

Εισαγωγή στην οπτική μικροσκοπία



Ιστορική αναδρομή οπτικής μικροσκοπίας



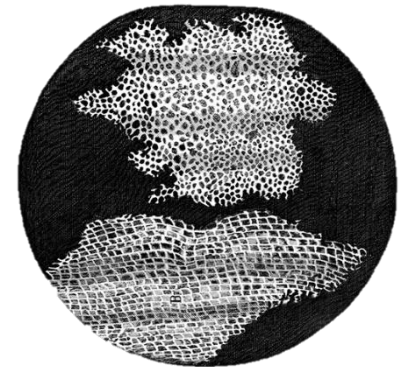
Η χρήση μεγεθυντικών φακών αναφέρεται σε κείμενα Ρωμαίων φιλοσόφων του 1^{ου} αιώνα μ.Χ.



Ο Γαλιλαίος διατυπώνει τις αρχές που διέπουν τη λειτουργία των φακών και την εστίαση του φωτός (αρχές 17^{ου} αιώνα)

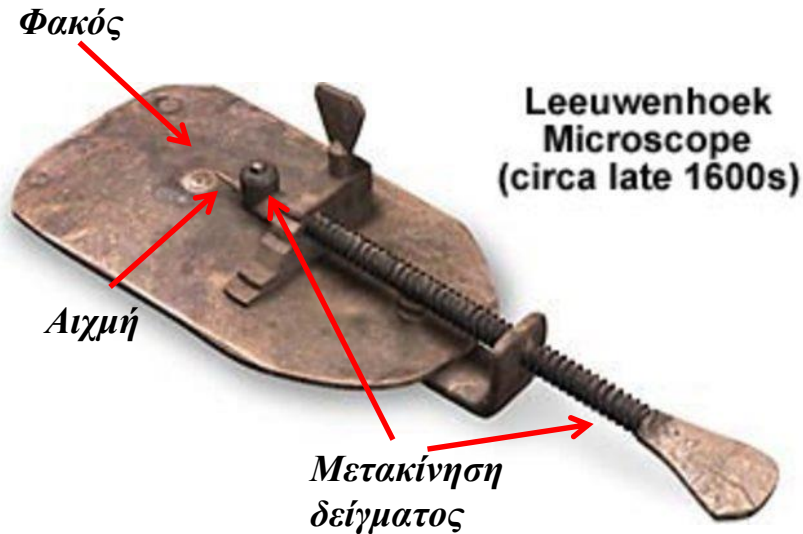


Εφεύρεση του **σύνθετου** οπτικού μικροσκοπίου από τον Robert Hooke (1665) με μεγέθυνση 20X.



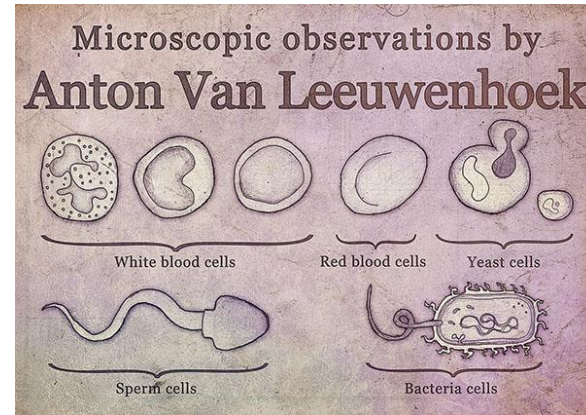
Το πρώτο σχέδιο από παρατήρηση κομματιών φελλού – διάκριση δομών που κατά τον Hooke θυμίζουν κελιά (cells) μοναχών

Ιστορική αναδρομή οπτικής μικροσκοπίας

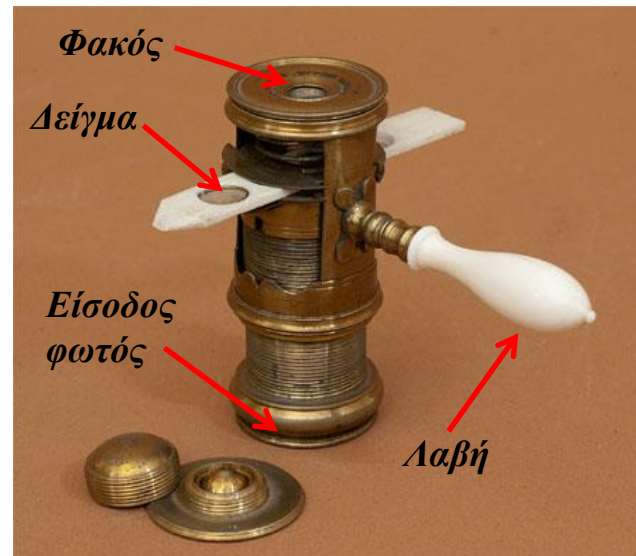


Ο Anton van Leeuwenhoek γύρω στο 1670 κατασκευάζει έναν διαφορετικό τύπο μικροσκοπίου χρησιμοποιώντας ένα φακό μεγέθυνσης εκατοντάδων φορές

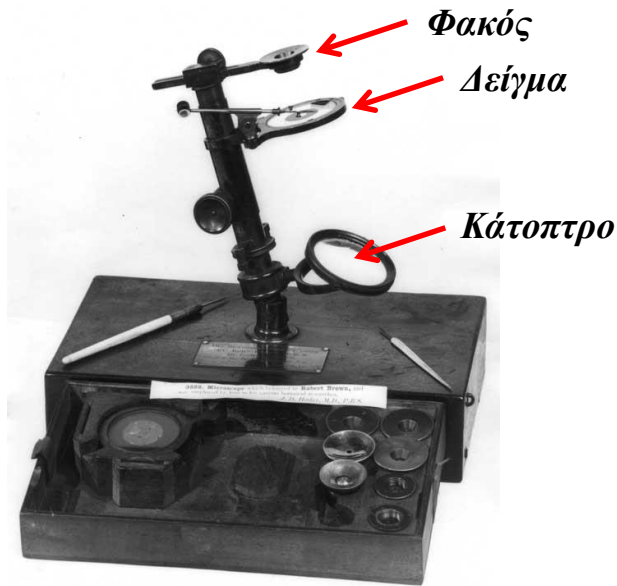
Το screw-barrel μικροσκόπιο (~1700) αποτελούνταν έναν κύλινδρο με σπείρωμα που βίδωνε σε εξωτερική βάση ώστε να επιτευχθεί η εστίαση στο δείγμα



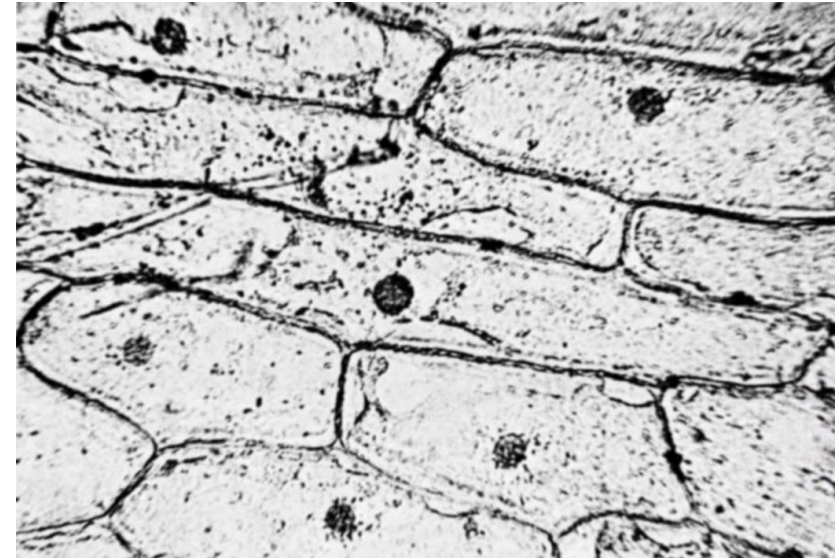
Πρώτες in-vivo παρατηρήσεις λευκών και ερυθρών κυττάρων, μυκήτων, σπερματοζωαρίων και βακτηρίων



Ιστορική αναδρομή οπτικής μικροσκοπίας



Το μικροσκόπιο που κατασκευάστηκε από το βοτανολόγο Robert Brown (~1830) για την παρατήρηση γύρης από διάφορα άνθη

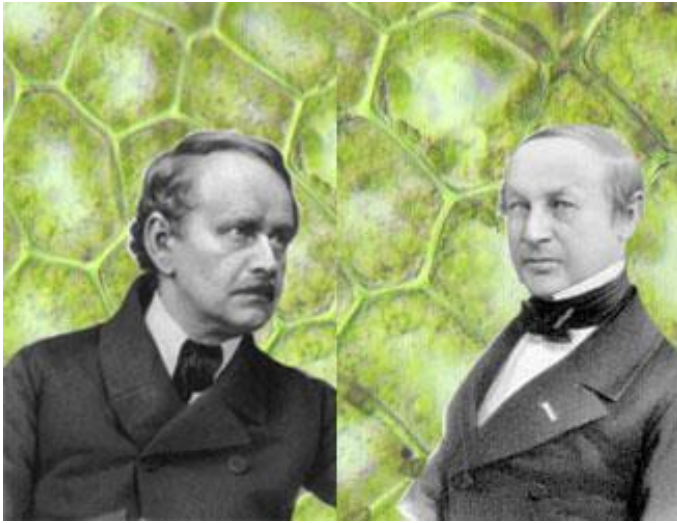


Εικόνα κυττάρων φλοιού Allium μέσω του μικροσκοπίου Brown με εμφανή τα κυτταρικά τοιχώματα και του πυρήνες



Όλες οι σημαντικές βιολογικές παρατηρήσεις μέχρι και τα τέλη του 19^{ου} αιώνα έγιναν με απλά μικροσκοπία που περιείχαν ένα φακό

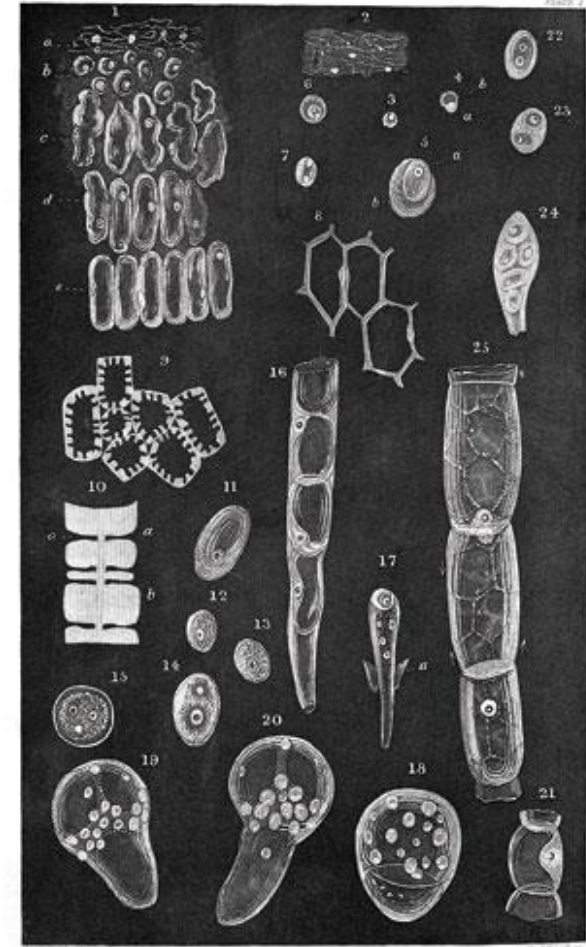
Η διατύπωση της κυτταρικής θεωρίας



Matthias Schleiden (1804-1881) **Theodor Schwann** (1810-1882)

«Θεμελιώδης δομική και λειτουργική μονάδα όλων των έμβιων οργανισμών είναι το κύτταρο»

Αν και τα κύτταρα είχαν παρατηρηθεί το 1665 από τον Hooke, μόλις το 1839 ο Schwann και Schleiden διατύπωσαν την ολοκληρωμένη κυτταρική θεωρία



1838: Σχέδια φυτικών κυττάρων από τον Schleiden

Η τελειοποίηση του σύνθετου μικροσκοπίου



Ernst Karl Abbe
(1840 - 1905)

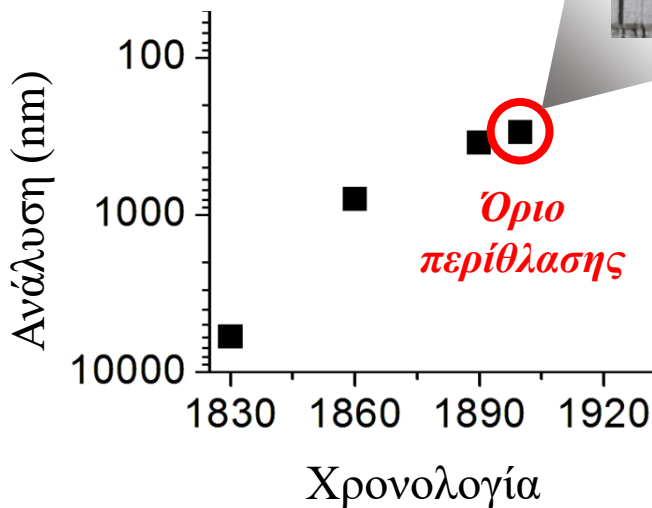
$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$



Ο Abbe σχεδίασε τους πρώτους σύγχρονους αντικειμενικούς φακούς (objective lenses) με δυνατότητα διόρθωσης της

- α) Σφαιρικής Εκτροπής
- β) Χρωματικής Εκτροπής

οι οποίοι μπορούσαν να φτάσουν πολύ κοντά στο θεωρητικό περιθλαστικό όριο όσον αφορά τη χωρική ανάλυση ενός μικροσκοπίου.

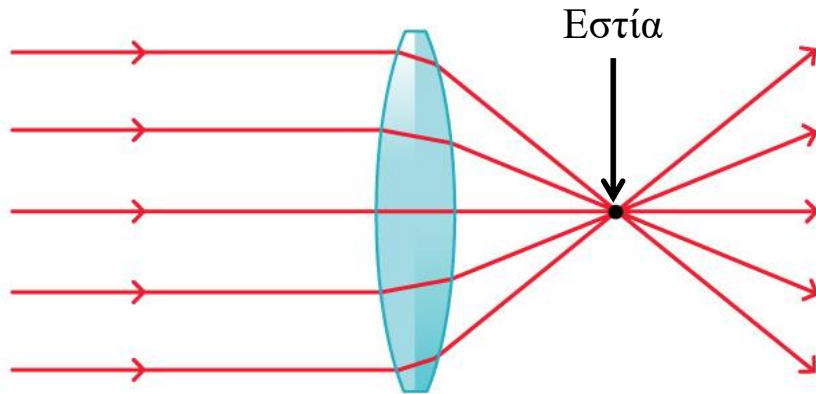


Σύνθετο μικροσκόπιο Carl Zeiss του 1879 με οπτικά κατασκευασμένα από τον Ernst Karl Abbe



Επικράτηση σύνθετων μικροσκοπίων

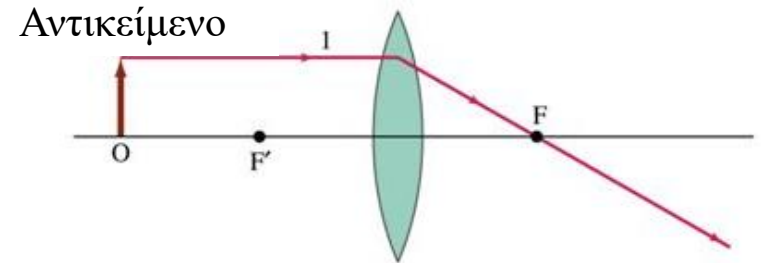
Φακοί και μικροσκόπια



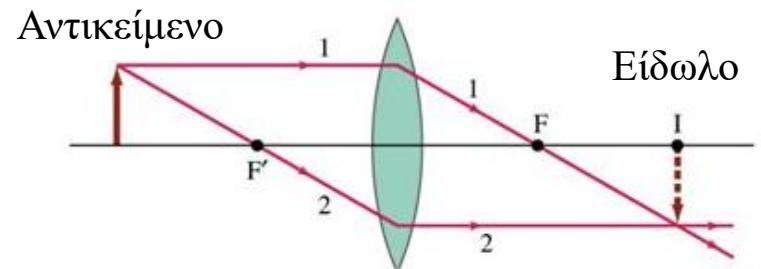
Ένας θετικός φακός συγκεντρώνει παράλληλες ακτίνες σε ένα σημείο, το οποίο ονομάζεται εστία του φακού. Η απόσταση της εστίας από το φακό ονομάζεται εστιακή απόσταση.

Απλοί κανόνες ray-tracing

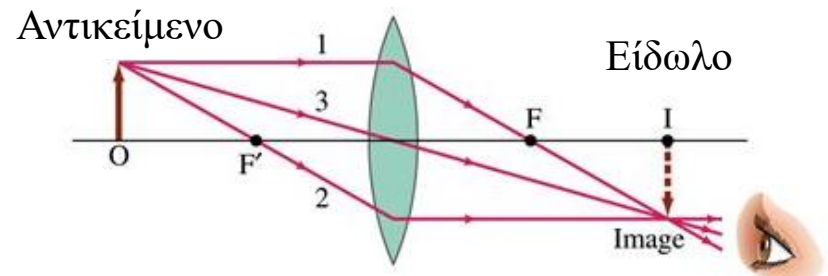
1. Μία ακτίνα παράλληλη ως προς τον άξονα θα εξέλθει μέσω του εστιακού σημείου



2. Μία ακτίνα που περνάει μέσω του εστιακού σημείου, εξέρχεται παράλληλη ως προς τον άξονα

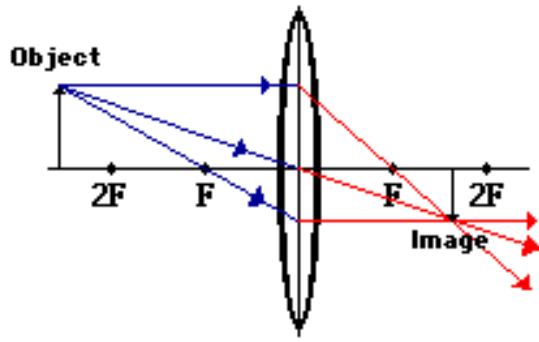


3. Μία ακτίνα που περνάει μέσω του κέντρου του φακού διατηρεί την πορεία της

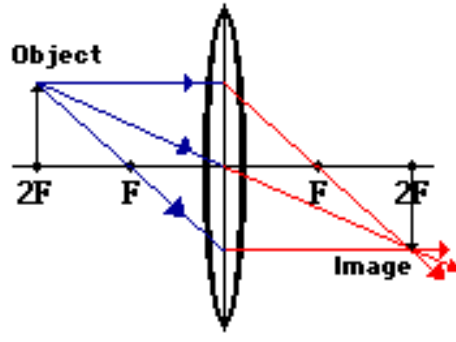


Πώς μπορούμε να μαντέψουμε που θα σχηματιστεί το είδωλο ενός αντικειμένου για θετικό (συγκλίνοντα) φακό εστιακής απόστασης F ;

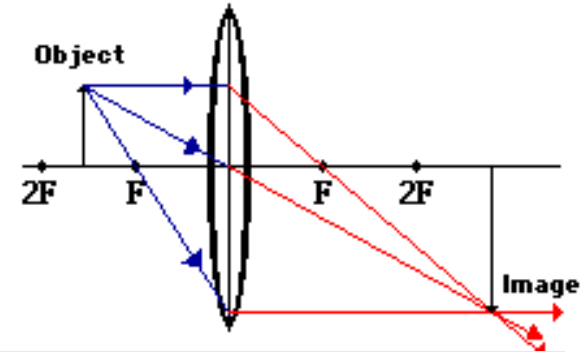
Φακοί και μικροσκόπια - Παραδείγματα



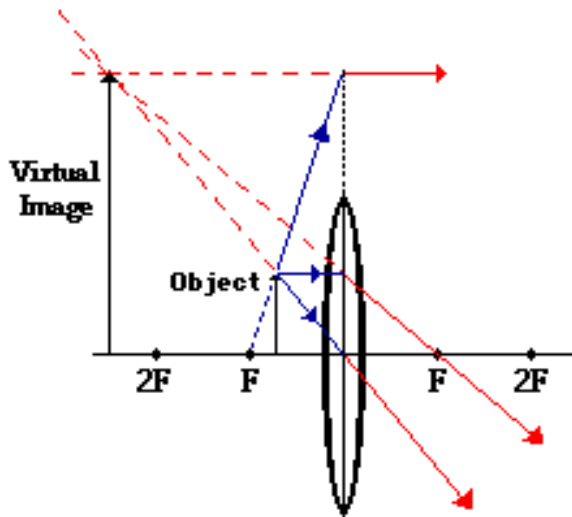
Για απόσταση αντικειμένου $> 2F$, το είδωλο θα βρίσκεται μεταξύ F και $2F$ στην απέναντι πλευρά του φακού.
Το είδωλο θα είναι πραγματικό, ανεστραμμένο και μικρότερο σε μέγεθος από το αντικείμενο.



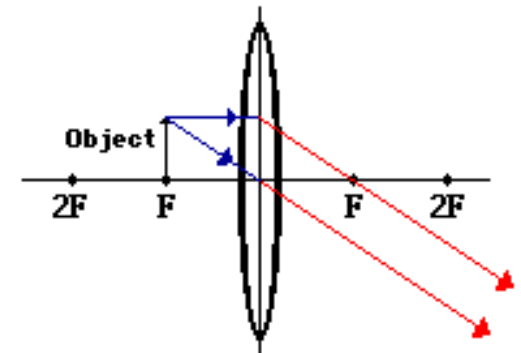
Για απόσταση αντικειμένου $= 2F$, το είδωλο θα βρίσκεται σε απόσταση $2F$ στην απέναντι πλευρά του φακού.
Το είδωλο θα είναι πραγματικό, ανεστραμμένο και ίσο σε μέγεθος με το αντικείμενο.



Για απόσταση αντικειμένου μεταξύ F και $2F$, το είδωλο θα βρίσκεται σε απόσταση $> 2F$ στην απέναντι πλευρά του φακού.
Το είδωλο θα είναι πραγματικό, ανεστραμμένο και μεγαλύτερο σε μέγεθος από το αντικείμενο.

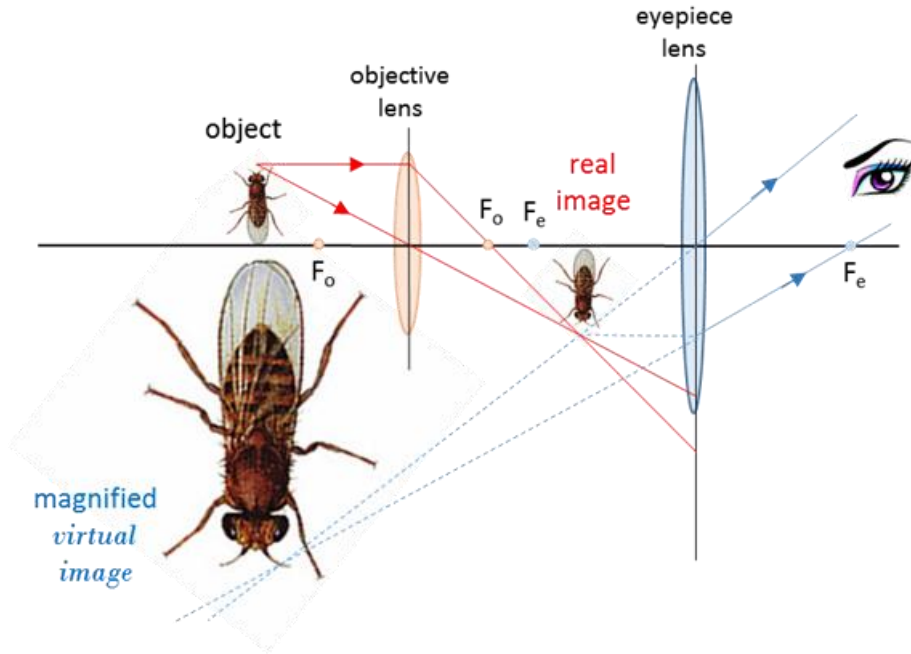


Για απόσταση αντικειμένου $< F$, το είδωλο θα βρίσκεται σε απόσταση $> 2F$ στην ίδια πλευρά του φακού.
Το είδωλο θα είναι φανταστικό, μη ανεστραμμένο και μεγαλύτερο σε μέγεθος από το αντικείμενο.



Για απόσταση αντικειμένου $= F$, δεν προκύπτει σχηματισμός ειδώλου!

Σχηματισμός ειδώλου στο σύνθετο μικροσκόπιο



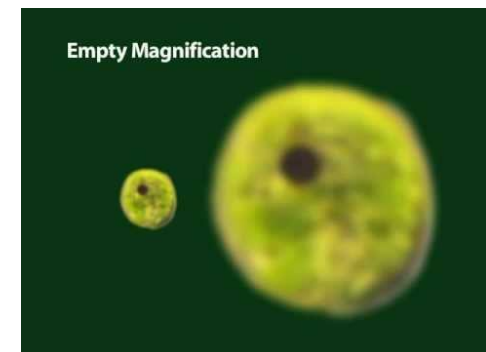
http://www.physics.usyd.edu.au/teach_res/hsp/sp/mod31/m31_diverging.htm



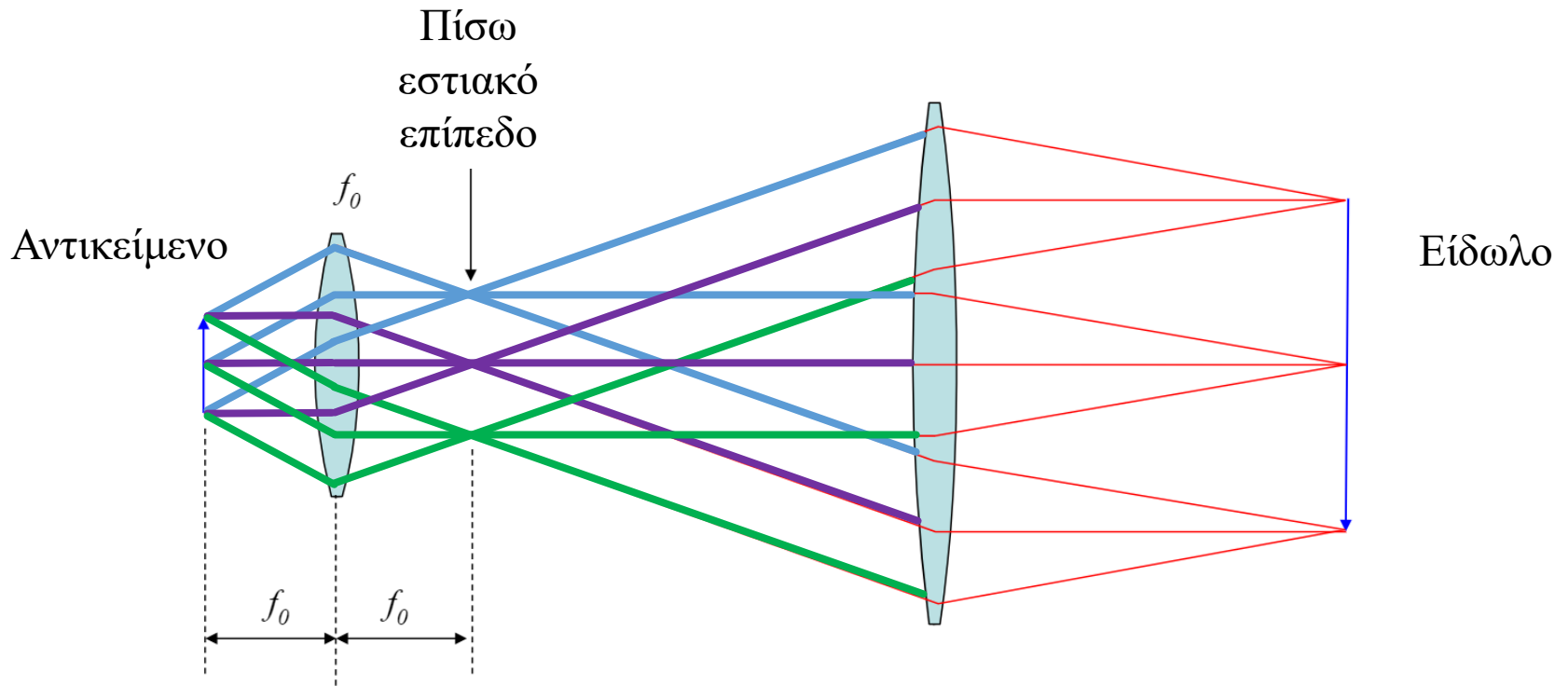
Η τελική μεγέθυνση προκύπτει ως το γινόμενο των επιμέρους μεγεθύνσεων του αντικειμενικού φακού (objective lens) και του προσφθάλμιου φακού (eyepiece lens).
Τυπικές τιμές μεγέθυνσης:
Objective lens: **5X – 100X**
Eyepiece lens: **συνήθως 10X**

Άλλο μεγέθυνση, άλλο ανάλυση!

- Η μεγέθυνση δίνεται από το λόγο του μεγέθους του ειδώλου ως προς το μέγεθος του αντικειμένου
- Η ανάλυση δείχνει τη δυνατότητα του οπτικού συστήματος να διακρίνει δύο σημειακά αντικείμενα ως ξεχωριστά
- Όταν το εξεταζόμενο δείγμα φαίνεται μεγαλύτερο χωρίς όμως να υπάρχει αντίστοιχα πιο μεγάλη ευκρίνεια της εικόνας, τότε μιλάμε για «άδεια μεγέθυνση»

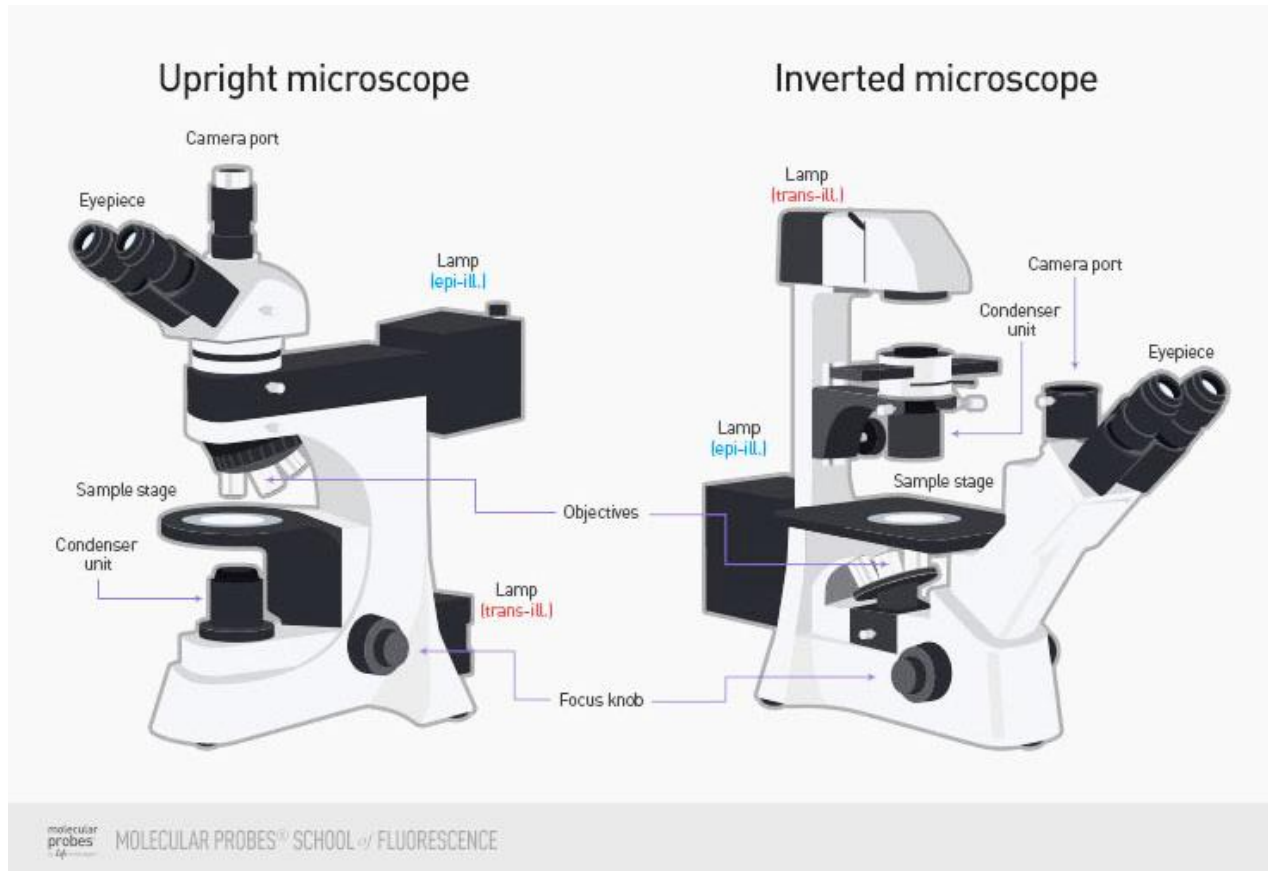


Ορισμός του πίσω εστιακού επιπέδου φακού



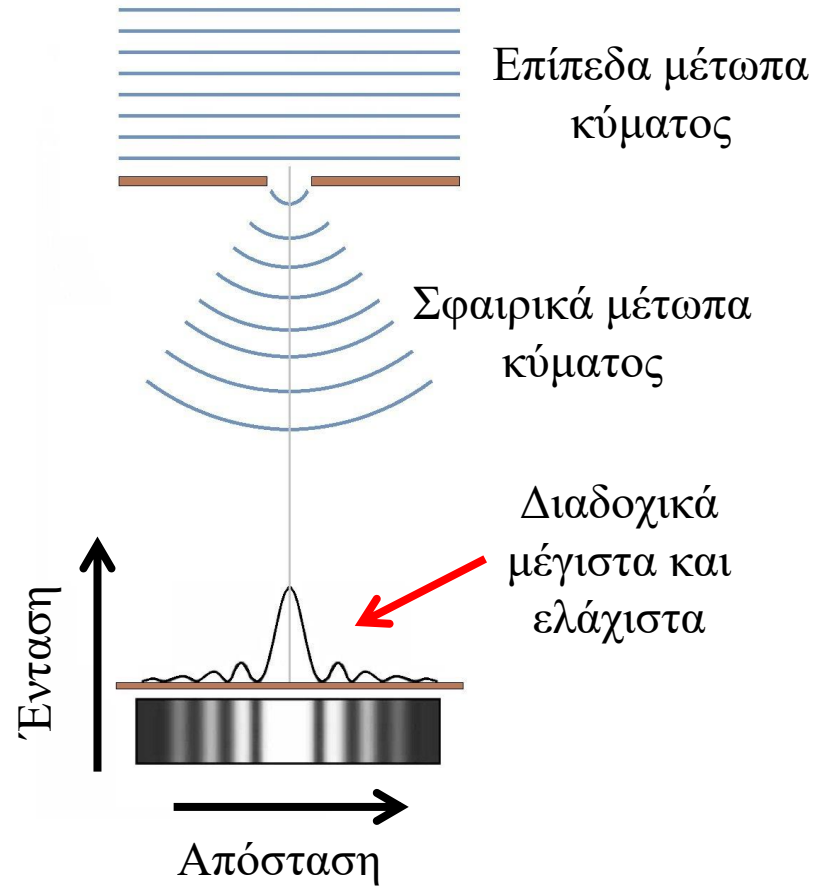
Οι ακτίνες που φεύγουν υπό την ίδια γωνία από το αντικείμενο συναντώνται στο πίσω εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού. Εφόσον οι τυπικές εστιακές αποστάσεις είναι 1- 10 mm, το πίσω εστιακό επίπεδο βρίσκεται εντός του αντικειμενικού φακού

Είδη οπτικών μικροσκοπίων (ορθό / ανάστροφο)



Τα ανάστροφα μικροσκόπια εκμεταλλεύονται τη βαρύτητα ώστε να επιτευχθεί απευθείας παρατήρηση ζωντανών κυττάρων τα οποία βρίσκονται σε petridish μαζί με θρεπτικό μέσο. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές είναι πιο ακριβά και διαθέτουν περιορισμένη μεγέθυνση σε σχέση με τα ορθά μικροσκόπια

Το περιθλαστικό όριο στη χωρική ανάλυση



Περίθλαση είναι η εκτροπή ενός κύματος από την ευθύγραμμη πορεία του όταν αυτό συναντήσει κάποια οπή ή εμπόδιο



Σχηματισμός μεγίστων και ελαχίστων έντασης λόγω διαδοχικής ενισχυτικής και καταστρεπτικής συμβολής των κυμάτων

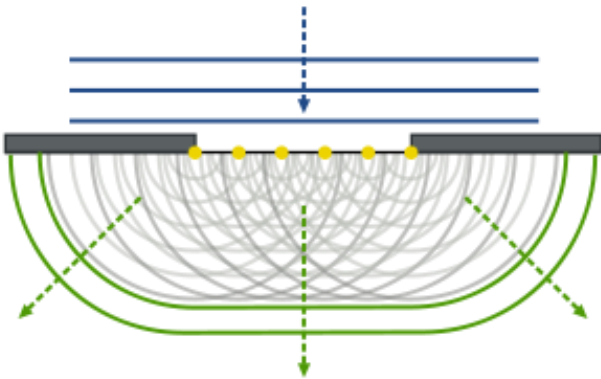
Το περιθλαστικό όριο στη χωρική ανάλυση



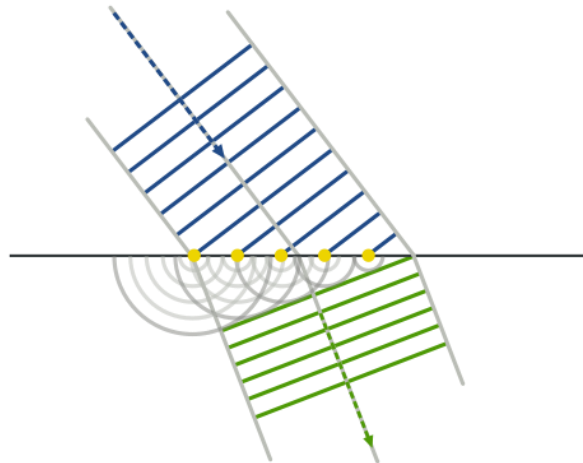
Christaan Huygens
(1629-1695)

Αρχή Huygens: Κάθε σημείο του αρχικού μετώπου κύματος μπορεί να θεωρηθεί ως πηγή δευτερογενών σφαιρικών κυμάτων, η περιβάλλουσα των οποίων δίνει το νέο μέτωπο κύματος.

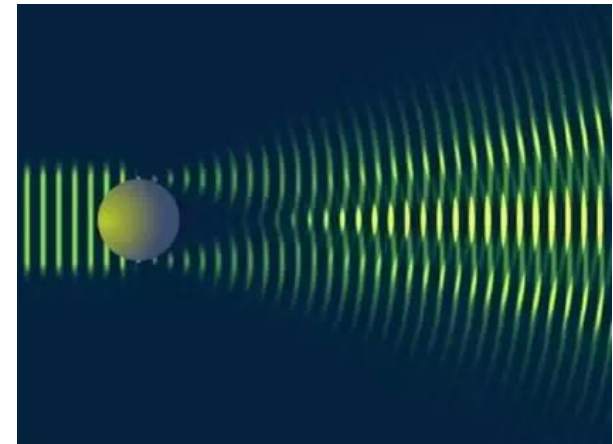
Περίθλαση επίπεδων μετώπων κύματος που προσπίπτουν σε σχισμή



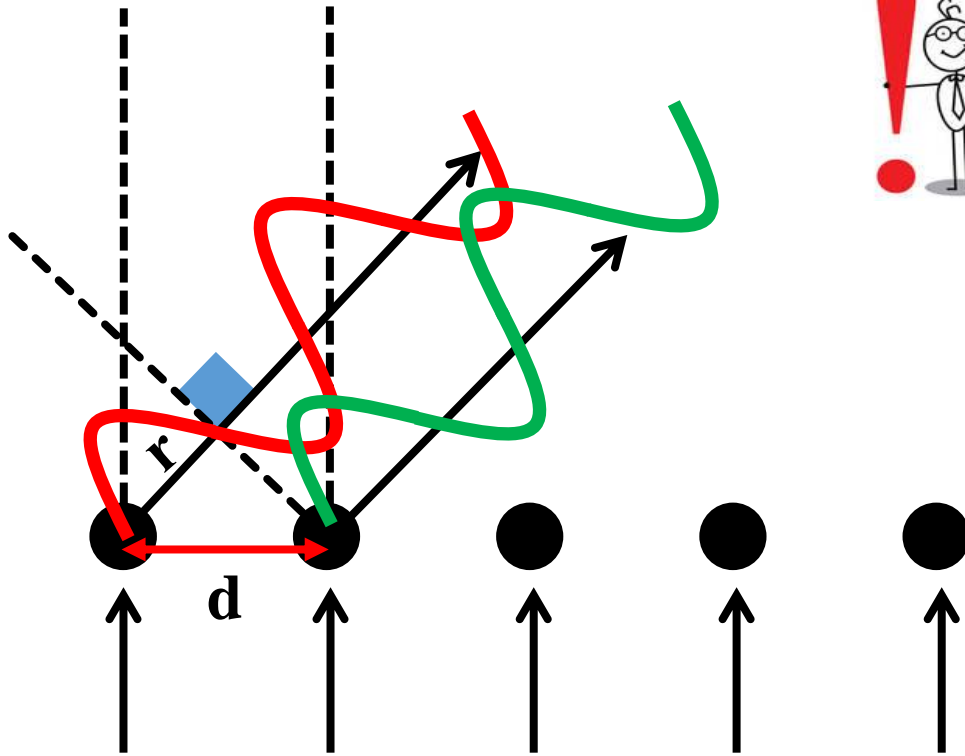
Διάθλαση επίπεδων μετώπων κύματος σε διεπιφάνεια



Περίθλαση επίπεδων μετώπων κύματος από σφαιρικό εμπόδιο



Το περιθλαστικό όριο στη χωρική ανάλυση



Αν $r = \lambda/2$ (μισό μήκος κύματος) τότε προκύπτει **καταστρεπτική συμβολή** των κυμάτων με ίδια γωνία εξόδου στο πίσω εστιακό επίπεδο

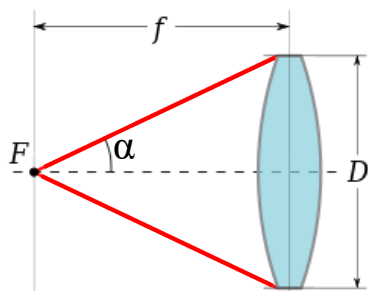
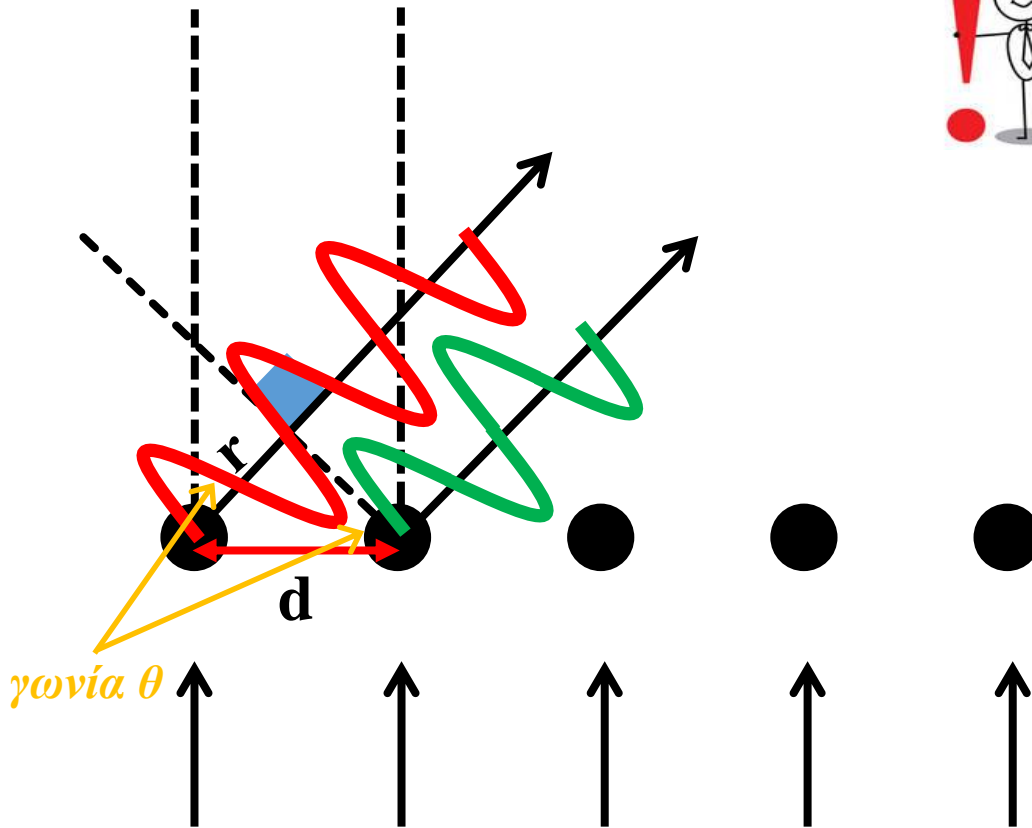
Το περιθλαστικό όριο στη χωρική ανάλυση



Αν $r = \lambda$ (ένα μήκος κύματος) τότε προκύπτει ενισχυτική συμβολή των κυμάτων με ίδια γωνία εξόδου στο πίσω εστιακό επίπεδο



$$\sin(\theta) = \lambda / d$$



Η ελάχιστη απόσταση που διακρίνεται θα είναι ίση με $d = \lambda / \sin(\alpha)$

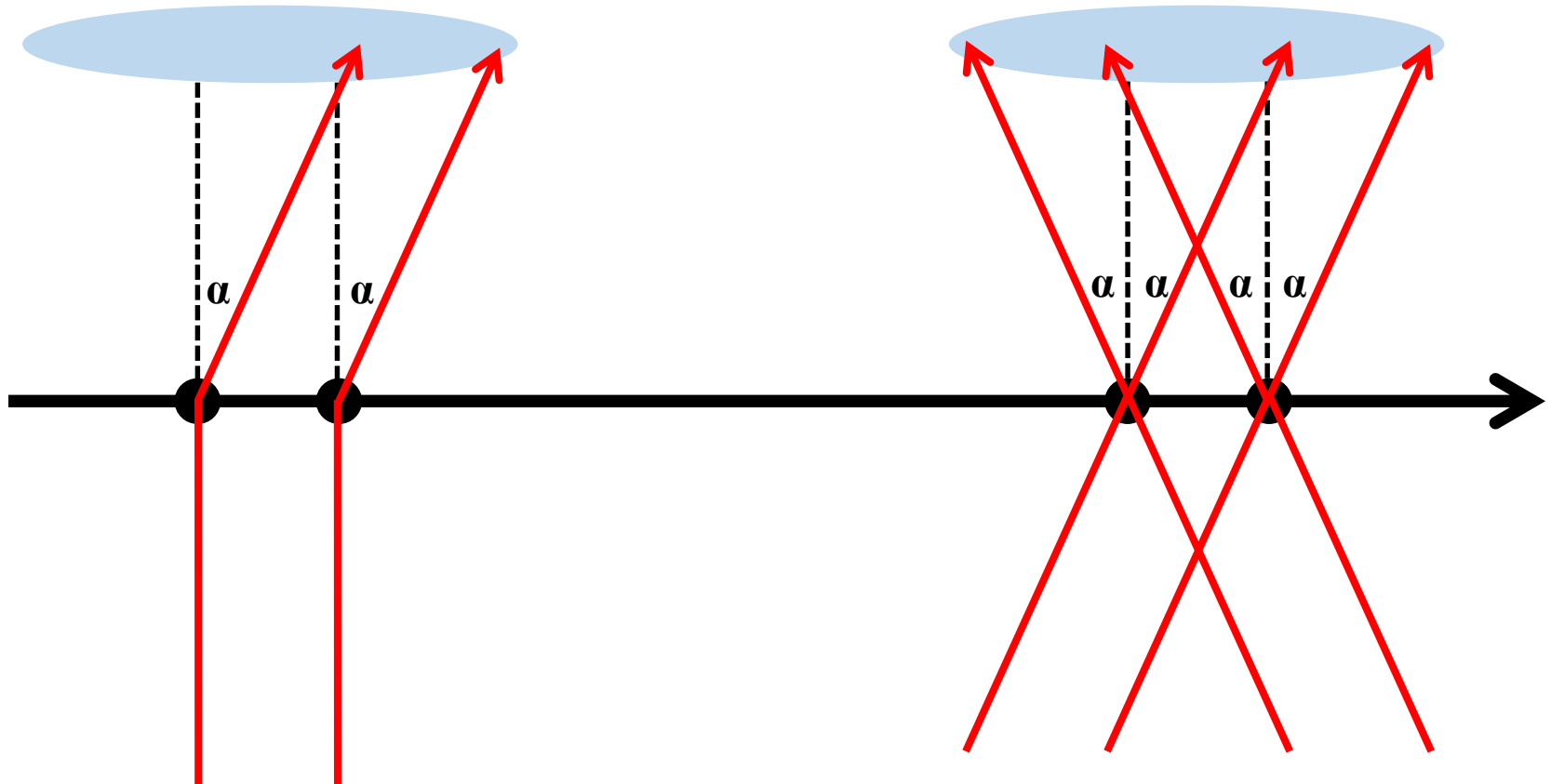
Αν ο αντικειμενικός φακός έχει μέγιστη ημίσεια γωνία υποδοχής φωτός α τότε:

- αν $\theta < \alpha$, η περιθλώμενη δέσμη περνά στο φακό και τα δύο σημεία διακρίνονται
- αν $\theta > \alpha$, η περιθλώμενη δέσμη δεν περνά στο φακό και τα δύο σημεία δεν διακρίνονται
- αν $\theta = \alpha$, τα δύο σημεία διακρίνονται οριακά

Το περιθλαστικό όριο στη χωρική ανάλυση

Παράλληλος
φωτισμός

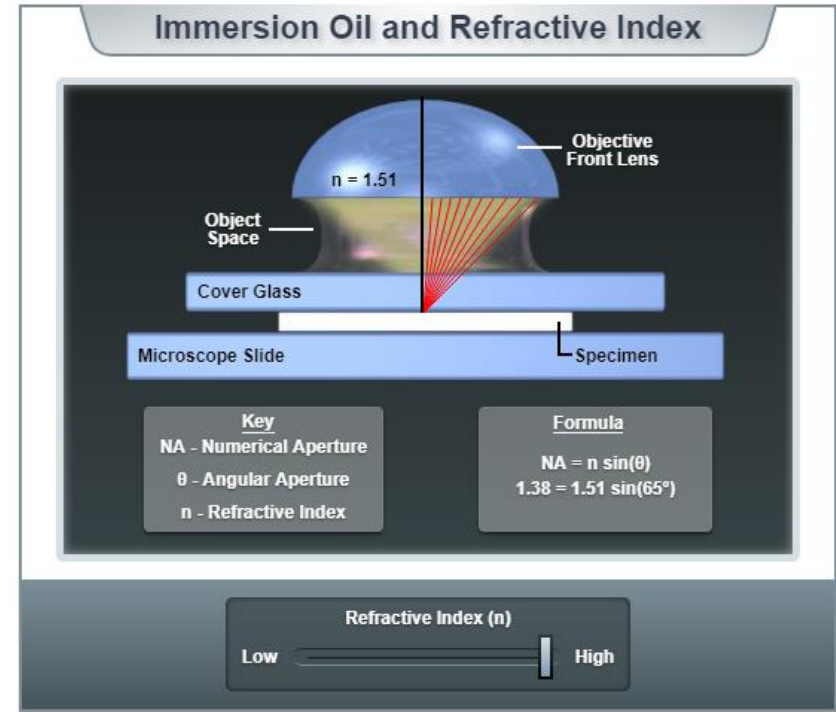
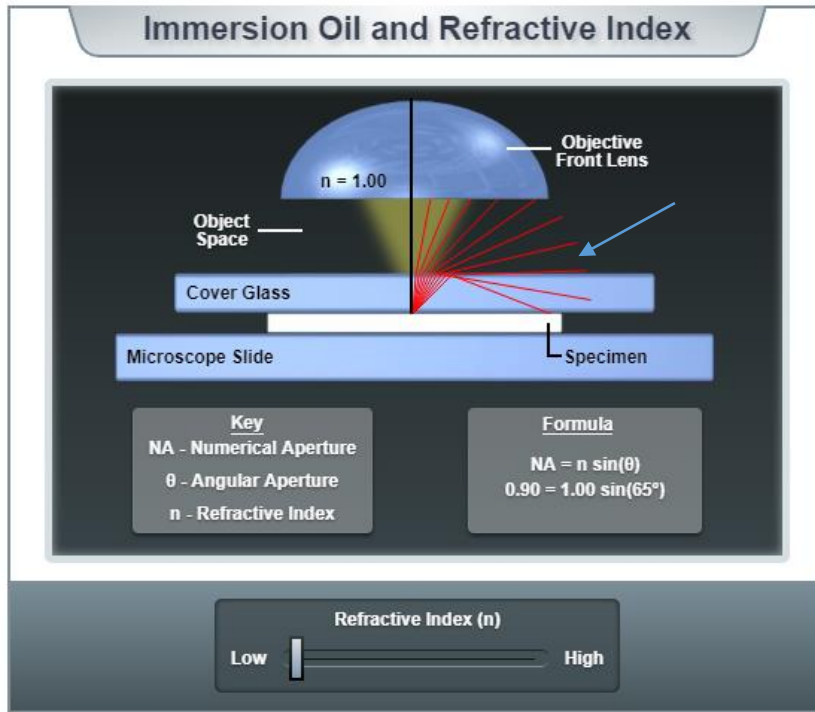
Εστιασμένος
φωτισμός



Με εστιασμένο φωτισμό (ημίσειας γωνίας ίσης ή μεγαλύτερης της α), η ανάλυση γίνεται δύο φορές καλύτερη εφόσον το περιθλώμενο φως μπορεί να εισέλθει στο φακό για γωνίες από 0 έως 2α

Abbe's formula
 $d = \lambda / 2\sin(\alpha)$

Αντικειμενικοί φακοί oil immersion



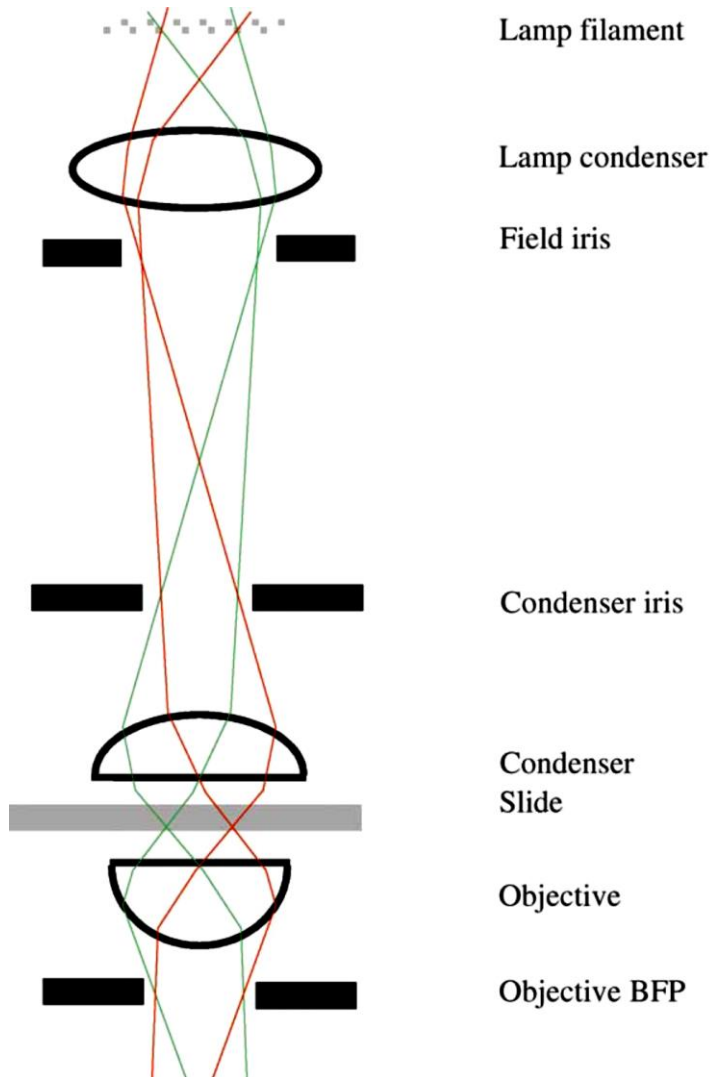
Δείκτης διάθλασης $n = 1$

(Μη αποτελεσματική συλλογή φωτός
λόγω διάθλασης)

Δείκτης διάθλασης $n = 1.51$

- Νέο μήκος κύματος $\lambda(\text{oil})$ μέσα στο immersion medium n:
 $\lambda(\text{oil}) = \lambda(\text{vacuum}) / n$
- Η σχέση Abbe θα γίνει: $d = \lambda / 2n \sin(\alpha)$, όπου $n \sin(\alpha)$ το αριθμητικό άνοιγμα (Numerical Aperture) του αντικειμενικού φακού

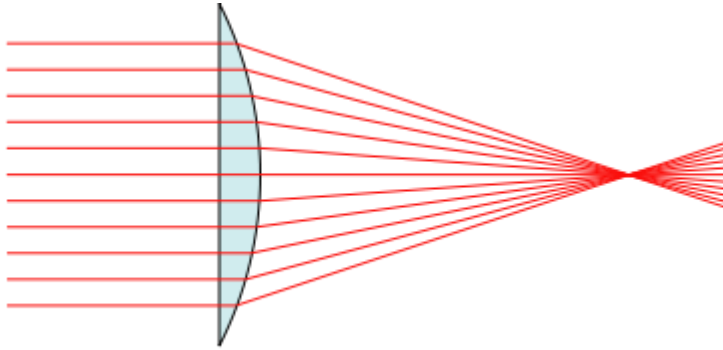
Köhler Illumination



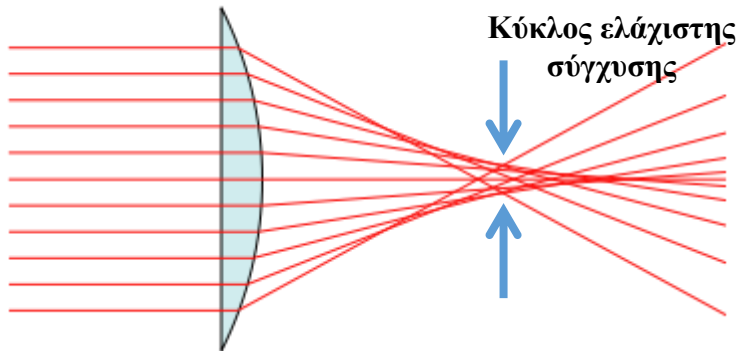
- Τρόπος επίτευξης μέγιστης ανάλυσης του μικροσκοπίου
- Ομοιογενής φωτισμός του δείγματος μέσω του πίσω εστιακού επιπέδου του Lamp condenser
- Field iris: Ρύθμιση του μεγέθους της περιοχής που φωτίζεται
- Condenser iris: Ρύθμιση της γωνίας του φωτός που φτάνει στο δείγμα ανάλογα με το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού
- Συναντάται στα καλής ποιότητας ερευνητικά μικροσκόπια

Εκτροπές στη μικροσκοπία – Σφαιρική εκτροπή

Ιδανικός φακός

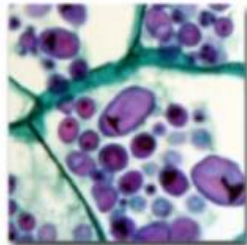
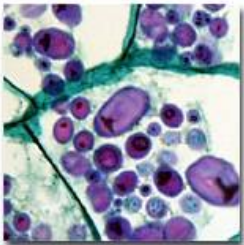


Φακός με σφαιρική εκτροπή



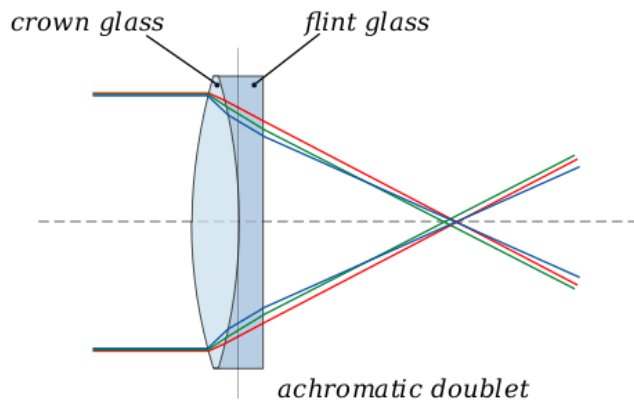
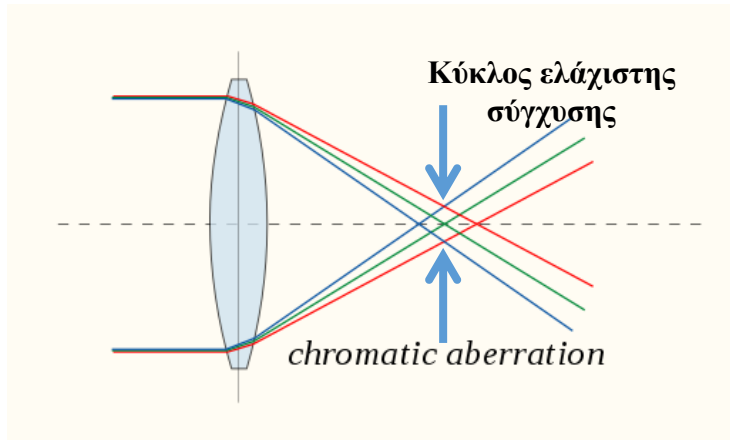
Με διόρθωση

Χωρίς διόρθωση



- Η σφαιρική εκτροπή προκύπτει σε φακούς που οι επιφάνειές τους αποτελούν τμήμα σφαιρικής επιφάνειας, λόγω της αυξημένης κάμψης των ακτίνων στην περιφέρεια σε σχέση με το κέντρο του φακού.
- Οι ακτίνες εστιάζονται σε διαφορετικά σημεία επί του οπτικού άξονα σχηματίζοντας τη λεγόμενη «καυστική καμπύλη».
- Η σφαιρική εκτροπή είναι ανάλογη της 4^{ης} δύναμης της διαμέτρου του φακού και αντιστρόφως ανάλογη της 3^{ης} δύναμης της εστιακής του απόστασης. Συνεπώς, είναι πιο σημαντική για φακούς μεγάλου αριθμητικού ανοίγματος (NA).
- Η σφαιρική εκτροπή μπορεί να διορθωθεί με κατάλληλο συνδυασμό θετικών, αρνητικών, καθώς και ασφαιρικών φακών ώστε να βελτιωθεί η ποιότητα του τελικού ειδώλου.

Εκτροπές στη μικροσκοπία – Χρωματική εκτροπή



- Η χρωματική εκτροπή προκύπτει κατά τη χρήση πολυχρωματικού φωτός, λόγω του διαφορετικού δείκτη διάθλασης για κάθε μήκος κύματος (φαινόμενο διασποράς).
- Εφόσον ο δείκτης διάθλασης $n(\lambda)$ για κάθε χρώμα διαφέρει, ακτίνες διαφορετικού μήκους κύματος που προσπίπτουν στο ίδιο σημείο του φακού, θα καμφθούν διαφορετικά σύμφωνα με το νόμο του Snell και άρα θα εστιαστούν σε διαφορετικά σημεία επί του οπτικού άξονα.
- Ο δείκτης διάθλασης μειώνεται με αυξανόμενο μήκος κύματος λ , συνεπώς τα κόκκινα μήκη κύματος εστιάζονται πιο μακριά σε σχέση με τα μπλε.
- Η χρωματική εκτροπή μπορεί να διορθωθεί για ορισμένο εύρος μηκών κύματος μέσω χρήσης συνδυασμού φακών διαφορετικής διασποράς (αντικειμενικοί achromat, fluorite, apochromat).

Εκτροπές στη μικροσκοπία – Καμυλότητα πεδίου

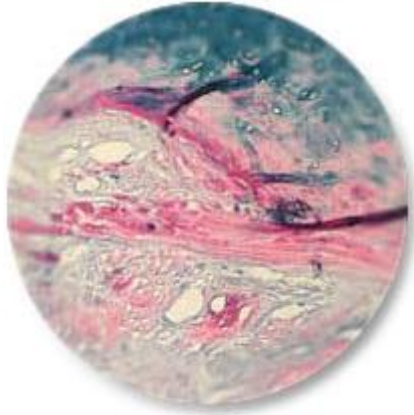
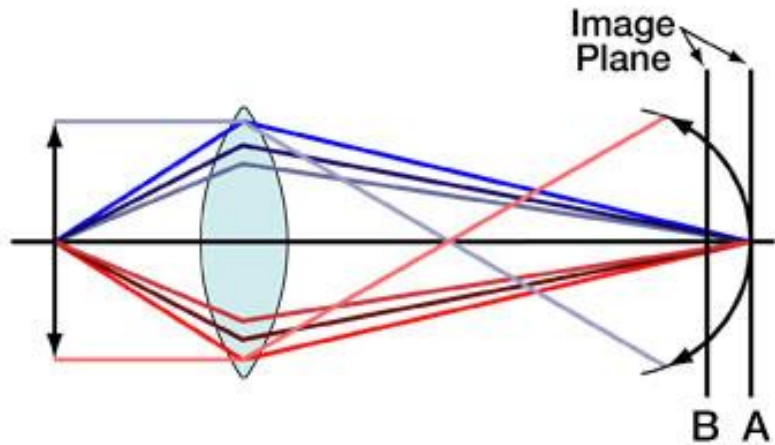


Image Plane A
(εστιασμένο
κέντρο)

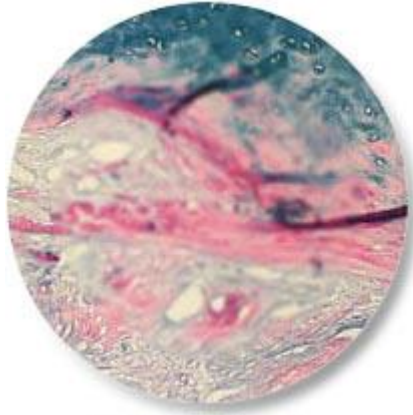
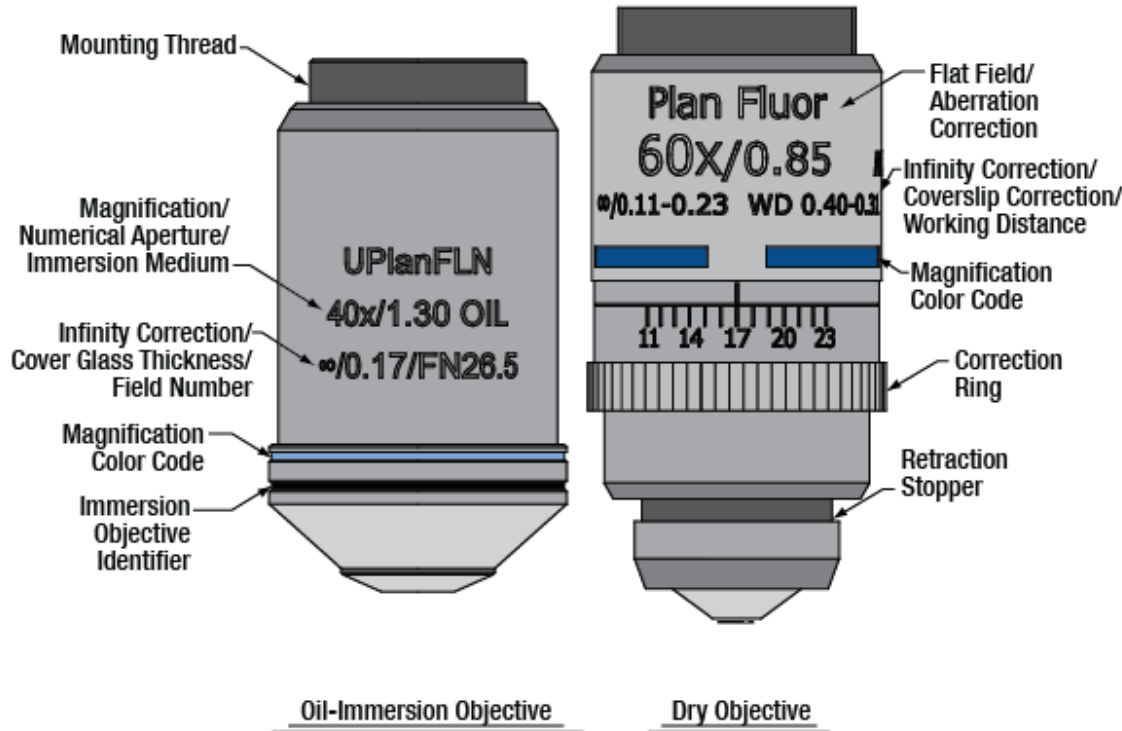


Image Plane B
(εστιασμένη
περιφέρεια)

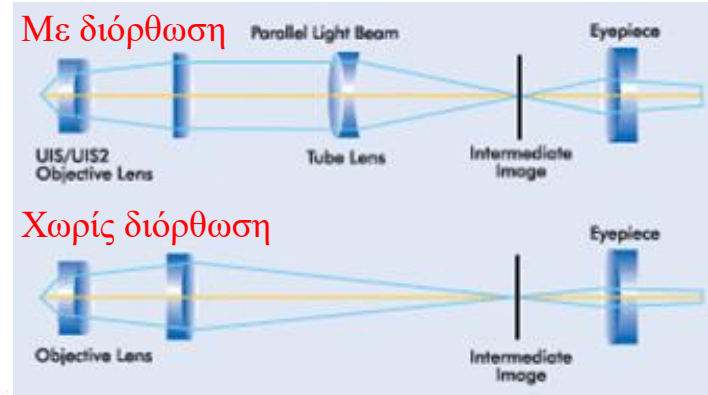
- Ένας απλός φακός εστιάζει σημεία ενός επίπεδου αντικείμενου (π.χ. ιστό από ένα slide μικροσκοπίου) σε μια σφαιρική επιφάνεια (Petzval) που μοιάζει με μπωλ.
- Η εικόνα μπορεί να είναι εστιασμένη ανάμεσα στα επίπεδα A και B δίνοντας ευκρίνεια απεικόνισης είτε στο κέντρο είτε στην περιφέρεια του πεδίου παρατήρησης, όχι όμως και στα δύο ταυτόχρονα.
- Τα σύγχρονα μικροσκόπια διορθώνουν την καμυλότητα πεδίου χρησιμοποιώντας αντικειμενικούς φακούς με το όνομα plan ή plano, οι οποίοι μπορούν ταυτόχρονα να διορθώνουν και άλλα είδη εκτροπών όπως η σφαιρική και η χρωματική.

Βασικά στοιχεία αντικειμενικών φακών



Field Number: Το εύρος της περιοχής παρατήρησης σε mm στο επίπεδο του ενδιάμεσου ειδώλου. Για τον υπολογισμό της περιοχής παρατήρησης στο επίπεδο του αντικειμένου, διαιρούμε το Field Number με τη μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού (π.χ. $25.6/60 \approx 0.42$ mm).

Infinity correction:



Χρωματικός κώδικας αντικειμενικών φακών

Mag.	1×	2×	4×	10×	20×	40×	50×	60×	100×
Code	Black	Gray	Red	Yellow	Green	Light blue	Dark blue	White	
Imm. Med.	Oil		Water		Glycerin		Oil/water/glycerin		
Code	Black		White		Orange		Red		

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124201385000021#f0010>

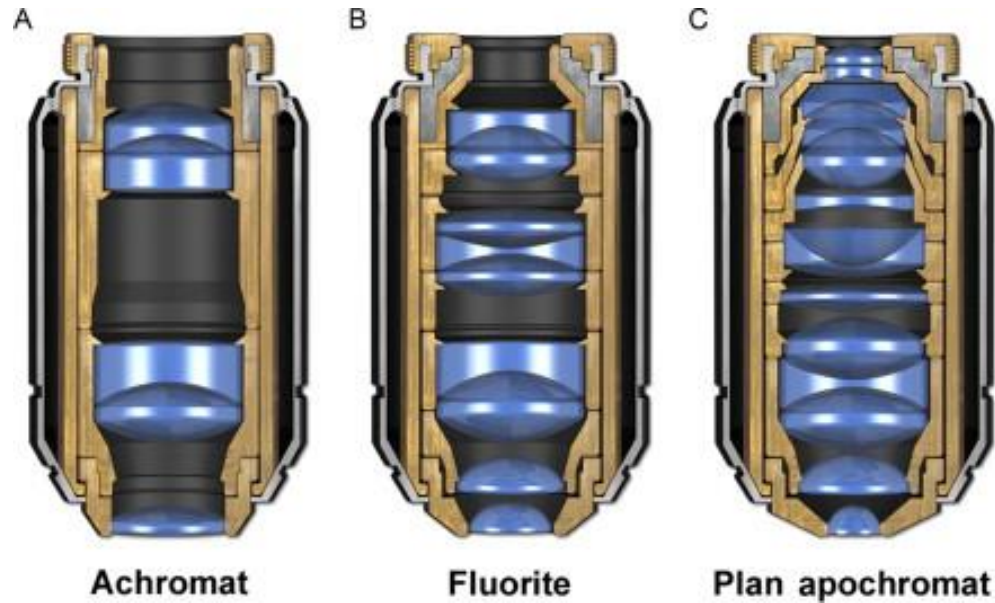


Το coverslip είναι κομμάτι του οπτικού συστήματος και θα πρέπει να βρίσκεται σε **απόλυτη συμφωνία** με τις προβλεπόμενες τιμές του αντικειμενικού φακού ώστε να μειωθούν δραστικά οι εκτροπές

https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_ID=1044

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/aberrations/spherical/>

Είδη αντικειμενικών φακών



- Οι αντικειμενικοί φακοί τύπου Achromat είναι οι απλούστεροι στην κατασκευή, διορθώνοντας μόνο τη χρωματική εκτροπή.
- Οι αντικειμενικοί φακοί τύπου Fluorite έχουν αυξημένη διόρθωση χρωματικής εκτροπής σε σχέση με τους Achromats, ενώ διορθώνουν και τη σφαιρική εκτροπή. Οι Fluorite επίσης παρουσιάζουν υψηλή διαπερατότητα στο UV φως.
- Οι αντικειμενικοί φακοί τύπου Plan apochromat είναι οι καλύτερα διορθωμένοι για χρωματική και σφαιρική εκτροπή. Επιπλέον είναι διορθωμένοι για την καμπυλότητα πεδίου, όπως υποδηλώνεται από το πρόθεμα «Plan».

Ποια ερωτήματα πρέπει να μπορούμε να απαντάμε;



Μικροσκόπιο από το εργαστήριο του Sir Alexander Fleming (1881-1955)

- Τι είδους βιολογικές παρατηρήσεις έγιναν με τα πρώτα μικροσκόπια κατά το 17^ο έως 19^ο αιώνα;
- Πότε και γιατί ήλθε στο προσκήνιο το σύνθετο οπτικό μικροσκόπιο;
- Ποιοι οι κανόνες του ray-tracing και πως αυτοί εφαρμόζονται στο μικροσκόπιο;
- Ποια είναι τα βασικά είδη των οπτικών μικροσκοπίων;
- Τί είναι περίθλαση και πως συνδέεται η περιγραφή της με την αρχή Huygens;
- Πώς προκύπτει η σχέση Abbe για τη χωρική ανάλυση ενός μικροσκοπίου;
- Τί είναι ο φωτισμός Köhler και τι πλεονεκτήματα προσφέρει;
- Ποιες είναι οι βασικές οπτικές εκτροπές σε ένα μικροσκόπιο;
- Τι σημαίνουν τα στοιχεία που αναγράφονται σε έναν αντικειμενικό φακό;