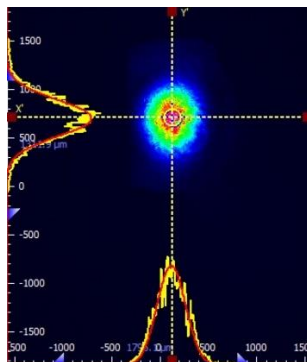
Dla soczewki $f_5 = 100$ mm pomierzone profilometrem średnice wiązek na skanerach wynosiły około 1,8 mm ($1/e^2$). W zależności od ogniskowej ostatniej soczewki układu średnice wiązek pobudzających 520 nm i 1040 nm na rogówce oka pacjenta wynosiły:

- około 0,4 mm ($1/e^2$) dla L8 o ogniskowej $f_8 = 30$ mm
- około 0,6 mm ($1/e^2$) dla L8 o ogniskowej $f_8 = 50$ mm
- około 1,2 mm ($1/e^2$) dla L8 o ogniskowej $f_8 = 100$ mm.

W części eksperymentów stosowana była soczewka $f_5 = 50$ mm, która powodowała, że średnice wiązek na skanerach wynosiły około 3,6 mm ($1/e^2$). W tym przypadku średnice wiązek pobudzających 520 nm i 1040 nm na rogówce oka pacjenta wynosiły:

- około 0,8 mm ($1/e^2$) dla L8 o ogniskowej $f_8 = 30$ mm
- około 1,2 mm ($1/e^2$) dla L8 o ogniskowej $f_8 = 50$ mm
- około 2,7 mm ($1/e^2$) dla L8 o ogniskowej $f_8 = 100$ mm.

Przykładowy profil wiązki zmierzony profilometrem umieszczonym w płaszczyźnie źrenicy pokazano na Rys. 3.1.7.



Rys. 3.1.7 Przykładowy profil wiązki pomierzony profilometrem umieszczonym w płaszczyźnie źrenicy dla wiązki 520 nm dla ogniskowej ostatniej soczewki układu $f_8 = 30$ mm. Średnica wiązki wynosiła $\sim 0,7$ mm ($1/e^2$).

Przy eksperymentach z wiązką OPO zwierciadła uchyłne Z1 oraz Z2 były odchylane. Wiazką pompującą OPO była wiązka 520 nm z lasera femtoTRAIN IC-495. W torze wiązki sygnałowej OPO umieszczono filtr F_{OP01} (ZT1025LP, Chroma, w zakresie długości fal 680 – 990 nm transmisja 0 – 2 %). W torze wiązki jałowej umieszczono filtry F_{OP02} (FELH0650, Thorlabs, wartości OD wahające się od 5,0 do 6,9, w zakresie długości fal 550 – 644 nm) oraz F_{OP03} (LESH1000, Thorlabs, przedział wartości OD od 4,5 do 7,3 dla przedziału długości fal λ 1040 nm – 1550 nm). Filtry te miały zapewnić odcięcie na wyjściach niechcianych wiązek generowanych w oscylatorze parametrycznym.

Elementem kombinującym wiązki sygnałową i jałową był dzielnik wiązki BS_{OP0} . Część wiązki za dzielnikiem była wyprzęgana i kierowana do kolimatora światłowodu połączonego z optycznym analizatorem widma (ang. *Optic Spectrum Analyzer*, w skrócie OSA) celem kontroli własności spektralnych wykorzystywanych impulsów. Wiazki generowane przez OPO odbijane były od zwierciadła Z_{OP02} i w dalszej części docierały do oka torem wiązki 1040 nm. Podczas pomiaru moce wiązek dla długości fal powyżej 1100 nm mierzone były miernikiem PM (Rys. 3.1.6) z głowicą na zakres długości fal 700 – 1800 nm (podrozdział 3.1.9).

Gradientowe filtry NDV są elementami zmniejszającymi moc optyczną wiązki w układzie. Współczynnik tłumienia filtra (gęstość optyczna, ang. *optical density*, OD) rośnie liniowo

od początku pokrycia jego powierzchni powłoką tłumiącą. Gęstość optyczna związana jest z transmisją zgodnie z zależnością [135]:

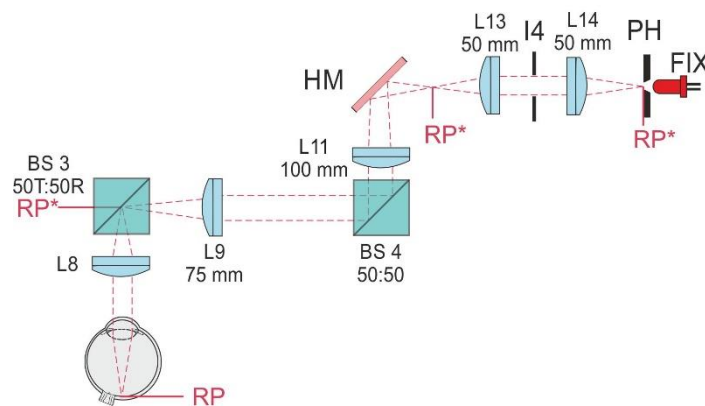
$$OD = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right)$$

(3-4)

Dla używanych w układzie filtrów pomierzono ich transmisyjności w zależności od zmienianej co 10° pozycji filtra. Uzyskane zależności osłabienia filtra w funkcji jego pozycji w stopniach zgodnie z założeniami producenta są w przybliżeniu liniowe. Przesunięcie filtra o 10° powodowało zmianę mocy wiązki o około 1,5 dB dla filtra NDV 1 (w torze wiązki widzialnej) i około 1 dB dla filtra NDV 2 (w torze wiązki podczerwonej).

3.1.3 Tor diody fiksacyjnej

Pozycja oka pacjenta była stabilizowana podczas badań za pomocą małego czerwonego punktu fiksacyjnego umieszczonego centralnie w polu widzenia pacjenta. Schemat toru umożliwiającego fiksację przedstawia Rys. 3.1.8.

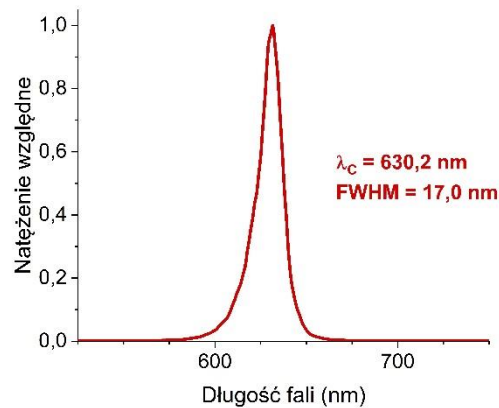


Rys. 3.1.8 Tor diody fiksacyjnej. Objaśnienia użytych skrótów umieszczono w tekście.

Punkt fiksacyjny utworzony był przez przysłonę (ang. *pinhol*) o średnicy $100 \mu\text{m}$, za którym umieszczono czerwoną diodę o centralnej długości fali 630 nm (jej widmo przedstawia Rys. 3.1.9). Te dwa połączone elementy zamontowane były na uchwycie XY umożliwiającym ruch góra-dół i prawo-lewo punktu fiksacyjnego względem osi optycznej układu. Płaszczyzna przysłony odwzorowywana była na płaszczyźnie siatkówki przez trzy teleskopy. Pierwszy teleskop 1:1 złożony z dwóch soczewek (L13 i L14) o ogniskowych 50 mm tworzył z przysłoną PH układ 4f. Soczewka L13 była ruchoma – jej położenie zmieniano pomiędzy pacjentami tak, by uwzględnić wadę refrakcji oka pacjenta i uzyskać ostry obraz punktu fiksacyjnego na siatkówce. Regulowana przysłona I4 znajdująca się wewnątrz tego teleskopu pełniła rolę przysłony połowej. Następnie wiązka odbijała się od elementu kombinującego tor fiksacyjny z torem tła – zwierciadła dichroicznego HM (FM02, Thorlabs)

i przechodziła przez kolejny teleskop L11 i L9 o ogniskowych 100 mm i 75 mm. Teleskop złożony z ostatniej soczewki układu L8 i soczewki oka pacjenta tworzył obraz punktu fiksacyjnego na siatkówce. Szacowany rozmiar tego punktu na siatkówce pacjenta wynosił:

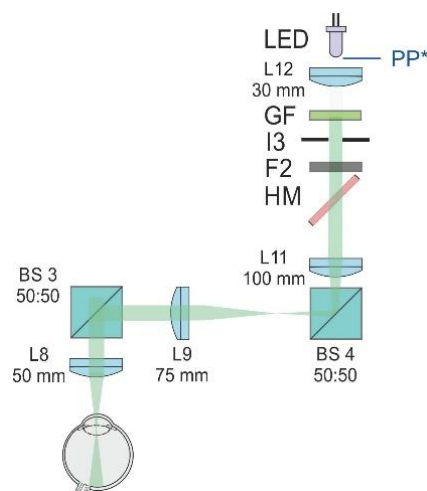
- około 8,3' dla L8 o ogniskowej $f_8 = 30$ mm
- około 5,0' dla L8 o ogniskowej $f_8 = 50$ mm
- około 2,5' dla L8 o ogniskowej $f_8 = 100$ mm



Rys. 3.1.9 Widmo diody fiksacyjnej.

3.1.4 Tor tła

Schemat toru z diodą LED przedstawia Rys. 3.1.10. Dioda LED zapewniała jednorodne oświetlenie siatkówki pacjenta dzięki zastosowaniu sprzężenia optycznego źródła oświetlenia (płaszczyzny obrazu) z płaszczyzną źrenicy oka pacjenta (ang. *Maxwellian view*, [136]). Przez to obraz tworzony na siatkówce nie jest obrazem źródła światła, a obrazem płaszczyzny znajdującej się między źródłem a soczewką L11 – w przypadku omawianego układu płaszczyzną tą była płaszczyzna przysłony I3 jak również płaszczyzna w BS 3.



Rys. 3.1.10 Tor tła. Objaśnienia użytych skrótów umieszczono w tekście.

Tor optyczny zawierał dwa teleskopy złożone z soczewek L12 i L11 (o ogniskowych odpowiednio 30 mm i 100 mm) oraz L9 i L8. Rozmiar obrazu źródła w płaszczyźnie źrenicy zależał od powiększenia teleskopów w torze, a nie zależał od ustawienia przysłony I3. Stopień zamknięcia przysłony decydował o ilości światła w płaszczyźnie źrenicy oraz o rozmiarze kątowym obrazu tworzonego na siatkówce. W zależności od ogniskowej ostatniej soczewki układu rozmiar obrazu LED mierzony w płaszczyźnie źrenicy przy maksymalnie otwartej przysłonie I3 wynosił:

- około 2,2 mm dla L8 o ogniskowej $f_8 = 30$ mm
- około 3,25 mm dla L8 o ogniskowej $f_8 = 50$ mm
- około 6,5 mm dla L8 o ogniskowej $f_8 = 100$ mm

Ostatnim elementem toru tła była soczewka oka pacjenta. O rozmiarze kątowym kołowego bodźca LED wyświetlanego na siatkówce decydował rozmiar regulowanej przysłony aperturowej I3. Zgodnie z pracą Burnsa [137] oświetlony obszar siatkówki S_R może być obliczony ze wzoru:

$$S_R = S_{stop} \cdot \left(\frac{f_{eye} \cdot f_9}{f_8 \cdot f_{11}} \right)^2 \quad (3-5)$$

gdzie:

S_{stop} – pole apertury soczewki L12 lub pole otwarcia przysłony I3,

f_{eye} – ogniskowa oka,

f_9, f_8, f_{11} – ogniskowe odpowiednich soczewek zgodnie z oznaczeniami na Rys. 3.1.10.

Przyjmując z modelu oka Gulstranda f_{eye} równą 16.67 mm i zakładając maksymalną wartość S_{stop} jako czystą aperturę (ang. *clear aperture*) soczewki L9 stanowiącą wg. specyfikacji 90 % apertury soczewki, która jest równa 25.4 mm, obliczamy S_{stop} , które w takim przypadku przyjmuje wartość 410 mm². Dla L8 o ogniskowej 50 mm oświetlone pole siatkówki jest równe około 25,7 mm². Zakładając oświetlenie kołowe, ma ono na siatkówce średnicę 5,7 mm, czyli około 19°. Przeliczając dla pozostałych stosowanych soczewek maksymalna możliwa do uzyskania średnica oświetlonego obszaru siatkówki wynosi:

- około 32° dla L8 o ogniskowej $f_8 = 30$ mm
- około 19° dla L8 o ogniskowej $f_8 = 50$ mm
- około 9.5° dla L8 o ogniskowej $f_8 = 100$ mm

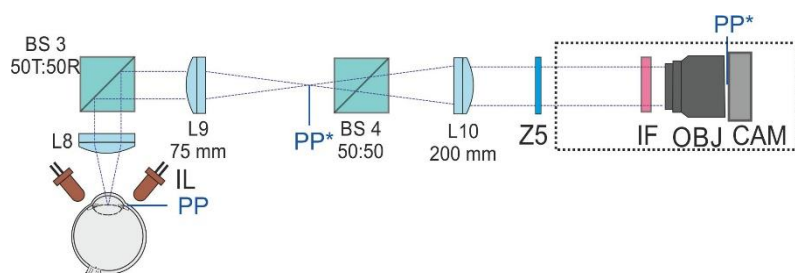
Zmieniając stopień przymknięcia przysłony I3 możemy regulować pole S_{stop} i przez to zmieniać wielkość oświetlonego obszaru siatkówki.

Biała dioda używana była do eksperymentów adaptacji do ciemności – powodowała wybielanie pigmentów wzrokowych.

Tor LED mógł być używany do wytworzenia jednorodnego tła o różnych kolorach poprzez umieszczenie w jego torze filtrów transmitujących wybraną część widma. Filtr zielony GF (FB 520-10, Thorlabs) umieszczony między soczewką L12 a przysłoną I3 pozwalał na uzyskanie zielonego tła do pomiarów progów czułości na tle i wytworzenia zielonego bodźca LED o rozmiarze regulowanym przysłoną I3 w badaniach reakcji źrenicy.

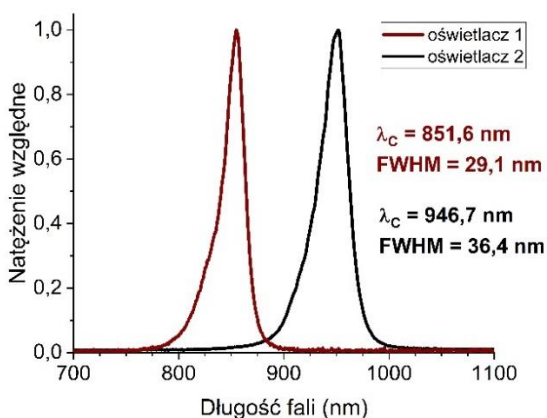
3.1.5 Tor kamery

Schemat toru umożliwiającego monitorowanie położenia źrenicy podczas pomiaru przedstawia Rys. 3.1.11.



Rys. 3.1.11 Tor kamery. Objaśnienia użytych skrótów umieszczono w tekście.

Sprzężenie płaszczyzny źrenicy oka z matrycą pikseli na kamerze (DCC1545M, Thorlabs) było realizowane przez dwa teleskopy – pierwszy złożony był z soczewek L8 i L9, drugi składał się z soczewki L10 o ogniskowej 200mm i obiektywu OBJ (MVL35M32, Thorlabs). Oko pacjenta oświetlane było oświetlaczem IL złożonym z diod podczerwonych zamontowanych na obręczy i przymocowanych do oprawki soczewki L8. Używano dwóch oświetlaczy zależnie od rodzaju przeprowadzanego badania. Pierwszy oświetlacz składał się z ośmiu diod o długości fali 850 nm (centralną długość fali $\lambda_c = 851.6$ nm, FWHM = 29.1 nm). Drugi oświetlacz tworzyło 16 diod emitujących promieniowanie o długości 940 nm (centralną długość fali $\lambda_c = 946.7$ nm, FWHM = 36.4 nm). Widma oświetlaczy przedstawione zostały na poniższym rysunku (Rys. 3.1.12)

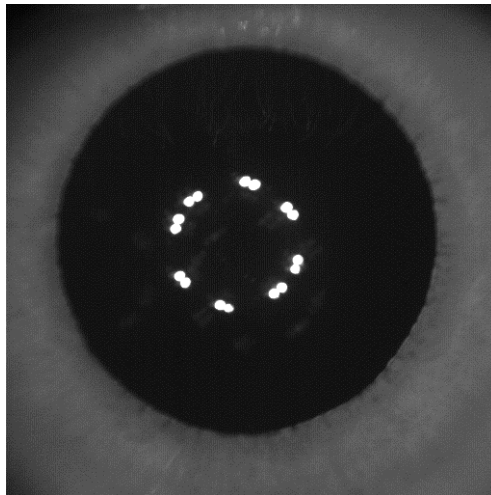


Rys. 3.1.12 Widma oświetlaczy.

W celu wyeliminowania innych długości fal docierających do kamery przed obiektywem umieszczano wąskopasmowy filtr IF dopasowany do centralnej długości fali oświetlacza – $\lambda_c = 940$ nm, FWHM = 10 nm (FB940-10, Thorlabs) lub $\lambda_c = 850$ nm, FWHM = 40 nm (FB850-40, Thorlabs). Zwierciadło Z5 umieszczone było w oprawce odbijającej badające promieniowanie pod kątem 45 stopni w górę. Część toru kamery otoczona kropkowanym prostokątem zbudowana została pionowo, prostopadle do pozostałej części toru.

Obrazy rejestrowane przez kamerę miały rozmiar 512 pikseli na 512 pikseli (dla $f_8 = 50$ mm i 30 mm) lub 1024 pikseli na 1080 pikseli (dla $f_8 = 100$ mm). Zbierane były z prędkością 83 klatek na sekundę (ang. *Frame Per Second*, FPS).

Środek źrenicy pacjenta utrzymywany był w odpowiedniej pozycji względem osi optycznej systemu oraz w odległości ogniskowej od ostatniej soczewki układu poprzez zmotoryzowany podbródek kontrolowany przez operatora. Typowy obraz rejestrowany przez kamerę przedstawia Rys. 3.1.13.



Rys. 3.1.13. Reprezentatywny obraz źrenicy zebrany przez tor kamery dla najczęściej używanego zestawu soczewek $f_5 = 100$ mm i $f_8 = 50$ mm. Na zdjęciu można dostrzec również tzw. odbicia Purkiniego oświetlacza: widocznie najjaśniejsze odbicie pochodzi od zewnętrznej powierzchni rogówki (tzw. odbicie P1), pozostałe to odbicia od zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni soczewki (tzw. odbicia P3 i P4) [138].

3.1.6 Wyciemnienie systemu

Główna część systemu znajdująca się na platformie posiadała łatwo demontowalną prostopadłościenną czarną obudowę chroniącą przed światłem otoczenia i wydostawaniem się poza układ wiązek używanych w badaniach. W pomiarach, w których pacjent był zaadaptowany do ciemności, używano dodatkowo wyciemniającego materiału, którym okrywano pacjenta, by uniknąć wpływu słabych źródeł światła pochodzących od aparatury laboratoryjnej znajdującej się poza układem jak np. diod kontrolnych zasilaczy i komputerów, światła monitora itp. Ponadto w czasie eksperymentów z adaptacją do

ciemności monitor komputera, który obsługiwał eksperyment był przykrywany czerwoną półprzezroczystą folią.

3.1.7 Oprogramowanie systemu

Dedykowane oprogramowanie utworzone w LabView (National Instruments) automatyzowało pracę systemu. Program ewoluował w miarę zmieniających się potrzeb. Umożliwiał:

- synchronizację działania podzespołów systemu w czasie,
- akwizycję danych (zapis obrazów źrenicy z kamery, zapis mocy mierzonych przez optyczne mierniki mocy),
- automatyczne ustawianie zadanych mocy poszczególnych wiązek,
- automatyczną zmianę zbieżności wiązek w płaszczyźnie źrenicy poprzez ruch soczewką L7,
- wyświetlanie na siatkówce wybranych kształtów generowanych/rysowanych przez skanery,
- ruch soczewek L3 i L7 oraz filtrów gradientowych NVD1 i NVD przez uczestnika badania poprzez użycie rolki myszy komputerowej,
- automatyczne zebranie charakterystyki podziału mocy między miernikiem wewnętrznym (PM_{in}) a miernikiem umieszczonym w płaszczyźnie źrenicy (PM_{out}).

Zaimplementowano protokoły do przeprowadzenia poszczególnych eksperymentów tj. procedury pomiaru progów czułości strategiami MoA i 4-2-1, procedurę dopasowywania jasności bodźców podczerwonego i widzialnego, procedurę rejestracji reakcji źrenicy na bodziec świetlny, procedurę pomiaru pomiarów progów czułości w zależności od zbieżności wiązek podbudzających.

3.1.8 Kalibracja wielkości kątowej bodźca od napięcia na skanerach

O rozmiarze kształtu bodźca wyrysowywanego na siatkówce decydują kąty wychylenia wiązki przez skanery determinowane przez napięcia podawane na skanery i soczewki teleskopu między skanerami a okiem badanego (Rys. 3.1.14). W celu przeliczenia napięć na wielkości kątowe przeprowadzono kalibrację. Polegała ona na ustawieniu linijki w znanej odległości od skanerów, a następnie zadawaniu napięć na skanery i notowaniu wielkości przesunięć na linijce. W ten sposób, z prostych zależności trygonometrycznych, można było przeliczyć zadane napięcie na kąty odchylenia wiązki od osi optycznej. Skończona apertura ścieżki optycznej (czysta apertura soczewki L7) ograniczała maksymalny kąt wychylenia skanerów względem osi optycznej układu równemu

$\left(\frac{\alpha_{skaner}}{2}\right)_{max} = \pm 4,4^\circ$, co odpowiadało wartości napięcia zadanego na skanery $V_{max} = \pm 1,46$ V.

By obliczyć kąt wiązki wchodzącej do oka w zależności od kąta wiązki odbijającej się od skanerów należało uwzględnić pomniejszenie $(M = \frac{f_8}{f_7})$ teleskopu, który sprzęgał płaszczyznę skanerów z płaszczyzną źrenicy zgodnie ze wzorem:

$$\alpha_{skaner} = M \cdot \alpha_{oko} \quad (3-6)$$

Uwzględniając maksymalny możliwy do osiągnięcia kąt skanerów α_{skaner} w omawianym układzie, maksymalny rozmiar kątowy bodźca α_{oko} wynosił:

- około 44° dla L8 o ogniskowej $f_8 = 30$ mm
- około 26° dla L8 o ogniskowej $f_8 = 50$ mm
- około 13° dla L8 o ogniskowej $f_8 = 100$ mm



Rys. 3.1.14 Zależności kątowe między kątem skanowania a kątem wiązki wchodzącej do oka. Fragment toru doprowadzającego wiązkę do oka: SS - skanery, teleskop złożony z soczewek L_7 i L_8 o ogniskowych odpowiednio f_7 i f_8 , α_{skaner} - kąt skanowania skanerów, $\alpha_{oko} = \alpha_8$ - kąt wiązki wchodzącej do oka (rozmiar kątowy bodźca w oku).

Zgodnie z oznaczeniami z Rys. 3.1.14 można zapisać proste zależności trygonometryczne:

$$\frac{S_7}{f_7} = \operatorname{tg} \frac{\alpha_{skaner}}{2} \quad (3-7)$$

$$\frac{S_8}{f_8} = \operatorname{tg} \frac{\alpha_8}{2} \quad (3-8)$$

$$S_7 = S_8 \quad (3-9)$$

$$f_7 \cdot \operatorname{tg} \frac{\alpha_{skaner}}{2} = f_8 \cdot \operatorname{tg} \frac{\alpha_8}{2} \quad (3-10)$$

By przeliczyć wartość kąta skanowania w oku na zadane na skanery napięcia uwzględniono, że maksymalne wychylenie skanera ograniczone przez czystą aperturę soczewki L_7 o $f_7 = 150$ mm ($S_7 = 11,43$ mm) wynosiło $\frac{\alpha_{skaner}}{2} = \pm 4,4^\circ$ dla napięcia $V = \pm 1,46$ V. W związku z

napięcie zadane na skanery $V = \pm 1$ V prowadziło do przesunięcia względem osi optycznej w płaszczyźnie S_7 równemu 7,82 mm. Uwzględniając te wartości w równaniu (3-7) po przekształceniu (3-10) otrzymujemy:

$$V = 19 \cdot \frac{f_8}{f_7} \cdot \operatorname{tg} \frac{\alpha_{oko}}{2} \quad (3-11)$$

Gdzie:

V – napięcie zadawane na skanery (V),

f_7 i f_8 – ogniskowe soczewek odpowiednio L7 i L8 (mm),

α_{eye} – rozmiar kątowy bodźca w płaszczyźnie źrenicy ($^\circ$).

3.1.9 Kalibracja podziału mocy P_{in}/P_{out} – współczynnik podziału

Kontrola mocy podczas pomiaru odbywała się poprzez pomiar mocy części wiązki odbijanej od dzielnika wiązki BS2. Dla każdego badanego, przed każdą sesją pomiarową, dokonywano pomiaru kalibracyjnego podziału mocy. Oprogramowanie zmieniało moc wiązki w układzie poruszając filtrem NVD 1 (dla wiązki widzialnej) lub NVD 2 (dla wiązek podczerwonych), a następnie zapisywało moce zmierzone za pomocą miernika wewnątrz układu (PM_{in}) i za pomocą drugiego miernika (PM_{out}) umieszczonego w miejscu oka (w płaszczyźnie źrenicy). Pomiar był wykonywany dla kilku położenia filtrów NVD obejmujących zakres mocy używanych podczas danego badania. Punkty te były następnie umieszczane na wykresie i znajdowano ich aproksymację liniową. Współczynnik kierunkowy aproksymacji był współczynnikiem podziału mocy użytym do przeliczania mocy mierzonej podczas badania na mierniku PM_{in} na moc padającą na oko.

Przykładowe wartości współczynników podziału mocy dla różnych ogniskowych ostatniej soczewki układu zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 3.1-2).

Tab. 3.1-2 Typowe wartości współczynników podziału mocy między mocą mierzoną miernikiem wewnętrznym a mocą mierzoną w płaszczyźnie źrenicy.

Ogniskowa soczewki L8	Wartość współczynnika podziału	
	IR (1040 nm)	VIS (520 nm)
30 mm	37.5	57
50 mm	38	39
100 mm	38	51

Główce mierników były zmieniane w zależności od wykorzystywanego przedziału długości fal. Były to odpowiednio dla zakresu do 1100 nm główce S130C jako PM_{in} i PM_{out} , a dla długości fal przekraczających 1100 nm główce S132C (Thorlabs) jako PM_{in} i główce S122C (Thorlabs) jako PM_{out} . Dodatkowo przeliczając moc padającą na oko w przypadku wiązki widzialnej należało uwzględnić osłabienie wprowadzane przez filtr F1 (Rys. 3.1.6) NE40A-A Thorlabs, które wynosiło $5,26 \cdot 10^{-5}$. Filtr ten był automatycznie umieszczany w torze wiązki, jeśli skanery kierowały światło lasera do oka (względy bezpieczeństwa).

3.1.10 Kalibracja przesuwu soczewki i dioptrii

Zerowym położeniem soczewki L7 było takie, przy którym wiązka IR była skolimowana. Przesunięcie soczewki od jej położenia zerowego powodowało zmianę zbieżności wiązki. Dostępny zakres przesuwu wynosił ± 17.5 mm. Do eksperymentów, w których badano wpływ zbieżności wiązki na progi widzenia konieczne było przeskalowanie przesuwu soczewki L7 na wprowadzaną przez ten przesuw zmianę zbieżności wiązki wyrażoną w dioptriach.

Kalibracji dokonano na cztery sposoby dla najczęściej używanego w pomiarach teleskopu 150-50: poprzez obliczenia, poprzez modelowanie w OSLO, poprzez pomiar z trzema soczewkami testowymi oraz na końcu potwierdzono doświadczalnie poprzez badanie osoby ze sparaliżowaną akomodacją.

Poniższy wzór (3-12) pozwala obliczyć położenie płaszczyzny obrazowej w oku w zależności od przesunięcia płaszczyzny obiektowej ostatniej soczewki systemu [24]:

$$s_{i\ o\ k\ o} = \frac{f_{o\ k\ o} \cdot d - \frac{f_{o\ k\ o} \cdot s_{o\ 8} \cdot f_8}{s_{o\ 8} - f_8}}{d - f_{o\ k\ o} - \frac{s_{o\ 8} \cdot f_8}{s_{o\ 8} - f_8}} \quad (3-12)$$

gdzie:

d – odległość między soczewkami teleskopu tworzonego, w rozważanym przypadku, przez ostatnią soczewkę układu L8 i soczewkę oka

$f_{o\ k\ o}$ – ogniskowa soczewki oka uwzględniająca współczynnik załamania całego oka (drugiej soczewki rozważanego teleskopu)

f_8 – ogniskowa soczewki L8 (pierwszej soczewki rozważanego teleskopu)

$s_{o\ 8}$ – odległość obiektowa dla układu dwóch soczewek

$s_{i\ o\ k\ o}$ – odległość obrazowa dla układu dwóch soczewek, odległość płaszczyzny obrazowej od soczewki

Poruszając soczewką L7 znajdującą się tuż przed rozważanym teleskopem powodujemy przesunięcie jej płaszczyzny obrazowej s_{i7} , która stanowi jednocześnie płaszczyznę

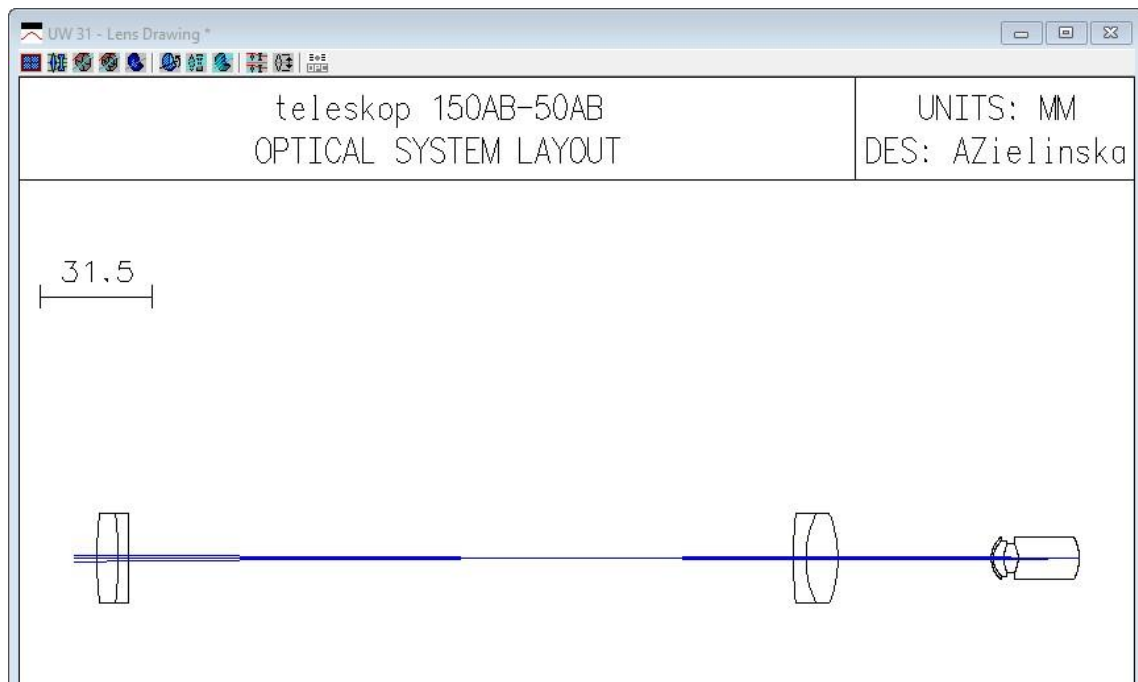
obiektywą soczewki L8 (s_{o8}). Uwzględniając zakres przesuwu soczewki L7 (± 17.5 mm) otrzymujemy odpowiednio dla różnych ogniskowych soczewek L8 zakresy przesuwu płaszczyzny obiektywnej s_{o8} . Uwzględniając ogniskową oka $f_{oko} = 17$ mm obliczamy zgodnie ze wzorem (1-1) jego moc optyczną jako 58,8235 D. Zgodnie z powyższym wzorem (3-12) możemy policzyć zmianę położenia płaszczyzny obrazowej w oku s_{ioko} i następnie przeliczyć ją na zmianę zbieżności wiązki w oku. Wyniki tych rozważań zestawiono w Tab. 3.1-3.

Tab. 3.1-3 Przesunięcia płaszczyzny obiektywnej soczewki L8 (s_{o8}) i powodowane nią zmiany położenia płaszczyzny obrazowej oka (s_{ioko}) i zmiany zbieżności wiązki w oku dla różnych soczewek L8.

f_8 (mm)	$s_{o8} \in \dots$ (mm)	$s_{ioko} \in \dots$ (mm)	zbieżność (D)
30	[12,5; 47,5]	[12,8; 25,4]	[-19,4; 19,4]
50	[32,5; 67,5]	[19,3; 15,2]	[-7,0; 7,0]
100	[82,5; 117,5]	[17,5; 16,5]	[-1,75; 1,75]

Drugim sposobem uzyskania przelicznika przesuwu soczewki L7 na dioptrie wiązki było modelowanie w OSLO. Zamodelowano 6 różnych teleskopów złożonych z używanych w eksperymentach soczewek L7 i L8 (modele pobrano ze strony producenta (Thorlabs)) oraz użyto modelowego oka Walkera. Zrzut ekranu z programu OSLO z zamodelowanym przykładowym układem przedstawia Rys. 3.1.15.

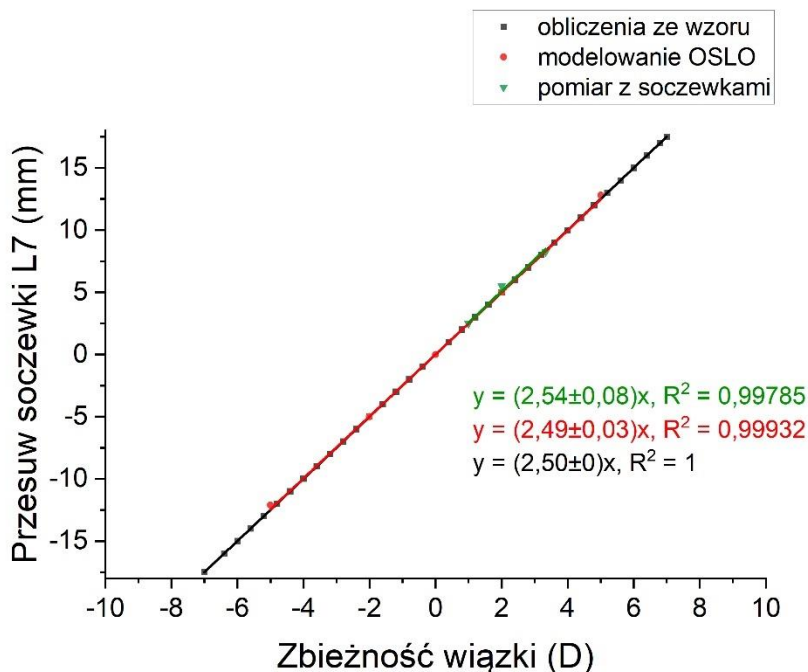
Dla wybranych wartości zbieżności wiązek wyrażonych w dioptriach przeprowadzono symulacje. Umieszczano soczewkę idealną o pożądanej mocy optycznej (np. 5 D) na rogówce modelu oka, a następnie przesuając soczewkę L7, szukano takiej odległości między soczewkami teleskopu, by wiązka wchodząca do oka skupiała się na jego siatkówce. Następnie usuwano soczewkę idealną otrzymując w ten sposób wiązkę o pożądanym stopniu zbieżności. Za pomocą narzędzia „Paraxial Gaussian Beam (ABCD)” obliczano wielkość plamki na płaszczyźnie siatkówki oka modelowego (teoretyczne wielkości średnic potrzebne do eksperymentu 4.2).



Rys. 3.1.15 Zrzut ekranu z programu OSLO przedstawiający zamodelowany teleskop 150AB-50AB oraz model oka Walkera.

W trzeciej procedurze kalibracyjnej wprowadzano w miejsce oka soczewkę testową o znanej liczbie dioptrii i znajdowano nowe położenie soczewki L7, przy którym wiązka wracała do równoległości obserwując ją w polu dalekim. Notowano przesuw (mm) w stosunku do pozycji zerowej, dla której wiązka była równoległa w układzie bez soczewek testowych. Pomiar wykonano dla trzech soczewek testowych o ogniskowych 300 mm (AC508-300-B-ML Thorlabs), 500 mm (LB-1869-B Thorlabs) i 1000 mm (LB-1409-B Thorlabs).

Zestawienie wyników trzech zastosowanych metod do kalibracji przesuwu soczewki L7 na dioptrie dla teleskopu 150AB-50AB przedstawiono na Rys. 3.1.15 Zrzut ekranu z programu OSLO przedstawiający zamodelowany teleskop 150AB-50AB oraz model oka Walkera..



Rys. 3.1.16 Wyniki obliczeń, symulacji i pomiarów przesuwu soczewki L7 ($f_7=50$ mm) i zmiany zbieżności wiązki. Na wykresie, odpowiednimi kolorami zapisano wyniki aproksymacji liniowych dla każdej z metod wraz z wartościami R^2 .

Na koniec przeprowadzono test na jednym ochotniku (kobieta, 30 lat) dla soczewki L8 o ogniskowej $f_8 = 50$ mm. Zastosowano paraliż akomodacji poprzez zakroplenie Tropicamidum 1 % i podczas działania kropli używano okulistycznych soczewek testowych umieszczanych przed okiem ochotnika, który miał za zadanie ustawić zbieżność wiązki poprzez przesuw soczewki L7. W wyniku tego testu oszacowano przelicznik na wartość 2,4 mm/D, co stanowi wynik bardzo zbliżony do wartości uzyskanych z obliczeń teoretycznych i testu z soczewkami.

Dla pozostałych rozważanych teleskopów przyjęto wartości współczynników z wyników symulacji i obliczeń jako równe:

- 0,92 mm/D dla L8 o ogniskowej $f_8 = 30$ mm
- 2,5 mm/D dla L8 o ogniskowej $f_8 = 50$ mm,
- 5 mm/D dla L8 o ogniskowej $f_8 = 100$ mm.

3.1.11 Kalibracja kamery

W celu określenia rozmiaru zarejestrowanej na zdjęciach źrenicy dokonano przeliczenia milimetrów na piksele poprzez wykonanie zdjęcia papieru milimetrowego. Analiza obrazu zebranego przez kamerę o rozmiarach 512 x 512 pikseli pozwoliła na oszacowanie

przelicznika jako 18 μm /piksel (55,6 pikseli/mm). Przelicznik ten wyznaczono dla ostatniej soczewki układu L8 o ogniskowej $f_8 = 50$ mm, która była najczęściej używana.

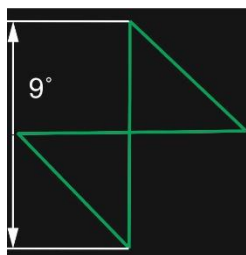
3.2 Procedury pomiarowe i przetwarzanie danych

Na początku każdego badania wykonywano czynności prowadzące do prawidłowego ustawienia oka pacjenta względem układu optycznego. Do stałych elementów każdej procedury należała również początkowa korekcja wady refrakcji badanej osoby dla używanych wiązek oraz ostre i centralne ustawienie punktu fiksacyjnego. Dla każdego z eksperymentów psychofizycznych wypracowano szczegółową procedurę pomiarową, by uzyskane w pomiarze wyniki były wiarygodne.

3.2.1 Korekcja wad refrakcji badanego oka

W zależności od eksperymentu korekcja refrakcji wiązki podczerwonej dokonywana była przez przesuwanie jednej z soczewek L5 lub L7 tak, by uzyskać ostry obraz wyświetlanego na siatkówce przez skanery kształtu - obróconej klepsydry (krzyżyka) jak na rysunku Rys. 3.2.1. Po znalezieniu odpowiedniej pozycji soczewki pacjent dokonywał w analogiczny sposób korekcji wzdłużnej aberracji chromatycznej LCA dla wiązki widzialnej (podrozdział 1.2.1) poprzez przesuw soczewki L4 lub L5. Położenia soczewek były zapamiętywane dla danego pacjenta tak, by podczas eksperymentu móc pobudzać siatkówkę wiązkami o zbieżności dostosowanej do wady pacjenta.

Korekcja refrakcji oka pacjenta dla punktu fiksacyjnego przeprowadzana była przez ręczne przesuwanie soczewki L13 przez operatora tak, by pacjent widział ostry obraz fiksacji.



Rys. 3.2.1 Kształt i rozmiar bodźca na siatkówce podczas procedury kompensacji wady refrakcji oka pacjenta.

Zmiana odległości soczewki L7 od płaszczyzny skanerów wpływała na zmianę efektywnych kątów skanowania. Jeśli soczewka znajdowała się bliżej skanerów niż dla oka emetropowego, to dla danego wychylenia skanerów kąt skanowania stawał się mniejszy, co skutkowało mniejszym rozmiarem kątowym wyświetlanego kształtu w płaszczyźnie źrenicy (tym samym mniejszym obrazem na siatkówce). Jeśli odległość soczewki L7 od płaszczyzny skanerów była większa niż dla oka emetropowego, to ten sam kąt wychylenia skanerów powodował większy rozmiar kątowy skanowanego kształtu w oku. Przykładowe

obliczenia dla zadanego na skanery kąta odpowiadającego rozmiarowi kątowemu bodźca w płaszczyźnie źrenicy $0,5^\circ$ (dla oka emetropowego) zestawiono w Tab. 3.2-1. Do obliczeń założono ogniskową soczewki L8 równą $f_8 = 50$ mm, do której przelicznik wady refrakcji na przesuw soczewki L7 wynosi 2,5 mm/D (podrozdział 3.1.10). Odległość między skanerami a soczewką L7 wykorzystano następnie do przeliczenia zadanego na skanery kąta na kąt wyjściowy w oku zgodnie z równaniem ((3-10). Obliczenia przeprowadzono dla oka emetropowego i dla różnych wad refrakcji z zakresu ± 6 D. Dla tych skrajnych wartości wad możliwych do skorygowania w zakresie przesuwu soczewki L7 wpływ zmiany położenia soczewki L7 na błąd rozmiaru bodźca na siatkówce wynosi około 10 %, dla wady ± 3 D wprowadzona zmiana rozmiaru nie przekraczała 5 %.

Tab. 3.2-1 Wpływ korekcji wady refrakcji (zmiany odległości skaner-soczewka L7) na wielkość kątową bodźców w płaszczyźnie źrenicy. Na pomarańczowym tle wartości dla oka emetropowego.

Wada refrakcji (D)	Odległość skaner-soczewka L7 (mm)	Wielkość kątowa bodźca ($^\circ$)	Wprowadzona zmiana rozmiaru (%)
6	168.75	0.5625	9.8
3	161.25	0.5375	4.9
2	158.75	0.5292	3.3
1	156.25	0.5208	1.6
0	153.75	0.5125	0.0
-1	151.25	0.5042	-1.6
-2	148.75	0.4958	-3.3
-3	146.25	0.4875	-4.9
-6	138.75	0.4625	-9.8

Zmiana położenia soczewki L5 powodowała zmianę długości teleskopu L5:L6 co wpływało na powiększenie wiązki. Dla przypadku, gdy $f_5 = 50$ mm pomierzono profilometrem zmianę rozmiaru w zależności od pozycji przesuwu soczewki L5. Dla wiązki widzialnej zmiana średnicy wiązki za teleskopem w odniesieniu do skolimowanego ustawienia teleskopu nie przekraczała ± 5 % przy przesuwie soczewki o $\pm 0,25$ cala ($\pm 6,35$ mm)

3.2.2 Adaptacja do ciemności

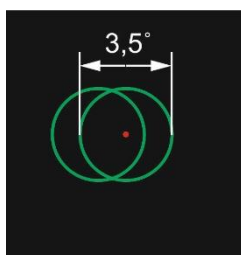
Adaptację do ciemności (regenerację rodopsyny do postaci aktywnej) przeprowadzano w wyciemnionym pomieszczeniu (zgaszone światła w laboratorium) z dodatkowo nałożoną na oboje oczu opaską. Adaptacja do ciemności trwała od 20 do 30 minut w zależności od stosowanych w przeprowadzanym badaniu standardów.

3.2.3 Ustawienie oka pacjenta i rejestracja obrazu źrenicy

Podczas każdego z eksperymentów operator kontrolował położenie źrenicy oka badanego – w oknie programu widoczny był podgląd źrenicy wraz z pionowymi znacznikami znaczącymi środek toru optycznego za ostatnią soczewką. Korekcja ustawienia pacjenta dokonywana była poprzez ruch zmotoryzowanym stolikiem (w kierunkach prawo-lewo, przód-tył), do którego przytwierdzony był podbródek okulistyczny oraz przy pomocy ruchu odpowiedniej śruby podbórdka (ruch w kierunku góra-dół). Podczas trwania pomiaru, operator dbał o to, by oko znajdowało się w odpowiedniej odległości od ostatniej soczewki układu optycznego oraz w odpowiedniej pozycji (osiowo). Przy prawidłowym ustawieniu uzyskiwano ostry obraz źrenicy w odległości ogniskowej ostatniej soczewki systemu L8.

3.2.4 Dobieranie jasności bodźca

Podczas procedury dopasowywania jasności bodźca, po sygnale dźwiękowym bloker B2 (Rys. 3.1.6) odślaniał wiązki IR i VIS i na siatkówce pacjenta wyświetlane były jednocześnie dwa przesunięte względem siebie okręgi (Rys. 3.2.2).



Rys. 3.2.2 Kształt i rozmiar bodźców na siatkówce podczas badań dopasowywania jasności. Wiązka VIS była przesunięta względem centralnie wyświetlanej wiązki IR o około 50' w lewo i o 25' w górę.

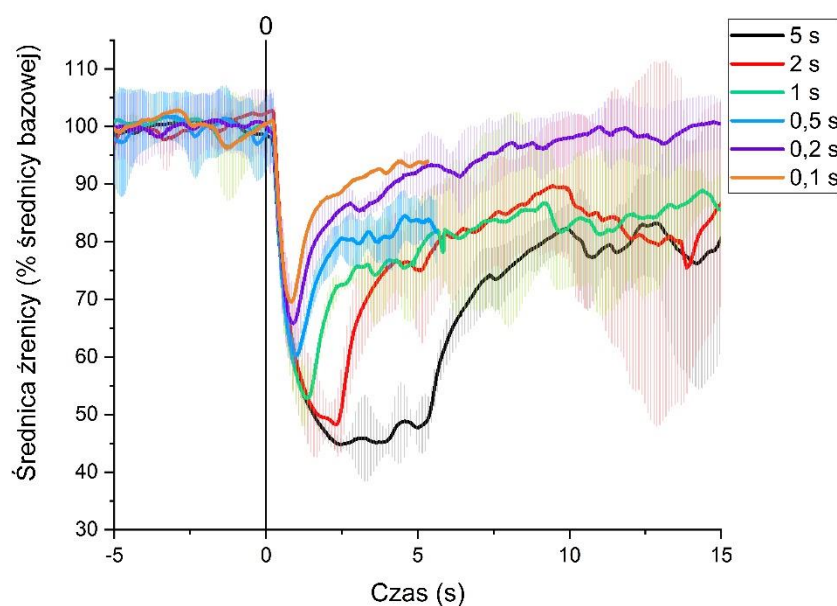
Moc okręgu IR była ustawiana automatycznie przez program na zadaną wartość. Dopasowania jasności wiązki VIS do IR dokonywano po jednym razie dla każdej z sześciu mocy wiązki podczerwonej, kolejno 100 μW , 160 μW , 250 μW , 400 μW , 600 μW i 800 μW (moce podane w płaszczyźnie źrenicy). Zadaniem pacjenta była zmiana za pomocą rolki myszy komputerowej (ruch filtrem NDV 1, Rys. 3.1.6) intensywności wiązki widzialnej 520 nm tak, by uzyskać taką samą jasność obu wiązek. W pierwszej iteracji krok, o który zmieniana była pozycja gradientowego filtra kołowego zmieniła moc o około 1,5 dB. Po kliknięciu przycisku myszy krok był automatycznie zmieniany 0,5 dB, co umożliwiało dokładniejsze dopasowanie jasności. Wartość mocy bodźca VIS zmierzona przez miernik wewnętrzny PM (Rys. 3.1.6) po tym kroku zapisywana była jako równoważna jasnością do danej mocy IR. Następnie program automatycznie ustawiał kolejną moc wiązki podczerwonej.

3.2.5 Analiza danych dopasowania jasności bodźców

Moce zapisywane do pliku tekstowego podczas tej procedury były mocami mierzonymi przez miernik wewnętrzny PM (Rys. 3.1.6). Współczynnik podziału mocy między miernikiem wewnętrznym a płaszczyzną źrenicy (3.1.9) mierzony był każdorazowo przed pomiarem lub bezpośrednio po nim. W ramach analizy danych przeliczano moce padające na oko dla wiązki podczerwonej i widzialnej. Następnie wykreślano punkty pomiarowe w skali logarytmicznej i aproksymowano je liniowo.

3.2.6 Pomiary reakcji źrenicy na bodźce podczerwony i widzialne

Przed pomiarami właściwymi przeprowadzono badania wstępne na jednej osobie, które miały na celu porównanie odpowiedzi źrenicy na bodźce widzialne o różnym czasie trwania i wybór optymalnego do dalszych badań. Wybrano czasy trwania bodźca: 0,1 s, 0,2 s, 0,5 s, 1 s, 2 s oraz 5 s. Dla każdego czasu trwania bodźca przeprowadzono po trzy próby, które następnie uśredniono w oprogramowaniu ORIGIN. Podmiot był adaptowany do ciemności przez 10 minut. Przerwy pomiędzy kolejnymi bodźcami wynosiły 2 minuty. Badania przeprowadzono dla bodźca 520 nm o kształcie spirali o rozmiarze jak na Rys. 3.2.5. wyniki tych prób przedstawia Rys. 3.2.3.



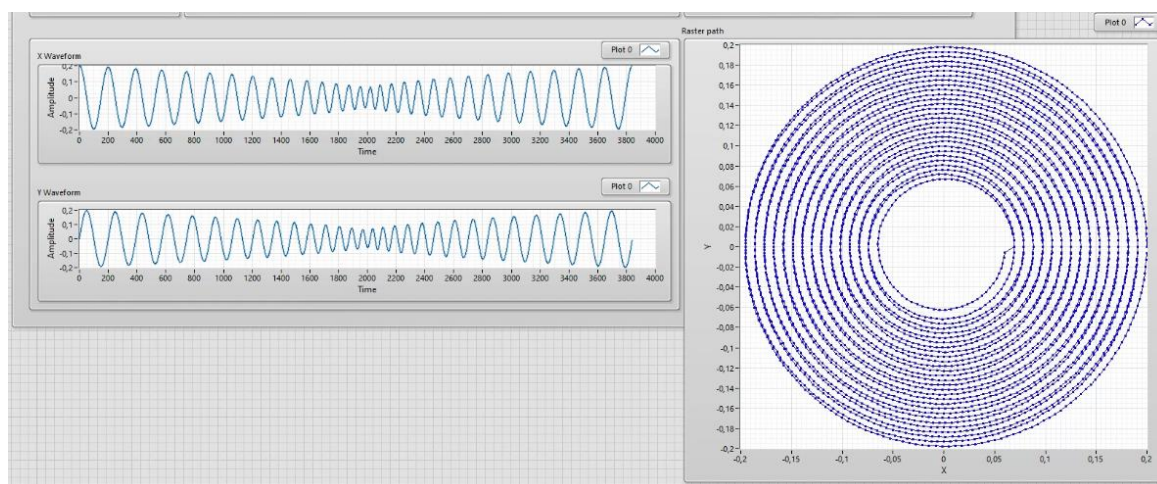
Rys. 3.2.3 Reakcje źrenicy jednego ochotnika na bodźce o różnym czasie trwania zgodnie z legendą. Każda krzywa jest uśrednieniem trzech pomiarów. Słupki wyznaczają jedno odchylenie standardowe.

Bodziec o najdłuższym czasie trwania (5 s) powodował największą reakcję źrenicy. Była ona jednak wielkością podobna do bodźca o czasie trwania 2 s (44 % vs 48 %). Bodziec 5 – sekundowy powodował dodatkowo utrzymywanie się skurczu źrenicy co potencjalnie

mogło być źródłem trudności w jednoznacznym określaniu minimalnej średnicy źrenicy. Bodźce o krótszym czasie trwania powodowały słabsze reakcje.

Po analizie tych wyników zdecydowano się wybrać czas trwania bodźca równy 2 s.

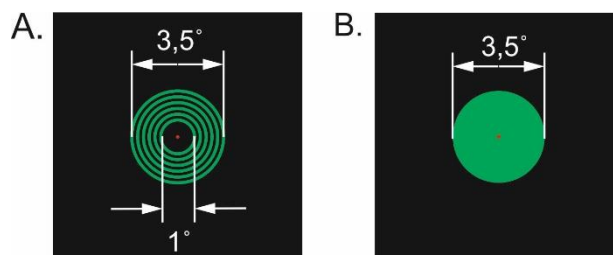
W standardowych badaniach reakcji źrenicy używane są ciągłe źródła światła np. monitory, których obraz pada na dużą powierzchnię siatkówki. W przypadku widzenia dwufotonowego konieczne jest stosowanie impulsowych wiązek laserowych skupionych na siatkówce. Kształt uzyskiwany przez szybkie skanowanie siatkówki dobrano tak, by był on możliwie jak najbardziej podobny do standardowego pobudzenia stosowanego w badaniach reakcji źrenicy [19]. Trajektoria skanerów tworzyła spiralę o wybieranej przez operatora średnicy zewnętrznej, wewnętrznej oraz liczbie pierścieni tworzących spiralę. Wielkości napięć podawanych na skanery dobrano tak, by średnice były odpowiednio równe około $3,5^\circ$ i $1,0^\circ$ (co zgodnie ze wzorem (3-11) odpowiadało napięciom 0,2 V i 0,06 V) a liczbę okręgów ustalono na 15. Napięcia podawane na skanery X i Y oraz wynikowa trajektoria wiązki przedstawione są na rysunku (Rys. 3.2.4). Częstotliwość powtarzania trajektorii wynosiła 50 Hz. W czasie trajektorii spirala była generowana dwukrotnie (od zewnątrz do środka i od środka na zewnątrz), w związku z czym częstotliwość repetycji bodźca wynosiła 100 Hz.



Rys. 3.2.4 Ścieżki skanerów, po lewej: przebieg napięciowy podawany na skanery X i Y, po prawej: kształt wyrysowywany przez skanery.

Wybrany czas trwania i kształt bodźca zastosowano dla wiązek podczerwonej (1040 nm) i widzialnej (520 nm) o subiektywnie dobranej takiej samej jasności (zgodnie z procedurą opisaną w 3.2.4). Dodatkowo badano również reakcję źrenicy na trzeci typ pobudzenia - zieloną diodę LED, aby sprawdzić czy pobudzenie zieloną diodą LED powoduje inną reakcję źrenicy niż pobudzenie skanującą widzialną wiązką laserową o zbliżonym kolorze i tej

samej mocy mierzonej w płaszczyźnie źrenicy. Rys. 3.2.5 przedstawia kształt bodźców na siatkówce używanych w eksperymentach z badaniem reakcji źrenicy.



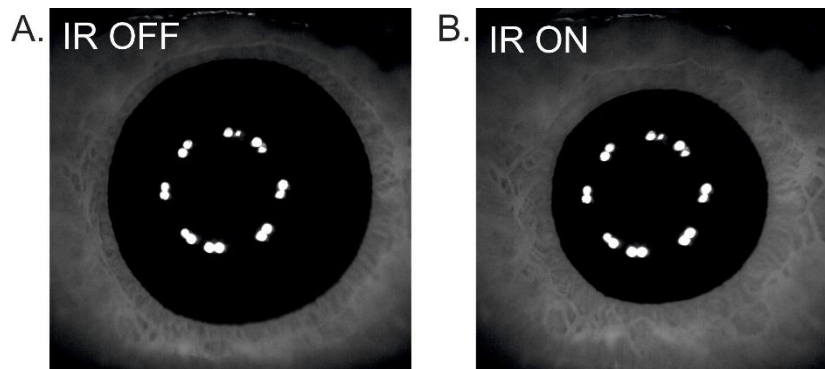
Rys. 3.2.5 Kształty bodźców w pomiarach reakcji źrenicy: (A) spirala w przypadku pobudzenia wiązką IR oraz VIS i (B) koło w przypadku pobudzenia zielonym światłem LED.

Moc bodźca podczerwonego mierzona w płaszczyźnie źrenicy wynosiła $800 \mu\text{W}$. Odpowiada to strumieniowi fotonów na siatkówce $17,5 \log \text{ fot}/(\text{cm}^2\text{s})$, przy założeniu równomiernie oświetlonego obszaru siatkówki o średnicy koła $3,5^\circ$ i 70 % transmisji dla 1040 nm w ośrodku ocznym [139]. Ekwiwalentną jasnością moc bodźca widzialnego była przeliczana indywidualnie dla każdego badanego na podstawie jego indywidualnej krzywej dopasowania jasności. Wynosiła ona średnio $266 \text{ pW} \pm 58 \text{ pW}$ (jedno odchylenie standardowe) w płaszczyźnie źrenicy (podrozdział 1174.1), co odpowiadało strumieniowi fotonów w siatkówce około $10,8 \pm 0,1 \log \text{ fot}/(\text{cm}^2\text{s})$ przy założeniu 80 % transmisji dla 520 nm w oku [140]. Moc bodźca utworzonego przez diodę LED ustawiano na taką samą wartość jak stojącej laserowej wiązki widzialnej.

By uniknąć wpływu zmęczenia pacjenta na wynik badania zastosowano naprzemienne pobudzanie każdym rodzajem bodźca. Rejestracja obrazów źrenicy rozpoczynała się 10 sekund przed włączeniem 2 s bodźca a kończyła 60 s po jego ustaniu. Zadaniem osoby badanej było wpatrywanie się w punkt fiksacji i unikanie mrugania w krytycznym czasie badania, tj. kilka sekund przed i po prezentacji bodźca. Po próbie dla danego pobudzenia następowała chwila przerwy, podczas której pacjent nadal przebywał w stanie adaptacji do ciemności. Mógł on zależnie od potrzeb zdjąć głowę z podbródka lub pozostawić ją opartą, swobodnie zamykać oczy i nimi ruszać. Pierwszy pomiar PLR był zawsze odrzucany z analizy zgodnie z zaleceniami opisanymi w standardach przez Kelbsch i współautorów [19].

3.2.7 Analiza danych z eksperymentu reakcji źrenicy

Przykładowe zdjęcia uzyskane w pomiarach reakcji źrenicy przedstawia Rys. 3.2.6. Pierścień 16 punktów w obrębie obrazu źrenicy jest utworzony przez odbicia diod oświetlających na powierzchni zewnętrznej rogówki (tzw. pierwsze odbicie Purkiniego).



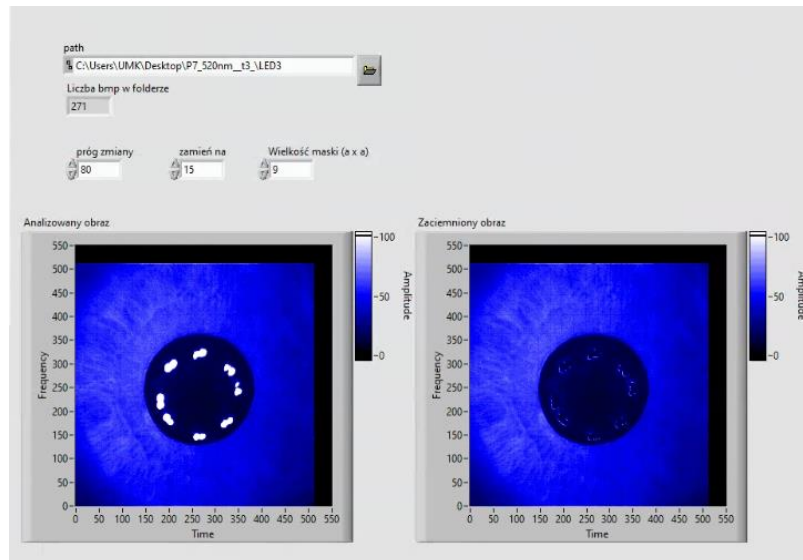
Rys. 3.2.6 Zdjęcia źrenicy otrzymane w wyniku eksperymentu. Przykładowe klatki kamery zebrane przy A. wyłączonym i B. włączonym bodźcu laserowym.

W analizie wstępnej program LabView usuwał identyczne klatki (zdarzało się, że kamera nie zdążyła odświeżyć obrazu do zapisu). Jego działanie polegało na sumowaniu tablicy wartości bezwzględnych różnic odpowiadających sobie pikseli dwóch obrazów. Jeśli suma ta wynosiła zero to powtarzająca się klatka z późniejszą godziną zapisu była usuwana.

W następnym kroku usuwane były klatki, na których badany przymykał powiekę, co uniemożliwiało lub (w przypadku częściowego zasłonięcia obrazu źrenicy przez powiekę) utrudniało określenie rozmiaru źrenicy przez algorytm. Program ten sumował wartości pikseli w części obrazu, w której pojawiała się górna powieka. Jeśli suma ta była większa od ustalonej wartości obraz był usuwany z analizy.

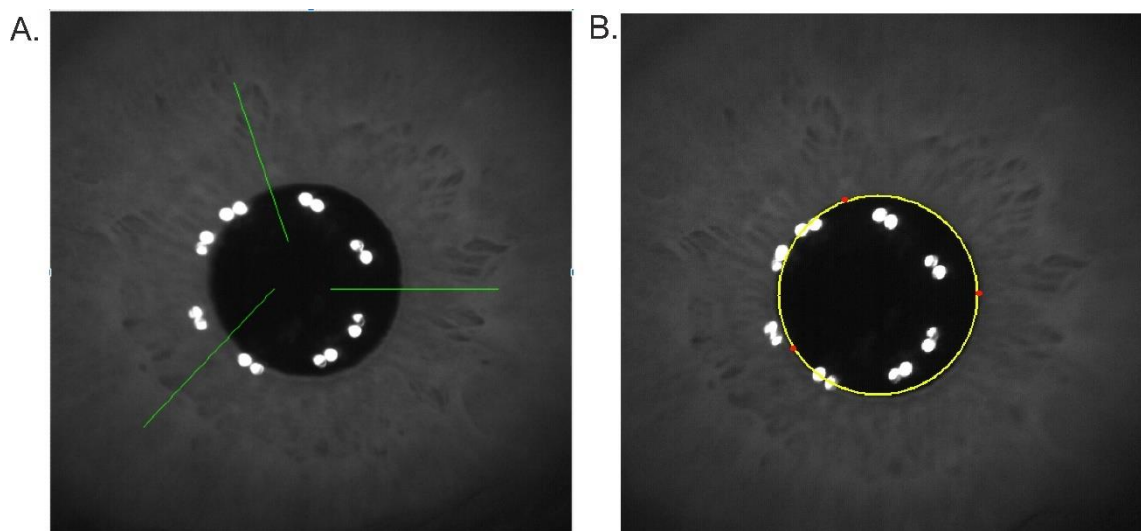
Po tak przeprowadzonej obróbce wstępnej średnicę źrenicy dla każdego zarejestrowanego obrazu wyznaczono za pomocą osobnego oprogramowania przygotowanego w Pythonie, opisanego szczegółowo w pracy [141]. Algorytm wyznaczał średnicę źrenicy na każdym zdjęciu, określał SD tej średnicy i zapisywał dane do pliku tekstowego przypisując im czas w odniesieniu do czasu włączenia bodźca.

W przypadku ochotników, których źrenica reagowała silnie, krawędź źrenicy leżała blisko obrazu odbić oświetlacza na rogówce i program Python nie był w stanie poprawnie dopasowywać okręgów na obrazach, na których widoczne było maksymalne zwężenie źrenicy. Dla takich zdjęć napisano dodatkowy autorski program w LabView służący do wycinania odbić oświetlacza - jasne piksele powodowane odbiciami oświetlacza zamieniane były na ciemniejsze - w kolorze zbliżonym do koloru źrenicy. Wynik działania tego programu dla ochotnika P7, którego reakcje na wiązkę widzialną były bardzo duże - przedstawiono na Rys. 3.2.7



Rys. 3.2.7 Zrzut panelu frontowego programu do usuwania jasnych pikseli oświetlacza. Po lewej - zdjęcie oryginalne, po prawej zdjęcie z zaciemnionymi odbłaskami diod oświetlających.

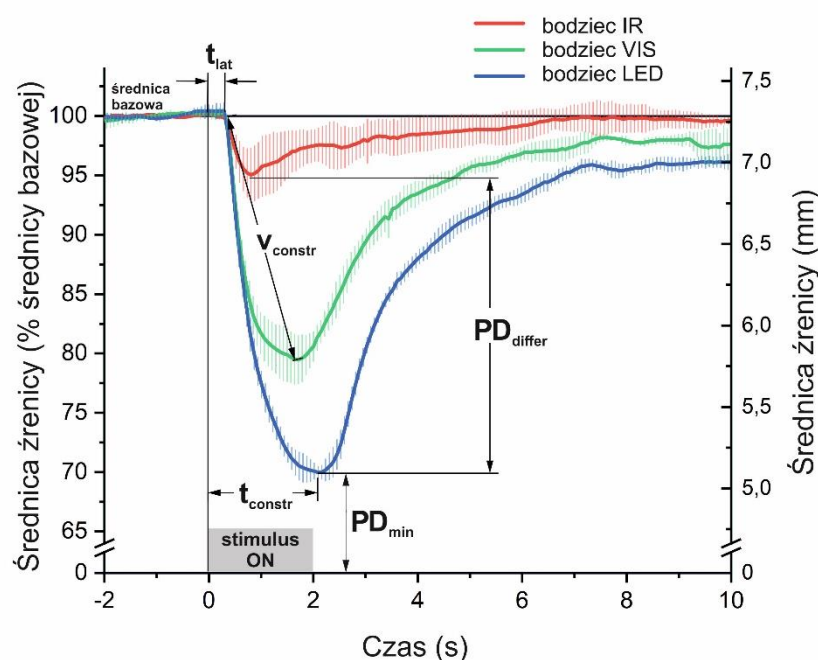
Mimo zastosowanych poprawek program napisany w języku Python nie był w stanie prawidłowo określić średnicy źrenicy w przypadkach, gdy jej rozmiar był mniejszy od średnicy pierścienia utworzonego przez odbijające się od rogówki podczerwone diody oświetlające. Dla takich zdjęć zastosowano inny autorski program w LabView, który wzdłuż ręcznie zdefiniowanych na obrazie odcinków wyszukiwał krawędź źrenicy i na podstawie znalezionych punktów krawędziowych dopasowywał okrąg do źrenicy. Rys. 3.2.8 przedstawia przykładowe zdjęcie źrenicy wraz z wybranymi ręcznie odcinkami oraz to samo zdjęcie z trzema wyznaczonymi przez program czerwonymi punktami krawędzi i żółtym okręgiem dopasowanym do źrenicy.



Rys. 3.2.8 Przykładowy obraz źrenicy w przypadku, gdy jej wielkość jest zbliżona do odbić od rogówki oświetlacza: A. Wyznaczone zielone linie, wzdłuż których wyszukiwana jest krawędź źrenicy, B. Znalezione przez program czerwone punkty wyznaczają krawędzie, na żółto dopasowany do obrazu źrenicy okrąg.

Program napisany w języku Python jako dane wyjściowe zapisywał w pliku .csv szereg parametrów przypisanym każdemu obrazowi (m.in. czas klatki, średnicę źrenicy wyznaczoną dwiema metodami, współrzędne środka, odchylenie SD wyznaczonej średnicy, status włączenia lasera, czas danej klatki względem czasu włączenia lasera). W kolejnym kroku analizy danych program LabView usuwał z pliku tekstowego te wiersze danych, w których SD było większe od 5 (co wskazywało na błędne dopasowanie okręgu do źrenicy), pozostawiał wybrane dane z pięciu kolumn z pliku wyjściowego .csv (Time [s] – czas liczony od momentu włączenia bodźca, Pupil diameter [px] – średnica źrenicy, Circle center X [px] – współrzędna X środka źrenicy, Circle center Y [px] - współrzędna Y środka źrenicy, SD [px] – odchylenie SD wyznaczonej średnicy źrenicy) oraz zapisywał dane dla danego pacjenta w uporządkowanych plikach tekstowych (dla każdego pacjenta tworzył trzy pliki – dla każdego z rodzajów pobudzenia – z zapisanymi uporządkowanymi danymi z poszczególnych prób).

Uzyskane dane liczbowe poddano dalszej analizie w programie Origin w celu wyznaczenia parametrów PLR przedstawionych na Rys. 3.2.9.



Rys. 3.2.9 Przykładowy przebieg źrenicznego odruchu świetlnego (PLR) ze zdefiniowanymi parametrami wyznaczanymi podczas analizy danych. Każda krzywa jest średnią z trzech pomiarów, słupki błędów wskazują odchylenie standardowe. Określono następujące parametry PLR: t_{lat} – czas latencji (s), t_{constr} – czas maksymalnego zwężenia (s), v_{constr} – średnia prędkość zwężenia (mm/s), PD_{min} – minimalna średnica źrenicy względem linii podstawowej (%), PD_{differ} – różnica w minimalnej średnicy źrenicy pomiędzy bodźcami lasera IR i VIS LED (%).

Bazowa średnica źrenicy (wartość 100 % na Rys. 3.2.9) została obliczona jako średnia średnica z czasu 2 s przed bodźcem. Względną średnicę źrenicy RPD (ang. *Relative Pupil Diameter*) w danym czasie t odniesiono do wartości wyjściowej według następującego wzoru:

$$RPD(t) = \frac{APD(t)}{BPD} \times 100\% \quad (3-13)$$

gdzie:

APD (ang. *Absolute Pupil Diameter*) – bezwzględna średnica źrenicy w danej chwili czasu (mm lub piksele)

BPD (ang. *Baseline Pupil Diameter*) – bazowa średnica źrenicy policzona z 2 s przed bodźcem (mm lub piksele)

Czas latencji (t_{lat}) wyznaczano ręcznie jako czas od początku bodźca do początku wyraźnego spadku średnicy źrenicy. Minimalna średnica źrenicy (PD_{min}) dla danej próby to pierwsze minimum występujące po włączeniu bodźca. Czas maksymalnego zwężenia (t_{constr}) to czas upływający od włączenia bodźca (czas = 0 s) do osiągnięcia minimalnej średnicy źrenicy. Średnia prędkość zwężenia (v_{constr}) została obliczona według wzoru:

$$v_{constr} = \frac{BPD - PD_{min}}{t_{constr} - t_{lat}} \quad (3-14)$$

Ze względu na dużą zmienność międzyosobniczą odpowiedzi źrenic po każdym rodzaju bodźca, określono również różnicę w minimalnej średnicy źrenicy (PD_{differ}). Została ona obliczona jako różnica pomiędzy minimalnymi średnicami źrenic dla każdej pary bodźców.

3.2.8 Badanie progów widzenia (4-2-1, MoA)

Przy użyciu LabView zaimplementowano metody pomiarów progów widzenia 4-2-1 i MoA opisane w podrozdziale 1.4.2. Zaadaptowany do ciemności lub jasności pacjent podczas pomiaru patrzył na centralnie umieszczony punkt fiksacyjny. Moce progowe rejestrowane przez miernik mocy PM (Rys. 3.1.6) były zapisywane do pliku tekstowego. Przeprowadzana procedura kalibracji podziału mocy (3.1.9) pozwalała na przeliczanie wartości mocy progowych na oko. Bodźcem był skanowany kształt migającego okręgu o średnicy $0,5^\circ$ (200 ms wyświetlanie bodźca, 600 ms przerwy). Krok obrotu filtra w metodzie MoA wynosił 3° ,

a po znalezieniu progu filtr automatycznie obracał się o 15° w górę (w procedurze „od góry”) lub dół (w procedurze „od dołu”).

3.2.9 Uczestnicy badań

Wszystkie stosowane protokoły badań były zgodne z Deklaracją Helsińską i zostały zatwierdzone przez Komisję Etyczną Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Uczestnicy byli informowani o charakterze eksperymentu, potencjalnym ryzyku z nim związanym, możliwości przerwania badania w dowolnym momencie na ich prośbę i podpisywali formularz zgody. Wszystkie badania przeprowadzono zgodnie z polską normą bezpieczeństwa PN EN 60825-1:2014 oraz normą ANSI Z136.1-2014.

3.2.10 Normy bezpieczeństwa w pomiarach widzenia dwufotonowego

Ochronę ludzkiego oka przed promieniowaniem laserowym reguluje norma ANSI Z136.1-2014 [140], która pozwala na określenie progów uszkodzeń dla różnych kombinacji długości fali, czasu ekspozycji i wielkości plamki na siatkówce. Przegląd i weryfikacja norm powiązane są z ich ciągłym uaktualnianiem. Norma polska PN EN 60825-1:2014 [142] jest zgodne z normą ANSI. Delori ze współautorami w swojej pracy [139] (2007) przedstawiają praktyczną interpretację tych norm w odniesieniu do urządzeń okulistycznych i badań wzroku, w których intencjonalnie wprowadzamy do oka wiązki laserowe, a ruchy oczu lub głowy są ograniczone.

Norma [140] wskazuje na trzy mechanizmy prowadzące do uszkodzeń siatkówki spowodowanych ekspozycją na światło: termiczne, termoakustyczne i fotochemiczne. Jak podaje, uszkodzenie termiczne jest związane z absorpcją światła przez melaninę w warstwie RPE, która prowadzi do wzrostu temperatury i denaturacji białek. Rozpraszanie ciepła w czasie ekspozycji poza naświetlany obszar siatkówki występuje dla ekspozycji dłuższych niż 20 s. W takim przypadku energia potrzebna do wywołania uszkodzenia siatkówki jest zależna od czasu trwania ekspozycji ($\sim t^{0,75}$). Dla ekspozycji krótszych rozpraszanie ciepła uznaje się za pomijalne, a energia wywołująca uszkodzenia siatkówki nie zależy od czasu trwania ekspozycji. Uszkodzenia termoakustyczne związane są z mechanizmami nieliniowymi (jak np. podział indukowany laserem, samoogniskowanie) i występują w przypadku krótszych impulsów – o czasie trwania poniżej 1 ns. Do wywołania takich uszkodzeń wystarcza mniejsza energia niż w przypadku dłuższych impulsów. Trzeci rodzaj uszkodzeń – uszkodzenia fotochemiczne – dotyczy czasów ekspozycji powyżej 1 s i krótszych długości fal. Energia powodująca uszkodzenia fotochemiczne jest niezależna od czasu ekspozycji. Źródła uszkodzeń tego typu upatruje się

w fotooksydacyjnym uszkodzeniu fotoreceptorów i pigmentów lipofuscyny w warstwie RPE.

Opisane w pracy Deloriego [139] sposoby liczenia bezpiecznych poziomów promieniowania sugerują dwa podejścia do wiązek skanujących, które zwykle stosowane są w skaningowym oftalmoskopie laserowym (SLO). W pierwszym, cały obrazowany przez SLO obszar siatkówki jest traktowany tak, jakby był równomiernie oświetlony. W drugim podejściu wiązka SLO poruszając się po prostokątnym rastrze, odwiedza to samo miejsce na siatkówce w trakcie każdego kolejnego skanu. W związku z tym takie oświetlenie można traktować, jak oświetlenie siatkówki impulsowym laserem o częstotliwości repetycji równej częstotliwości repetycji zbierania kolejnych obrazów SLO, a czasie trwania impulsu powiązanym z szybkością odprowadzania ciepła przez tkankę. Obydwa te podejścia pozwalają na zwiększenie bezpiecznego limitu ekspozycji w stosunku do sytuacji, gdybyśmy rozpatrywali stacjonarną wiązkę laserową. W przedstawianych w niniejszej rozprawie badaniach używano impulsowych laserowych wiązek światła skanujących siatkówkę po różnych kształtach, zależnie od procedury. Z uwagi na niewielkie rozmiary skanowanych obszarów zdecydowano o przyjęciu norm dla wiązek stacjonarnych i unieruchomionego oka. Podejście to jest bardziej restrykcyjne i pozostawia większy margines bezpieczeństwa. W przypadku ekspozycji z użyciem powtarzających się impulsów (równomiernie rozłożonych w czasie, o równej energii) średnia moc promieniowania (Φ_{av}) określona jest wzorem:

$$\Phi_{av} = Q_1 F = \Phi_1 \delta \quad (W) \quad (3-15)$$

gdzie:

Q_1 – energia na impuls (J)

F – częstotliwość repetycji (Hz)

Φ_1 – moc szczytowa promieniowania pojedynczego impulsu prostokątnego (W)

δ – współczynnik wypełnienia ($\delta = Ft_1$, gdzie t_1 to czas trwania impulsu)

W przypadku impulsów innych niż prostokątne związek między mocą szczytową i średnią uwzględnia jeszcze stałą wynikającą z kształtu impulsu – 0,707 dla impulsów gaussowskich i 0,647 dla impulsów sech^2 [143].

Standardy ANSI w przypadku impulsowych wiązek laserowych definiują trzy reguły, z których każda wyznacza maksymalną dopuszczalną ekspozycję jako natężenie promieniowania na impuls [J/cm^2] lub średnią moc promieniowania ciągu impulsów [W]. Pierwsza reguła sprawdza bezpieczeństwo pojedynczego impulsu, druga – chroni przed nagromadzeniem ciepła z mocy średniej w uszkodzeniach termicznych i powodowanych

mechanizmami uszkodzeń fotochemicznych, a trzecia – chroni przed podprogowym, kumulującym impulsy uszkodzeniem termicznym. Limity definiowane przez te trzy reguły zależą od czasu trwania impulsu (t_1) i częstotliwości repetycji (F). Limit bezpiecznej mocy średniej wyrażony dla danego ciągu impulsów determinowany jest przez regułę, która daje najbardziej restrykcyjne ograniczenie.

Reguła trzecia mówiąca o uszkodzeniach fotochemicznych obowiązuje w zakresie długości fali 400 – 600 nm i przy używanej podczerwieni nie podlega rozważaniom. Przy częstotliwościach repetycji lasera rzędu MHz normy wskazują, że najbardziej restrykcyjne ograniczenie wynika z reguły drugiej dotyczącej mocy średniej.

Oko w naszych badaniach mimo stosowania wiązek podczerwonych, które wg normy nie są widziane przez oko i nie wpływają na jego stabilizację tak jak wiązka widzialna, jest stabilizowane przez użycie punktu fiksacyjnego, na którym pacjent stara się utrzymywać wzrok (stabilizowany obraz siatkówki). By uniknąć uszkodzeń termicznych maksymalna dopuszczalna ekspozycja (ang. *Maximum Permissible Exposure*, MPE) powinna być obliczona z czasem ekspozycji ograniczonym termicznie przez $T_2=10^4$ s.

Zgodnie z normami ANSI dla długości fali 1040 nm, czasu ekspozycji równego 3 min ($T = 180$ s), czasu trwania impulsu $t_1 = 260$ fs, częstotliwości repetycji $F = 76$ MHz stosujemy wzór na MPE przedstawiony niżej:

$$MPE_{\text{retina}} = 1,8 \cdot C_A \cdot C_E \cdot t^{0,75} \cdot 10^{-3} \left(\frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) \quad (3-16)$$

Wartość parametru $C_A = 10^{0,002(\lambda-700)}$ (Tabela 6a, ANSI 2014), co daje $C_A = 4,786$, a dla małych źródeł $\alpha < \alpha_{\text{min}} = 1,5$ mrad, wartość parametru $C_E = 1$ (Tabela 6b, ANSI 2014), stąd maksymalna dopuszczalna ekspozycja:

$$MPE_{\text{retina}} = 0,423 \left(\frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) \quad (3-17)$$

Dla średnicy źrenicy równej 7 mm (powierzchnia apertury ograniczającej $A_{\text{limiting aperture}} = 0,385 \text{ cm}^2$, Tabela 8c, ANSI 2014), dla czasu ekspozycji 180 s, przeliczamy:

$$MP\Phi_{\text{av}} = \frac{MPE_{\text{retina}} \cdot A_{\text{limiting aperture}}}{T} = \frac{0,423 \left(\frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) \cdot 0,385 (\text{cm}^2)}{180 (\text{s})} = 905 (\mu\text{W}) \quad (3-18)$$

Powyższy sposób obliczania obowiązuje dla stosowanych przez nas wiązek z zakresu 700 nm – 1050 nm. Dla zakresu 1050 nm – 1200 nm stosujemy wzór:

$$MP\Phi_{\text{retina}} = 9 \cdot C_C \cdot C_E \cdot t^{0,75} \cdot 10^{-3} \left(\frac{J}{\text{cm}^2} \right) \quad (3-19)$$

Przy czym dla zakresu długości fal 1050 nm – 1150 nm wartości parametrów są sobie równe: $C_C = C_E = 1$, a dla zakresu 1150 nm – 1200 nm odpowiednio $C_C = 10^{0,018(\lambda-1150)}$, a $C_E = 1$.

Dla wiązki widzialnej o długości fali 520 nm i czasów ekspozycji powyżej 100 s najbardziej restrykcyjnym ograniczeniem jest ograniczenie dawki luminancji (paragraf 8.3.3, ANSI 2014), które stanowi, że maksymalna dopuszczalna ekspozycja wynosi:

$$MPE_{\text{retina}} = \frac{5 \left(\frac{J}{\text{cm}^2} \right)}{V(\lambda)} \quad (3-20)$$

Dla 520 nm wartość $V(\lambda)=0,71$ (Aneks 1 norm), co daje wartość:

$$MPE_{\text{retina}} = \frac{5 \left(\frac{J}{\text{cm}^2} \right)}{0,71} = 7,04 \left(\frac{J}{\text{cm}^2} \right) \quad (3-21)$$

Rozmiar plamki na siatkówce, oblicza się stosując wzór 2 z [139] przyjmując ogniskową oka modelowego Gulstranda $f_e = 0,017 \text{ m}$ oraz obszar ekspozycji siatkówki $\alpha = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ rad}$:

$$A_{\text{retina}} = \frac{\pi}{4} \cdot (f_e \cdot \alpha_{\text{siatkówka}})^2 = 5,1 \cdot 10^{-6} \text{ (cm}^2\text{)} \quad (3-22)$$

Przechodząc z natężenia promieniowania na impuls $\left(\frac{J}{\text{cm}^2} \right)$ na średnią moc promieniowania ciągu impulsów, obliczamy:

$$MP\Phi_{\text{av}} = \frac{MPE_{\text{retina}} \cdot A_{\text{retina}}}{T} = \frac{7,04 \left(\frac{J}{\text{cm}^2} \right) \cdot 5,107 \cdot 10^{-6} \text{ (cm}^2\text{)}}{180 \text{ (s)}} = 199,7 \text{ (nW)} \quad (3-23)$$

W poniższej tabeli (Tab. 3.2-2) zestawiono maksymalne dopuszczalne moce średnie dla różnych czasów ekspozycji i wybranych długości fal.

Tab. 3.2-2 Maksymalne dopuszczalne moce średnie dla wybranych długości fal stosowanych w przeprowadzanych eksperymentach. Przy obliczaniu dopuszczalnych mocy pominięto skanowanie wiązek – założono wiązki stacjonarne na oku.

	Czas ekspozycji (min)	Długość fali (nm)								
		520	700	800	900	1000	1040	1050 - 1150	1175	1200
Maksymalna dopuszczalna moc średnia (W)	3	199 n	189 μ	299 μ	475 μ	753 μ	905 μ	945 μ	2,66 m	7,51 m
	5	119 n	166 μ	263 μ	418 μ	662 μ	796 μ	832 μ	2,34 m	6,61 m
	15	39 n	126 μ	200 μ	317 μ	503 μ	605 μ	632 μ	1,78 m	5,02 m
	30	19 n	106 μ	168 μ	267 μ	423 μ	509 μ	531 μ	1,49 m	4,22 m
	60	9 n	89 μ	141 μ	224 μ	356 μ	428 μ	447 μ	1,26 m	3,55 m

4. Przeprowadzone badania i otrzymane wyniki

4.1 Badania reakcji źrenicy na bodziec podczerwony postrzegany dwufotonowo

4.1.1 Motywacja i cel badań

Prowadzone dotychczas badania widzenia dwufotonowego opierają się na klasycznych metodach psychofizycznych percepcji wzrokowej, które bazują na informacjach zwrotnych od badanych osób. Cały czas poszukiwana jest obiektywna miara tego sposobu postrzegania. Reakcja źrenicy badanego jest jednym z obiektywnych wskaźników zdolności wykrycia bodźca przez pacjenta, niezależnym od procesów decyzyjnych badanego. Stewart ze współpracownikami jako pierwsi w swojej pracy [144] pokazali, że nawet dla małych bodźców ($1,2^\circ$ i $3,5^\circ$) na progu widzenia źrenica wykazywała słabą reakcję, gdy pacjent dostrzegał bodziec. Jako obiektywne testy pola widzenia bazujące na reakcji źrenicy pojawiającej się po spostrzeżeniu bodźca stymulującego niewielki obszar siatkówki wykorzystywane są również inne techniki – ang. *pupil campimetry* [145], [146] oraz ang. *chromatic pupillometry* [147], [148]. Tak więc informacja o zwężeniu źrenicy mogłaby być obiektywną miarą reakcji psychofizycznej na bodziec dwufotonowy i mogłaby uzupełnić dwufotonową perymetrię.

Ponadto wcześniejsze badania wykazały, że czopki i pręciki mogą być pobudzane w innym stopniu w widzeniu dwufotonowym niż w normalnym [118]. Różnica ta może być również uwidoczniła w reakcji źrenicy – w zależności od charakterystyki spektralnej, czasowej i przestrzennej bodźca oraz warunków adaptacji, różny jest stopień pobudzenia na poziomie komórkowym czopków i pręcików i różny udział sygnałów pochodzących od tych fotoreceptorów w odruchu źrenicznym [19].

Kolejnym ciekawym zagadnieniem jest pobudzanie ipRGC, które znajdują się w innej warstwie siatkówki niż czopki i pręciki (1.1.9). W widzeniu jednofotonowym rozproszenia i większe objętościowo ognisko mogą prowadzić do udziału sygnału pochodzącego z tych komórek w reakcji źrenicy. Wykonując eksperyment z pobudzeniem wiązką dwufotonową (absorpcja dwufotonowa zachodząca w małej objętości) mogliśmy sprawdzić, czy komórki te mogą uczestniczyć w percepcji tego rodzaju bodźców.

Ponadto źrenica stanowi naturalną zmienną aperturę ludzkiego oka i jest istotnym elementem urządzeń obrazujących i diagnostycznych. Reakcja źrenicy jest więc istotnym zagadnieniem z punktu widzenia konstrukcji urządzeń i opracowywania nowych metod diagnostycznych oka opartych na widzeniu dwufotonowym.

Celem doświadczeń w tej części pracy była odpowiedź na pierwsze z pytań postawionych na początku pracy – określenie czy źrenica reaguje na wiązkę podczerwoną postrzeganą

dwufotonowo. Jeśli tak, to ustalenie jak silna jest to reakcja oraz czy i w jaki sposób różni się od reakcji na wiązkę widzialną o takiej samej jasności i podobnym kolorze.

Fotometria pozwala na określenie jasności źródeł postrzeganych przez oko ludzkie. Krzywe luminancji (1.3.3) uwzględniają efektywność pobudzania układu wzrokowego przez poszczególne długości fal z zakresu widzialnego i określają ogólnie przyjętą uśrednioną czułość oka. Mechanizm postrzegania dwufotonowego i efekt wywierany przez promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni na układ wzrokowy, nie jest uwzględniony w tych krzywych, nie był badany i nie jest znany. Z tego powodu określenie jasności źródeł postrzeganych dwufotonowo nie jest możliwe przy zastosowaniu obecnych jednostek fotometrycznych. Celem pierwszej części tego eksperymentu było więc określenie jasności postrzegania dwufotonowego bodźca podczerwonego o mocy 800 μW .

4.1.2 Badana grupa

W badaniu brało udział 14 zdrowych ochotników (7 kobiet i 7 mężczyzn) w wieku od 20 do 42 lat (średnia wieku 30,7 lat, SD = 7,9 lat), z których każdy miał badane jedno, preferowane oko. Badani nie zgłaszali problemów ze wzrokiem. Wady refrakcji nie przekraczały 2,5 D, średnia wada refrakcji uczestników wynosiła -0,5 D, SD = 1,2 D. Uczestnicy mieli prawidłowe widzenie barw, co stwierdzono za pomocą wykonanych internetowo dwóch testów widzenia barwnego: 38 tablicowego testu Ishihary oraz testu dychotomicznego D-15 aranżacji kolorów „Color Arrangement Test”. Oba testy pochodziły ze strony [149]. Nie stosowano rozszerzania źrenic.

4.1.3 Procedura pomiarowa i metodologia badania

Pomiary przeprowadzano w godzinach 9 – 16 w warunkach skotopowych ($<0,1$ luksa). Rys. 4.1.1 przedstawia przebieg procedury eksperymentalnej. Przed głównym badaniem ochotnik w słabo oświetlonym pomieszczeniu (<2 luksy) dokonywał kompensacji wady refrakcji (podrozdział 3.2.1) i wykonywał procedurę treningową dopasowywania jasności bodźca widzialnego do bodźca dwufotonowego o ustalonej mocy. Następnie adaptował się do ciemności przez 20 minut. Po upływie tego czasu jedno preferowane oko było odsłaniane i przeprowadzane badanie właściwe dopasowywania jasności bodźca opisane szczegółowo w podrozdziale 3.2.4.

Moc podczerwonej wiązki pobudzającej trzymano poniżej poziomów określonych dla trzyminutowych ekspozycji dla impulsowych wiązek laserowych o długości fali 1040 nm – maksymalnie 800 μW (MP = 905 μW), a moc wiązki 520 nm (kilkaset pW) była o trzy rzędy wielkości mniejsza od obliczonej mocy MPE (199 nW) (patrz Tab. 3.2-2). Pojedyncze dopasowywanie jasności/intensywności wiązki widzialnej do pojedynczej

wartości mocy wiązki podczerwonej trwało ~1 minutę, a używane moce wiązek podczerwonych mieściły się w przedziale 100 μW – 800 μW . Podczas procedury bodźce laserowe były wyświetlane jednocześnie, ale ze względu na skanowanie i przesunięcie wiązki widzialnej (Rys. 3.2.2) nigdy nie znajdowały się w tym samym miejscu siatkówki w tej samej chwili czasu.

Po przeprowadzeniu testu dopasowywania jasności wiązki widzialnej do wiązki podczerwonej następował okres ok. 10-minutowej readaptacji osoby badanej, w czasie której operator ustawiał odpowiednie moce wiązki źródeł pobudzających do dalszej części eksperymentu (podane w rozdziale 3.2.6). Następnie wykonywano pomiary PLR wywołane przez trzy rodzaje stymulacji opisane szczegółowo w rozdziale 3.2.6.



Rys. 4.1.1 Przebieg procedury pomiarowej eksperymentów doboru jasności i badań reakcji źrenicy.

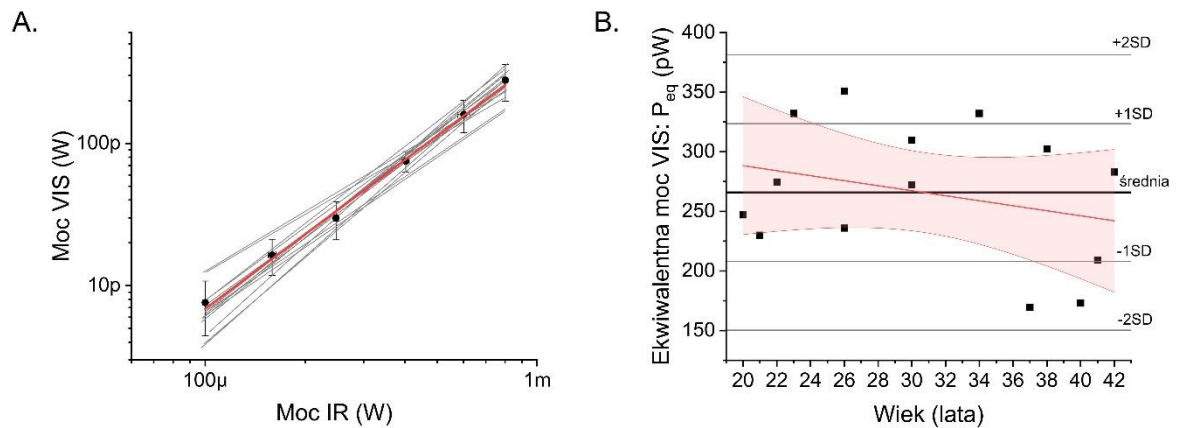
Analizę danych otrzymanych w wyniku eksperymentu opisano w rozdziale 3.2.7. Dla każdego badanego obliczono średnią wartość każdego parametru jako średnią z trzech oddzielnych prób dla danego bodźca, zarejestrowanych zgodnie z protokołem pomiarowym (Rys. 4.1.1).

4.1.4 Wyniki

Wyniki eksperymentu dopasowywania jasności przedstawione są na Rys. 4.1.2.A. Odpowiadające sobie jasnością moce przedstawiono w skali logarytmicznej. Aproksymacje liniowe dla wyników poszczególnych uczestników badania oznaczono przez szare linie. Czarnymi punktami oznaczono średnie dla 14 ochotników, a czerwoną linią ich aproksymację liniową. Słupki błędów odpowiadają jednemu odchyleniu standardowemu średniej. Średnia wartość współczynnika kierunkowego prostej wynosiła $1,7 \pm 0,1$ i jest istotnie różna od 1,0 wskazując na nieliniowy charakter postrzegania wiązki podczerwonej. Otrzymany wynik jest zgodny z rezultatami z pracy [118].

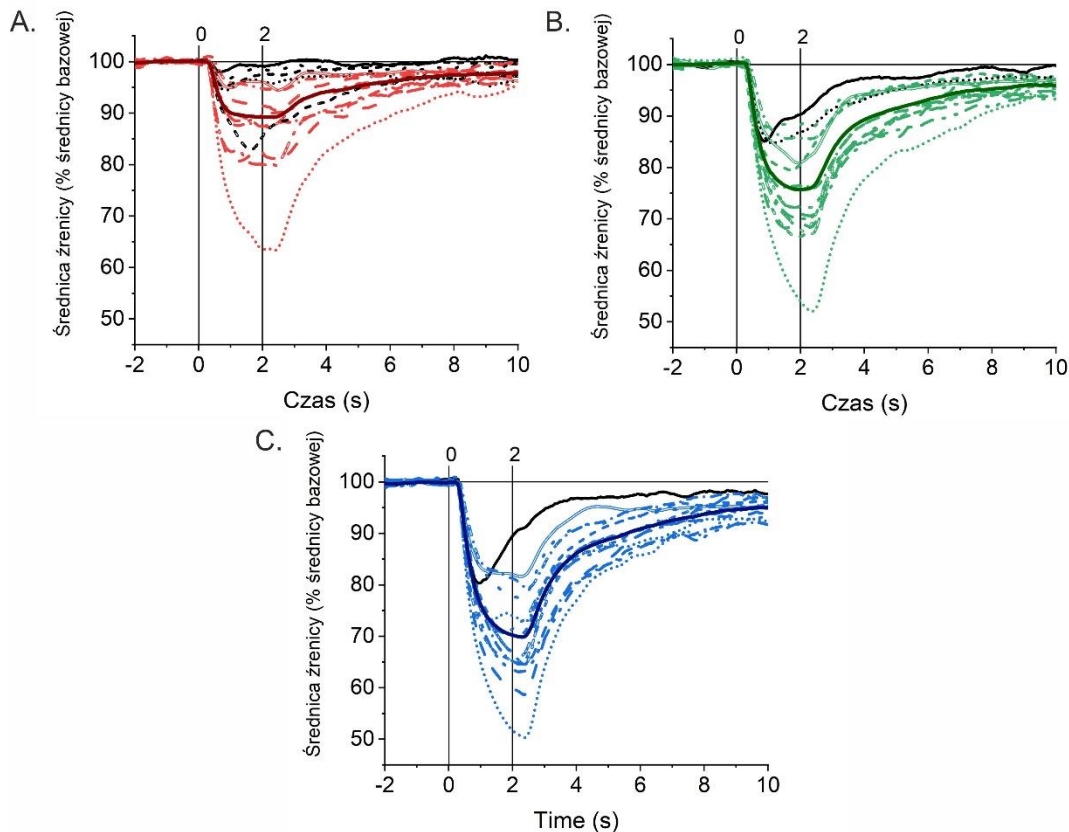
Nachylenia krzywych zostały również obliczone indywidualnie dla każdego ochotnika. Średnia z tych nachyleń wyniosła $1,7 \pm 0,3$. Moc wiązki widzialnej o jasności ekwiwalentnej do jasności wiązki podczerwonej (P_{eq}) o mocy 800 μW obliczono dla każdego ochotnika indywidualnie z jego współczynnika nachylenia aproksymacji liniowej sześciu punktów pomiarowych. Wykres na Rys. 4.1.2.B przedstawia moce ekwiwalentne wiązki widzialnej w funkcji wieku ochotników.

Średnia moc wiązki widzialnej (± 1 SD) odpowiadająca jasnością 800 μ W wiązki podczerwonej wynosi 266 pW \pm 58 pW w płaszczyźnie źrenicy. Wszystkie indywidualne wyniki mieszczą się w 95 % przedziale ufności ± 2 SD (test Grubbsa).



Rys. 4.1.2 A. Wyniki testu dopasowania jasności; średnia moc bodźca VIS dopasowana do określonej mocy bodźca IR - czarne kwadraty; słupki błędów - jedno odchylenie standardowe średniej; poziome słupki błędów (ledwo widoczne) wynikają z dokładności ustawienia mocy wiązki IR (z tolerancją 5 %); czerwona linia - dopasowanie liniowe, o współczynniku nachylenia $1,7 \pm 0,1$. Linie szare - liniowe dopasowanie dla każdego uczestnika. B. Moce VIS równoważne mocy IR 800 μ W (P_{eq}) dla 14 badanych jako funkcja wieku badanego, czarna pogrubiona linia ciągła to wartość średnia, szare linie oznaczają jedno i dwa odchylenia standardowe, czerwona linia jest aproksymacja liniową wyników wraz z 95 % granicami ufności oznaczonymi przez czerwone pole (współczynnik nachylenia prostej $-2,1 \pm 2,0$, współczynnik Pearsona $-0,29$ przy wartości współczynnika $p = 0,32$).

W pomiarach reakcji źrenicy dla każdego badanego uzyskano po trzy zestawy danych dla trzech rodzajów bodźców. Uśrednione fragmenty przebiegów obejmujące zakres czasowy (od -2 s do 10 s, gdzie $t = 0$ s oznacza chwilę włączenia bodźca) dla każdego ochotnika przedstawia Rys. 4.1.3.



Rys. 4.1.3 Krzywe PLR dla 14 badanych zarejestrowane po pobudzeniu: A. bodźcem laserowym IR, B. bodźcem laserowym VIS oraz C. bodźcem LED VIS. Bodziec był włączany w chwili $t = 0$ s. Każda krzywa jest uśrednieniem trzech prób badanej osoby oznaczonej tym samym stylem linii na każdym z wykresów. Na czarno zaznaczono te próby, które posiadają cechy tzw. „ucieczki źrenicy”. Pogrubione linie ciągłe są średnią ze wszystkich badanych.

We wszystkich trzech typach pobudzenia (Rys. 4.1.3) widzimy jednego badanego, który cechował się wyjątkowo silną reakcją źrenicy na bodźce (oznaczenie kolorowymi kropkami). Bodziec dwufotonowy u pięciu osób powodował tzw. „ucieczkę źrenicy” – źrenica zwiększała swoją średnicę jeszcze podczas trwania bodźca. Dla jednego badanego takie zachowanie źrenicy było obserwowane dla wszystkich typów pobudzeń (czarna linia ciągła), a dla drugiego badanego – dla pobudzeń wiązkami laserowymi (czarne kropki).

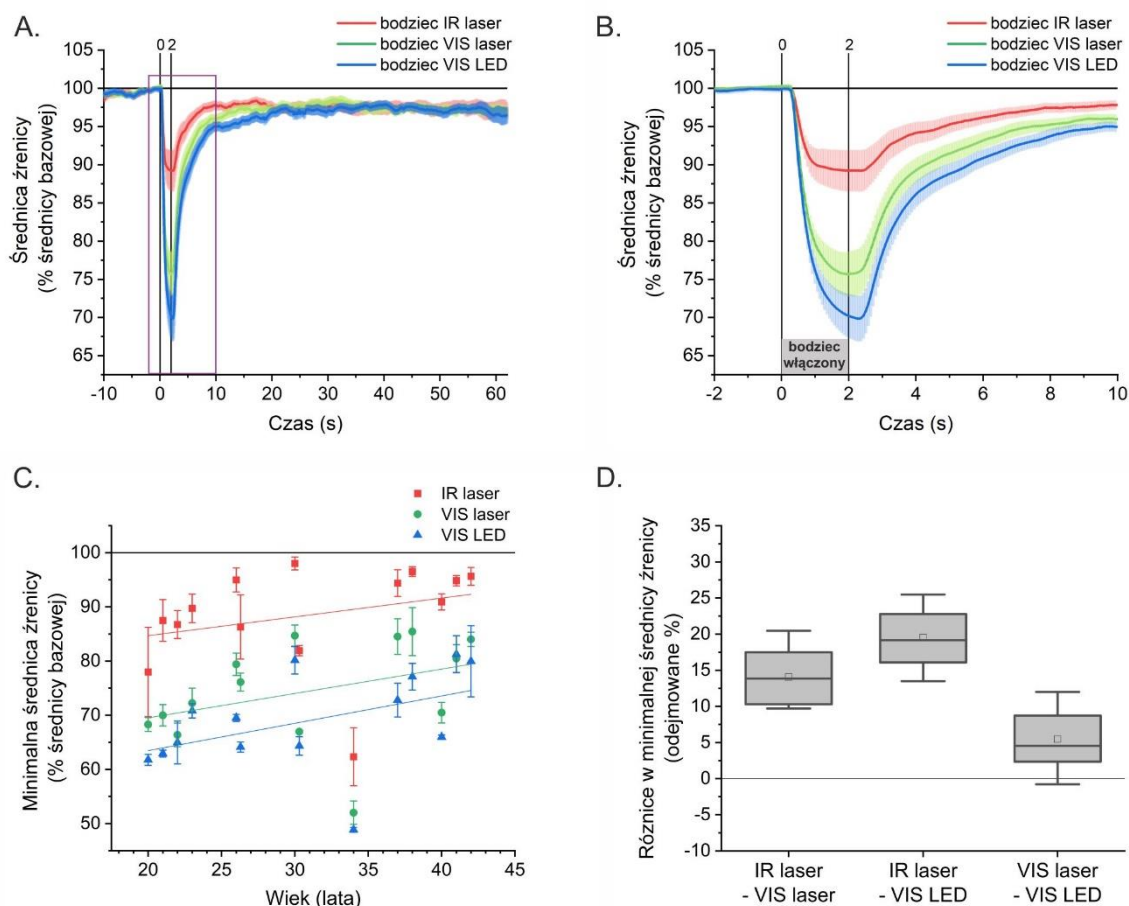
Wykresy uśrednione dla wszystkich 14 badanych, przedstawiono na Rys. 4.1.4.A i B. Średnie krzywe PLR wskazują, że bodziec IR powodował w ogólności słabszą reakcję źrenicy niż oba bodźce VIS: laserowy i LED. Ponadto bodziec laserowy VIS wydaje się wywoływać słabszy PLR niż bodziec LED VIS. Prawdopodobnie było to związane z mniejszą powierzchnią bodźca laserowego, co omówiono na s. 119 w akapicie dotyczącym Rys. 4.1.4.D. Minimalne średnice źrenic (Rys. 4.1.4.C) były istotnie mniejsze dla bodźca IR niż dla bodźca laserowego VIS u 13 z 14 uczestników (p -value $< 0,031$, test ANOVA Tukey). Jedynie w przypadku 20-letniego ochotnika (P6) różnica ta nie była istotna (p -value = 0,11), co prawdopodobnie wynika z dużego rozrzutu reakcji tej osoby na pobudzenie bodźcem

dwufotonowym. Stwierdzono istotną różnicę pomiędzy bodźcami laserowymi IR i VIS LED u wszystkich badanych ($p\text{-value} < 0,015$). Średnie minimalnych średnic źrenic wywołanych przez oba bodźce VIS (laserowy i diodowy) różnią się istotnie tylko u 6 spośród 14 badanych.

Dane na Rys. 4.1.4.C. wykazały słabą dodatnią liniową zależność minimalnej średnicy źrenicy od wieku dla wszystkich bodźców (obliczone nachylenia w % na rok wynosiły: 0,29 (IR laser), 0,38 (VIS laser) i 0,45 (VIS LED)), co jest zgodne z danymi z literatury dla pobudzeń z zakresu widzialnego [150], [151].

Test Grubbsa przeprowadzony na danych (Rys. 4.1.4.C) wykazał, że minimalna średnica źrenicy osiągnięta po stymulacji laserem IR u 34-letniego ochotnika jest wartością odstającą. W porównaniu z pozostałymi uczestnikami badania, zwężenie źrenic u tego badanego było największe dla wszystkich rodzajów bodźców. Ze względu na neurologiczne pochodzenie PLR, jego charakter jest wysoce indywidualny, dlatego zdecydowaliśmy się nie odrzucać danych tej osoby z analizy.

Ze względu na dużą międzyosobniczą zmienność reakcji źrenic po każdym rodzaju bodźca, uwzględniliśmy również różnice w minimalnej średnicy źrenicy PD_{differ} pomiędzy parami bodźców (Rys. 4.1.4.D). Średnia różnica \pm SD obliczona dla wszystkich badanych wynosiła 14 ± 4 % pomiędzy bodźcami laserowymi IR i VIS, natomiast dla bodźców IR lasera i VIS LED wynosiła 20 ± 4 %. Różnica pomiędzy bodźcami lasera VIS i VIS LED wynosiła 5 ± 4 %. Chociaż ta ostatnia różnica jest niewielka w porównaniu z różnicami między bodźcami IR i VIS, można zauważyć, że bodziec z widzialną diodą LED powoduje większe zwężenie źrenicy niż skanowanie bodźca laserowego o tej samej długości fali. Można to wytłumaczyć faktem, że bodziec LED był wypełnionym kołem, w przeciwieństwie do spiralnych bodźców laserowych. Prowadziło to do innego rozkładu mocy na polu powierzchni siatkówki w dwóch typach bodźców widzialnych: dla pobudzenia LED ustalona moc rozkładała się na polu około $0,87 \text{ mm}^2$, podczas gdy dla pobudzenia VIS laserem – na polu około $0,8 \text{ mm}^2$. W związku z tym, bodziec LED oddziaływał na więcej fotoreceptorów.



Rys. 4.1.4 A. Uśrednione po wszystkich ochotnikach przebiegi PLR po pobudzeniu trzema typami bodźców. B. Powiększony obszar zaznaczony fioletowym prostokątem na wykresie A. Zaciemnione obszary reprezentują błąd standardowy średniej (SE). C. Średnia minimalna średnica źrenicy z trzech prób PLR w funkcji wieku ochotników. Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe (SD). Linie ciągłe są aproksymacjami liniowymi. D. Średnie różnice między parami bodźców dla wszystkich ochotników. Wykresy pudełkowe: pudełka są wyznaczone przez 25. i 75. percentyl; średnia wartość oznaczona jest otwartym kwadratem, mediana – linią ciągłą, słupki wyznaczają 5 i 95 percentyl.

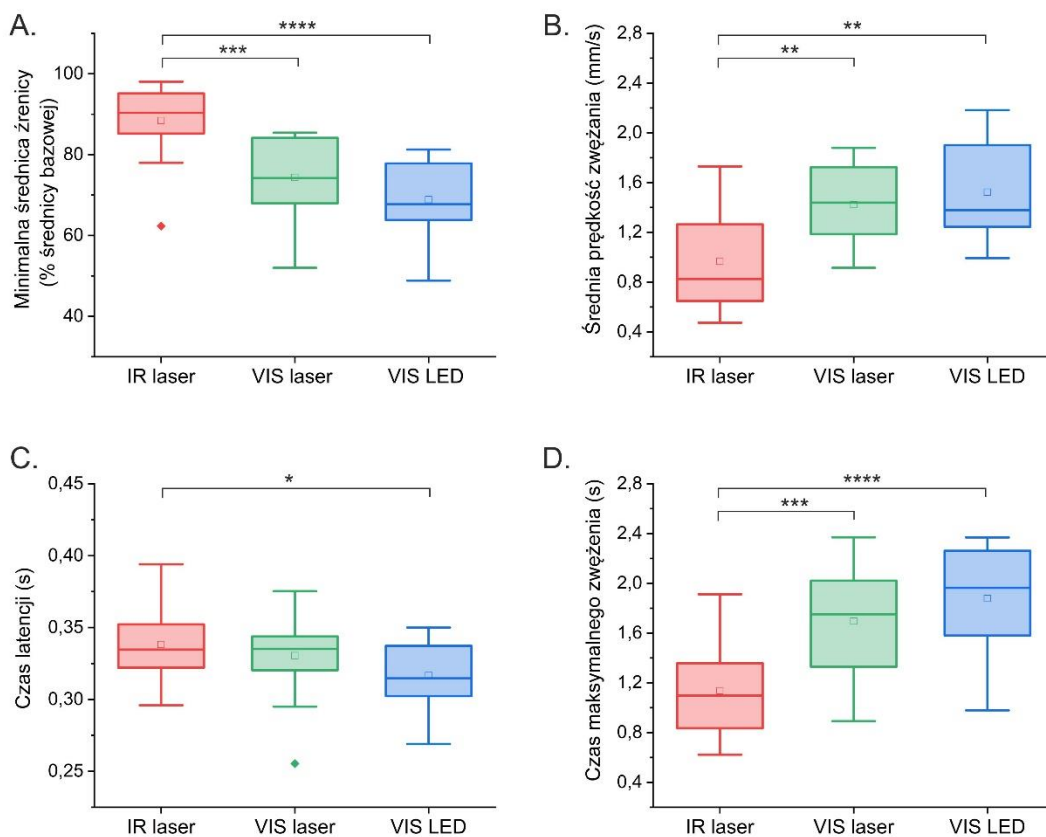
Rys. 4.1.5 przedstawia cztery parametry (zdefiniowane w podrozdziale 3.2.7) wyodrębnione z indywidualnej analizy PLR uśrednionej dla wszystkich uczestników. Średnia minimalna średnica źrenicy PD_{min} (Rys. 4.1.5.A) zarejestrowana dla bodźca IR wynosiła $88 \pm 10 \%$ (SD), natomiast dla obu bodźców VIS: $74 \pm 10 \%$ (SD) - laser i $69 \pm 9 \%$ (SD) - LED. Różnica średnich była istotna statystycznie w przypadku porównania bodźca laserowego IR z obydwoma bodźcami widzialnymi. Mimo że średnia średnica minimalna była nieco mniejsza dla VIS LED niż dla VIS laser, nie różniły się one istotnie (p -value=0,13, test ANOVA Tukey).

Średnie prędkości zwężania v_{constr} (Rys. 4.1.5.B) wynosiły: $1,0 \pm 0,4$ mm/s (SD) dla lasera IR, $1,4 \pm 0,3$ mm/s (SD) dla lasera VIS oraz $1,5 \pm 0,4$ mm/s (SD) dla VIS LED. Ponownie, różnice

między tymi średnimi były istotne dla lasera IR i obu bodźców widzialnych i nieistotne statystycznie dla VIS LED i VIS laser (p -value=0,49, ANOVA test Tukey'a).

Średnie czasy latencji t_{lat} (Rys. 4.1.5.C) wynosiły 330 ± 30 ms (SD) dla lasera IR, 310 ± 30 ms (SD) dla lasera VIS i 300 ± 20 ms (SD) dla VIS LED. Test ANOVA Tukey'a wykazał istotną różnicę tylko dla bodźców IR laser i VIS LED (p -value=0,005).

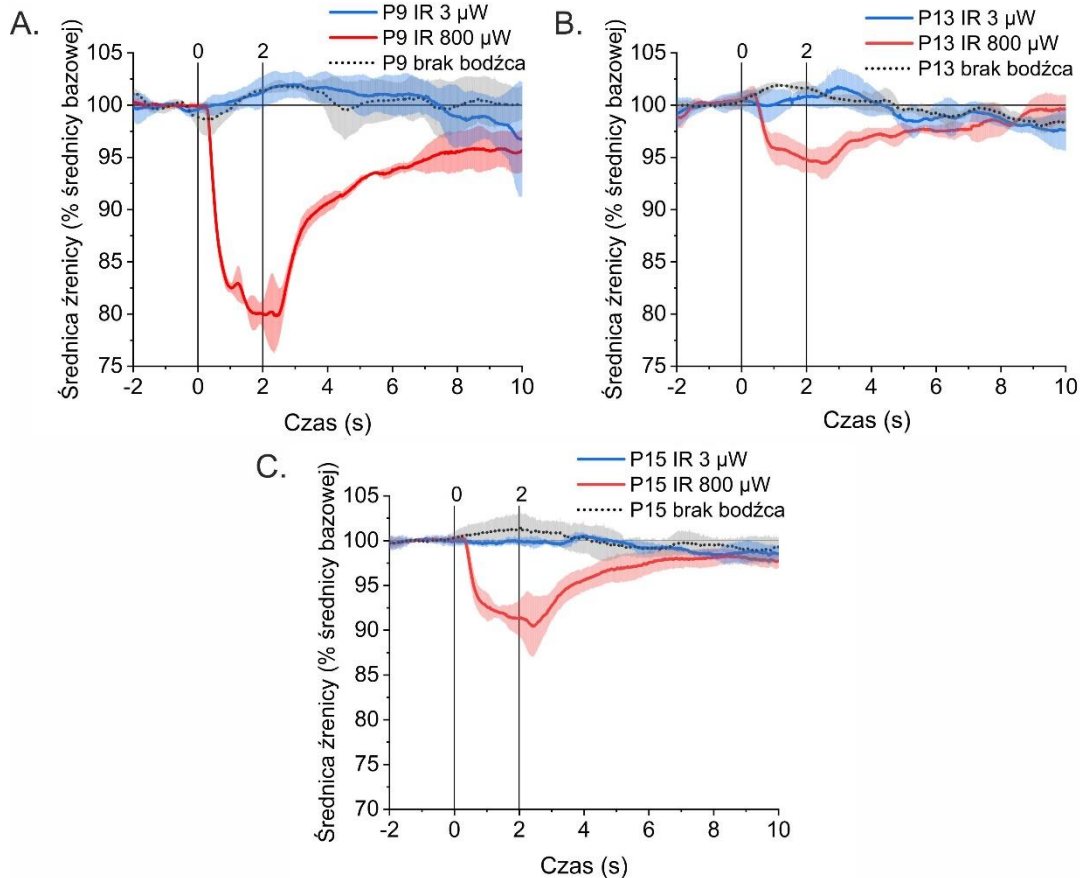
Wartości średnich czasów maksymalnego zwężenia t_{constr} (Rys. 4.1.5.D) wynosiły 1140 ± 340 ms (SD) dla lasera IR, 1700 ± 440 ms (SD) dla lasera VIS i 1890 ± 440 ms (SD) dla VIS LED. Porównanie średnich dla lasera IR i obu bodźców widzialnych wykazało, że były one istotnie różne, natomiast dla lasera VIS i VIS LED nie były (p -value=0,28, test ANOVA Tukey).



Rys. 4.1.5 Średnie parametry wyznaczone z poszczególnych PLR: (A) minimalna średnica źrenicy PD_{min} , (B) średnia prędkość zwężenia v_{constr} (C) czas latencji t_{lat} , (D) czas maksymalnego zwężenia t_{constr} ; wywołane przez: IR laser - pudełka czerwone, VIS laser - pudełka zielone, oraz VIS LED - pudełka niebieskie. Wykresy pudełkowe: pudełka są wyznaczone przez 25. i 75. percentyl; średnia wartość oznaczona jest otwartym kwadratem, mediana – linią ciągłą, słupki wyznaczają 5 i 95 percentyl, wartość odstającą oznaczono pogrubionym punktem. Gwiazdki oznaczają, że średnie są istotnie różne: * - p -value $\leq 0,05$, ** - p -value $\leq 0,01$, *** - p -value $\leq 0,001$, **** - p -value $\leq 0,0001$.

Dla trzech ochotników sprawdzono również czy bodziec dwufotonowy poniżej progu widzenia ($3\mu W$) nie wywołuje reakcji źrenicy. Dodatkowo, skanery podczas generowania

kształtu spirali na siatkówce wytwarzały charakterystyczny dźwięk. Wykonano więc eksperyment, w którym nie było żadnego bodźca, chcąc również sprawdzić czy ten dźwięk nie powoduje oddziaływania na układ nerwowy w sposób wywołujący reakcję źrenicy. Przebiegi uzyskane w tym eksperymencie przedstawia Rys. 4.1.6.

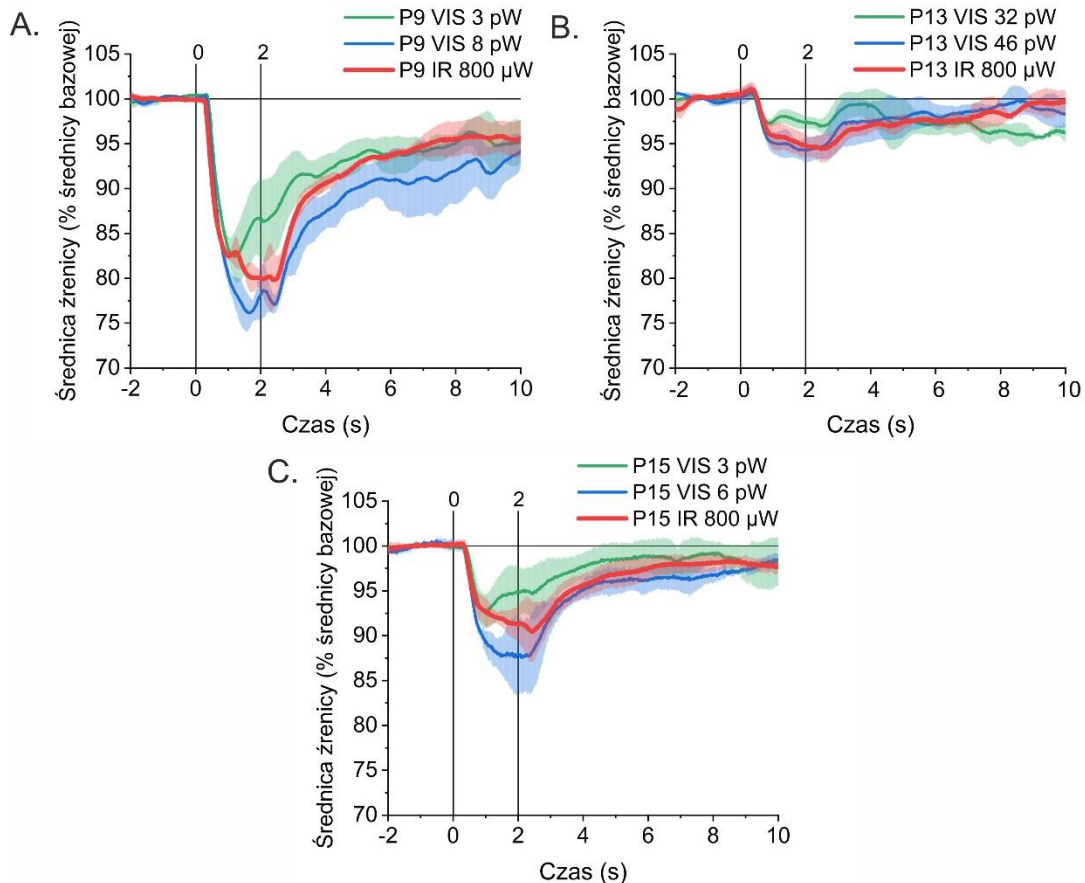


Rys. 4.1.6 Uśrednione z trzech prób przebiegi rozmiaru źrenic przy braku bodźca (czarna kropkowana linia), bodźcu IR o mocy $800\mu\text{W}$ (czerwona linia) oraz bodźcu IR poniżej progu widzenia o mocy $3\mu\text{W}$ (niebieska linia) dla trzech ochotników: A. P9, B. P13 oraz C. P15. Słupki błędów oznaczają błąd standardowy z trzech prób.

Jak można zaobserwować, bodziec poniżej progu widzenia nie wywoływał reakcji źrenicy – przebieg jest płaski podobnie jak dla braku bodźca. Źrenica badanych osób nie zareagowała również na charakterystyczny dźwięk włączanych skanerów.

W procedurze doboru jasności bodźców ustalono jasność bodźca widzialnego odpowiadającą danej mocy bodźca podczerwonego. Jak wynika z opisywanych rezultatów, mimo zastosowania procedury doboru jasności bodziec widzialny wywołuje silniejszą reakcję źrenicy niż bodziec podczerwony. Sprawdzone więc również, jak powinna być moc bodźca VIS, żeby wywołać podobnie niewielką reakcję źrenicy co największa zastosowana moc wiązki IR ($800\mu\text{W}$). Dla trzech ochotników przeprowadzono próby, w których pobudzano siatkówkę różnymi mocami wiązki VIS szukając podobnej reakcji do powodowanej pobudzeniem IR. Rys. 4.1.7 przedstawia wybrane przebiegi dla wiązek VIS najbardziej zbliżone do przebiegu IR. Moce VIS wywołujące podobną reakcję źrenicy co 800

μW IR dla tych trzech ochotników wynosiły: dla P9 i P15 kilka pW (podczas gdy P_{eq} odpowiednio 270 pW dla P9, 280 pW dla P15) oraz 30 – 40 pW dla P13 ($P_{\text{eq}} = 210 \text{ pW}$). Wynika z tego, że ekwiwalentne reakcje źrenicy dla pobudzenia wiązką widzialną wymagają od jednego do dwóch rzędów wielkości słabszej mocy niż znaleziona w procedurze dopasowywania jasności. Tak więc źrenica reaguje na bodziec dwufotonowy zwiężając się tak jakby stymulowano bodźcem jednofotonowym o znacznie mniejszej intensywności niż wynikająca z dopasowywania jasności.



Rys. 4.1.7 Krzywe PLR dla jednofotonowego bodźca laserowego VIS, który wywołał reakcję źrenicy podobną do dwufotonowego bodźca laserowego IR o mocy 800 μW , zarejestrowanego u osób (A) P9, (B) P13, (C) P15. Każda krzywa to średnia, a słupki błędów wskazują błąd standardowy z trzech prób.

4.1.5 Dyskusja

Wszyscy badani postrzegali wiązkę podczerwoną 1040 nm jako zieloną, przy czym część ochotników zgłaszała różnicę w odcieniu zieleni – podczerwień była nieco bardziej żółta niż wiązka widzialna 520 nm, co jest zgodne z wynikami Palczewskiej i współpracowników [108]. Mogło mieć to wpływ na dokładność dopasowania jasności wiązki widzialnej. Grupa badawcza była złożona ze stosunkowo młodych osób. Stwierdzono słabą ujemną korelację mocy ekwiwalentnej z wiekiem (r Pearsona = -0,29), ale nie osiągnęła ona

poziomu istotności statystycznej ($p = 0,31$). Na podstawie zebranych danych nie ma zatem podstaw do wnioskowania o zależności mocy ekwiwalentnej od wieku.

Jasność bodźca postrzegana przez nasz mózg jest powiązana z przekrojem czynnym na absorpcję pigmentów wzrokowych. Dopasowanie jasności pozwala określić różnicę wydajności procesu dwufotonowego w stosunku do jednofotonowego, w przeprowadzonym eksperymencie, jako 6 rzędów wielkości mniejszą (setki μW vs. setki pW). Porównanie to dotyczy mocy średniej dla lasera impulsowego o długości impulsu około 260 fs i częstotliwości repetycji 76 MHz. Jasność bodźca zależną od wydajności procesu dwufotonowego można zmienić poprzez zmianę częstotliwości impulsów [120], zmianę rozmiaru bodźca lub innych parametrów zgodnie ze wzorem (2-3) – średnicy wiązki wchodzącej do oka, parametrów ciągu impulsów (czas trwania impulsu, moc średnią lasera) czy długości fali.

Oceniono również powtarzalność i wiarygodność testu dopasowania jasności [152]. Pięciu badanych wykonało test dwukrotnie w tym samym dniu. W Tab. 4.1-1 zestawiono wartości mocy ekwiwalentnych wyznaczonych dla każdej z wykonanych prób.

Tab. 4.1-1 Wyznaczone moce ekwiwalentne z dwóch prób dla pięciu ochotników.

		Ochotnik				
		P1	P4	P9	P12	P13
P_{eq} [pW]	Próba 1	272	356	216	154	220
	Próba 2	224	395	172	160	239
P_{eq} średnie [pW] (\bar{P}_i)		248	375,5	194	157	229,5

Policzono odchylenie standardowe między próbami danego badanego (ang. *within subjects*, WS) zgodnie ze wzorem [153]:

$$SD_{WS} = \sqrt{\frac{MS_{BS} + (K - 1)MS_{WS}}{K}} = \sqrt{MS_{WS}} = \sqrt{615.8 \text{ pW}^2} \cong 25 \text{ pW} \quad (4-1)$$

gdzie:

MS_{WS} – wewnątrzsobnicza średnia kwadratów ($MS_{WS} = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^K (P_{ik} - \bar{P}_i)^2}{n(K-1)}$ przy czym \bar{P}_i – średnia z powtórzeń dla badanego X, \bar{P} – średnia ze wszystkich obserwacji, n – liczba uczestników)

MS_{BS} – międzyosobnicza średnia kwadratów ($MS_{BS} = \frac{K \cdot \sum_{i=1}^n (\bar{P}_i - \bar{P})^2}{n}$)

K – liczba powtórzeń (K = 2)

Odchylenie standardowe między badanymi (ang. *between subjects* – BS) policzono ze wzoru [153]:

$$SD_{BS} = \sqrt{\frac{MS_{BS} - MS_{WS}}{K}} = \sqrt{\frac{MS_{BS} - MS_{WS}}{2}} = \sqrt{615.8 \text{ pW}^2} \cong 81 \text{ pW} \quad (4-2)$$

Współczynnik powtarzalności metody (ang. *repeatability coefficient*, RC) wynosił [153]:

$$RC = 2.77 \cdot SD_{WS} \cong 70 \text{ pW} \quad (4-3)$$

Przedział ufności (95 %) wyznaczono na 40 pW – 170 pW zgodnie ze wzorem [153]:

$$CI = \left(\sqrt{\frac{5 \cdot MS_{WS}}{\chi_5^2(0,025)}}, \sqrt{\frac{5 \cdot MS_{WS}}{\chi_5^2(0,975)}} \right) \cong (40 \text{ pW}, 170 \text{ pW}) \quad (4-4)$$

Tak więc w 95 przypadkach na 100, współczynnik powtarzalności metody powinien znajdować się w przedziale między 40 a 170 pW.

Wiarygodność metody, określona jako korelacja wewnątrzklasowa została policzona zgodnie ze wzorem [152]:

$$ICC = \frac{SD_{BS}^2}{SD_{BS}^2 + SD_{WS}^2} = 0,91 \quad (4-5)$$

Wynik korelacji wewnątrzklasowej 0,91 potwierdza wiarygodność metody [154].

Przedstawione wyniki eksperymentu dotyczącego reakcji źrenicy pokazują, że źrenica człowieka zwęża się w odpowiedzi na dwufotonowy bodziec IR. Reakcja ta jest jednak znacznie słabsza niż na bodziec VIS o tym samym kształcie, jasności i podobnym kolorze (zielony). Średnio źrenica po pobudzeniu bodźcem utworzonym przez laser IR zwężała się do 90 % swojej pierwotnej średnicy, podczas gdy po obu bodźcach VIS zwężała się do około 70 %. Średnia prędkość zwężenia była również najmniejsza dla bodźca IR, a czas do maksymalnego zwężenia był najkrótszy dla stymulacji dwufotonowej. Bodziec VIS LED wywoływał nieco silniejszą odpowiedź niż VIS laser (Rys. 4.1.4.A i B), jednak różnice między średnimi wartościami czterech omówionych wyżej parametrów nie różniły się istotnie dla obu bodźców widzialnych (Rys. 4.1.5). Wskazuje to, że stymulacja oka skanującą wiązką VIS była podobna do stymulacji diodą VIS. Samo skanowanie, nie tłumaczy więc obserwowanej słabszej reakcji po bodźcu IR w porównaniu z obydwojema bodźcami widzialnymi.

Średnica źrenicy jest regulowana przez wrażliwe na światło ipRGC, które otrzymują sygnały zewnętrzne od pręcików i czopków oraz sygnały wewnętrzne pochodzące od melanopsyny [155]. W przeprowadzonym eksperymencie stosowano bodźce o krótkim czasie trwania i niskiej intensywności. Dla takich pobudzeń reakcja źrenicy jest regulowana głównie przez pręciki [156], [157]. Słabsza stymulacja pręcików przez dwufotonową wiązkę IR niż przez wiązkę VIS może być przyczyną słabszego PLR obserwowanego w naszym badaniu. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami opisanymi w pracy [118].

Te hipotetyczne różnice w stopniu stymulacji dwufotonowej między czopkami i pręcikami w porównaniu z normalnym widzeniem mogą również wyjaśniać różnicę w odcieniu między bodźcami lasera IR i VIS zgłaszaną przez niektórych naszych uczestników podczas testu dostosowania jasności. Wiadomo, że pręciki również biorą udział w postrzeganiu kolorów w widzeniu mezopowym i skotopowym, co powoduje zmianę postrzeganego odcienia w porównaniu z warunkami fotopowymi [158].

Bezpośrednia stymulacja ipRGC w naszym eksperymencie była mało prawdopodobna – ekspozycja siatkówki dla źródeł światła widzialnego (520 nm) wynosiła maksymalnie $10,9 \log \text{ fot}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$. Chociaż próg pobudzenia ipRGC wynosi $\sim 11 \log \text{ phot}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$, wartość ta została znaleziona dla długości fali 480 nm [159], blisko maksymalnej czułości spektralnej melanopsyny ipRGC (482 nm) [43]. Próg aktywacji ipRGC dla 520 nm jest więc większy niż dla 480 nm. PLR wykazujące aktywację melanopsyny ipRGC były zwykle indukowane przez niebieskie światło o natężeniu promieniowania siatkówki powyżej $13 \log \text{ fot}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ [160]. ipRGC nie są również aktywowane przez widzialne światło czerwone – czułość spektralna melanopsyny przy 600 nm jest o 2,5 rzędu wielkości niższa niż w maksimum [44]. Dlatego najprawdopodobniej nie doszło do jednofotonowej stymulacji tych komórek przez naszą wiązkę lasera IR, chociaż poziom napromieniowania dla długości fali 1040 nm był znacznie wyższy niż dla 520 nm. Brak stymulacji ipRGC jest dodatkowo potwierdzony brakiem utrzymującej się w czasie zmniejszonej średnicy źrenicy (PIRP) [44] w zarejestrowanych krzywych (Rys. 4.1.4.A). Niektóre krzywe indywidualne (Rys. 4.1.3) wykazują cechy tzw. „ucieczki źrenicy”, polegającej na zmniejszaniu rozmiaru źrenicy mimo trwania stymulacji [156]. Takie zachowanie źrenicy było obserwowane dla bodźców o niewielkich natężeniach i jest dodatkowym argumentem za tym, że komórki ipRGC nie są pobudzane przez bodźce IR, a absorpcja w zewnętrznych fotoreceptorach siatkówki jest znikoma [156].

Dodatkowym czynnikiem tłumaczącym słabszą odpowiedź IR może być fakt, że dwufotonowa stymulacja fotoreceptorów zachodzi tylko w obszarze ogniskowym lasera wiązki, gdzie natężenie światła jest wystarczająco duże, aby nastąpiła absorpcja dwufotonowa. W przeciwieństwie do obu bodźców widzialnych, rozproszone światło

podczerwone nie jest postrzegane i nie bierze udziału w ogólnej odpowiedzi układu wzrokowego. W efekcie w percepcję światła bodźca dwufotonowego zaangażowana jest mniejsza liczba fotoreceptorów niż w przypadku bodźców jednofotonowych.

4.1.6 Wnioski

Po raz pierwszy zaproponowano metodę określania jasności bodźca dwufotonowego w odniesieniu do jednofotonowego. Wykazano wiarygodność i powtarzalność przedstawionej procedury. Wyniki potwierdziły również nieliniowy charakter postrzegania wiązki podczerwonej (współczynnik nachylenia między mocami ekwiwalentnymi $1,7 \pm 0,1$). Bodziec dwufotonowy jest postrzegany jako stosunkowo ciemny – 800 μW mocy średniej mierzonej w płaszczyźnie źrenicy uformowanej na siatkówce w okrąg o średnicy $3,5^\circ$ odpowiada jedynie około 266 pW wiązki widzialnej. Badania przeprowadzone nad reakcją źrenicy po raz pierwszy pokazały, że źrenica człowieka zwięża się w odpowiedzi na impulsowy bodziec podczerwony postrzegany w procesie widzenia dwufotonowego. Okazało się, że stymulacja bodźcem dwufotonowym wywołuje znacznie słabsze reakcje źrenicy niż bodźce jednofotonowe subiektywnie dobrane jako mające tę samą jasność.

Obserwacja ta może być wyjaśniona przez dwa czynniki. Po pierwsze, dwufotonowa stymulacja pręcików jest słabsza w porównaniu z jednofotonową stymulacją o tej samej subiektywnej jasności. Po drugie, światło rozproszone nie powoduje dwufotonowej absorpcji, co zmniejsza liczbę pobudzonych fotoreceptorów. Uzyskane wyniki są istotne dla zrozumienia podstaw dwufotonowej percepcji światła i rozwoju urządzeń okulistycznych wykorzystujących impulsowe wiązki lasera podczerwonego.

4.2 Wpływ rozmiaru i zbieżności wiązki pobudzającej na progi widzenia

4.2.1 Motywacja i cel badania

Podczas badań psychofizycznych prowadzonych nad widzeniem dwufotonowym, zależnie od konstrukcji układu optycznego, można uzyskać różne średnice wiązek pobudzających wchodzących do oka. Wiązki o większych średnicach skupiane są do mniejszych plamek na siatkówce, zgodnie ze wzorem (1-6), co przekłada się na większą gęstość mocy w obszarze fotoreceptorów, a więc więcej aktów absorpcji dwufotonowej w pigmentach wzrokowych. Wraz ze wzrostem średnicy wiązki wchodzącej do oka można spodziewać się więc niższych progów widzenia dwufotonowego. Jednak rosnące wraz ze średnicą wiązek na rogówce aberracje plamki powstającej na siatkówce (Rys. 1.2.2) powodują, że wzór (1-6)

obowiązuje w praktyce (dla układów bez korekcji aberracji oka) tylko dla wiązek do 3 – 3,5 mm średnicy w płaszczyźnie źrenicy [51]. Pierwszym celem eksperymentów opisanych w tym rozdziale było zbadanie czy i jak bardzo rozmiar wiązki wpływa na progi widzenia: dwufotonowego oraz jednofotonowego.

Każda procedura badań psychofizycznych z użyciem wiązek laserowych rozpoczyna się od korekcji wady refrakcji badanego oka ochotnika. Zależnie od doświadczenia czy skrupulatności osoby biorącej udział w badaniu korekcja ta może być wykonana z różną dokładnością. Tak więc drugim celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu dokładności korekcji refrakcji oka (zbieżności wiązki) na progi widzenia jedno- i dwufotonowego.

By odpowiedzieć na drugie pytanie badawcze zdefiniowane na początku rozprawy w przedstawionym eksperymencie testowano dwie hipotezy: ze względu na nieliniową naturę, widzenie dwufotonowe w porównaniu do jednofotonowego będzie cechowało się silniejszą zależnością progu widzenia od średnicy wiązki wchodzącej do oka (1) jak również silniejszą zależnością progów widzenia od zbieżności wiązki pobudzającej (2).

4.2.2 Badana grupa

Eksperyment przeprowadzono w dwóch turach. W pierwszej przeprowadzono badania na czterech ochotnikach – dwóch kobietach i dwóch mężczyznach w wieku 31 – 43 lat (średnia 37,5 lat, SD = 5,5 lat). Średnia wada refrakcji wynosiła $-1,4$ D, SD = $\pm 1,8$ D. W drugim eksperymencie badano trzech ochotników – jedną kobietę i dwóch mężczyzn w wieku 36 – 44 lat (średnia 40,7 lat, SD = 4,2 lat, średnia wada refrakcji wynosiła $-1,3$ D, SD = $\pm 2,3$ D. Ochotnicy nie zgłaszali problemów ze wzrokiem. Badane było preferowane oko, które zakraplano Tropicamidum 1 % w celu porażenia akomodacji i rozszerzenia źrenicy (2 x po 1 kropli w odstępie 5 minut, następnie aplikacja 1 kropli powtarzana co 30 minut w celu utrzymania porażenia akomodacji).

4.2.3 Procedura pomiarowa i metodologia badania

Przed głównym badaniem ochotnik w słabo oświetlonym pomieszczeniu (<2 luksy) dokonywał kompensacji wady refrakcji (rozdział 3.2.1) i wykonywał procedurę treningową pomiaru progu widzenia bodźca metodą 4 – 2 – 1. Następnie badany był zakraplany Tropicamidum 1 % i adaptował się do ciemności przez 30 minut. Po upływie czasu adaptacji preferowane oko było odsłaniane i przeprowadzano właściwy pomiar progu widzenia bodźca metodą 4 – 2 – 1 opisaną w rozdziale 3.2.8. Podczas badania zmiana zbieżności wiązki była realizowana przez wyskalowany w dioptriach ruch soczewki L7 (kalibracja przesuwu soczewki została opisana w rozdziale 3.1.10). Progi dla różnych

dioptrii badane były w warunkach: adaptacji do ciemności (DA) oraz na jednorodnym tle (LA) utworzonym przez diodę LED o luminancji 0,5 cd/m². Jest to mezopowy zakres postrzegania (rozdział 1.3.2), w którym aktywne są zarówno czopki jak i pręciki.

Badania przeprowadzano dwukrotnie – w drugim podejściu zmodyfikowano układ (wymiana soczewki L5, z $f_5 = 100$ mm na $f_5 = 50$ mm), by umożliwić wprowadzanie do oka wiązek o większych średnicach. W tym drugim eksperymencie, oprócz badania czułości w centrum plamki, badano również czułość siatkówki w odległości 5° skroniowo. Średnicę wiązki w obu eksperymentach zmieniano wymieniając ostatnią soczewkę układu L8. Najważniejsze parametry eksperymentów zestawiono w Tab. 4.2-1.

Tab. 4.2-1 Porównanie warunków eksperymentów badających wpływ rozmiaru i zbieżności wiązki pobudzającej na progi widzenia jedno – i dwufotonowego.

	Eksperyment 1	Eksperyment 2
Soczewka L5	$f_5 = 100$ mm (AC254-100-AB-ML, Thorlabs)	$f_5 = 50$ mm (AC254-50-AB-ML, Thorlabs)
Soczewka L8	$f_8 = 30$ mm (AC254-30-B-ML, Thorlabs) $f_8 = 50$ mm (AC254-50-AB-ML, Thorlabs) $f_8 = 100$ mm (AC254-100-B-ML, Thorlabs)	$f_8 = 30$ mm (AC254-30-B-ML, Thorlabs) $f_8 = 50$ mm (AC254-50-B-ML, Thorlabs) $f_8 = 100$ mm (AC254-100-AB-ML, Thorlabs)
Grupa badana	2 kobiety, 2 mężczyzn	1 kobieta, 2 mężczyzn
Bodziec	1040 nm (IR), 520 nm (VIS) okrąg 0,5° średnice wiązek 520 nm: 0,4 mm, 0,6 mm i 1,2 mm 1040 nm: 0,4 mm, 0,6 mm, 1,3 mm	1040 nm (IR), 520 nm (VIS) okrąg 0,5° średnice wiązek 520 nm: 0,7 mm, 1,2 mm i 2,9 mm 1040 nm: 0,8 mm, 1,2 mm i 2,7 mm
Miejsca i warunki pobudzenia	Centrum plamki w warunkach adaptacji do ciemności i światła	Centrum plamki w warunkach adaptacji do ciemności i światła, 5° skroniowo w warunkach adaptacji do ciemności i światła

W pierwszym eksperymencie brało udział 4 ochotników. W danym dniu pomiarowym badano jednego ochotnika dla dwóch rozmiarów wiązek dla każdej długości fali (VIS: 1,2 mm, 0,6 mm oraz IR: 1,3 mm, 0,6 mm). W innym dniu pomiarowym mierzono progi dla wiązek VIS i IR 0,4 mm. Badania wykonano badając centralną czułość w warunkach adaptacji do ciemności i adaptacji do światła.

W drugim eksperymencie brało udział trzech ochotników, a sesje pomiarowe trwające około 1 h 40 minut dla jednego badanego odbywały się w trzech kolejnych dniach – dla jednej średnicy wiązki w danym dniu. Schemat procedury pomiarowej zastosowanej w badaniach dla danego rozmiaru wiązki przedstawia Rys. 4.2.1.



Rys. 4.2.1 Schemat procedury pomiarowej drugiego eksperymentu

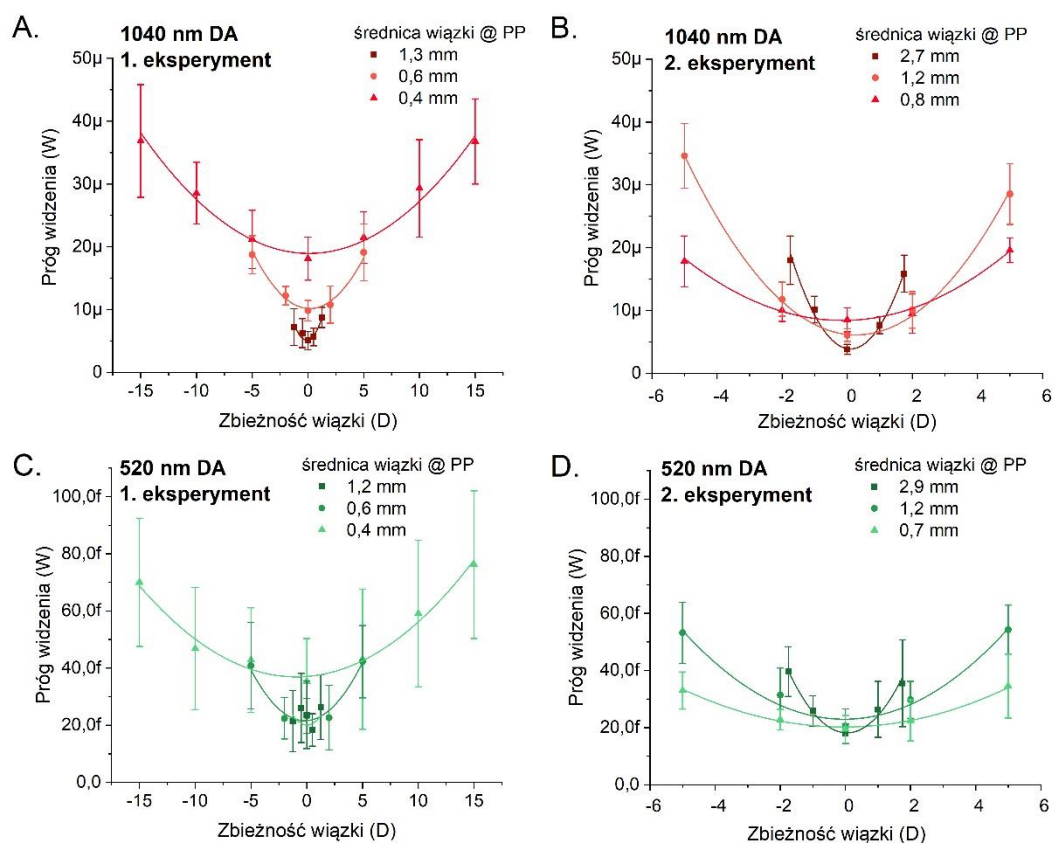
Przeliczenie rozmiarów wiązek stosowanych w eksperymencie na apertury numeryczne policzone zgodnie ze wzorami (1-5) zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 4.2-2). Zakres badanych apertur wynosił 0,01 – 0,09. Zakładając pomijalny wpływ aberracji i ograniczenie limitem dyfrakcyjnym możemy oszacować rozmiar plamki na siatkówce zgodnie ze wzorami (1-6) dla wiązki jednofotonowej oraz (1-7) dla wiązki dwufotonowej.

Tab. 4.2-2 Zestawienie średnic wiązek na rogówce (d) z uzyskanymi aperturami numerycznymi (NA) oraz średnicami plamki na siatkówce ($d_{\text{siatkówka}}$) przy pominięciu aberracji.

d (mm)	θ (°)	NA	Jednofotonowy $d_{\text{siatkówka 1ph}}$	Dwufotonowy $d_{\text{siatkówka 2ph}}$	Jednofotonowy $d_{\text{siatkówka 1ph}}$
			1040 nm (μm)	1040 nm (μm)	520 nm (μm)
0,4	0,5	0,01	56.1	28.1	39.9
0,6	0,8	0,02	37.4	18.7	26.6
0,7	0,9	0,02	32.1	16.0	22.8
0,8	1.0	0,02	28.1	14.0	20.0
1,2	1,5	0,04	18.7	9.4	13.3
1,3	1,6	0,04	17.3	8.6	12.3
2,7	3,4	0,08	8.3	4.2	5.9
2,9	3,7	0,09	7.7	3.9	5.5

4.2.4 Wyniki

Na Rys. 4.2.2 zestawiono wyniki pomiarów obu eksperymentów w warunkach adaptacji do ciemności przy pobudzeniu centralnym.



Rys. 4.2.2 Średnie progi widzenia (dla 4 osób w pierwszym eksperymencie i 3 osób w drugim eksperymencie) w warunkach adaptacji do ciemności dla różnych rozmiarów wiązki na rogówce dla pobudzenia w centrum plamki wiązka podczerwoną 1040 nm (A. i B.) oraz wiązką widzialną 520 nm (C. i D.).

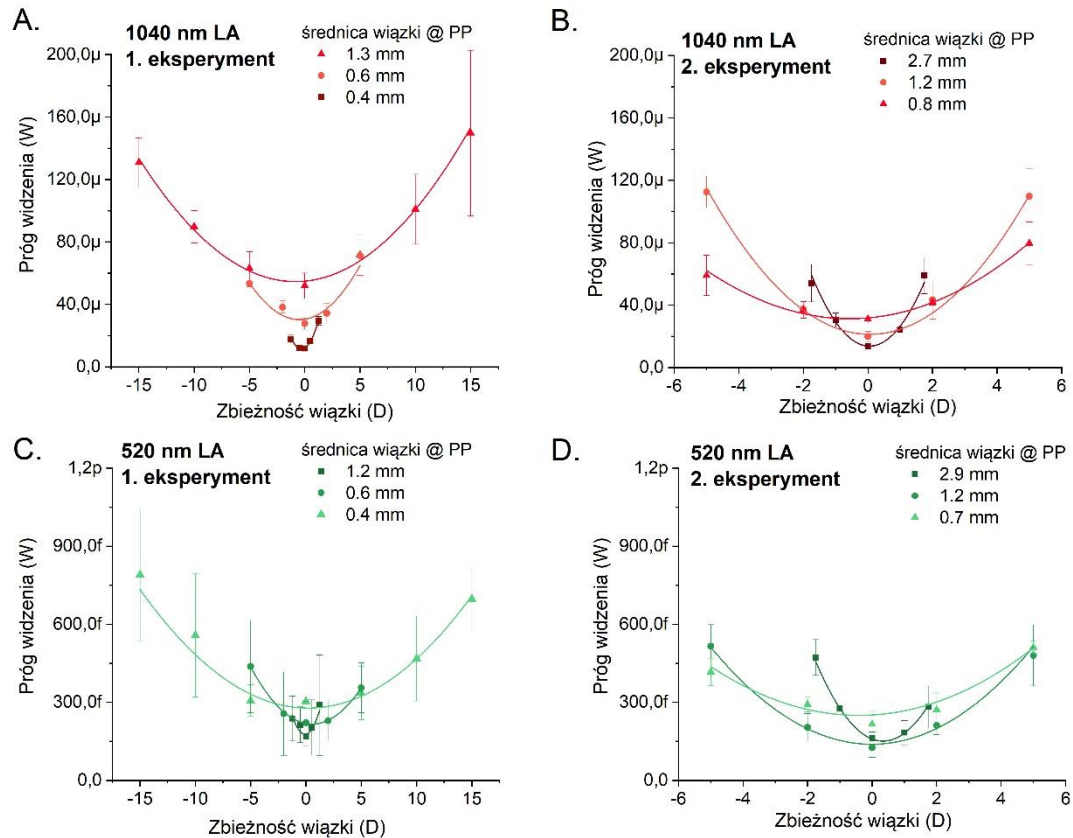
Dla każdego z wykresów na Rys. 4.2.2 minima parabol zlokalizowane są w pobliżu ($< 0,3$ D) najlepszej korekcji (0 D), co świadczy o dobrej korekcji wad refrakcji ochotników.

Można zauważyć, że średnie progi dwufotonowe i jednofotonowe obliczone dla wszystkich ochotników leżą na trzech parabolach odpowiadających średnicom wiązki na rogówce. Wyjątek stanowi wiązka 520 nm 1,2 mm w pierwszym eksperymencie (Rys. 4.2.2.C). Progi dla wiązki o tej średnicy były badane w bardzo wąskim zakresie, w którym różnice czułości są małe. W drugim podejściu rozszerzono zakres i parabola jest lepiej oznaczona. Ponadto słupki błędów (1 SD) dla wiązki 520 nm w pierwszym z eksperymentów mają większe wartości, z powodu mniejszej dokładności wyznaczania progu. Przyczyną tego był błąd w ostatnim kroku algorytmu programu, który powodował, że algorytm działał jak metoda 4-2. W drugim podejściu błąd ten został poprawiony.

Widzimy również, że dla pobudzenia dwufotonowego (Rys. 4.2.2.A i B) wraz ze zwiększaniem średnicy wiązki wchodzącej do oka, tożsamym ze zwiększaniem apertury numerycznej (Tab. 4.2-2) i zmniejszaniem średnicy wiązki skanującej siatkówkę, średnia wartość progu widzenia przy minimum maleje. Na punktach pomiarowych w 0 D wykonano testy statystyczne, by sprawdzić czy zauważone różnice są istotne. Wykazały one, że progi

w 0 D dla wiązki IR DA w pierwszym i drugim eksperymencie są istotnie różne (p-value odpowiednio $<0,008$ i $<0,041$, ANOVA Tukey). Z kolei dla wiązki VIS DA różnice w progach nie są istotne statystycznie (p-value $>0,10$ i $>0,46$, ANOVA Tukey).

Wyniki pomiarów progów czułości w centrum plamki dla warunków adaptacji do światła przedstawia Rys.4.2.3.

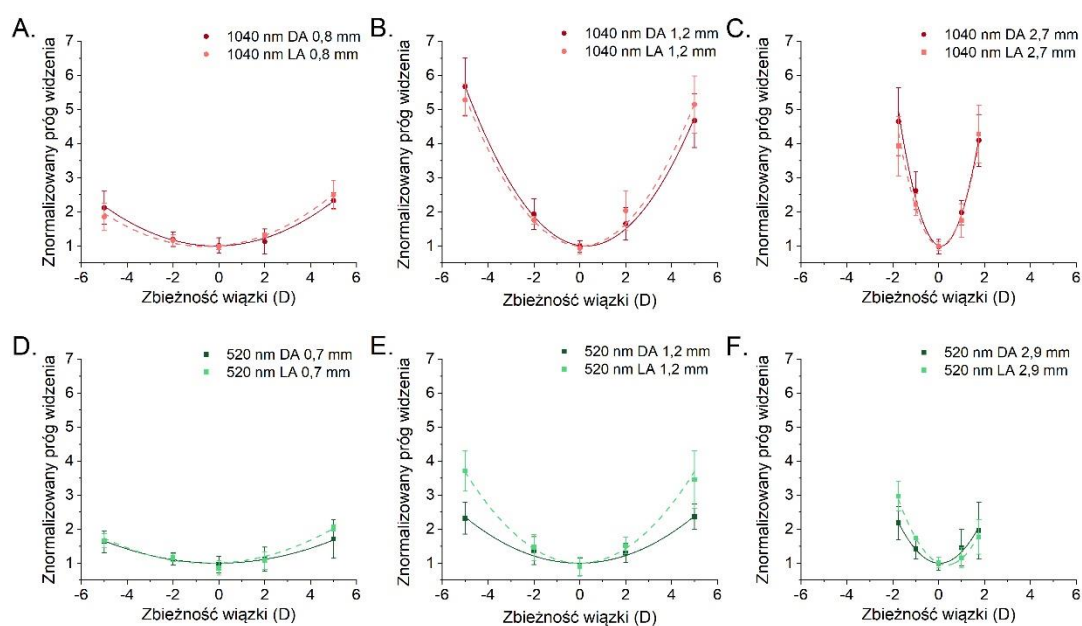


Rys. 4.2.3 Średnie progi widzenia w dwóch eksperymentach w warunkach adaptacji do światła dla różnych rozmiarów wiązki na rogówce dla pobudzenia centralnego (A i B) wiązką podczerwoną 1040 nm oraz (C i D) wiązką widzialną 520 nm

Wartości progów w warunkach LA są większe niż w DA, jednak kształty wykresów dla poszczególnych wiązek wyglądają podobnie, co potwierdzi przeprowadzona w dalszej części normalizacja (Rys. 4.2.3). W ramach widocznych różnic zauważyć można dwie niesymetryczności parabol: parabola VIS LA dla wiązki 2,9 mm ma dłuższe lewe ramię, a parabola LA IR dla wiązki 0,4 mm - prawe. Nie jest jasne, dlaczego jedynie w tych dwóch przypadkach pojawiła się taka niesymetryczność. Zmiana pochylenia paraboli IR może być wynikiem działania mechanizmu resztkowej akomodacji, który pozwala na zogniskowanie wiązki rozbieżnej (z ujemnymi dioptriami).

W kolejnym kroku analizy znormalizowano wyniki – dla poszczególnych rozmiarów wiązek wartości progów podzielono przez wartość minimum dopasowanej paraboli. Z powodu większych niepewności wyników dla wiązki widzialnej w pierwszym eksperymencie

w analizie wzięto pod uwagę wyniki drugiego eksperymentu. Porównanie warunków pobudzania DA i LA dla wybranych rozmiarów wiązek przedstawia Rys. 4.2.4.



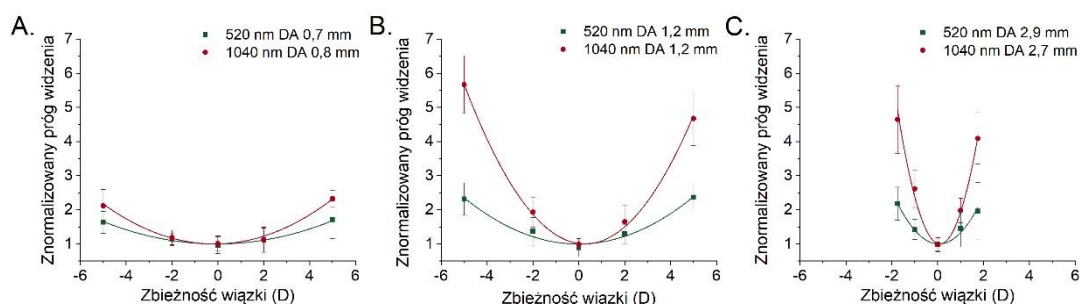
Rys. 4.2.4 Porównanie znormalizowanych progów widzenia w warunkach LA i DA przy pobudzeniu siatkówki w centrum plamki dla wybranych średnic wiązek na rogówce.

Parametry parabol dopasowanych do znormalizowanych danych zestawiono w Tab. 4.2-3. Kształty parabol dla poszczególnych rozmiarów wiązek pokazały, że warunki pobudzania (LA czy DA) w centrum plamki nie mają znaczącego wpływu na kształt zależności znormalizowanych progów widzenia od zbieżności wiązki w badanym zakresie zbieżności. Jedynie wykresy dla wiązki widzialnej 520 nm o średnicy na rogówce 1,2 mm (Rys. 4.2.E) różnią się w skrajnych punktach – średnie znormalizowane progi widzenia dla zbieżności wiązek 5 D i -5 D są wyższe w warunkach LA niż DA ($3,71 \pm 0,92$ vs $2,32 \pm 0,38$ dla -5 D oraz $3,45 \pm 1,62$ vs. $2,37 \pm 0,34$ dla 5 D), a współczynnik a paraboli przy zmiennej kwadratowej jest prawie dwukrotnie wyższy w warunkach LA niż DA ($0,108 \pm 0,154$ vs. $0,055 \pm 0,007$).

Tab. 4.2-3 Wartości współczynnika a parabol $y = ax^2 + bx + c$ dopasowanych do znormalizowanych danych dla poszczególnych średnic wiązek na rogówce (d) w poszczególnych eksperymentach.

		Współczynnik kierunkowy paraboli dopasowania			
d (mm)	miejsce siatkówki	IR DA	IR LA	VIS DA	VIS LA
0,8 (IR)	0°	0,050±0,003	0,050±0,006	0,027±0,003	0,035±0,006
0,7 (VIS)	5°	0,026±0,002	0,049±0,001	0,003±0,002	0,027±0,002
1,2	0°	0,168±0,007	0,171±0,012	0,055±0,007	0,108±0,154
	5°	0,088±0,016	0,174±0,025	0,014±0,002	0,054±0,007
2,7 (IR)	0°	1,150±0,078	1,027±0,094	0,369±0,031	0,465±0,023
2,9 (VIS)	5°	0,826±0,057	-	0,092±0,015	-

By porównać wpływ zmiany zbieżności wiązek o porównywalnych średnicach na rogówce dla IR i VIS zestawiono znormalizowane progi widzenia przy pobudzeniu centralnym w warunkach adaptacji do ciemności –Rys. 4.2.5.

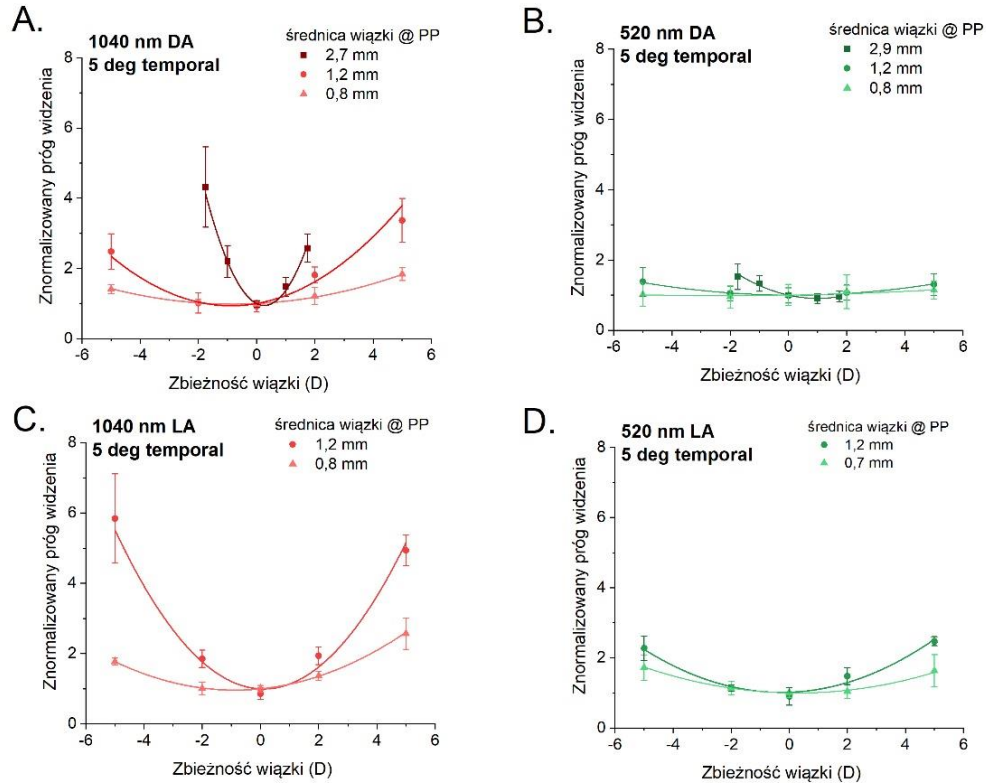


Rys. 4.2.5 Znormalizowane progi widzenia przy pobudzeniu centralnym bodźcem dla różnych rozmiarów wiązek (apertur numerycznych) w warunkach adaptacji do ciemności: A. 0,7 mm dla 520 nm i 0,8 mm dla 1040 nm ($NA=0,02$), B. 1,2 mm dla 520 nm i 1040 nm ($NA=0,04$), C. 2,9 mm dla 520 nm i 2,7 mm dla 1040 nm ($NA=0,08$).

Przedstawione wykresy pokazują, że dla wiązek o podobnych średnicach progi widzenia wiązki postrzeganej dwufotonowo wykazują silniejszą zależność od zbieżności wiązki pobudzającej niż progi widzenia wiązki postrzeganej jednofotonowo - współczynniki a dopasowanych parabol są 2-3-krotnie większe dla wiązki IR w stosunku do VIS (Tab.4.2-3). Ponadto ze wzrostem średnic wiązek (zmniejszaniem średnicy plamki na siatkówce) parabole są bardziej ściśnięte – współczynniki a dla IR zmieniają się od 0,05 do 1,15, a dla wiązki VIS od 0,027 do 0,369 (Tab. 4.2-3).

Znormalizowane wyniki eksperymentów mierzących progi widzenia w odległości 5° skroniowo od centrum siatkówki zostały przedstawione na Rys.4.2.6 Badania w warunkach LA nie zostały przeprowadzone dla największych rozmiarów wiązek (średnice na rogówce 2,7 mm dla 1040 nm oraz 2,9 mm dla 520 nm). Zastosowany w tych pomiarach teleskop

składający się z ostatniej soczewki L8 o ogniskowej $f_8=100$ mm umożliwił otrzymanie takich wielkości średnic wiązek na rogówce, jednak ograniczał jednocześnie maksymalną średnicę tła uzyskiwanego na siatkówce do 9.5° (rozdział 3.1.4) i skanowane bodźce znajdowały się poza obszarem tła.



Rys. 4.2.6 Znormalizowane średnie progi widzenia dla 3 osób zmierzone w warunkach adaptacji do światła i ciemności dla różnych rozmiarów wiązki na rogówce dla pobudzenia siatkówki 5° skroniowo (A. i C.) wiązką podczerwoną 1040 nm oraz (B. i D.) wiązką widzialną 520 nm.

Podobnie jak w przypadku pobudzenia centralnego, dla wiązki IR zauważamy silniejszą zależność progów od zbieżności niż dla wiązki VIS w obu warunkach. Ciekawą różnicą jest słabsza niż w centrum zależność progów IR od zbieżności wiązki w DA (współczynnik a około dwukrotnie większy dla obu średnic wiązki (Tab. 4.2.3), podczas gdy dla warunków LA zależności są podobne w obu pobudzanych obszarach siatkówki. W przypadku wiązki VIS w warunkach DA zależności są również słabsze niż w centrum dla obu rozmiarów wiązek, a w warunkach LA podobne dla wiązki 0,7 mm, a dwukrotnie słabsze dla wiązki 1,2 mm (Tab.4.2-3).

Przy pobudzaniu w 5° nadal możemy traktować wiązkę jako przyosiową (sinus tak małego kąta różni się od funkcji liniowej dopiero na czwartym miejscu po przecinku), jednak optyka oka zoptymalizowana jest dla centrum plamki. Poza jej obszarem ostrość widzenia szybko spada, a udział aberracji znacznie rośnie. Ponadto w tym miejscu siatkówki stosunek liczby

pręcików do czopków szacunkowo (zgodnie z Rys. 1.1.11) wynosi 75:20, podczas gdy w centrum plamki obecne są głównie czopki.

Pole powierzchni bodźca na siatkówce będącego pierścieniem ($A_{siatkówka}$) możemy obliczyć jako różnicę pól koła o promieniu $R = 0,25^\circ \approx 75 \mu\text{m}$ i koła o promieniu mniejszym o wielkość średnicy wiązki to jest $(R - d_{siatkówka})$, przy czym $d_{siatkówka}$ zawiera się między $3.9 \mu\text{m}$ a $22.8 \mu\text{m}$. Można to zapisać wzorem:

$$A_{siatkówka} = \pi(R^2 - (R - d_{siatkówka})^2) = \pi(2Rd_{siatkówka} - d_{siatkówka}^2) \approx \approx |d_{siatkówka} \ll R| \approx 2\pi R d_{siatkówka} \quad (4-6)$$

Pole powierzchni rozważanego bodźca na siatkówce zależy więc liniowo od średnicy plamki na siatkówce.

Z kolei zależność określająca próg percepcji ($I_{próg}$) jako iloraz mocy progowej i średnicy wiązki przedstawia wzór:

$$I_{próg} = \frac{P}{A_{siatkówka}} \quad (4-7)$$

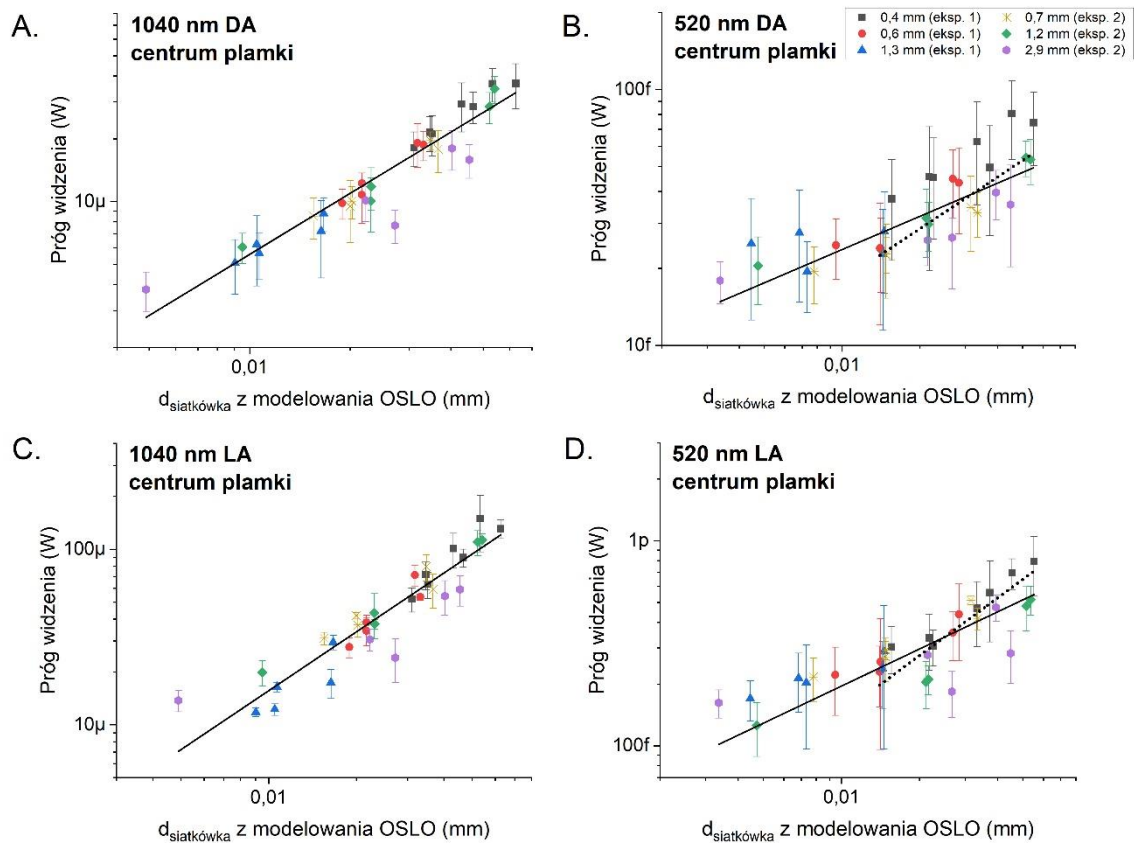
gdzie:

$I_{próg}$ – minimalna intensywność wymagana do spostrzeżenia bodźca (intensywność progowa)

P – próg widzenia (W)/moc progowa (W)

$A_{siatkówka}$ – powierzchnia bodźca na siatkówce (cm^2)

Na Rys.4.2.7 przedstawiono zależności, w których na osi poziomej oznaczono teoretyczne średnice wiązki na siatkówce (uzyskane z modelowania w OSLO, podrozdział 3.1.10) a na osi pionowej – odpowiadające im wartości progów z poszczególnych eksperymentów.



Rys. 4.2.7 Zależności progów widzenia od teoretycznej średnicy wiązki na siatkówce zmierzonych w centrum plamki: w warunkach adaptacji do ciemności dla wiązki A. 1040 nm i B. 520 nm oraz w warunkach adaptacji do światła dla wiązki C. 1040 nm i D. 520 nm. Kolorami oznaczono dane uzyskane z eksperymentów dla poszczególnych średnic wiązek w płaszczyźnie źrenicy (legenda). Każdy punkt to dane uśrednione z 3 ochotników, słupki błędów to jedno odchylenie standardowe. Liniami ciągłymi wyrysowano dopasowania liniowe do wszystkich danych, liniami kropkowanymi – dopasowania dla VIS dla średnic plamek na siatkówce większych od 0,01 mm.

Zależności dla wiązki postrzeganej dwufotonowo w warunkach DA (Rys. 4.2.7.A) i LA (Rys. 4.2.7.C) są praktycznie liniowe – dopasowane na skali log-log proste mają współczynniki kierunkowe wraz z błędem SE odpowiednio $0,97 \pm 0,07$ ($R^2 = 0,89$) i $1,11 \pm 0,07$ ($R^2 = 0,92$), co jest argumentem za bardzo liniową zależnością prezentowanych wielkości. Uznając punkty dla najmniejszej wiązki na siatkówce jako odstające (fioletowe koła dla wiązki 2,9 mm po lewej stronie wykresów) uzyskujemy współczynniki kierunkowe dopasowanych prostych odpowiednio: $1,03 \pm 0,07$ ($R^2 = 0,88$) i $1,17 \pm 0,06$ ($R^2 = 0,93$).

Dane uzyskane dla wiązki widzialnej w warunkach DA (Rys. 4.2.7.B) i LA (Rys. 4.2.7.D) w pierwszym podejściu również dopasowano do funkcji liniowej – współczynniki kierunkowe dopasowanych prostych wraz z błędem SE wynoszą odpowiednio: $0,43 \pm 0,05$ ($R^2 = 0,76$) oraz $0,60 \pm 0,09$ ($R^2 = 0,62$). Jeśli uznamy, że zależności cechują się liniowością dla średnic na siatkówce większych niż 0,01 mm, przy której to średnicy następuje załamaniem zależności i wypłaszczenie progów dla mniejszych średnic na siatkówce,

to dopasowane proste mają współczynniki kierunkowe odpowiednio: $0,67 \pm 0,07$ ($R^2 = 0,78$) dla warunków DA oraz $0,93 \pm 0,13$ ($R^2 = 0,70$) dla warunków LA. W tym podejściu współczynniki kierunkowe mają wyższe wartości z lepszym współczynnikiem R^2 .

Progi dla wiązek VIS mają większe niepewności w porównaniu do progów IR, a ich aproksymacje liniowe mają mniejsze wartości R^2 .

4.2.5 Dyskusja

Różnice w wartościach progów dla wiązek o różnych średnicach dla 0 D (Rys. 4.2.2) w przypadku wiązek postrzeganych dwufotonowo pokazują, że aberracje zdają się mieć mniejszy wpływ na progi widzenia wiązek postrzeganych dwufotonowo (progi dla wiązek widzialnych mają większe niepewności i nie różnią się statystycznie). Prace Artala i współpracowników [161], [162] wykazują, że dla fal z zakresu 633 nm – 1070 nm aberracje monochromatyczne w oku zależą od długości fali, jednak aberracje monochromatyczne wyższego rzędu są niewielkie i stosunkowo stałe. Mniejszy wpływ aberracji na progi widzenia, nie wynika więc z różnicy w stosowanych długościach fali, lecz z natury procesu dwufotonowego. Tylko centralna część wiązki posiada odpowiednią gęstość energii, by osiągnąć progi procesu dwufotonowego i rozpocząć kaskadę widzenia. Proces dwufotonowy zależy od kwadratu PSF, co powoduje, że wkład aberracji, które poszerzają funkcję rozmycia punktowego poza centralną część siatki jest mniejszy. Aberracje nie mają wystarczającego natężenia, by doprowadzić do absorpcji dwufotonowej w pigmentach wzrokowych, dlatego nie wpływają na progi.

Fakt ten może być argumentem za użyciem mechanizmu widzenia dwufotonowego jako bardziej precyzyjnej metody stymulacji siatkówki. Bardzo istotną rolę odgrywa jednak odpowiednie ustawienie zbieżności wiązki, gdyż rozogniskowanie ma większy wpływ na postrzeganie niż w przypadku wiązki jedofotonowej.

Stosując w układach z widzeniem dwufotonowym większe rozmiary wiązek (do 3 mm) powodujemy, że osobie badanej łatwiej jest przeprowadzić korekcję wady refrakcji – pacjent wyraźnie gorzej zaczyna widzieć wiązkę, gdy nie ogniskuje się ona na fotoreceptorach. Jednocześnie, nieprawidłowo przeprowadzona korekcja wady refrakcji, powoduje większe błędy pomiaru podczas wyznaczania progów widzenia.

Warunki oświetlenia przy pobudzeniu centralnym nie miały istotnego wpływu na znormalizowane progi widzenia w funkcji badanego zakresu zbieżności wiązki.

Uwzględniając kształt stosowanego w eksperymencie bodźca (pierścień) oraz fakt, że jego powierzchnia zależy liniowo, a nie kwadratowo od średnicy bodźca (4-6), stwierdzamy, że dane eksperymentalne dla wiązki postrzeganej dwufotonowo (Rys. 4.2.7.A i C) spełniają wzór (4-7) mówiący o liniowej zależności progu i powierzchni bodźca. W przypadku wiązki

widzialnej (Rys. 4.2.7.B i D) zależność (4-7) nie jest tak dobrze określona (współczynniki aproksymowanych prostych w warunkach DA i LA odpowiednio: $0,43 \pm 0,05$ ($R^2 = 0,76$) oraz $0,60 \pm 0,09$ ($R^2 = 0,62$). Może być to spowodowane tym, że wielkość bodźca zaczyna odpowiadać rozmiarem obszarowi Ricco (1.3.8). Nasuwa się jednak pytanie, dlaczego dla wiązki IR, mimo podobnego rozmiaru plamek na siatkówce co dla wiązki VIS (Tab. 4.2-2, stanowiących około 2/3 rozmiaru plamek VIS), nie obserwujemy załamania zależności. Wielkości obszaru Ricco zależą od wielu czynników (1.3.8) m.in. stanu adaptacji siatkówki – pola pręcikowe są większe, a czopkowe są mniejsze. Widzenie dwufotonowe być może jako bardziej „czopkowe” (mniejsze różnice w czułościach między czopkami i pręcikami niż w widzeniu normalnym - podrozdział 4.3) powoduje, że nie wchodzimy w pręcikowy obszar Ricco. Wiązka IR mniej efektywnie stymuluje pręciki, a progi zależą w większym stopniu od czopków. Tak więc jednym z możliwych wyjaśnień braku załamania zależności może być inna wydajność pobudzania fotoreceptorów przez obie wiązki.

Wartości progów dla wiązek skolimowanych w warunkach DA jak i LA, dla tego eksperymentu, pozwalają na oszacowanie wydajności procesu dwufotonowego w stosunku do jednofotonowego jako około 8 rzędów wielkości mniejszą. Różnica w stosunku do wyniku poprzedniego eksperymentu (6 rzędów wielkości, podrozdział 4.1.5) może wynikać z kwadratowej zależności jasności bodźca dwufotonowego od mocy. Jasność zmienia się liniowo w widzeniu jednofotonowym, a kwadratowo – w dwufotonowym. Dlatego względna różnica jasności będzie się zmniejszać wraz z mocą bodźca. Różnice wydajności szacowane były w obcym eksperymencie na podstawie progów absolutnych, w poprzednim (4.1) – na wyższych poziomach jasności.

4.2.6 Wnioski

Przedstawione wyniki eksperymentów pokazują, że progi widzenia w widzeniu dwufotonowym silniej zależą od rozmiaru wiązki w płaszczyźnie źrenicy i jej zbieżności niż w widzeniu jednofotonowym. Mniejszy wpływ aberracji wiązek podczerwonych na progi widzenia (objawiający się istotnie różnymi wartościami progów w 0 D dla badanych średnic wiązek) może być argumentem za użyciem dwufotonowego mechanizmu widzenia jako bardziej precyzyjnej metody stymulacji siatkówki.

4.3 Krzywe adaptacji do ciemności

4.3.1 Motywacja i cel badania

Różnicowanie odpowiedzi czopków i pręcików umożliwiają m.in. krzywe adaptacji do ciemności, które dostarczają oddzielnie informacji o ich czułości (podrozdział 1.4.3)

w testowanej lokalizacji na siatkówce. Celem badań przedstawionych w tym podrozdziale była odpowiedź na trzecie pytanie badawcze postawione we wstępie pracy poprzez uzyskanie krzywych adaptacji do ciemności dla widzenia dwufotonowego, porównanie ich z krzywymi w widzeniu jednofotonowym, a dzięki temu porównanie względnych odpowiedzi czopków i pręcików na bodźce podczerwony i widzialny. Te dwa typy fotoreceptorów różnią się morfologią, zawierają różny pigment wzrokowy, w różny sposób przetwarzają sygnały, są inaczej połączone z kolejnymi neuronami siatkówki. Związane z odmiennością tych komórek różnice w początkowej fazie przetwarzania sygnału optycznego na nerwowy sugerują, że możemy spodziewać się istnienia jakiejś różnicy w przebiegach krzywych adaptacji do ciemności w tych dwóch mechanizmach widzenia. Wstępnie sformułowano następującą hipotezę: względne odpowiedzi czopków i pręcików wywołane widzeniem dwufotonowym różnią się od wywołanych widzeniem jednofotonowym.

4.3.2 Badana grupa

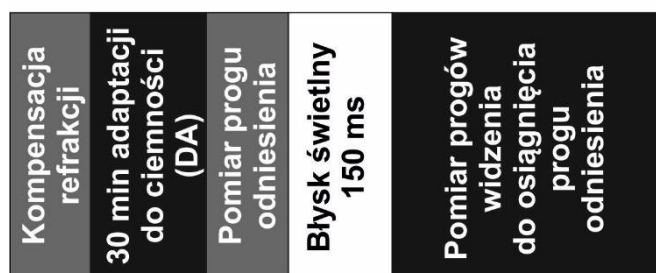
Z uwagi na fakt, że badania były czasochłonne i męczące – zebranie jednej krzywej wymagało wielokrotnych pomiarów chwilowych progów widzenia przez pół godziny poprzedzonych półgodziną adaptacją do ciemności – w eksperymencie tym brało udział dwoje zdrowych ochotników w wieku 40 i 32 lat. Badano prawe oko ochotnika S1 z wadą refrakcji -1,5 D oraz lewe oko ochotnika S2 z wadą refrakcji -3,5 D. Nie stosowano rozszerzenia źrenicy ani paraliżu akomodacji.

4.3.3 Procedura pomiarowa i metodologia badania

Przebieg procedury pomiarowej ukazuje schemat na Rys. 4.3.1. Na początku przeprowadzano korekcję wad refrakcji dla obu wiązek i fiksacji (podrozdział 3.2.1). Następnie uczestnik przez 30 minut adaptował się do ciemności. Po tym ochotnik pięciokrotnie mierzył próg widzenia (próg odniesienia, P_{ref}) a badane oko było poddawane ekspozycji na krótkotrwałą (150 ms) bodziec świetlny ($7,3 \cdot 10^6$ Td·s, jednostki skotopowe) o kolorze białym lub zielonym 510 nm (widma na Rys. 3.1.5), który powodował wybielenie pigmentów wzrokowych, a więc chwilowe olśnienie. Następnie uczestnik badania wielokrotnie mierzył swój chwilowy próg widzenia (P_t) „odzyskiwany” w różnych odstępach czasu po ekspozycji na błysk. W badaniu stosowano procedurę wyznaczania progu metodą dopasowania od góry (opisaną w 1.4.2). Badany szukał progów widzenia aż do momentu osiągnięcia progu odniesienia (do około 30 minut).

Bodźcem był migający okrąg o średnicy $0,5^\circ$ lub $3^\circ 20'$ padający w centrum plamki lub w odległości $6,5^\circ$ skroniowo od niej. Soczewki L5 i L8 (Rys. 3.1.6) miały ogniskowe

$f_5 = f_8 = 50$ mm. Do korekcji wady refrakcji badanego używano jedynie soczewki L7 – zmieniając jej położenie dla każdej z wiązek oddzielnie. W miejsce BS3 (Rys. 3.1.6) umieszczono DM (T800Rlpxrt, Chroma), a jako element kombinujący wiązki użyto BS (BS017, Thorlabs). Wiązki laserowe w tym eksperymencie były doprowadzane na platformę główną układu za pomocą pięciometrowych światłowodów jednomodowych (P3-980-A-FC-5 dla wiązki 1040 nm oraz P3-460-B-FC5 dla wiązki 520 nm). Do budowy kolimatorów użyto soczewek o ogniskowych $f = 19$ mm. Rozmiar wiązki padającej na rogówkę był równy 1,5 mm ($1/e^2$). Zastosowanie światłowodów do transmisji wiązek laserowych spowodowało poszerzenie impulsów szacowane na około ~1-2 ps. Podczas pomiarów adaptacji do ciemności mierzono wielkość i pozycję źrenicy badanego.



Rys. 4.3.1 Procedura pomiarowa w badaniu krzywych adaptacji do ciemności.

By oszacować stopień wybielenia rodopsyny przez błysk światła LED, zastosowano wzór obowiązujący dla krótkotrwałych bodźców o dużym natężeniu [163]:

$$B = 1 - e^{-\frac{L}{L_{Rh}}} \quad (4-8)$$

gdzie:

B – stopień wybielenia rodopsyny

L – całkowite natężenie oświetlenia na siatkówce (log Td·s, jednostki skotopowe)

L_{Rh} – stała wybielenia (6,8 – 7,8 log Td·s, jednostki skotopowe)

W omawianym eksperymencie, pojedynczy błysk LED dostarczał natężenie oświetlenia siatkówki $L = 7,28 \cdot 10^6$ (Td·s, jednostki skotopowe). Przyjmując stałą wybielenia jak u osób zdrowych – zgodnie z [163] jako $L_{Rh} = 10^7$ (Td·s, jednostki skotopowe) obliczamy stopień wybielenia rodopsyny $B \approx 50$ %.

W pliku tekstowym zapisywane były wartości mocy progowych mierzonych przez miernik wewnętrzny podczas znalezienia progów widzenia przez ochotnika. Próg odniesienia obliczano jako średnią arytmetyczną z progów zmierzonych tuż przed błyskiem świetlnym wybielającym pigmenty wzrokowe. Procedura kończyła się, gdy progi chwilowe badanego osiągały niższe wartości niż próg odniesienia.

Na wykresach z wynikami przedstawiono krzywe adaptacji do ciemności jako poziom progów wyrażony w jednostkach \log_{10} w funkcji czasu od momentu wybielenia pigmentów wzrokowych. Dodatkowo z powodu kwadratowej zależności progów wiązek postrzeganych dwufotonowo od mocy, wartości logarytmów dla 1040 nm zostały pomnożone przez czynnik 2. Logarytm poziomu progów policzono jako stosunek chwilowej mocy progowej do mocy progów odniesienia:

$$\log_{10}(\text{poziom prog}) = \log_{10} \frac{P_t}{P_{ref}} \quad (4-9)$$

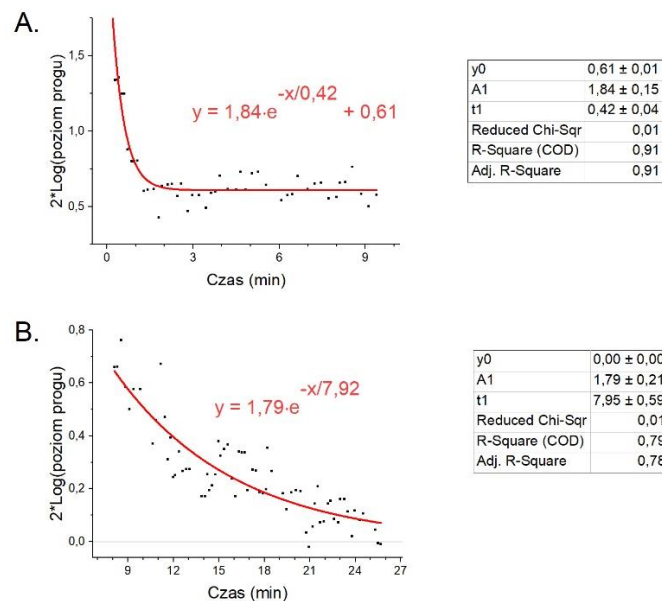
gdzie:

P_t – moc progów chwilowych (W)

P_{ref} – moc progów odniesienia (W)

Poziom progów można obliczać zgodnie ze wzorem (4-9) podstawiając albo obie moce jako moce mierzone bezpośrednio na mierniku wewnętrznym albo obie moce progów przeliczone na moc w płaszczyźnie źrenicy.

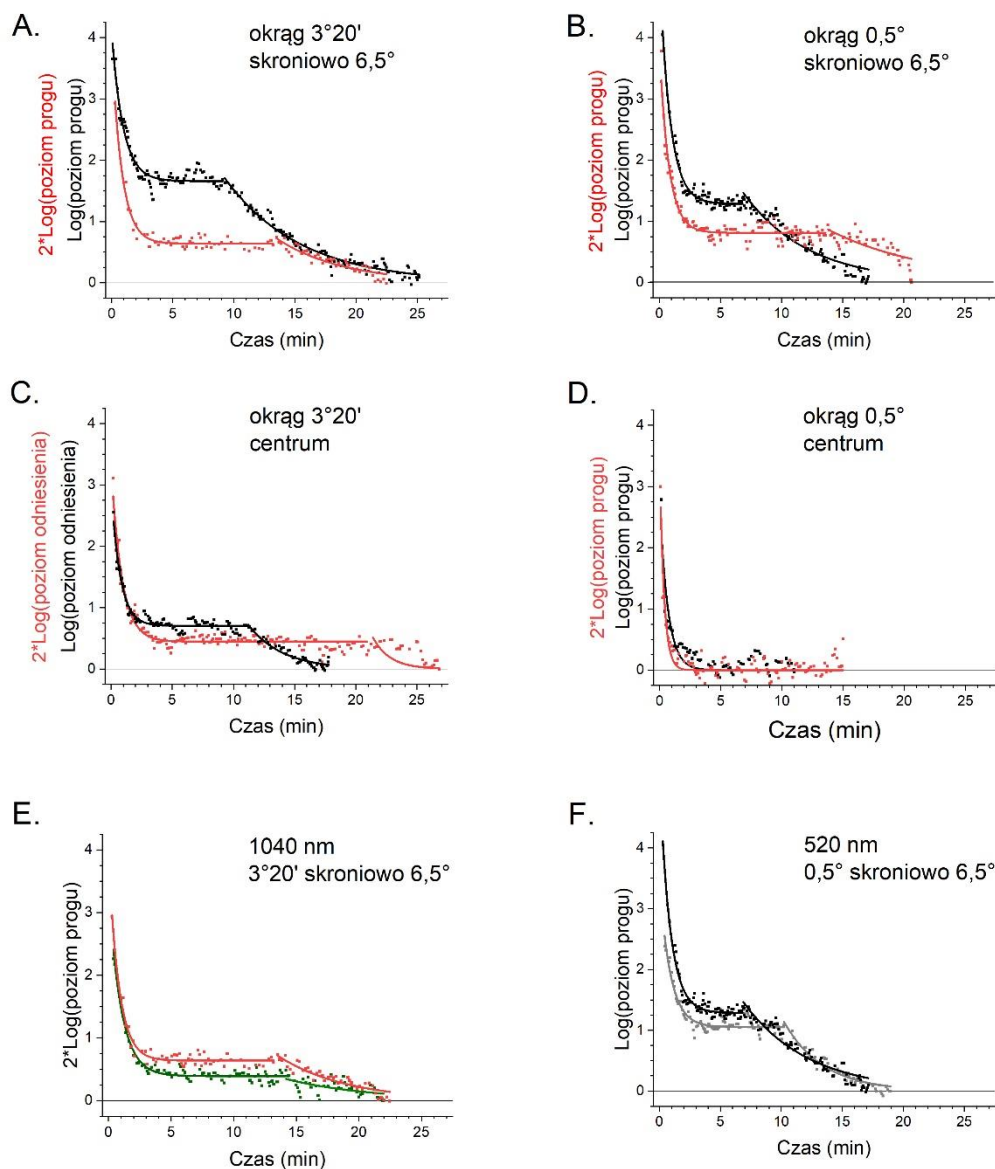
W sumie wykonano 24 próby dla ochotnika S1 oraz 4 próby dla ochotnika S2, natomiast do prezentacji wyników wybrano 16. Do otrzymanych przebiegów krzywych adaptacji do ciemności, dopasowywano funkcje eksponencjalne. Do części czopkowej krzywych dopasowywano funkcję postaci $y = A_1 \cdot e^{-\frac{x}{\tau_1}} + y_0$, natomiast do części pręcikowej wymuszano $y_0 = 0$ (równoznaczne z osiągnięciem przez krzywą progów odniesienia), stąd funkcja miała postać $y = A_1 \cdot e^{-\frac{x}{\tau_1}}$. Przykładowe dane z pomiarów S2, rozdzielone na dwa panele (część czopkową i pręcikową), wraz z dopasowanymi do nich funkcjami i szczegółowymi parametrami dopasowań przedstawiono na Rys. 4.3.2.



Rys. 4.3.2. Przykładowe dopasowania funkcji eksponencjalnych (czerwone linie) do części A. czopkowej i B. pręcikowej krzywej adaptacji do ciemności dla bodźca 1040 nm. Czarnymi punktami oznaczono dane – progi pomierzone przez ochotnika S2, przy pobudzeniu okręgiem 0,5° w oddaleniu od centrum plamki 6,5° skroniowo po oślepieniu białą diodą LED. Wzory dopasowanych funkcji umieszczono nad krzywymi. W tabelach obok wykresów zestawiono parametry dopasowań. Dodatkowo z powodu kwadratowej zależności progów wiązek postrzeganych dwufotonowo od mocy, wartości logarytmów zostały pomnożone przez czynnik 2.

4.3.4 Wyniki

Obie długości fali były postrzegane przez ochotników jako zielone. Dla ochotnika S3 przeprowadzono sześć rodzajów eksperymentów, których wyniki zestawiono na Rys. 4.3.3. Parametry dopasowanych funkcji eksponencjalnych zestawiono w tabelach Tab. 4.3-1 dla części czopkowej i Tab. 4.3-2 dla części pręcikowej. Dla ochotnika S2 wykonano jeden rodzaj eksperymentu. Zestawienie jego wyniku z wynikiem uczestnika S1 w tych samych warunkach eksperymentalnych przedstawia Rys. 4.3.4.



Rys. 4.3.3 Krzywe adaptacji do ciemności dla ochotnika S1 dla bodźców 520 nm (czarne i szare punkty) i 1040 nm (czerwone i zielone punkty) po wybieleniu pigmentów przez błysk światła: A. białego LED w oddaleniu skroniowym 6,5° od centrum plamki z bodźcem o rozmiarze 3°20' oraz B. o rozmiarze 0,5°; C. białego LED w centrum plamki z bodźcem o rozmiarze 3°20' oraz D. 0,5°; E. zielonego (oliwkowe punkty) i białego LED (czerwone punkty) w centrum plamki z bodźcem 1040 nm o rozmiarze 3°20' oraz F. zielonego (szare punkty) i białego LED (czarne punkty) dla bodźca 520 nm o rozmiarze 0,5°. Dopasowane do przebiegów funkcje eksponencjalne oznaczono ciągłymi liniami (czarną dla wiązki 520 nm oraz czerwoną dla 1040 nm). Czas na poziomej osi wykresów oznacza czas od włączenia bodźca wybielającego pigmenty wzrokowe.

Tab. 4.3-1 Parametry dopasowania funkcji eksponencjalnych postaci $y = A_1 e^{-x/t_1} + y_0$ do części czopkowych danych eksperymentalnych ochotnika S1 z Rys. 4.3.2. oraz odczytane załamania pręcikowo-czopkowe.

panel Rys. 4.3.3	rozmiar i λ bodźca; miejsce pobudzenia; kolor LED	$y_0 \pm SE$	$A_1 \pm SE$	$t_1 \pm SE$ (min)	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square	Załamanie pręcikowo-czopkowe
A.	3°20' 520 nm; 6,5° skroniowo; biały	1,66 ± 0,02	2,44 ± 0,11	0,93 ± 0,06	0,018	0,911	~9 min
B., F.	0,5° 520 nm; 6,5° skroniowo; biały	1,29 ± 0,01	3,95 ± 0,15	0,85 ± 0,03	0,009	0,953	~7 min
C.	3°20' 520 nm; centrum; biały	0,70 ± 0,01	2,27 ± 0,12	0,73 ± 0,04	0,008	0,914	~11 min
D.	0,5° 520 nm; centrum; biały	0	2,75 ± 0,25	0,68 ± 0,07	0,036	0,738	-
A., E.	3°20' 1040 nm; 6,5° skroniowo; biały	0,64 ± 0,01	3,28 ± 0,16	0,82 ± 0,05	0,007	0,945	~13 min
B.	0,5° 1040 nm; 6,5° skroniowo; biały	0,80 ± 0,01	3,07 ± 0,12	0,78 ± 0,04	0,014	0,926	~16 min
C.	3°20' 1040 nm; centrum; biały	0,47 ± 0,01	2,90 ± 0,11	0,83 ± 0,04	0,010	0,940	~21 min
D.	0,5° 1040 nm; centrum; biały	0	3,42 ± 0,23	0,36 ± 0,03	0,025	0,836	-
E.	3°20' 1040 nm; 6,5° skroniowo; zielony	0,39 ± 0,01	2,98 ± 0,11	1,00 ± 0,04	0,006	0,967	~14 min
F.	0,5° 520 nm; 6,5° skroniowo; zielony	1,05 ± 0,01	2,42 ± 0,15	0,90 ± 0,06	0,010	0,903	~10 min

Tab. 4.3-2 Parametry dopasowania funkcji eksponencjalnych postaci $y = A_1 e^{-x/t_1} + y_0$ do części pręcikowych danych eksperymentalnych ochotnika S1 z Rys. 4.3.2. Podczas dopasowywania funkcji do danych wymuszono wartość parametru $y_0=0$.

panel Rys. 4.3.3	rozmiar i λ bodźca; miejsce pobudzenia; kolor LED	y_0	$A_1 \pm SE$	$t_1 \pm SE$ (min)	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
A.	3°20' 520 nm; 6,5° skroniowo; biały	0	7,56 ± 0,34	6,22 ± 0,14	0,006	0,966
B., F.	0,5° 520 nm; 6,5° skroniowo; biały	0	5,33 ± 0,39	5,32 ± 0,23	0,015	0,916
C.	3°20' 520 nm; centrum; biały	0	40,1 ± 9,9	2,79 ± 0,15	0,004	0,911
A., E.	3°20' 1040 nm; 6,5° skroniowo; biały	0	8,46 ± 2,01	5,48 ± 0,45	0,006	0,841
B.	0,5° 1040 nm; 6,5° skroniowo; biały	0	4,44 ± 1,34	8,45 ± 1,34	0,021	0,560
C.	3°20' 1040 nm; centrum; biały	0	1,99 E6 ± 1,1 E7	1,41 ± 0,51	0,046	-0,764
E.	3°20' 1040 nm; 6,5° skroniowo; zielony	0	2,73 ± 1,68	6,87 ± 1,75	0,146	0,037
F.	0,5° 520 nm; 6,5° skroniowo; zielony	0	26,63 ± 5,06	3,24 ± 0,17	0,309	0,016

Załamania pręcikowo-czopkowe u ochotnika S1 dla wiązki 520 nm we wszystkich badanych warunkach (A-C) występuje wcześniej niż dla wiązki 1040 nm (Tab. 4.3-1).

Rys. 4.3.3.A przedstawia przebiegi krzywych adaptacji do ciemności po wybieleniu pigmentów wzrokowych białym błyskiem światła LED dla bodźców 520 nm i 1040 nm o rozmiarze 3°20' w oddaleniu 6,5° skroniowo. Progi widzenia wracają do poziomu progu odniesienia po odpowiednio 25 i 23 minutach, a załamania pręcikowo-czopkowe (rozdział 1.4.3) dla tych wykazujących dwufazowość przebiegów występują po około 9 i 13 minutach. Plateau czopków ma odpowiednio wartości $1,66 \pm 0,02$ i $0,64 \pm 0,01$, co wskazuje na mniejszą różnicę czułości między czopkami i pręcikami dla bodźca dwufotonowego. Zauważyć można, że część krzywej VIS, od około 17 minuty, zbiega się z częścią krzywej IR podniesioną do kwadratu.

Rys. 4.3.3.B przedstawia krzywe adaptacji do ciemności w warunkach analogicznych jak w A., ale dla mniejszego bodźca ($0,5^\circ$). Progi odniesienia są osiągnięte szybciej niż w poprzednich warunkach – po około 17 minutach dla bodźca 520 nm i 21 minutach dla bodźca 1040 nm. Plateau czopków wynosi odpowiednio $1,29 \pm 0,01$ i $0,80 \pm 0,01$, a załamania pręcikowo-czopkowe występują po 7 i 16 minutach.

Przeprowadzono również badania krzywych adaptacji do ciemności w centrum plamki po oślepieniu błyskiem światła białego LED dla obu długości fal i kombinacji obu rozmiarów bodźców (Rys. 4.3.3.C i Rys. 4.3.3.D). Wyniki przedstawione na Rys. 4.3.3.C porównują przebiegi krzywych adaptacji przy pobudzeniu centralnym bodźcem o rozmiarze $3^\circ 20'$ dla pobudzenia jedno- i dwufotonowego. Próg widzenia dla bodźca 520 nm powraca do stanu sprzed adaptacji po około 18 minutach, a dla 1040 nm po około 27 minutach. Oba przebiegi zdają się wykazywać dwufazowy charakter, przy czym przebieg dwufotonowy jest bardziej płaski. Załamania pręcikowo-czopkowe występują około 12 minuty dla wiązki 520 nm i około 22 minuty dla wiązki 1040 nm. Wyznaczone z dopasowań plateau czopków ma wartość odpowiednio $0,70 \pm 0,01$ i $0,47 \pm 0,01$. Bodziec o rozmiarze $3^\circ 20'$ pobudza zarówno czopki obecne w takiej odległości od centrum plamki pręciki (podrozdział 1.1.9). Wynik ten również pokazuje, że różnice w czułości między czopkami a pręcikami są mniejsze dla pobudzenia dwufotonowego.

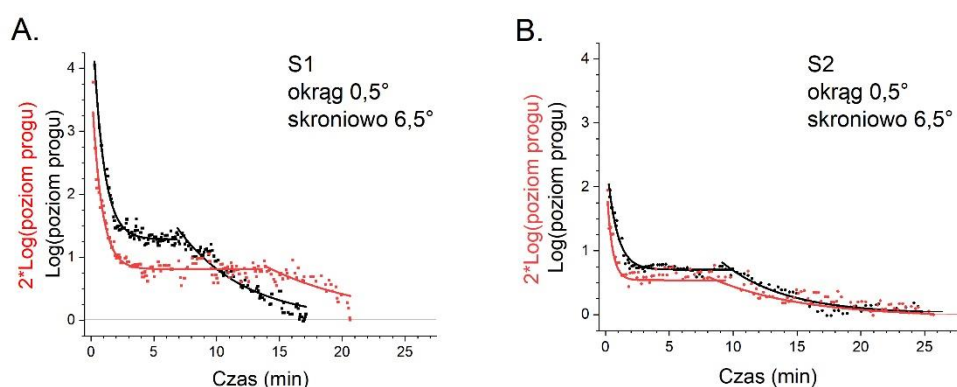
Na Rys. 4.3.3.D zestawiono krzywe dla pobudzenia centralnego bodźcami o rozmiarach $0,5^\circ$ dla obu wiązek. Oba przebiegi są płaskie i nie wykazują dwufazowości. Dołeczek siatkówki o rozmiarze $1^\circ 40'$ zawiera wyłącznie czopki (podrozdział 1.1.9), tak więc przy założeniu zminimalizowanych ruchów oka bodziec o rozmiarze $0,5^\circ$ stymuluje tylko ten rodzaj fotoreceptorów, w związku z czym nie obserwujemy pręcikowej części wykresu. Próg odniesienia dla tego przypadku jest progiem czopkowym. Mimo szybkiego osiągnięcia wartości progu odniesienia przez progi chwilowe (poniżej 5 minut) pomiary były kontynuowane, by otrzymać dłuższy przebieg.

Porównując wykresy dla pobudzeń centralnych 520 nm i 1040 nm z Rys. 4.3.3.C i Rys. 4.3.3.D widzimy, że pobudzenie większymi bodźcami (okrąg obejmujący większe średnice wokół centrum plamki) skutkuje dłuższymi, mniej zakłóconymi przebiegami, w których dopatrzeć się możemy słabej dwufazowości.

Badano również wpływ koloru błysku powodującego olśnienie (LED biały lub LED zielony 510) na uzyskane krzywe adaptacji do ciemności dla ochotnika S1. Progi mierzono w oddaleniu od centrum plamki $6,5^\circ$ skroniowo. Wykonano dwie próby dla bodźców 1040 nm o rozmiarze $3^\circ 20'$ – dla białej i zielonej diody LED oraz dwie próby dla bodźca 520 nm o rozmiarze $0,5^\circ$ na obu tłach. Wyniki przedstawiono odpowiednio na Rys. 4.3.3.E i Rys. 4.3.3.F. Zgodnie z Tab. 4.3-1 poziomy plateau czopków dla wiązki podczerwonej

wynosiły $0,64 \pm 0,01$ dla białego LED oraz $0,39 \pm 0,01$ dla zielonego LED. Załamanie pręcikowo-czopkowe wystąpiło ~ 13 minuty dla białego błysku i ~ 14 minuty dla zielonego. Dla wiązki widzialnej dla LED białego vs. zielonego plateau określono na $1,29 \pm 0,01$ vs. $1,05 \pm 0,01$ a załamanie pręcikowo-czopkowe ~ 7 minuty vs. ~ 10 minuty.

Dla drugiego ochotnika przeprowadzono próby z białym błyskiem LED, dla pobudzenia bodźcami 520 nm i 1040 nm o rozmiarze $0,5^\circ$ w miejscu odległym o $6,5^\circ$ skroniowo. Wynik tego badania przedstawia Rys. 4.3.4.B i jest zestawiony z prezentowanym wyżej wynikiem dla tych samych warunków u ochotnika S1 (Rys. 4.3.4.A). Parametry dopasowanych krzywych do przebiegów S2 zestawiono w Tab. 4.3-1.



Rys. 4.3.4 Przebiegi krzywych adaptacji do ciemności po wybieleniu pigmentów wzrokowych błyskiem światła białej diody LED, przy pobudzeniu bodźcami 520 nm (czarne punkty) i 1040 nm (czerwone punkty) o rozmiarze $0,5^\circ$ w odległości $6,5^\circ$ skroniowo od centrum plamki dla ochotników A. S1 oraz B. S2.

Dla ochotnika S2 w przypadku czopków odzyskiwane progi dla wiązek 520 nm i 1040 nm szybko osiągnęły plateau na poziomie odpowiednio $0,72 \pm 0,01$ i $0,62 \pm 0,02$ (dla S1 odpowiednio $1,29 \pm 0,01$ i $0,80 \pm 0,01$). Punkty załamania pręcikowo-czopkowe wystąpiły po około 10 i 9 minutach (dla S1 po około 7 i 16 minutach). Pełny powrót do czułości początkowej następował dla obu bodźców w ciągu 25 min po oślepieniu.

Tab. 4.3-3 Parametry dopasowania funkcji eksponencjalnych postaci $y = A_1 e^{-x/t_1} + y_0$ do części czopkowych i pręcikowych do danych eksperymentalnych ochotnika S2 z Rys. 4.3.4.B.

	$y_0 \pm SE$	$A_1 \pm SE$	$t_1 \pm SE$ (min)	Reduced Chi-Sqr	Adj. R- Square	Załamanie pręcikowo- czopkowe
1040 nm część czopkowa	$0,62 \pm 0,02$	$1,84 \pm 0,16$	$0,42 \pm 0,04$	0,008	0,909	~ 9 min
1040 nm część pręcikowa	0	$1,68 \pm 0,22$	$8,41 \pm 0,69$	0,007	0,742	
520 nm część czopkowa	$0,72 \pm 0,01$	$1,86 \pm 0,08$	$0,79 \pm 0,05$	0,005	0,963	~ 10 min
520 nm część pręcikowa	0	$9,14 \pm 2,43$	$4,19 \pm 0,37$	0,005	0,890	

4.3.5 Dyskusja

Różnica w czułości między czopkami a pręcikami dla bodźca dwufotonowego w porównaniu z bodźcem widzialnym była mniejsza we wszystkich badanych przypadkach. Wszystkie otrzymane przebiegi czasowe krzywych adaptacji do ciemności w oddaleniu od centrum plamki mają klasyczny dwufazowy przebieg [164]. Po punkcie załamania pręcikowo-czopkowego, za poziom progu odpowiadały adaptujące się do ciemności pręciki. Brak części pręcikowej krzywej adaptacji występuje przy pobudzeniu centralnym, bodźcem o małych rozmiarach (Rys. 4.3.3.D) - mniejszych niż dołeczek siatkówki, gdzie nie jest obecny ten rodzaj fotoreceptorów.

Dla ochotnika S1 załamania pręcikowo-czopkowe dla wiązki 520 nm występują zawsze wcześniej w porównaniu do pobudzenia dwufotonowego – plateau czopków było zawsze dłuższe dla krzywych dwufotonowych. Dla ochotnika S2 załamanie występuje szybciej dla wiązki 1040 nm, choć różnica w porównaniu do wiązki widzialnej nie jest duża (około 1 minuty). Dodatkowo w przypadku uczestnika S2 różnice czułości między czopkami a pręcikami nie są tak duże jak dla S1. Należy jednak uwzględnić, że u ochotnika S2 przeprowadzono tylko jeden rodzaj eksperymentu i wykonano na nim tylko cztery próby prowadzące do uzyskania dwóch krzywych adaptacji do ciemności. Mniejsze doświadczenie w wykonywaniu eksperymentu również mogło wpłynąć na otrzymane wyniki. Ponadto S2 miał stosunkowo dużą wadę wzroku, co zostanie szerzej rozważone w dalszej części dyskusji. Skala logarytmiczna pionowej osi czułości została zachowana na Rys. 4.3.4. Warto zauważyć, że pierwszy próg zmierzony przez S2 ma wartość na skali logarytmicznej prawie dwukrotnie mniejszą niż pierwszy próg zmierzony przez S1. Może to wynikać właśnie z mniejszego doświadczenia uczestnika S1 albo pokazywać, że jego pigmenty wzrokowe nie zostały wybielone w tak dużym jak dla S1 stopniu.

Sprawą wartą rozważenia jest wielkość wpływu korekcji wady refrakcji ochotników na rozmiar i lokalizację bodźca. Nasz układ pomiarowy charakteryzuje się brakiem stałej zależności między kątem skanerów a rozmiarem bodźca dla ochotników z różnymi wadami. Zależność (3-6) jest prawdziwa dla oka emetropowego. Dla oka krótkowidza, korekcja wady refrakcji wymaga wydłużenia teleskopu L7:L8, czyli zmniejszenia odległości soczewki L7 od skanerów, które po takiej operacji nie znajdują się już w ognisku soczewki L7. Powoduje to zmianę przełożenia kątów skanera na kąty w oku (podrozdział 3.1.8). Wady refrakcji uczestników badania zostały przeliczone zgodnie z wartością przelicznika 2,5 mm/D (podrozdział 3.1.10) na przesunięcia soczewki L7, która dla oka emmetropowego dla wiązki widzialnej znajduje się w odległości 150 mm od skanerów. Odległość między skanerami a soczewką L7 wykorzystano następnie do przeliczenia zadanego na skanery kąta na kąt wyjściowy w oku zgodnie z równaniem ((3-10). Wyniki zestawiono w Tab. 4.3-4

Tab. 4.3-4 Wpływ korekcji wady refrakcji uczestnika badania (zmiany odległości soczewki L7 od skanerów) na wielkość kątową bodźca i przesunięcie na siatkówce; OE – oko emetropowe, S1 – ochotnik 1, S2 – ochotnik 2.

Ochotnik	Wada refrakcji (D)		Odległość skaner-soczewka L7 (mm)		Wielkość kątowa bodźca (°)		Przesunięcie pobudzenia (°)		Zmiana rozmiaru bodźca (°)		Przesunięcie obszaru pobudzenia (°)	
	520 nm	1040 nm	520 nm	1040 nm	520 nm	1040 nm	520 nm	1040 nm	520 nm	1040 nm	520 nm	1040 nm
OE	0	1.5	150	153.75	0.500	0.512	6.500	6.661	0.0	0.0	0.0	0.0
S1	-1.5	0	146.25	150	0.488	0.500	6.339	6.500	-0.7	-0.7	-9.7	-9.7
S2	-3.5	-2	141.25	145	0.471	0.483	6.124	6.285	-1.7	-1.7	-22.6	-22.6

Przeliczone wartości pokazują, że korekcja wady refrakcji uczestnika powodowała nieznaczną zmianę rozmiaru kąowego bodźca pobudzającego oraz zmianę miejsca pobudzania w stosunku do oka emetropowego. Różnica w wadach uczestników badania wynosiła -2 D. Ochotnik S2 był pobudzany mniejszym o 1' bodźcem niż S1, który znajdował się o około 13' bliżej plamki żółtej niż bodziec dla S1. Różnice te nie wydają się być znaczące – tak więc większa wada refrakcji nie powinna mieć wpływu na wyniki.

Przyczyny zaobserwowanych różnic wyników między ochotnikami można upatrywać w osobniczych cechach – stosunku liczebności i rozkładu mozaiki poszczególnych fotoreceptorów [36], [37]. Jednakowe oddalenie od dołka nie gwarantuje takiego samego rozkładu fotoreceptorów w każdym oku. Ponadto mozaika czopków w centrum plamki w oczach krótkowzrocznych jest rozciągnięta w porównaniu do oka emetropowego [165], a odstępy między czopkami są większe [166]. Te różnice anatomiczne również mogły wpłynąć na wyniki S2, którego wada jest znacząco większa niż S1.

Różnice w widmach błysków wybielających są znaczne (Rys. 3.1.5) i mimo zachowania tego samego poziomu trolandów, parametry funkcji dopasowanych do krzywych różnią się między sobą. Krzywe adaptacji do ciemności po olśnieniu białą diodą znajdują się powyżej swoich odpowiedników dla zielonej diody LED. Może być to związane z tym, że światło zielone w mniejszym stopniu wybiela pigmenty wzrokowe zawarte w czerwonych czopkach – tak więc wybielana jest mniejsza część fotoreceptorów. Zgodnie z tym tokiem rozumowania, powoduje to mniejsze wybielenie i mniejszy spadek czułości, co widać na samym początku – pierwszy próg dla białego wybielenia jest wyżej niż dla zielonego. Zgadza się to ze spostrzeżeniem ochotnika, który zgłaszał, że w próbach z zielonym olśnieniem tuż po błysku wiązka 1040 nm wydawała się być czerwona, a wiązka 520 nm – żółtopomarańczowa. Może to sugerować, że czopki czerwone jako pierwsze odzyskiwały czułość, bo ich pigmenty wzrokowe nie zostały wybielone przez zielony błysk w takim stopniu jak miało to miejsce przy błysku białym. Podsumowując, kolor światła powodującego olśnienie również ma wpływ na cechy krzywych adaptacji do ciemności dla obu rodzajów bodźców. Warto również mieć na uwadze, że pomiary z zielonym LED

były wykonywane w innym dniu niż pomiary z białym LED, co również mogło zaważyć na wynikach. Biorąc pod uwagę wiele czynników, które mogą mieć wpływ na wyniki: inne ustawienie oka i głowy, czy inna predyspozycja psychofizyczna badanej osoby, lepiej byłoby porównywać wyniki uzyskiwane w tym samym dniu.

Hipotetyczne różnice w czułościach między fotoreceptorami zewnętrznej siatkówki w widzeniu dwufotonowym mogłyby być spowodowane różnicami spektralnymi w przekroju czynnym na absorpcję dwufotonową barwników wzrokowych czopków i pręcików albo lepszymi właściwościami światłowodowymi czopków. Prawdopodobieństwo absorpcji dwóch fotonów zależy od gęstości strumienia świetlnego (podrozdział 2.2). Oba typy fotoreceptorów działają jak światłowody [167], ale ze względu na różnice w wielkości i kształcie czopki mogłyby być bardziej efektywne w zbieraniu światła w procesie dwufotonowym niż pręciki.

Zgodnie z wykresem z Rys. 1.3.4 różnica czułości między czopkami i pręcikami jest różna dla różnych długości fal. Maksimum osiąga przy około 507 nm, a dla długości fali 630 nm różnica jest już znikoma. Kolor wiązki 1040 nm postrzeganej dwufotonowo ma bardziej żółty odcień niż zielona wiązka 520 nm – kolor dopasowany do 1040 nm zgodnie z [108] to około 540 nm. Dla tej długości fali różnica czułości między czopkami i pręcikami wynosi około 2,3 log (Rys. 1.3.4), niewiele różniąc się od maksimum. Jest na tyle duża, że nie da się nią wyjaśnić zmniejszonej różnicy między czułością czopków i pręcików w widzeniu dwufotonowym np. dla S1 przy pobudzeniu skroniowym bodźcu $3^{\circ}20'$, w którym wynosiła ona 0,64 log. Różnica taka odpowiada kolorowi czerwonemu – długości fali około 610 nm, a nie postrzeganemu 540 nm. Co prawda dane na Rys. 1.3.4 zebrane zostały dla 8° nad centrum plamki, a my porównujemy w analizie wynik dla $6,5^{\circ}$ skroniowo i dla innego rozmiaru i typu bodźca (obręcz a nie wypełnione koło), to i tak różnice są zbyt duże, by móc wytłumaczyć nimi mniejszą czułość dla 1040 nm.

W wielu przypadkach dopasowanie funkcji eksponencjalnej do części pręcikowej nie osiągało poziomu bliskiego zera w zakresie pomiarowym. Szczególnie w przypadku krzywych adaptacji do ciemności dla podczerwieni różnica między progiem czopkowym a pręcikowym jest mała w porównaniu do rozrzutu statystycznego, który występuje w tych pomiarach. W związku z tym wybór momentu, w którym zaczynamy dopasowywać składową pręcikową do przebiegu, jest bardzo arbitralny, co może powodować duże niedokładności w wyznaczaniu załamania pręcikowo-czopkowego. Na większy rozrzut danych mogły wpłynąć dwa czynniki możliwe do wyeliminowania w kolejnych pomiarach. Po pierwsze podczas przeprowadzanych badań ochotnicy nie mieli blokowanej farmakologicznie akomodacji ani rozszerzanej źrenicy. Badany po oślepieniu starał się zobaczyć migający bodziec, szukał go wzrokiem i mechanizm akomodacji podczas tego

procesu był z pewnością silnie wykorzystywany. Mechanizm ten ma silniejszy wpływ na postrzeganie wiązki dwufotonowej. Przy kolejnych badaniach warto zastosować środki blokujące akomodację, co może wpłynąć korzystnie na rozrzut mierzonych progów. Po drugie na stopień trudności wykonywania eksperymentu i wielkość rozrzutu mierzonych progów mógł wpłynąć zastosowany kształt bodźca. Użycie jako bodźca skanowanego kształtu spirali, który byłby zbliżony kształtem do bodźców w postaci wypełnionych kółek, stosowanych w tradycyjnych badaniach krzywych adaptacji do ciemności widzenia jednofotonowego [164] z pewnością spowodowałoby, że bodziec byłby łatwiejszy do dostrzeżenia niż stosowana w tym badaniu cienka obręcz. Rozrzut progów chwilowych może być również efektem zmęczenia badanego długotrwałym pomiarem lub dużą liczbą pomiarów.

4.3.6 Wnioski

Zaprezentowane dane wskazują na istnienie różnicy w czułości między czopkami i pręcikami w obu rodzajach widzenia. Dla wiązek podczerwonych postrzeganych dwufotonowo można postawić hipotezę, że względna różnica czułości między czopkami i pręcikami jest mniejsza niż w przypadku wiązki widzialnej. Są to dane wstępne, które pozwalają na zaplanowanie kolejnych eksperymentów, które pozwoliłyby na zweryfikowanie hipotezy o istnieniu tej różnicy. Warto byłoby przeprowadzić eksperyment na większej liczbie osób, z pobudzeniem możliwie dużym bodźcem przypominającym wypełnione koło (np. o kształcie spirali) w niecentralnych częściach siatkówki, jak to jest w innych tego typu eksperymentach w literaturze [164]. Istotnym elementem byłoby również zablokowanie akomodacji i dobór do badania ochotników o podobnych, niezbyt dużych, wadach refrakcji.

4.4 Krzywa czułości widzenia dwufotonowego

4.4.1 Motywacja i cel badania

Krzywe luminancji w widzeniu jednofotonowym zostały dobrze zdefiniowane: dla czopków określa ją fotopowa krzywa czułości $V(\lambda)$, a dla pręcików - skotopowa krzywa czułości $V'(\lambda)$. W widzeniu dwufotonowym zależności czułości od długości fali pobudzającej nie były dotąd badane i ich kształt nie jest znany. Uzyskanie takich krzywych pozwoliłoby m.in. na określanie jasności źródeł postrzeganych dwufotonowo. Celem tych badań była odpowiedź na pytanie o zakres spektralny widzenia dwufotonowego poprzez uzyskanie pierwszej krzywej czułości w widzeniu dwufotonowym oraz określenie zakresu długości fal, dla którego ten sposób percepcji światła ma miejsce.

4.4.2 Badana grupa

W badaniu brały udział trzy osoby: dwie kobiety (43 i 32; - 1,5 D) i jeden mężczyzna (28 (- 5,75 D ekwiwalent sferyczny dla 1,0). Prawidłowe widzenie barw u badanych potwierdzono trzema testami: tablicami Ishihary, testem D15 i testem Franswortha-Munsella 100-Hue. Badane były oczy prawe – u wszystkich preferowane.

4.4.3 Procedura pomiarowa i metodologia badania

Badany mężczyzna z powodu wysokiej wady refrakcji był zakraplany Tropicamidum 1 % (3 x po 1 kropli co 15 minut, a następnie 1 kropla co 30 minut). Po 30-minutowej adaptacji do ciemności (podrozdział 3.2.2) przeprowadzano dla danej badanej długości fali korekcję refrakcji (podrozdział 3.2.1) a następnie dokonywano po pięć pomiarów pojedynczych progów widzenia metodą MoA od dołu i od góry (opisane w 1.4.2 i 3.2.8). Dla długości fali, przy których występują oba sposoby widzenia wykonywano pomiary progów jednofotonowych (zanikanie całkowite bodźca, który miał kolor czerwony) oraz dwufotonowych (zanikanie zmieszanego z czerwonym koloru postrzegania dwufotonowego). Badanie z powodu czasochłonności (adaptacja do ciemności, ustawianie źródła OPO, wykonywanie charakterystyk widmowych generowanych długości fal, korekcja refrakcji ochotnika, wyznaczanie współczynników podziału mocy, wyznaczanie progów widzenia) wykonywano w trzech sesjach pomiarowych dla danej osoby (w trzy różne dni). Badania wykonywano dla zakresów 750 – 990 nm, 1100 – 1200 nm i 1200 – 1320 nm oraz dla wiązki 1040 nm.

W celu utrzymania średnicy wiązki na rogówce równej ~1 mm dla wiązki sygnałowej OPO soczewka L5 (Rys. 3.1.6) miała ogniskową $f_5=100$ mm, a dla wiązki jałowej $f_5=50$ mm. By zapewnić wystarczającą i bezpieczną moc na oko dzielnik wiązki przed skanerami BS2 (Rys. 3.1.6) był również zmieniany – w pomiarach z wiązka sygnałową był to BS029 (Thorlabs), w pomiarach z wiązką jałową BS014 (Thorlabs).

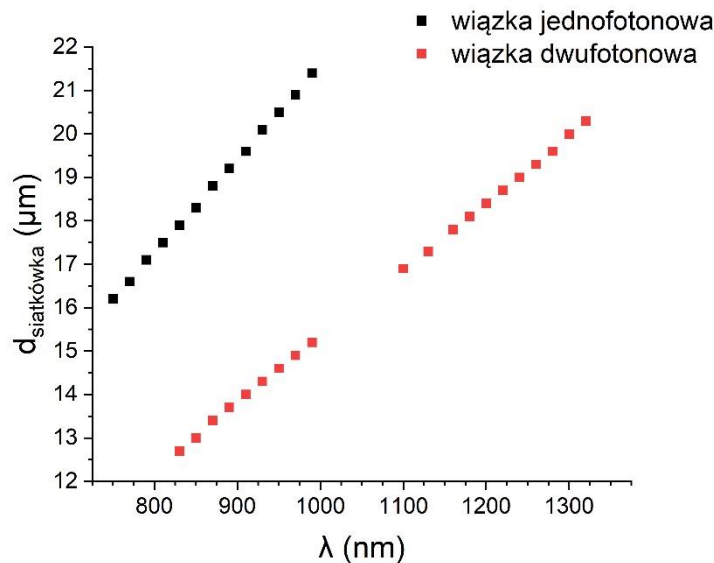
Pojedyncze progi widzenia dla każdej z długości fali i każdego sposobu postrzegania były mierzone metodą dopasowania MoA (opisaną w rozdziałach 1.4.2, 3.2.8) prowadząc do wyznaczenia pięciu progów z góry i pięciu progów z dołu. Policzono następnie uśredniony próg z góry $T_{up} \pm SD_{T_{up}}$ i z dołu $T_{down} \pm SD_{T_{down}}$. Ostatecznie średni próg widzenia policzony został jako średnia geometryczna z T_{up} i T_{down} zgodnie ze wzorem (1-12), a niepewność średniego progu widzenia policzono metodą różniczki zupełnej, zgodnie z zależnością:

$$\delta T = \delta_{T_{down}} \left| \frac{1}{2\sqrt{T_{up} \cdot T_{down}}} \right| + \delta_{T_{up}} \left| \frac{1}{2\sqrt{T_{up} \cdot T_{down}}} \right|$$

(4-10)

Przy czym $\delta_{T_{down}} = SD_{T_{down}}$ i $\delta_{T_{up}} = SD_{T_{up}}$.

Grubość krawędzi bodźca przy założeniu braku aberracji oka i średnicy wiązki na rogówce około 1 mm, zależnie od długości fali przyjmowała wartości przedstawione na Rys. 4.4.1.



Rys. 4.4.1 Rozmiar plamki na siatkówce przy pominięciu aberracji oka – ognisko jednofotonowe ($d_{siatkówka}$, 1ph) obliczone zgodnie ze wzorem (1-6), dwufotonowe ($d_{siatkówka}$, 2ph) – wzór (1-7). Średnica wiązki na rogówce wynosiła $\sim 1,0$ mm dla wszystkich długości fal.

4.4.4 Wyniki

Progi jednofotonowe określano dla zakresu długości fal 750 – 930 nm. Wiązki z tego zakresu w widzeniu jednofotonowym były postrzegane przez wszystkich badanych jako czerwone. Progi dwufotonowe były wykrywane w zakresie od 830 do 1300 nm przez wszystkich ochotników. Jeden ochotnik był w stanie określić próg widzenia dwufotonowego dla wiązki 1320 nm, dla pozostałych bezpieczna moc była za mała, by wywołać percepcję. Zakres fal 810 – 930 nm jest obszarem, w którym badani wyraźnie mogli doświadczyć dwóch sposobów postrzegania jednocześnie. Wiązki o większych mocach (przy zachowaniu MPE) były mieszaniną kolorów powstającą w wyniku pobudzenia fotoreceptorów jednocześnie jedno- i dwufotonowo. Gdy moc wiązki była obniżana, proces absorpcji dwufotonowej stawał się coraz mniej wydajny aż do momentu, gdy nie był wystarczający, by wzbudzić dwufotonową percepcję. Wtedy kolor wiązki był czerwony, bez domieszek

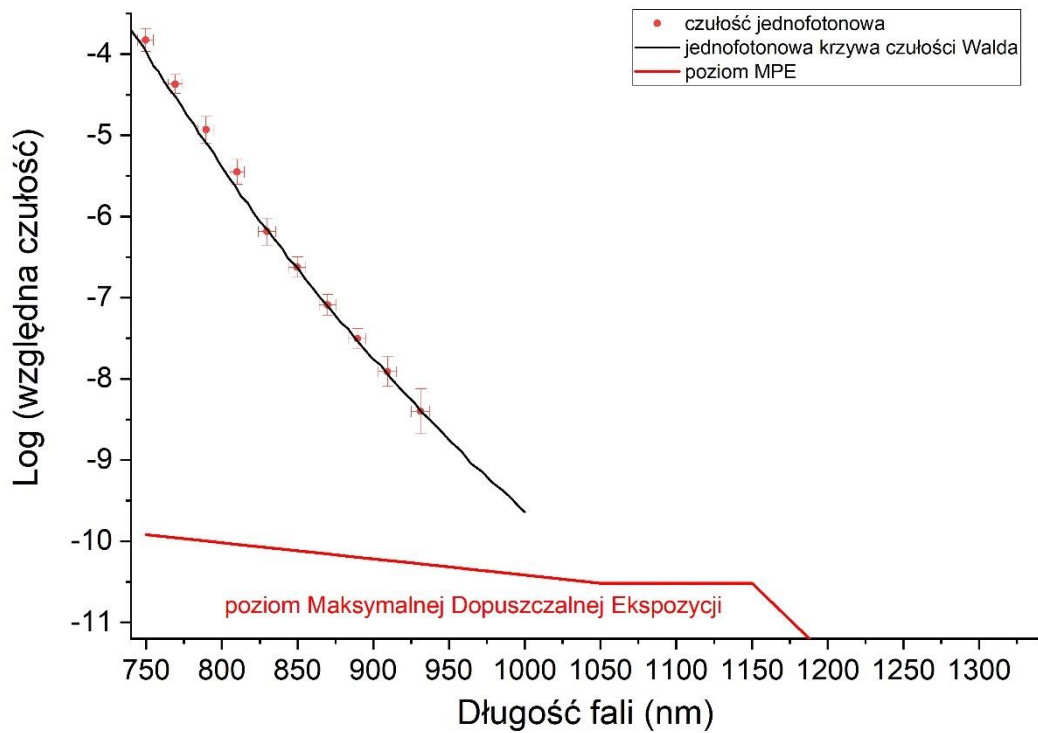
koloru dwufotonowego. Od długości fali 930 nm postrzeganie zachodziło już tylko poprzez proces dwufotonowy - niebieski kolor wiązki dwufotonowej wraz ze zwiększaniem długości fali przechodził w zielony. Dla zakresu długości fal 1100 – 1300 nm postrzegane kolory zmieniały się od jasnozielonego przez żółty, pomarańczowy aż do czerwonego. Wszyscy ochotnicy zgłaszali, że kolor silnie zależał od mocy wiązki oraz od jej zbieżności (podczas korekcji kolor zmieniał się). Dla wiązek o większych mocach i zogniskowanych kolor często określany był jako biały co może wiązać się z nasyceniem barwników w fotoreceptorach. Tab. 4.4-1 przedstawia zestawienie określonych postrzeganych kolorów dla poszczególnych długości fal.

Znalezienie granicy progu dwufotonowego dla 810 nm było trudne do określenia, mimo że widać było nieco bardziej różowy odcień dla wiązki o większej mocy. Wyniki dwufotonowe z zakresu postrzegania wywołanego dwoma rodzajami pobudzenia są obarczone większym błędem niż dla długości fal, w których nie było już wzbudzenia jednofotonowego. Ochotnicy mogli przyjąć różne strategie znalezienia progu widzenia dwufotonowego – np. uznać za próg moment, w którym kończył się wyraźnie niebieski odcień wiązki 910 nm lub moment, w którym całkowicie zniknęła domieszka koloru niebieskiego do jednofotonowo postrzeganego czerwonego. Wyniki te, trzeba więc traktować ze świadomością dużej niepewności pomiarowej, jednak nie ulega wątpliwości, że ten mechanizm postrzegania miał miejsce.

Uśrednione względne czułości jednofotonowe w zakresie długości fal 750-990 nm dla trzech ochotników przedstawiono na Rys. 4.4.2. Pionowa oś wykresu przedstawiona została w skali logarytmicznej - maksimum czułości przypada w zerze dla 555 nm [47]. Uzyskane dane są zgodne z klasycznymi historycznymi doniesieniami literaturowymi – krzywą czułości Walda [47]. Została ona wykorzystana do znalezienia poziomu odniesienia wyznaczanych w naszym eksperymencie progów – znalezione progi zostały przesunięte o wartość +13,79 w na osi logarytmicznej, by pokryć się z danymi literaturowymi. Próg dla 770 nm jest średnim progiem policzonym dla dwóch osób (ta długość fali została omyłkowo pominięta przy pomiarach jednego ochotnika).

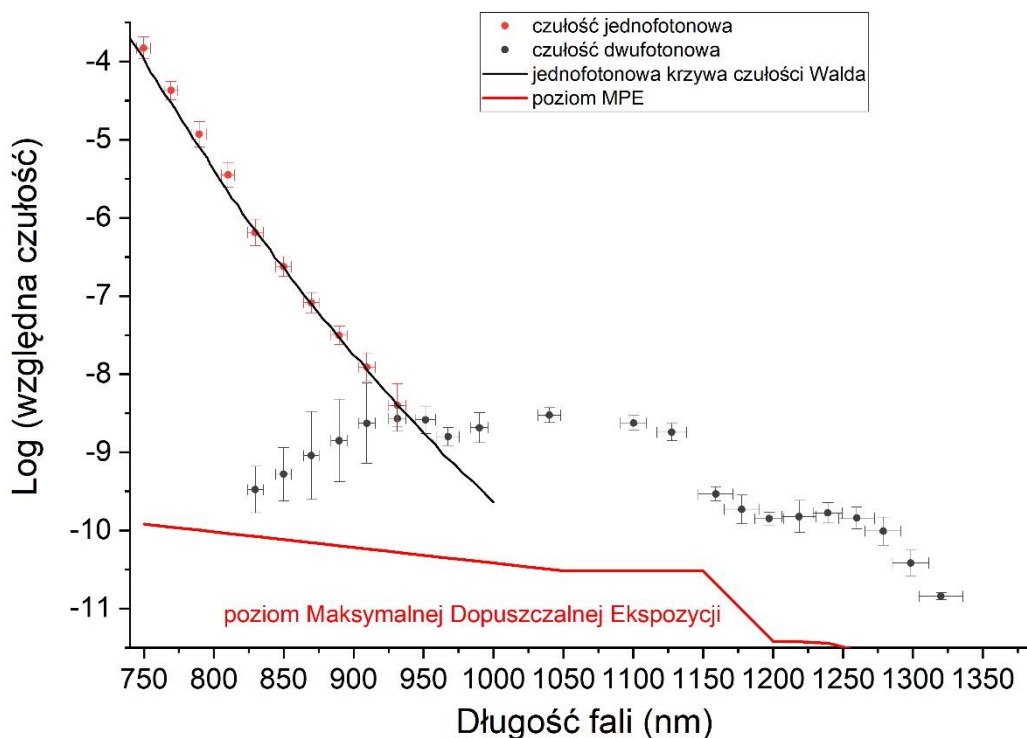
Tab. 4.4-1 Percepcja kolorów wiązek postrzeganych dwufotonowo. * - wiązki postrzegane jako czerwone w procesie jednofotonowym, ** - wiązka postrzegana tylko przez jednego ochotnika.

Długość fali (nm)	Postrzegany kolor dwufotonowy
810*	różowy
830*	różowy
850*	różowy
870*	czerwono-fioletowy
890*	fioletowy
910*	niebieski
930*	niebieski
950	niebiesko- zielony
970	zielono – niebieski/zielony
990	zielony
1040	zielony
1100	żółty/ żółto-zielony
1125	żółty/ zielono-żółty
1160	żółto-pomarańczowy/ pomarańczowy
1180	pomarańczowy
1200	pomarańczowy/ ciemnopomarańczowy lub jasnoczerwony
1220	mocny – jeszcze pomarańczowy/ słaby – czerwony
1240	czerwony/ czerwony w kolorze fiksacji (630 nm)
1260	czerwony
1280	czerwony
1300	czerwony
1320**	czerwony



Rys. 4.4.2 Uśrednione czułości jednofotonowe dla zakresu długości fal 750 nm – 930 nm oznaczone czerwonymi punktami. Krzywa czułości Walda zaznaczona na czarno [47].

Uśrednione względne czułości dwufotonowe dla trzech ochotników przedstawiono na Rys. 4.4.3. Pionową oś wykresu przedstawiono w skali logarytmicznej, a w naniesionych na wykres czułościach uwzględniono wyznaczony w poprzednim akapicie poziom odniesienia (+13,79 w na osi logarytmicznej). Próg dla 1320 nm jest progiem wyznaczonym dla jednego ochotnika.



Rys. 4.4.3 Uśrednione czułości dwufotonowe dla trzech ochotników dla zakresu długości fal 830 nm – 1320 nm. Punkt dla 1320 nm jest czułością dla jednego ochotnika.

Zaobserwować można zależną od długości fali zmianę czułości dwufotonowej. Krzywa czułości spektralnej dla widzenia dwufotonowego osiąga maksimum przy długościach fali między 990 nm a 1100 nm.

Wspomniana duża niepewność określania progów dwufotonowych w zakresie występowania obu sposobów percepcji uwidoczniła jest Rys. 4.4.3 poprzez wyższe w stosunku do pozostałych punktów wykresu odchylenia standardowe czułości (pionowe słupki błędów dla progów dwufotonowych z zakresu 830 nm – 910 nm).

W kolejnym kroku analizy danych obliczono hipotetyczne kształty dwufotonowych krzywych czułości fotopowych i skotopowych. W celu ich uzyskania wykonano następujące kroki:

1. Pobrano dane dla krzywych luminancji fotopowej $V(\lambda)$ (CIE zmodyfikowaną przez Judd (1951)) oraz skotopowej $V'(\lambda)$ (CIE (1951)) z [60].
2. Krzywe luminancji $V(\lambda)$ i $V'(\lambda)$ skorygowano o transmisję oka (podzielono przez transmitancję oka dla zakresu VIS [168])
3. Uwzględniając dwufotonową naturę postrzegania przemnożono długości fali przez czynnik 2.
4. Zmodyfikowane krzywe przemnożono przez transmitancję oka dla IR [168]

Transmitancję oka T dla podczerwonych długości fal możemy obliczyć zgodnie ze wzorem [168]:

$$T = e^{-a(\lambda)/d} \quad (4-11)$$

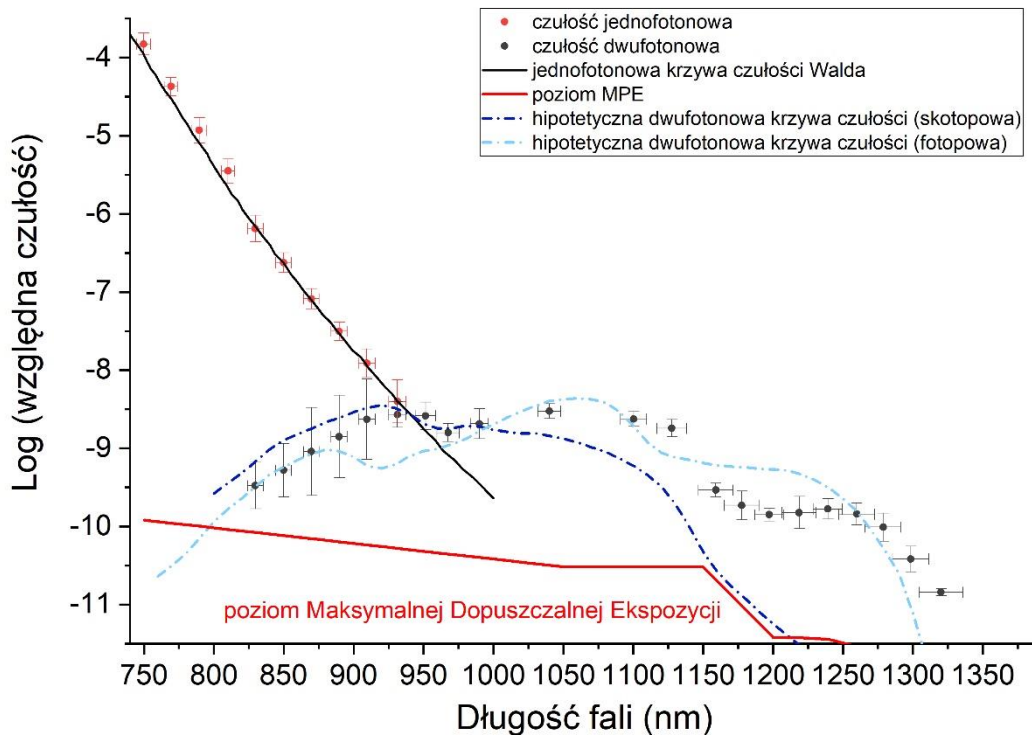
gdzie:

$a(\lambda)$ – współczynnik absorpcji podczerwieni dla danej długości fali (1/m)

d - grubość warstwy absorbującej, w rozważanym przypadku równa około 22 mm co odpowiada sumie grubości warstw znajdujących się przed siatkówką (ciała szkliste, soczewki, cieczy wodnistej oraz rogówki)

5. Znormalizowano krzywe względem ich maksimum.
6. Przesunięto w lewo hipotetyczne krzywe fotopową i skotopową na skali logarytmicznej, by dopasować je do danych – przesunięcie odpowiednio o -8,36 i -8,45.

Tak uzyskane hipotetyczne kształty dwufotonowych krzywych czułości fotopowych i skotopowych i zestawiono z wynikami (Rys. 4.4.3).



Rys. 4.4.4 Hipotetyczne kształty dwufotonowych krzywych czułości fotopowych i skotopowych zestawiono z wynikami eksperymentu.

Hipotetyczna fotopowa krzywa czułości dwufotonowej wydaje się lepiej pasować do danych eksperymentalnych niż hipotetyczna krzywa skotopowa.

4.4.5 Dyskusja

Zmierzone progi czułości jednofotonowej są zgodnie z wcześniejszymi badaniami [47], co stanowi potwierdzenie poprawności przyjętej metodologii badania progów widzenia z użyciem wiązek laserowych do wyznaczania czułości siatkówki.

Teoretyczna fotopowa krzywa czułości dwufotonowej lepiej pasowała do otrzymanych wyników. Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, że pobudzany był bardzo mały obszar centralnej części siatkówki (okrąg o promieniu $0,25^\circ$), w której dominującymi fotoreceptorami są czopki (Rys. 1.1.12). Żeby wysunąć wniosek o bardziej czopkowym charakterze widzenia dwufotonowego należałoby powtórzyć eksperyment stymulując inną część siatkówki, w której znajduje się więcej pręcików.

Widma wiązek jałowych generowanych przez OPO były dwukrotnie szersze spektralnie niż wiązki sygnałowe (Tab. 3.1-1). Mogło mieć to wpływ na postrzegany kolor i powodować różnice w dokładności wyznaczenia czułości dla obu typów wiązek generowanych przez OPO.

Badanie stanowi wstęp do dalszych badań nad czułościowym aspektem widzenia dwufotonowego. Warto byłoby wykonać eksperyment dla większej liczby osób ze źródłami światła o węższej charakterystyce spektralnej, które pozwolą również na pomiar czułości w najbardziej interesującym zakresie długości fal od 1040 nm do 1100 nm, w którym występuje maksimum czułości widzenia dwufotonowego.

4.4.6 Wnioski

Percepcja dwufotonowa dla używanego źródła OPO występowała w zakresie 830 nm – 1300 nm. Maksimum czułości przypada na zakres między 1040 nm a 1100 nm. Po raz pierwszy podjęto w badaniach spektralny aspekt widzenia dwufotonowego. Dalsze badania ze źródłami umożliwiającymi częstsze próbkowanie długości fal w zakresie maksimum pomoże określić je dokładniej. Badanie na większej liczbie osób są pożądane, by otrzymać ustandaryzowane krzywe. Ciekawym eksperymentem byłoby pobudzanie innego miejsca siatkówki, co mogłoby zwiększyć udział pręcików w percepcji bodźca i wpłynąć na kształt otrzymanej krzywej. Ponadto do pomiaru krzywych luminancji widzenia dwufotonowego można by skonstruować układ podobny do heterochromatycznej fotometrii migotania [63], w której osoba badana dopasowywałaby jasności dwóch wyświetlanych obok siebie wiązek wprowadzanych jednocześnie do oka.

5. Podsumowanie

Absorpcja dwufotonowa impulsowych wiązek laserowych zachodząca w pigmentach wzrokowych oka ludzkiego jest ciekawym zjawiskiem o dużym potencjale aplikacyjnym do precyzyjnego pobudzania siatkówki ze względu na swoją nieliniową naturę. Znaczącym atutem jest również mniejsza podatność na rozproszenia w ośrodku oka. Badania nad widzeniem dwufotonowym mogą efektywnie przyczynić się do poszerzenia wiedzy o samej siatkówce (selektywne pobudzanie fotoreceptorów).

Prace badawcze omówione w niniejszej rozprawie wymagały skonstruowania laboratoryjnego optycznego układu pomiarowego do badań psychofizycznych widzenia dwufotonowego oraz stworzenia oprogramowania sterującego. W niniejszej rozprawie opisano poszczególne elementy tego układu i omówiono zastosowaną metodologię (pomiar progów czułości, obrazowanie źrenicy oka badanego, korekcję wady refrakcji, zmianę średnicy wiązek pobudzających, możliwość pomiaru na tle i inne). Przedstawiono również wyniki czterech eksperymentów porównujących widzenie dwufotonowe z jednofotonowym, których wyniki pozwoliły odpowiedzieć na pytania badawcze postawione na początku rozprawy. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić co następujące:

1. Źrenica jest zdolna do reakcji na dwufotonową wiązkę pobudzającą, jednak reakcja ta jest o wiele słabsza niż w przypadku wiązki widzialnej o podobnej jasności i kolorze.
2. Zmiana zbieżności wiązki pobudzającej powoduje większe różnice w dwufotonowych progach widzenia, przez co ten sposób postrzegania wykazuje przewagę nad widzeniem normalnym jako narzędzie do bardziej precyzyjnej stymulacji siatkówki. Poprawna kompensacja wady refrakcji oka osoby badanej w urządzeniach wykorzystujących widzenie dwufotonowe jest kluczowa szczególnie w przypadku większych średnic wiązek pobudzających (największa badana wiązka ~3 mm). Rozmiar wiązki pobudzającej miał większy wpływ na progi widzenia w postrzeganiu dwufotonowym niż normalnym.
3. Istnieje względna różnica w czułości między czopkami a pręcikami w widzeniu dwufotonowym i wydaje się być ona mniejsza niż w widzeniu jednofotonowym dla bodźców o zbliżonym kolorze.
4. Dwufotonowa percepcja była obserwowana w zakresie 830 nm – 1300 nm. Progi widzenia dwufotonowego zależą od długości fali, a maksimum czułości przypada na zakres długości fal między 1040 nm a 1100 nm.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie pozwoliły na poszerzenie wiedzy o stymulacji wiązką podczerwoną postrzeganą w procesie widzenia dwufotonowego i stanowią znaczący krok ku zdefiniowaniu optymalnych warunków stymulacji układu

wzrokowego opartego o ten nieliniowy mechanizm. Pozwolą na lepsze zaplanowanie przyszłych eksperymentów dotyczących np. znalezienia maksimum czułości widzenia dwufotonowego, dalszego poszukiwania różnic między stymulacją czopków i pręcików przez wiązkę dwufotonową, czy wypracowania metody pozwalającej na porównywanie jasności bodźców jedno- i dwufotonowych. Wyniki rozprawy mają również istotne znaczenie dla praktycznych zastosowań widzenia dwufotonowego, zarówno rozwijanych obecnie w diagnostyce medycznej, jak i w innych obszarach w przyszłości (np. rozszerzonej rzeczywistości).

Dodatek – Metody pomiaru jasności bodźców

Podstawowe wielkości radiometryczne

Radiometria jest dziedziną nauki zajmująca się pomiarem wielkości promieniowania elektromagnetycznego. Bielecki w swoim opracowaniu [169] dzieli wielkości radiometryczne na trzy rodzaje: energetyczne, fotometryczne (światlne) i fotonowe. Przy zachowaniu tych samych oznaczeń dla danych wielkości stosuje indeksy odpowiednio e (energetyczne), v (światlne) oraz p (fotonowe). Poniższe tabele zawierają symbole, wielkości, jednostki i definicje wielkości energetycznych (Tab. 0-1 Energetyczne wielkości radiometryczne. Zaczerpnięte z [169] Tab. 0-1), fotonowych (Tab. 0-2) i fotometrycznych (Tab. 0-3).

Tab. 0-1 Energetyczne wielkości radiometryczne. Zaczerpnięte z [169]

Symbol	Wielkość	Jednostka	Definicja
Q_e	Energia promieniowania	J	Energia emitowana, przenoszona lub na powierzchnię
ϕ_e	Strumień energetyczny	W	Moc emitowana, przenoszona lub padająca na powierzchnię
I_e	Natężenie promieniowania	W/sr	Strumień energetyczny emitowany w jednostkowy kąt bryłowy
E_e	Natężenie napromienienia	W/m ²	Strumień energetyczny padający na jednostkową powierzchnię
M_e	Egzytancja energetyczna	W/ m ²	Strumień energetyczny emitowany przez jednostkową powierzchnię źródła
L_e	Luminancja energetyczna	W/(m ² sr)	Strumień energetyczny emitowany przez jednostkową powierzchnię w jednostkowy kąt bryłowy

Tab. 0-2 Fotonowe wielkości radiometryczne. Zaczepnięte z [169]

Symbol	Wielkość	Jednostka	Definicja
Q_p	Liczba fotonów	fot	
ϕ_p	Strumień fotonowy	fot/s	Liczba fotonów w jednostce czasu emitowanych, przenoszonych lub padających
I_p	Gęstość fotonów	fot/(s sr)	Strumień fotonowy emitowany w jednostkowy kąt bryłowy
E_p	Fotonowe natężenie napromienienia	fot/(s m ²)	Strumień fotonowy padający na jednostkową powierzchnię
M_p	Egzytancja fotonowa	fot/(s m ²)	Strumień fotonowy emitowany przez jednostkową powierzchnię źródła
L_p	Luminancja fotonowa	fot/(s m ² sr)	Strumień fotonowy emitowany przez jednostkową powierzchnię w jednostkowy kąt bryłowy

Tab. 0-3 Wielkości fotometryczne. Zaczepnięte z [169]

Symbol	Wielkość	Jednostka	Definicja
Q_v	Ilość światła	lm s	
ϕ_v	Strumień świetlny	lm	Ilość światła w jednostce czasu emitowana, przenoszona lub padająca
I_v	Natężenie światła	lm/sr	Strumień świetlny emitowany w jednostkowy kąt bryłowy
E_v	Natężenie oświetlenia	lm/m ² (lx)	Strumień świetlny padający na jednostkową powierzchnię
M_v	Egzytancja świetlna	lm/ m ²	Strumień świetlny emitowany przez jednostkową powierzchnię źródła
L_v	Luminancja świetlna	lm/(m ² sr)	Strumień świetlny emitowany przez jednostkową powierzchnię w jednostkowy kąt bryłowy

Konwersja między jednostkami radiometrycznymi

Zamiana jednostek pomiędzy energetycznymi a fotometrycznymi wielkościami radiometrycznymi jest możliwa dzięki wykorzystaniu wzoru na energię fotonu:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

(D - 0-1)

gdzie:

h - stała Plancka,

c - prędkość światła (m/s),

λ - długość fali (nm).

Wtedy otrzymujemy np. wzór na strumień energetyczny:

$$\phi_e \left[\frac{J}{s} \right] = \phi_p \left[\frac{fot}{s} \right] \cdot E \left[\frac{J}{fot} \right]$$

(D - 0-2)

gdzie:

ϕ_e - strumień energetyczny [W],

ϕ_p - strumień fotonowy [fot/s].

Wielkości fotometryczne uwzględniają efekt wywierany przez promieniowanie na układ wzrokowy. Podstawą pomiarów fotometrycznych jest krzywa jasności fotonowej $V(\lambda)$, która pokazuje, że pewne długości fal są bardziej efektywne w pobudzaniu układu wzrokowego niż inne. Zamiana energetycznych jednostek radiometrycznych na jednostki fotometryczne polega na uwzględnieniu ogólnie przyjętej uśrednionej czułości oka (podrozdział 1.3.3 Krzywa luminancji). Międzynarodowa Komisja Miar i Wag zatwierdziła stosowanie krzywych CIE $V(\lambda)$ i $V'(\lambda)$ do określania wartości wielkości fotometrycznych źródeł światła [170].

Dla źródeł monochromatycznych przejście od jednostek energetycznych do fotometrycznych umożliwia wzór:

$$X_v = K_m X_e V(\lambda)$$

(D - 0-3)

X_v - wielkość fotometryczna,

X_e – wielkość energetyczna,

K_m – maksymalna spektralna skuteczność świetlna (dla widzenia fotopowego = 683 lm/W),

$V(\lambda)$ – funkcja fotopowej spektralnej skuteczności świetlnej.

Przykładowo dla laserów monochromatycznych o $\lambda_1 = 670$ nm i $\lambda_2 = 635$ nm, których strumień energetyczny jest równy $\Phi_e = 10$ mW odczytujemy odpowiednie wartości $V(\lambda_1) = 0,032$ i $V(\lambda_2) = 0,217$ i obliczamy strumień świetlny odpowiednio:

$$\Phi_v(\lambda_1) = 0,01 \text{ W} \cdot 0,032 \cdot 683 \text{ lm/W} = 0,22 \text{ lm}$$

$$\Phi_v(\lambda_2) = 0,01 \text{ W} \cdot 0,217 \cdot 683 \text{ lm/W} = 1,48 \text{ lm}$$

Zakładając takie same średnice obu wiązek laserowych widzimy, że laser 635 nm świecić będzie blisko 7 razy jaśniej niż laser 670 nm przy takim samym strumieniu energetycznym.

W celu przeliczenia jednostek źródła o niemonochromatycznym rozkładzie widma na wielkość świetlną sytuacja jest zdecydowanie bardziej skomplikowana. Musimy znać charakter widmowy źródła, ponieważ jest on wykorzystywany w równaniu [170]:

$$X_v = K_m \int_{360 \text{ nm}}^{830 \text{ nm}} X_e(\lambda) V(\lambda) d\lambda$$

(D - 0-4)

Gdzie:

X_v – wielkość fotometryczna,

$X_e(\lambda)$ – wielkość energetyczna dla danej długości fali,

$V(\lambda)$ – funkcja fotopowej spektralnej skuteczności świetlnej,

K_m – maksymalna spektralna skuteczność świetlna (dla widzenia fotopowego = 683 lm/W).

Granice całkowania wynikają z granic tabeli CIE $V(\lambda)$. Dla widzenia skotopowego, kiedy badamy niższe poziomy oświetlenia stosujemy krzywą $V'(\lambda)$, dla której stała K'_m oznaczająca maksymalną spektralną skuteczność świetlną dla widzenia skotopowego wynosi 1 700 lm/W przy długości fali 507 nm. [170]

Konwersja z jednostek fotometrycznych na energetyczne jest możliwa jedynie dla przypadków, w których źródło emituje w zakresie widzialnym. W przeciwnym przypadku, nie jest możliwe uwzględnienie części promieniowania poza zakresem widzialnym w przeliczeniu na wielkości energetyczne, gdyż całka jest ograniczona do zakresu widzialnego, dla którego określone są krzywe $V(\lambda)$ i $V'(\lambda)$.

Trolandy

Jednostka „troland” jest szeroko stosowaną standardową miarą natężenia oświetlenia siatkówki w naukach o widzeniu. Uwzględnia ona rozmiar źrenicy przy określaniu siły bodźców wzrokowych. Potrzebę wzięcia pod uwagę średnicy źrenicy zauważył twórca jednostki – Leonard Troland. W swojej pracy [171] przedstawił matematyczny dowód na to, że ilość światła z obiektu padająca na siatkówkę jest proporcjonalna do powierzchni źrenicy oka. Zaproponował również utworzenie standardowej jednostki natężenia bodźca wzrokowego, którą nazwał „fotonem”. Zdefiniowana była jako iloczyn luminancji obiektu i pola powierzchni źrenicy w mm². W późniejszym czasie nazwa jednostki została zmieniona przez Komitet Kolorymetrii na „troland” i dodatkowo zmieniono jego miarę z miary „intensywności bodźca wzrokowego” na miarę „oświetlenia siatkówki”. Definicja podana przez Komitet Kolorymetrii według autorów [172] brzmi: „Troland definiuje się jako stymulację wzrokową wytwarzaną przez luminancję jednej kandel na metr kwadratowy, gdy powierzchnia źrenicy wejściowej oka wynosi jeden milimetr kwadratowy”. Definicję trolanda zapisać można następująco:

$$1 \text{ troland} = \frac{1 \text{ cd/m}^2}{10^{-6} \text{ m}^2}$$

(D- 0-5)

Warto zauważyć, za autorami pracy [172], że jesteśmy w stanie określić światło docierające do oka, jednak by określić natężenie oświetlenia siatkówki musimy poczynić dodatkowe założenia m.in. o przepuszczalności ośrodków oka, relacji wielkości obiektów znajdujących się przed okiem do ich obrazów na siatkówce i inne. Na mniejsze niż obliczone rzeczywiste wartości oświetlenia siatkówki może wpływać m.in. pochłanianie krótszych długości fal przez soczewkę oka, schorzenia takie jak zaćma i obrzęk rogówki (powodujący rozproszenia światła na siatkówce).

Fotometryczną metodę uzyskania wielkości oświetlenia siatkówki wyrażonej w trolandach w układzie, w którym źródło oświetlenia (płaszczyzna obrazu) jest sprzężona optycznie z płaszczyzną źrenicy oka (ang. *Maxwellian view* [137]) z użyciem miernika natężenia oświetlenia mierzonego w luksach (lx) przedstawiono w pracy [173].

Procedura zakłada dwa przybliżenia: cała płaszczyzna odniesienia urządzenia pomiarowego musi być wypełniona światłem oraz obraz źródłowy musi być mniejszy niż źrenica obserwatora. W takim przypadku oświetlenie siatkówki (skotopowe lub fotopowe) wyrażone w trolandach może być obliczone z przybliżonego wyrażenia [173]:

$$E_R^{S/V} \cong E^{S/V} \cdot d^2$$

(D- 0-6)

gdzie:

E^S – natężenie oświetlenia skotopowe (lx)

E^V – natężenie oświetlenia fotopowe (lx)

d – odległość między luksomierzem a źródłem oświetlenia (mm)

Publikacje naukowe

*Prace, których wyniki stanowiły podstawy do napisania niniejszej rozprawy

1. Kaczkoś, O., Zielińska, A., Marzejon, M. J., Solarz-Niesłuchowski, J., Pniewski, J., & Komar, K. Methods of determining the contrast sensitivity function for two-photon vision. *22nd Polish-Slovak-Czech Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics*, SPIE, 2022, 12502, s.235-245. doi: <https://doi.org/10.1117/12.2664174>
2. Łabuz G., Zielińska A., Kessler L. J. [i in.] Two-photon vision in age-related macular degeneration: a translational study. *Diagnostics*, 2022, 12(3), s.1-12, doi: 760. DOI:10.3390/diagnostics12030760 (1 cytowanie)
3. *Zielińska A., Ciąćka P., Szkulmowski M., Komar K. Pupillary Light Reflex in two-photon vision. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2021, 62(15), s.1-11, doi: 23. DOI:10.1167/iovs.62.15.23 (6 cytowań)
4. *Zielińska, A., Kiluk, K., Wojtkowski, M., & Komar, K. System for psychophysical measurements of two-photon vision. *Photonics Letters of Poland*, 2019, 11(1), s.1-3, doi: <https://doi.org/10.4302/plp.v11i1.837> (6 cytowań)
5. *Ruminski, D., Palczewska, G., Nowakowski, M., Zielińska, A., [i in.] Two-photon microperimetry: sensitivity of human photoreceptors to infrared light. *Biomedical optics express*, 10(9), s.4551-4567. doi: <https://doi.org/10.1364/BOE.10.004551> (23 cytowania)
6. Martynow, M., Zielińska, A., Marzejon, M., Wojtkowski, M., & Komar, K. Pupil detection supported by Haar feature based cascade classifier for two-photon vision examinations. *2019 11th International Symposium on Image and Signal Processing and Analysis (ISPA)*, 2019, s.54-59. IEEE. doi: 10.1109/ISPA.2019.8868706. (2 cytowania)

Prezentacje na konferencjach

*Materiały, których wyniki stanowiły podstawy do napisania niniejszej rozprawy

1. Zielińska, A., Kaczkoś, O., Marzejon, M., Solarz-Niesluchowski J., Szkulmowski M., & Komar, K. (2022). Contrast Sensitivity Function of Two-Photon Vision. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60(9), 2293.
2. *Zielińska, A., Ciacka, P., Szkulmowski, M., & Komar, K. (2021). The influence of stimulus defocus on two-photon visibility thresholds. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 62(8), 511.
3. *Zielińska, A., Ciacka, P., Martynow, M., Wojtkowski, M., Szkulmowski, M., & Komar, K. (2020). Comparison of one-and two-photon pupillary light reflexes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 61(7), 5096.
4. *Zielińska, A., Ciacka, P., Martynow, M., Wojtkowski, M., & Komar, K. (2019). Pupillary light reflex in two-photon vision experiments. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60(9), 2293. (2 cytowania)
5. Marzejon M., Zielinska A., Stachowiak D., Sobon G., Wojtkowski M., Komar K. (2022), Towards spectral sensitivity curve for two-photon vision mechanism. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 63(7), 2232. (1 cytowanie)
6. Komar, K., Zielinska, A., Ciacka, P., Ruminski, D., Szkulmowski, M., & Wojtkowski, M. (2022). Effect of stimulating beam diameter on two-photon visual thresholds. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 63(7), 2233-F0441.
7. Komar, K., Zielińska, A., Ruminski, D., Marzejon, M., Ciacka, P., Kornaszewski, L., ... & Wojtkowski, M. (2019). The limits of perception of light by two-photon vision. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60(9), 3907-3907. (2 cytowania)
8. *Komar, K. P., Ruminski, D., Zielińska, A., Kiluk, K., [i in] (2018). Two-photon visual sensitivity of human cones-a psychophysical study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(9), 4049-4049. (1 cytowanie)
9. Komar, K., Stremplewski, P., Zielińska, A., Palczewska, G., Palczewski, K., & Wojtkowski, M. (2015). The sensitivity of human infrared vision is age-dependent. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56(7), 4308-4308.
10. Wojtkowski, M., Komar, K., Palczewska, G., Zielińska, A., Stremplewski, P., & Palczewski, K. (2016). Age dependent sensitivity of two-photon isomerization of rhodopsin chromophores in the human retina (Conference Presentation). In *Ophthalmic Technologies XXVI* (Vol. 9693, p.969312). International Society for Optics and Photonics.

Doświadczenie w pracy w zespołach naukowo-badawczych

- Asystent naukowy Katedrze Biofotoniki i Inżynierii Optycznej, od 10.2020
- Stypendysta – doktorant w grantie NCN OPUS 12 dr K. Komar „Widzenie dwufotonowe – mechanizm, charakterystyka i zastosowania”, 09.2017 – 05.2020
- Fizyk, Fundacja Badawcza Bałtycki Instytut Technologiczny, projekt badawczy „Widzenie w bliskiej podczerwieni”, 10.2016 – 09.2017
- Stypendysta – doktorant w grantie TEAM FNP prof. dr hab. M. Wojtkowskiego „Novel optical techniques for enhanced structural, functional and dynamical imaging of anterior and posterior segments of the eye”, 02.2014 – 10.2015

Udział w konferencjach naukowych

- XIII Sympozjum Techniki Laserowej STL2022, Karpacz, wystąpienie ustne „Wpływ rozmiaru wiązki pobudzającej na progi widzenia dwufotonowego” (19. – 23.09.2022)
- The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2022, on – line, plakat “Contrast Sensitivity Function of Two-Photon Vision” (01. – 04.05.2022, 11 – 12.05.2022)
- The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2021, on – line, plakat “The influence of stimulus defocus on two-photon visibility thresholds” (01. – 07.05.2021)
- Industrialization Potential of Optics in Biomedicine i-POB by POB, on – line, prezentacja „Two-photon Pupillary Light Reflex” (07. – 08.10.2020)
- Przyjęte zgłoszenie na konferencję ARVO 2020, Baltimore, USA (odwołaną z powodu pandemii), zgłoszenie plakatu pt.: “Comparison of one- and two-photon pupillary light reflexes” (05.2020)
- The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2019, Vancouver, Kanada, plakat “Pupillary light reflex in two-photon vision experiments” (28.04. – 02.05.2019)
- OPTO-Meeting for Young Researchers & SPIE Student Chapter Meeting 2018, Gdańsk, plakat “Pupil monitoring in psychophysical measurements of two-photon vision” (04. – 07.07.2018)
- 44. Zjazd Fizyków Polskich, Wrocław, plakat „Układ do badań psychofizycznych widzenia dwufotonowego” (10. – 15.09.2017)
- OPTO-Meeting for Young Researchers & SPIE Student Chapter Meeting 2015, Wrocław, wystąpienie ustne „Aberration correction by wavefront sensorless adaptive optics” (27. – 30.05.2015)
- IX Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń, wystąpienie ustne „Korekcja aberracji układów optycznych z użyciem optyki adaptacyjnej bez użycia czujnika frontu falowego” (24. – 26.06.2015)

Literatura

- [1] S. Cole i E. Balcetis, „Motivated perception for self-regulation: How visual experience serves and is served by goals”, *Adv Exp Soc Psychol*, t. 64, s. 129–186, sty. 2021, doi: 10.1016/BS.AESP.2021.04.003.
- [2] oprac. M. Drabikowski, *Słownik fizyczny: optyka i akustyka*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo - Techniczne, 1991.
- [3] F. Ronald S, „Darwin and Helmholtz on imperfections of the eye”, *Archives of Ophthalmology*, t. 128, nr 9, s. 1209–1211, 2010. doi: 10.1001/archophthalmol.2010.189.
- [4] I. Bekerman, P. Gottlieb, i M. Vaiman, „Variations in Eyeball Diameters of the Healthy Adults”, *J Ophthalmol*, t. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/503645.
- [5] S. H. Schwartz, *Visual Perception a clinical orientation*, 4. edycja. Nowy Jork: The McGraw-Hill Companies, 2010.
- [6] A. Valberg, *Light Vision Color*. Chichester: John Wiley&Sons, Ltd, 2005.
- [7] A. Lens, *Anatomia i fizjologia narządu wzroku*, 1. wyd. w Seria: Podstawy Okulistyki. Wrocław: Górnicki Wydawnictwo Medyczne, 2010.
- [8] R. Montés-Micó, „Role of the tear film in the optical quality of the human eye”, *J Cataract Refract Surg*, t. 33, nr 9, s. 1631–1635, 2007, doi: 10.1016/j.jcrs.2007.06.019.
- [9] S. Mathôt, „Pupillometry: Psychology, Physiology, and Function”, *J Cogn*, t. 1, nr 1, s. 1–23, luty 2018, doi: 10.5334/joc.18.
- [10] P. Reeves, „The Response of the Average Pupil to Various Intensities of Light”, *J Opt Soc Am*, t. 4, nr 2, s. 35–43, 1920, doi: 10.1364/josa.4.000035.
- [11] P. Reeves, „Rate of pupillary dilation and contraction”, *Psychol Rev*, t. 25, nr 4, s. 330, 1918, doi: 10.1037/h0075293.
- [12] P. Moon i D. E. Spencer, „On the Stiles-Crawford Effect”, *J Opt Soc Am*, t. 34, nr 6, s. 319–329, 1944, doi: 10.1364/josa.34.000319.
- [13] S. G. DE GROOT i J. W. GEBHARD, „Pupil size as determined by adapting luminance.”, *J Opt Soc Am*, t. 42, nr 7, 1952, doi: 10.1364/JOSA.42.000492.
- [14] D. A. Atchison i G. Smith, *Optics of the human eye*. Butterworth-Heinemann, 2000.
- [15] A. Valberg, *Light Vision Color*. Chichester: John Wiley&Sons, Ltd, 2005.
- [16] „Pupillometry”, *APA Dictionary of Psychology*. <https://dictionary.apa.org/pupillometry> (dostęp 24 maj 2023).

- [17] O. Lowenstein i I. E. Loewenfeld, „Electronic pupillography: A new instrument and some clinical applications”, *AMA Arch Ophthalmol*, t. 59, nr 3, s. 352–363, 1958, doi: 10.1001/archopht.1958.00940040058007.
- [18] M. Pieniążek, „Pupillometria w okulistyce”, *Przegląd Okulistyczny*, t. 3, nr 41, s. 2, 2011.
- [19] C. Kelbsch *i in.*, „Standards in pupillography”, *Frontiers in Neurology*, t. 10. Frontiers Media S.A., 1 luty 2019. doi: 10.3389/fneur.2019.00129.
- [20] J. Feher, *Quantitative human physiology: an introduction*. Academic Press, 2012. doi: 10.1016/B978-0-12-382163-8.00041-4.
- [21] L. Takemoto i C. M. Sorensen, „Protein-protein interactions and lens transparency”, *Experimental Eye Research*, t. 87, nr 6, s. 496–501, 2008. doi: 10.1016/j.exer.2008.08.018.
- [22] R. A. Schachar, *The Mechanism of Accommodation and Presbyopia*. Kugler Publications, 2012. [Online]. Dostępne na: <https://books.google.pl/books?id=a70kamO-yb8C>
- [23] W. van Bommel, *Interior Lighting Fundamentals, Technology and Application*. Nuenen: Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-17195-7.
- [24] E. Hecht, *Optyka*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2012.
- [25] „Diopter”, *Encyclopedia Britannica*, 20 lipiec 1998. <https://www.britannica.com/technology/diopter-optics> (dostęp 24 maj 2023).
- [26] „Tropicamidum WZF 0,5% - ulotka dla pacjenta”. Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa S.A., Warszawa, lipiec 2018. Dostęp: 24 maj 2023. [Online]. Dostępne na: <https://www.polfawarszawa.pl/products/pil/pil-tropikamid-wzf-05-2018-07pl.pdf>
- [27] J. Z. Nowak i W. Bienias, „Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD): etiopatogeneza i strategie terapeutyczne.”, *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, t. 61, s. 83–94, 2007.
- [28] M. Kaschke, K.-H. Donnerhacke, i M. S. Rill, *Optical Devices in Ophthalmology and Optometry*. Weinheim: WILEY-VCH, 2014. doi: 10.1002/9783527648962.
- [29] K. Rogers, *The Eye - The Physiology of Human Perception*. New York: Britannica, 2011.
- [30] „Rod”, *Encyclopedia Britannica*, 28 kwiecień 2017. <https://www.britannica.com/science/rod-retinal-cell> (dostęp 24 maj 2023).
- [31] „11-cis i - trans retinal”, *Platforma Wikimedia*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:11-cis-Retinal_Vitamin_A-Aldehyd.svg (dostęp 25 maj 2023).

- [32] T. Lamb, „Why rods and cones?“, *Eye*, t. 30, nr 2, s. 179–185, 2016, doi: 10.1080/00043079.1969.10790295.
- [33] J. N. Tinsley *i in.*, „Direct detection of a single photon by humans“, *Nat Commun*, t. 7, nr 1, s. 12172, 2016, doi: 10.1038/ncomms12172.
- [34] D. Mustafi, A. H. Engel, i K. Palczewski, „Structure of cone photoreceptors“, *Progress in Retinal and Eye Research*, t. 28, nr 4, s. 289–302, 2009. doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.05.003.
- [35] C. A. Curcio, K. R. Sloan, R. E. Kalina, A. E. Hendrickson, O. Cac, i C. Science, „Human Photoreceptor Topography“, *J Comp Neurol*, t. 292, nr 4, s. 497–523, 1990.
- [36] A. Roorda i D. R. Williams, „The arrangement of the three cone classes in the living human eye“, *Nature*, t. 397, nr 6719, s. 520–522, 1999, doi: 10.1038/17383.
- [37] F. Zhang, K. Kurokawa, A. Lassoued, J. A. Crowell, i D. T. Miller, „Cone photoreceptor classification in the living human eye from photostimulation-induced phase dynamics“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 116, nr 16, s. 7951–7956, 2019, doi: 10.1073/pnas.1816360116.
- [38] O. Strauss, „The retinal pigment epithelium in visual function“, *Physiological Reviews*, t. 85, nr 3, s. 845–881, 2005. doi: 10.1152/physrev.00021.2004.
- [39] H. Gao i J. G. Hollyfield, „Aging of the human retina: Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells“, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, t. 33, nr 1, s. 1–17, 1992.
- [40] W. Kwon i S. A. Freeman, „Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium: Recognition, Resolution, Recycling“, *Front Immunol*, t. 11, s. 604205, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.604205.
- [41] L. Levin, S. Nilsson, J. Ver Hoeve, S. Wu, P. Kaufman, i A. Alm, *Adler's Physiology of the Eye*, 11th edition. Elsevier, 2011.
- [42] R. W. Young, „The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey“, *Journal of Cell Biology*, t. 49, nr 2, s. 303–318, 1971, doi: 10.1083/jcb.49.2.303.
- [43] D. M. Dacey *i in.*, „Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN“, *Nature*, t. 433, nr 7027, 2005, doi: 10.1038/nature03387.
- [44] E. L. Markwell, B. Feigl, i A. J. Zele, „Intrinsically photosensitive melanopsin retinal ganglion cell contributions to the pupillary light reflex and circadian rhythm“, *Clin Exp Optom*, t. 93, nr 3, s. 137–149, 2010, doi: 10.1111/j.1444-0938.2010.00479.x.
- [45] H. Walker, „The Origins of the History and Physical Examination“, w *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, H. Walker, W. Hall, i J. Hurst, Red., 3. edycja. Boston: Butterworths, 1990. Dostęp: 24 maj 2023. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK458/#A34>

- [46] „Macula”, *Platforma Wikimedia*.
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Macula.svg> (dostęp 25 maj 2023).
- [47] D. R. Griffin, R. Hubbard, i G. Wald, „The Sensitivity of the Human Eye to Infra-Red Radiation”, *JOSA*, t. 37, nr 7, s. 546–554, 1947.
- [48] P. Azzopardi i A. Cowey, „The overrepresentation of the fovea and adjacent retina in the striate cortex and dorsal lateral geniculate nucleus of the macaque monkey”, *Neuroscience*, t. 72, nr 3, 1996, doi: 10.1016/0306-4522(95)00589-7.
- [49] S. H. Schwartz, *Geometrical and Visual Optics*, 2. edycja. Nowy Jork: McGraw-Hill Education, 2013.
- [50] A. Roorda *i in.*, „What can adaptive optics do for a scanning laser ophthalmoscope?”, *Bull Soc Belge Ophtalmol*, t. 302, s. 231, 2006.
- [51] A. Roorda, „Adaptive optics for studying visual function: A comprehensive review”, *J Vis*, t. 11, nr 5, 2011, doi: 10.1167/11.5.1.
- [52] A. S. Holik, „Optical Microscopy”, *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, s. 6458–6463, 2001, doi: 10.1016/B0-08-043152-6/01142-6.
- [53] W. R. Zipfel, R. M. Williams, i W. W. Webb, „Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences”, *Nature Biotechnology*, t. 21, nr 11. 2003. doi: 10.1038/nbt899.
- [54] M. Zając, *Optyka okularowa*. Wrocław: Dolnośląskie Wydawnictwo Edukacyjne, 2003.
- [55] J. Szaflik i A. M. Ambroziak, *Optyka kliniczna, część 3*. Wrocław: Elsevier Urban&Partner, 2009.
- [56] „ebEye Clinic”, *Refractive errors*. <https://www.webeyeclinic.com/refractive-errors/refractive-errors> (dostęp 25 maj 2023).
- [57] „Widmo promieniowania EM”, *Internetowy dziennik Świat obrazu*.
<https://www.swiatobrazu.pl/zdjecie/artykuly/254753/fotografia-od-a-do-z-widmo.jpg> (dostęp 25 maj 2023).
- [58] M. Ramamurthy i V. Lakshminarayanan, „Human vision and perception”, w *Handbook of Advanced Lighting Technology*, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-00176-0_46.
- [59] M. Kalloniatis i C. Luu, „Light and Dark Adaptation”, w *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, Salt Lake City: University of Utah Health Sciences Center, 1995. Dostęp: 26 maj 2023. [Online]. Dostępne na: <https://webvision.med.utah.edu/book/part-viii-psychophysics-of-vision/light-and-dark-adaptation/>
- [60] „Luminous efficiency data”, *Colour and Vision Research Laboratory*.
<http://www.cvrl.org/lumindex.htm> (dostęp 25 maj 2023).

- [61] „Principles of Vision”, w *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, Salt Lake City: University of Utah Health Sciences Center, 1995. Dostęp: 25 maj 2023. [Online]. Dostępne na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11513/figure/ch24psych1.F9/>
- [62] B. B. Lee, P. R. Martin, i A. Valberg, „The physiological basis of heterochromatic flicker photometry demonstrated in the ganglion cells of the macaque retina.”, *J Physiol*, t. 404, nr 1, 1988, doi: 10.1113/jphysiol.1988.sp017292.
- [63] G. Wagner i R. M. Boynton, „Comparison of four methods of heterochromatic photometry.”, *J Opt Soc Am*, t. 62, nr 12, 1972, doi: 10.1364/JOSA.62.001508.
- [64] S. H. Schwartz, *Visual perception: A clinical orientation*. McGraw-Hill Medical Pub. Division, 2009.
- [65] J. Pokorny i V. C. Smith, „Wavelength discrimination in the presence of added chromatic fields.”, *J Opt Soc Am*, t. 60, nr 4, 1970, doi: 10.1364/JOSA.60.000562.
- [66] L. Perusek i T. Maeda, „Vitamin a derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases”, *Nutrients*, t. 5, nr 7, s. 2466–2666, lip. 2013, doi: 10.3390/nu5072646.
- [67] V. J. Kefalov, „Rod and cone visual pigments and phototransduction through pharmacological, genetic, and physiological approaches”, *Journal of Biological Chemistry*, t. 287, nr 3. 2012. doi: 10.1074/jbc.R111.303008.
- [68] P. Ala-Laurila i in., „Visual cycle: Dependence of retinol production and removal on photoproduct decay and cell morphology”, *Journal of General Physiology*, t. 128, nr 2, s. 153–169, 2006, doi: 10.1085/jgp.200609557.
- [69] J. S. Wang, M. E. Estevez, M. C. Cornwall, i V. J. Kefalov, „Intra-retinal visual cycle required for rapid and complete cone dark adaptation”, *Nat Neurosci*, t. 12, nr 3, 2009, doi: 10.1038/nn.2258.
- [70] J. S. Wang i V. J. Kefalov, „An Alternative Pathway Mediates the Mouse and Human Cone Visual Cycle”, *Current Biology*, t. 19, nr 19, 2009, doi: 10.1016/j.cub.2009.07.054.
- [71] J. S. Wang i V. J. Kefalov, „The Cone-specific visual cycle”, *Progress in Retinal and Eye Research*, t. 30, nr 2. 2011. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.11.001.
- [72] N. S. Hart, „Phototransduction”, w *Encyclopedia of Neuroscience*, N. and W. U. Binder Marc D. and Hirokawa, Red., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, s. 3156–3159. doi: 10.1007/978-3-540-29678-2_4573.
- [73] T. D. Lamb i E. N. Pugh, „Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration”, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, t. 47, nr 12, 2006.

- [74] D. Purves, G. Augustine, i D. Fitzpatrick, „Functional Specialization of the Rod and Cone Systems”, w *Neuroscience*, 2001.
- [75] H. B. Barlow, „Temporal and spatial summation in human vision at different background intensities”, *J Physiol*, t. 141, nr 2, 1958, doi: 10.1113/jphysiol.1958.sp005978.
- [76] M. E. Wilson, „Invariant features of spatial summation with changing locus in the visual field”, *J Physiol*, t. 207, nr 3, 1970, doi: 10.1113/jphysiol.1970.sp009083.
- [77] B. E. Scheffrin, M. L. Bieber, R. McLean, i J. S. Werner, „The area of complete scotopic spatial summation enlarges with age”, *Journal of the Optical Society of America A*, t. 15, nr 2, 1998, doi: 10.1364/josaa.15.000340.
- [78] K. D. Davila i W. S. Geisler, „The relative contributions of pre-neural and neural factors to areal summation in the fovea”, *Vision Res*, t. 31, nr 7-8, 1991, doi: 10.1016/0042-6989(91)90058-D.
- [79] E. Dalimier i C. Dainty, „Role of ocular aberrations in photopic spatial summation in the fovea”, *Opt Lett*, t. 35, nr 4, 2010, doi: 10.1364/ol.35.000589.
- [80] „Psychophysics”, *Encyclopedia Britannica*, 18 kwiecień 2017. <https://www.britannica.com/science/psychophysics>
- [81] J. J. i G. T. Fechner, „Elemente der Psychophysik”, *Am J Psychol*, t. 2, nr 4, 1889, doi: 10.2307/1411906.
- [82] F. A. A. Kingdom i N. Prins, *Psychophysics: A Practical Introduction*, Edycja 2. Elsevier, 2010. doi: 10.1016/C2012-0-01278-1.
- [83] G. M. Johnson i M. D. Fairchild, „Visual psychophysics and color appearance”, w *Digital Color Imaging Handbook*, 2017. doi: 10.1201/9781420041484.
- [84] S. Hecht, C. Haig, i A. M. Chase, „The influence of light adaptation on subsequent dark adaptation of the eye”, *Journal of General Physiology*, t. 20, nr 6, 1937, doi: 10.1085/jgp.20.6.831.
- [85] „Fixation point”, *APA Dictionary of Psychology*. <https://dictionary.apa.org/fixation-point> (dostęp 24 maj 2023).
- [86] H. , Hofstetter, J. R. , Griffin, M. S. , Berman, i R. W. Everson, *Dictionary of visual science and related clinical terms*, 5th edition. Butterworth-Heinemann, 2000.
- [87] L. Thaler, A. C. Schütz, M. A. Goodale, i K. R. Gegenfurtner, „What is the best fixation target? The effect of target shape on stability of fixational eye movements”, *Vision Res*, t. 76, s. 31-42, 2013, doi: 10.1016/j.visres.2012.10.012.
- [88] A. Jabłoński, „Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes [6]”, *Nature*, t. 131, nr 3319. 1933. doi: 10.1038/131839b0.

- [89] J. F. Bille, Red., *High Resolution Imaging in Microscopy and Ophthalmology*. Springer, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-16638-0.
- [90] K. Pigoń i Z. Ruziewicz, *Chemia fizyczna*, 2. wyd. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe, 1981.
- [91] R. W. Boyd, *Nonlinear Optics*, Edycja 4. Elsevier, 2020. doi: 10.1201/9781420004694.ch5.
- [92] M. G. Mayer, „Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen”, *Ann Phys*, t. 401, nr 3, 1931.
- [93] A. Grzybowski i K. Pietrzak, „Maria Goeppert-Mayer (1906-1972): two-photon effect on dermatology.”, *Clin Dermatol*, t. 31, nr 2, 2013, doi: 10.1016/j.clindermatol.2012.06.002.
- [94] W. Kaiser i C. G. B. Garrett, „Two-Photon Excitation in CaF₂:Eu²⁺”, *Phys. Rev. Lett.*, t. 7, nr 6, s. 229–231, wrz. 1961, doi: 10.1103/PhysRevLett.7.229.
- [95] W. Denk, J. H. Strickler, i W. W. Webb, „Two-Photon laser scanning fluorescence microscopy”, *Science (1979)*, t. 248, nr 4951, s. 73–76, 1990.
- [96] W. M. McClain, „Excited state symmetry assignment through polarized two-photon absorption studies of fluids”, *J Chem Phys*, t. 55, nr 6, 1971, doi: 10.1063/1.1676494.
- [97] D. M. Friedrich i W. M. McClain, „Two-Photon Molecular Electronic Spectroscopy”, *Annu Rev Phys Chem*, t. 31, nr 1, 1980, doi: 10.1146/annurev.pc.31.100180.003015.
- [98] R. R. Birge, „Two-Photon Spectroscopy of Protein-Bound Chromophores”, *Acc Chem Res*, t. 19, nr 5, 1986, doi: 10.1021/ar00125a003.
- [99] G. J. Brakenhoff, M. Müller, i R. I. Ghauharali, „Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence generation in biological objects”, *J Microsc*, t. 183, nr 2, 1996, doi: 10.1046/j.1365-2818.1996.870647.x.
- [100] P. L. Walraven i H. J. Leebeek, „Foveal Sensitivity of the Human Eye in the Near Infrared”, *J. Opt. Soc. Am.*, t. 53, nr 6, s. 765–766, cze. 1963, doi: 10.1364/JOSA.53.000765.
- [101] L. S. Vasilenko, V. P. Chebotaev, i Y. V Troitskii, „Visual observation of infrared laser emission”, *Soviet Physics JEPT*, t. 21, nr 3, s. 513–662, 1965.
- [102] S. Fine i W. P. Hansen, „Optical second harmonic generation in biological systems”, *Appl Opt*, t. 10, nr 10, s. 2350–2353, 1971.
- [103] D. H. Sliney, R. T. Wangemann, J. K. Franks, i M. L. Wolbarsht, „Visual sensitivity of the eye to infrared laser radiation”, *JOSA*, t. 66, nr 4, s. 339–341, 1976.
- [104] V. G. Dmitriev i et al., „Nonlinear perception of infrared radiation in the 800-1355 nm range with human eye”, *Soviet Journal of Quantum Electronics*, t. 9, nr 4, s. 475, 1979.

- [105] Q. Zaidi i J. Pokorny, „Appearance of pulsed infrared light: second harmonic generation in the eye”, *Appl Opt*, t. 27, nr 6, s. 1064–1068, 1988.
- [106] T. Theodossiou, E. Georgiou, V. Hovhannisyanyan, i D. Yova, „Visual observation of infrared laser speckle patterns at half their fundamental wavelength”, *Lasers Med Sci*, t. 16, s. 34–39, 2001.
- [107] P. V. Kazakevich, A. V. Simakin, i G. A. Shafeev, „Frequency up-conversion of infrared laser radiation in the human eye”, *Laser physics*, t. 16, nr 7, s. 1078–1081, 2006.
- [108] G. Palczewska *i in.*, „Human infrared Vision is triggered by two-photon chromophore isomerization”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 111, nr 50, s. E5445–E5454, grudz. 2014, doi: 10.1073/pnas.1410162111.
- [109] E. A. Gibson, O. Masihzadeh, T. C. Lei, D. A. Ammar, i M. Y. Kahook, „Multiphoton Microscopy for Ophthalmic Imaging”, *J Ophthalmol*, t. 2011, 2011, doi: 10.1155/2011/870879.
- [110] D. A. Ammar, T. C. Lei, O. Masihzadeh, E. A. Gibson, i M. Y. Kahook, „Trans-scleral imaging of the human trabecular meshwork by twophoton microscopy”, *Mol Vis*, t. 17, s. 583, 2011.
- [111] B. G. Wang, A. Eitner, J. Lindenau, i K. J. Halbhuber, „High-resolution two-photon excitation microscopy of ocular tissues in porcine eye”, *Lasers Surg Med*, t. 40, nr 4, 2008, doi: 10.1002/lsm.20628.
- [112] B. G. Wang, K. Koenig, I. Riemann, R. Krieg, i K. J. Halbhuber, „Intraocular multiphoton microscopy with subcellular spatial resolution by infrared femtosecond lasers”, *Histochem Cell Biol*, t. 126, nr 4, 2006, doi: 10.1007/s00418-006-0187-0.
- [113] W. R. Zipfel, R. M. Williams, R. Christie, A. Y. Nikitin, B. T. Hyman, i W. W. Webb, „Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, t. 100, nr 12, s. 7075–7080, 2003.
- [114] G. Palczewska *i in.*, „Human infrared Vision is triggered by two-photon chromophore isomerization”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, t. 111, nr 50, s. E5445–E5454, grudz. 2014, doi: 10.1073/pnas.1410162111.
- [115] P. Artal, S. Manzanera, K. Komar, A. Gambín-Regadera, i M. Wojtkowski, „Visual acuity in two-photon infrared vision”, *Optica*, t. 4, nr 12, s. 1488, grudz. 2017, doi: 10.1364/optica.4.001488.
- [116] F. Vinberg *i in.*, „Sensitivity of Mammalian Cone Photoreceptors to Infrared Light”, *Neuroscience*, t. 416, s. 100–108, wrz. 2019, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.07.047.

- [117] A. Zielińska, K. Kiluk, M. Wojtkowski, i K. Komar, „System for psychophysical measurements of two-photon vision”, *Photonics Lett Pol*, t. 11, nr 1, s. 1–3, 2019, doi: 10.4302/plp.v11i1.837.
- [118] D. Ruminski *i in.*, „Two-photon microperimetry: sensitivity of human photoreceptors to infrared light”, *Biomed Opt Express*, t. 10, nr 9, s. 4551, wrz. 2019, doi: 10.1364/boe.10.004551.
- [119] S. Gholami, L. Pedraza-González, X. Yang, A. A. Granovsky, I. N. Ioffe, i M. Olivucci, „Multistate Multiconfiguration Quantum Chemical Computation of the Two-Photon Absorption Spectra of Bovine Rhodopsin”, *Journal of Physical Chemistry Letters*, t. 10, nr 20, s. 6293–6300, paź. 2019, doi: 10.1021/acs.jpcllett.9b02291.
- [120] M. J. Marzejon *i in.*, „Two-photon microperimetry with picosecond pulses”, *Biomed Opt Express*, t. 12, nr 1, s. 462, sty. 2021, doi: 10.1364/boe.411168.
- [121] S. Manzanera, D. Sola, K. Komar, M. Wojtkowski, i P. Artal, „Two photon vision with a supercontinuum source”, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, t. 60, nr 9, s. 5945, 2019.
- [122] G. Łabuz *i in.*, „Clinical application of infrared-light microperimetry in the assessment of scotopic-eye sensitivity”, *Transl Vis Sci Technol*, t. 9, nr 8, s. 1–9, lip. 2020, doi: 10.1167/tvst.9.8.7.
- [123] G. Łabuz *i in.*, „The loss of infrared light sensitivity of photoreceptor cells measured with two-photon excitation as an indicator of diabetic retinopathy. A Pilot Study”, *Retina*, t. 41, nr 6, s. 1302, 2021.
- [124] G. Łabuz *i in.*, „Two-Photon Vision in Age-Related Macular Degeneration: A Translational Study”, *Diagnostics*, t. 12, nr 3, 2022, doi: 10.3390/diagnostics12030760.
- [125] G. Łabuz, A. Rayamajhi, K. Komar, R. Khoramnia, i G. U. Auffarth, „Infrared- and white-light retinal sensitivity in glaucomatous neuropathy”, *Sci Rep*, t. 12, nr 1, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-05718-6.
- [126] G. Łabuz *i in.*, „The loss of infrared light sensitivity of photoreceptor cells measured with two-photon excitation as an indicator of diabetic retinopathy. A Pilot Study”, *Retina*, t. 41, nr 6, s. 1302, 2021.
- [127] A. Wei *i in.*, „Two-photon microperimetry: A media opacity-independent retinal function assay”, *Transl Vis Sci Technol*, t. 10, nr 2, luty 2021, doi: 10.1167/tvst.10.2.11.
- [128] J. Boguslawski *i in.*, „In vivo imaging of the human eye using a 2-photon-excited fluorescence scanning laser ophthalmoscope”, *Journal of Clinical Investigation*, t. 132, nr 2, 2022, doi: 10.1172/JCI154218.

- [129] „Autocorrelators”, *Optipedia*. https://spie.org/publications/fg14_p94-96_autocorrelators?SSO=1 (dostęp 25 maj 2023).
- [130] „Specyfikacja autokorelatora pulseCheck SM”, *Photonics Solution*. https://www.photonicsolutions.co.uk/upfiles/pulseCheck_SM.pdf (dostęp 25 maj 2023).
- [131] „Pulse energy”, *Encyclopedia RP Photonics*. https://www.rp-photonics.com/pulse_energy.html (dostęp 25 maj 2023).
- [132] „Peak power”, *Encyclopedia RP Photonics*. https://www.rp-photonics.com/peak_power.html (dostęp 25 maj 2023).
- [133] H. Abramczyk, *Wstęp do spektroskopii laserowej*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
- [134] „Synchronously pumped OPO - manual”, *Levante Emerald APE*, 2009.
- [135] „Neutral Density Filters - features”, *Thorlabs*. https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=1393 (dostęp 25 maj 2023).
- [136] S. A. Burns i R. H. Webb, „Optical generation of the visual stimulus”, w *Handbook of Optics, vol.1*, New York: McGraw-Hill, 1995.
- [137] S. A. Burns i R. H. Webb, „Optical generation of the visual stimulus”, w *Handbook of Optics, vol.1*, New York: McGraw-Hill, 1995.
- [138] „Laboratorium optyczne - we wnętrzu oka”, *Repozytorium Uniwersytetu Jagiellońskiego*. https://ruj.uj.edu.pl/xmlui/bitstream/handle/item/252475/cieslar_laboratorium_optyczne_we_wnetrzu_oka_2010.pdf?sequence=1&isAllowed=y (dostęp 24 maj 2023).
- [139] F. C. Delori, R. H. Webb, i D. H. Sliney, „Maximum permissible exposures for ocular safety (ANSI 2000), with emphasis on ophthalmic devices”, *JOSA A*, t. 24, nr 5, s. 1250–1265, 2007.
- [140] „ANSI. ANSI Z136.1-2014: American National Standard for Safe Use of Lasers”. American National Standards Institute, 2014.
- [141] M. Martynow, A. Zielińska, M. Marzejon, M. Wojtkowski, i K. Komar, „Pupil detection supported by Haar feature based cascade classifier for two-photon vision examinations”, *2019 11th International Symposium on Image and Signal Processing and Analysis (ISPA)*, t. IEEE, s. 54–59, 2019.
- [142] „PN-EN 60825-1:2014 Bezpieczeństwo urządzeń laserowych -- Część 1: Klasyfikacja sprzętu i wymagania”. Polski Komitet Normalizacyjny, 2014.

- [143] „Autocorrelators”, *Optipedia - SPIE Press books opened for your reference*. https://spie.org/publications/fg14_p94-96_autocorrelators?SSO=1 (dostęp 24 maj 2023).
- [144] B. E. Stewart i R. S. L. Young, „Pupillary response: an index of visual threshold”, *Appl Opt*, t. 28, nr 6, s. 1122, 1989, doi: 10.1364/ao.28.001122.
- [145] R. Schmid, H. Luedtke, B. J. Wilhelm, i H. Wilhelm, „Pupil campimetry in patients with visual field loss”, *Eur J Neurol*, t. 12, nr 8, s. 602–608, 2005.
- [146] K. Skorkovská, H. Wilhelm, H. Lüdtke, i B. Wilhelm, „How sensitive is pupil campimetry in hemifield loss?”, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, t. 247, nr 7, s. 947–953, 2009, doi: 10.1007/s00417-009-1040-7.
- [147] D. Ben Ner *i in.*, „Chromatic pupilloperimetry for objective diagnosis of best vitelliform macular dystrophy”, *Clinical Ophthalmology*, t. 13, s. 465–475, 2019, doi: 10.2147/OPHTH.S191486.
- [148] R. Chibel *i in.*, „Chromatic Multifocal Pupillometer for Objective Perimetry and Diagnosis of Patients with Retinitis Pigmentosa”, *Ophthalmology*, t. 123, nr 9, s. 1898–1911, wrz. 2016, doi: 10.1016/j.ophtha.2016.05.038.
- [149] „Free color blindness test app”. <https://www.color-blindness.com/> (dostęp 24 maj 2023).
- [150] L. L. Lobato-Rincón, M. del C. Cabanillas-Campos, C. Bonnin-Arias, E. Chamorro-Gutiérrez, A. Murciano-Cespedosa, i C. S. R. Roda, „Pupillary behavior in relation to wavelength and age”, *Front Hum Neurosci*, t. 8, nr 1 APR, kwi. 2014, doi: 10.3389/fnhum.2014.00221.
- [151] P. Bitsios, R. Prettyman, i E. Szabadi, „Changes in autonomic function with age: A study of pupillary kinetics in healthy young and old people”, *Age Ageing*, t. 25, nr 6, 1996, doi: 10.1093/ageing/25.6.432.
- [152] J. W. Bartlett i C. Frost, „Reliability, repeatability and reproducibility: Analysis of measurement errors in continuous variables”, *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, t. 31, nr 4. 2008. doi: 10.1002/uog.5256.
- [153] H. X. Barnhart i D. P. Barboriak, „Applications of the repeatability of quantitative imaging biomarkers: A review of statistical analysis of repeat data sets”, *Transl Oncol*, t. 2, nr 4, 2009, doi: 10.1593/tlo.09268.
- [154] T. K. Koo i M. Y. Li, „A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research”, *J Chiropr Med*, t. 15, nr 2, 2016, doi: 10.1016/j.jcm.2016.02.012.

- [155] M. Münch i A. Kawasaki, „Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: Classification, function and clinical implications”, *Current Opinion in Neurology*, t. 26, nr 1. s. 45–51, luty 2013. doi: 10.1097/WCO.0b013e32835c5e78.
- [156] D. H. McDougal i P. D. Gamlin, „The influence of intrinsically-photosensitive retinal ganglion cells on the spectral sensitivity and response dynamics of the human pupillary light reflex”, *Vision Res*, t. 50, nr 1, s. 72–87, sty. 2010, doi: 10.1016/j.visres.2009.10.012.
- [157] C. Kostic *i in.*, „Determination of rod and cone influence to the early and late dynamic of the pupillary light response”, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, t. 57, nr 6, s. 2501–2508, maj 2016, doi: 10.1167/iovs.16-19150.
- [158] D. Cao, J. Pokorny, V. C. Smith, i A. J. Zele, „Rod contributions to color perception: Linear with rod contrast”, *Vision Res*, t. 48, nr 26, s. 2586–2592, lis. 2008, doi: 10.1016/j.visres.2008.05.001.
- [159] R. J. Lucas, S. Hattar, M. Takao, D. M. Berson, R. G. Foster, i K. W. Yau, „Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice”, *Science (1979)*, t. 299, nr 5604, 2003, doi: 10.1126/science.1077293.
- [160] P. D. R. Gamlin, D. H. McDougal, J. Pokorny, V. C. Smith, K. W. Yau, i D. M. Dacey, „Human and macaque pupil responses driven by melanopsin-containing retinal ganglion cells”, *Vision Res*, t. 47, nr 7, s. 946–954, 2007, doi: 10.1016/j.visres.2006.12.015.
- [161] E. J. Fernández, A. Unterhuber, P. M. Prieto, B. Hermann, W. Drexler, i P. Artal, „Ocular aberrations as a function of wavelength in the near infrared measured with a femtosecond laser”, *Opt Express*, t. 13, nr 2, 2005, doi: 10.1364/opex.13.000400.
- [162] E. J. Fernández i P. Artal, „Ocular aberrations up to the infrared range: from 6328 to 1070 nm”, *Opt Express*, t. 16, nr 26, 2008, doi: 10.1364/oe.16.021199.
- [163] M. M. Thomas i T. D. Lamb, „Light adaptation and dark adaptation of human rod photoreceptors measured from the α -wave of the electroretinogram”, *Journal of Physiology*, t. 518, nr 2, 1999, doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0479p.x.
- [164] T. D. Lamb i E. N. Pugh, „Dark adaptation and the retinoid cycle of vision”, *Progress in Retinal and Eye Research*, t. 23, nr 3. s. 307–380, maj 2004. doi: 10.1016/j.preteyeres.2004.03.001.
- [165] Y. Wang, N. Bensaid, P. Tiruveedhula, J. Ma, S. Ravikumar, i A. Roorda, „Human foveal cone photoreceptor topography and its dependence on eye length”, *Elife*, t. 8, 2019, doi: 10.7554/eLife.47148.
- [166] Y. Kitaguchi, K. Bessho, T. Yamaguchi, N. Nakazawa, T. Mihashi, i T. Fujikado, „In vivo measurements of cone photoreceptor spacing in myopic eyes from images obtained

- by an adaptive optics fundus camera”, *Jpn J Ophthalmol*, t. 51, nr 6, 2007, doi: 10.1007/s10384-007-0477-7.
- [167] V. Lakshminarayanan i J. M. Enoch, „Biological waveguides”, w *Handbook of Optics*, 2000.
- [168] T. J. T. P. Van Den Berg i H. Spekreijse, „Near infrared light absorption in the human eye media”, *Vision Res*, t. 37, nr 2, 1997, doi: 10.1016/S0042-6989(96)00120-4.
- [169] Z. Bielecki i A. Rogalski, *Detekcja sygnałów optycznych*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2001.
- [170] J. M. Palmer, „Radiometry and photometry FAQ”, *The University of Arizona*, 2003. <https://wp.optics.arizona.edu/jpalmer/radiometry/radiometry-and-photometry-faq/> (dostęp 24 maj 2023).
- [171] L. T. Troland, „On the measurement of visual stimulation intensities”, *J Exp Psychol*, t. 2, nr 1, 1917, doi: 10.1037/h0071652.
- [172] L. N. Thibos, N. Lopez-Gil, i A. Bradley, „What is a troland?”, *Journal of the Optical Society of America A*, t. 35, nr 5, s. 813, 2018, doi: 10.1364/josaa.35.000813.
- [173] R. W. Nygaard i T. E. Frumkes, „Calibration of the retinal illuminance provided by Maxwellian View”, *Vision Res*, t. 22, s. 433–434, 1982.