



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

**Σύγχρονες τεχνικές/συστήματα οπτικής
μικροσκοπίας με υψηλή διακριτική
ικανότητα**

ΑΝΔΡΙΩΤΗΣ ΣΑΡΑΝΤΟΣ

Αριθμός Μητρώου: 16006

Επιβλέπων Καθηγητής

ΓΚΛΩΤΣΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Αθήνα 26/09/2023

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ο Επιβλέπων Καθηγητής

Γκλώτσος Δημήτριος

Καθηγητής

[ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ]

Κωστόπουλος Σπυρίδων

Αναπληρωτής Καθηγητής

[ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ]

Ασβεστάς Παντελεήμων

Καθηγητής

[ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ]

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο υπογράφων Ανδριώτης Σαράντος του Πέτρου, με αριθμό μητρώου 48016006 φοιτητής του Τμήματος Μηχανικών Βιοϊατρικής της Σχολής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του διπλώματός μου».

Ημερομηνία

26/09/2023

Ο Δηλών

Ανδριώτης Σαράντος



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρακάτω εργασία αποσκοπεί στο να διευρύνει τις γνώσεις του αναγνώστη στην μικροσκοπία και συγκεκριμένα στις τεχνικές της υπερ-ανάλυσης. Αρχικά, γίνεται μία αναφορά στις ιδιότητες του φωτός, καθώς η ίδια η μικροσκοπία βασίζεται πάνω σε αυτές. Αυτό συμβαίνει καθώς η κάθε τεχνική μικροσκοπίας αξιοποιεί διαφορετικές ιδιότητες του φωτός για την παρατήρηση του δείγματος, με σκοπό να παρέχουν στον μελετητή τα απαραίτητα δεδομένα που θα τον βοηθήσουν στην μελέτη του. Στη συνέχεια, γνωστοποιείται στον αναγνώστη η σημασία που κατέχει το ανθρώπινο οπτικό σύστημα στην οπτική παρατήρηση, που αποτελείται από τους οφθαλμούς, το οπτικό νεύρο και τον εγκέφαλο. Έπειτα, γίνεται μία αναφορά σε κάποιες από τις απλές τεχνικές μικροσκοπίας που χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα και σε ποιες ιδιότητες του φωτός βασίζεται η καθεμία. Μετά, αναλύεται το οπτικό όριο που μπορεί να διακριθεί με την χρήση των απλών τεχνικών και που οφείλεται αυτό, το οποίο ήταν και ο λόγος που δημιουργήθηκε η ανάγκη της δημιουργίας των τεχνικών μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης. Ύστερα, αναλύονται οι διάφορες τεχνικές υπερ-ανάλυσης και πως εξετάζουν η καθεμία ξεχωριστά το δείγμα κατά την παρατήρηση του, και τέλος, σε ποια δείγματα είναι προτιμότερο να εφαρμόζεται η κάθε τεχνική από αυτές. Συμπερασματικά, η εργασία τελειώνει αναφέροντας ότι οι τεχνικές υπερ-ανάλυσης πρέπει περαιτέρω να βελτιωθούν, ώστε να αυξηθεί η αξιοπιστία, αλλά και η προσαρμοστικότητα τους στην ποικιλομορφία των διαφορετικών δειγμάτων.

Λέξεις Κλειδιά: Διπλωματική εργασία, Τεχνικές μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης, Οπτική μικροσκοπία, Ανθρώπινο οπτικό σύστημα, Ιδιότητες φωτός, Πλεονεκτήματα/Μειονεκτήματα τεχνικών μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης, Τεχνικές μικροσκοπίας με υψηλή διακριτική ικανότητα.

ABSTRACT

The following thesis aims to expand the knowledge of the reader on field of microscopy and specifically on the techniques of super-resolution microscopy. To begin with, there is a reference on the properties of light, since the whole aspect of microscopy is based on them. This happens because every microscopy technique makes use of a different property of light for the observation of the sample, in order to provide the researchers with the necessary data needed to help them with their research. Subsequently, the reader is made aware of the human visual system and how it functions and the parts it consists of, those being the oculi, optical nerve and the brain. Afterwards, some basic microscopy techniques that are still used even nowadays are being mentioned, whilst also explaining which property of light each of them is based on. Then, analysis is done on the optical limit that is discernible with the usage of simple techniques, and why that is. That being the reason for the need, for the creation of the super-resolution microscopy techniques. Following, the different super-resolution techniques are being introduced and how each of them examines the sample provided by the researcher during their observation, and lastly, in which samples is each of them better suited to be used in order to produce the best results possible. To conclude with, the thesis ends on the premise that super-resolution techniques must be further improved, so that both their credibility and their adaptability increases, even when examining a big variety of samples which have different characteristics and properties.

Keywords: Final project, Super-resolution microscopy techniques, Optical microscopy, Human visual system, Properties of light, Advantages/Disadvantages of super-resolution microscopy techniques, Microscopy techniques with high resolution

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής και συγκεκριμένα στο τμήμα Μηχανικών Βιοϊατρικής, κατά το έτος 2023.

Θέλω να ευχαριστήσω πολύ τον καθηγητή μου, Καθηγητής του ΠΑ.Δ.Α, Κος Δημήτριος Γκλώτσος, καθώς με την συνεχή του υποστήριξη και βοήθεια μπόρεσα να ολοκληρώσω την πτυχιακή μου εργασία, με θέμα Σύγχρονες τεχνικές/συστήματα οπτικής μικροσκοπίας με υψηλή διακριτική ικανότητα, που αποδείχθηκε ένα αρκετά δύσκολο θέμα μελέτης και χωρίς την βοήθειά του θα μου ήταν αδύνατο να το τελειοποιήσω.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, που χάρις αυτούς οφείλω την όλη διαδρομή των σπουδών μου έως και σήμερα, αλλά και για την συνεχή τους υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2. Εισαγωγή στην μικροσκοπία	9
2.1 Ιδιότητες του φωτός	9
2.2 Αλληλεπίδραση φωτός-ύλης.....	13
2.3 Ανθρώπινο οπτικό σύστημα	17
2.3.1 Οφθαλμοί	19
2.3.2 Οπτικό νεύρο εγκεφάλου	20
2.3.3 Εγκέφαλος.....	21
2.4 Οπτική μικροσκοπία	22
2.4.1 Οργανολογία	23
2.4.2 Αρχή λειτουργίας.....	25
2.4.3 Μικροσκοπία φθορισμού	37
2.4.4 Συνεστιακή Μικροσκοπία.....	41
3. Μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης.....	47
3.1 Αρχές της μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης	47
3.2 Τεχνικές	51
3.3 Εφαρμογές της μεθοδολογίας	65
4. Συγκριτική αξιολόγηση.....	68
4.1 Έρευνα	68
4.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης.....	73
4.2.1 Πλεονεκτήματα μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης.....	73
4.2.2 Μειονεκτήματα μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης	74
5. Συμπεράσματα	75
6. Αναφορές – Πηγές	78

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διπλωματική αυτή στοχεύει στο να διευρύνει τις γνώσεις του αναγνώστη πάνω στον τομέα της μικροσκοπίας και συγκεκριμένα στις τεχνικές μικροσκοπίας με υψηλή διακριτική ικανότητα ή αλλιώς τεχνικές υπερ-ανάλυσης. Η ικανότητα να βλέπουμε βιολογικά γεγονότα σε δράση είτε *in vitro* είτε *in vivo*, αποτελεί παράγοντα καίριας σημασίας για την κατανόηση τους αλλά και για την διεύρυνση των γνώσεων πάνω στις βιολογικές λειτουργίες, αυτή τη δυνατότητα παρέχει και το οπτικό μικροσκόπιο.

Η μικροσκοπία είναι ένας κλάδος που έχει προχωρήσει σημαντικά από όταν πρωτοεισήχθη στην μελέτη των βιολογικών φαινομένων και συνεχίζει να βελτιώνεται με την πάροδο του χρόνου. Η βελτίωση αυτή προήλθε κυρίως από την καλύτερη κατανόηση των χαρακτηριστικών του φωτός και την πρόοδο στην τεχνολογία των φακών. Όλες οι τεχνικές μικροσκοπίας χρησιμοποιούν σαν αρχή κάποια από τις αλληλεπιδράσεις του φωτός με την ύλη, σαν βάση για την μελέτη του εκάστοτε δείγματος. Ενώ είναι απαραίτητη και η αναφορά στο οπτικό σύστημα, καθώς είναι σημαντικό να γίνει αντιληπτό το πως διενεργά και αντιλαμβάνεται το φως ο ανθρώπινος οργανισμός.

Με την ανακάλυψη διάφορων τεχνικών μικροσκοπίας ο άνθρωπος μπόρεσε να αυξήσει την ποικιλία, αλλά και τις λεπτομέρειες που μπορεί να διακρίνει κατά την παρατήρηση. Οι σημαντικότερες τεχνικές μικροσκοπίας που συνείσφεραν περισσότερο στην τελική επίτευξη των τεχνικών υπερ-ανάλυσης είναι η μικροσκοπία φθορισμού και η συνεστιακή μικροσκοπία. Η μικροσκοπία φθορισμού βασίζεται στην ανακάλυψη και στη δημιουργία πολύ στοχευμένων ανιχνευτών φθορισμού που ήταν συμβατοί με όλο το φάσμα του ορατού φωτός και πρόσφεραν ένα μικρό εύρος ζωνών διέγερσης, ενώ η συνεστιακή μικροσκοπία εισήγαγε την ιδέα της τρισδιάστατης απεικόνισης. Η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης είναι μια σύζευξη αυτών των δύο, ένα αποτέλεσμα που κατάφερε να ξεπεράσει το όριο της οπτικής παρατήρησης που ήταν δυνατό με τις απλές τεχνικές μικροσκοπίας.

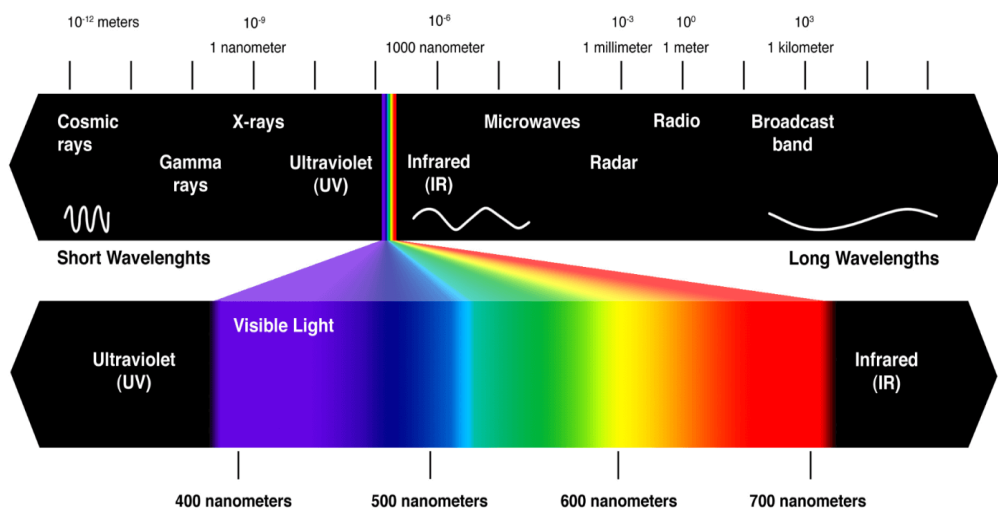
Με τις δυνατότητες που προσφέρει η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης και της ικανότητας της να αλληλοεπιδρά με ένα ευρύ φάσμα βιολογικών μορίων, είναι ένα επιθυμητό εργαλείο για την έρευνα των δομών και της μοριακής δυναμικής των ζωντανών όντων. Χάρης αυτή, η προηγουμένως απεικόνιση μικροσκοπικών δομών και

μοριακών αλληλεπιδράσεων (μεταξύ μορίων και οργανιδίων) που ήταν αθέατη από τις απλές τεχνικές είναι πλέον ορατή. Γεγονός που την καθιστά πολύ σημαντική καθώς τέτοιες δομές και αλληλεπιδράσεις πρέπει να μελετηθούν για να κατανοηθεί πως λειτουργούν τα κύτταρα, οι βασικές μονάδες της ζωής. Σε αυτή την έρευνα λοιπόν, θα αναλυθούν οι βασικές αρχές λειτουργίας, οι τρέχουσες εξελίξεις και οι εφαρμογές των τεχνικών υπερ-ανάλυσης.

2.Εισαγωγή στην μικροσκοπία

2.1 Ιδιότητες του φωτός

Πριν αναλυθούν οι ιδιότητες του ορατού φωτός, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το φως είναι μια μορφή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποτελείται από μαγνητικά και ηλεκτρικά πεδία. Με άλλα λόγια, είναι εφικτό ένα ηλεκτρόνιο να μετακινηθεί από την τροχιά του σε μια τροχιά με υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο όταν ένα άτομο αποκτά ενέργεια. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως διέγερση ενός ατόμου και είναι μια ασταθής κατάσταση με πολύ σύντομη διάρκεια. Όταν το ηλεκτρόνιο επιστρέψει στην αρχική του τροχιά και επίπεδο ενέργειας, εκπέμπει σημαντικά περισσότερη ενέργεια (Mauser, 2011). Έτσι, συμπεραίνουμε ότι η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι μια μορφή ενέργειας που μπορεί να οριστεί από το μήκος κύματός της. Παρακάτω απεικονίζεται το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα σε διάφορες κλίμακες νανομέτρων (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Απεικόνιση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, Πηγή: <https://photographyinfo.gr/blog/ifysitofotos/>

Όταν το μήκος κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κυμαίνεται μεταξύ 400 και 750 νανόμετρα(nm) μπορεί να διεγείρει το ανθρώπινο μάτι και αναφέρεται ως ακτινοβολία φωτός ή απλώς, φως (Walsh & Shakibaie, 2007). Συγκεκριμένα, το μήκος κύματος του ορατού φωτός κυμαίνεται από 380nm έως 780nm. Ωστόσο, τυπικά το μέσο ανθρώπινο μάτι δεν μπορεί να αντιληφθεί αυτή την ποσότητα ακτινοβολίας.

Ο ρυθμός διάδοσης της ακτινοβολίας εξαρτάται από το μέσο μέσω του οποίου ταξιδεύει την κάθε προκειμένη φορά. Στο κενό, η ταχύτητα του φωτός ως μορφή ενέργειας είναι περίπου $C = 3.108 \text{ m/s}$. Στα διάφορα μέσα διάδοσης, ο ρυθμός διάδοσης της ακτινοβολίας είναι μικρότερος από την ταχύτητα του φωτός, καθώς εξαρτάται από τις ιδιότητες του μέσου διάδοσης, όπως ο δείκτης διάθλασης και η πυκνότητα του μέσου. Για παράδειγμα, στον αέρα, ο ρυθμός διάδοσης του φωτός είναι κοντά στην ταχύτητα του φωτός στο κενό, αλλά μειώνεται αρκετά σε άλλα υλικά όπως τα γυαλιά ή το νερό.

Οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες με μικρότερα, αλλά και μεγαλύτερα μήκη κύματος από το ορατό φως είναι αόρατες στο γυμνό μάτι. Καθώς όπως προαναφέραμε το εύρος των μηκών κύματος για το ορατό φως είναι από 380 nm έως 780 nm. Οι κοσμικές ακτίνες, οι ακτίνες X και Y και οι ακτίνες UV είναι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες με μικρότερα μήκη κύματος, ενώ οι υπέρυθρες ακτίνες, τα μικροκύματα, και τα ραδιοκύματα έχουν μεγαλύτερα μήκη κύματος (Radi & Rasmussen, 2013). Η ακτινοβολία του φωτός μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο κατηγορίες, την μονοχρωματική και την σύνθετη. Η μονοχρωματική ακτινοβολία φωτός αποτελείται από ηλεκτρομαγνητικά κύματα που έχουν περίπου το ίδιο μήκος κύματος. Η σύνθετη ακτινοβολία, από την άλλη πλευρά, αποτελείται από ηλεκτρομαγνητικά κύματα με διάφορα μήκη κύματος (Sik & Kim, 2019).

Η φύση του φωτός παρέμεινε ένα μυστήριο παρά τις θεωρητικές και πρακτικές εξελίξεις στο πρώτο μισό του δέκατου ένατου αιώνα. Η αρχική σύνδεση μεταξύ ηλεκτρικών και μαγνητικών φαινομένων έγινε το 1820 από τον Δανό επιστήμονα Hans Christian Oersted, ο οποίος ανακάλυψε ότι τα ηλεκτρικά ρεύματα δημιουργούν μαγνητικές δυνάμεις. Έπειτα, τη δεκαετία του 1860 ο Σκωτσέζος φυσικός Τζέιμς Κλερκ Μάξγουελ, συνδύασε τα πεδία του ηλεκτρισμού, του μαγνητισμού και της οπτικής σε ένα θεμελιώδες θεωρητικό πλαίσιο (Krumm & Scourfield, 2000). Ο Maxwell όρισε το φως ως ένα κύμα διάδοσης ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων στη θεωρία του για τον ηλεκτρομαγνητισμό. Προέβλεψε επίσης ότι υπήρχε

ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η οποία αποτελείται από την σύζευξη ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων που ταξιδεύουν ως κύματα με τη ταχύτητα του φωτός. Ενώ, ο Heinrich Hertz, ένας Γερμανός φυσικός, ανακάλυψε και απέδειξε ότι τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα μεγάλου μήκους κύματος είχαν ιδιότητες παρόμοιες με το ορατό φως μικρότερου μήκους κύματος το 1888.

Εξισώσεις του Maxwell

Ο Faraday έκανε μία υπόθεση που υποστήριζε ότι τα ηλεκτρικά φορτία δημιουργούν πεδία που διαπερνούν ολόκληρο το σύμπαν και μεταφέρουν ηλεκτρικές και μαγνητικές δυνάμεις σε κοντινά φορτία. Βάση της υπόθεσης αυτής ο Maxwell δημιούργησε τις εξισώσεις για τα ηλεκτρικά και μαγνητικά φαινόμενα. Χάρης στις τέσσερις εξισώσεις του Maxwell μπορούμε να χαρακτηρίσουμε αυτά τα μεταβαλλόμενα μαγνητικά και ηλεκτρικά πεδία.

Η πρώτη από τις εξισώσεις αυτές αναφέρεται στο νόμο του Gauss για το ηλεκτρικό πεδίο, ο οποίος συσχετίζει την ηλεκτρική ροή από μία κλειστή επιφάνεια και το συνολικό φορτίο που περικλείει την επιφάνεια (1.1).

$$\oint \vec{E} \cdot d\vec{S} = \frac{Q_{in}}{\epsilon_0} \quad (1.1).$$

Όπου \vec{E} το ηλεκτρικό πεδίο, $d\vec{S}$ το διαφορικό διανυσματικής περιοχής παράλληλο προς την κανονική επιφάνεια, Q_{in} το συνολικό φορτίο που περικλείει την επιφάνεια και ϵ_0 η διηλεκτρική σταθερά (permittivity) του κενού.

Η διαφορική μορφή του νόμου του Gauss είναι η παρακάτω εξίσωση (1.2) που συνδέει ηλεκτρικό πεδίο \vec{E} κάποιου σημείου του χώρου με την κατανομή του φορτίου που εκφράζεται με την πυκνότητα ρ , στο ίδιο σημείο του χώρου.

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = \frac{\rho(\vec{r})}{\epsilon_0} \quad (1.2).$$

Η δεύτερη εξίσωση είναι ο νόμος του Gauss για το μαγνητικό πεδίο (2.1), που εκφράζει ότι η μαγνητική ροή που διέρχεται μέσα από μια κλειστή επιφάνεια είναι πάντοτε μηδέν.

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{S} = 0 \quad (2.1).$$

Όπου \vec{B} είναι το μαγνητικό πεδίο, $d\vec{S}$ το διαφορικό διανυσματικής περιοχής παράλληλο προς την κανονική επιφάνεια.

Η διαφορική της μορφή είναι η (2.2):

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (2.2).$$

Η τρίτη εξίσωση είναι ο νόμος του Faraday-Henry ή αλλιώς ο νόμος της επαγωγής (3.1), βάση αυτόν το μαγνητικό πεδίο που μεταβάλλεται με τον χρόνο δημιουργεί ηλεκτρικό πεδίο, στο οποίο η ηλεκτρεγερτική δύναμη του ισούται με τον (αρνητικό) ρυθμό μεταβολής της μαγνητικής ροής. Αποδίδει δηλαδή ότι το μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο δημιουργεί μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο.

$$\oint_c \vec{E} d\vec{l} = - \frac{d(\int_s \vec{B} d\vec{S})}{dt} = \int_s \left(- \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right) d\vec{S} \quad (3.1).$$

Όπου \vec{E} το ηλεκτρικό πεδίο, \vec{B} είναι το μαγνητικό πεδίο, $d\vec{S}$ το διαφορικό διανυσματικής περιοχής παράλληλο προς την κανονική επιφάνεια και s μία μη-κλειστή επιφάνεια (ανεξάρτητη του χρόνου).

Η διαφορική του μορφή είναι (3.2):

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = - \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (3.2).$$

Η τέταρτη εξίσωση είναι ο νόμος Ampere-Maxwell (4.1) που αποδίδει ότι στο μαγνητικό πεδίο συμβάλει και το μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο.

$$\oint_c \vec{B} d\vec{l} = \mu_0 I_{in} + \mu_0 \epsilon_0 \frac{d(\int_s \vec{E} d\vec{S})}{dt} \quad (4.1).$$

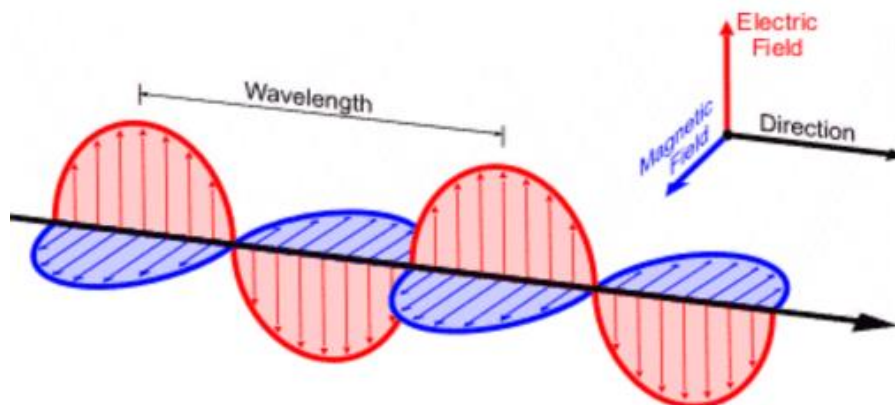
Όπου \vec{E} το ηλεκτρικό πεδίο, \vec{B} είναι το μαγνητικό πεδίο, $d\vec{S}$ το διαφορικό διανυσματικής περιοχής παράλληλο προς την κανονική επιφάνεια, s μία μη-κλειστή επιφάνεια (ανεξάρτητη του χρόνου), μ_0 η μαγνητική διαπερατότητα (permeability) του κενού, I η πυκνότητα ρεύματος και ϵ_0 η διηλεκτρική σταθερά (permittivity) του κενού.

Η διαφορική μορφή της μορφή είναι (4.2) όπου αποδίδει ότι το μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό πεδίο δημιουργεί μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο:

$$\vec{\nabla} \times \vec{B} = \mu_0 \vec{j} + \mu_0 \epsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (4.2).$$

Όπου \vec{j} η πυκνότητα ρεύματος στο ίδιο σημείο του χώρου. Με τις εξισώσεις αυτές λοιπόν, ο Maxwell συμπέρανε ότι το ηλεκτρικό και το μαγνητικό πεδίο ήταν σε φάση μεταξύ τους, αλλά και κάθετα στο πέρασμα του κύματος για να ταλαντωθούν προς την ίδια κατεύθυνση. Ακόμη η θεωρία του ηλεκτρομαγνητισμού του Maxwell συνέδεσε τα ιόντα με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Ο ίδιος ισχυρίστηκε ότι οι αλλαγές στο ηλεκτρικό πεδίο και στο μαγνητικό πεδίο προκύπτουν από ένα κινούμενο φορτίο που όταν να εξαπλώνεται

δημιουργεί ένα αυτοδιαδιδόμενο ηλεκτρομαγνητικό κύμα. Έτσι, ο Maxwell κατέληξε στο συμπέρασμα ότι: «Μπορούμε μόνο να συμπεράνουμε ότι το φως αποτελείται από τα ίδια εγκάρσια κύματα που δημιουργούνται από τα ηλεκτρικά και μαγνητικά φαινόμενα». Ως εκ τούτου, πρότεινε μια σύνδεση μεταξύ της ταχύτητας της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και της ταχύτητας του φωτός. Η εργασία του Maxwell στον ηλεκτρισμό βελτίωσε την ικανότητά μας στο να μετράμε την ταχύτητα του φωτός. Αργότερα, το 1907, η Rosa και ο Dorsey ανέλυσαν την ηλεκτρική και μαγνητική αγωγιμότητα του αέρα για να κάνουν έναν εμπειρικό υπολογισμό της ταχύτητας του φωτός. Το αποτέλεσμα απέδειξε ότι υπάρχουν ηλεκτρομαγνητικά πεδία, όπως και η ύπαρξη των ηλεκτρομαγνητικών ιδιοτήτων στο φως. Βέβαια, το αποτέλεσμα αυτού του πειράματος χρειάστηκε να αναθεωρηθεί αργότερα, αφού έγινε αντιληπτό ότι η ταχύτητα των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων στο πείραμα αυτό θεωρούνταν σταθερή ανεξάρτητα από το υλικό μέσο στο οποίο ταξιδεύουν, κάτι το οποίο όμως ρεαλιστικά αλλάζει αναλόγως το μέσο από το οποίο διασχίζει. Παρακάτω απεικονίζεται το ηλεκτρομαγνητικό κύμα βάση της θεωρίας του Maxwell (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Απεικόνιση του ηλεκτρομαγνητικού κύματος βάση της θεωρίας του Maxwell, Πηγή: <https://www.pemptousia.gr/2016/06/sigchroni-fisiki-ke-enotita-ton-fisikon-dinameon/>

2.2 Αλληλεπίδραση φωτός-ύλης

Η αλληλεπίδραση φωτός και ύλης αποτελεί τον τρόπο με τον οποίο το φως αλληλοεπιδρά με τα διάφορα υλικά και τις ουσίες. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι ουσιώδης για πολλά φυσικά φαινόμενα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές εφαρμογές στη μικροσκοπία. Η μικροσκοπία βασίζεται πάνω στις διάφορες ιδιότητες του φωτός και με βάση αυτές έχουν δημιουργηθεί διαφορετικές τεχνικές μικροσκοπίας

που τις αξιοποιούν. Αυτό αποσκοπεί στο να εντοπίζονται κάποια χαρακτηριστικά ή ιδιότητες του δείγματος υπό μελέτη που διαφορετικά δεν θα ήταν δυνατόν να μελετηθούν, ή ακόμα και στο να βελτιώσουν τις συνθήκες της παρατήρησης αυξάνοντας την ποιότητα, την αντίθεση και την ανάλυση, βοηθώντας έτσι τον μελετητή στην ερευνά του. Οι πιο σημαντικές ιδιότητες του φωτός με την ύλη που εφαρμόζονται στην μικροσκοπία είναι η απορρόφηση, η ανάκλαση, η σκέδαση, η διάθλαση και η περίθλαση.

Η απορρόφηση (Absorption) του φωτός στη μικροσκοπία αναφέρεται στην απορρόφηση του εισερχόμενου ηλεκτρομαγνητικού κύματος από το δείγμα που εξετάζεται με το μικροσκόπιο. Κατά την διέλευση του φωτός μέσα από το δείγμα, ορισμένα μέρη του απορροφούν μέρος ή ακόμη και το σύνολο της ενέργειας του φωτός, ενώ άλλα μέρη το διαβιβάζουν ή το ανακλούν, αυτό μπορεί να μας υποδείξει την σύσταση των δομών του υπό εξέτασης δείγματος δίνοντας μας χρήσιμα συμπεράσματα. Καθώς με την παραγωγή των εικόνων φωτεινότητας θα υπάρχουν περιοχές που θα είναι είτε φωτεινές είτε σκοτεινές, κάτι το οποίο υποδηλώνει μικρή και μεγάλη απορρόφηση φωτός αντιστοίχως. Η απορρόφηση του φωτός εξαρτάται από τις ιδιότητες του δείγματος, όπως η σύνθεση του, η πυκνότητα και η δομή του. Με την χρήση αυτού του φαινομένου μπορούν να αναγνωριστούν και να αναλυθούν διάφορα υλικά και δομές στο δείγμα. Κατά τη διάρκεια της απορρόφησης, τα μόρια ή τα άτομα του δείγματος απορροφούν την ενέργεια των φωτονίων και αναδιανέμουν την ενέργεια αυτή σε διαφορετικούς τρόπους, όπως θερμική ενέργεια ή φωτοεκπομπή. Η φωτοεκπομπή στη μικροσκοπία αναφέρεται στην ικανότητα ορισμένων υλικών να εκπέμπουν φωτόνια (φωτεινή ακτινοβολία) όταν εκτίθενται σε φως ή άλλες μορφές ενέργειας.

Η ανάκλαση (Reflection) του φωτός αναφέρεται στην ικανότητα ενός αντικειμένου να αντανακλά το φως που πέφτει πάνω του και να του αλλάξει την πορεία διάδοσης προς τα πίσω έτσι ώστε η γωνία πρόσπτωσης και η γωνία ανάκλασης να είναι ακριβώς η ίδια. Κατά την μικροσκοπία, η ανακλαστική ιδιότητα των διαφορετικών υλικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διακρίνουμε και να μελετήσουμε διάφορα αντικείμενα και δομές. Όταν το φως πέφτει πάνω σε ένα δείγμα, μέρος του απορροφάτε, ενώ το υπόλοιπο μέρος ανακλάται προς τον ανιχνευτή του μικροσκοπίου. Στην ουσία, η ανακλαστική ιδιότητα μπορεί να είναι ένα χρήσιμο κριτήριο για να διαχωρίσουμε διάφορα υλικά ή δομές μέσα σε ένα δείγμα. Για παράδειγμα, αν δύο διαφορετικά κύτταρα έχουν διαφορετικές ανακλαστικές ιδιότητες, μπορούμε να τα

διακρίνουμε και να μελετήσουμε πώς αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους ή με το περιβάλλον τους.

Η σκέδαση (Scattering) φωτός με την ύλη αποτελεί σημαντικό φαινόμενο που επιτρέπει την οπτική παρατήρηση και ανάλυση μικροσκοπικών δομών, όπως κύτταρα, ιστοί και νανοδομές. Κατά τη διέλευσή τους μέσα από υλικά, τα φωτόνια συναντούν άτομα και μόρια της ύλης. Κάθε ατομική ή μοριακή δομή μπορεί να αλληλοεπιδράσει με το φως και να το σκορπίσει (σκέδαση Rayleigh) ή να το διαθλάσει (σκέδαση Raman) και ταυτόχρονα να αλλάξει την ενέργεια του διερχόμενου ηλεκτρομαγνητικού κύματος. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διαφοροποιούνται ανάλογα με τις φυσικές ιδιότητες του δείγματος, όπως η δομή του και οι δονητικές του ιδιότητες. Οι τεχνικές μικροσκοπίας που έχουν δημιουργηθεί βάση αυτής της αλληλεπίδρασης βασίζονται στην ανίχνευση της σκέδασης για να δημιουργήσουν εικόνες και φασματικές πληροφορίες για τα δείγματα. Με τη βοήθεια συλλεκτικών φακών, η σκέδαση μπορεί να συλλεχθεί και να εστιαστεί σε μια εικόνα, η οποία στη συνέχεια μπορεί να καταγραφεί από αισθητήρες.

Η διάθλαση (Refraction) του φωτός λαμβάνει μέρος όταν το φως διέρχεται μέσα από μια διαφανή ή ημιδιαφανή ύλη, όπως φακούς ή διάφορα είδη μικροσκοπικών δειγμάτων. Αυτό σημαίνει ότι το φως αλλάζει κατεύθυνση και μονοποικιλία ταχυτήτων καθώς διασχίζει το υλικό. Η διάθλαση είναι ένα σημαντικό φαινόμενο στην οπτική μικροσκοπία, και ο συντελεστής διάθλασης (n) παίζει κρίσιμο ρόλο στον τρόπο με τον οποίο το φως διασπάται όταν διέρχεται από διαφορετικά υλικά. Ανάλογα με τους δείκτες διάθλασης των δύο υλικών που συνορεύουν, το φως μπορεί να ανακλαστεί, να διαθλαστεί ή να υποστεί ολική εσωτερική ανάκλαση. Όταν το φως διέρχεται από δύο υλικά με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης (n_1 και n_2), ο νόμος της διάθλασης (ή νόμος Snell) περιγράφει τη σχέση μεταξύ των γωνιών διάδοσης (θ_1 και θ_2) και των δεικτών διάθλασης με τον τύπο (5.1) :

$$\sin\theta_1 / \sin\theta_2 = n_2 / n_1 \quad (5.1)$$

Όταν ο δείκτης διάθλασης του δεύτερου υλικού (n_2) είναι μεγαλύτερος από τον δείκτη διάθλασης του πρώτου υλικού (n_1), το φως διαθλάσεται και αλλάζει κατεύθυνση. Ωστόσο, όταν ο δείκτης διάθλασης του δεύτερου υλικού (n_2) είναι μικρότερος από τον δείκτη διάθλασης του πρώτου υλικού (n_1), το φως δεν μπορεί να διαθλαστεί στο δεύτερο υλικό. Σε αυτήν την περίπτωση, αν η γωνία διάδοσης (θ_1) είναι αρκετά μεγάλη, το φως υποστέλλεται πλήρως προς τα πίσω στο πρώτο υλικό, αυτό είναι η ολική

εσωτερική ανάκλαση. Η γωνία ολικής εσωτερικής ανάκλασης υπολογίζεται από τον τύπο (5.2):

$$\sin\theta_{cr} = n_1 / n_2 \quad (5.2)$$

Όταν η γωνία διάδοσης (θ_1) είναι μεγαλύτερη από τη γωνία ολικής εσωτερικής ανάκλασης (θ_{cr}), το φως διασπάται στο δεύτερο υλικό. Όταν η γωνία διάδοσης είναι μικρότερη από τη γωνία ολικής εσωτερικής ανάκλασης, το φως ανακλάται πλήρως προς τα πίσω στο πρώτο υλικό.

Η περίθλαση (Diffraction) είναι ένα φαινόμενο το οποίο συμβαίνει όταν το φως περνά μέσα από έναν διάφανο ή ημιδιαφανή υλικό και αλλάζει κατεύθυνση εξαιτίας της αλληλεπίδρασής αυτής. Η περίθλαση παρατηρείται κυρίως όταν το φως περνά από διάφανα αντικείμενα όπως κρύσταλλα, πρίσματα, νερό, γυαλί κ.ά. Αυτό που συμβαίνει είναι ότι το φως αλλάζει κατεύθυνση όταν περνάει από ένα υλικό στο άλλο, λόγω της διαφορετικής ταχύτητας που έχει το φως στο κάθε υλικό. Αυτή η αλλαγή κατεύθυνσης είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του φωτός με την ουσία του υλικού και το φαινόμενο αποτυπώνεται ως μια διάθλαση του φωτός. Ένα πολύ γνωστό παράδειγμα περίθλασης είναι όταν το φως περνά από ένα πρίσμα. Το πρίσμα περιθλάσσει το φως, ανακλώντας το σε διαφορετικές γωνίες ανάλογα με το χρώμα του φωτός, ομοίως παράγονται και τα διάφορα χρώματα του ορατού φάσματος που βλέπουμε στο ουράνιο τόξο.

Συγκεκριμένα στην μικροσκοπία, αυτό το φαινόμενο είναι καίριας σημασίας. Αυτό οφείλετε στο γεγονός ότι σε όλες τις οπτικές μελέτες προκύπτει περίθλαση λόγω της λεπτής σχισμής από όπου και διέρχεται το φως για την ακτινοβολία του δείγματος. Αυτό σύμφωνα με την αρχή Χόυχενς συνεπάγει ότι κάθε μέρος της σχισμής γίνεται με την σειρά του πηγή εκπομπής φωτεινών ακτινών. Αυτές επηρεάζουν την παρατήρηση του αντικειμένου καθώς συμβάλλουν είτε καταστρεπτικά είτε ενισχυτικά ακολουθώντας τους κανόνες της ενισχυτικής και καταστρεπτικής συμβολής. Παρακάτω αποδίδετε η σχέση που δίνει την διαφορά των δρόμων ΔS (6.1) Αν έχουμε μία σχισμή πλάτους a τότε για δύο δέσμες που εξέρχονται από την σχισμή με διεύθυνση θ και απέχουν $a/2$ η διαφορά των δρόμων τους είναι ίση:

$$\Delta S = \frac{a}{2} \cdot \eta\mu\theta \quad (6.1)$$

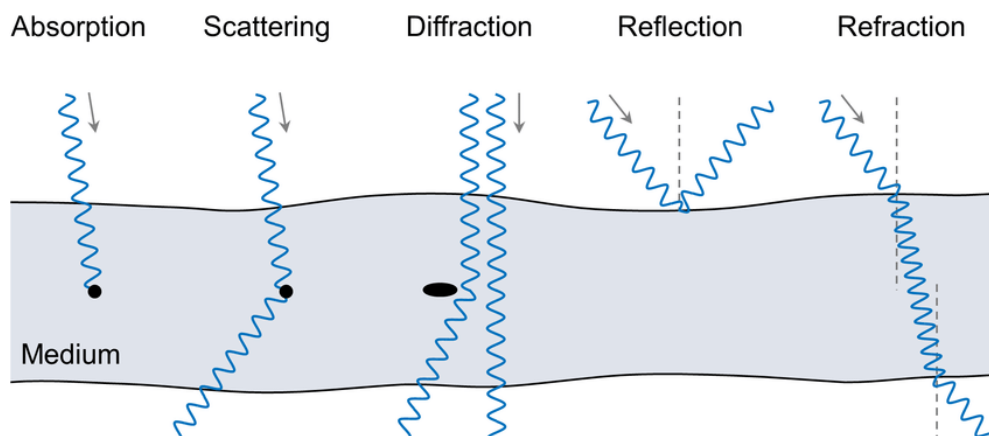
Άρα η συνθήκη καταστρεπτικής συμβολής (6.2) μεταξύ τους είναι:

$$\frac{\alpha}{2} \cdot \eta\mu\theta = n \frac{\lambda}{2} \quad (6.2)$$

Που βάση αυτής προκύπτει η σχέση που δίνει τις διευθύνσεις όπου παρατηρείται καταστρεπτική συμβολή (6.3).

$$\eta\mu\theta = n \cdot \frac{\lambda}{\alpha} \quad (6.3)$$

Παρακάτω απεικονίζονται οι ιδιότητες του φωτός κατά την αλληλεπίδρασή του με την ύλη (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Απεικόνιση ιδιοτήτων του φωτός κατά την αλληλεπίδρασή του με την ύλη, Πηγή: https://www.researchgate.net/figure/Basic-interactions-between-light-and-matter_fig1_323835351

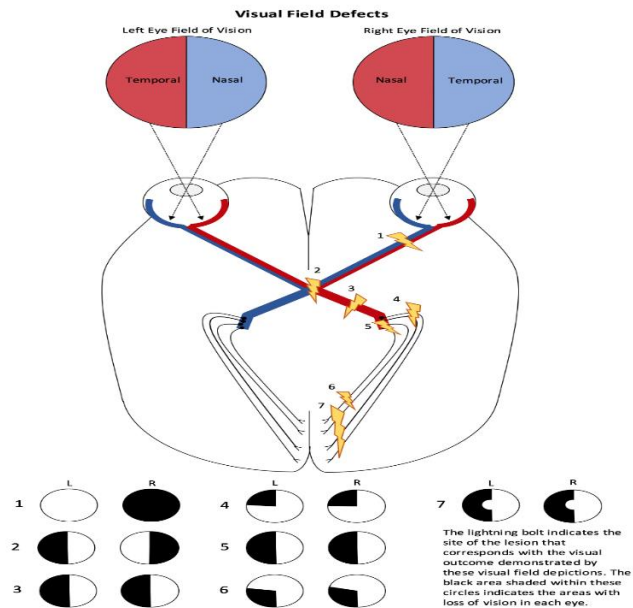
2.3 Ανθρώπινο οπτικό σύστημα

Το ανθρώπινο οπτικό σύστημα αποτελείται από τους οφθαλμούς, το οπτικό νεύρο και τον εγκέφαλο. Αυτά συνεργάζονται για να επιτρέψουν στον άνθρωπο να βλέπει και να αντιλαμβάνεται το περιβάλλον του. Οι οφθαλμοί είναι τα όργανα που λαμβάνουν το φως και μετατρέπουν τις οπτικές πληροφορίες σε νευρικά σήματα. Κάθε οφθαλμός αποτελείται από διάφορα μέρη, συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων της κόρης, του φακού και του αμφιβληστροειδούς. Το οπτικό νεύρο είναι ο νευρικός αγωγός που μεταφέρει τα οπτικά σήματα από τα μάτια στον εγκέφαλο και αποτελείται από πολλές νευρικές ίνες. Ο εγκέφαλος είναι ο κύριος αναλυτής των οπτικών πληροφοριών. Οι οπτικές πληροφορίες που μεταφέρονται από το οπτικό νεύρο

επεξεργάζονται και ερμηνεύονται σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου που θα αναφερθούν παρακάτω.

Το οπτικό πεδίο, όπως περιγράφεται από μελέτες ψυχολογικού προβληματισμού, είναι η γεωγραφική διαμόρφωση των πιθανών οπτικών αντιλήψεων. Το μέγεθος και η μορφή του οπτικού πεδίου καθορίζονται από την εξάπλωση των αισθητηρίων κυττάρων στο μάτι καθώς και από την ικανότητα του οπτικού πεδίου να παρέχει μια προσέγγιση του περιβάλλοντος. Η διάμετρος του οπτικού εύρους του ανθρώπινου οφθαλμού είναι περίπου 60 μοίρες (Phu, 2017). Βέβαια η όραση δεν είναι το ίδιο "δυνατή" σε όλη της την περιφέρεια. Η καλύτερη απόδοση του ανθρώπινου οπτικού συστήματος βρίσκεται σε ένα εύρος περίπου 1 μοίρας από την οπτική θηλή, το φαινόμενο αυτό λέγεται οπτική οξύτητα.

Το οπτικό πεδίο του ανθρώπου χωρίζεται στη μέση κάθετα του κάθε οφθαλμού, χωρίζοντας έτσι το πεδίο της όρασης σε δύο ήμισυ. Οι περιοχές αυτές είναι το κροταφικό τμήμα όρασης (temporal part of vision) και το ρινικό τμήμα όρασης (nasal part of vision). Το κροταφικό τμήμα όρασης αναφέρεται στην περιοχή που βρίσκεται προς το εξωτερικό πεδίο όρασης του κάθε ματιού, στην κατεύθυνση του κροτάφου. Το ρινικό τμήμα όρασης, από την άλλη, αναφέρεται στην περιοχή της όρασης του κάθε ματιού η οποία βρίσκεται προς την κατεύθυνση της ρίνας. Ο κάθε οφθαλμός βλέπει την αντίθετη πλευρά του οπτικού πεδίου, άρα οι πληροφορίες των ειδώλων του ενός ήμισυ μεταφέρεται στην αντίθετη περιοχή αντίληψης των αντικειμένων. Οι πληροφορίες και των δύο περιοχών του κάθε οφθαλμού συνδυάζονται στον εγκέφαλο για να σχηματίσουν μία ενιαία, ενοποιημένη οπτική εικόνα. Παρακάτω απεικονίζεται η λειτουργία του ανθρώπινου οπτικού πεδίου (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Απεικόνιση της λειτουργίας του ανθρώπινου οπτικού πεδίου, Πηγή:
<https://morancore.utah.edu/basic-ophthalmology-review/hemianopsia/>

2.3.1 Οφθαλμοί

Σημαντική δομή στους οφθαλμούς για την όραση είναι ο αμφιβληστροειδής. Στον αμφιβληστροειδή υπάρχουν οι αμφιβληστροειδικοί κώνοι, που αποτελούν μία συλλογή μικρών κωνοειδών δομών που βρίσκονται στο εσωτερικό του αμφιβληστροειδούς. Κάθε κώνος αποτελείται από έναν σωλήνα επικαλυμμένο με κερατίνη και έχει στην άκρη του ένα μικρό άνοιγμα, το οποίο ονομάζεται ακροβολιστής ή άκρη του κώνου. Οι κώνοι του αμφιβληστροειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των χρωμάτων και στην όραση υψηλής ανάλυσης. Κάθε κώνος περιέχει έναν διαφορετικό χρωματικό ανιχνευτή, ο οποίος ανταποκρίνεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος του ορατού φωτός. Με τη βοήθεια των κωνικών κυττάρων στον αμφιβληστροειδή, το ανθρώπινο μάτι είναι σε θέση να αναγνωρίζει χιλιάδες διαφορετικούς συνδυασμούς χρωμάτων και να διακρίνει λεπτομέρειες σε αντικείμενα.

Στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς υπάρχει μία κοιλότητα η οποία ονομάζεται βοθρίο. Το βοθρίο, που ονομάζεται και «κέντρο του βλέμματος», είναι εκεί όπου συγκεντρώνονται οι περισσότεροι κώνοι του αμφιβληστροειδούς. Οι κώνοι στο βοθρίο συρρικνώνονται στο μικρότερο δυνατόν μέγεθος στο οποίο είναι λειτουργικοί, επιτρέποντας την υψηλότερη δυνατή οπτική ευκρίνεια. Το βοθρίο του ματιού χρησιμοποιείται για την οργάνωση της χωρικής εικόνας και την προβολή μεγάλων αντικειμένων, ενώ το κέντρο του οπτικού πεδίου εστιάζει στην προσεκτική επιθεώρηση

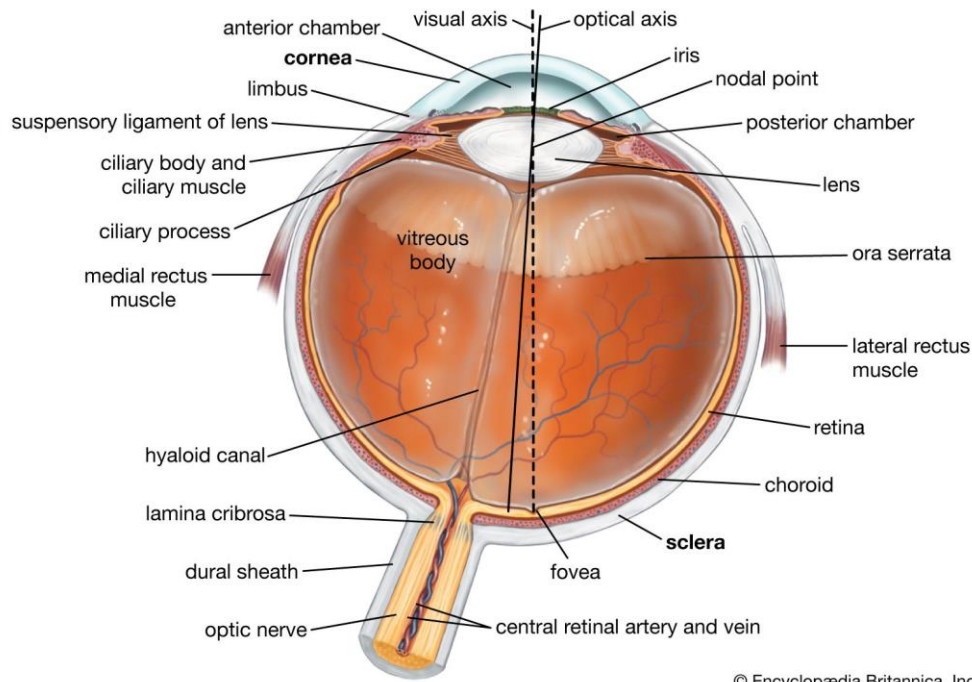
μικρών λεπτομερειών. Το βοθρίο έχει δύο πεδία δακτυλίου, το εσωτερικό και το εξωτερικό. Το εσωτερικό πεδίο δακτυλίου περιβάλλει την οπή του βοθρίου και είναι υπεύθυνο για την αντιληπτική δράση στο κοντινό πεδίο όρασης. Το εξωτερικό πεδίο δακτυλίου βρίσκεται περιφερειακά από το εσωτερικό πεδίο και είναι υπεύθυνο για την αντιληπτική δράση στο μακρινό πεδίο όρασης. Τέλος, το βοθρίο περιέχει το οπτικό νεύρο, το οποίο μεταφέρει τα οπτικά ερεθίσματα από τον οφθαλμό στον εγκέφαλο για επεξεργασία.

2.3.2 Οπτικό νεύρο εγκεφάλου

Το οπτικό νεύρο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των οπτικών πληροφοριών από το μάτι προς τον εγκέφαλο, όπου στη συνέχεια οι πληροφορίες αυτές επεξεργάζονται για τη δημιουργία της αντίληψης της όρασης. Αρχικά, το κάθε μάτι λαμβάνει φως από το περιβάλλον μέσω της κόρης του και του φακού. Ο αμφιβληστροειδής είναι το ευαίσθητο στο φως εσωτερικό στρώμα του ματιού και αναλαμβάνει τη μετατροπή των οπτικών ερεθισμάτων που προκαλούνται από το φως σε ηλεκτρικά σήματα, τα οποία στην συνέχεια μεταφέρονται από το οπτικό νεύρο για περαιτέρω επεξεργασία στον εγκέφαλο. Στην επιφάνεια του βρίσκονται οι φωτουποδοχείς, γνωστοί ως κωνία και ραβδία.

Η πλειοψηφία των κωνίων βρίσκεται στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς, αυτά τα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την αντίληψη των λεπτομερειών, των χρωμάτων και της καλής ορατότητας σε φωτεινές συνθήκες. Ενώ, στην περιφερειακή περιοχή του αμφιβληστροειδή βρίσκεται πλειοψηφία των ραβδίων. Αυτά τα κύτταρα είναι υπεύθυνα για την αντίληψη της όρασης σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού και για την ανίχνευση της κίνησης. Στη συνέχεια, οι οπτικοί νευρώνες του οπτικού νεύρου συλλέγουν τα ηλεκτρικά σήματα από τους φωτουποδοχείς, όπου μεταφέρονται στην οπτική θηλή. Η οπτική θηλή είναι η περιοχή του αμφιβληστροειδούς όπου οι οπτικοί νευρώνες συγκεντρώνονται και εξέρχονται του οφθαλμικού κόγχου για να σχηματίσουν το οπτικό νεύρο.

Το οπτικό νεύρο διαβιβάζει τις οπτικές πληροφορίες σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου και του οπτικού φλοιού. Εκεί, οι πληροφορίες αυτές επεξεργάζονται περαιτέρω και συνδέονται με τις αντίστοιχες περιοχές που είναι υπεύθυνες για την αντίληψη της όρασης, όπως η αναγνώριση αντικειμένων και η ανίχνευση του χρώματος και της κίνησης. Παρακάτω απεικονίζεται η ανατομία του οπτικού νεύρου (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ανατομία του οπτικού νεύρου, Πηγή:

<https://www.britannica.com/science/uveitis>

2.3.3 Εγκέφαλος

Ο εγκέφαλος είναι ένα πολύπλοκο όργανο που αποτελείται από νευρικό ιστό και βρίσκεται μέσα στην κρανιακή κοιλότητα. Σε αυτόν εντοπίζεται ινιακός λοβός που είναι γνωστός και ως οπτικός φλοιός και βρίσκεται στο οπίσθιο τμήμα του εγκεφάλου. Αυτός αποτελεί την κύρια περιοχή του εγκεφάλου που επεξεργάζεται τις οπτικές πληροφορίες και είναι υπεύθυνη για την επεξεργασία των οπτικών ερεθισμάτων και την αντίληψη της όρασης. Ταυτόχρονα, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση των αντικειμένων, στην αντίληψη του χρώματος και στη διάκριση των αντιθέσεων. Επιπλέον, ο οπτικός φλοιός συμβάλλει στον συντονισμό των κινήσεων των ματιών μέσω των οφθαλμοκινητικών μυών, έτσι ώστε ο άνθρωπος να μπορεί να επικεντρωθεί σε συγκεκριμένα αντικείμενα και να παρακολουθήσει κινούμενα αντικείμενα.

Ο οπτικός φλοιός χωρίζεται σε διάφορες περιοχές γνωστές και ως οπτικές περιοχές. Αυτές αναλαμβάνουν διάφορες λειτουργίες στην επεξεργασία των οπτικών ερεθισμάτων και ονομάζονται V1, V2, V3, V4, V5. Η V1 βρίσκεται στο πίσω μέρος του εγκεφάλου και είναι υπεύθυνη για την πρωτογενή επεξεργασία των οπτικών πληροφοριών. Εδώ, οι νευρώνες αποκρίνονται σε διάφορες αντιλήψεις της όρασης

όπως οι γωνίες, τα σχήματα και οι κινήσεις. Η V2 αναλαμβάνει την επεξεργασία των οπτικών πληροφοριών που σχετίζονται με το χρώμα και την αντίθεση. Η V3 είναι υπεύθυνη για την επεξεργασία των κινήσεων και την αντίληψη της βάθους. Η V4 ειδικεύεται στην αναγνώριση των περιγραμμάτων, των σχημάτων και των αντικειμένων. Η V5 είναι απαραίτητη για την αντίληψη και επεξεργασία των κινήσεων, καθώς ανιχνεύει την κατεύθυνση και την ταχύτητα των κινούμενων αντικειμένων. Οι πληροφορίες που επεξεργάζονται σε αυτές τις οπτικές περιοχές συνδέονται και ενσωματώνονται για τη δημιουργία μιας πλήρους εικόνας της ορατής πραγματικότητας.

2.4 Οπτική μικροσκοπία

Η οπτική μικροσκοπία χρησιμοποιείται για να δούμε αντικείμενα που είναι πολύ μικρά με γυμνό μάτι, και χάρις αυτήν μπορούμε να τα μελετήσουμε. Αυτό επιτυγχάνεται με τις διάφορες ακτινοβολίες που εκπέμπονται, απορροφώνται, μεταδίδονται ή αντικατοπτρίζονται από το οπτικό εξοπλισμό. Το φως από μια πηγή φωτός αλληλοεπιδρά με το δείγμα και βάση της εκάστοτε αλληλεπίδρασης του φωτός με την ύλη που χρησιμοποιεί η κάθε διαφορετική τεχνική μικροσκοπίας δημιουργεί μια εικόνα που ενισχύεται και ανιχνεύεται από το φακό του μικροσκοπίου. Η εικόνα αυτή μετέπειτα παρατηρείται από τον χρήστη μέσω του οπτικού συστήματος του μικροσκοπίου, όπου η οπτική αυτή απεικόνιση χρησιμοποιεί φως από το ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Το πρώτο σύνθετο μικροσκόπιο δημιουργήθηκε το 1595 από τους Hans και Zacharias Janssen. Ενώ ο Antonie van Leeuwenhoek κατάφερε να αναπτύξει το 1674 ένα μικροσκόπιο που επέτρεπε την παρατήρηση μικροοργανισμών και άλλων μικροδομών. Αυτό το μικροσκόπιο ήταν απλό κατασκευαστικά, με έναν μικρό φακό που τοποθετήθηκε σε ένα μικρό μεταλλικό πλαίσιο και μια βελόνα που χρησιμοποιήθηκε για να στηρίζει το δείγμα. Αν και απλό σε σχεδίαση, κατάφερε να επιτύχει την εντυπωσιακή ενίσχυση των περίπου 300 φορές. Αυτό επέτρεψε και τους ερευνητές να ανακαλύψουν και να παρατηρήσουν μικροοργανισμούς και κύτταρα για πρώτη φορά, ανοίγοντας τον δρόμο για μια νέα εποχή στη μικροβιολογία και την ανατομία.

Ένα άλλο σημαντικό βήμα για την μικροσκοπία ήταν και το βιβλίο "Micrographia" του Robert Hooke, που δημοσιεύτηκε το 1665. Στο βιβλίο αυτό, ο

Hooke περιγράφει τις παρατηρήσεις που κατάφερε να κάνει χρησιμοποιώντας το μικροσκόπιο. Ο Hooke περιγράφει αναλυτικά τα αντικείμενα που παρατήρησε με το μικροσκόπιο του, περιλαμβάνοντας την ανατομία των ζώων και των φυτών, αλλά και αντικείμενα από τον ανόρατο κόσμο. Το βιβλίο περιέχει επίσης πανοραμικές εικόνες και παραστάσεις των παρατηρηθέντων αντικειμένων. Το "Micrographia" ακόμη, θεωρείται σημαντικό γιατί παρουσιάζει για πρώτη φορά την ιδέα της κυτταρικής δομής των οργανισμών και εισάγει πολλούς όρους που χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα στην επιστήμη. Αυτό το έργο έδωσε ώθηση στην ανάπτυξη της μικροσκοπίας και είχε σημαντική επίδραση στην επιστημονική κοινότητα της εποχής του.

2.4.1 Οργανολογία

Τα απλά και τα σύνθετα μικροσκόπια είναι τα δύο θεμελιώδη είδη οπτικών μικροσκοπίων. Τα μικροσκόπια βασίζονται στην χρήση φακών για να μεγεθύνουν τα αντικείμενα προς μελέτη. Το απλό μικροσκόπιο χρησιμοποιεί μόνο έναν φακό, ενώ τα σύνθετα μικροσκόπια χρησιμοποιούν από δύο έως και περισσότερους φακούς. Με την ποικιλία φακών που έχει το σύνθετο μικροσκόπιο μπορεί να μεγεθύνει ένα αντικείμενο σημαντικά περισσότερο, αυτό επιτυγχάνεται καθώς η αλληλεπίδραση των φακών μεταξύ τους πολλαπλασιάζει την μεγέθυνση που μπορεί να αποδοθεί στην τελική εικόνα για την μελέτη του δείγματος. Ακόμη, οι φακοί του σύνθετου μικροσκοπίου είναι τοποθετημένοι σε έναν περιστρεφόμενο φακό, με την περιστροφή αυτού δίνεται η δυνατότητα στον χρήστη να αλλάζει την μεγέθυνση κατά την παρακολούθηση του δείγματος. Αν και ορισμένα εμπορικά ψηφιακά μικροσκόπια χαμηλού κόστους έχουν μονούς φακούς, τα σύνθετα μικροσκόπια αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των σημερινών μικροσκοπίων έρευνας. Πρόσθετες ποικιλίες μικροσκοπίων που διαφέρουν ως προς τον οπτικό σχεδιασμό, την τιμή και τον προβλεπόμενο σκοπό μπορούν να ταξινομηθούν στην κατηγορία των σύνθετων μικροσκοπίων.

Τα μέρη των μικροσκοπίων είναι:

Αντικειμενικοί φακοί: Ένα σύνθετο μικροσκόπιο έχει συνήθως τρεις ή τέσσερις αντικειμενικούς φακούς με επίπεδα μεγέθυνσης 10X, 40X και 100X. Ο φακός με τη μικρότερη εστιακή απόσταση έχει τη χαμηλότερη ισχύ, ενώ ο φακός με τη μεγαλύτερη εστιακή απόσταση έχει τη μεγαλύτερη ισχύ.

Διάφραγμα: Το διάφραγμα βοηθά στη ρύθμιση της ποσότητας φωτός που εισέρχεται στη σκηνή μέσω του διαφράγματος. Είναι χρήσιμο για τη ρύθμιση του ελέγχου του φωτός που εισέρχεται σε ένα δωμάτιο.

Κουμπί χονδροειδούς προσαρμογής: χρησιμοποιείται για εστίαση σάρωσης.

Μικρομετρικός κοχλίας: Ο σωλήνας μετακινείται για να πραγματοποιηθεί εστίαση με τον φακό υψηλής ισχύος.

Βραχίονας (λαβή): Υποστηρίζει τον οπτικό σωλήνα του μικροσκοπίου και συνδέεται με τη βάση του μικροσκοπίου.

Προσοφθάλμιος φακός: Ο προσοφθάλμιος φακός είναι ο φακός που τοποθετείται στο επάνω μέρος που χρησιμοποιείται για να δει τα αντικείμενα που εξετάζονται. Η μεγέθυνση του φακού του προσοφθάλμιου φακού είναι 10X ή 15X.

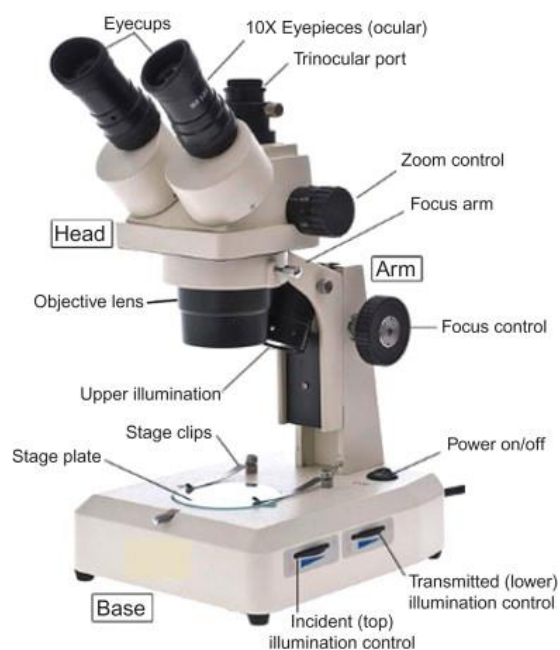
Οπτικός σωλήνας: συνδέει τον προσοφθάλμιο φακό και τους αντικειμενικούς φακούς.

Τράπεζα: Η επίπεδη πλατφόρμα στην οποία τοποθετούνται τα υπό μελέτη δείγματα.

Βάση: παρέχει υποστήριξη για τη βάση του μικροσκοπίου.

Διακόπτης λειτουργίας: ενεργοποιεί ή απενεργοποιεί τα φώτα.

Παρακάτω απεικονίζεται ένα οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Οπτικό μικροσκόπιο, Πηγή: <https://geologyscience.com/geology/optical-properties-of-minerals/>

2.4.2 Αρχή λειτουργίας

Η θεμελιώδης ιδέα λειτουργίας του οπτικού μικροσκοπίου είναι ότι το φως από μια λάμπα εστιάζεται από έναν φακό συμπύκνωσης στο δείγμα. Χρησιμοποιώντας την έννοια της διάθλασης, ένα αντικείμενο σχηματίζει μια εικόνα όταν το φως ταξιδεύει μέσα από αυτό. Αυτή η εικόνα λαμβάνεται αρχικά από έναν φακό που μεγεθύνει (που ονομάζεται αντικειμενικός), και στη συνέχεια από τον προσοφθάλμιο φακό (ο φακός στον οποίο κοιτάζει το μάτι του ερευνητή) (Midgley, 2009). Η συνολική μεγέθυνση z είναι το γινόμενο της μεγέθυνσης του αντικειμενικού φακού y και της μεγέθυνσης του προσοφθάλμιου φακού x (7.1). Σε ιδανικές ρυθμίσεις, τα οπτικά μικροσκόπια παρέχουν μεγεθύνσεις έως και 1.500 φορές.

$$x \cdot y = z \quad (7.1)$$

Για να υπολογιστεί λοιπόν η συνολική μεγέθυνση που αποδίδει ένα μικροσκόπιο είναι απαραίτητο να εξεταστεί το περίβλημα του κάθε φακού που χρησιμοποιεί. Στην πλευρά του περιβλήματος του εκάστοτε φακού αναγράφεται μία σειρά αριθμών, και συγκεκριμένα σε κάποιο σημείο περιλαμβάνει έναν αριθμό που ακολουθείται από x , όπως για παράδειγμα $10x$. Αυτό σημαίνει ότι ο συγκεκριμένος φακός μεγεθύνει το αντικείμενο που θα υποβληθεί σε παρακολούθηση με αυτόν κατά δέκα φορές, άρα το αντικείμενο αυτό θα φανεί δέκα φορές μεγαλύτερο από την πραγματικότητα.

Η μεγέθυνση που μπορεί να επιτευχθεί σε ένα απλό μικροσκόπιο είναι πολύ εύκολο να βρεθεί, καθώς αυτό χρησιμοποιεί μόνο έναν φακό που αναγράφει επάνω του πόση μεγέθυνση προσφέρει. Επομένως, εάν αυτός ο φακός προσφέρει $10x$ μεγέθυνση, συνεπάγεται ότι το μικροσκόπιο θα προσφέρει μία μεγέθυνση του δείγματος στην τελική εικόνα όπου αυτό θα φαίνεται δέκα φορές μεγαλύτερο από το πραγματικό του μέγεθος. Ενώ, η συνολική μεγέθυνση που αποδίδει το σύνθετο μικροσκόπιο μπορεί να υπολογιστεί με έναν απλό πολλαπλασιασμό. Αυτό επιτυγχάνεται με την εύρεση των μεγεθύνσεων του προσοφθάλμιου φακού όσο και των αντικειμενικών φακών. Όταν γνωστοποιηθεί η κάθε μεμονωμένη μεγέθυνση του κάθε φακού, τις πολλαπλασιάζουμε μεταξύ τους, παίρνοντας έτσι την συνολική μεγέθυνση. Για παράδειγμα, έστω ότι σε ένα μικροσκόπιο ο προσοφθάλμιος φακός έχει μεγέθυνση $10x$ και ο αντικειμενικός φακός έχει $4x$, η συνολική μεγέθυνση θα είναι $10 \times 4 = 40$. Αυτό σημαίνει ότι το

αντικείμενο προς μελέτη θα εμφανίζεται σαράντα φορές μεγαλύτερο από ότι είναι πραγματικά.

Κατά την οπτική παρατήρηση όμως, πέρα από την μεγέθυνση που μπορεί να αποδοθεί στο αντικείμενο προς μελέτη μας ενδιαφέρει και η διακριτική ικανότητα (Δ), η οποία σχετίζεται με το ποσοστό των λεπτομερειών που μπορούν να παρατηρηθούν κατά την εξέταση του αντικειμένου. Ενώ, διακριτό όριο (δ) ενός μικροσκοπίου ορίζεται η ελάχιστη απόσταση που μπορούν να έχουν δύο ξεχωριστά σημεία ώστε τα είδωλά τους να μπορούν να διακριθούν με την απαραίτητη ευκρίνεια. Η διακριτική ικανότητα και το διακριτικό όριο είναι αντιστρόφως ανάλογα μεταξύ τους όπως και αποδίδετε από την παρακάτω σχέση (7.2):

$$\delta = 1/\Delta \quad (7.2)$$

Η παραπάνω σχέση οφείλεται στο φαινόμενο της περίθλασης του φωτός, καθώς εξαιτίας της το είδωλο ενός σημείου δεν εμφανίζεται σαν σημείο, αλλά σαν κύκλος. Έτσι όταν κατά την διαδικασία της οπτικής παρατήρησης δεν είναι εφικτό να επιτευχθεί μια ευχερής διάκριση μεταξύ αυτών των δύο κύκλων, η τελική εικόνα που θα λάβει ο παρατηρητής δεν θα έχει την απαραίτητη διακριτικότητα, που συνεπάγει ότι η περαιτέρω μεγέθυνση θα είναι ανούσια. Συγκεκριμένα, το διακριτό όριο ενός μικροσκοπίου μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση (7.3):

$$\delta = (0,5 \cdot \lambda)AA \quad (7.3)$$

Όπου λ το μήκος κύματος του φωτός κατά την παρατήρηση και AA το αριθμητικό άνοιγμα διαφράγματος.

Ενώ για να υπολογίσουμε το αριθμητικό άνοιγμα AA μπορούμε να εφαρμόσουμε τον τύπο (7.4):

$$AA = n \cdot \eta\mu\Phi/2 \quad (7.4)$$

Όπου n ο δείκτης διάθλασης του υλικού που παρεμβάλλεται μεταξύ του δείγματος και του φακού και Φ η γωνία υπό την οποία το δείγμα βλέπει τον φακό.

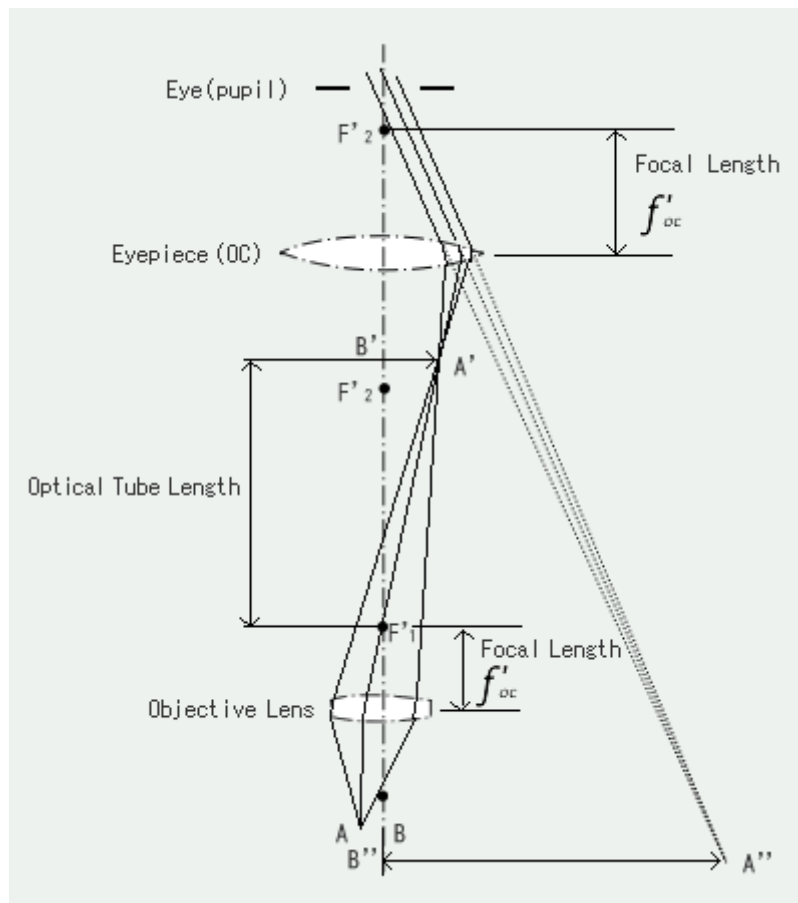
Για να βελτιωθεί το διακριτικό όριο δ , δηλαδή να μικρύνει κατά την παρατήρηση του αντικειμένου προς μελέτη, πρέπει να αυξηθεί ο διαιρέτης, δηλαδή το AA . Για να επιτευχθεί αυτή η αύξηση του γινομένου $n \cdot \eta\mu\Phi/2$ εφαρμόζεται η χρήση καραδυτικών φακών, δηλαδή φακών που έχουν εμβαπτιστεί σε κάποιο υγρό που έχει υψηλό δείκτη διάθλασης και παρεμβάλλεται μεταξύ του δείγματος και του φακού. Ένα τέτοιο υγρό μπορεί να είναι το απλό νερό, αν και συνήθως εφαρμόζονται ειδικά λάδια εμβάπτισης καθώς πέρα από την αύξηση του δείκτη διάθλασης, αυξάνουν και την γωνία Φ ελαχιστοποιώντας το φαινόμενο της διάθλασης του φωτός μεταξύ του αντικειμένου μελέτης και του φακού. Αλλιώς, ένας δεύτερος τρόπος να βελτιωθεί το διακριτικό όριο, όπως και είναι εμφανής από τον τύπο (7.3), $\delta = (0,5 \cdot \lambda)AA$, είναι η χρήση μικρότερου μήκους κύματος φωτός λ .

Για να αναλυθεί το αντικείμενο προς παρατήρηση στο μικροσκόπιο πρέπει να δημιουργηθεί η τελική εικόνα που αντιλαμβάνεται ο χρήστης. Η τελική εικόνα στο μικροσκόπιο εμφανίζεται μέσω της διαδικασίας της αύξησης (μεγέθυνσης) και της εστίασης του φωτός που περνά από το δείγμα. Συνοπτικά, η διαδικασία εμφάνισης της τελικής εικόνας στο μικροσκόπιο περιλαμβάνει την διέλευση του φωτός, την εστίαση, την ενίσχυση της εικόνας, και τέλος, την παρατήρηση της εικόνας. Αρχικά, η διέλευση του φωτός αναφέρεται στο φως που προέρχεται από το δείγμα όταν περνάει μέσα από τον αντικείμενο φακό. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι αντικειμενικοί φακοί είναι σημαντικοί για τη μεγέθυνση και την ευκρίνεια της εικόνας στο μικροσκόπιο, καθώς η ακρίβεια και η ποιότητα των αντικειμενικών φακών επηρεάζουν την ανάλυση, την εστίαση και την απεικόνιση των δομών που παρατηρούνται. Τα μικροσκόπια συνήθως έχουν πολλούς αντικειμενικούς φακούς με διαφορετικές μεγεθύνσεις ώστε να επιτρέπεται η παρατήρηση του δείγματος σε διάφορα επίπεδα μεγέθυνσης.

Το δεύτερο στάδιο είναι η εστίαση, εκεί το φως που έχει συγκεντρωθεί από τον φακό συλλογής περνάει μέσα από τον προσοφθαλμικό φακό. Ο προσοφθαλμικός φακός εστιάζει το φως και δημιουργεί μια μεγεθυμένη εικόνα του δείγματος στο ενδιάμεσο επίπεδο εικόνας. Ο ρόλος του είναι να συγκεντρώσει το φως που προέρχεται από το αντικείμενο και να δημιουργήσει μια εστίαση, έτσι ώστε να παράγεται μια μεγεθυμένη εικόνα του αντικειμένου, επιτρέποντας την παρατήρηση λεπτομερειών που δεν θα μπορούσαν να ανιχνευθούν με γυμνό μάτι.

Στη συνέχεια γίνεται η ενίσχυση της εικόνας αφού η εικόνα στο ενδιάμεσο επίπεδο είναι ακόμη ασθενής. Για να ενισχυθεί, περνάει μέσα από τον φακό ευκρίνειας, του οποίου ο ρόλος είναι να βελτιώνει την εστίαση και την ευκρίνεια της εικόνας.

Τέλος, έχουμε την παρατήρηση της εικόνας που είναι η ενισχυμένη εικόνα που προέκυψε στο ενδιάμεσο επίπεδο και μπορεί να παρατηρηθεί από τον παρατηρητή. Συνολικά, η τελική εικόνα του δείγματος στο μικροσκόπιο εμφανίζεται μετά από μια σειρά διαδοχικών επεξεργασιών φωτός και εστίασης, επιτρέποντάς στον χρήστη να παρατηρήσει και να αναλύσει λεπτομέρειες του δείγματος που δεν θα ήταν ορατές. Ακόμη, σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η εικόνα που παράγεται είναι έγχρωμη αφού σχηματίζεται από τη διάθλαση και την απορρόφηση του φωτός. Ως εκ τούτου, αντικείμενο ενδιαφέροντος εμφανίζεται με ακριβή χρώματα. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας του οπτικού μικροσκοπίου (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Αρχή λειτουργίας οπτικού μικροσκοπίου, Πηγή: <https://www.olympus-ims.com/es/microscope/terms/feature10/>

Στη μικροσκοπία με την διέλευση του φωτός μέσω των φακών του μικροσκοπίου προκύπτει το διαθλασμένο φως και το μη αποκλίνον φως. Αυτά τα δύο φαινόμενα μας βοηθάνε στην παρακολούθηση και την ανάλυση του δείγματος. Το διαθλασμένο φως στη μικροσκοπία αναφέρεται στο φως που υπόκειται σε διάθλαση καθώς διέρχεται από τους φακούς μέσα στο μικροσκόπιο. Η διάθλαση είναι η αλλαγή

της κατεύθυνσης και της ταχύτητας του φωτός όταν περνάει από τους φακούς του μικροσκοπίου με διαφορετική οπτική αντίσταση. Η διαφορετική αυτή οπτική αντίσταση οφείλεται στο ότι οι αντικειμενικοί φακοί στο μικροσκόπιο κατασκευάζονται από διάφορα υλικά, όπως γυαλί, κβαρτσ ή πλαστικό, και κάθε υλικό έχει διαφορετική οπτική αντίσταση. Ενώ, το μη αποκλίνον φως στη μικροσκοπία αναφέρεται σε φως που προχωράει παράλληλα μετά τη διέλευσή του από το φακό ή από το δείγμα που εξετάζονταν κατά την χρήση του μικροσκοπίου. Αυτό σημαίνει ότι το φως που εκπέμφθηκε διατηρεί την ίδια κατεύθυνση και δεν αποκλίνει ή διασπάται πριν φτάσει στον παρατηρητή. Αυτή η ιδιότητα είναι σημαντική για την ακρίβεια και την ποιότητα της εικόνας που παράγεται στο μικροσκόπιο.

Οι φακοί που χρησιμοποιούνται στα μικροσκόπια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, καθώς πέρα από την απόδοση μεγέθυνσης που μας προσφέρουν μας ενδιαφέρει και η μορφή τους η οποία μπορεί να ποικίλει, καθώς έχουμε κοίλους φακούς, φακούς που είναι επίπεδοι από τη μία πλευρά και κοίλοι από την άλλη πλευρά και κυρτούς φακούς. Το ποιος φακός είναι πιο αποδοτικός εξαρτάτε από την κάθε περίπτωση που θα αντιμετωπίσουμε την εκάστοτε φορά. Καθώς το κάθε είδος φακού έχει και κάποια μειονεκτήματα.

Τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι κυρτοί φακοί είναι η σφαιρική παραμόρφωση και η καμπυλότητα του πεδίου. Η σφαιρική παραμόρφωση είναι η αλλαγή της γωνίας διάθλασης του φωτός, που παρατηρείται όταν δέσμες φωτός διαθλώνται από μια σφαιρική επιφάνεια φακού, καθώς οι ακτίνες του φωτός που εισέρχονται στον φακό σε διάφορα σημεία της επιφάνειας θα διαθλαστούν υπό διαφορετικές γωνίες. Αυτή η παραμόρφωση μπορεί να προκαλέσει σφάλματα στην τελική εικόνα. Ενώ, η καμπυλότητα πεδίου αναφέρεται στο γεγονός ότι οι φακοί με σφαιρικές επιφάνειες μπορεί να μην προσφέρουν ομοιόμορφη εστίαση σε όλο το πεδίο της εικόνας. Παράλληλα, κατά την εστίαση ενός αντικειμένου που βρίσκεται εκτός του οπτικού κέντρου του φακού, οι δέσμες φωτός που περνούν από τις περιφερειακές περιοχές του φακού μπορεί να υποστούν μεγαλύτερη διάθλαση και να συγκεντρωθούν σε άλλο σημείο εστίασης σε σχέση με τις δέσμες φωτός που περνούν από το κέντρο του φακού. Αυτή η απόκλιση από το επίπεδο εστίασης του κεντρικού πεδίου ονομάζεται καμπυλότητα πεδίου. Ως αποτέλεσμα, οι εικόνες μπορεί να εμφανίζουν ασυμμετρία, παραμόρφωση ή ασάφεια στις περιφερειακές περιοχές.

Τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν οι κοίλοι φακοί είναι η διάχυση, η στρέβλωση της εικόνας και η μείωση της φωτεινότητας. Η διάχυση μπορεί να οδηγήσει

σε μείωση της αντίθεσης και της ευκρίνειας της εικόνας. Η στρέβλωση εικόνας μπορεί να οδηγήσει σε ασάφειες και σε μη ακριβείς απεικονίσεις των δομών που παρατηρούνται μέσω του μικροσκοπίου. Η μείωση της φωτεινότητας μπορεί να επηρεάσει την ορατότητα και την ποιότητα της εικόνας.

Η λύση που δόθηκε για να αντιμετωπιστούν αυτά τα προβλήματα ήταν η δημιουργία των σύνθετων φακών. Οι σύνθετοι φακοί είναι ο συνδυασμός πολλών φακών σε σειρά και σε επαφή μεταξύ τους που αποτελούνται από διάφορες επιφάνειες με διαφορετικές καμπυλότητες και σχήματα. Αυτοί οι φακοί κατασκευάζονται από πολυμερή υλικά με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης για να διορθώνουν τις παραμορφώσεις και τις ανεπιθύμητες οπτικές ιδιότητες. Ο συνδυασμός αυτός των κυρτών και κοίλων επιφανειών επιτρέπει την επίτευξη μίας καλύτερης τελικής εικόνας.

Παρόλα αυτά, λόγω της διαφορετικότητας και της πολυμορφίας των δειγμάτων, δεν αρκεί μόνο η σωστή επιλογή των φακών αλλά απαιτούνται πολλοί τρόποι και δυνατότητες για την παρακολούθηση των δειγμάτων κάτι που οδήγησε και στην δημιουργία πολλών τεχνικών μικροσκοπίας. Ένα απλό παράδειγμα είναι τα δείγματα στα οποία τα κύτταρα και οι ιστοί διασπώνται υπό μεγάλες εκπομπές ακτινοβολίας φωτός ή το φως που περνά από αυτά δεν διαχέεται. Για να αυξηθεί η ορατότητα των κυττάρων και ιστών κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση σε αυτά τα δείγματα συχνά απαιτείται η βαφή τους με ειδικές βαφές ή διαλύματα που επιτρέπουν την αποτύπωση των δομών τους και την αύξηση της αντίθεσης.

Οι βαφές αυτές μπορούν να απομονώσουν και να επισημάνουν συγκεκριμένα στοιχεία των κυττάρων και των ιστών, καθιστώντας τα ορατά και ευκρινή στο φως του μικροσκοπίου. Η χρήση βαφών αποτελεί συνηθής πρακτική στη μικροσκοπία για τη μελέτη των κυττάρων και των ιστών, καθώς επιτρέπει την επισήμανση και την αναγνώριση διαφορετικών δομών και συστατικών. Βέβαια, δεν μπορούμε σε όλα τα δείγματα να εφαρμόσουμε την παραπάνω πρακτική είτε λόγω ιδιαιτερότητας του δείγματος είτε λόγω των πολύ μικρών αποστάσεων ανάμεσα στις περιοχές που μας ενδιαφέρουν.

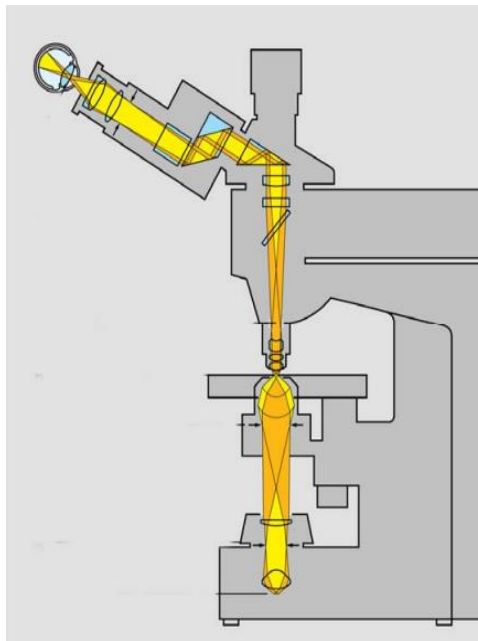
Ακόμη, καίριο ρόλο κατέχει και ο χρήστης, ο οποίος μπορεί να κάνει επιπρόσθετες αλλαγές στο μικροσκόπιο, οι οποίες εξαρτώνται βέβαια από τον τύπο του μικροσκοπίου και τις δυνατότητες που αυτό προσφέρει. Ωστόσο, τα μικροσκόπια μεταξύ τους έχουν κάποιες κοινές αλλαγές που μπορεί να κάνει ένας χρήστης. Αυτές περιλαμβάνουν την εστίαση όπου ο χρήστης μπορεί να αλλάξει την εστίαση του μικροσκοπίου προσαρμόζοντας την απόσταση μεταξύ του δείγματος και των φακών.

Αυτό επιτρέπει την ευκρίνεια της εικόνας και την προσαρμογή της εστίασης σε διάφορα αντικείμενα. Επιπλέον, ο χρήστης μπορεί να ρυθμίσει το φωτισμό του μικροσκοπίου για να βελτιώσει την ορατότητα του δείγματος. Αυτό μπορεί να γίνει με τη ρύθμιση της έντασης του φωτισμού ή τη χρήση φίλτρων για να τροποποιηθεί το αποτέλεσμα της τελικής εικόνας. Δίνεται ακόμα η δυνατότητα να αλλάξει το μέγεθος του διαφράγματος για να ρυθμιστεί η ποσότητα φωτός που φτάνει στον φακό και, κατά συνέπεια, στην εικόνα. Παράλληλα, είναι δυνατή η χρήση πολλαπλών φίλτρων τα οποία μπορούν να τοποθετηθούν μεταξύ του δείγματος και του φακού. Ο χρήστης μπορεί να χρησιμοποιήσει αυτά τα φίλτρα για να τροποποιήσει την εικόνα, όπως την αύξηση της αντίθεσης ή την απομόνωση συγκεκριμένων χρωμάτων. Τέλος, καίριο ρόλο έχει και η αλλαγή των φακών για να επιτευχθούν διάφορες μεγεθύνσεις. Ο χρήστης μπορεί να αλλάξει τον φακό για να προσαρμόσει τη μεγέθυνση στις ανάγκες της εκάστοτε παρατήρησης.

Για την μέγιστη απόδοση στην μικροσκοπία πέρα από τους φακούς, τις βαφές των δειγμάτων και τον χειρισμό από τον χρήστη, αναπτύχθηκαν και πολυπληθείς τεχνικές για την παρατήρηση των διαφορετικών δειγμάτων με σκοπό την καλύτερη παρατήρηση τους. Καθώς καθένα από αυτά έχει τις δικές του ιδιαιτερότητες και χαρακτηριστικά, συντελώντας έτσι στο να μην μπορούν να παρατηρηθούν όλα εξίσου καλά με την χρήση της ίδιας τεχνικής. Σε τέτοιες περιπτώσεις φαίνεται και η σημασία στην ύπαρξη πολλών και διαφορετικών τεχνικών οπτικής μικροσκοπίας. Κάποιες από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές μικροσκοπίας, που δεν εντάσσονται στην κατηγορία της υπερ-ανάλυσης, αλλά χρησιμοποιούνται ακόμα και σήμερα είναι η μικροσκοπίες φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου, αντίθετης φάσης, φθορισμού και συνεστιακή.

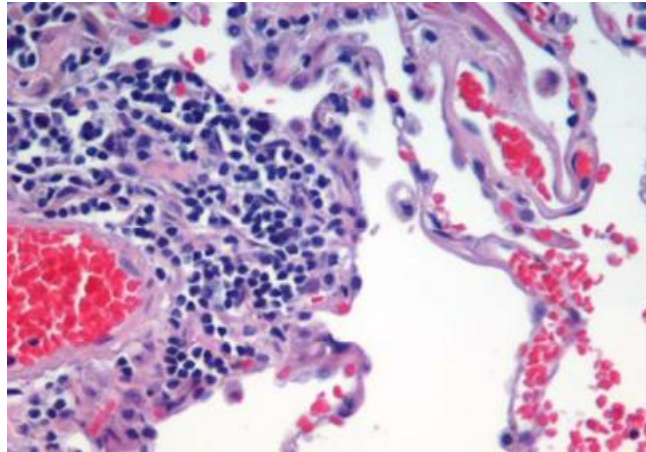
Η μικροσκοπία φωτεινού πεδίου βασίζεται στα φαινόμενα της απορρόφησης, της διάθλασης και της διάσπασης του φωτός, σε αυτή την τεχνική το δείγμα τοποθετείται μεταξύ της φωτεινής πηγής και του φακού παρατήρησης, με αποτέλεσμα το φως να περνά μέσα από το δείγμα. Στις περιοχές όπου το δείγμα δεν παρεμβάλλει το φως, το φως περνά ανεμπόδιστο και φτάνει στον φακό. Εκεί, η έλλειψη της παρεμβολής οδηγεί σε ένα πιο φωτεινό σημείο στην εικόνα, καθώς ο φακός παρατήρησης λαμβάνει μεγαλύτερη ποσότητα φωτός. Στις περιοχές όπου το δείγμα παρεμβάλλει το φως, το φως διασπάται, διαθλάσεται ή απορροφάται από τα στοιχεία του δείγματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να φτάνει λιγότερο φως στον φακό, αποδίδοντας σε ένα πιο σκοτεινό σημείο στην εικόνα. Η διαφορά λοιπόν που προκύπτει στη φωτεινότητα των περιοχών που παρεμβάλλεται το δείγμα και των περιοχών που δεν

παρεμβάλλεται είναι αυτό που επιτρέπει στον παρατηρητή να διακρίνει και να αναλύσει τη δομή και τις ιδιότητες του δείγματος κάτω από το μικροσκόπιο. Παρακάτω απεικονίζεται η διαδικασία της οπτικής παρατήρησης με χρήση της μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου, όπου παρατηρείται ότι η δέσμη φωτός που πέφτει στο αντικείμενο προς μελέτη, διέρχεται από το ίδιο το αντικείμενο και έπειτα μέσω της οπτικής οδούς του μικροσκοπίου η εικόνα φτάνει στο προσοφθάλμιο φακό και κατ' επέκταση στο μάτι του παρατηρητή ή την κάμερα απεικόνισης (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Αρχή λειτουργίας μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου, Πηγή:
<https://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy4.pdf>

Για να δημιουργηθεί αντίθεση κατά την διάρκεια της παρατήρησης, πρέπει το δείγμα να υποστεί μονιμοποίηση και χρώση, το οποίο καθιστά δύσκολη την παρατήρηση βιολογικών δειγμάτων καθώς δεν μπορούν πάντα να βρίσκονται υπό χρώση. Ακόμη, η χρώση απαιτεί την μονιμοποίηση του δείγματος, επομένως δεν είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωντανών κυττάρων. Παρακάτω απεικονίζεται μία οπτική παρατήρηση με την χρήση της μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου (Εικόνα 9).

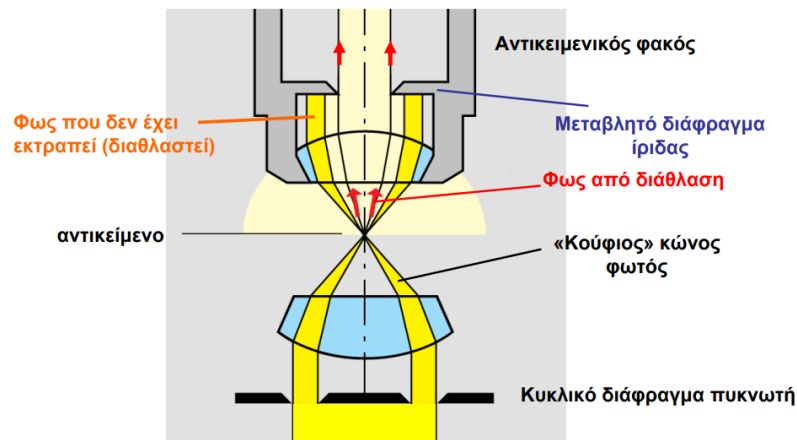


Εικόνα 9. Οπτική παρατήρηση με χρήση μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου, Πηγή:
<https://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy4.pdf>

Η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου την οποία εφηύρε ο φυσικός Friedrich Wilhelm Zernike το 1950 και βασίζεται στο φαινόμενο της διάθλασης του φωτός. Αυτή είναι μια τεχνική φωτισμού που χρησιμοποιείται στη μικροσκοπία για την απεικόνιση αντικειμένων που είναι διαφανή, με αποτέλεσμα να μην απορροφούν ουσιαστικά το φως και να μην είναι ορατά με τον συμβατικό φωτισμό, γεγονός που δεν επιτρέπει να επιτευχθεί επαρκής αντίθεση στην τελική εικόνα για να μελετηθεί. Κατά τη διέλευση του φωτός μέσα από το δείγμα, το φως υπόκειται διάθλαση λόγω των διαφορετικών δομών και ιδιοτήτων που έχει το δείγμα. Αυτό προκαλεί αλλαγή στην κατεύθυνση και κάμψη στο φως καθώς αυτό περνάει μέσα από το δείγμα. Κατά τη διαδικασία της μικροσκοπίας σκοτεινού πεδίου, η φωτεινή πηγή του μικροσκοπίου βρίσκεται σε πλάγια θέση από το αντικείμενο που παρατηρείται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας σκοτεινός φόντος γύρω από το αντικείμενο, ενώ το ίδιο το αντικείμενο εμφανίζεται φωτεινό και αντιδρά με το φως που διασχίζει το πλάτος του. Το αντικείμενο που φαίνεται φωτεινό έναντι του σκοτεινού φόντου που δημιουργείται από το φως που περνά πλάι δίνει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν μικρές δομικές λεπτομέρειες και να παρατηρηθούν κινήσεις του δείγματος που διαφορετικά θα ήταν δύσκολο να διακριθούν. Συντελώντας, στην αύξηση της αντίθεσης και την ενίσχυση των λεπτομερειών του αντικειμένου που παρατηρείται.

Τα σύγχρονα μικροσκόπια σκοτεινού πεδίου χρησιμοποιούν μεταβλητό διάφραγμα ίριδας, το οποίο αποσκοπεί στο να αποκλείει την διέλευση του φωτός το οποίο δεν έχει εκτραπεί από το αντικείμενο, με αποτέλεσμα, να χρησιμοποιείται μόνο το φως που προέρχεται από τη διάθλαση του φωτός από την επαφή του με το αντικείμενο προς παρατήρηση για τον σχηματισμό του ειδώλου. Παρακάτω

απεικονίζονται η αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας σκοτεινού πεδίου (Εικόνα 10) και το αποτέλεσμα της εφαρμογής του σε συγκεκριμένο δείγμα, έναντι της μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου (Εικόνα 11).

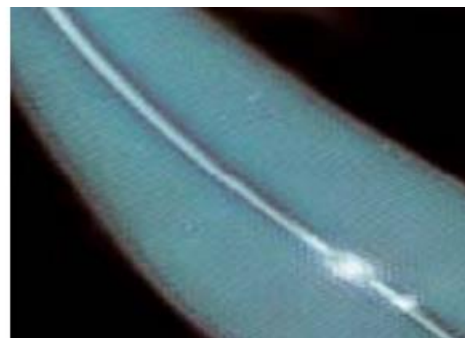


Εικόνα 10. Αρχή λειτουργίας μικροσκοπίας σκοτεινού πεδίου, Πηγή:

<https://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy4.pdf>



Διάτομο με brightfield



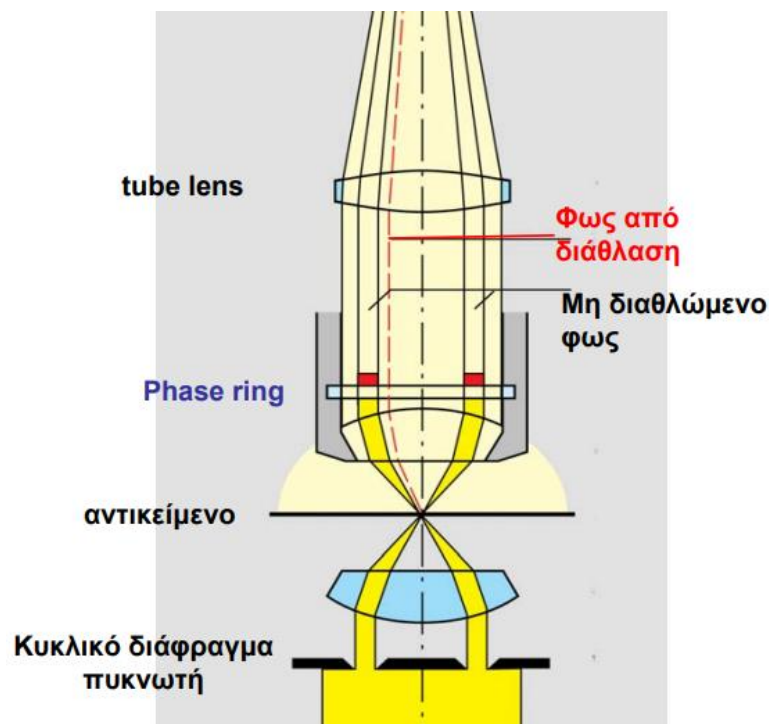
Διάτομο με darkfield

Εικόνα 11. Οπτική παρατήρηση με σύγκριση μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου-σκοτεινού πεδίου, Πηγή:

<https://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy4.pdf>

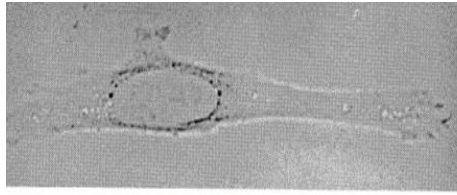
Μια άλλη τεχνική είναι η μικροσκοπία αντίθεσης φάσης που αναπτύχθηκε από τον φυσικό και επιστήμονα Fritz Zernike το 1932. Αυτή η τεχνική μικροσκοπίας βασίζεται στην αρχή της σκέδασης του φωτός με την ύλη και χρησιμοποιείται για να απεικονίζει διάφανα αντικείμενα με αυξημένη αντίθεση και λεπτομέρεια. Στη μέθοδο αντίθεσης φάσης, ο φωτισμός προσαρμόζεται έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια διαφορά φάσης μεταξύ των διαφανών δομών του αντικειμένου και του περιβάλλοντος τους. Η ιδέα υλοποίησης αυτής της τεχνικής, είναι η μελέτη των ακτινών του φωτός που σκεδάζονται από το δείγμα. Οι σκεδαζόμενες αυτές ακτίνες διαφέρουν ως προς την

φάση τους σε σχέση με τις αρχικές ακτίνες εκπομπής καθώς επιβραδύνονται από την επαφή τους με το δείγμα λόγω του διαφορετικού συντελεστή διάθλασης ή/και του πάχους του δείγματος. Στην τεχνική αυτή τόσο το διαθλώμενο όσο και το μη διαθλώμενο από το αντικείμενο προς παρακολούθηση φως δεσμεύονται από τον αντικειμενικό φακό. Η διαφορά είναι ότι το μη διαθλώμενο φως περνά από το ημιδιαφανές phase ring όπου επιβραδύνεται, αλλά και απορροφάται χονδρικά το 70% της έντασής του. Αυτό συντελεί και στον τελικό σχηματισμό της εικόνας που αντιλαμβάνεται ο χρήστης καθώς, η τελική εικόνα που σχηματίζεται παρέχει ένα αντίθετο προς το φόντο αποτέλεσμα διευκολύνοντας την παρατήρηση του δείγματος. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης (Εικόνα 12) και μία σύγκριση των τελικών εικόνων που παράγονται μεταξύ της μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου και της μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης (Εικόνα 13).

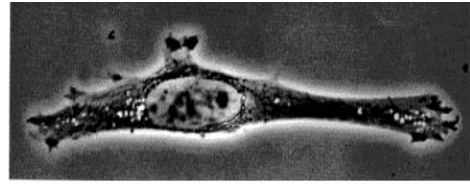


Εικόνα 12. Αρχή απεικόνισης μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης, Πηγή:
<https://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy4.pdf>

Σύγχρονες τεχνικές/συστήματα οπτικής μικροσκοπίας με υψηλή διακριτική ικανότητα



Brightfield



Phase contrast

Εικόνα 13. Οπτική παρατήρηση με σύγκριση μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου-αντίθεσης φάσης, Πηγή:

<https://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy4.pdf>

Παρακάτω απεικονίζεται το μικροσκόπιο που χρησιμοποιείται και για τις τρεις τεχνικές μικροσκοπίας, φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου και αντίθεσης φάσης (Εικόνα 14). Αυτό είναι ένα απλό κατασκευαστικά μικροσκόπιο καθώς καμία από αυτές τις τεχνικές δεν απαιτεί την χρήση ειδικού εξοπλισμού.



Εικόνα 14. Οπτικό μικροσκόπιο, Πηγή: <https://www.microscopes.gr/phase-contrast-microscopes/>

2.4.3 Μικροσκοπία φθορισμού

Το φαινόμενο του φθορισμού στη μικροσκοπία αναφέρεται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών να απορροφούν φως σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και να εκπέμπουν φως σε ένα άλλο μεγαλύτερο μήκος κύματος. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται φθορισμός και αξιοποιείται ευρέως στη μικροσκοπία για να απεικονίσει δομές και οργανισμούς. Κατά τη διαδικασία της παρατήρησης στη μικροσκοπία φθορισμού, τα δείγματα επεξεργάζονται με μια ουσία, γνωστή ως φθοροχρώμα, που έχει την ιδιότητα να εκπέμπει φως όταν δέχεται ενέργεια από φωτόνια. Το δείγμα που έχει επεξεργαστεί με φθοροχρώμα απορροφά φως σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος (συνήθως υπεριώδες φως) και εκπέμπει ακτινοβολία στο ορατό φάσμα. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την απεικόνιση δομών και οργανισμών που δεν μπορούν να ανιχνευθούν με άλλες μεθόδους μικροσκοπίας.

Ο φθορισμός είναι μια εξειδικευμένη τεχνική μικροσκοπίας και απαιτεί τη χρήση ειδικού εξοπλισμού, όπως μικροσκόπια φθορισμού και φθοριστικές ουσίες, για την παρατήρηση και την απεικόνιση των δειγμάτων. Στη μικροσκοπία, ο φθορισμός αναφέρεται στη μεταβολή των ιδιοτήτων ενός δείγματος κατά τη διάρκεια της παρατήρησης με χρήση μικροσκοπίου. Αφού μπορεί να επηρεάσει την παρατήρηση δειγμάτων με διάφορους τρόπους, καθώς ορισμένα από αυτά μπορεί να φθείρονται ή να μεταβάλλουν τις ιδιότητές τους κατά τη διάρκεια του φαινομένου αυτού. Κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη φωτεινότητα, την αντίθεση ή τον χρωματισμό της τελικής εικόνας. Επιπρόσθετα, οι ιδιότητες ενός δείγματος μπορούν να επηρεαστούν και από την θερμότητα που εκπέμπεται κατά τον φθορισμό. Η θέρμανση ενός δείγματος κατά τη διάρκεια της παρατήρησης μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές των ιδιοτήτων του, όπως τη μορφή του, την ανάπτυξη ή την αποδιάλυση των δομικών στοιχείων. Τέλος, μπορεί να υπάρξει φθορισμός από χημική αλληλεπίδραση, όπου, ορισμένα δείγματα μπορεί να υποστούν χημικές αλληλεπιδράσεις κατά τη διάρκεια της παρατήρησης, προκαλώντας μεταβολές στη δομή, τη σύνθεση ή την εμφάνισή τους.

Για να αντιμετωπιστούν αυτές οι ανεπιθύμητες φθορές στο δείγμα μπορούν να ληφθούν διάφορα μέτρα. Αυτά περιλαμβάνουν, τη χρήση κατάλληλων φίλτρων για την απορρόφηση ή διάχυση του περιττού φωτός, τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας, τη χρήση μη επιβλαβών χημικών ουσιών και την αποφυγή μεγάλων περιόδων έκθεσης του δείγματος.

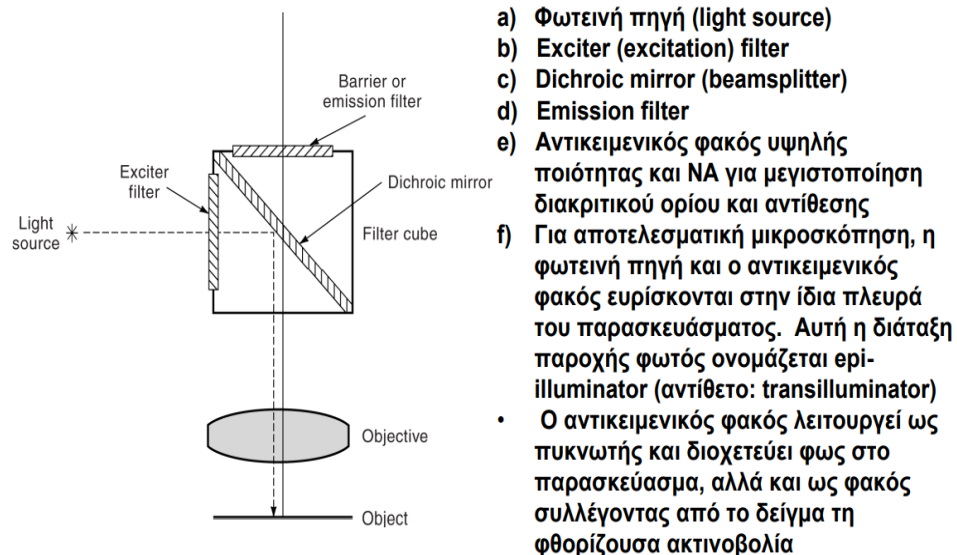
Το μικροσκόπιο φθορισμού, γνωστό και ως φθοριστικό μικροσκόπιο, είναι ένα είδος μικροσκοπίου που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την απεικόνιση φθοριστικών υλικών ή δειγμάτων και μπορεί να εφαρμοστεί είτε αυτά είναι άβια είτε ένβια. Τα μόρια του δείγματος σημαίνονται με ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες όταν εκτίθενται στον φωτισμό που εκπέμπει το μικροσκόπιο φθορισμού παρατηρούνται ως διαφορετικά χρώματα. Το πόσα χρώματα μπορούν να παρατηρηθούν ταυτόχρονα εξαρτάται από τις εκάστοτε δυνατότητες του μικροσκοπίου φθορισμού, όπως είναι ο αριθμός των φίλτρων και το είδος της φωτεινής πηγής που κατέχει. Σε ιδανικές συνθήκες μπορούν να παρατηρηθούν έως και τρεις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές.

Αναλυτικά, για την ανάδειξη και παρακολούθηση των περιοχών ενδιαφέροντος, τα μόρια του δείγματος διεγείρονται σε ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος, απορροφώντας την ενέργεια που εκπέμπεται από το φως συνεπάγοντας έτσι στην μετακίνηση των ηλεκτρονίων τους σε μία υψηλότερη ενεργειακά στοιβάδα. Με την μετέπειτα επαναφορά τους στην αρχική τους ενεργειακή στοιβάδα τα μόρια εκπέμπουν ακτινοβολία φθορισμού στο ορατό φάσμα όπου και παρατηρούνται από τον παρατηρητή. Το μικροσκόπιο φθορισμού διαθέτει συστήματα φωτισμού που εκπέμπουν φως στο δείγμα και συλλαμβάνουν το εκπεμπόμενο φως για να παραχθεί μια εικόνα προς παρατήρηση.

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του μικροσκοπίου φθορισμού είναι η δυνατότητα να απεικονίσει μόνο το εκπεμπόμενο φθορισμένο φως, αφαιρώντας το αρχικό φως που χρησιμοποιείται για την ανάκλαση ή τη διέλευση, επιτρέποντας έτσι, την επισήμανση και την ανίχνευση των φθοριστικών υλικών σε ένα δείγμα με μεγάλη ευαισθησία και ανάλυση. Αυτό καθίσταται δυνατόν με την χρήση φίλτρων, τα οποία απομονώνουν και ανακλούν συγκεκριμένα μήκη κύματος ακτινοβολίας που δεν ενδιαφέρουν τον παρατηρητή. Συγκεκριμένα, αυτός ο ρόλος πραγματοποιείται από ένα long-pass φίλτρο που βρίσκεται στο μικροσκόπιο και ονομάζεται διχρωϊκός καθρέπτης. Το φίλτρο αυτό είναι ένα βασικό τμήμα του μικροσκοπίου φθορισμού και έχει συγκεκριμένη θέση τοποθέτησης, όπου εντοπίζεται ανάμεσα στον οπτικό άξονα και την φωτεινή πηγή. Τέλος, με την χρήση επιπρόσθετων φίλτρων μπορεί να επιτευχθεί η προστασία του δείγματος από την ακτινοβολία που εκτίθεται κατά την παρατήρηση, αλλά και, η καλύτερη παρατήρηση των διάφορων περιοχών ενδιαφέροντος.

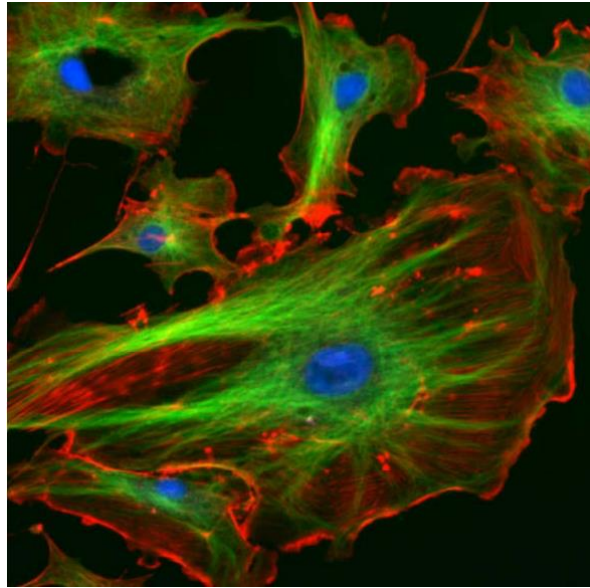
Στην μικροσκοπία φθορισμού έχουν αναπτυχθεί εξειδικευμένες τεχνικές που μπορούν να παρέχουν πρόσθετες πληροφορίες και εικόνες υψηλής ανάλυσης αναλόγως

το θέμα ενδιαφέροντος παρατήρησης της κάθε έρευνας. Αυτές είναι η FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) που βασίζεται πάνω στον συνδυασμό της απορρόφησης και της εκπομπής φθοριστικού φωτός, η FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) βασίζεται στην αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη μέσω της μεταφοράς ενέργειας από τον έναν φθοριστικό χρωμοφόρο (donor) στον άλλο φθοριστικό χρωμοφόρο (acceptor) μέσω επαγωγικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των ηλεκτρομαγνητικών πεδίων τους. Η FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) βασίζεται στην αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη μέσω της μέτρησης του χρόνου διάρκειας φθορισμού (fluorescence lifetime) των φθοριστικών χρωμοφώρων και μελετά τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών, και τέλος, η TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) που μελετά τις δομές του κυτταροσκελετού η οποία βασίζεται στο φαινόμενο της ανάκλασης του φωτός με την ύλη. Συνοψίζοντας, τα μικροσκόπια φθορισμού χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιολογία, την ιατρική και άλλους τομείς επιστημονικής έρευνας για την απεικόνιση και την ανίχνευση βιολογικών δομών, κυττάρων, μορίων και παθολογικών καταστάσεων εκμεταλλευόμενο την ιδιότητα του φθορισμού για την ανίχνευση του εκπεμπόμενου φωτός. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας φθορισμού (Εικόνα 15) και μία απεικόνιση ενός επιθηλιακού κυττάρου που σχηματίστηκε με την χρήση της μικροσκοπίας φθορισμού (Εικόνα 16).



Εικόνα 15. Αρχή λειτουργίας του φθοριστικού μικροσκοπίου, Πηγή:

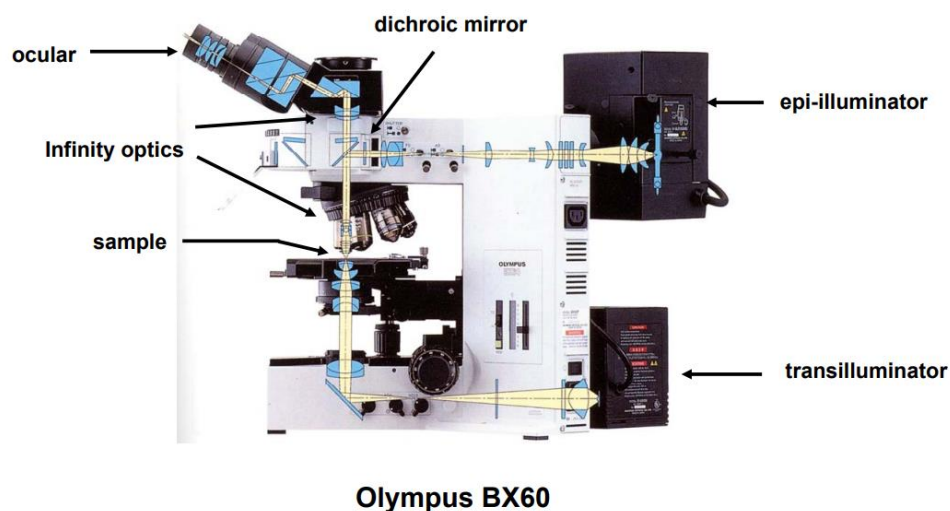
<http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf>



Εικόνα 16. Απεικόνιση επιθηλιακού κυττάρου με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού,

Πηγή: <http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf>

Παρακάτω απεικονίζεται το μικροσκόπιο που χρησιμοποιείται στην μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνα 17). Αυτό είναι πιο απαιτητικό κατασκευαστικά και απαιτεί την χρήση ειδικού εξοπλισμού. Αυτός αποτελείται από το μεγάλο εύρος διαφορετικών φακών για την μελέτη του αντικειμένου ενδιαφέροντος, τον διχρωϊκό καθρέπτη, την χρήση epi-illuminator που ο ρόλος του είναι να επικεντρώνει την φωτεινή δέσμη του laser πάνω στο δείγμα, και τέλος, τον transilluminator που ο ρόλος του είναι ο εντοπισμός και η απεικόνιση του αντικειμένου ενδιαφέροντος.



Εικόνα 17. Μικροσκόπιο φθορισμού, Πηγή:

<https://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy5.pdf>

2.4.4 Συνεστιακή Μικροσκοπία

Η συνεστιακή μικροσκοπία βασίζεται και αυτή στο φαινόμενο του φθορισμού και χρησιμοποιεί ένα συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) όπου είναι ένα είδος μικροσκοπίου που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση των δομών ενός δείγματος με σημαντικό πάχος (όπως στρογγυλά κύτταρα ή τομές ιστών) με υψηλή και πολύ συχνά 3D ανάλυση. Ο όρος "συνεστιακό" αναφέρεται στη χρήση ενός πίνακα αποκλεισμού φωτός που επιτρέπει μόνο το φως που προέρχεται από μία συγκεκριμένη εστίαση να φτάσει στον ανιχνευτή και χρησιμοποιεί την ίδια λογική με το μικροσκόπιο φθορισμού. Αυτή η τεχνική αποκόπτει τα φθορίζοντα σήματα που εκπέμπονται από τα μόρια που εντοπίζονται κοντά στην περιοχή ενδιαφέροντος του δείγματος, μειώνοντας έτσι τον θόρυβο του υποβάθρου (background noise), το οποίο αυξάνει την αντίθεση (contrast) διευκολύνοντας την παρατήρηση της εικόνας συγκριτικά με άλλες τεχνικές μικροσκοπίας.

Η συνεστιακή μικροσκοπία είναι μια τεχνική εικόνας που συνδυάζει τη μικροσκοπία φθορισμού με την κεφαλή σάρωσης (scan head) για την παραγωγή υψηλής ανάλυσης εικόνων. Αποτελείται από μικροσκόπιο φθορισμού, πολλαπλές πηγές φωτός laser, κεφαλή σάρωσης (scan head), ηλεκτρονικά στοιχεία, ηλεκτρονικό υπολογιστή, λογισμικό (software) και οθόνες. Το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ένα οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιείται για την παρατήρηση και ανίχνευση φθορισμού σε δείγματα. Απεικονίζει την ενέργεια φθορισμού που παράγεται από τη διέγερση μιας ουσίας με λέιζερ ή άλλη πηγή φωτός. Οι πολλαπλές πηγές φωτός laser χρησιμοποιούνται για τη διέγερση των φωσφορίζοντων υλικών στο δείγμα, προκειμένου να παραχθεί φθορισμός. Κάθε πηγή φωτός μπορεί να είναι συγκεκριμένα κατευθυνόμενη σε διάφορα μήκη κύματος για να επιτρέψει την ανίχνευση διαφορετικών χρωμοφόρων ουσιών.

Η κεφαλή σάρωσης είναι υπεύθυνη για την κίνηση του δείγματος και την καταγραφή της εικόνας. Συνήθως περιλαμβάνει οπτικά στοιχεία, όπως φακούς και καθρέπτες, για τη συλλογή και την ανακατεύθυνση του φθορισμένου φωτός προς τον ανιχνευτή. Τα ηλεκτρονικά στοιχεία περιλαμβάνουν αισθητήρες φωτονίων (photodetectors) που ανιχνεύουν το φθορισμένο φως και το μετατρέπουν σε ηλεκτρικό σήμα. Αυτό το σήμα χρησιμοποιείται για την καταγραφή και επεξεργασία της εικόνας.

Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των διαδικασιών της συνεστιακής μικροσκοπίας, την αποθήκευση και την επεξεργασία των δεδομένων εικόνας και την αναπαραγωγή της εικόνας στην οθόνη. Το λογισμικό χρησιμοποιείται

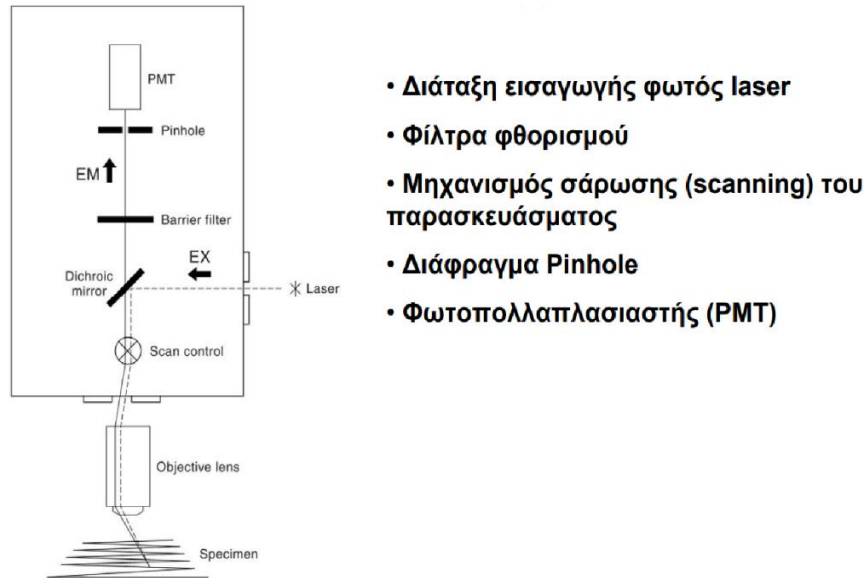
για τον έλεγχο των λειτουργιών της συνεστιακής μικροσκοπίας, την ανάλυση των δεδομένων εικόνας και την απεικόνιση των αποτελεσμάτων. Οι οθόνες χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση της εικόνας που προκύπτει από την παρατήρηση. Παράλληλα, οι εικόνες μπορούν να εμφανίζονται σε μία ή περισσότερες οθόνες, ανάλογα με τις απαιτήσεις και τις προτιμήσεις του χρήστη. Οι εφαρμογές της συνεστιακής μικροσκοπίας είναι ευρέως διαδεδομένες στη βιολογία, την ιατρική, την υλικοτεχνολογία και άλλους επιστημονικούς τομείς όπου η ακρίβεια, η ανάλυση και η τρισδιάστατη απεικόνιση σε μικρή κλίμακα είναι κρίσιμη.

Η διαδικασία λειτουργίας του συστήματος συνεστιακής μικροσκοπίας είναι σύνθετη και αποτελείται από διάφορα βήματα. Αρχικά, το δείγμα δέχεται την φωτεινή δέσμη που παρέχεται από πολλαπλές πηγές φωτός laser με σκοπό τη διέγερση του φθοροφόρου στο δείγμα. Έπειτα, η κεφαλή σάρωσης (scan head) κατευθύνει τη φωτεινή δέσμη λέιζερ πάνω από το δείγμα. Το σύστημα συνεστιακής μικροσκοπίας χρησιμοποιεί την τεχνική της *epi-illumination*, όπου η φωτεινή δέσμη του laser επικεντρώνεται σε ένα σημείο του παρασκευάσματος και σαρώνει το επίπεδο εστίασης που ορίζει ο χρήστης από δεξιά προς τα αριστερά και από επάνω προς τα κάτω. Η τεχνική αυτή επιτυγχάνεται με την χρήση δύο καθρεπτών που βρίσκονται στο εσωτερικό της κεφαλής σάρωσης και είναι κάθετοι μεταξύ τους. Ο ένας καθρέπτης σαρώνει την περιοχή ενδιαφέροντος κατά τον άξονα χ και ο άλλος κατά τον άξονα ψ .

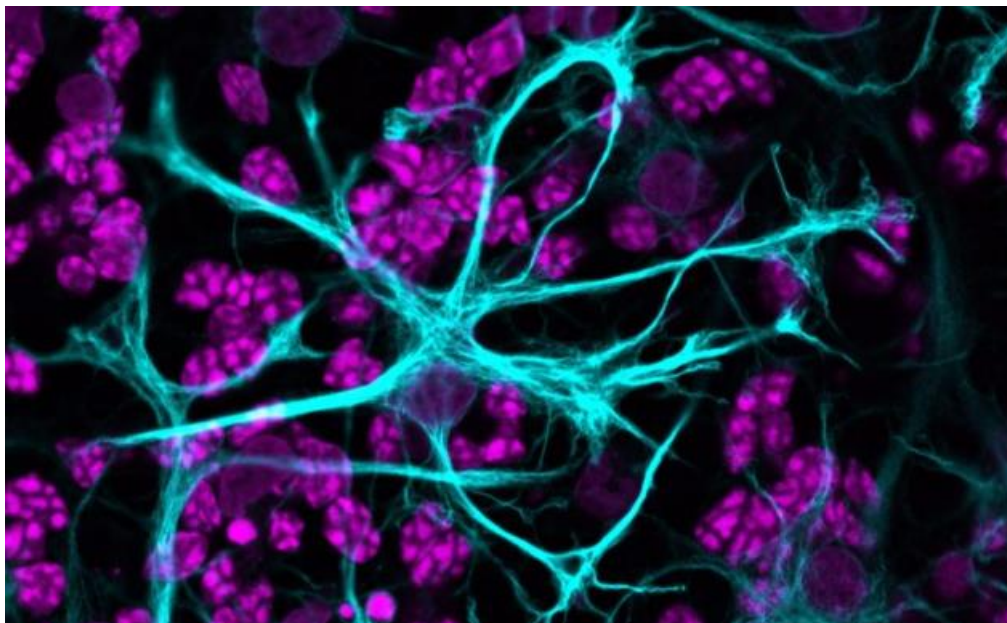
Κατά τη διέλευση του φθορισμένου φωτός από το παρασκεύασμα, αυτό κατευθύνεται προς την *pinhole* (ακριβέστερα, την ανοχή του *pinhole*) και τον φωτοπολλαπλασιαστή (PMT). Η *pinhole* είναι ένα μικρό τρύπημα που βρίσκεται στο επίπεδο σχηματισμού του ειδώλου. Αυτή δέχεται τα φωτόνια φθορισμού από το σημείο του παρασκευάσματος που σαρώνεται από τη δέσμη laser και αποκλείει το φθορισμό από σημεία εκτός του επιπέδου εστίασης. Ο φωτοπολλαπλασιαστής μετατρέπει το φθορισμένο φως σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο ενισχύεται και αναλύεται για την ανίχνευση της έντασης του φθορισμού.

Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής λαμβάνει τα σήματα από τον φωτοπολλαπλασιαστή και μετατρέπει τις διαφορές έντασης φωτός σε ψηφιακή εικόνα. Έτσι, η εικόνα του *confocal* μικροσκοπίου δημιουργείται μέσω της σάρωσης της φωτεινής δέσμης λέιζερ πάνω από το δείγμα και την ανίχνευση του φθορισμού από τον φωτοπολλαπλασιαστή, με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού υπολογιστή και του λογισμικού ανάλυσης εικόνας. Η ψηφιακή εικόνα του *confocal* εμφανίζεται στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή, όπου μπορεί να προβληθεί, να αποθηκευτεί και

να επεξεργαστεί. Η εικόνα που προκύπτει παρουσιάζει μια λεπτομερή αναπαράσταση της δομής και του φθορισμού του δείγματος που μπορεί να προβληθεί στην οθόνη για παρατήρηση και ανάλυση. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας της συνεστιακής μικροσκοπίας (Εικόνα 18) και η λήψη μίας εικόνας με την χρήση της συνεστιακής λειτουργίας (Εικόνα 19).



Εικόνα 18. Απεικόνιση της λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου, Πηγή:
<http://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy6.pdf>



Εικόνα 19. Απεικόνιση αστρογλοιακών κυττάρων ποντικών με χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας, Πηγή:
<https://www.scienceinschool.org/article/2022/fluorescence-microscopy-classroom/>

Η τρισδιάστατη παρατήρηση με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας επιτυγχάνεται μέσω της διαδοχικής σάρωσης του παρασκευάσματος σε πολλαπλά επίπεδα, γνωστά και ως οπτικές τομές, κατά μήκος του άξονα z. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το παρασκεύασμα σαρώνεται σε διάφορα βάθη, με μια προκαθορισμένη απόσταση (βήμα) μεταξύ των επιπέδων. Μετά τη λήψη των οπτικών τομών, το λογισμικό αποσυμπιεστή (deconvolution software) χρησιμοποιείται για να επεξεργαστεί τις εικόνες. Το λογισμικό εφαρμόζει αλγορίθμους αποσυμπίεσης για την αποκατάσταση της λεπτομέρειας και της ανάλυσης που έχουν χαθεί κατά την απόκτηση των οπτικών τομών. Το αποτέλεσμα είναι η παρουσίαση των οπτικών τομών σε ένα επίπεδο ή μια τρισδιάστατη αναπαράσταση του δείγματος. Αυτό επιτρέπει την αναπαράσταση και την παρατήρηση των δομών του δείγματος σε διάφορα βάθη, προσδίδοντας πληροφορίες για την τρισδιάστατη ανατομία και την αντιστοίχιση των δομών στον χώρο. Η χρήση της τρισδιάστατης αναπαράστασης επιτρέπει στους ερευνητές να εξετάσουν τον όγκο των δειγμάτων και να αναλύσουν την τοπολογία και τις αλληλεπιδράσεις των δομών σε μεγαλύτερη κλίμακα από τις δύο διαστάσεις που παρέχει η κλασική μικροσκοπία. Συνοψίζοντας, η διαδικασία τρισδιάστατης παρατήρησης με συνεστιακή μικροσκοπία περιλαμβάνει τη διαδοχική σάρωση του παρασκευάσματος σε πολλαπλά επίπεδα και τη χρήση λογισμικού αποσυμπίεσης για την αποκατάσταση και την τρισδιάστατη αναπαράσταση των εικόνων.

Τα κριτήρια ποιότητας για ένα σύστημα συνεστιακής μικροσκοπίας περιλαμβάνουν το διακριτικό του όριο, την ένταση του φωτεινού σήματος και το λόγο του σήματος προς θόρυβο. Το διακριτικό όριο αναφέρεται στην ελάχιστη απόσταση μεταξύ δύο αντικειμένων που μπορεί να διακριθούν στην εικόνα. Ένα σύστημα με υψηλό διακριτικό όριο είναι ικανό να αναγνωρίζει λεπτομέρειες με μικρή απόσταση μεταξύ τους, ενώ ένα σύστημα με χαμηλό διακριτικό όριο μπορεί να εμφανίζει δύσκολη διάκριση μεταξύ κοντινών σημείων.

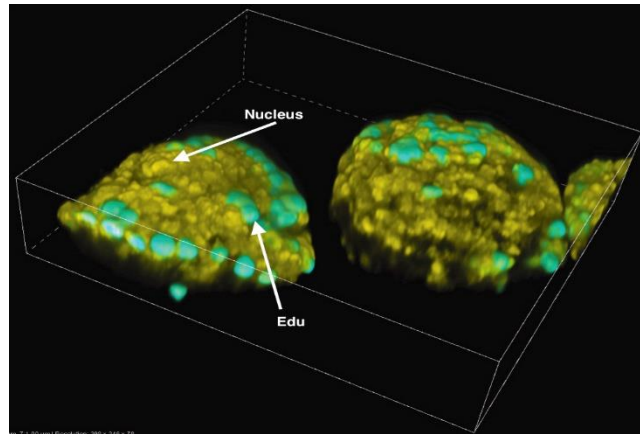
Η ένταση του φωτεινού σήματος αναφέρεται στην ένταση του φωτός που ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή (όπως ο φωτοπολλαπλασιαστής) και μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα. Ένα σύστημα με υψηλή ένταση φωτεινού σήματος παρουσιάζει ένα ισχυρό και ευδιάκριτο φωτεινό σήμα, ενώ ένα σύστημα με χαμηλή ένταση μπορεί να παρουσιάσει μειωμένο φωτεινό σήμα και ανεπιθύμητο θόρυβο.

Ο λόγος σήματος προς θόρυβο αναφέρεται στη σχέση μεταξύ της έντασης του φωτεινού σήματος και του επιπέδου θορύβου στην εικόνα. Ο λόγος σήματος προς θόρυβο είναι σημαντικός για την ποιότητα της εικόνας, καθώς υψηλός λόγος σήματος

προς θόρυβο παρέχει καθαρή εικόνα με καλή αντίθεση και λεπτομέρεια, ενώ χαμηλός λόγος σήματος προς θόρυβο μπορεί να οδηγήσει σε θορυβώδη εικόνες με χαμηλή αντίθεση.

Στη συνεστιακή μικροσκοπία η ρύθμιση της ποιότητας της εικόνας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως οι ρυθμίσεις που έχουν γίνει στο άνοιγμα του pinhole, η ταχύτητα της σάρωσης του δείγματος, η μεγέθυνση που υφίσταται η εικόνα λήψης του δείγματος και οι ρυθμίσεις offset(κατώφλι ανίχνευσης φωτός) και gain (πολλαπλασιαστής σήματος) του PMT.

Η συνεστιακή μικροσκοπία έχει πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τη μικροσκοπία φθορισμού ως προς την ευκρίνεια των οπτικών τομών, την ευκρίνεια της εικόνας, την τρισδιάστατη απεικόνιση και την ανάλυση. Η συνεστιακή μικροσκοπία επιτρέπει την απόκτηση εικόνων οπτικών τομών σε παρασκευάσματα με μεγάλο πάχος (10-80 μm), όπως ιστολογικές τομές. Αυτό επιτρέπει την παρατήρηση και την ανάλυση των δομών μέσα σε παχύτερα δείγματα. Επίσης, προσφέρει καλύτερη ευκρίνεια εικόνας ακόμα και σε λεπτά παρασκευάσματα, όπως λεπτές στρώσεις κυττάρων. Αυτό επιτρέπει την ανίχνευση λεπτομερειών και την παρατήρηση δομών που είναι δύσκολο να αναγνωριστούν με τη μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου. Με τη λήψη μίας σειράς τομών κατά μήκος του κατακόρυφου άξονα (z-stacks), μπορούμε να προβάλλουμε τις οπτικές τομές σε ένα επίπεδο, να επιτύχουμε τρισδιάστατη απεικόνιση, περιστροφή και εγκάρσια όψη του παρασκευάσματος. Αυτό μας επιτρέπει να παρατηρούμε τις δομές του δείγματος σε πολλαπλές διαστάσεις και να αναλύουμε την τοπολογία και τις αλληλεπιδράσεις του σε μεγαλύτερη κλίμακα. Αυτά τα πλεονεκτήματα καθιστούν τη συνεστιακή μικροσκοπία ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση και την απεικόνιση των δειγμάτων με υψηλή ανάλυση και αντίθεση, επιτρέποντας μας να εξερευνήσουμε την τρισδιάστατη δομή και τις λειτουργίες των δειγμάτων με μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Παρακάτω απεικονίζεται μία τρισδιάστατη απεικόνιση εντερικών οργανικών κυττάρων φθορισμένα πράσινα για τους πυρήνες και κίτρινα για την ταχεία αναπαραγωγή των κυττάρων (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Τρισδιάστατη απεικόνιση εντερικών κυττάρων με χρήση της συνεστιακής μικροσκοπίας, Πηγή: <https://cfi3d.utoronto.ca/nikon-swept-field-sfc-and-tirf-confocal-microscope/>

Παρακάτω απεικονίζεται ένα συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 21), αυτό απαιτεί ακριβώς τον ίδιο εξοπλισμό που χρησιμοποιεί και το μικροσκόπιο φθορισμού συν την κεφαλή σάρωσης (scan head). Ο οποίος τοποθετείτε στο πάνω μέρος του μικροσκοπίου.



Εικόνα 21. Συνεστιακό μικροσκόπιο, Πηγή: <https://www.zeiss.com/microscopy/en/products/light-microscopes/confocal-microscopes/lsm-900-for-materials.html>

3. Μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης

3.1 Αρχές της μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης

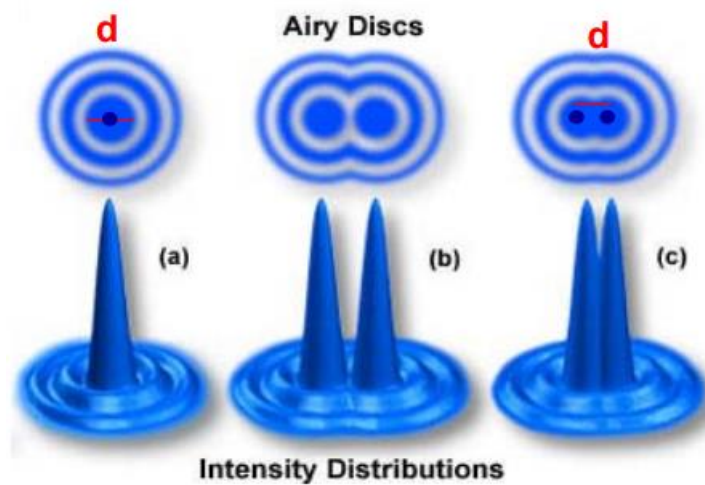
Η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης (SRM – Super Resolution Microscopy) είναι μια ομάδα τεχνικών που χρησιμοποιούνται για την απεικόνιση δειγμάτων σε υψηλότερη ανάλυση από αυτή που είναι δυνατή με τα συμβατικά οπτικά μικροσκόπια και βασίζεται στις μεθόδους της φθοριστικής και της συνεστιακής μικροσκοπίας. Οι τεχνικές της μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης επιτρέπουν την ανίχνευση δομών και λεπτομερειών σε μόρια που παρουσιάζουν μικρότερες αποστάσεις από την ανάλυση που είναι δυνατή με το παραδοσιακό αναλογικό φωτογραφικό φιλμ ή τον αισθητήρα εικόνας, καθιστώντας την μία κατηγορία τεχνικών η οποία έφερε την επανάσταση στον τομέα της μικροσκοπίας. Οι τεχνικές υπερ-ανάλυσης μικροσκοπίας βασίζονται συνήθως στη χρήση ειδικών αλγορίθμων επεξεργασίας εικόνας που αξιοποιούν πληροφορίες από διάφορες λήψεις του ίδιου δείγματος. Αυτοί οι αλγόριθμοι μπορούν να αποκαταστήσουν λεπτομέρειες που έχουν χαθεί λόγω των φυσικών περιορισμών του φωτός και του μικροσκοπίου, επιτρέποντας την απεικόνιση δομών σε μικρότερη κλίμακα με μεγαλύτερη αντίθεση, ανάλυση, ακρίβεια και τρισδιάστατη απεικόνιση.

Το συμβατικό μικροσκόπιο φωτός έχει όριο ανάλυσης 250 nm στις κατευθύνσεις x και y και >450–700 nm στην κατεύθυνση z. Αυτό το όριο, γνωστό και έως διακριτικό όριο είναι η ελάχιστη απόσταση όπου δύο σημεία μπορούν να γίνουν αντιληπτά ως ξεχωριστά και οφείλεται στο φαινόμενο της περίθλασης. Λόγω αυτής κάθε φωτεινό σημείο απεικονίζεται ως κηλίδα φωτός (δίσκος περίθλασης Airy) η οποία περιβάλλεται από ομόκεντρα δαχτυλίδια περίθλασης. Το διακριτικό όριο του αντικειμενικού φακού (d), και κατ' επέκταση του μικροσκοπίου είναι ίσο με την διαμέτρου του δίσκου Airy. Αυτό εξαρτάται από το μήκος κύματος της φωτεινής ακτινοβολίας (λ) και το αριθμητικό άνοιγμα του φακού (Numerical Aperture, NA) και αποδίδεται από την σχέση (8.1):

$$d = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{2} \cdot NA \quad (8.1)$$

Από την παραπάνω σχέση είναι εμφανές ότι όσο μεγαλύτερο είναι το αριθμητικό άνοιγμα του φακού, τόσο μικρότερο θα είναι το διακριτικό όριο d του φακού, άρα τόση καλύτερη παρατήρηση μικρότερων λεπτομερειών του αντικειμένου. Παρακάτω απεικονίζεται πως φαίνονται τα ξεχωριστά σημεία του αντικειμένου κατά την οπτική

παρατήρηση όταν αυτά έχουν απόσταση μικρότερη του διακριτικού ορίου του μικροσκοπίου (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Οπτική παρατήρηση σημείων κάτω του διακριτικού ορίου, Πηγή: <https://www.biology.uoc.gr/courses/BIOL493/documents/Microscopy2.pdf>

Πέρα από το διακριτικό όριο πρέπει να ληφθούν υπόψιν και ατέλειες του οπτικού συστήματος ώστε να μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια το ποσοστό σφάλματος της κάθε οπτικής παρατήρησης σε κάθε ξεχωριστό σημείο. Ο συνδυασμός αυτών των δύο ονομάζεται συνάρτηση διασποράς σημείου (Point Spread Function - PSF) και είναι η σταθερή διάσταση του φωτός που διαθλάται από ένα μόνο σημείο μέσω μικροσκοπίου. Είναι επίσης ένα μέτρο της μικρότερης σημειακής πηγής ή αντικείμενου που μπορεί να αναλυθεί με μικροσκόπιο. Σε ένα μικροσκόπιο, αντικείμενα μικρότερα από το PSF φαίνεται να έχουν το ίδιο μέγεθος με το PSF και αντικείμενα που είναι πιο κοντά μεταξύ τους από το πλάτος του PSF δεν μπορούν να διακριθούν ως ξεχωριστά.

Το κάθε σημείο έχει διαφορετικά PSF στον άξονα z απ' ότι στους άξονες x-y, ενώ το PSF του άξονα z είναι πάντα μεγαλύτερο από αυτό στους x-y. Για να υπολογιστούν τα διαφορετικά αυτά PSF γίνεται χρήση των τύπων που αναγράφονται παρακάτω και αποδίδονται από τις σχέσεις 9.1 για τον άξονα z και 9.2 για τους άξονες x-y. Οποιαδήποτε τεχνική μικροσκοπίας υπερβαίνει το όριο ανάλυσης της συμβατικής μικροσκοπίας φωτός κατηγοριοποιείται ως τεχνική υπερ-ανάλυσης.

$$PSF = 0.61\lambda/NA \quad (9.1)$$

$$PSF = 2 \cdot \frac{\lambda \cdot n}{NA^2} \quad (9.2)$$

Όπου NA είναι το αριθμητικό άνοιγμα του φακού, λ το μήκος κύματος του εκπεμπόμενου φωτός και n ο δείκτης διάθλασης.

Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε το PSF για τη σωστή επεξεργασία των εικόνων μικροσκοπίας στην υπερ-ανάλυση, καθώς με την αξιοποίηση αυτού μπορούμε να βελτιώσουμε την ανάλυση και την αντίθεση της εικόνας. Το PSF επιτρέπει την αποκατάσταση και την υπολογιστική αντιμετώπιση των παραμορφώσεων που προκαλεί ο μη ιδανικός φακός ενός μικροσκοπίου, επιτρέποντας την αναδημιουργία της πραγματικής δομής του δείγματος με την αποκατάσταση της εικόνας και τη βελτίωση της ανάλυσης, ακόμα και πέραν των φυσικών περιορισμών του μικροσκοπίου. Ακόμη, το PSF χρησιμοποιείται σε αλγόριθμους απομάκρυνσης παρασκηνίου (deconvolution) για την αντιστάθμιση των παραμορφώσεων που προκαλεί το μικροσκόπιο, την ανίχνευση και τον προσδιορισμό αντικειμένων, αλλά, και άλλες μορφές επεξεργασίας.

Επιπρόσθετα, αξιοποιώντας την ικανότητα κορεσμού της εκπομπής των φθοροφόρων και μια σειρά από τεχνικές απεικόνισης υπερ-ανάλυσης μπορούμε να αυξήσουμε τον βαθμό στον οποίο μπορεί να ξεπεραστεί το φράγμα της περίθλασης και να υπερβούμε έτσι το όριο του PSF του συμβατικού μικροσκοπίου. Με τη χρήση φωτός, οι μέθοδοι υπερ-ανάλυσης ενδέχεται να προκαλέσουν φωτοχημικές αντιδράσεις σε φωτοενεργοποιημένα φθοροφόρα. Αυτή η διαδικασία μπορεί να αλλάξει το χρώμα των φθοροφόρων ή να τα εναλλάξει μεταξύ των καταστάσεων ενεργοποίησης και απενεργοποίησης. Επειδή αυτές οι μεταβάσεις περιορίζονται σε ένα υποσύνολο φθοροφόρων που χωρίζονται χωρικά από τη συνάρτηση διασποράς σημείου (PSF) του μικροσκοπίου, είναι εφικτός ο εντοπισμός μορίων με ακρίβεια μέχρι και περίπου 8 nm. Ο αριθμός των μοναδικών σημείων που μπορούν να επιλυθούν στις σχετικές δομές ενδιαφέροντος καθορίζει τον βαθμό λεπτομέρειας μιας εικόνας, είτε είναι απλής είτε υψηλής ανάλυσης.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ανάλυση εικόνας και η ακρίβεια εντοπισμού δεν είναι τα ίδια. Η ανάλυση των δημιουργούμενων εικόνων υπερ-ανάλυσης καθορίζεται από το πλάτος της συνάρτησης εξάπλωσης η οποία βελτιώνεται χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις που βασίζονται σε πολλαπλές λήψεις που λαμβάνονται με διαφορετικό φως διέγερσης ή από διαφορετική θέση. Αντίθετα, η ακρίβεια

εντοπισμού της ακριβούς θέσης των μορίων εξαρτάται από την έξοδο φωτονίων και αναφέρεται στην αβεβαιότητα του εντοπισμού του κέντρου το PSF ενός μορίου (Thompson et al., 2002).

Ακόμη, στην μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη εάν ο χρόνος λήψης μιας φωτογραφίας είναι πιο αργός από τον ρυθμό με τον οποίο αλλάζουν οι δυναμικές βιολογικές δομές του δείγματος. Κάτι το οποίο γίνεται εύκολα εμφανής στην μελέτη των μορίων με την απλή εναλλαγή της ταχύτητας των λήψεων μεταξύ των εικόνων. Η παρακολούθηση ενός μορίου υψηλής ταχύτητας και υψηλής πυκνότητας έχει καταστεί δυνατή με τη χρήση των φθοροφόρων και τις δυνατότητες που παρέχονται από τις μεθόδους της μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης. Ωστόσο, λόγω των διακυμάνσεων στην ποσότητα του φθοροφόρου κατά μήκος ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού, αλλά και της δυναμικής φύσης των χημικών εναλλαγών εντός των κυτταρικών δομών καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας απεικόνισης, η χωρική ακρίβεια της απεικόνισης σε ζωντανά κύτταρα συχνά επηρεάζεται. Προκειμένου λοιπόν, να μειωθεί η παραμόρφωση και να αναλυθεί με ακρίβεια το δείγμα, τα δεδομένα υπερ-ανάλυσης ενός μορίου από ζωντανά κύτταρα πρέπει να ληφθούν με τη χρήση μεθόδων γρήγορης δειγματοληψίας χρονικά και χωρικά.

Σε γενικές γραμμές ο ρυθμός λήψης εικόνων υπερ-ανάλυσης είναι πολύ πιο αργός απ' ό τι στα συμβατικά μικροσκόπια. Αυτό συμβαίνει καθώς η σάρωση ενός δείγματος με τις τεχνικές υπερ-ανάλυσης διαρκεί περισσότερο από τη σάρωση ενός δείγματος από ένα παραδοσιακό μικροσκόπιο σάρωσης λόγω του χαμηλότερου PSF που πρέπει να αναλυθεί. Παράλληλα, στις τεχνικές υπερ-ανάλυσης πρέπει να συγκεντρωθούν αρκετές λήψεις από διαφορετικές θέσεις λήψης για το δείγμα που υπόκειται υπό μελέτη ώστε να σχηματίσει μια εικόνα υπερ-ανάλυσης. Παράλληλα, με την επιπλέον διεύρυνση του οπτικού πεδίου, η ταχύτητα απεικόνισης μειώνεται ακόμη περισσότερο.

Όπως και με άλλες διαδικασίες φθορισμού έτσι και στις τεχνικές υπερ-ανάλυσης, η επιλογή του σωστού εξοπλισμού είναι απαραίτητη. Καίριο ρόλο κατέχουν οι ανιχνευτές, που επιτρέπουν τη μέτρηση του αριθμού των μορίων που υπάρχουν σε μια συγκεκριμένη δομή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του κατάλληλου αριθμού λήψεων εικόνων χρονοσειράς ενός μορίου, για την ορθή υπερ-ανάλυσή του. Σημαντικό είναι βέβαια, να λαμβάνεται υπόψη η φωτολεύκανση που προκύπτει λόγω της συλλογής πολλών ενδιάμεσων φωτογραφιών. Ακόμη, είναι

απαραίτητο για τον ηλεκτρονικό εξοπλισμό να αναστρέφεται, είτε στιγμιαία είτε μόνιμα, μεταξύ καταστάσεων υψηλής και χαμηλής φωτεινότητας ή μεταξύ διαφορετικών μηκών κύματος. Οι ιδανικοί ανιχνευτές αυτής της διαδικασίας είναι αυτοί που κατέχουν υψηλή αναλογία αντίθεσης μεταξύ των δύο καταστάσεων και παρουσιάζουν ελάχιστη έως και μηδαμινή παραμόρφωση. Γενικά, η αποτελεσματικότητα μιας μελέτης ενός δείγματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μεθοδολογία που θα χρησιμοποιηθεί. Ενώ επιπρόσθετα, οι ίδιες οι βαφές πρέπει να έχουν αρκετή φωτοσταθερότητα για να αποδίδουν αποτελεσματικά σε υψηλά επίπεδα μηκών κύματος διέγερσης όσο και σε μήκη κύματος απορρόφησης. Επιπλέον, είναι απαραίτητο να ενεργοποιούνται εύκολα στην απαιτούμενη φάση εκπομπής, ενώ θα πρέπει να παραμένουν μη διεγερμένοι από το μήκος κύματος απορρόφησης.

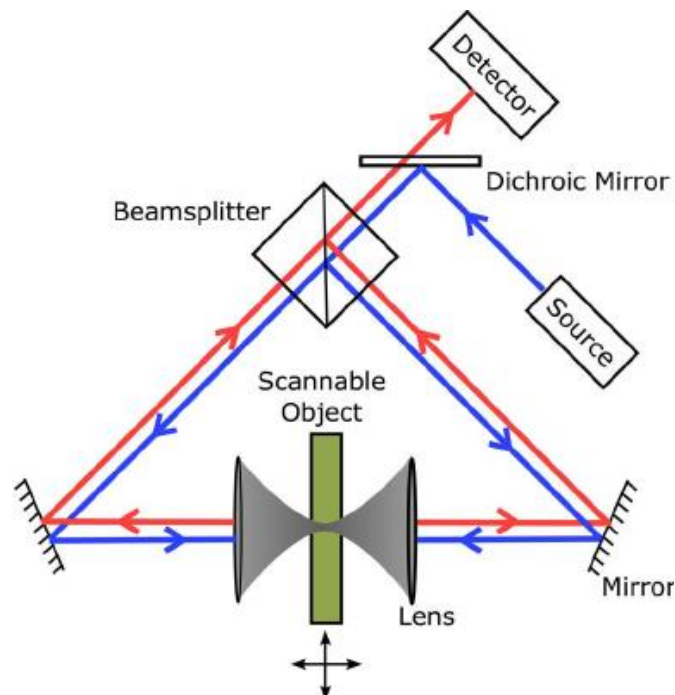
3.2 Τεχνικές

Υπάρχουν πολλές τεχνικές SRM που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη εικόνων υπερ-ανάλυσης και όλες βασίζονται στο φαινόμενο του φθορισμού και παρέχουν τρισδιάστατη απεικόνιση των δειγμάτων που υπόκεινται υπό μελέτη. Οι πιο διαδεδομένες εξ' αυτών είναι:

- Η πρώτη τεχνική που δημιουργήθηκε και κατηγοριοποιήθηκε στη μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης είναι η τεχνική 4Pi. Η κατασκευή της εικόνας υπερ-ανάλυσης σε αυτή την τεχνική επιτυγχάνεται με την χρήση δύο αντικειμενικών φακών που έχουν αντίθετη τοποθέτηση ο ένας από τον άλλο, ενώ παράλληλα και οι δύο επικεντρώνονται στην ίδια γεωγραφική θέση του δείγματος. Είναι σημαντικό να ρυθμιστούν με τέτοιο τρόπο ώστε να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η διαφορά του οπτικού μονοπατιού της απόστασης ανάμεσα των δύο αντικειμενικών αυτών φακών.

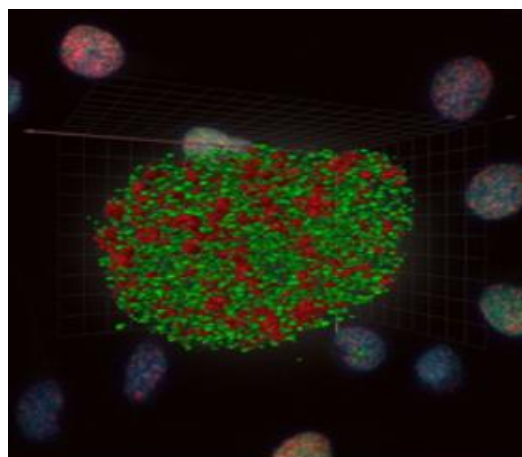
Αυτή η τεχνική επιτρέπει τον ταυτόχρονο φωτισμό των μορίων στο ίδιο σημείο εστίασης του δείγματος και από τις δύο πλευρές του, και παράλληλα την ταυτόχρονη συλλογή του ανακλώμενου ή του εκπεμπόμενου φωτός. Με άλλα λόγια, είναι δυνατόν να υπερθέσουμε εύληπτα το εκπεμπόμενο φως και των δύο στον ανιχνευτή. Στην τεχνική αυτή, η ποσότητα του φωτός που χρησιμοποιείτε για τον φωτισμό και την ανίχνευση του δείγματος αυξάνεται και πλησιάζει την μέγιστη τιμή με αποτέλεσμα το δείγμα να φωτίζεται και να ανιχνεύεται από όλες τις πλευρές. Η δέσμη λείζερ ενεργοποίησης που εκπέμπεται χωρίζεται από έναν διαχωριστή δέσμης και

κατευθύνετε από τον διχρωϊκό καθρέπτη στους δύο αντίθετα τοποθετημένους αντικειμενικούς φακούς. Έτσι προκύπτει η εστίαση φωτός και των δύο νέων δεσμών λέιζερ στο κοινό σημείο εστίασης. Τα μόρια που διεγείρονται σε αυτή την θέση θα υποστούν φθορισμό. Ο φθορισμός αυτός συλλέγεται και από τις δύο πλευρές, που στην συνέχεια ενώνεται από τον διαχωριστή δέσμης και εκτρέπεται στον ανιχνευτή από τον διχρωϊκό καθρέπτη. Με αυτόν τον τρόπο, η μέθοδος 4Pi μπορεί να προσφέρει διακριτική ικανότητα που φθάνει τα 100nm. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας της τεχνικής 4pi (Εικόνα 23) και η λήψη μίας εικόνας υπερ-ανάλυσης ενός πυρήνα με την τεχνική αυτή (Εικόνα 24).



Εικόνα 23. Τεχνική υπερ-ανάλυσης 4PI, Πηγή:

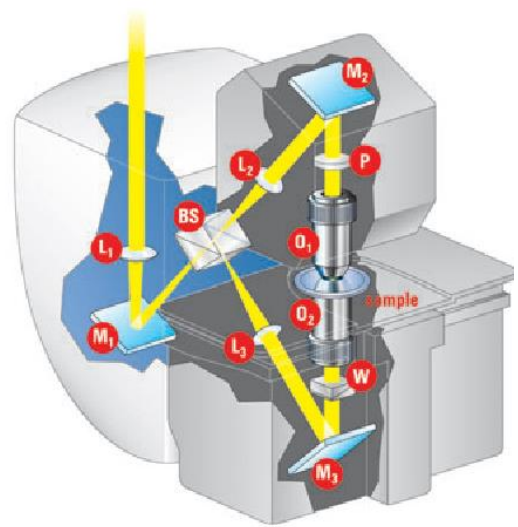
<https://academic-accelerator.com/encyclopedia/4pi-microscope>



Εικόνα 24. Απεικόνιση πυρήνα με χρήση της τεχνικής υπερ-ανάλυσης 4PI, Πηγή:

<https://phys.org/news/2006-11-high-resolution-4pi-microscopy-nucleus.html>

Παρακάτω απεικονίζεται μία εικόνα με ένα μικροσκόπιο που εφαρμόζει την τεχνική 4PI (Εικόνα 25). Παρουσιάζετε η ακριβής τοποθέτηση του εξοπλισμού με M_1 να είναι ο διχρωϊκός καθρέπτης, BS το beamsplitter που μοιράζει την ακτίνα laser σε δύο νέες, οι οποίες με την σειρά τους έρχονται σε επαφή με άλλους δύο καθρέπτες (M_2 και M_3) που στην συνέχεια ακτινοβολούν το δείγμα και από τις δύο του πλευρές.



Εικόνα 25. Μικροσκόπιο 4PI, Πηγή:

<https://www.semanticscholar.org/paper/4Pi-Confocal-Microscopy-Is-Coming-of-Age/8341b0fe833b9208a45334badc30db2447f1f191/figure/1>

Με εξαίρεση την τεχνική υπερ-ανάλυσης 4PI, οι υπόλοιπες τεχνικές υπερ-ανάλυσης κατηγοριοποιούνται σε δύο κατηγορίες, την Ντετερμινιστική υπερ-ανάλυση (Deterministic super-resolution) και την Στοχαστική υπερ-ανάλυση (Stochastic super-resolution). Στη Ντετερμινιστική υπερ-ανάλυση χρησιμοποιούνται φθοροφόρα, που δείχνουν μία μη γραμμική αντίδραση κατά την διέγερση, το οποίο εκμεταλλευόμαστε για να ενισχύσουμε την ανάλυση της τελικής εικόνας. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει τις τεχνικές SIM και STED. Ενώ, η Στοχαστική υπερ-ανάλυση εκμεταλλεύεται τη χημική πολυπλοκότητα των μοριακών φωτεινών πηγών δίνοντας τους μία πολύπλοκη προσωρινή συμπεριφορά, με σκοπό να κάνει τα φθοροφόρα να εκπέμπουν φως σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και επομένως οι χωρικές τους διαφοροποιήσεις να

μπορούν να επιλυθούν με την εισαγωγή της μεταβλητής του χρόνου. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει την τεχνική SOFI και όλες τις τεχνικές που κατηγοριοποιούνται στη SMLM (Single-Molecule Localization Microscopy), δηλαδή την PALM, FPALM, GSD, STORM, και dSTORM.

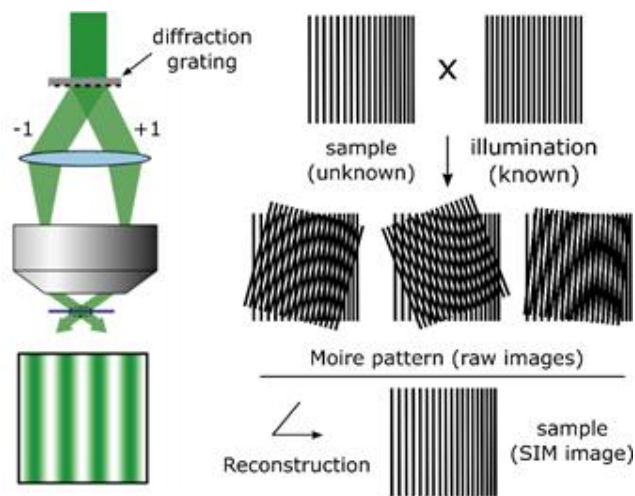
Η SMLM είναι μια γενική κατηγορία τεχνικών υπερ-ανάλυσης μικροσκοπίας που χρησιμοποιούν τη μέθοδο του μονομοριακού φθορισμού (single-molecule fluorescence) για την ανίχνευση αλλά και για την ακριβή εύρεση της θέσης των ενιαίων μορίων. Οι τεχνικές SMLM εκμεταλλεύονται την ικανότητα ορισμένων φθοροφόρων μορίων να εκπέμπουν φως μεμονωμένα, δηλαδή να διακρίνονται ως μεμονωμένα φωτόνια κατά την ενεργοποίησή τους. Αυτό επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της θέσης κάθε μοναδικού μορίου μέσω της ανάλυσης της εικόνας. Οι τεχνικές SMLM παρέχουν υψηλή ανάλυση και ευαισθησία και έχουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς, όπως η κυτταρική βιολογία, η νανοτεχνολογία και η μελέτη μορίων και πρωτεϊνών σε μοριακό επίπεδο.

- SIM (Structured Illumination Microscopy), χρησιμοποιεί λέιζερ, στο οποίο έχει τοποθετηθεί ένα κινούμενο πρίσμα διάθλασης στη διαδρομή της δέσμης ενεργοποίησης. Αυτές οι δέσμες αλληλοδρομούν στο επίπεδο εστίασης του φακού και δημιουργούν μια φωτεινότητα σε ρίγες (με ένταση που ακολουθεί ημιτονοειδές κύμα). Αυτή η ραβδωτή μορφή φωτός, μέσω της επικάλυψής της με το δείγμα, δημιουργεί ένα φαινόμενο που ονομάζεται Moire.

Κάτω από ομογενή φωτισμό, λόγω του PSF φαινομένου τα σημεία που έχουν υψηλή συχνότητα, δηλαδή που βρίσκονται πολύ κοντά το ένα με το άλλο δεν είναι ορατά. Επομένως, η τεχνική SIM χρησιμοποιώντας δομημένο φωτισμό και δημιουργώντας μία επικάλυψη από τον συνδυασμό μεταξύ της υψηλής συχνότητας διάταξης των σημείων του δείγματος και της υψηλής συχνότητας της φωτεινότητας σε ρίγες που δημιουργείται, δημιουργούν ένα μοτίβο χαμηλότερης συχνότητας που ανιχνεύεται με μεγάλη ανάλυση από τον φακό.

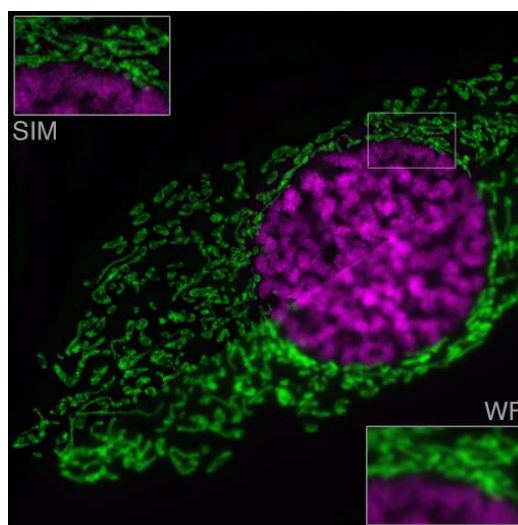
Για την ανακατασκευή της τελικής εικόνας υπερ-ανάλυσης, πρέπει να συλλεγούν αρκετές αρχικές εικόνες, καθεμία από τις οποίες λαμβάνεται σε διαφορετικό προσανατολισμό του δομημένου φωτισμού. Κάτι που επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση του πρίσματος διάθλασης (μετάφραση και περιστροφή). Αυτό επιτρέπει την επανακατασκευή μιας εικόνας με υψηλότερη συχνότητας χωρικής πληροφορίας από αυτή που θα καταγράφονταν από ένα συμβατικό μικροσκόπιο. Στη συνέχεια,

εφαρμόζοντας κάποιες αλγεβρικές διαδικασίες στις πληροφορίες που έχουν αντληθεί από τις διάφορες λήψεις με διαφορετικές φάσεις του φάσματος, μπορούν να αποκαλυφθούν επιπλέον λεπτομέρειες για το δείγμα. Για την απόκτηση μιας δυσδιάστατης εικόνας υπερ-ανάλυσης απαιτούνται 9 αρχικές εικόνες (3 μεταφράσεις x 3 περιστροφές) και για την απόκτηση μιας τρισδιάστατης εικόνας υπερ-ανάλυσης, απαιτούνται 15 εικόνες (5 μεταφράσεις x 3 περιστροφές). Η διακριτική ικανότητα αυτής της τεχνικής είναι έως και τα 100nm. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας της τεχνικής SIM (Εικόνα 26) και μία λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης SIM πάνω σε κύτταρο συγκριτικά με την μικροσκοπία φθορισμού (Εικόνα 27).



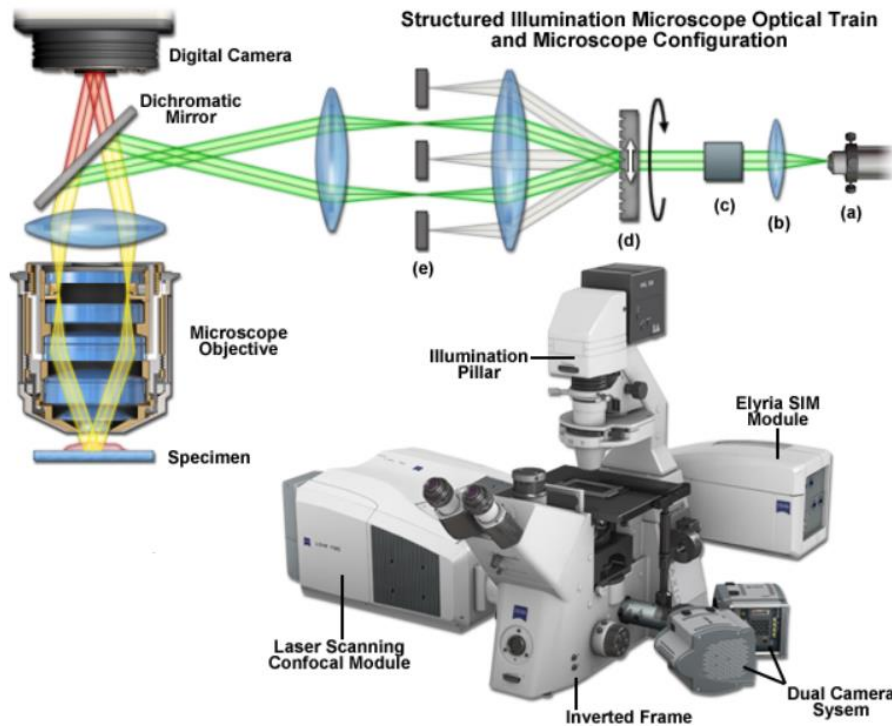
Εικόνα 26. Αρχή λειτουργίας SIM, Πηγή:

<https://andor.oxinst.com/learning/view/article/super-resolution-imaging-structured-illumination-microscopy>



Εικόνα 27. Λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης SIM πάνω σε κύτταρο συγκριτικά με την μικροσκοπία φθορισμού, Πηγή: <https://sim.hms.harvard.edu/>

Παρακάτω απεικονίζεται ένα μικροσκόπιο που εφαρμόζει την τεχνική SIM (Εικόνα 28). Αρχικά, μεταφέρεται στο μικροσκόπιο μέσω οπτικής ίνας (a), η δέσμη laser όπου και συγκεντρώνεται (β) και πολώνεται γραμμικά (c), έπειτα η δέσμη laser περιθλάται σε πολλές ακτίνες (d). Τέλος, από αυτές τις ακτίνες, μόνο οι αρχικές (+1 και -1) χρησιμοποιούνται ενώ οι υπόλοιπες μπλοκάρονται (e).

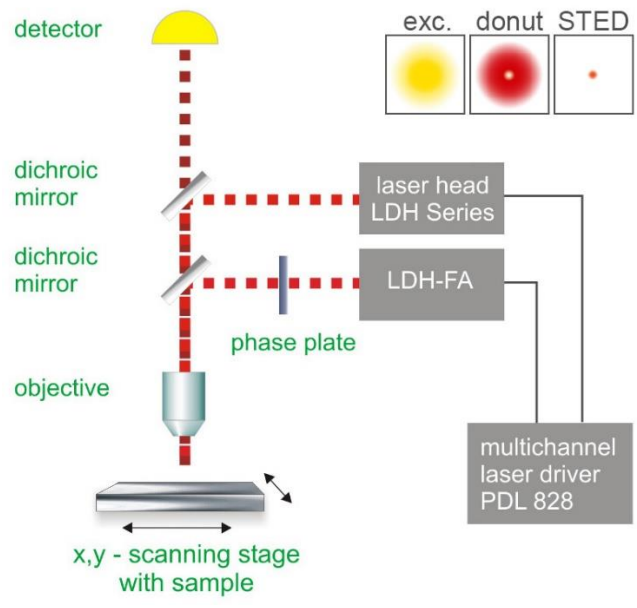


Εικόνα 28. Λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης SIM πάνω σε κύτταρο συγκριτικά με την μικροσκοπία φθορισμού, Πηγή:

<https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/supersim.html>

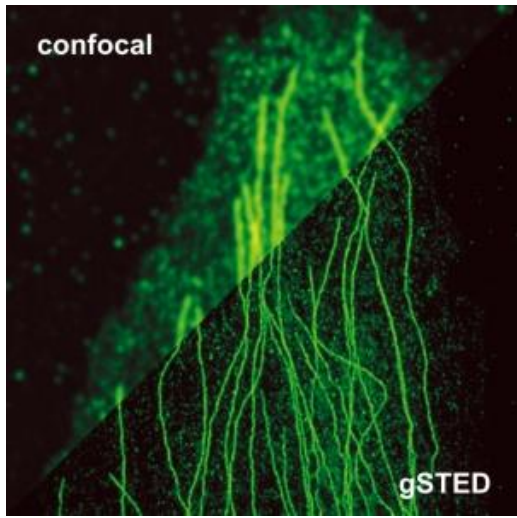
STED (Stimulated Emission Depletion Microscopy), είναι μια τεχνική μικροσκοπίας που χρησιμοποιεί δύο δέσμες laser, η πρώτη εξ' αυτών διεγείρει τα φθορίζοντα μόρια, ενώ η δεύτερη δέσμη είναι μετατοπισμένη στην κόκκινη συχνότητα και ο ρόλος της είναι να αναστέλλει την ικανότητα φθορισμού των μορίων σε ένα δακτύλιο γύρω και έξω από την περιοχή ενδιαφέροντος, που φέρει έως αποτέλεσμα την μείωση της φωταύγειας εκτός της εστιακής περιοχής κάτι το οποίο βοηθάει στην περαιτέρω βελτίωση της ανάλυσης της εικόνας του δείγματος αφού εξαλείφει τις λοιπές πληροφορίες κάνοντας την λήψη του δείγματος πιο ευανάγνωστη. Η λήψη εικόνων υπερ-ανάλυσης απαιτεί τον σχηματισμό μίας εικόνας με περισσότερα pixel, κάτι που σημαίνει ότι πρέπει να ληφθούν περισσότερες πληροφορίες από ένα δείγμα για τον σχηματισμό της, αυτό οδηγεί σε μεγαλύτερο χρόνο για την δημιουργία της

εικόνας. Παρόλα αυτά, το σημείο εστίασης της τεχνικής STED εξαρτάται από την ένταση της δεύτερης δέσμης λέιζερ που χρησιμοποιείτε. Αυτό συντελεί στην δυνατότητα μείωσης μεγέθους του σημείου ενδιαφέροντος επομένως και την ταχύτητα απεικόνισης του. Ένας συμβιβασμός μπορεί να γίνει ανάμεσα σε αυτών των δύο παραγόντων για την απεικόνιση ενός συγκεκριμένου σημείου. Αυτή η μέθοδος μπορεί να αποδώσει έως και 10nm διακριτική ικανότητα. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας STED (Εικόνα 29) και μία λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης STED μιας μεμβράνης συγκριτικά με την συνεστιακή μικροσκοπία (Εικόνα 30).



Εικόνα 29. Τεχνική υπερ-ανάλυσης STED, Πηγή:

<https://www.picoquant.com/applications/category/life-science/sted>



Εικόνα 30. Λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης STED μίας μεμβράνης συγκριτικά με την συνεστιακή μικροσκοπία, Πηγή:

<https://www.picoquant.com/applications/category/life-science/sted>

Παρακάτω απεικονίζεται ένα μικροσκόπιο που εφαρμόζει την τεχνική STED (Εικόνα 31). Παρατηρούμε ότι δεν έχει διαφοροποιήσεις από ένα μικροσκόπιο φθορισμού με εξαίρεση την προσθήκη της μονάδας STED που πραγματοποιεί όλες τις απαραίτητες ενέργειες για την διεξαγωγή της παρακολούθησης STED.



Εικόνα 31. Μικροσκόπιο STED, Πηγή:

<https://www.picoquant.com/products/category/fluorescence-microscopes/microtime-200-sted-time-resolved-confocal-fluorescence-microscope-with-super-resolution-capability>

• Η GSD (Ground State Depletion) παρακάμπτει το όριο της διάθλασης μειώνοντας τον αριθμό των φθοροφόρων που εκπέμπουν ακτινοβολία ταυτόχρονα. Αυτή η τεχνική λοιπόν, επιτρέπει να μεταβεί μόνο ένα μικρό υποσύνολο από τα φθοροφόρα σε κατάσταση διέγερσης (ground state), ενώ τα υπόλοιπα παραμένουν σε ανενεργή κατάσταση έως ότου να διεγερθούν και αυτά. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση μίας δέσμης λέιζερ υψηλής έντασης που χρησιμοποιείται για να διεγείρει τα φθοροφόρα μόρια βομβαρδίζοντας τα με ηλεκτρόνια και φωτόνια, ενώ παράλληλα με αυτό τον τρόπο αυξάνει και την πιθανότητα να υποβληθούν στο φαινόμενο γνωστό ως 'spin-flip' αυτό λαμβάνει μέρος όταν το 'spin' του ηλεκτρονίου και του φωτονίου είναι ίδια με αποτέλεσμα το φθοροφόρο αυτού του μορίου να σταματήσει να εκπέμπει φωτόνια, αυτό το φαινόμενο λέγεται 'dark state' ή αλλιώς 'triplet'. Τα φθοροφόρα μόρια θα μεταβούν πολλές φορές κατά την διάρκεια της μελέτης του δείγματος ανάμεσα σε καταστάσεις φθορισμού και 'triplet'. Λόγω των μειωμένων φθοροφόρων

που είναι ενεργά την ίδια χρονική στιγμή χάρης του φαινομένου ‘triplet’ τα μεμονωμένα ενεργά φθοροφόρα γίνονται προσωρινά πιο διακριτά χωρικά από τα γειτονικά μη διεγερμένα φθοροφόρα. Το ξέσπασμα των φωτονίων μπορεί να υπολογιστεί με την χρήση της Γκαουσιανής συνάρτησης (Gaussian function), ενώ ο υπολογισμός της ακριβής θέσης που ανταποκρίνεται στο φθοροφόρο εξαρτάται από το αριθμητικό άνοιγμα του φακού του μικροσκοπίου, το μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση και τον αριθμό των φωτονίων που εκπέμπει το κάθε φθοροφόρο. Η διακριτική ικανότητα αυτής της τεχνικής μπορεί να κυμανθεί έως και τα 8nm. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας της μικροσκοπίας GSD (Εικόνα 32) και μία λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης GSD των κενών μεταξύ των ατόμων του διαμαντιού συγκριτικά με την συνεστιακή μικροσκοπία (Εικόνα 33).

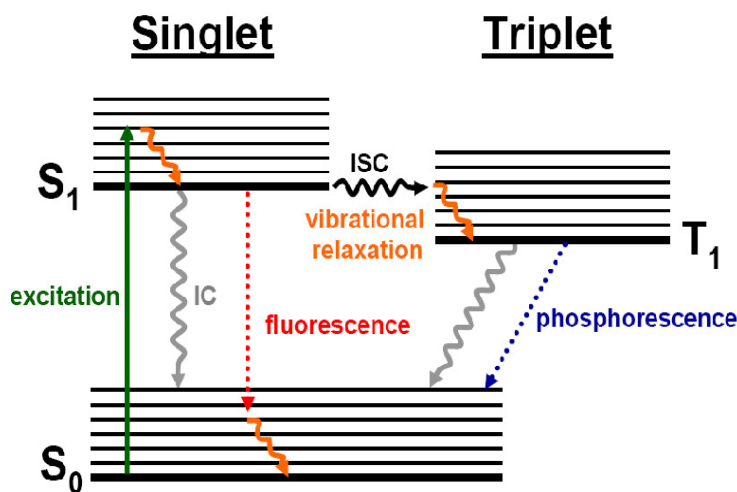
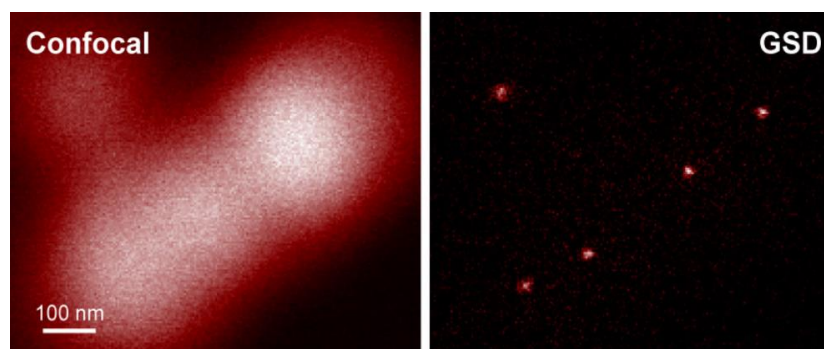


Figure 2.1: Main electronic energy levels in a fluorophore. S_0 = singlet ground state, S_1 = first excited singlet state, T_1 = triplet state, IC = internal conversion, ISC = intersystem crossing, dotted lines = radiative transitions

Εικόνα 32. Αρχή λειτουργίας τεχνικής υπερ-ανάλυσης GSD, Πηγή:

<https://www.semanticscholar.org/paper/Ground-State-Depletion-Fluorescence-Microscopy-Bretschneider/c45dc2527d37f2c609f4e619074196b71baca10d>



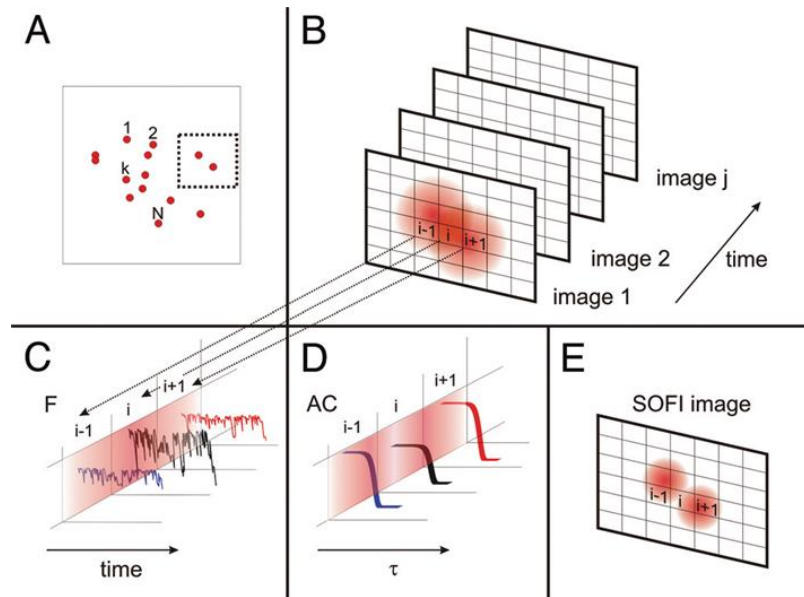
Εικόνα 33. Λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης GSD κατά την παρατήρηση διαμαντιού συγκριτικά με την συνεστιακή μικροσκοπία, Πηγή:

https://en.wikipedia.org/wiki/File:Rittweger_gsd2.jpg

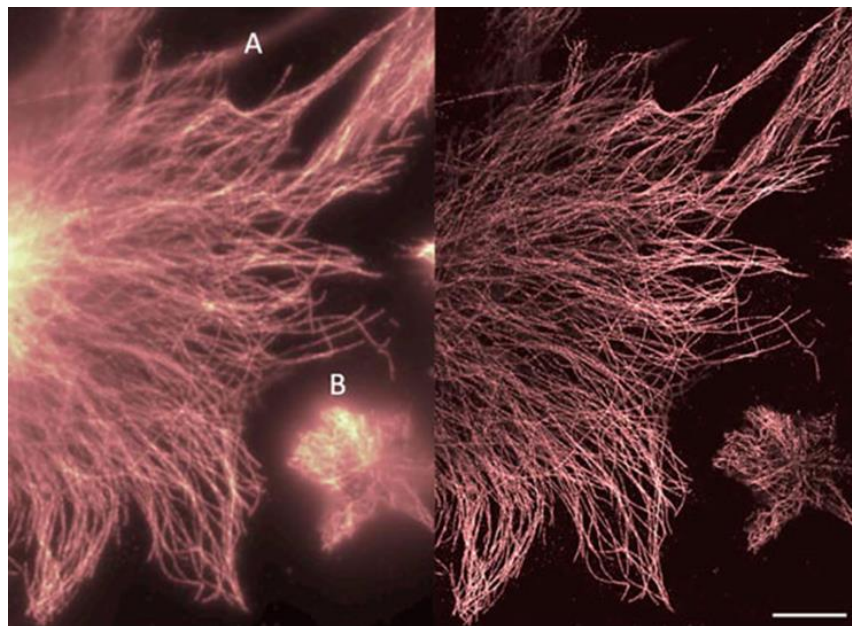
•SOFI (Super-resolution optical fluctuation imaging) η θεμελιώδης της αρχή βασίζεται στην εκμετάλλευση της συσχέτισης του φωτός που εκπέμπεται από τα φθοροφόρα σε συνάρτηση με τον χρόνο. Όταν η εκπομπή φωτός ενός φθοροφόρου παρουσιάζει διακύμανση στο χρόνο, το φως που εκπέμπεται από αυτό το φθοροφόρο θα συσχετιστεί στο χρόνο. Αυτό το φαινόμενο προκύπτει από οποιοδήποτε σημείο και αν το φθοροφόρο εκπέμψει προς τον ανιχνευτή, αδιάφορος το πόσο φως ανιχνεύθηκε ή αν τα γειτονικά φθοροφόρα εκπέμπαν ταυτόχρονα μ' αυτό.

Όλες αυτές οι συσχετίσεις φθορισμού μπορούν να υπολογιστούν μαθηματικά και να αποδοθούν με ακρίβεια στην εικόνα υπερ-ανάλυσης. Το κάθε φθοροφόρο αντιστοιχεί και σε ένα pixel (εικονοστοιχείο) της εικόνας, όση περισσότερη ισχύ και συσχετισμένο φως εκπέμπεται από αυτό, τόσο πιο φωτεινό θα είναι το pixel στην εικόνα που θα σχηματιστεί με την τεχνική SOFI. Παράλληλα, ο λοιπός θόρυβος που παρουσιάζεται, όπως ο φωτισμός του παρασκηνίου και το φως που δεν εκπέμπεται από την περιοχή ενδιαφέροντος εντοπίζεται και αφαιρείται από την τελική εικόνα υπερ-ανάλυσης που κατασκευάζει η SOFI. Αυτή η τεχνική μπορεί να προβάλλει το εσωτερικό του δείγματος (την τρίτη διάσταση ή άξονα z) με την λήψη μόλις λίγων εικόνων, καθιστώντας την μία πολύ γρήγορη τεχνική υπερ-ανάλυσης, με διακριτική ικανότητα έως και τα 80nm.

Στην τεχνική SOFI δημιουργείται μία σειρά από ένα στατικό δείγμα εικόνων. Οι πολλές στιγμιαίες αυτές λήψεις της βιντεοεικόνας του δείγματος εντοπίζουν το φως που εκπέμφθηκε από τα φθοροφόρα τα οποία είναι πολύ κοντά για να μελετηθούν και να τοποθετηθούν με ακρίβεια, καθώς τα PSF τους αλληλεπικαλύπτονται και με την μετέπειτα συσχέτιση των φθοροφόρων στον χρόνο κατασκευάζεται η τελική εικόνα υπερ-ανάλυσης της τεχνικής SOFI. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας της τεχνικής υπερ-ανάλυσης SOFI (Εικόνα 34) και μία λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης SOFI (δεξιά εικόνα) ινοβλάστεων συγκριτικά με την μικροσκοπία φθορισμού(αριστερή εικόνα) (Εικόνα 35).



Εικόνα 34. Αρχή λειτουργίας τεχνικής υπερ-ανάλυσης SOFI, Πηγή:
<https://www.photometrics.com/learn/super-resolution-microscopy/super-resolution-optical-fluctuation-imaging-sofi>



Εικόνα 35. Λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης SOFI ινοβλάστεων συγκριτικά με την μικροσκοπία φθορισμού, Πηγή: <https://www.photometrics.com/learn/super-resolution-microscopy/super-resolution-optical-fluctuation-imaging-sofi>

• Η μέθοδος PALM (Photoactivated Localization Microscopy), χρησιμοποιεί φθοριστικές πρωτεΐνες, αυτές μπορούν να προσκολληθούν με μεγάλη ευκολία σε άλλες πρωτεΐνες και επομένως να επιτρέψουν την απεικόνιση υπερ-ανάλυσης σε ουσιαστικά οποιασδήποτε πρωτεΐνης ενδιαφέροντος μέσα στο κύτταρο. Ενώ ταυτόχρονα, οι

φθορίζων πρωτεΐνες έχουν μεγάλο εύρος διαφορετικών αντιδράσεων που συμβαίνουν όταν έρχονται σε επαφή με το εκπεμπόμενο φως διέγερσης, αυτές είναι:

1) Φωτοενεργοποιούμενες φθοριστικές πρωτεΐνες (Photoactivatable-PA), που ενεργοποιούνται από χαμηλές φθορίζων καταστάσεις (OFF) σε υψηλές φθορίζων καταστάσεις (ON).

2) Φωτομετατρέψιμες φθοριστικές πρωτεΐνες (Photoconvertible - PC fluorophores), που όταν ενεργοποιηθούν αλλάζουν από το ένα φθορίζων χρώμα σε άλλο.

Όταν οι δέσμες λέιζερ ενεργοποιήσουν τις φθοριστικές πρωτεΐνες, αυτές εκπέμπουν φως για ένα σύντομο χρονικό διάστημα και έπειτα επανέρχονται στην πρόιμή τους κατάσταση. Οι δέσμες λέιζερ ενεργοποιούν όλες τις φθοριστικές πρωτεΐνες σταδιακά έως ότου να έχουν ενεργοποιηθεί όλες. Αυτές ενεργοποιούνται τυχαία και σε μικρό πλήθος το οποίο αποσκοπεί στο να ληφθεί μία πιο ακριβής εικόνα ως προς την θέση τους. Επομένως, μόρια που βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους και δεν θα μπορούσαν να μελετηθούν ως ξεχωριστά μόρια λόγω του ορίου της διάθλασης του φωτός, προσωρινά διαχωρίζονται.

Τα σήματα που λαμβάνονται από την κάθε φθοριστική πρωτεΐνη παραμένει να εκπέμπει σε φάσμα γύρω στα 300nm. Παρόλα αυτά επειδή η καθεμία έχει ενεργοποιηθεί ξεχωριστά, το κέντρο μάζας της μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια. Με την χαρτογράφηση όλων των μονοκυτταρικών θέσεων των μορίων που λήφθηκαν από τους επανειλημμένους κύκλους φωτοενεργοποίησης και την μετέπειτα επιστροφή τους στην πρόιμή τους κατάσταση παράγεται η τελική εικόνα υπερ-ανάλυσης.

Οι τεχνικές FPALM (fluorescence photoactivation localization microscopy), STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) και dSTORM (direct stochastic optical reconstruction microscopy) λειτουργούν παρόμοια, καθώς βασίζονται στις ίδιες αρχές, απλά χρησιμοποιούν διαφορετικά είδη φθοροφόρων. Η PALM και η FPALM αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας φωτοενεργοποιήσιμες φθορίζων πρωτεΐνες, ενώ η STORM και η dSTORM αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας συνθετικές καρβοκυανίνες μογιές, για την ταυτοποίηση των μικρών μορίων DNA. Παρόλο των μικρών διαφορών μεταξύ τους, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν πειράματα PALM με συνθετικές βαφές και πειράματα STORM με φθορίζων πρωτεΐνες.

Η διαφορά μεταξύ των μεθόδων PALM και της fPALM είναι ότι χρησιμοποιούν διαφορετικά μικροσκόπια, η PALM χρησιμοποιεί το μικροσκόπιο TIRF (total internal reflection fluorescence) και η fPALM το συνεστιακό μικροσκόπιο.

Ενώ η διαφορά μεταξύ των μεθόδων STORM και dSTORM είναι ότι, στην μέθοδο STORM χρησιμοποιούνται δύο φωτοενεργοποιήσιμες βαφές, όπου ο ρόλος της μίας είναι να ενεργοποιήσει τα φθοροφόρα όταν έρθει σε επαφή με τη δέσμη λέιζερ ενεργοποίησης (activator dye) και ο ρόλος της δεύτερης είναι να εκπέμψει το σήμα που θα διαβαστεί από τον ανιχνευτή για την χαρτογράφηση του μορίου (reporter dye), στη dSTORM δεν απαιτείται η χρήση της πρώτης βαφής (activator dye). Η διακριτική ικανότητα αυτών των τεχνικών κυμαίνεται έως και τα 10nm. Παρακάτω απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας των μεθόδων που βασίζονται στον μονομοριακού φθορισμό (Εικόνα 36), μία λήψη εικόνας σε ζωντανά βακτήρια με την τεχνική υπερ-ανάλυσης PALM (Εικόνα 37) και μία λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης dSTORM πάνω σε μυοϊνίδια κουνελιού (Εικόνα 38).

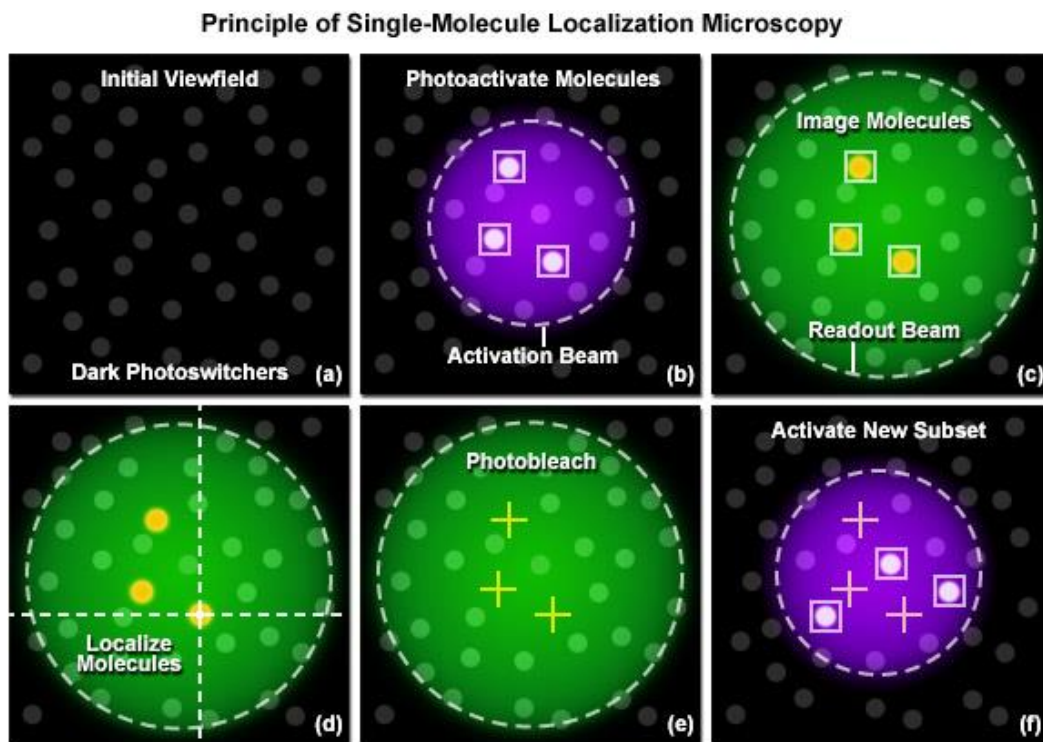
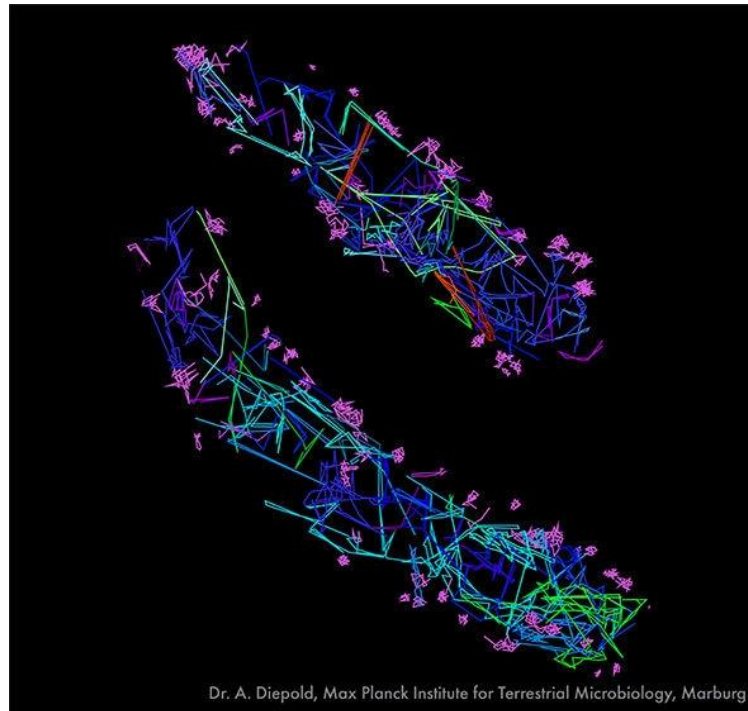


Figure 1

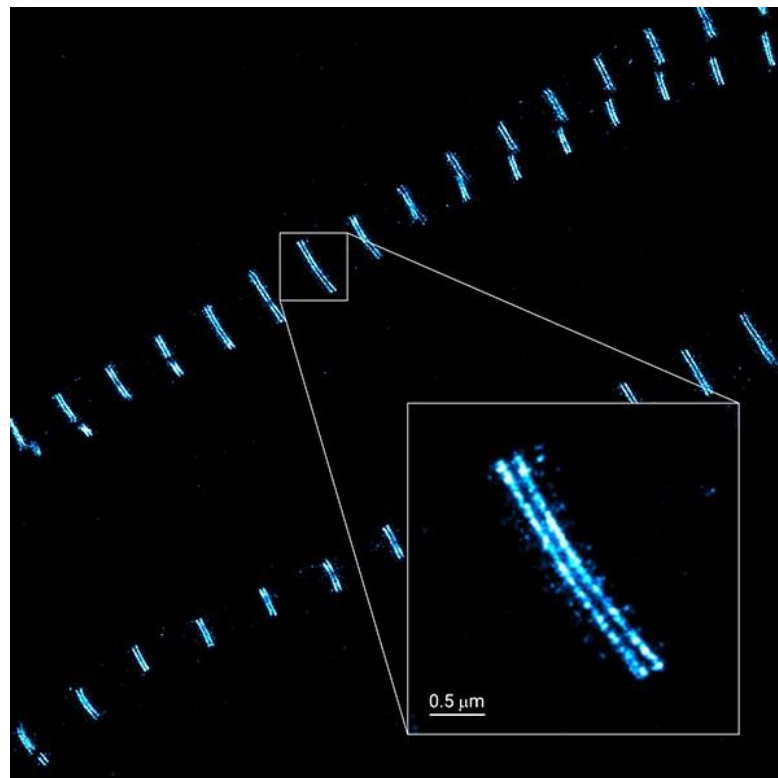
Εικόνα 36. Αρχή λειτουργίας τεχνικών υπερ-ανάλυσης SMLM, Πηγή:

<https://zeiss->

[campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/practicalaspects.html](https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/practicalaspects.html)

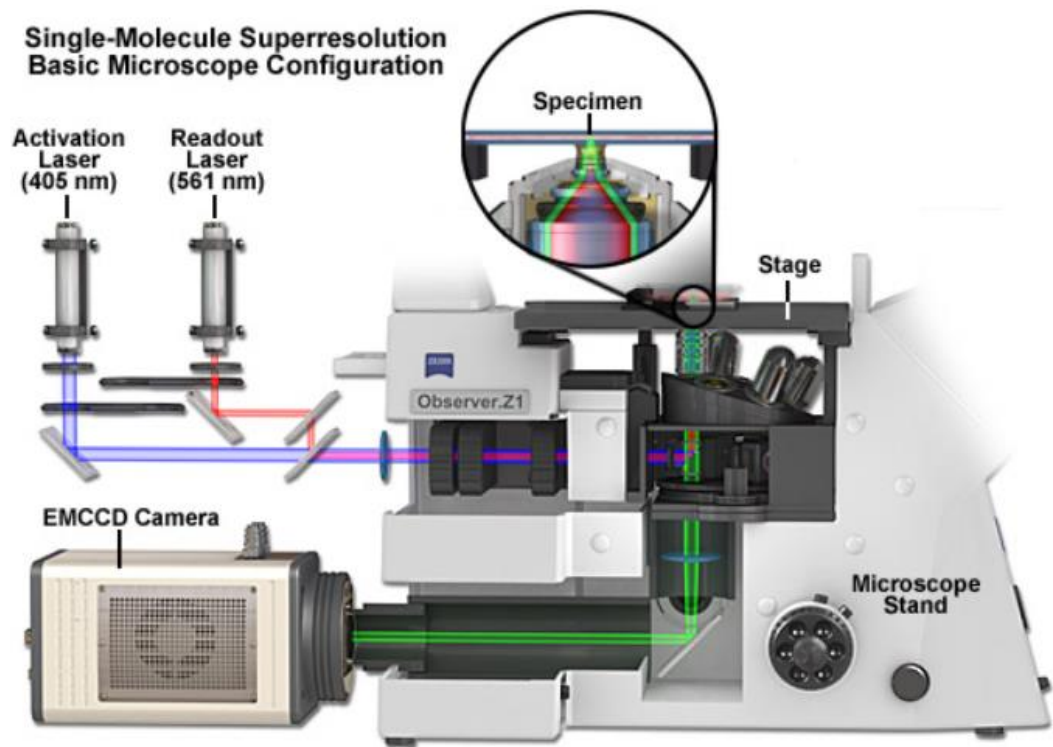


Εικόνα 37. Λήψη εικόνας σε ζωντανά βακτήρια με την τεχνική υπερ-ανάλυσης PALM, Πηγή: <https://oni.bio/palm-microscopy/>



Εικόνα 38. Λήψη εικόνας υπερ-ανάλυσης dSTORM πάνω σε μυοϊνίδια κουνελιού, Πηγή: <https://oni.bio/storm-microscopy/>

Όλες οι τεχνικές μικροσκοπίας SMLM (SOFI, PALM, FPALM, GSD, STORM, και dSTORM) χρησιμοποιούν μικροσκόπια που έχουν την ίδια κατασκευή όπως και παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 39). Όπως απεικονίζεται και στην εικόνα, τα μικροσκόπια αυτά έχουν δύο δέσμες laser, η πρώτη χρησιμοποιείται για να ενεργοποιήσει την φθοριστική ουσία και η δεύτερη για να εντοπίσει και να καταγράψει το εκάστοτε σημείο.



Εικόνα 39. Μικροσκόπια SMLM, Πηγή: <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html>

3.3 Εφαρμογές της μεθοδολογίας

Η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης ενισχύει τις ποσοτικές ικανότητες, την στατιστική ανάλυση και σημαντικότερα απ' όλα τις αναλυτικές ικανότητες της μικροσκοπίας στην μελέτη των δειγμάτων. Αυτό καθίσταται δυνατό με την εγγραφή μιας εικόνας ως βίντεο, επιτρέποντας τη σταδιακή ανάκτηση δεδομένων από την εικόνα. Ενώ παράλληλα, οι λοιπές χωρικές πληροφορίες μπορούν να αφαιρεθούν από μια εικόνα χρησιμοποιώντας τα δεδομένα υπερ-ανάλυσης για να παραχθεί μια εικόνα κάτω από το όριο περίθλασης. Η υψηλή ανάλυση και η μεγέθυνση της μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης επιτρέπουν την λήψη εικόνων εξαιρετικά μικρών δομών που με οποιοδήποτε άλλη μικροσκοπία, θα ήταν δύσκολο να αποτυπωθούν με λεπτομέρεια.

Οι μελέτες υπερ-ανάλυσης είναι κατάλληλες για μεγάλες μακρομοριακές δομές και ενζυμικά σύμπλοκα, συμπεριλαμβανομένων κεντροσωμάτων, κινετοχωρών, συμπλεγμάτων επιδιόρθωσης DNA, κυτταροσκελετών, υποκυτταρικών οργανιδίων και άλλων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η επισήμανση συνάψεων, δεδομένου ότι οι συναπτικές δομές είναι συχνά μικρότερες από το όριο περίθλασης του φωτός, με αποτέλεσμα μόνο η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης να μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ αυτών.

Χάρης την μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης τόσο η έρευνα για τον καρκίνο όσο και η θεραπεία του καρκίνου έχουν σημειώσει σημαντικές προόδους τις τελευταίες δεκαετίες. Οι τεχνικές υπερ-ανάλυσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποσαφήνιση των θεμελιωδών μηχανισμών πίσω από τη σηματοδότηση και την ανάπτυξη του καρκίνου καθώς και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων σε προκλινικά μοντέλα. Για παράδειγμα, η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης έχει χρησιμοποιηθεί για την εξέταση της κυτταρικής σειράς του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HuH7 χρησιμοποιώντας δείκτες ενδοπλασματικού δικτύου, που παράγουν πρωτεΐνες δέσμησης RNA. Παρόλα αυτά, ο καρκίνος είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη και ποικίλη ασθένεια, καθώς υπάρχουν πολλές ξεχωριστές μορφές όγκων, πολλές από τις οποίες είναι ελάχιστα κατανοητές. Με αποτέλεσμα, προκλινικές και κλινικές μελέτες να είναι απαραίτητες για την αξιολόγηση της πιθανής τοξικότητας, την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και την αποκάλυψη των εκτός στόχου συνεπειών για νέα φάρμακα (Hervieu, Christou, Battu, Mathonnet, 2021).

Επιπρόσθετα, η γονιδιωματική απεικόνιση είναι μια χρήσιμη τεχνική για τη μελέτη της βιολογίας του καρκίνου, καθώς οι δομικές διαφορές στο γονιδίωμα συνδέονται με την ετερογένεια του καρκίνου. Η γονιδιακή έκφραση διέπεται από την τρισδιάστατη (3D) δομή των χρωμοσωμάτων. Τα χρωμοσώματα αποτελούνται από DNA και πρωτεΐνες που μεταφέρουν γενετικό υλικό. Επειδή η λειτουργία των χρωμοσωμάτων εξαρτάται από την τρισδιάστατη δομή τους και επειδή η ασθένεια μπορεί να οδηγήσει σε δομικά ελαττώματα που αλλάζουν τον τρόπο έκφρασης των γονιδίων, η απεικόνιση των χρωμοσωμάτων είναι ζωτικής σημασίας (Beliveau, Boettiger, McCole, Joyce, & Erceg, 2015). Με την επισήμανση ενός χρωμοσώματος με ειδικά συντεθειμένα ολιγονουκλεοτίδια, η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης μπορεί να παρέχει μια τρισδιάστατη εικόνα του χρωμοσώματος.

Η χρήση της μεθόδου SIM έχει βοηθήσει σημαντικά στη διερεύνηση του σχηματισμού συνάψεων κατά την συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων. Η διαδικασία

συμπύκνωσης των χρωμοσωμάτων είναι ένα κρίσιμο βήμα για την εξασφάλιση του ακριβούς διαχωρισμού κατά τη διάρκεια των διεργασιών της μίτωσης και της μείωσης σε όλους τους οργανισμούς που υφίστανται κυτταρική διαίρεση. Η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης επέτρεψε την εξέταση της κατανομής και της οργάνωσης του DNA σε υπεράριθμα χρωμοσώματα κατά την διάρκεια της διαδικασίας όπου τα ινίδια της χρωματίνης αρχίζουν να περιελίσσονται και να συμπυκνώνονται, για να πάρουν τη χαρακτηριστική μορφή των χρωμοσωμάτων. Ο ακριβής διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης εξαρτάται από την ύπαρξη κεντρομερών/κινητοχωρών, που λειτουργούν ως θέσεις δέσμευσης για τις ίνες της ατράκτου. Τα τελομερή διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαφύλαξη των τερματικών περιοχών των χρωμοσωμάτων από πιθανή υποβάθμιση και σύντηξη. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο για τα έμβια όντα να διασφαλίζουν τη σταθερότητα του γονιδιώματός τους χρησιμοποιώντας και τους δύο μηχανισμούς. Η χρήση ανιχνευτών SIM επέτρεψε νέες αποκαλύψεις σχετικά με τη διάταξη των κεντρομερών κατά τη διάρκεια ολόκληρου του κυτταρικού κύκλου μέσω της ακριβούς αναγνώρισης και του συνεντοπισμού συστατικών κεντρομερών, όπως επαναλήψεις DNA ειδικών για το κεντρομερίδιο, πρωτεΐνες κινετοχόρης και τροποποιήσεις ιστόνης, εντός της κεντρομερής χρωματίνης.

Ακόμη, η κατανόηση της εσωτερικής λειτουργίας των κυττάρων και της πολυπλοκότητας της ανάπτυξης των ζώων και των φυτών είναι απαραίτητη για τη μοντελοποίηση ασθενειών και τη δημιουργία πόρων για μελλοντικές θεραπείες (Joseph, Bort, Grose, McCormick, & Simoncelli, 2021). Η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιολογικών εικόνων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη συγκεκριμένων βιομορίων ή και για την παρακολούθηση βιολογικών διεργασιών. Καθιστώντας την επομένως εξαιρετικά χρήσιμη σε κάθε επιστήμονα που θέλει να καταγράψει ζωντανή βιολογική κίνηση, κάτι που θα ήταν δύσκολο να γίνει με τα συμβατικά μικροσκόπια.

Επιπλέον, η τεχνική μικροσκοπίας SIM επιδεικνύει σημαντική προσαρμοστικότητα και έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη μελέτη φυτικών ζωντανών κυττάρων. Μία έρευνα που χρησιμοποιήθηκε ήταν για να εξακριβωθεί αν μπορεί να εντοπίσει τις μεμβράνες πρωτεϊνών στις ρίζες αραβιδόψης (*Arabidopsis*). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ήταν θετικά, καθώς η βελτιωμένη ανάλυση που επιτυγχάνεται μέσω της μικροσκοπίας δομημένου φωτισμού (SIM) είναι ξεκάθαρα ευδιάκριτη σε σύγκριση με τη συμβατική μικροσκοπία και οδηγεί σε επαυξημένο

περιεχόμενο πληροφοριών. Η χρήση συγκεκριμένων φθοροφόρων για το σκοπό της επισήμανσης των μορίων επέτρεψε τη διάκριση των μοτίβων κατανομής και εντοπισμού των ενζύμων RNA πολυμεράσης II (RNAPII) και των σχετικών παραγόντων εντός των πυρήνων του *Arabidopsis*. Επιπλέον, οι Schubert (2014) και Schubert και Weissbart (2015) χρησιμοποίησαν μεθοδολογίες SIM και PALM για να μετρήσουν τις σχετικές και απόλυτες ποσότητες των προαναφερθέντων μορίων σε στοιβές τρισδιάστατων εικόνων. Ακόμη, η τεχνική μικροσκοπίας SIM χρησιμοποιήθηκε και στην μελέτη των πυρήνων σε παρασκευάσματα ιστού κολοκύθας όπου και εκεί αποδόθηκαν σημαντικά υψηλές αναλύσεις.

Τέλος, η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης χρησιμοποιείται και σε άλλους τομείς πέρα από τη βιολογική έρευνα. Μερικοί από αυτούς τους τομείς είναι σε οφθαλμολογικό επίπεδο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη λήψη λεπτομερών φωτογραφιών του ανθρώπινου αμφιβληστροειδούς, στην έρευνα τροφίμων με σκοπό να εξεταστούν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους, σε καρδιαγγειακές έρευνες ή παθήσεις, αλλά ακόμη, και σε μελέτες που αναζητούν την επίλυση σύνθετων ζητημάτων σχετικά με νευρολογικές και ψυχικές ασθένειες στους ανθρώπους (Dong, 2022).

4. Συγκριτική αξιολόγηση

4.1 Έρευνα

Η κάθε τεχνική μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης έχει συγκεκριμένους τομείς που δουλεύει καλύτερα από τις υπόλοιπες. Επομένως, η σωστή επιλογή της τεχνικής που θα χρησιμοποιήσει ο ερευνητής είναι καίριας σημασίας. Αυτό το φαινόμενο λαμβάνει μέρος καθώς τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων, αλλά και οι τομείς που φέρει τα καλύτερα αποτελέσματα η κάθε τεχνική διαφέρουν. Κάποια δείγματα προς εξέταση μπορεί να είναι λεπτά εφαρμόζοντας έτσι καλύτερα πάνω στην περιοχή εξέτασης του δείγματος ή μπορεί να είναι παχύτερα με αποτέλεσμα να μην εφαρμόζουν καλά. Άλλα δείγματα μπορεί να είναι πιο ευαίσθητα και να πρέπει να μελετηθούν με περισσότερη προσοχή και συγκεκριμένα επίπεδα φθορισμού ώστε να αποδώσουν εύστοχες λεπτομέρειες στην μελέτη τους. Ενώ, υπάρχει και η διαφοροποίηση μεταξύ των ζωντανών και άβιων δειγμάτων προς μελέτη, που εκεί προστίθεται και ο παράγοντας της κίνησης του δείγματος που πρέπει να ληφθεί υπόψιν.

Ξεκινώντας με την τεχνική 4Pi, τα γενικά της πλεονεκτήματα είναι ότι με την υψηλή ευαισθησία που παρέχει η τεχνική αυτή στη μελέτη του δείγματος δεν το καταπονεί, ταυτόχρονα διακατέχει έναν υψηλό δείκτη επιλεκτικότητας καθιστώντας την εξαιρετικά ακριβής στην χαρτογράφηση των μορίων του δείγματος. Μπορεί ακόμη, να εφαρμοστεί και σε αρκετά μικρή ποσότητα δείγματος και πάνω από όλα είναι πολύ εύκολη στην εφαρμογή της για τον χρήστη. Ταυτόχρονα, η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί φωτοενεργοποιήσιμες πρωτεΐνες που από μόνες τους προσφέρουν πολλαπλά σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τα συνθετικά φθοροφόρα, ειδικά στην απεικόνιση ζωντανών κυττάρων. Αυτές, τοποθετούνται πιο απαλά από ότι τα φθοροφόρα στο δείγμα καθώς απλώς απαιτείται ήπια τοποθέτηση για την προσκόλληση τους, ενώ τα κύτταρα επανέρχονται αμέσως σε φυσιολογική κατάσταση, καθιστώντας την τεχνική 4Pi ιδανική για απεικόνιση βιολογικών δειγμάτων. Με την υψηλή ανάλυση, αλλά και την τρισδιάστατη απεικόνιση η τεχνική 4Pi επιτρέπει στους βιολόγους να παρατηρήσουν τα βιολογικά δείγματα με περισσότερες λεπτομέρειες στις τρεις διαστάσεις. Ενώ τα αρνητικά της τεχνικής αυτής είναι ότι έχει περιορισμένο εύρος εφαρμογής και μεγάλη ευαισθησία σε εξωτερικές παρεμβολές.

Όσον αναφορά την τεχνική SIM, τα πλεονεκτήματα της είναι ότι είναι συμβατή με όλα τα συμβατικά φθοροφόρα προδίδοντας ένα μεγάλο εύρος επιλογών στον χρήστη για το μαρκάρισμα των μορίων, κάνει γρήγορες λήψεις σε μεγάλο εύρος οπτικού πεδίου εντοπίζοντας έτσι και τις παραμικρές διαφοροποιήσεις που λαμβάνουν μέρος, ακόμη και αν είναι πολύ σύντομες κατά την παρατήρηση του δείγματος. Ταυτόχρονα μπορεί να αποδώσει πολύ υψηλή ευαισθησία και αντίθεση με την χρήση κατάλληλου εξοπλισμού και μπορεί να απεικονίσει τρισδιάστατα ακόμα και σε πολύ λεπτά δείγματα. Όλα αυτά την καθιστούν ιδανική για χρήση στην παρακολούθηση ζωντανών κυττάρων. Ενώ, τα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι ότι υστερεί συγκριτικά με τις άλλες τεχνικές υπερ-ανάλυσης στην βελτίωση της ανάλυσης που αποδίδει στην τελική εικόνα. Ακόμη, απαιτεί μία απαραίτητη χρονική διεργασία (1-30 δευτερόλεπτα) για να παράγει την εικόνα υπερ-ανάλυσης. Επιπρόσθετα, δεν είναι κατάλληλη για χρήση σε παχιά δείγματα, μόνο με την χρήση κατάλληλων αλγορίθμων, κάτι που την καθιστά πιο δύσχρηστη από ότι θα ήταν αν εξετάζαμε το δείγμα με άλλη τεχνική. Τέλος, απαιτεί από τον χρήστη ειδικευμένες γνώσεις καθώς πρέπει να γίνουν κατάλληλες ρυθμίσεις όπως στον τρόπο τοποθέτησης, στην βαθμονόμηση του συστήματος και στον διαθλαστικό δείκτη του φωτός. Που αν παρουσιαστεί κάποιο

σφάλμα σε κάποιο από αυτά μπορεί να διακινδυνεύει το τελικό αποτέλεσμα που θα λάβει ο χρήστης.

Η τεχνική STED βασίζεται στην συνεστιακή μικροσκοπία, επομένως παρά το γεγονός ότι μπορεί να είναι πιο κοστοφόρα και έμμεση, την καθιστά πιο εύκολη στην χρήση από τους χρήστες. Παράλληλα, έχει γρήγορο χρόνο λήψης εικόνων και λόγω της συνεστιακής της φύσης έχει πολύ υψηλή διεισδυτικότητα, επομένως είναι καλή στην απεικόνιση παχύτερων δειγμάτων. Η τεχνική STED ακόμη, δημιουργεί απευθείας την εικόνα υπερ-ανάλυσης, χωρίς να χρειάζεται κάποια ψηφιακή επεξεργασία της εικόνας πριν την τελική της λήψη. Παράλληλα, μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες τεχνικές υπερ-ανάλυσης ενισχύοντας περισσότερο την ανάλυση που μπορεί να αποδώσει. Αυτό την καθιστά ιδανική για την απεικόνιση στο εσωτερικό του ζωντανού εγκεφαλικού ιστού, τόσο σε τομές ή σε *in vivo* παρατήρηση, ενώ λόγω της μεγάλης μεγέθυνσης που προσφέρει, επιτρέπει την ανάλυση των νευρικών μορφολογιών αλλά και των συναπτικών δομών. Τα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι ότι τα φθοροφόρα υποβάλλονται σε ένα μεγάλο αριθμό υποχρεωτικών on/off καταστάσεων χωρίς να συμβάλλουν περαιτέρω στην βελτίωση της τελικής εικόνας. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη φωτολεύκανση που θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν στα τελικά αποτελέσματα του πειράματος. Ακόμη, παρόλο που η τεχνική STED μπορεί να εφαρμοστεί με σχεδόν όλα τα φθοροφόρα, απαιτεί την χρήση υψηλών εντάσεων φωτός κατά την διαδικασία της παρατήρησης, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε καταπόνηση της εικόνας επηρεάζοντας την ανάλυση της ή ακόμα και στην καταστροφή του δείγματος. Ενώ, τα υψηλότερα επίπεδα φωτός περιορίζουν τα δείγματα που μπορούν να εξεταστούν με την τεχνική, κάτι το οποίο καθιστά την STED να μην είναι τόσο αξιόπιστη για εφαρμογή σε ζωντανά κύτταρα.

Η τεχνική GSD επιτρέπει την χρήση ενός μεγάλου εύρους φθοροφόρων λόγω του ότι η σκοτεινή κατάσταση (ή triplet) είναι έμφυτη σε σχεδόν κάθε φθοροφόρο. Χρησιμοποιεί λιγότερο υψηλή ένταση φωτός από ότι η τεχνική STED κατά την διάρκεια της παρατήρησης, κάτι που γίνεται εφικτό, λόγω του σχετικά μεγάλου χρονικού διαστήματος που διαρκούν οι σκοτεινές καταστάσεις των μορίων σε σύγκριση με την διάρκεια χρόνου του φθορισμού. Ενώ ακόμη, η χρήση της χαμηλότερης έντασης φωτός επιτρέπει την λήψη καλύτερων αποτελεσμάτων, καθώς μειώνει την πίεση που δέχεται το δείγμα κατά την διάρκεια της παρατήρησής του, γεγονός που επιτρέπει και την χρήση απλούστερου εξοπλισμού στην τεχνική αυτή. Ένα από τα μειονεκτήματα της GSD τεχνικής, είναι ότι αφού μόνο ένα υποσύνολο

φθοροφόρων εκπέμπει φωτόνια κάθε φορά, πρέπει να συλλεχθούν χιλιάδες εικόνες μέσα στο χρονικό διάστημα μερικών λεπτών με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μία ολοκληρωμένη εικόνα υπερ-ανάλυσης. Αυτός ο μακρύς χρόνος απόκτησης της εικόνας σε συνδυασμό με την ανάγκη χρήσης σχετικά υψηλής έντασης φωτός, σημαίνει ότι η τεχνική αυτή είναι καλύτερη στο να εφαρμόζεται σε άβια δείγματα από ότι σε έμβια. Ακόμη, λόγω του γεγονότος ότι ποτέ δεν εκμηδενίζεται εντελώς ο φθορισμός που προέρχεται από τα φθοροφόρα που εκπέμπουν σταδιακά κατά την διάρκεια της παρατήρησης του δείγματος, πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν το φαινόμενο της φωτολεύκανσης στην τελική εικόνα.

Η τεχνική υπερ-ανάλυσης SOFI προσφέρει ευέλικτο, γρήγορο, και χαμηλού κόστους υπολογιστική απεικόνιση των δειγμάτων με την χρήση φθοροφόρων, καθώς έχει σχετικά λιγότερο απαιτητικές εξοπλιστικές ανάγκες. Η ανάλυση που θα απεικονιστεί κατά την παρατήρηση του δείγματος μπορεί να ρυθμιστεί από τον χρήστη, αυξομειώνοντας έτσι και τον χρόνο διάρκειας της παρατήρησης. Παράλληλα, με την επιπρόσθετη χρήση υπολογιστικών τεχνικών ή/και τον συνδυασμό με άλλες τεχνικές υπερ-ανάλυσης μπορεί περαιτέρω να βελτιώσει το αποτέλεσμα της τελικής απεικόνισης της εικόνας. Ακόμη, χρησιμοποιεί χαμηλά επίπεδα έκθεσης φωτός κατά την διάρκεια της παρατήρησης και ταυτόχρονα ο λοιπός θόρυβος που παρουσιάζεται, όπως ο φωτισμός του παρασκήνιου και το φως που δεν εκπέμπεται από την περιοχή ενδιαφέροντος εντοπίζεται και αφαιρείται. Αλλά, η τεχνική SOFI παρουσιάζει δυσκολίες στην απεικόνιση δειγμάτων που κινούνται, κάτι που αν δεν διορθωθεί πριν την ανάλυση της τεχνικής, μπορεί να οδηγήσει σε θολή εικόνα, ή ακόμα και σε σφάλματα, αυτό καθιστά την τεχνική καλύτερη για εφαρμογή σε άβια δείγματα. Ενώ, κάποια από τα σύνηθες σφάλματα που παρουσιάζει η τεχνική, είναι ότι με την αύξηση της ανάλυσης μπορεί να μεγαλώσει και η δυναμική διαφορά ανάμεσα στις φωτεινότερες και σκοτεινότερες περιοχές της εικόνας. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε πολύ μεγάλες διαφορές στα επίπεδα των τόνων του γκρι κατ' επέκταση του δείγματος, το οποίο σημαίνει ότι διαφορετικές περιοχές και δομές μπορεί να είναι δύσκολο να διακριθούν με τις ίδιες ρυθμίσεις μεγέθους κατά την παρατήρηση. Τέλος, η SOFI βασίζεται στο ότι η μοναδική πηγή συσχέτισης στην εικόνα θα είναι το συσχετισμένο φως που προέρχεται από τα φθοροφόρα. Όμως, είναι πιθανόν να υπάρχουν και άλλες πηγές που να συμπεριλαμβάνονται στο συνολικό συσχετισμένο σήμα, όπως ένα αναβόσβησμα 50Hz από κάποια πηγή φωτός που μπορεί να υπάρχει στο χώρο(π.χ

φώτα), το οποίο να διαβάζεται από τον πειραματικό εξοπλισμό και να επηρεάζει αρνητικά το αποτέλεσμα της τελικής εικόνας.

Η τεχνική PALM χαρακτηρίζεται από την προσαρμοστικότητα και την ακρίβεια που προσδίδει κατά την χρήση της στην παρατήρηση των δειγμάτων. Σε αυτή την τεχνική περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη τα χαρακτηριστικά των φθοροφόρων έχουν ύψιστη σημασία. Αυτό συμβαίνει καθώς η τεχνική PALM χρησιμοποιεί κατά κύριο λόγο φθοριστικές πρωτεΐνες. Οι οποίες βάση της φασματικής αλλαγής που προκαλείται κατά την ενεργοποίηση τους μπορούμε να διακρίνουμε φθορίζων πρωτεΐνες που έχουν on-off καταστάσεις, πρωτεΐνες που είναι μη αναστρέψιμες όταν εισέρθουν σε κατάσταση φθορισμού και πρωτεΐνες που ενεργοποιηθούν αλλάζουν από το ένα φθορίζων χρώμα σε άλλο. Αυτές έχουν την ιδιαιτερότητα ότι μπορούν να επισυνάψουν στις πρωτεΐνες του δείγματος προς μελέτη με ιδιαίτερη ευκολία και ακρίβεια επιτρέποντας ουσιαστικά την απεικόνιση υπερ-ανάλυσης οποιασδήποτε πρωτεΐνης ενδιαφέροντος στα κύτταρα ή μικροοργανισμό που εξετάζεται. Επομένως, η τεχνική PALM είναι η πιο αποτελεσματική τεχνική υπερ-ανάλυσης για να απεικονίσει 'δύσκολους' στόχους, όταν δηλαδή είναι δύσκολο να διακριθούν τα κοντινά μόρια στο δείγμα με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η επισύναψη συνηθισμένων φθοροφόρων ή ο στόχος που θέλουμε να επισυνάψουμε, επειδή βρίσκεται σε ένα συνωστισμένο ενδοκυτταρικό τμήμα, ή περικυκλωμένο από έναν δύσκολα για να διεισδύσει περίβλημα. Όλα αυτά καθιστούν την τεχνική PALM ιδανική για απεικόνιση υπερ-ανάλυσης σε ζωντανά κύτταρα. Συγκεκριμένα, όταν συνδυάζονται με αλγόριθμους εντοπισμού, η τεχνική PALM επιτρέπει τον μεμονωμένο εντοπισμό μορίων σε ζωντανά κύτταρα και οργανισμούς, με νανομετρική χωρική διακριτικότητα και με msec χρονική ευκρίνεια. Η υψηλή ακρίβεια επισύναψης και η χαμηλή υπερμέτρηση (τα περισσότερα μη αναστρέψιμα φθοροφόρα PALM ενεργοποιούνται μόνο μία φορά) αυτό καθιστά την τεχνική ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για ποσοτικά πειράματα και για ακριβής μετρήσεις μονο-μοριακών μετρήσεων. Όσον αφορά τα μειονεκτήματα της τεχνικής, η PALM έχει συγκριτικά μικρότερη ανάλυση από τις άλλες τεχνικές, καθώς οι φθοριστικές πρωτεΐνες γενικά εκπέμπουν λιγότερο φωτεινά από τα οργανικά φθοροφόρα. Αυτή η μικρότερη εκπομπή φωτός συνεπάγει σε μικρότερη ακρίβεια της τοπικοποίησης και επομένως μικρότερη επιτεύξιμη ανάλυση. Ενώ, η τεχνική αντιμετωπίζει και παραπάνω δυσκολίες στην απόδοση πολυχρωμίας στην τελική εικόνα λόγω της μεγάλης και αλληλοκαλυπτόμενης εκπομπής φάσματος

των φθοριστικών πρωτεϊνών, και την ταυτόχρονη συν-ενεργοποίηση του υπεριώδους φωτός ακτινοβολίας.

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής STORM είναι ότι έχει οικονομικά αποδοτικό κόστος και είναι σχετικά εύκολη για να χρησιμοποιηθεί ακόμη και από χρήστες που απλώς κατέχουν τις βασικές γνώσεις πάνω στην οπτική μικροσκοπία. Στην τεχνική αυτή δεν χαραμίζονται κύκλοι φθορισμού με αποτέλεσμα τα μόρια του δείγματος να μην υπόκεινται σε ταλαιπωρία κατά την διάρκεια της παρατήρησης, και παράλληλα έχει την καλύτερη χωρική ευκρίνεια από όλες τις τεχνικές υπερ-ανάλυσης. Επιπρόσθετα, κατά την εξέταση του δείγματος χρησιμοποιεί σχετικά χαμηλά επίπεδα φωτός. Όλα αυτά, καθιστούν την τεχνική STORM ιδανική για χρήση σε *in vivo* εφαρμογές όπου χαμηλή προσωρινή ανάλυση είναι αποδεκτή και σε πολλές περιστάσεις και πιο ταιριαστή. Ενώ, τα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι ότι μπορεί να αποδώσει την βέλτιστη ανάλυση μόνο στην επιφάνεια του γυαλιού εξέτασης άρα σε επίπεδα δείγματα και σε δείγματα που δεν κινούνται. Ενώ, είναι και αρκετά χρονοβόρα τεχνική καθώς έχει σχετικά μεγάλο χρόνο απεικόνισης της τελικής εικόνας (μεταβάλλεται αναλόγως την ανάλυση που απαιτείται στην κάθε παρατήρηση) και απαιτεί πολύ χρόνο μετά την ολική λήψη της τελικής εικόνας ώστε να την επεξεργαστεί και να ανακατασκευάσει την τελική εικόνα.

4.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης

4.2.1 Πλεονεκτήματα μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης

Οι γνώσεις που έχουμε αποκτήσει στο τομέα της βιολογίας βασίζονται κατά κύριο λόγο στις παρατηρήσεις που έχουν διεξαχθεί από οπτικές παρατηρήσεις των βιολογικών διεργασιών και των δομών τους με την χρήση των μικροσκοπίων. Έως ότου, η συμβατική μικροσκοπία δεν μπορούσε πλέον να συμβάλει στην απεικόνιση των ενδοκυτταρικών δομών λόγω του οπτικού ορίου που μπορούσε να φτάσει η ανάλυση της. Με αποτέλεσμα, οι ανακαλύψεις να έχουν περαιτέρω περιοριστεί λόγω των περιορισμών των ίδιων των απεικονιστικών συστημάτων. Αυτό το φαινόμενο, ορίστηκε αρχικά από τον Ernst Abbe το 1873, ως το διαθλαστικό όριο. Αυτό θεμελίωσε ότι το μέγιστο όριο ανάλυσης του οπτικού συστήματος είναι περίπου 200nm στους άξονες X-Y και 500-700nm στον άξονα Z. Συνεπάγοντας ότι, πολλές ενδοκυτταρικές δομές και δυναμικές ενέργειες που λάμβαναν μέρος δεν ήταν αρκετά μεγάλες για να

παρατηρηθούν με την απαιτούμενη λεπτομέρεια με την χρήση των περισσότερων οπτικών μικροσκοπίων.

Για να ξεπεραστεί αυτό το όριο, οι επιστήμονες επιστράτευαν διάφορες μικροσκοπικές τεχνικές υπερ-ανάλυσης, με στόχο να απεικονίσουν τις διεργασίες των ζωντανών κυττάρων που συνέβαιναν κάτω από το θεωρητικό όριο του Abbe. Σύντομα, οι τεχνικές αυτές κυριάρχησαν στις μελέτες των βιολογικών φαινομένων των ζωντανών κυττάρων. Αυτό συνέβη καθώς, με την χρήση της μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης οι βιολόγοι μπορούσαν να διερευνήσουν δομές πέραν του ορίου διάθλασης του φωτός. Ενώ παράλληλα, τους επέτρεπε την μελέτη ζωντανών δειγμάτων σε πραγματικό χρόνο, που απαιτούν την ακριβής επισήμανση των μορίων τους, κάτι που είναι δυνατόν μόνο με την χρήση του φαινομένου του φθορισμού. Με την εισαγωγή των τεχνικών της μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης στις έρευνες, δόθηκαν πολλαπλές επιλογές στους ερευνητές που χρειαζόνταν να απεικονίσουν δείγματα σε ανάλυση κάτω των 200nm. Και χάρις της ικανότητάς τους να επιτρέπουν την παρατήρηση λεπτομερειών σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο, πλέον οι ερευνητές μπορούν να δουν πληροφορίες που προηγουμένως ήταν εντελώς αθέατες.

4.2.2 Μειονεκτήματα μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης

Παρόλα αυτά, ακόμα και με την εισαγωγή της μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης δεν έχουν αντιμετωπιστεί όλες οι προκλήσεις, καθώς αυτές τείνουν να αυξάνονται όσο οι απαιτήσεις για ακόμα πιο βελτιωμένη ανάλυση αυξάνονται. Αυτό συμβαίνει καθώς, όσο τα απεικονιστικά συστήματα προσπαθούν να απεικονίσουν μικρότερη και μικρότερη λεπτομέρεια, το πλήθος των διαθέσιμων φθοροφόρων που μπορεί να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις αυτές μειώνεται, αναγκάζοντας την συνεχή ανάπτυξη νέων φθοροφόρων με υψηλότερες αποδόσεις. Όμως με την αύξηση της ανάλυσης στην οπτική παρατήρηση εισάγονται και νέοι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν, αυτοί είναι οι αυξημένες δονήσεις και πιο μεγάλου μεγέθους που θα παρατηρούνται κατά την απεικόνιση λόγω της μεγαλύτερης ανάλυσης και ότι κάποια ζωντανά δείγματα παρατήρησης είναι πιο επιρρεπείς όταν υπόκεινται σε απεικόνιση υπερ-ανάλυσης λόγω της υψηλής έντασης του φωτός της διέγερσης ή τους μεγάλους χρόνους έκθεσης κατά την παρατήρηση. Όλα αυτά μπορούν να συντελέσουν στην δημιουργία αναξιόπιστων αποτελεσμάτων υποσκιάζοντας τα πλεονεκτήματα της αυξημένης ανάλυσης.

Μία άλλη σημαντική παρατήρηση που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι τα αποτελέσματα μεταξύ διαφορετικών τεχνικών υπερ-ανάλυσης στην παρατήρηση του ίδιου δείγματος με την ίδια κλίμακα ανάλυσης, μπορεί να διαφέρουν σημαντικά τόσο στην ανάλυση που θα αποδίδουν όσο και στην εμφάνιση της τελικής εικόνας, παρουσιάζοντας διάφορες ατέλειες ή σφάλματα. Επιπρόσθετα, υπάρχει μία έλλειψη ευελιξίας μεταξύ των περισσοτέρων τεχνικών υπερ-ανάλυσης ως προς τον εξοπλισμό τους, καθώς πολλές από αυτές βασίζονται σε συγκεκριμένα εξοπλιστικά συστήματα και στη χρήση συγκεκριμένων φθοροφόρων ή φθορίζων πρωτεϊνών, που χωρίς αυτά δεν μπορούν να είναι αξιόπιστες. Ακόμη, τα συστήματα υπερ-ανάλυσης είναι κοστοφόρα, αφού ένα πλήρως εξοπλισμένο σύστημα υπερ-ανάλυσης ξεκινάει σε τουλάχιστον την διπλή τιμή απ' ότι θα είχε ένα σύστημα συνεστιακής απεικόνισης και μπορεί να φτάσει μέχρι και την τετραπλάσια τιμή.

5. Συμπεράσματα

Η συμβατική μικροσκοπία κατά την οπτική παρατήρηση, έθετε κάποιους περιορισμούς στους ερευνητές, καθιστώντας τους μη ικανούς να παρατηρήσουν λεπτομέρειες που βρίσκονταν κάτω από το όριο της διάθλασης του φωτός. Αυτό το εμπόδιο ξεπεράστηκε με την εισαγωγή της μικροσκοπίας της υπερ-ανάλυσης, που ξεπέρασε τα θεμελιώδη όρια της οπτικής ανάλυσης και ικανοποίησε κάποιες από τις επιπρόσθετες ανάγκες των ερευνητών. Αυτές ήταν η βελτίωση της ανάλυσης στις χωρικές διαστάσεις, η παροχή της δυνατότητας για ογκομετρική απεικόνιση, η αύξηση της προσωρινής ανάλυσης και μείωση της επιβάρυνσης του δείγματος με συνεχόμενη καταπόνηση φωτισμού, επιτρέποντας έτσι την απεικόνιση υπερ-ανάλυσης σε ζωντανά κύτταρα, και τέλος, την αύξηση του βάθους και της διείδυσης, παρέχοντας καλύτερη τρισδιάστατη απεικόνιση. Συντελώντας έτσι, στο να γίνει ένα πολύ εύχρηστο και σημαντικό εργαλείο της σύγχρονης επιστημονικής έρευνας, ιδιαίτερα στους τομείς της βιολογίας και της υγείας.

Με αυτές τις νέες δυνατότητες που προσδίδει η μικροσκοπία υπερ-ανάλυσης και λόγω της αυξημένης ζήτησης της από τον επιστημονικό κλάδο, και ιδιαίτερα από τον τομέα της κυτταρικής βιολογίας, η εμπορευματοποίηση των μικροσκοπίων της συνεχώς αυξάνεται. Επομένως, η περαιτέρω ανάπτυξη των τεχνικών της είναι υψίστης σημασίας και αναμένεται να συνεχιστεί. Σε αυτή την ανάπτυξη είναι πιθανόν να συντελέσουν και οι εξελίξεις των λογισμικών ενισχυμένων με τεχνητή νοημοσύνη,

ειδικά εκείνων που χρησιμοποιούν μηχανική μάθηση, που πιθανότατα θα συμβαδίσει με τις εξελίξεις στα απεικονιστικά συστήματα και στα φθοροφόρα. Τα λογισμικά αυτά πιθανότατα θα στοχεύουν στη βελτιστοποίηση των τελικών αποτελεσμάτων που θα αποδίδει η εκάστοτε τεχνική μικροσκοπίας υπερ-ανάλυσης και θα αναλύει τα δεδομένα που θα έχουν παρατηρηθεί.

Ωστόσο όμως, υπάρχουν και προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν. Συνήθως, η ποιότητα μιας εικόνας είναι αντιστρόφως ανάλογη με την ταχύτητα με την οποία μπορεί να ληφθεί. Σε κάποιες παρατηρήσεις δειγμάτων τα μόρια των ζωντανών κυττάρων μετακινούνται πιο γρήγορα, με ρυθμό που υπερβαίνει την ικανότητα των μικροσκοπίων υπερ-ανάλυσης να συλλάβουν εικόνες, εντάσσοντας έτσι το ενδεχόμενο για σφάλματα ή ατέλειες στην τελική απεικόνιση. Παράλληλα, με την εξέλιξη των τεχνικών υπερ-ανάλυσης θα δημιουργηθούν και νέες προκλήσεις, απαιτώντας την δημιουργία επιπλέον φθοροφόρων, καθώς τα ήδη διαθέσιμα πιθανότατα δεν θα μπορούν να ανταπεξέλθουν σε αυτές, περιορίζοντας έτσι τις προοπτικές τους. Ακόμη, οι τεχνικές υπερ-αναλύσεις απαιτούν τον εντοπισμό εκατομμυρίων μορίων προκειμένου να επιτευχθεί η απαραίτητη χωρική ανάλυση για την τελική εικόνα. Καθένας από αυτούς τους παράγοντες λοιπόν, υποδηλώνει και μια λύση που θα πρέπει να βρεθεί, αλλά και να αξιολογηθεί για το εάν θα είναι όντως λειτουργική και αξιόπιστη σε κάθε πείραμα.

Η μικροσκοπία είναι ένας επιστημονικός κλάδος που περιλαμβάνει τη συνεργασία διαφόρων τομέων. Το κίνητρο της διεύρυνσης και βελτίωσης της μικροσκοπίας μπορεί να πηγάζει από την επιθυμία για καινοτομία, την επίτευξη βέλτιστης ανάλυσης, την απόκτηση νέων γνώσεων στις φυσικές και υλικές επιστήμες, την προβολή νέων φυσικών φαινομένων ή απλώς την εκτίμηση της τεχνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ ανθρώπων και μηχανών. Το όριο οπτικής ανάλυσης του Ernst Abbe όπως και αποδεικνύεται από τις τεχνικές υπερ-ανάλυσης, μπορεί να ξεπεραστεί μέσω της χρήσης προηγμένης τεχνολογίας μικροσκοπίας, της χρήσης φθοροφόρων και των υπολογιστικών λογισμικών. Το πρωταρχικό μέλημα για την πρόοδο της έγκειται στην αύξηση της αξιοπιστίας και της χρησιμότητας αυτών των τεχνικών και όχι στην τόσο στην περαιτέρω βελτίωση της ανάλυσης. Με την αύξηση της αξιοπιστίας και την διόρθωση των σφαλμάτων που προκύπτουν, θα διευκολυνθεί η επίτευξη βέλτιστης ανάλυσης, ακόμη και σε δείγματα που ήταν δύσκολο να ληφθούν αλάνθαστα αποτελέσματα, όπως πολυπληθή κύτταρα και ιστούς.

Η υπερ-ανάλυση έχει ακόμα μέλλον για να φτάσει την δικαιωματική της θέση σαν πρωταρχικό εργαλείο για προηγμένη απεικόνιση. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι απλώς η επίτευξη εντοπισμού μορίων και η χαρτογράφησή τους με υψηλή ακρίβεια, δεν εγγυάται από μόνη της μία αποτελεσματική απεικόνιση. Επομένως, η χρήση συνεχής εφαρμογής και καλά καθορισμένων πρωτόκολλων, είναι ένας τρόπος για την επιβεβαίωση του ότι τα καταγεγραμμένα δεδομένα είναι ορθά. Επιπρόσθετα, σημαντικό ρόλο, διακατέχει και η σωστή επιλογή της τεχνικής ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς καθεμία από αυτές έχει τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της.

Συμπερασματικά, ο καλύτερος τρόπος προσέγγισης της απεικόνισης με υπερ-ανάλυση είναι ξεκινώντας με τις συγκεκριμένες ανάγκες της έρευνας και λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις προσεγγίσεις που μπορούν να ληφθούν. Ο ερευνητής θα πρέπει να διαλέξει την τεχνική που προσδίδει την πλήρως απαραίτητη φθορίζουσα εκπομπή που χρειάζεται για να αντληθούν τα απαραίτητα στοιχεία που απαιτούνται στην μελέτη του εκάστοτε δείγματος. Τέλος, αποτελεί επιτακτική ανάγκη να εκπαιδύσουμε τους σημερινούς και μελλοντικούς χρήστες των τεχνικών υπερ-ανάλυσης με σκοπό την βελτίωση της κατανόησης των περιορισμών και των ιδιαιτεροτήτων τους.

6. Αναφορές – Πηγές

1. Goulielmakis, W. (2004). Direct Measurement of Light Waves. *Science*, 1267-1269.
2. Krumm, H., & Scourfield, M. (2000). The light in Maxwell's wave equation. *European Journal of Physics*, 189.
3. Radi, H., & Rasmussen, J. (2013). Light Waves and Optics. *Principles of Physics*, 561-601.
4. Gordon, L. (2017). Optic Nerve. *Handb Exp Pharmacol*, 369-386.
5. Midgley, P. (2009). The principles of microscopy. *Materials Today*, 57.
6. Sako, Y. (2015). Optical Microscopy: The Past, Present, and the Days to Come. *Seibutsu Butsuri*, 317-321.
7. Bates M., Huang B., Dempsey G. T., Zhuang X. (2007). Multicolor super-resolution imaging with photoswitchable fluorescent probes. *Science* 317, 1749-1753
8. Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., Lindwasser O. W., Olenych S., Bonifacino J. S., Davidson M. W., Lippincott-Schwartz J., Hess H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313, 1642-1645
9. Brechtneider S., Eggeling C., Hell S. W. (2007). Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving. *Phys. Rev. Lett.* 98, 218103
10. Grundberg, I. (2013). In situ mutation detection and visualization of intratumor heterogeneity for cancer research and diagnostics. *Oncotarget*, 2407-2418.
11. Hess S. T., Girirajan T. P., Mason M. D. (2006). Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* 91, 4258-4272
12. Huang B., Wang W., Bates M., Zhuang X. (2008). Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* 319, 810-813
13. Kner P., Chhun B. B., Griffis E. R., Winoto L., Gustafsson M. G. (2009). Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat. Methods* 6, 339-342

14. Lee H. L., Lord S. J., Iwanaga S., Zhan K., Xie H., Williams J. C., Wang H., Bowman G. R., Goley E. D., Shapiro L., et al. (2010). Superresolution imaging of targeted proteins in fixed and living cells using photoactivatable organic fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 15099-15101
15. Manley S., Gillette J. M., Patterson G. H., Shroff H., Hess H. F., Betzig E., Lippincott-Schwartz J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods* 5, 155-157
16. Nagerl U. V., Willig K. I., Hein B., Hell S. W., Bonhoeffer T. (2008). Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18982-18987
17. Punge A., Rizzoli S. O., Jahn R., Wildanger J. D., Meyer L., Schonle A., Kastrop L., Hell S. W. (2008). 3D reconstruction of high-resolution STED microscope images. *Microsc. Res. Tech.* 71, 644-650 Schmidt R., Wurm C. A., Punge A., Egner A., Jakobs S., Hell S. W. (2009). Mitochondrial cristae revealed with focused light. *Nano Lett.* 9, 2508-2510
18. Thompson R. E., Larson D. R., Webb W. W. (2002). Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* 82, 2775-2783
19. Vaziri A., Tang J., Shroff H., Shank C. V. (2008). Multilayer three-dimensional super resolution imaging of thick biological samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 20221-20226
20. York A. G., Ghitani A., Vaziri A., Davidson M. W., Shroff H. (2011). Confined activation and subdiffraction localization enables whole-cell PALM with genetically expressed probes. *Nat. Methods* 8, 327-333
21. Kner, P., Chhun, B., Griffis, E., Winoto, L., & Gustafsson, M. (2009). Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat Methods*, 339-342.
22. Phu, J. (2017). The value of visual field testing in the era of advanced imaging: clinical and psychophysical perspectives. 313-332.
23. Ryabinin, E., Tsivkovskaia, O., & Ryabinin, A. (2005). Urocortin 1-containing neurons in the human Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience.*, 1317-1323.

24. Schermelleh, L., Carlton, P., Winoto, L., Kner, P., Burke, B., & Agard, D. (2008). Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy. *Science*, 1332-1336.
25. Shroff, r., Vergara, F., Muck, A., Svatos, A., & Gershenzon, J. (2008). Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense. . *Proc Natl Acad Sci USA* , 6196-6201.
26. Smolyaninov, I. (2008). Optical microscopy beyond the diffraction limit. *HFSP J.*, 129-131.
27. Werner, C., Sauer, M., & Geis, C. (2021). Super-resolving Microscopy in Neuroscience. *Chem. Rev.*, 11971–12015.