



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

3D PRINTED ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΟΠΤΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ

Δετοράκης Γεώργιος

Αριθμός Μητρώου: 48017017

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γκλώτσος Δημήτριος, Καθηγητής

Η Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων

Δημήτριος Γκλώτσος
Καθηγητής

Παντελής Ασβεστάς
Καθηγητής

Εμμανουήλ Αθανασιάδης
Επίκουρος Καθηγητής

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο υπογράφων Δετοράκης Γεώργιος του Λεωνίδα., με αριθμό μητρώου 48017017 φοιτητής του Τμήματος Μηχανικών Βιοϊατρικής της Σχολής Μηχανικών 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

30/07/2024

Ο Δηλών



Ευχαριστίες

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτρη Γκλώτσο για το ενδιαφέρον και τη σωστή καθοδήγηση του. Τον κ. Ρουμπιέ Γιώργο που μου παρείχε ένα μικροσκόπιο κάνοντας πιο εύκολη τη μελέτη μου. Τα δεκάδες διαπαιδαγωγικά βίντεο στο ίντερνετ που με βοήθησαν να μάθω από την αρχή να χειρίζομαι το πρόγραμμα σχεδίασης που χρησιμοποίησα για την υλοποίηση της εργασίας. Τους συμφοιτητές μου Χρήστο και Κωνσταντίνο που συνέβαλλαν κι αυτοί στο τελικό αποτέλεσμα.

Περίληψη

Στόχος της εργασίας αυτής είναι να χτίσει στον αναγνώστη από το μηδέν, ένα προφίλ αποτελούμενο από θεμελιώδεις έννοιες φυσικής μέχρι κατασκευαστικές γνώσεις. Ύστερα, συνδυάζοντας όλες τις παρεχόμενες πληροφορίες, στόχος είναι η κατασκευή ενός απλού λειτουργικού οπτικού μικροσκοπίου. Δεν είναι όμως η τελική κατασκευή ο μοναδικός στόχος. Μέσα από την εργασία αυτή, ο αναγνώστης θα κατανοήσει τη συμπεριφορά του φωτός και πως ο άνθρωπος έχει καταφέρει να αξιοποιήσει τα χαρακτηριστικά του. Μαθαίνει πως δομείται ένα μικροσκόπιο, τι περιλαμβάνει, για ποιο λόγο βρίσκονται εκεί που βρίσκονται τα στοιχεία του και τι συμβαίνει μέσα σε αυτό. Ακόμη, θα έρθει σε επαφή με διάφορες τεχνικές μικροσκοπίας που έχει ανακαλύψει ο άνθρωπος για την καλύτερη παρατήρηση δειγμάτων με ιδιαιτερότητες στη δομή τους. Τέλος, δε λείπουν οι κατασκευαστικές γνώσεις κι αυτές της σχεδίασης οι οποίες έχουν σκοπό να απομυθοποιήσουν την εικόνα πολύπλοκων ιατρικών μηχανημάτων και να “στρώσουν το δρόμο” αυτού που θέλει να κάνει μία αρχή στον κόσμο των κατασκευών. Θα μπορούσε να παρουσιαστεί ως ένα κατασκευαστικό ημερολόγιο που μέσα σε αυτό θα αναγράφεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε από την αρχή έως το τέλος, καθώς και τα αδιέξοδα, τα λάθη και γενικότερα οι παρατηρήσεις που υπήρξαν καθόλη τη διάρκεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

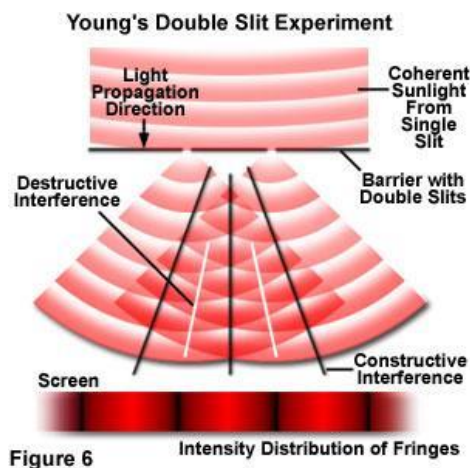
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1. Πειράματα και χαρακτηριστικά του φωτός	6
2. Όραση και οφθαλμός	
2.1 Ανατομία οφθαλμού	11
2.2 Το φαινόμενο της όρασης.....	12
3. Φακοί	
3.1 Τεχνολογία φακών.....	13
3.2 Σφάλματα φακών.....	14
3.3 Κατηγορίες φακών και φωτισμός Koehler	16
4. Δομή μικροσκοπίου.....	17
4.1 Πηγή φωτός.....	18
4.2 Διαθλαστικά μέσα και φίλτρα.....	19
4.3 Τράπεζα δείγματος και μηχανικός σωλήνας.....	21
4.4 Φωτοανιχνευτής (CCD).....	21
5. Τεχνικές μικροσκοπίας	22
5.1 Φωτεινού πεδίου	22
5.2 Σκοτεινού πεδίου	22
5.3 Αντίθεσης φάσης	24
5.4 Μικροσκοπία Φθορισμού	26
5.4.1 Μικροσκόπιο φθορισμού	26
5.5 Συνεστιακή μικροσκοπία	28
5.6 Μικροσκοπία πολωμένου φωτός	29
5.7 Πολυφωτονική μικροσκοπία.....	30
5.8 Τεχνικές υπερδιακριτικής ικανότητας	31
6. Κατασκευή.....	33
6.1 Τρισδιάστατη εκτύπωση (3D Print).....	33
6.2 Μεθοδολογία.....	34
6.3 Σχολιασμός παρούσας κατασκευής	38
6.4 Παρόμοια πρότζεκτ.....	45
6.4.1 UC2.....	47
6.4.2 OpenFlexure.....	48
7. Σχολιασμός και συμπεράσματα	52
Βιβλιογραφία	57

Εισαγωγή

Η περιέργεια του ανθρώπου, ανέκαθεν αποτελούσε το “καύσιμο” για την εξέλιξη του. Από τους προϊστορικούς χρόνους ο άνθρωπος παρατηρεί το περιβάλλον γύρω του και τα φαινόμενα που το διέπουν κι αντιδρά/προσαρμόζεται ανάλογα σε αυτά ακόμα και υποσυνείδητα. Μεταπηδώντας στους πιο σύγχρονους καιρούς ο άνθρωπος έχει φτάσει να παρατηρεί και να μελετά τον μικρόκοσμο πράγμα που έχει δημιουργήσει χιλιάδες δυνατότητες κι έχει εξελίξει κι ενισχύσει τομείς όπως τον φαρμακευτικό, ιατρικό, βιοτεχνολογικό και πολλούς άλλους. Το μέσο το οποίο έδωσε τη δυνατότητα αυτή της παρατήρησης του μικρόκοσμου είναι τα γνωστά παγκοσμίως μικροσκόπια. Πριν ακολουθήσει, όμως, η λεπτομερής τους ανάλυση, πρέπει να γίνουν κατανοητές βασικές έννοιες και φαινόμενα που καθιστούν τη διαδικασία της παρατήρησης εφικτή. Αρχικά, για να υπάρξει παρατήρηση σε ένα κλασικό μικροσκόπιο χρειάζεται φως. Μία έννοια η οποία απασχόλησε πολλούς επιστήμονες και φιλοσόφους από την αρχαία Ελλάδα έως σήμερα λόγω της διττής φύσης που παρουσίαζε.

1. Πειράματα και χαρακτηριστικά του φωτός

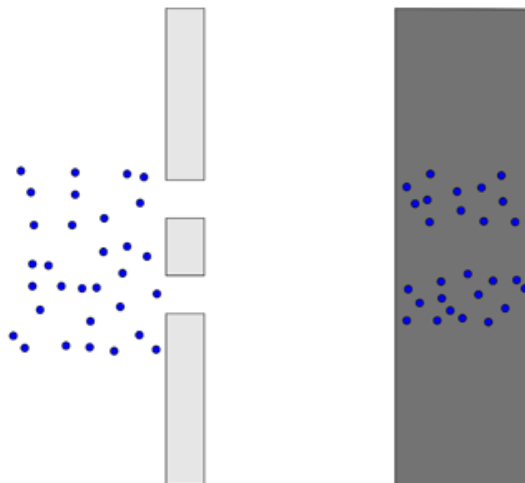
Από την αρχαιότητα λοιπόν, είχε καθιερωθεί ότι το φως πρόκειται για μικρά σωματίδια. Ωστόσο, στις αρχές του 18ου αιώνα ο Huygens εισάγει την έννοια της κυματικής φύσης του φωτός. Μία έννοια η οποία δεν έγινε αρχικά αποδεκτή αφού αδυνατούσαν να εξηγήσουν τη διάδοση του φωτός στο κενό (Ηλιος-Γη). Παράλληλα την ίδια εποχή ο Νεύτωνας υποστήριζε τη σωματιδιακή φύση του φωτός δημιουργώντας έτσι αντίπαλα στρατόπεδα ως προς το ποια θεωρία ήταν σωστή. Ενώ, λοιπόν με το κύρος του στην τότε εποχή η θεωρία του Νεύτωνα είχε πολλούς οπαδούς, ο Huygens έσπευσε να αποδείξει ότι αν όντως το φως αποτελούταν από μικρά σωματίδια τότε κατά τη διάθλαση του σε ένα πυκνότερο μέσο θα έπρεπε κανονικά να αυξηθεί η ταχύτητα του. Δηλαδή υποστήριζε ότι ο παράγοντας διάθλασης σε ένα υλικό είναι αντιστρόφως ανάλογος της ταχύτητας του φωτός. Με το πέρασμα των χρόνων εμφανίστηκαν αρκετοί επιστήμονες (Foucault, de Broglie, Compton, Maxwell, Hertz, Einstein, Young) που ήρθαν να ενισχύσουν τη θεωρία της κυματικής φύσης του φωτός αποδεικνύοντας με πειράματα τις κυματικές του ιδιότητες και πρόσθεσαν νέες έννοιες και θεωρίες. Για παράδειγμα, ο Thomas Young με το πείραμα του εδραίωσε τη κυματική θεωρία του φωτός. Στο πείραμα του, ο Young χρησιμοποίησε τον ήλιο σαν φωτεινή πηγή και τοποθέτησε μία επιφάνεια με μία σχισμή μπροστά του. Όταν το φως περνούσε από τη σχισμή η γωνία διάδοσής του γινόταν ευρύτερη. Έπειτα τοποθέτησε μία δεύτερη επιφάνεια μετά από την πρώτη η οποία είχε δύο σχισμές σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους. Όταν το φως περνούσε κι από τη δεύτερη επιφάνεια δημιουργούνταν ταυτόχρονα δύο συμφασικές πηγές φωτός. Τα σημεία που συναντούσε το ένα φως της πηγής το άλλο συνέβαλλαν είτε θετικά, δηλαδή δημιουργούσαν ένα μεγαλύτερο κύμα, είτε καταστρεπτικά, δηλαδή προέκυπτε σκοτάδι από τη συμβολή τους. Οι παραπάνω παρατηρήσεις της συμπεριφοράς του φωτός επιβεβαιώνουν την κυματική του φύση. Δεν αρκεί όμως μόνο η κυματική φύση για να εξηγηθεί πλήρως το ποιόν του φωτός. Γι' αυτό ο Einstein έδειξε μαθηματικά ότι τα ηλεκτρόνια ατόμων σε ένα μεταλλικό κουτάκι μπορούν να απορροφήσουν συγκεκριμένη ποσότητα φωτός, επομένως έχουν την ενέργεια να αποδράσουν από το άτομο. Ακολούθησαν τα πειράματα του Compton που έδειξαν ότι τα φωτόνια έχουν ορμή.



Εικόνα 1. Πείραμα του Thomas Young

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/particleorwave/>

Στην εικόνα 1 παρατηρείται ένα από τα πιο γνωστά πειράματα που αποδεικνύουν την κυματική φύση του φωτός. Σε ένα τοίχο υπάρχουν δύο σχισμές από τις οποίες περνάει φως. Πιο πέρα υπάρχει ένας άλλος τοίχος όπου εκεί προσκρούει το φως από τις σχισμές. Αν το φως συμπεριφερόταν σαν σωματίδιο τότε θα περίμενε κανείς το αποτέλεσμα που φαίνεται στην εικόνα 2.

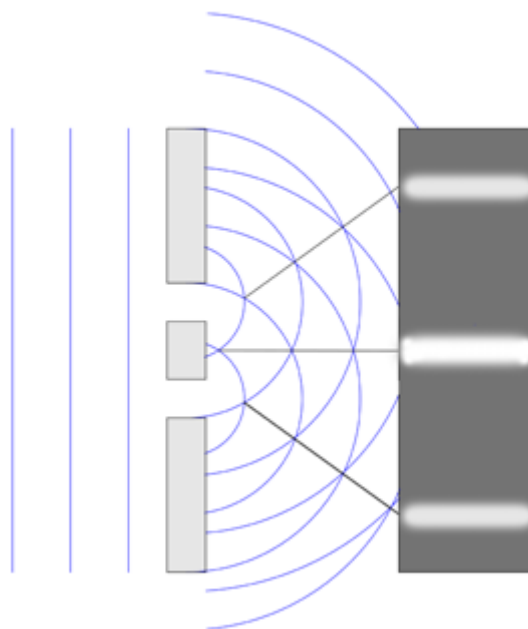


Εικόνα 2. Αν το φως συμπεριφερόταν σαν σωματίδιο.

<https://plus.maths.org/content/physics-minute-double-slit-experiment-0>

Αυτό που συμβαίνει στην πραγματικότητα όμως διαφέρει. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3, όταν το κύμα του φωτός περνάει τις μικρές σχισμές χωρίζεται εκ νέου σε δύο κύματα. Τα καινούρια αυτά κύματα σε κάποια σημεία που συναντιούνται το ένα μπορεί να βρίσκεται στο μέγιστο και το άλλο σε ελάχιστο. Τότε θα συμβάλλουν καταστρεπτικά, δηλαδή δε θα μεταδοθεί περαιτέρω το φως. Αν όταν συναντηθούν βρίσκονται και τα δύο σε μέγιστο ή και τα δύο σε ελάχιστο τότε θα συμβάλλουν ενισχυτικά, δηλαδή το φως θα διαδοθεί με τη μεγαλύτερη ένταση. Σαφώς, υπάρχουν και οι ενδιάμεσες καταστάσεις όπου δεν συναντιούνται σε ελάχιστα ή μέγιστα. Όλα αυτά τα φαινόμενα μαζί δίνουν ένα σχεδιάγραμμα της έντασης του φωτός όπως φαίνεται στο κάτω μέρος της εικόνας 1. και δεξιά της εικόνας 3.

Παράλληλα με την εδραίωση της φύσης του φωτός, πολλά πειράματα έλαβαν χώρα με σκοπό να προσεγγιστεί η ταχύτητά του. Αυτό που έχει οριστεί ως μέγιστη ταχύτητα του φωτός σήμερα πρόκειται για την ταχύτητα διάδοσης του στο κενό κι έχει υπολογιστεί ότι είναι σχεδόν 300.000 χιλιόμετρα ανά δευτερόλεπτο. Συμβολίζεται με το λατινικό χαρακτήρα «c» και λαμβάνει μέρος σε πολλές εξισώσεις όπως στη θεωρία της σχετικότητας του Einstein.



Εικόνα 3. Κυματική συμπεριφορά του φωτός.

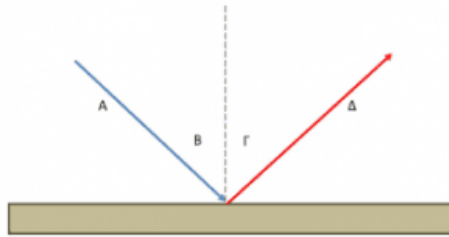
<https://plus.maths.org/content/physics-minute-double-slit-experiment-0>

Πλέον, όταν γίνεται αναφορά στο φως επικρατεί σαν άποψη η διττή του φύση, δηλαδή ότι άλλοτε το φως συμπεριφέρεται σαν σωματίδιο κι άλλοτε σαν ηλεκτρομαγνητικό κύμα. Στην πραγματικότητα, διακρίνεται σε παραπάνω ποιότητες έτσι ώστε να γίνει πιο εύκολη η μελέτη του. Οι βασικές ποιότητες του φωτός είναι η σωματιδιακή, η κυματική και η ακτινική. Η σωματιδιακή φύση χρησιμεύει όταν το φως πέφτει πάνω στον ανιχνευτή κι αυτός μετράει την ποσότητα του βάσει αριθμού φωτονίων. Από την κυματική φύση του φωτός λαμβάνονται πληροφορίες για την ηλεκτρική και μαγνητική του συνιστώσα που πάλλονται κάθετα η μία στην άλλη. Τέλος, η ακτινική του φύση χρησιμεύει στη μελέτη της γεωμετρικής οπτικής. Επιπλέον χαρακτηριστικά μίας φωτεινής δέσμης είναι η πόλωση της. Πολωμένο κύμα θεωρείται αυτό του οποίου το ηλεκτρικό διάνυσμα κατά την ταλάντωση είναι παράλληλο. Άλλο χαρακτηριστικό του φωτός είναι η μονοχρωματικότητα, η ιδιότητα δηλαδή των κυμάτων μιας δέσμης να βρίσκονται στο ίδιο μήκος κύματος. Τέλος, συμφασικά είναι τα κύματα που διατηρούν την ίδια φάση κατά τη διάδοσή τους. Από όλα τα παραπάνω, ο άνθρωπος δε μπορεί να διακρίνει την πόλωση και τη φάση του φωτός. [1]

Κατά τη διάδοση του φωτός αν αυτό συναντηθεί με ύλη τότε υπάρχει μία σειρά από φαινόμενα που μπορούν να συμβούν. Μία από αυτές τις περιπτώσεις είναι η ανάκλαση όπου το κύμα φωτός που διαδίδεται πέφτει πάνω σε λεία επιφάνεια. Το φως τότε αλλάζει κατεύθυνση τέτοια ώστε αν πέφτει στην επιφάνεια με γωνία θ_1 ανακλάται με γωνία θ_2 όπου και ισχύει ότι:

$$\theta_1 = \theta_2 \quad (1)$$

Στην εικόνα 4. γίνεται κατανοητό ότι η γωνία που σχηματίζει η προσπίπτουσα ακτινοβολία με τον κατακόρυφο άξονα είναι ίση με τη γωνία που σχηματίζει ο κατακόρυφος άξονας με την ανακλώμενη ακτινοβολία.



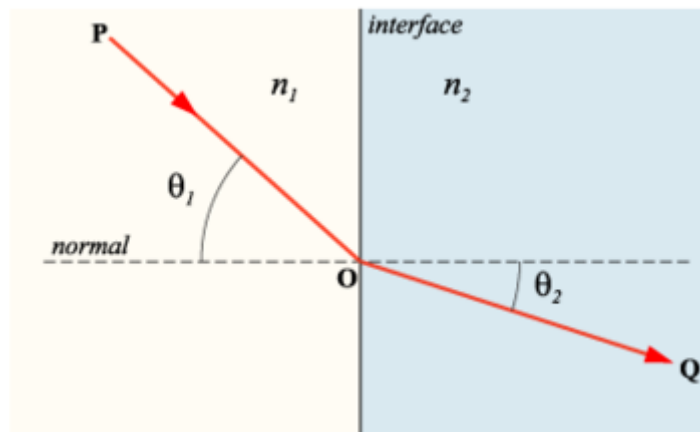
Εικόνα 4. Ολική ανάκλαση φωτός

<https://www.golabz.eu/ils/>

Εάν η δέσμη του φωτός πέσει πάνω σε τραχιά επιφάνεια τότε θα έχουμε διάχυση, δηλαδή το φως θα ανακλάται με διάφορες γωνίες. Στην περίπτωση που μία ακτίνα φωτός συναντήσει επιφάνεια ενός δεύτερου διαφανούς μέσου, τότε μέρος του φωτός θα ανακλαστεί και το υπόλοιπο θα συνεχίσει να διαδίδεται στο άλλο μέσο με διαφορετική γωνία, η οποία εξαρτάται από το δείκτη διάθλασης των υλικών. Ο νόμος του Snell προβλέπει την αλλαγή αυτή με τον παρακάτω τύπο:

$$n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2 \quad (2)$$

όπου n_1, n_2 ο δείκτης διάθλασης κάθε υλικού αντίστοιχα και θ_1, θ_2 η γωνία που σχηματίζει η αντίστοιχη ακτινοβολία με τον κατακόρυφο άξονα όπως φαίνεται και παρακάτω. Για παράδειγμα, στην εικόνα 5. απεικονίζεται φωτεινή δέσμη που διαδίδεται σε μέσο n_1 υπό γωνία θ_1 να αλλάζει μέσο n_2 και να διαδίδεται με $\theta_2 < \theta_1$. Βάσει του παραπάνω τύπου συμπεραίνει κανείς ότι $n_1 < n_2$.

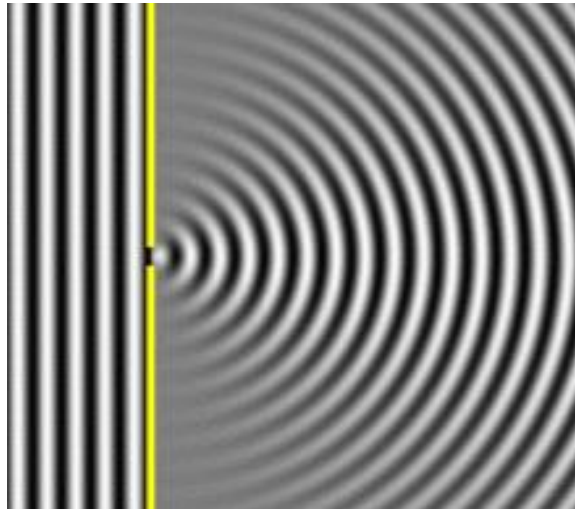


Εικόνα 5. Διάθλαση φωτός

<https://el.wikipedia.org/wiki/Διάθλαση>

όπου n ο δείκτης διάθλασης του μέσου, θ_1 η γωνία που σχηματίζεται όταν προσπίπτει το φως με τον κάθετο άξονα στο πρώτο υλικό και θ_2 η γωνία που σχηματίζεται από τη διάθλαση του φως με τον κατακόρυφο άξονα πάλι.

Περίθλαση του φωτός συμβαίνει όταν ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα μήκους λ περάσει από σχισμή διαμέτρου μικρότερη από το λ . Τότε το κύμα που ως τότε διαδίδεται ευθύγραμμα, «κάμπτεται» δημιουργώντας μέγιστα κι ελάχιστα όπως φαίνεται και στην εικόνα 6. Το φαινόμενο της περίθλασης λάμβανε χώρα και στο πείραμα του Young που σχολιάστηκε παραπάνω.



Εικόνα 6. Περίθλαση φωτός

<https://el.wikipedia.org/wiki/Περίθλαση>

Τέλος, απορρόφηση του φωτός θα έχουμε όταν το ηλεκτρομαγνητικό κύμα πέσει πάνω σε ύλη που θα απορροφήσει την ενέργεια του. Χρήσιμο σαν φαινόμενο αν κανείς εξετάζει δομές που αναλόγως της ικανότητας τους να απορροφούν το φως σου παρέχουν πληροφορίες για το δείγμα. [1]

2. Όραση και οφθαλμός

2.1 Ανατομία οφθαλμού

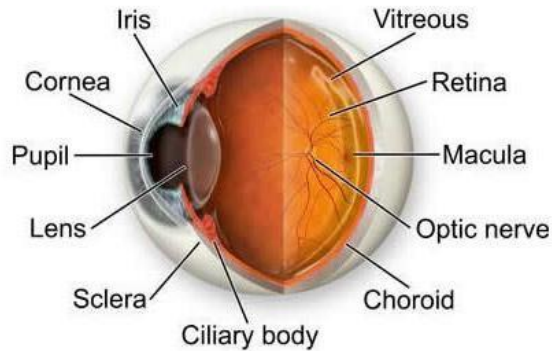
Ο οφθαλμός περιέχει την οπτική συσκευή του οπτικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από τρεις χιτώνες:

- Τον ινώδη χιτώνα που αποτελείται από τον σκληρό και τον κερατοειδή,
- Τον αγγειώδη χιτώνα που περιλαμβάνει τον χοριοειδή, το ακτινωτό σώμα και την ίριδα,
- Τον έσω χιτώνα ή αλλιώς αμφιβληστροειδή.

Ο σκληρός χιτώνας καλύπτει τα οπίσθια 5/6 του οφθαλμού προσδίδοντας πρόσφυση σε εξωτερικούς και εσωτερικούς μύες του οφθαλμού. Ο κερατοειδής χιτώνας ο οποίος συμμετέχει και στην όραση βρίσκεται στο εξωτερικό του οφθαλμού και πρόκειται για μία πολύ ευαίσθητη δομή σε ξένα σώματα που πιθανόν εισέρχονται στο μάτι και γι' αυτό η οποιαδήποτε επαφή ενεργοποιεί το αντανακλαστικό «ανοιγόκλεισμα» των ματιών. Ο κερατοειδής είναι υπεύθυνος για τη διάθλαση του φωτός μέσα στο μάτι και γι' αυτό το λόγο δεν περιέχει τριχοειδή κύτταρα και αιμοφόρα αγγεία που θα υποβάθμιζαν την ικανότητά του αυτή. Επομένως, συντηρείται διά μέσου τριχοειδών αγγείων γειτονικών δομών και από το υδατοειδές και δακρυϊκό υγρό που ρυθμίζουν την υγρασία του κερατοειδή και του προσδίδουν οξυγόνο.

Ο χοριοειδής εκτείνεται στο πίσω μέρος του σκληρού και φέρει πολλά αιμοφόρα αγγεία και τριχοειδή που συντελούν στη θρέψη του αμφιβληστροειδή. Το ακτινωτό σώμα συνδέει τον χοριοειδή με την ίριδα και προσφέρει πρόσφυση στον φακό. Μέσω των συσπάσεων των λείων μυϊκών του ινών ρυθμίζεται το πάχος του φακού. Επίσης, από τις ακτινωτές αποφυάδες εκκρίνεται το υδατοειδές υγρό που καλύπτει το πρόσθιο τμήμα του οφθαλμικού βολβού.

Ο αμφιβληστροειδής αποτελεί το νευρικό αισθητήριο του ματιού. Διακρίνονται ορισμένα στοιχεία του όπως ο οπτικός δίσκος ο οποίος βρίσκεται στο εσωτερικό και πίσω μέρος του αμφιβληστροειδούς ή αλλιώς στον ονομαζόμενο βυθό του οφθαλμικού βολβού. Ο βυθός είναι το σημείο που εστιάζεται το εισερχόμενο φως και από τον οπτικό δίσκο διέρχονται αγγεία και αισθητικές ίνες. Η οπίσθια μοίρα του αμφιβληστροειδούς δεν περιέχει φωτοϋποδοχείς, συνεπώς ονομάζεται και τυφλό σημείο. Κοντά του οπτικού δίσκου βρίσκεται μια κίτρινη κυκλική περιοχή γνωστή ως ωχρά κηλίδα. Αυτή μπορεί να παρατηρηθεί αν πέσει πάνω της φως που δεν περιέχει κόκκινο χρώμα. Η ωχρά κηλίδα εξειδικεύεται στην οξεία όραση καθώς περιλαμβάνει ειδικά φωτοευαίσθητα κύτταρα, τα κωνία. Στο κέντρο της ωχράς κηλίδας βρίσκεται το κεντρικό βοθρίο, η περιοχή με τη μέγιστη οπτική οξύτητα. Πέρα όμως από τα διάφορα επίπεδα ενός οφθαλμού υπάρχει και ο φακός που βρίσκεται μετά τον κερατοειδή. [2]
Στην εικόνα 7. φαίνεται παραστατικά η τοποθεσία των προαναφερθέντων.

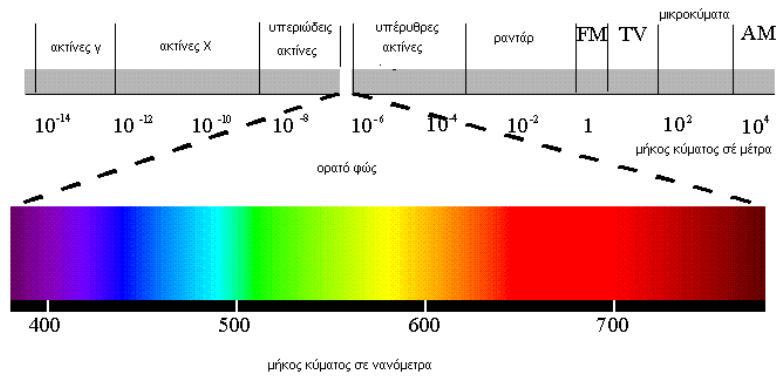


Εικόνα 7. Ανατομία οφθαλμού

<https://www.idocsoffice.com/eye-health/eye-anatomy.html>

2.2 Το φαινόμενο της όρασης

Η πορεία του φωτός μέσα στο μάτι και η μεταβίβαση του στον εγκέφαλο έχει ως εξής. Το φως διέρχεται στο μάτι δια μέσου της κόρης της οποίας η διάμετρος ρυθμίζεται από την ίριδα ανάλογα με το πόσο φωτεινό ή σκοτεινό είναι το περιβάλλον. Έτσι ελέγχεται το μέγεθος της ακτίνας που μπαίνει στο μάτι. Ένα φυσικό διάφραγμα θα έλεγε κανείς. Αφού το φως έχει εισέλθει στον αμφιβληστροειδή χιτώνα σχηματίζεται το είδωλο ανεστραμμένο πάνω του. Η φωτεινή απεικόνιση στο εσωτερικό του αμφιβληστροειδή ενεργοποιεί φωτοευαίσθητα κύτταρα τα οποία απορροφούν την ενέργεια αυτή και τη μετατρέπουν σε ηλεκτρικό σήμα, πιο συγκεκριμένα αναπτύσσουν σειρές δυναμικών ενέργειας. Με αυτόν τον τρόπο, μεταβιβάζεται η πληροφορία στον εγκέφαλο διά μέσου των γαγγλιοκυττάρων. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται φωτομεταγωγή. Τα φωτοευαίσθητα κύτταρα διαχωρίζονται σε ραβδία και κωνία. Τα ραβδία βρίσκονται σε αφθονία και καλύπτουν κοντά στο 95% των φωτοανιχνευτικών κυττάρων και ευθύνονται για την όραση σε χαμηλά επίπεδα φωτός (σκοτοπική όραση). Ρόλος τους είναι η νυχτερινή και η περιφερειακή όραση. Η χρωστική που έχουν είναι η ροδοψίνη, ευαίσθητη γύρω στα 496nm (μπλε-πράσινο). Σε αντίθεση, τα κωνία αποτελούν μόνο το 5% των φωτοανιχνευτικών κυττάρων και δραστηριοποιούνται σε συνθήκες υψηλής φωτεινότητας (φωτοπική όραση). Είναι υπεύθυνα για τη διάκριση των χρωμάτων και περιέχουν τρεις διαφορετικές χρωστικές ευαίσθητες στο κόκκινο, πράσινο και μπλε. Γενικότερα, το ορατό φάσμα κυμαίνεται από 400nm-750nm. [2] Στην εικόνα 8. φαίνεται που τοποθετούνται τα μήκη κύματος του ορατού φάσματος σε σχέση με τα υπόλοιπα μήκη κύματος.



Εικόνα 8. Ορατό φάσμα

https://physiclessons.blogspot.com/2013/11/blog-post_19.html

3. Φακοί

3.1 Τεχνολογία φακών

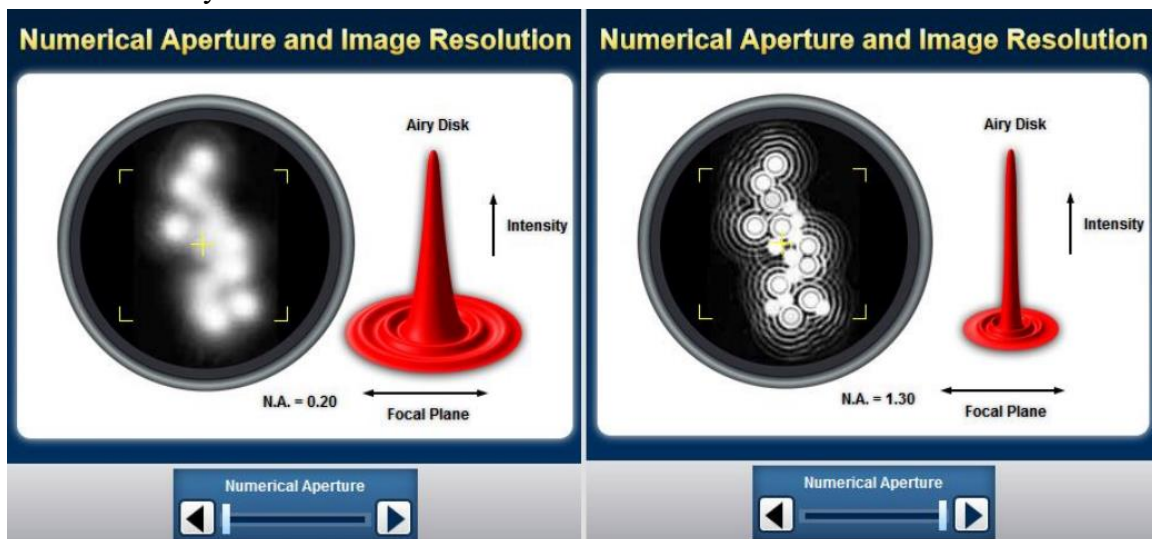
Προτού αναλυθεί η βασική δομή ενός οπτικού μικροσκοπίου χρειάζεται να γίνει αναφορά σε ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία που το απαρτίζουν. Το στοιχείο αυτό είναι οι φακοί οι οποίοι βοηθούν να εστιάσουν τη δέσμη του φωτός και να μεγεθύνουν την τελική εικόνα. Η ικανότητα των φακών να συλλέγουν τις πλαϊνές ακτίνες φωτός ονομάζεται αριθμητικό άνοιγμα και περιγράφεται από τον παρακάτω τύπο:

$$NA = n \cdot \sin \mu \quad (3)$$

όπου n είναι ο δείκτης διάθλασης μεταξύ δείγματος και φακού και μ η γωνία της οπτικής ακτίνας στον αντικειμενικό φακό. Στα οπτικά μικροσκόπια χρησιμοποιούνται διατάξεις με σειρές από φακούς και ενδιάμεσα υλικά με μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης από τον αέρα έτσι ώστε να αυξάνεται η τιμή του αριθμητικού ανοίγματος δηλαδή να συλλέγονται και να συγκεντρώνονται περισσότερες περιφερειακές οπτικές ακτίνες. Επομένως, σαν έννοια το αριθμητικό άνοιγμα σχετίζεται άμεσα με τη διακριτική ικανότητα αφού περισσότερα φωτόνια θα δώσουν εικόνα με περισσότερη πληροφορία. Η διακριτική ικανότητα ορίζεται ως η ελάχιστη απόσταση κατά την οποία γίνονται διακριτοί δύο δίσκοι του Airy και περιγράφεται από τον τύπο:

$$R = 1.22 \cdot \lambda / NA \quad (4)$$

όπου λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και NA το αριθμητικό άνοιγμα του φακού. [1],[3] Στην εικόνα 9. φαίνονται δύο περιπτώσεις με διαφορετικά αριθμητικά ανοίγματα. Στην περίπτωση με το μεγάλο αριθμητικό άνοιγμα φαίνονται ξεκάθαρα τα όρια των διαφορετικών δίσκων του Airy.



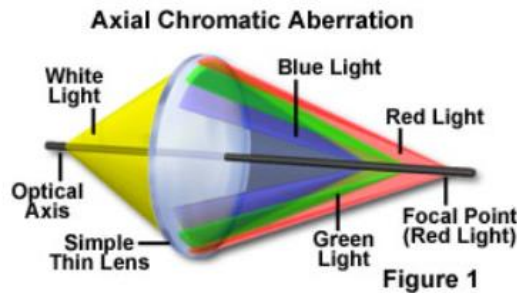
Εικόνα 9. Διακριτική ικανότητα μέσω δίσκων Airy

<https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/primer/java/imageformation/airyna/>

Οι φακοί διαχωρίζονται σε θετικούς και αρνητικούς. Θετικός είναι ένας φακός με τουλάχιστον μία κυρτή επιφάνεια ενώ αρνητικοί είναι φακοί με τουλάχιστον μία κοίλη επιφάνεια. Τα δύο αυτά είδη διαφέρουν μεταξύ τους στο πάχος με τους αρνητικούς να είναι πιο λεπτοί από τους θετικούς. Σε έναν θετικό φακό το είδωλο που σχηματίζεται πρόκειται για πραγματική εικόνα την οποία μεγεθύνουν όταν βρεθούν ανάμεσα στον παρατηρητή και το αντικείμενο. Αντίθετα, αν τους αρνητικός φακός τοποθετηθεί ανάμεσα στο μάτι και στο αντικείμενο παρατήρησης, οι ακτίνες του φωτός αποκλίνουν μεταξύ τους σμικρύνοντας το είδωλο δημιουργώντας έτσι μία μη πραγματική εικόνα. Υπάρχουν κάποιοι κανόνες που ισχύουν για τη φωτεινή δέσμη όταν αυτή διέρχεται από έναν φακό. Αρχικά, αν η δέσμη περάσει από το κέντρο του φακού δεν αποκλίνει. Εάν μία ακτίνα διέρχεται παράλληλα στον οπτικό άξονα του φακού τότε στη συνέχεια αυτή θα συγκλίνει προς το εστιακό κέντρο του. Τέλος, όταν μία ακτίνα πριν διέλθει από τον φακό περάσει από το πρώτο εστιακό κέντρο τότε μετά τη διέλευση της, αυτή θα συνεχίζει να διαδίδεται παράλληλα στον οπτικό άξονα. [1], [3]

3.2 Σφάλματα φακών

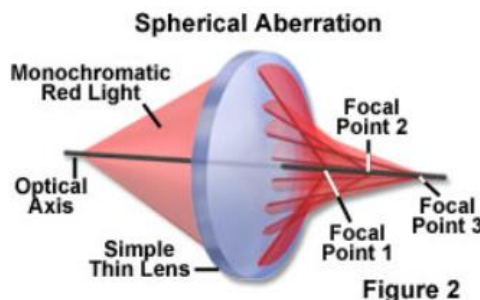
Η πολύπλοκη γεωμετρία των φακών τους προσδίδει επιπλέον ιδιότητες καθώς τους επιτρέπει να αποκόπτουν συγκεκριμένα μήκη κυμάτων και να διορθώνουν φαινόμενα αστιγματισμού που οφείλονται στη δομή του φακού. Με το πέρασμα των χρόνων οι φακοί εξελίχθηκαν έτσι ώστε να συμβάλλουν και σε άλλα επίπεδα πέρα των βασικών ιδιοτήτων τους. Από τον 18ο μόλις αιώνα παρατηρήθηκε ότι πιθανά χρωματικά σφάλματα μπορούσαν να μειωθούν με τη χρήση διαφορετικού είδους φακών. Έτσι από τότε έως σήμερα η πολύπλοκη τεχνολογία των φακών στοχεύει στην διόρθωση λαθών όπως είναι τα χρωματικά και τα γεωμετρικά με σκοπό την καλύτερη δυνατή απεικόνιση [3]. Από τα προαναφερθέντα λοιπόν σφάλματα, τα χρωματικά έχουν ως εξής. Σε διαφανή αντικείμενα όπως οι φακοί, διαφορετικά μήκη κύματος διαθλώνται με διαφορετική γωνία. Έτσι για παράδειγμα το μπλε θα διαθλαστεί με τη μεγαλύτερη γωνία, το πράσινο με μικρότερη και το κόκκινο με ακόμα πιο μικρή γωνία με αποτέλεσμα να μη συναντιούνται στο ίδιο εστιακό σημείο. Όταν συμβαίνει αυτό, δημιουργείται ένα “φωτοστέφανο” γύρω από την εικόνα. Τα χρωματικά σφάλματα συνήθως διορθώνονται με τη χρήση δύο φακών με διαφορετικό δείκτη διάθλασης έτσι ώστε τα μήκη κύματος να εστιάζουν στο ίδιο σημείο. Τέτοιοι φακοί είναι οι achromat όπου διορθώνουν δύο μήκη κύματος (κόκκινο, μπλε) και οι apochromat που διορθώνουν τρία μήκη κύματος (κόκκινο, μπλε, πράσινο). Στην εικόνα 10. απεικονίζεται ο διαχωρισμός των χρωμάτων μίας φωτεινής δέσμης που διέρχεται από φακό με χρωματικό σφάλμα.



Εικόνα 10. Χρωματικό σφάλμα φακού

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/opticalaberrations/>

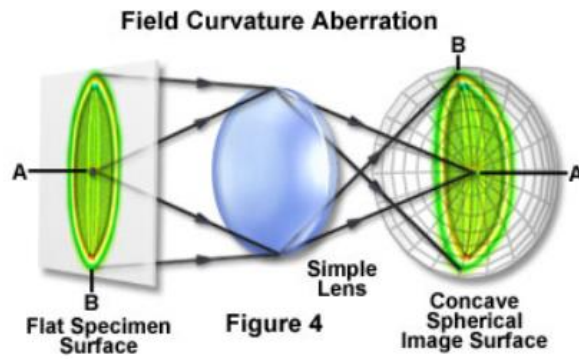
Άλλη κατηγορία σφαλμάτων είναι τα σφαιρικά. Αυτά προκύπτουν λόγω της γεωμετρίας του φακού και πρόκειται ουσιαστικά για την αδυναμία του φακού να συγκεντρώσει τις περιφερειακές ακτίνες φωτός στο σημείο εστίασης με αποτέλεσμα να εμφανίζεται πάλι ένα «φωτοστέφανο» γύρω από την εικόνα με τέλεια εστίαση ή αυτή να είναι θολή, ειδικά στην περιφέρεια της. Υποβαθμίζουν, δηλαδή, την ποιότητα τη εικόνας. Για να αντιμετωπιστεί το σφάλμα αυτό συνήθως χρησιμοποιείται πλήθος αρνητικών και θετικών φακών κατάλληλα εγκατεστημένων ως μέρος ευρύτερης διάταξης με κοχλία που μπορεί να μεταβάλλει τις αποστάσεις μεταξύ τους. Επίσης, γίνεται με τη χρήση διαφράγματος να μειωθεί η διάμετρος της φωτεινής δέσμης κι έτσι να αποφευχθεί η πρόσπτωση της σε περιφερειακά σημεία του φακού που μπορούν να προκαλέσουν σφαιρικά σφάλματα.[3],[4] Στην εικόνα 11. φαίνεται πως διάφορα εστιακά σημεία δημιουργούνται λόγω της γεωμετρίας του φακού.



Εικόνα 11. γεωμετρικό σφάλμα φακού

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/opticalaberrations/>

Στη συνέχεια, τα σφάλματα καμπυλότητας πεδίου οφείλονται στο σχήμα των φακών. Η καμπυλότητα αυτή του φακού αποτυπώνεται πάνω στην εικόνα με τη μορφή πολύ καλής ευκρίνειας στο κέντρο και θολής στην περιφέρεια. Τέτοιου είδους λάθη διορθώνονται με επιπρόσθετους φακούς με την ένδειξη PLAN σε διάταξη όμως την παραπάνω για τα χρωματικά και τα σφαιρικά σφάλματα.[3],[4] Στην εικόνα 12. Το φως που περνάει από τον κοίλο φακό εστιάζεται στο κέντρο προσφέροντας καλή ευκρίνεια όμως σαν γενικό αποτέλεσμα σχηματίζεται κοίλη εικόνα.



Εικόνα 12. Χρωματικό σφάλμα φακού

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/opticalaberrations/>

Γενικότερα, όσο περισσότερα σφάλματα θέλει κανείς να διορθώσει τόσο περισσότερους και πολύπλοκους σε δομή και σύσταση φακούς χρειάζεται να χρησιμοποιήσει. Ως επακόλουθο αυξάνεται το κόστος της διάταξης σε συνάρτηση με την πολυπλοκότητά της. Τέλος, οι παραμορφώσεις κομής οφείλονται στη μη σωστή ευθυγράμμιση του μικροσκοπίου και παρουσιάζονται σε σημεία της εικόνας σαν να αφήνουν πίσω τους γραμμή που μοιάζει με ουρά κομής.[3],[4]

3.3 Κατηγορίες φακών και φωτισμός Köhler

Κατηγορίες αντικειμενικών φακών όπως οι παραπάνω μπορούν να συνδυαστούν μεταξύ τους για να προκύψει μία διάταξη που θα μπορεί να διορθώνει πολλά σφάλματα.



Εικόνα 13. Αντικειμενικοί φακοί εμπορίου

<https://wavelength-oe.com/el/imaging-optics/objective-lenses/>

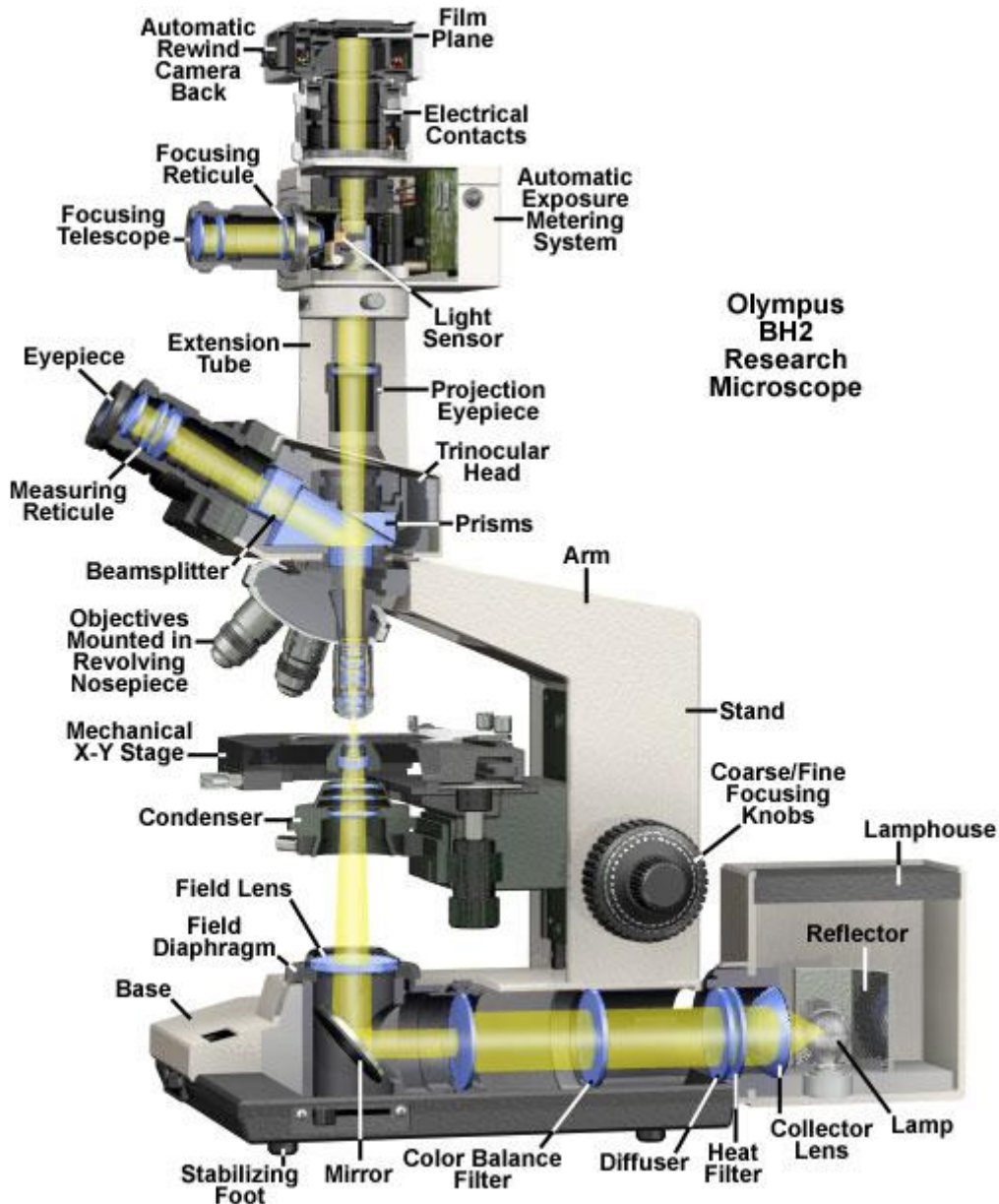
Πάνω τους αναγράφονται τα χαρακτηριστικά τους. Για παράδειγμα στην εικόνα 13 τα σύμβολα σημαίνουν:

1. APO: Achromat
2. Plan: επίπεδος φακός Plan
3. 10x: Μεγέθυνση x10
4. 0.25: αριθμητικό άνοιγμα
5. ∞: Διορθωμένο στο άπειρο
6. WD (Working Distance): 6mm

Το “WD” αναφέρεται στην απόσταση που πρέπει να έχει ο αντικειμενικός φακός από το δείγμα για τη βέλτιστη παραγωγή εικόνας και μπορεί να αναφερθεί επίσης ως βάθος πεδίου. Όσο πιο κοντά στο δείγμα είναι τοποθετημένος ο φακός τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η μεγέθυνση. Δεδομένου λοιπόν των βέλτιστων συνθηκών εστίασης, κάθε φακός έχει διαφορετική απόσταση από την οποία μπορεί να τοποθετηθεί από το δείγμα. Ο πιο σημαντικός ίσως παράγοντας που συμβάλλει στην παραγωγή της τελικής εικόνας είναι ο σωστός φωτισμός του δείγματος. Το 1893 η βέλτιστη μέθοδος φωτισμού του δείγματος παρουσιάστηκε από τον August Köhler και είναι ευρέως διαδεδομένη κι εύχρηστη μέχρι και σήμερα. Σύμφωνα λοιπόν με τον φωτισμό κατά Köhler [3] μεγάλη σημασία έχει η σωστή ευθυγράμμιση και τοποθέτηση όλων των στοιχείων του μικροσκοπίου καθώς και ο ομοιόμορφος φωτισμός του δείγματος. Αφού ληφθούν υπ’ όψη οι παραπάνω παράμετροι, η πορεία του φωτός μέσα στο μικροσκόπιο έχει ως εξής. Αρχικά, η ευθυγραμμισμένη πηγή ακτινοβολεί και το πρώτο πράγμα που συναντά είναι ο φακός συλλογής όπου συγκεντρώνει τη φωτεινή δέσμη και τη στέλνει στα διαφράγματα πεδίου, τα οποία ρυθμίζουν την ακτίνα της, πρώτα και στο διάφραγμα του συμπυκνωτή έπειτα. Σειρά έχουν οι φακοί του συμπυκνωτή που ρόλος τους είναι να εστιάζουν ή να αποεστιάζουν το φως στο δείγμα με σκοπό το σωστό φωτισμό του για τη βέλτιστη απεικόνιση. Στη συνέχεια, η δέσμη πλησιάζει τον αντικειμενικό φακό, υπεύθυνο για τη μεγέθυνση της εικόνας του δείγματος και καταλήγει στον προσοφθάλμιο φακό και τέλος στο μάτι του παρατηρητή. [4]

4. Δομή οπτικού μικροσκοπίου

Στην εικόνα 14 φαίνονται αναλυτικότερα όλα τα δομικά μέρη ενός μικροσκοπίου Olympus BH2. Στη συνέχεια θα σχολιαστούν τα πιο σημαντικά από αυτά.



Εικόνα 14. Δομικά μέρη μικροσκοπίου.

<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/components.html>

4.1 Πηγή φωτός

Τα βασικά στοιχεία που απαρτίζουν ένα οπτικό μικροσκόπιο έχουν ως εξής. Αρχικά, κάθε οπτικό μικροσκόπιο χρειάζεται μία φωτεινή πηγή. Αυτή ποικίλει ανάλογα με την εφαρμογή.

Στην κλασική μικροσκοπία φωτεινού πεδίου χρησιμοποιείται συνήθως λάμπα αλογόνου. Τροφοδοτείται με DC ρεύμα τάσης έως 12 Volt η οποία ρυθμίζεται από ένα ενσωματωμένο στο μικροσκόπιο ποτενσιόμετρο και παράγει φωτεινότητα μέχρι 100 Watt. Είναι στεγασμένη για να αποφεύγεται η παρεμβολή από εξωτερική ακτινοβολία και διαθέτει σχισμές για να περνάει αέρας και να ρίχνει τις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται από τη λάμπα (2200K-3400K). Οι λάμπες αλογόνου εκπέμπουν σε όλο το ορατό φάσμα όμως ανάλογα με την ένταση που τους δίνεται υπερισχύουν συγκεκριμένα μήκη κύματος πχ σε χαμηλή ένταση εμφανίζεται κόκκινο, σε συνθήκες κανονικής λειτουργίας κίτρινο και σε υψηλή ένταση μπλε. Πέφτει η αποδοτικότητα τους με τη συνεχή χρήση, όμως είναι οικονομικές και εύκολα αντικαταστάσιμες. Στη μικροσκοπία φθορισμού που απαιτούνται συγκεκριμένα μήκη κύματος χρησιμοποιούνται άλλου είδους φωτεινές πηγές. Πιο συγκεκριμένα, λάμπες υδραργύρου (50-200 watts) και xenon (75-150 watts) είναι οι πιο συνηθισμένες πηγές γι' αυτή την εφαρμογή, με τις πρώτες να έχουν τη μέγιστη ένταση σε μήκη κύματος στο υπεριώδες κυρίως (313, 334, 365, 406, 435, 546, 578 nm). Οι λάμπες xenon δεν έχουν τόσες κορυφές και λειτουργούν κυρίως στο υπέρυθρο άρα ως αποτέλεσμα αναπτύσσουν μεγάλες θερμοκρασίες. Στην εικόνα 15. απεικονίζεται μία τέτοια λάμπα. Γενικότερα, χρειάζεται προσοχή κατά τη χρήση των παραπάνω λαμπών διότι είναι μεγάλος ο κίνδυνος εκρήξεων λόγω μεγάλων πιέσεων και θερμοκρασίας. [3]



Εικόνα 15. Λάμπα xenon και υδραργύρου.

<https://www.newport.com/p/6293>

4.2 Διαθλαστικά μέσα και φίλτρα

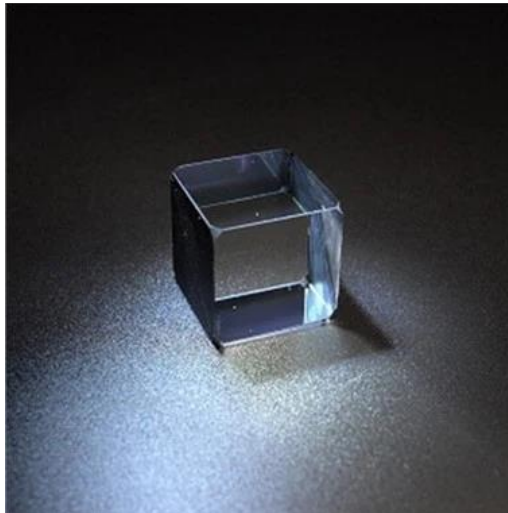
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω δεν νοείται οπτικό μικροσκόπιο χωρίς φακούς, καθώς αυτοί αποτελούν ένα από τα βασικά στοιχεία που το απαρτίζουν. Οι αντικειμενικοί φακοί είναι υπεύθυνοι για τον καλύτερο δυνατό συνδυασμό μεγέθυνσης και διακριτικής ικανότητας της εικόνας. Ένας φακός που συνεργάζεται άμεσα με τον αντικειμενικό φακό είναι ο συμπυκνωτής. Ρόλος του είναι να συγκεντρώνει τη φωτεινή δέσμη σε σχήμα κώνου και να την εστιάζει στο δείγμα. Ο πρώτος φακός που συναντά η φωτεινή δέσμη, αυτός δηλαδή που βρίσκεται αμέσως μετά τη φωτεινή πηγή, είναι ο συγκεντρωτής. Αυτός αναλαμβάνει να συλλέξει όλες τις φωτεινές ακτίνες από την ήδη ευθυγραμμισμένη πηγή. Τέλος, υπάρχουν και οι προσοφθαλμιοί φακοί που συμμετέχουν στη μεγέθυνση της εικόνας. Αυτοί χωρίζονται σε

δύο κατηγορίες, τους θετικούς και τους αρνητικούς. Οι δύο πιο διαδεδομένοι φακοί ανάλογα με την κατηγορία τους είναι ο Ramsden και ο Huygenian αντίστοιχα. [3], [4]

Άλλες διατάξεις σημαντικές για την κατεύθυνση και την επιθυμητή ποιότητα του φωτός είναι τα διάφορα φίλτρα και πρίσματα. Τα φίλτρα απορρόφησης είναι ευρέως διαδεδομένα για χρήσεις που δεν απαιτείται μεγάλη ακρίβεια κατά την αποκοπή μηκών κύματος. Πρόκειται για κατασκευές από χρωματισμένο γυαλί ή συνθετικά gel και είναι σημαντικό να είναι υψηλής ποιότητας η κατασκευή τους για να υπάρχει ομοιομορφία της έντασης στη δέσμη. Το πάχος και η πυκνότητα τους καθορίζουν το ποσοστό της ακτινοβολίας που θα απορροφήσουν. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Τα ζωνοπερατά φίλτρα έχουν μία κεντρική συχνότητα η οποία υπολογίζεται ως ο μεσαίος αριθμός του FWHM που προσδιορίζει το εύρος διέλευσης της ακτινοβολίας κατά 50%. Συχνότητες μικρότερες και μεγαλύτερες από την ονομαστική τιμή του εύρους του φίλτρου αποκóπτονται. Τα φίλτρα ακμής είναι η άλλη κατηγορία και χωρίζονται περαιτέρω σε υψιπερατά και χαμηλοπερατά. Κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το μήκος κύματος στο οποίο περνάει το 50% της μέγιστης ακτινοβολίας της δέσμης. Αυτή ονομάζεται αλλιώς και συχνότητα αποκοπής. Ανάλογα, λοιπόν, με τη συχνότητα αποκοπής αν το φίλτρο είναι υψιπερατό τότε επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολίας υψηλών μηκών κύματος, ενώ τα χαμηλοπερατά φίλτρα αποκóπτουν τα ψηλά μήκη κύματος της δέσμης. Στη συνέχεια υπάρχουν τα διχρωικά φίλτρα. Αυτά έχουν εύρος ζώνης 100nm πράγμα που σημαίνει ότι δεν ενδείκνυνται σε εφαρμογές σχηματισμού εικόνας και γενικότερα όπου απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στην αποκοπή μηκών κύματος. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικά φίλτρα σε εφαρμογές για την αύξηση αντίθεσης και διαχωρισμού χρωμάτων. Τα φίλτρα συμβολής αποτελούν κι αυτά μία ξεχωριστή κατηγορία φίλτρων με πολύ καλή απόδοση, καθώς έχουν την ικανότητα να αποκóπτουν αποτελεσματικά συγκεκριμένα μήκη κύματος μέσω ανάκλασης ή καταστρεπτικής συμβολής. Η κατασκευή τους περιλαμβάνει στρώσεις διηλεκτρικών υλικών πάχους $\frac{1}{2}$ ή $\frac{1}{4}$ του στοχευμένου μήκους κύματος αποκοπής. Τα υλικά αυτά (zinc sulfide, zinc selenide, ή sodium aluminum fluoride) τοποθετούνται πάνω σε επίπεδο γυαλί σε κενό αέρος. Άλλα φίλτρα είναι αυτά της ουδέτερης πυκνότητας. Χαρακτηρίζονται από το γκρι τους χρώμα και σκοπός τους ουσιαστικά είναι να μειώνουν την ένταση του φωτός είτε σε συγκεκριμένα μήκη κύματος είτε σε όλο το φάσμα. Χωρίζονται σε φίλτρα απορρόφησης και ανάκλασης και υλικά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή τους είναι το γυαλί, η ζελατίνη, πολυμερή υλικά. Τέλος, υπάρχουν τα φίλτρα υπεριώδους και υπέρυθρου.[4] Αυτά αποκóπτουν μήκη κύματος εκτός του ορατού φάσματος που παράγονται από την φωτεινή πηγή και δεν συνεισφέρουν στο σχηματισμό εικόνας καθώς μπορούν επίσης να την υποβαθμίσουν. Κύρια ανησυχία αποτελεί η υπέρυθρη ακτινοβολία που παράγεται από πηγές που αναπτύσσουν μεγάλες θερμοκρασίες κι εκεί συνήθως παρατηρείται η ανάγκη των παραπάνω φίλτρων για να προστατεύσουν το CCD, το CMOS και γενικότερα διατάξεις με μεγάλη ευαισθησία στο υπέρυθρο φως.

Άλλα στοιχεία που αλληλοεπιδρούν άμεσα με τις ακτίνες του φωτός είναι τα πρίσματα και οι διαχωριστές δέσμης. Τα πρίσματα έχουν τριγωνικό σχήμα και είναι κατασκευασμένα από γυαλί ή άλλες διαφανείς ύλες. Διαχωρίζονται σε πρίσματα ανάκλασης, πόλωσης και διάθλασης. Όπως ορίζει και η ονομασία τους τα πρίσματα διάθλασης ανακλούν το φως, είναι κατάλληλα δηλαδή για να ανακατευθύνουν την πορεία της φωτεινής δέσμης. Έχουν επίσης την ιδιότητα ανάλογα του σχήματος τους και της τοποθέτησής τους έναντι της ακτίνας να αναστρέψουν το είδωλο της εικόνας. Τα πρίσματα πόλωσης είναι υπεύθυνα για το διαχωρισμό

πολωμένου και μη πολωμένου φωτός. Τέλος, τα πρίσματα διάθλασης διαχωρίζουν τη φωτεινή δέσμη καθώς κάθε μήκος κύματος που εμπεριέχεται σε αυτή διαθλάται με διαφορετική γωνία η οποία υπολογίζεται από το νόμο του Snell και εξαρτάται από τον διαθλαστικό παράγοντα του πρίσματος. Η γωνία απόκλισης που λαμβάνει χώρα μετά τη διάθλαση διορθώνεται μερικώς με τη σωστή γωνία πρόσπτωσης της δέσμης πάνω στο πρίσμα. Οι διαχωριστές δέσμης έχουν την ικανότητα να αφήνουν ένα ποσοστό της ακτινοβολίας να περάσει ενώ ανακλούν το υπόλοιπο. Τα ποσοστά αυτά διαφέρουν ανάλογα την εφαρμογή κι επιτυγχάνονται τοποθετώντας επιστρώσεις από άλλα υλικά όπως ασημί πάνω σε αυτούς. Μπορούν επίσης να ενώσουν δύο διαφορετικές δέσμες σε μία. Ένας κλασσικός διαχωριστής δέσμης μπορεί να κατασκευαστεί από δύο πρίσματα συγκολλημένα μεταξύ τους με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να δημιουργείται ένας κύβος. [3], [4] Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται ένας διαχωριστής δέσμης.



Εικόνα 16. Διαχωριστής δέσμης.

<https://gr.visopto.net/beamsplitters/>

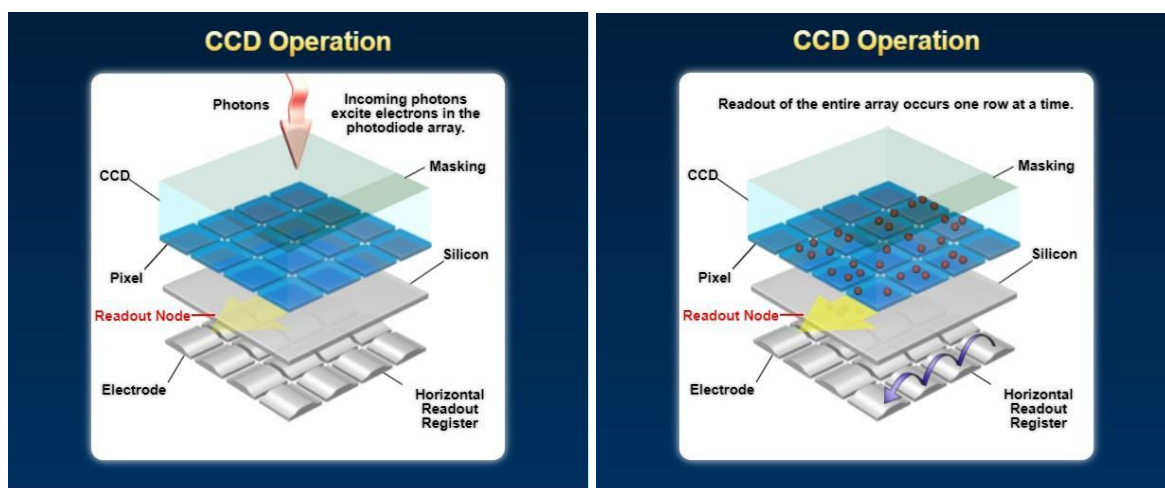
4.3 Τράπεζα δείγματος και μηχανικός σωλήνας

Μέσα στις βασικές δομές ενός μικροσκοπίου κατατάσσεται και η τράπεζα συγκράτησης του δείγματος. Εκεί τοποθετείται το γυάλινο πλακίδιο που εμπεριέχει το δείγμα και επιτρέπει την κίνηση στους άξονες x-y-z είτε χειροκίνητα με κάποιο βραχίονα είτε ηλεκτρονικά. Ακόμη, υπάρχει ο μηχανικός σωλήνας. Ως μηχανικός σωλήνας ορίζεται η απόσταση που ενώνονται οι αντικειμενικοί φακοί με το ικρίωμα του μικροσκοπίου έως το σημείο που ενώνονται οι προσοφθάλμιοι φακοί. Η απόσταση αυτή έχει καθοριστεί στα 160mm στα περισσότερα μικροσκόπια σήμερα. [3]

4.4 Φωτοανιχνευτής (CCD)

Τέλος, υπάρχουν και οι ηλεκτρονικές διατάξεις των μικροσκοπίων, οι ψηφιακοί ανιχνευτές CCD (Charge Coupled Device). Πρόκειται για τετραγωνικές κατασκευές με πολλαπλές στρώσεις αποτελούμενες από φωτοευαίσθητο ημιαγώγιμο υλικό, συνήθως πυρίτιο. Η λειτουργία του ψηφιακού ανιχνευτή περιλαμβάνει τη μετατροπή των φωτονίων που

προσπίπτουν πάνω του σε ηλεκτρικό φορτίο. Πιο συγκεκριμένα, τα φωτόνια διεγείρουν τη φωτοδίοδο του ανιχνευτή καθώς πέφτουν πάνω της δημιουργώντας έτσι ηλεκτρικό φορτίο. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια αυτά διοχετεύονται στην επιφάνεια κρυστάλλου τύπου MOS (Metal Oxide Semiconductor) που επενδύει κάθε στρώση του ανιχνευτή. Έπειτα, ακολουθεί η κατά σειρά μεταφορά των ηλεκτρονίων, που αντιστοιχούν, ένα τη φορά, σε ένα pixel του ανιχνευτή. Η διαδικασία τελειώνει με τη σειριακή ανάγνωση των γειτονικών οριζόντιων pixel.[3] Παρακάτω απεικονίζεται ο τρόπος λειτουργίας ενός “CCD”.



Εικόνα 17. Τρόπος λειτουργίας φωτοανιχνευτή.

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/flash/ccd/>

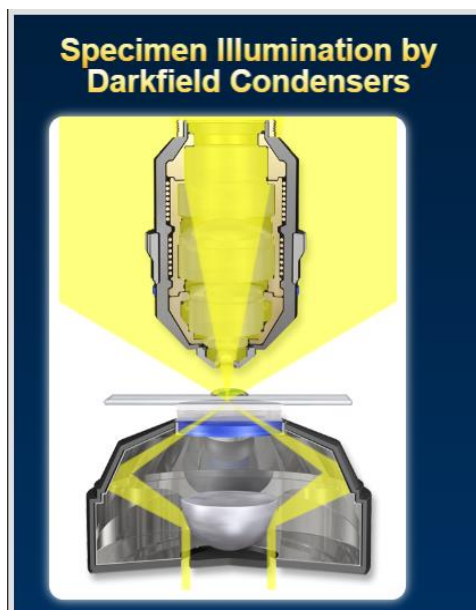
5. Τεχνικές οπτικής μικροσκοπίας

5.1 Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου

Αυτή είναι η πιο απλή τεχνική μικροσκοπίας. Χρησιμοποιείται επίσης στην εργασία αυτή. Φως εκπέμπεται από τη φωτεινή πηγή, περνά από το διάφραγμα και τον συγκεντρωτή φακό και φτάνει στο δείγμα. Εκεί διαθλάται, και διέρχεται στο σύμπλεγμα αντικειμενικών φακών, συνεχίζει στον μηχανικό σωλήνα και καταλήγει να σχηματίζεται η εικόνα στον προσοφθάλμιο φακό. Μία εύκολη, εύχρηστη, γρήγορη, φθηνή τεχνική η οποία βέβαια συναντά περιορισμούς στην διακριτική της ικανότητα και στη μελέτη δειγμάτων που δεν έχουν υψηλή αντίθεση με το υπόβαθρο παρατήρησης.

5.2 Μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου

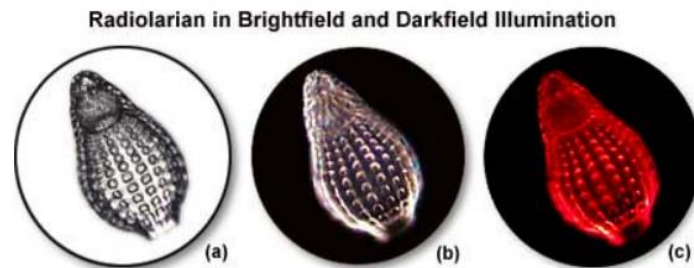
Η φιλοσοφία που ακολουθεί η τεχνική αυτή μπορεί να παραλληλιστεί με την παρατήρηση των αστεριών το βράδυ. Όταν σκοτεινιάζει τα αστέρια φαίνονται έντονα παρόλο που βρίσκονται έτη φωτός μακριά. Σ' αυτό βοηθάει η έλλειψη φωτός στο τριγύρω περιβάλλον, δηλαδή η αντίθεση μεταξύ του σκοτεινού ουρανού και των φωτεινών αστεριών. Τη μέρα άλλωστε δεν εξαφανίζονται τα άστρα απλά η δυνατή ακτινοβολία του ήλιου υπερισχύει και χάνεται αυτή η αντίθεση που τα έκανε ορατά. Έτσι λοιπόν, στη μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου δείγματα όπως υδάτινοι οργανισμοί μπορούν να προσφέρουν εικόνα υψηλής ευκρίνειας και γενικότερα ποιότητας δίχως να χρειαστεί χρώση. Αυτό επιτυγχάνεται με τον πλευρικό φωτισμό του δείγματος, όπως φαίνεται και στην εικόνα 18. Προϋπόθεση είναι το δείγμα να είναι σωστά τοποθετημένο έτσι ώστε οι συγκλίνοντες ακτίνες του φωτός να πέσουν πάνω του, να διαθλαστούν και να περάσουν από το σύστημα των συγκεντρωτών και αντικειμενικών φακών για να σχηματιστεί η τελική φωτεινή εικόνα σε σκοτεινό υπόβαθρο. [1], [3]



Εικόνα 18. Πορεία φωτός σε μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου.

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/darkfield/>

Τώρα στην περίπτωση που το δείγμα δεν έχει μεγάλο διαθλαστικό παράγοντα, οι ακτίνες του φωτός πέφτουν πάνω του ανακλώνται και σκεδάζονται προς διάφορες κατευθύνσεις. Παρόλα αυτά υπάρχει ένα μικρό ποσοστό της ακτινοβολίας που καταφέρνει να φτάσει στο σύμπλεγμα των φακών και τότε το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή μίας τρισδιάστατης φωτεινής εικόνας αντίστοιχα σε σκοτεινό περιβάλλον. Το σημείο που διαφέρει είναι ότι σε πιο πυκνές περιοχές γίνεται αισθητή η έλλειψη του φωτός και δημιουργούνται τόνοι δίνοντας περισσότερο σχήμα και λεπτομέρεια στο δείγμα.



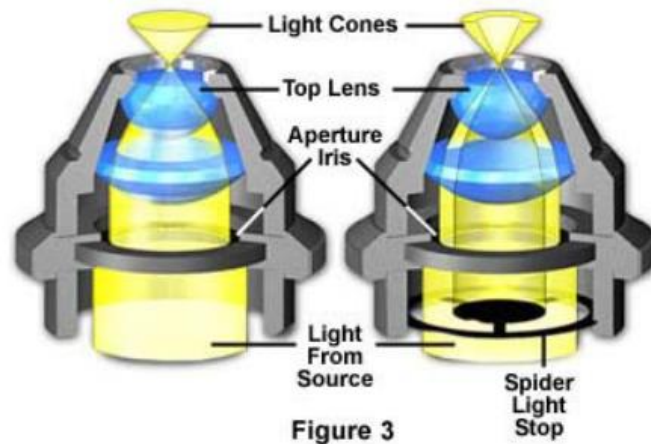
Εικόνα 19. Απεικόνιση πρωτόζωου

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/darkfield/>

Παραπάνω φαίνεται απεικόνιση ενός πρωτόζωου με α) μικροσκοπία φωτεινού πεδίου, β) με σκοτεινού πεδίου και γ) με σκοτεινού πεδίου και προσθήκη κόκκινου φίλτρου.

Συνοψίζοντας, ταιριαστά δείγματα για απεικόνιση σκοτεινού πεδίου είναι υδάτινοι μικροοργανισμοί, μικρά έντομα, κόκκαλα, κύτταρα επιθηλιακού ιστού, πρωτόζωα. Τα χαρακτηριστικά που θα έχει το δείγμα δηλαδή θα πρέπει να είναι δείκτης διάθλασης 1,2 με 1,4 που είναι οι περισσότεροι υδάτινοι μικροοργανισμοί ή να είναι τόσο πυκνά που να ανακλούν την εκπεμπόμενη ακτινοβολία και να αφήνουν μόνο μικρό της μέρος να συνεχίσει προς τους φακούς παρατήρησης. Σε άλλα δείγματα φωτοδιαπερατά με πολύ μεγάλο δείκτη διάθλασης, η ακτίνες του φωτός θα διαθλαστούν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε θα δημιουργήσουν ένα τόξο 180 μοιρών. Το αποτέλεσμα θα είναι ο “υπερφωτισμός” του δείγματος και υποβαθμίζει αισθητά την ποιότητα της εικόνας. Όπως έχει γίνει ήδη αντιληπτό, η επιλογή και η προετοιμασία του υλικού προς παρατήρηση διαδραματίζουν μεγάλο ρόλο στην τελική εικόνα. Το πάχος του δείγματος, ο δείκτης διάθλασης του, η σωστή τοποθέτησή το στην πλάκα ακόμα και η απόσταση που θα έχουν μεταξύ τους τα οπτικά μέσα είναι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη για να λάβει κανείς τα βέλτιστα αποτελέσματα.

Ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στη μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου είναι το “spider stop”. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα αντίστροφο διάφραγμα, δηλαδή μπλοκάρει την κεντρική ακτινοβολία και αφήνει να μόνο την πλευρική να περάσει με σκοπό να φωτιστεί πλευρικά δείγμα. Είναι στρογγυλό και μεταβαλλόμενου μεγέθους, επομένως δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να ρυθμίσει τη διάμετρό του για να λάβει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Η προσθήκη του εργαλείου αυτού θα μπορούσε να μετατρέψει ένα μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου σε σκοτεινού αν τοποθετηθεί σωστά πάνω στα οπτικά στοιχεία όπως φαίνεται παρακάτω.

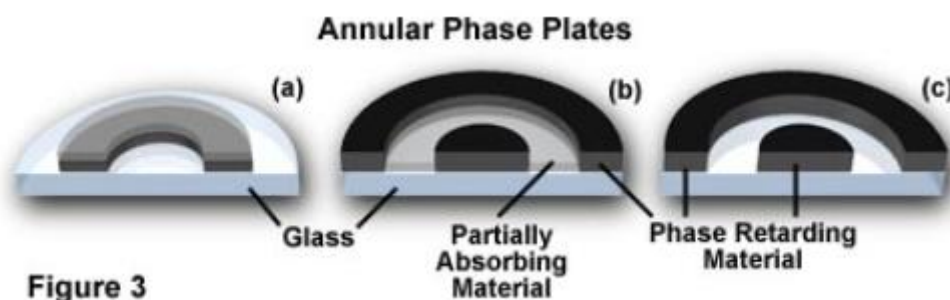


Εικόνα 20. Πλευρικός φωτισμός δείγματος με χρήση αντίστροφου διαφράγματος

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/darkfield/>

5.3 Αντίθεση φάσης

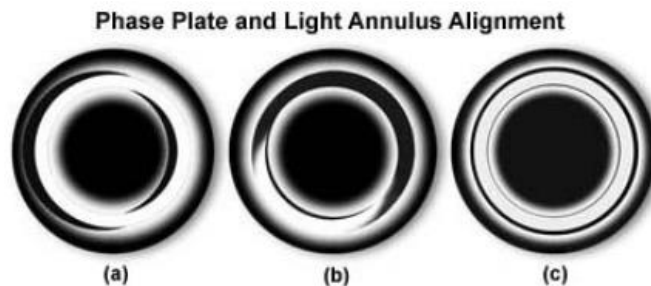
Μια άλλη δημοφιλής μέθοδος απεικόνισης είναι αυτή της αντίθεσης φάσης. Η γενική ιδέα είναι η παρατήρηση με φως διαφορετικών φάσεων. Το ανθρώπινο μάτι δε μπορεί από μόνο του να ξεχωρίσει τη φάση του φωτός, όμως εάν εφαρμοστούν οι κατάλληλες συνθήκες τότε μπορεί να αξιοποιηθεί η ιδιότητα αυτή. Δείγματα τα οποία δεν απορροφούν ακτινοβολία και απλά τη σκεδάζουν δε μειώνουν το πλάτος της αλλά αλλάζουν τη φάση της. Πιο συγκεκριμένα, “καθυστερούν” τη φωτεινή δέσμη, την επιβραδύνουν, κατά $\frac{1}{4}$ σε σχέση με την κανονική ταχύτητα. Μέρος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας εισέρχεται στο οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου και το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι μία εικόνα η οποία εκλείπεται μεγάλης αντίθεσης και λόγω αυτού δεν υπάρχουν ξεκάθαρες λεπτομέρειες, επομένως χάνεται σημαντική πληροφορία. Πάνω σε αυτή την ιδιότητα των “φασικών” δειγμάτων έρχεται ο Zernike με μία πρωτοπόρα ιδέα για να εγκαθιδρύσει τη μέθοδο της απεικόνισης με τη χρήση της αντίθεσης φάσης. Η ιδέα του ήταν να επιταχύνει τις ακτίνες του φωτός που δεν αλληλοεπιδρούν με το δείγμα κατά $\frac{1}{4}$. Έτσι, πλέον, οι φάσεις μεταξύ των ακτίνων που φτάνουν στο σύστημα των αντικειμενικών φακών διαφέρουν κατά $\frac{1}{2}$, δηλαδή συμβάλλουν καταστρεπτικά. Η καταστρεπτική συμβολή μεταφράζεται σε έλλειψη φωτός στα σημεία εκείνα, επομένως στην τελική εικόνα σχηματίζεται το δείγμα με σκοτεινές λεπτομέρειες και φωτεινό υπόβαθρο. Πρακτικά, αυτό επιτυγχάνεται προσθέτοντας μία γυάλινη πλάκα όπως φαίνεται στην εικόνα 21 με σκοπό να γίνει ο διαχωρισμός των φωτεινών δεσμών που πέτουν και μη πάνω στο δείγμα.



Εικόνα 21. Γυάλινο πλακίδιο με ιδιότητα να επιταχύνει τη φάση του φωτός.

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/phasecontrast/phase/>

Ουσιαστικά, οι ανεπηρέαστες ακτίνες του φωτός περνούν τη γυάλινη πλάκα και φτάνουν στον αντικειμενικό φακό σε σχήμα δακτυλιδιού. Οι ακτίνες που διαθλώνται από το δείγμα απλώνονται σε όλο τον αντικειμενικό φακό. Αυτή η παρέμβαση δεν αρκεί όμως για να υπάρξει καταστρεπτική συμβολή. Χρειάζεται η προσθήκη ενός ακόμη δακτυλιοειδούς δίσκου σαν αυτού στην εικόνα 22. τοποθετημένου στον αντικειμενικό φακό. Έτσι, διέρχονται οι μη σκεδαζόμενες ακτίνες, οι οποίες έχουν σχηματιστεί ως δακτύλιος στον αντικειμενικό φακό, από το στενό πέρασμα του δίσκου. Στο πέρασμα αυτό, το υλικό είναι λεπτότερο απ' ότι στον υπόλοιπο δίσκο, επομένως το μη σκεδαζόμενο φως διανύει μικρότερη απόσταση. Πλέον, όταν οι δύο δέσμες συναντηθούν στο τέλος της πορείας τους θα συμβάλλουν καταστρεπτικά και θα δώσουν απεικόνιση μεγάλης αντίθεσης. [1], [3]



Εικόνα 22. Δακτύλιος διαχωρισμού σκεδαζόμενης και μη ακτινοβολίας.

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/phasecontrast/phase/>

Η δομή ενός μικροσκοπίου αντίθεσης φάσης δε διαφέρει πολύ από αυτή του μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου πέραν της προσθήκης των δύο δίσκων. Αυτό σημαίνει, ότι ένα 3D εκτυπωμένο ικρίωμα κατάλληλα διαμορφωμένο έτσι ώστε να δέχεται τα παραπάνω αυτά στοιχεία δεν υστερεί πουθενά και θα μπορούσε κάλλιστα να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός μικροσκοπίου αντίθεσης φάσης.

5.4 Μικροσκοπία φθορισμού

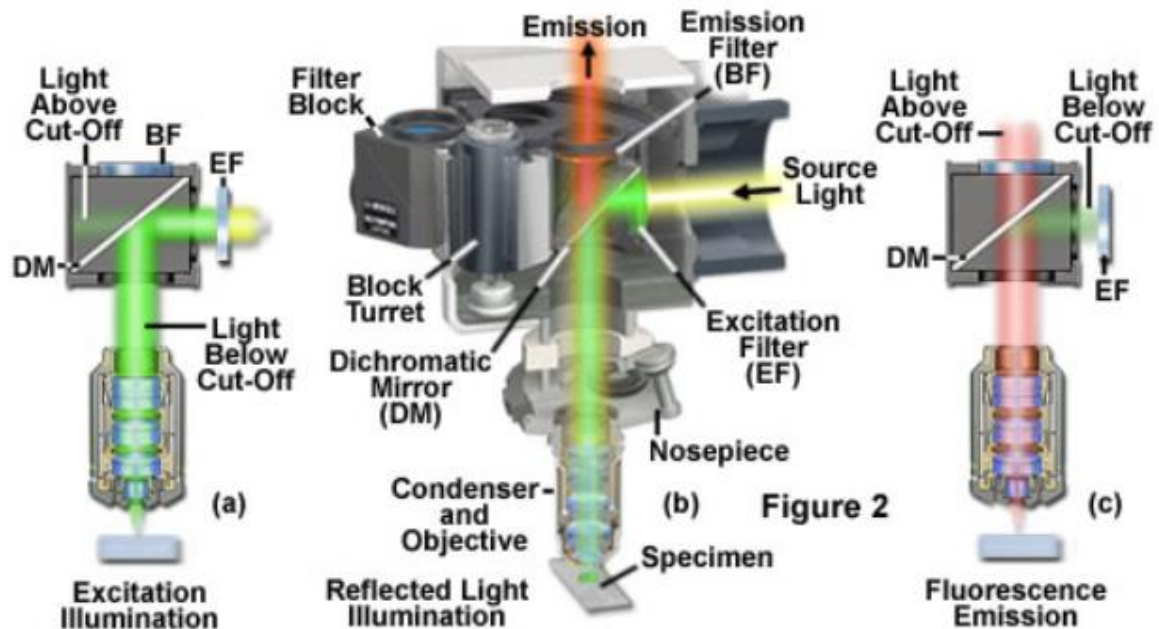
Για την εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής, ο άνθρωπος εκμεταλλεύεται τα φαινόμενα του φθορισμού και του φωσφορισμού. Πιο συγκεκριμένα, το δείγμα εισάγεται κατάλληλος ιχνηθέτης που θα δεσμευτεί από την περιοχή ενδιαφέροντος. Ύστερα, με τη χρήση πηγής φωτός xenon, υδραργύρου ή μονοχρωματικής ακτινοβολίας (laser), τα ηλεκτρόνια απορροφούν φωτόνια και αναγκάζονται να μεταπηδήσουν σε υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα, διεγείρονται. Αυτή η κατάσταση διαρκεί πολύ μικρό χρονικό διάστημα της τάξης του 10^{-9} - 10^{-12} sec κι έπειτα τα ηλεκτρόνια επιστρέφουν στην αρχική τους θέση παράγοντας ακτινοβολία μήκους κύματος ίσο με τη διαφορά των ενεργειακών σταθμών, γνωστή ως ακτινοβολία εκπομπής. Οι διαφορετικές αυτές ακτινοβολίες διέρχονται μέσα από διχρωικά

φίλτρα τα οποία έχουν την ικανότητα να ανακλούν κατά 90 μοίρες την διέγερσης και να επιτρέπουν τη διέλευση της εκπεμπόμενης. Η δεύτερη στη συνέχεια φτάνει στον ψηφιακό φωτοανιχνευτή και το τελικό αποτέλεσμα είναι μία εικόνα του δείγματος με φωτισμένες τις περιοχές ενδιαφέροντος, που έχει συσσωρευτεί ο ιχνηθέτης, με την ακτινοβολία διέγερσης. Η διαφορά των μηκών κύματος μεταξύ των δύο ακτινοβολιών ονομάζεται “Stoke shift” και συνήθως είναι από λίγες δεκάδες έως λίγες εκατοντάδες νανόμετρα. Μεγάλο “stoke shift” είναι επιθυμητό για να μπορεί να γίνεται πιο εύκολα ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο.[1], [3]

5.4.1 Μικροσκόπιο φθορισμού

Η πιο διαδεδομένη μορφή για ένα μικροσκόπιο φθορισμού είναι αυτή του ανακλώμενου φωτός. Στην πρώτη μορφή του έμοιαζε με τα μικροσκόπια οπτικού πεδίου που έχουν ήδη σχολιαστεί. Δηλαδή, ακτινοβολία διέγερσης περνούσε από ένα φίλτρο και συναντούσε το δείγμα. Έπειτα, η ακτινοβολία εκπομπής συλλεγόταν από τον αντικειμενικό φακό μαζί με σημαντική ποσότητα αυτής της διέγερσης, συνέχιζαν προς άλλο ένα φίλτρο και τέλος προς το φακό παρατήρησης. Το πρόβλημα με το παραπάνω μοντέλο ήταν ότι η ποσότητα της ακτινοβολίας διέγερσης που έφτανε στον παρατηρητή ήταν πολύ μεγάλη σε σχέση με αυτή της εκπομπής έχοντας ως αποτέλεσμα μία εικόνα με πολύ χαμηλή αντίθεση απεικονισμένη σε ένα υποβάθρο φωτισμένο από σκεδαζόμενες ακτίνες διέγερσης. Το δεύτερο ζήτημα διευθετήθηκε με τη χρήση συγκεντρωτή φακού σκοτεινού πεδίου με υψηλό αριθμητικό άνοιγμα εμπλουτισμένο με έλαια. Έτσι, αντιμετωπίστηκε ο θόρυβος στο φόντο όμως, η εικόνα παρέμεινε χαμηλής διακριτικής ικανότητας και έγινε αρκετά σκοτεινή. Η λύση στο παραπάνω πρόβλημα δόθηκε με τη δημιουργία της ανακλαστικής απεικόνισης. Δηλαδή, όπως περιγράφηκε και πιο πάνω, η ακτινοβολία διέγερσης δεν ακολουθεί ευθεία πορεία, αντίθετα συναντά διχρωμικά φίλτρα που αλλάζουν την κατεύθυνση της και τη διαχωρίζουν από την ακτινοβολία εκπομπής. Στην πράξη αυτό δεν είναι τόσο εύκολο και για αυτό παίζει πολύ σημαντικό ρόλο το σύμπλεγμα των οπτικών φίλτρων και κατόπτρων που θα χρησιμοποιηθούν για το ύστατο αποτέλεσμα. Το κύριο θέμα είναι ο σημαντικά χαμηλότερος φωτισμός εκπομπής έναντι της διέγερσης. Επομένως, οι απαιτήσεις έγκεινται στον βέλτιστο διαχωρισμό των δύο δεσμών φωτός για τη λήψη εικόνων υψηλής αντίθεσης, στην ενίσχυση της ακτινοβολίας εκπομπής και την τελική υποβάθμιση της ακτινοβολίας διέγερσης. Stoke shift ονομάζεται η διαφορά μεταξύ της ακτινοβολίας διέγερσης και αυτής της εκπομπής. Σε μία εφαρμογή στόχος είναι μεγάλο το Stoke shift έτσι ώστε να είναι εύκολος ο διαχωρισμός των δύο δεσμών.

Dichromatic Mirror Function in Reflected Light Fluorescence Illumination



Εικόνα 23. Ρόλος οπτικών φίλτρων στην ανακλαστική μικροσκοπία φθορισμού.

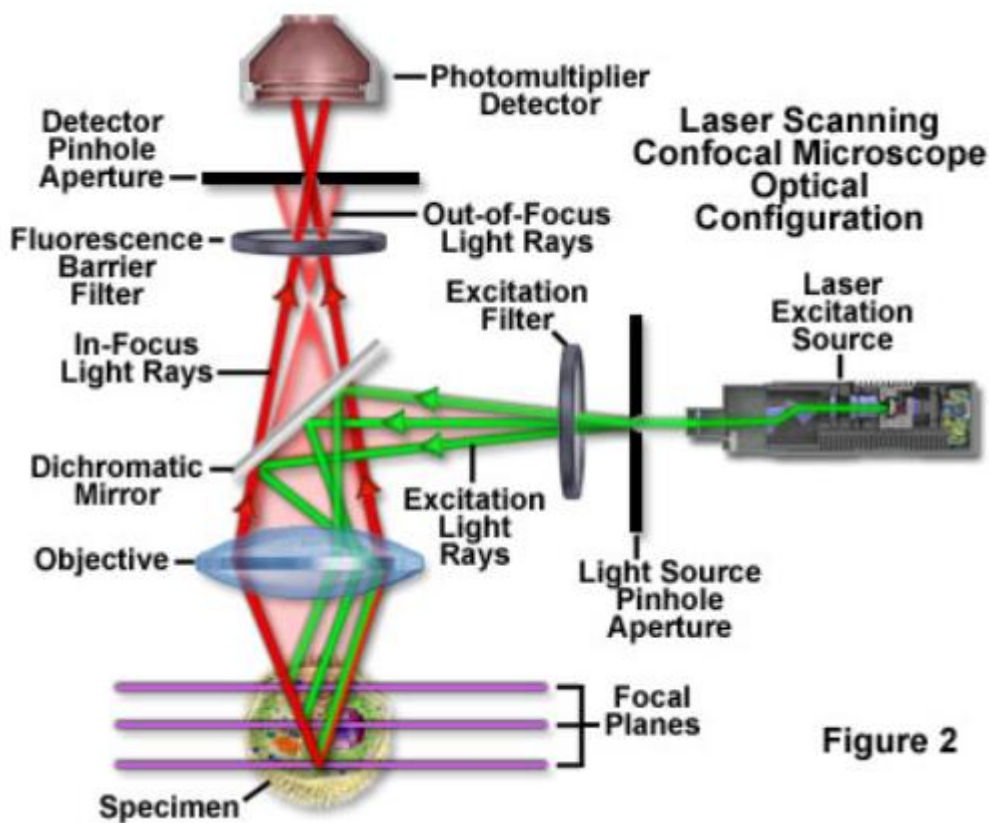
<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy/>

Έχοντας ως οδηγό την εικόνα 23, μπορεί να δοθεί ένα υποθετικό παράδειγμα της πορείας του φωτός για να γίνει πιο κατανοητή η διαδικασία. Πηγή χημική ή λάμπα υδραργύρου εκπέμπει ακτινοβολία η οποία έχει κορυφές κυρίως στο υπεριώδες. Αυτό σημαίνει ότι η ακτινοβολία στο υπεριώδες εκπέμπεται με περισσότερη ένταση απ' ό,τι σε άλλα μήκη κύματος. Στη συνέχεια, η ακτινοβολία αυτή συναντά το πρώτο φίλτρο (EF) το οποίο επιτρέπει τη διέλευση ενός συγκεκριμένου εύρους μηκών κύματος. Στην περίπτωση αυτή αν θεωρήσουμε ότι το δείγμα έχει φθορίζοντα ιχνηθέτη που διεγείρεται στα 550nm (πράσινο) και εκπέμπει ακτινοβολία στο κόκκινο (620-660nm), από το φίλτρο θα περάσει ακτινοβολία με εύρος κοντά στα 550nm. Έστω ότι περνάει 510-560nm μήκος ακτινοβολίας με μεγάλη ένταση. Ύστερα, η φιλτραρισμένη ακτινοβολία συναντά διχρωμικό κάτοπτρο το οποίο επιλεκτικά ανακλά ένα εύρος μηκών κύματος 500-570nm ενώ αφήνει τα υπόλοιπα μήκη να περάσουν. Η ανακλώμενη ακτινοβολία φτάνει μέσω διαφράγματος και συμπλέγματος φακών στο δείγμα το οποίο και διεγείρει. Οι διεγερμένοι φωσφορίζοντες ιχνηθέτες του δείγματος εκπέμπουν ακτινοβολία η οποία διέρχεται μέσα από το διχρωμικό κάτοπτρο ανεμπόδιστη αφού το κάτοπτρο ανακλά ακτινοβολίες 100nm κάτω της εκπεμπόμενης. Τέλος, φτάνει στον φωτοανιχνευτή.

5.5 Συνεστιακή μικροσκοπία

Σκοπός της συνεστιακής μικροσκοπίας είναι να ενισχύσει την μικροσκοπία φθορισμού και να δώσει εικόνες με καλύτερη διακριτική ικανότητα. Όπως προαναφέρθηκε στη μικροσκοπία φθορισμού ένα από τα κύρια θέματα είναι ο αποκλεισμός του φωτός στο υπόβαθρο που δημιουργεί θόρυβο στην τελική εικόνα. Πόσο μάλλον όταν πρόκειται για πιο παχύ δείγμα που

συνήθως είναι μεγαλύτερη η ένταση της ακτινοβολίας που εκπέμπει το φθορίζον δείγμα. Τότε γίνεται ακόμα πιο δύσκολο το έργο της εξάλειψης του θορύβου. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, πηγή laser εκπέμπει ακτινοβολία η οποία διέρχεται από μικρή σημειακή οπή διαφράγματος και συνεχίζει την πορεία της όπως και στη μικροσκοπία φθορισμού. Περνάει το φίλτρο διέγερσης και ανακλάται από το διχρωμικό κάτοπτρο. Η φθορίζουσα ακτινοβολία που εκπέμπει το δείγμα συνεχίζει με σκοπό να φτάσει στον φωτοπολλαπλασιαστή. Πριν τον φωτοπολλαπλασιαστή όμως, είναι τοποθετημένο άλλο ένα διάφραγμα με πολύ μικρή διάμετρο. Εκεί αποκόπτονται οι “εκτός εστίασης” ακτίνες. Επομένως, μόνο οι εστιασμένες είναι αυτές που συντελούν στην δημιουργία της τελικής εικόνα, έπειτα από την ενίσχυση τους στο φωτοπολλαπλασιαστή. [3] Παρακάτω φαίνεται αναλυτικά η πορεία της ακτινοβολίας διέγερσης και εκπομπής σε ένα συνεστιακό μικροσκόπιο με πηγή “laser”.



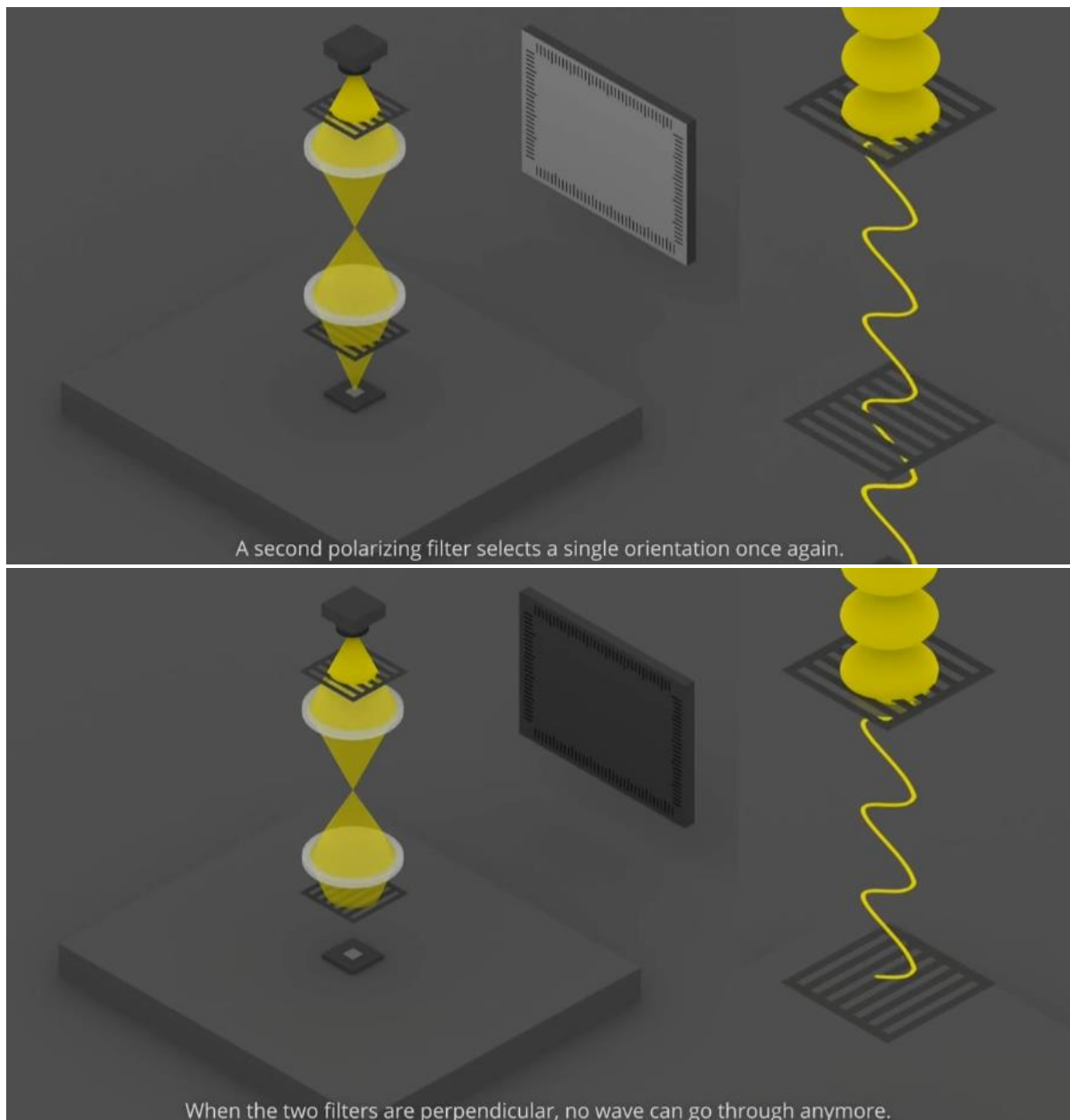
Εικόνα 24. Πορεία φωτεινής δέσμης στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

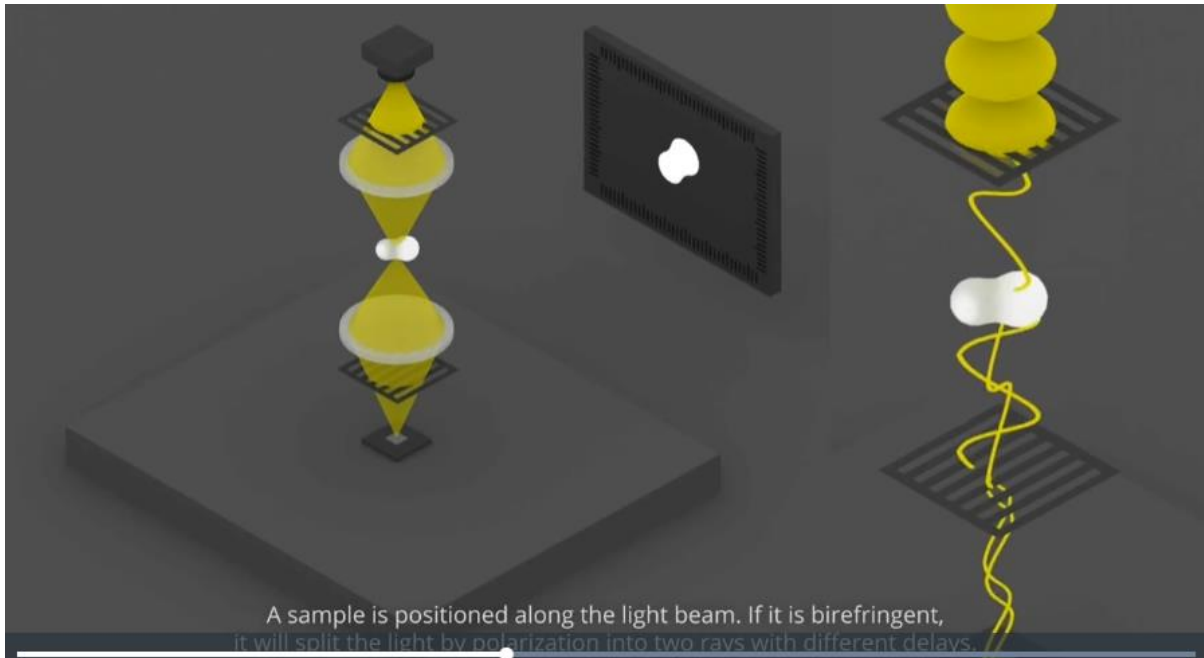
<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalintro/>

5.6 Μικροσκοπία πολωμένου φωτός

Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται την ιδιότητα της πόλωσης του φωτός για τη μελέτη διαθλαστικών και διπλοδιαθλαστικών μέσων. Άλλα υλικά, ανισοτροπικά, όπως μερικοί υγροποιημένοι κρύσταλλοι δημιουργούν παρεμβολές στη μεταφορά του φωτός στον ανιχνευτή και δυσχεραίνουν την απεικόνιση. Η δομή ενός μικροσκοπίου πολωμένου φωτός βοηθά να

κατανοήσει κανείς καλύτερα τον τρόπο λειτουργίας του. Ένα τέτοιο μικροσκόπιο θα μπορούσε σαν δομή να είναι παρόμοιο με ένα οπτικού πεδίου με τη διαφορά ότι υπάρχει ένας πολωτής πριν η φωτεινή δέσμη φτάσει στο δείγμα κι άλλος ένας ανάμεσα στο δείγμα και στον φακό παρατήρησης. Επίσης, είναι εξοπλισμένο με τράπεζα η οποία επιτρέπει την περιστροφή του δείγματος για τη μελέτη διπλοδιαθλαστικών δειγμάτων. Αρχικά, λοιπόν, το φως πολώνεται προς έναν άξονα. Όταν δεν έχουμε δείγμα και οι πολωτές είναι τοποθετημένοι με 90 μοίρες διαφορά μεταξύ τους, όπως φαίνεται και στις παρακάτω εικόνες, το φως αποκόπτεται τελείως. Αυτός είναι κι ένας καλός τρόπος να ελέγξει κανείς την αρτιότητα των αποτελεσμάτων του μικροσκοπίου πριν κάνει κάποια απεικόνιση. Συνεχίζοντας, αν ανάμεσά τους παρεμβληθεί δείγμα, τότε επηρεάζεται η πολικότητα του φωτός κι έτσι όταν φτάσει στον δεύτερο πολωτή ή αλλιώς αναλυτή, μόνο το φως το οποίο έχει προέλθει από αλληλεπίδραση με το δείγμα θα καταφέρει να πολωθεί και να τον περάσει για να φτάσει στον προσοφθάλμιο φακό ή τον ανιχνευτή. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται αναλυτικά η διαδικασία.





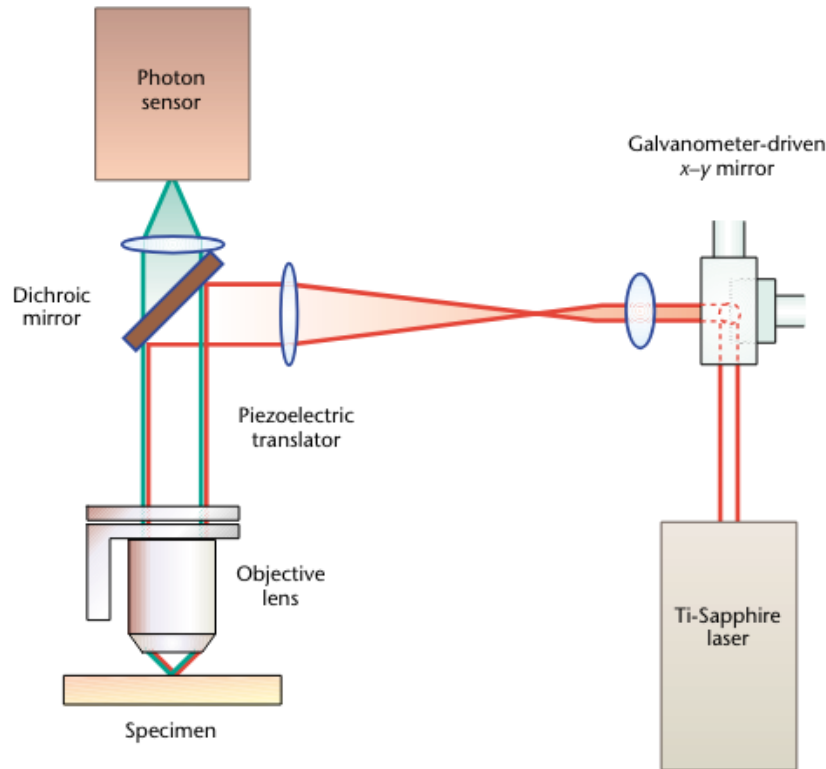
Εικόνα 25. Πορεία φωτεινής δέσμης σε μικροσκόπιο πολωμένου φωτός

https://en.wikipedia.org/wiki/Polarized_light_microscopy

Συνοψίζοντας, η μικροσκοπία πολωμένου φωτός είναι μία τεχνική υψηλής αντίθεσης.

5.7 Πολυφωτονική μικροσκοπία

Φιλοσοφία της τεχνικής αυτής είναι ότι για τη διέγερση του φθορίζοντα ιχνηθέτη χρησιμοποιούνται δύο φωτόνια μικρότερης ενέργειας που στο σύνολο είναι αρκετή, η ενέργεια, για να μεταπηδήσει στοιβάδα και να εκपुरσοκροτήσει το φαινόμενο του φθορισμού.[5] Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση laser Ti-Sapphire που δίνει παλμούς στο υπέρυθρο όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα. Αφού χρειάζονται δύο φωτόνια για τη διέγερση, η πιθανότητα να γίνει αυτό είναι αντιστρόφως ανάλογη του τετραγώνου της απόστασης που ακτινοβολεί η πηγή. Αυτό σημαίνει ότι η απομάκρυνση από τον στόχο δίνει αισθητά λιγότερα φθορισμό άρα περισσότερη ακρίβεια στο σημείο εστίασης και αποκλεισμός του περιφερειακού φθορισμού. Η τεχνική αυτή σε συνδυασμό με φακούς με μεγάλο αριθμητικό άνοιγμα μπορούν να δώσουν εικόνες της τάξεως των μερικών εκατοντάδων νανομέτρων (300-900nm). Επιπροσθέτως, στα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι ότι η χρήση υπέρυθρης ακτινοβολίας επιτρέπει μεγαλύτερη διείσδυση στο δείγμα.

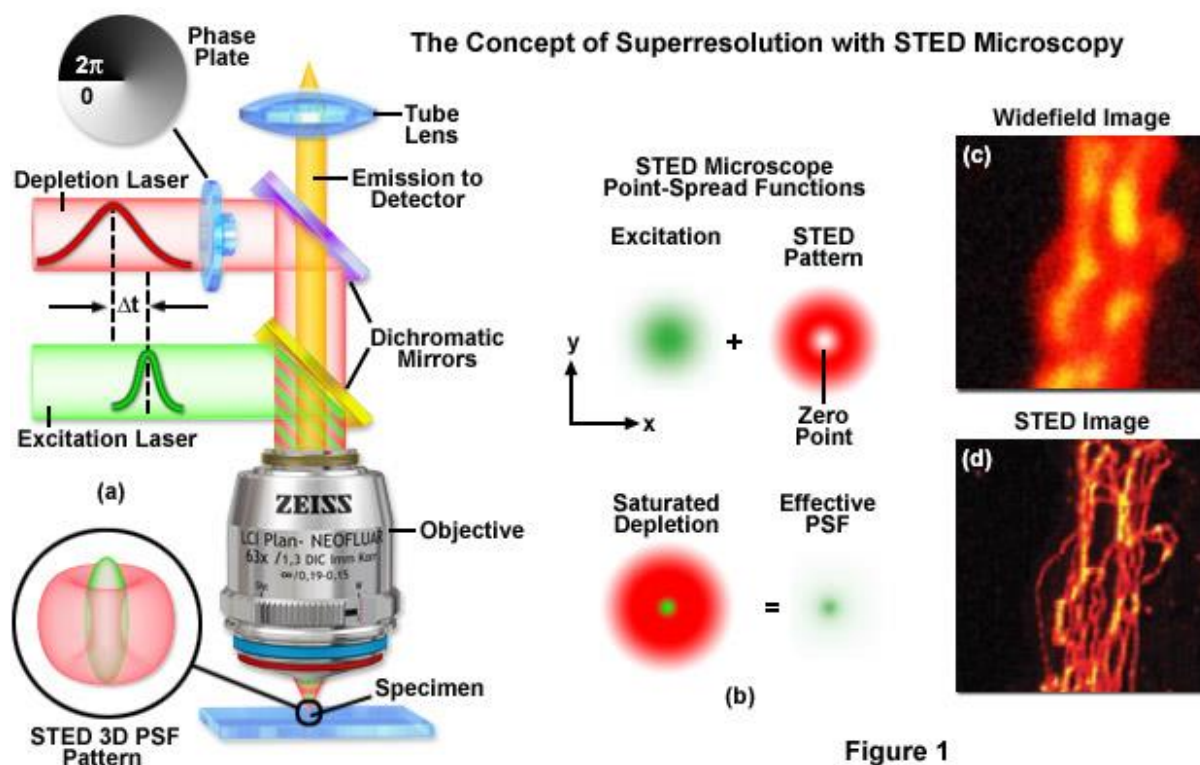


Εικόνα 26. Διάταξη για πολυφωτονική μικροσκοπία.

<https://web.mit.edu/solab/Documents/Assets/So-2PF%20light%20microscopy.pdf>

5.8 Τεχνικές υπερδιακριτικής ικανότητας

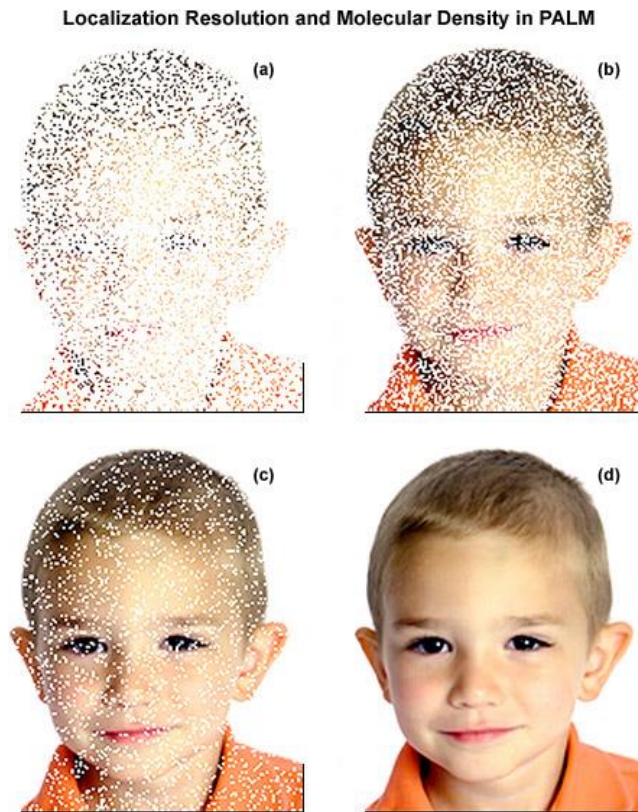
Οι τεχνικές αυτές προσεγγίζουν καλύτερα από οποιαδήποτε άλλη τεχνική τη διακριτική ικανότητα των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων. Μερικά παραδείγματα είναι η “STED” (Stimulated Emission Depletion) [6]. Σε αυτή την τεχνική υπάρχουν δύο laser. Το ένα χρησιμεύει στη διέγερση του φθορίζοντα ιχνηθέτη και το άλλο έχει σχήμα πολύ μικρού δακτυλίου. Όταν αυτά τα δύο laser συμβάλλουν μεταξύ τους, πρώτα διεγείρεται ο ιχνηθέτης κι έπειτα ο παλμός του δεύτερου laser ουσιαστικά “εξουδετερώνει” το φαινόμενο του φθορισμού κυκλικά του κέντρου. Έτσι, βελτιστοποιείται η συνάρτηση σημειακής διασποράς. Αυτό με απλές έννοιες σημαίνει ότι μικρότερο σημειακό κέντρο ισούται με καλύτερη διακριτική ικανότητα. Η τεχνική “STED” δίνει διακριτική ικανότητα μερικές δεκάδες νανόμετρα (20-50nm). Στην εικόνα 27. φαίνεται αναλυτικά ο τρόπος που συμβάλλουν τα δύο laser μεταξύ τους προς σχηματισμό μικρότερου κέντρου φθορισμού και η διαφορά μεταξύ αυτής της τεχνικής υπερδιακριτικής ικανότητας και απλής μικροσκοπίας φθορισμού.



Εικόνα 27. Δομή μικροσκοπίου για χρήση τεχνικής “STED”

<https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/superresolution/stedconcept/indexflash.html>

Μία άλλη μέθοδος είναι η “PALM” (Photoactivated localization microscopy) [7]. Σε αυτή χρησιμοποιούνται φθορίζοντα μόρια τα οποία έχουν την ιδιότητα να ενεργοποιούν και απενεργοποιούν τον φθορισμό τους έπειτα από αλληλεπίδραση με παλμό laser. Αρχικά, ένα πολύ μικρό ποσοστό της τάξεως του 1% από τα φθορίζοντα μόρια αυτά είναι ενεργοποιημένο. Ένας σύντομος παλμός ενεργοποιεί συγκεκριμένα μόρια των οποίων η τοποθεσία μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια αν αφαιρεθούν τα μη ενεργοποιημένα μόρια από την εξίσωση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές κι εντοπίζονται έτσι όλα ιχνηθετημένα μόρια με σκοπό το σχηματισμό της τελικής εικόνας μέσω του συνδυασμού των συντεταγμένων των μορίων. Η διακριτική του ικανότητα μπορεί να φτάσει κοντά στα 10nm. Σε τέτοιες διαστάσεις γίνονται πλέον ορατές βιολογικές διαδικασίες.



Εικόνα 28. Σχηματισμός εικόνα με την τεχνική “PALM”

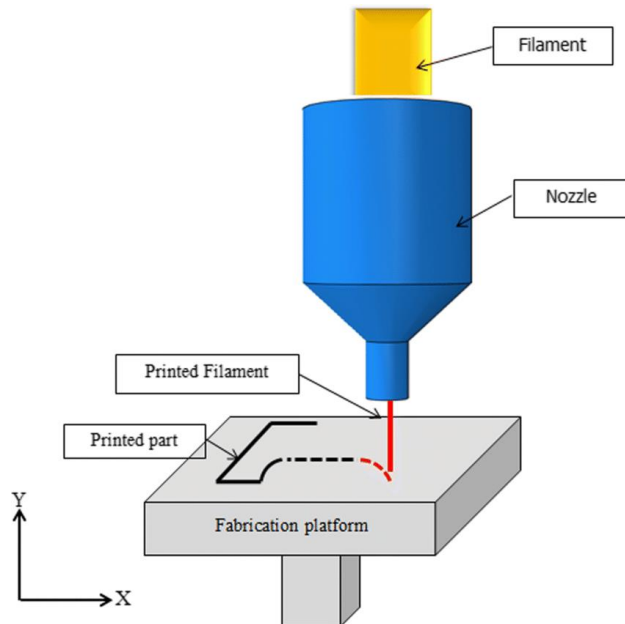
<https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/palm/introduction.html>

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η διαδικασία σχηματισμού της εικόνας στην τεχνική “PALM”. Η εικόνα “χτίζεται” σταδιακά με βήμα διαστάσεων μορίου, πράγμα που υποδηλώνει την πολύ καλή διακριτική της ικανότητα.

6. Κατασκευή

6.1 Τρισδιάστατη εκτύπωση (3D print)

Η τρισδιάστατη εκτύπωση αποτελεί επαναστατική τεχνολογία, καθώς φέρει μεγάλο αντίκτυπο στην κοινωνία. Η φιλοσοφία αυτής της τεχνολογίας βασίζεται στην προσθήκη πολλών στρώσεων υλικού το οποίο στο τέλος παίρνει το επιθυμητό σχήμα και τα χαρακτηριστικά του υλικού που χρησιμοποιήθηκε. Μπορεί να βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο, όμως η ταχεία αναγνώριση και διάδοσή της υποδηλώνει το πλήθος των πλεονεκτημάτων που έχει να προσφέρει αναλόγως την εφαρμογή. Ξεκινώντας από τα βασικά, το ουσιαστικότερο πράγμα που προσφέρει είναι η ελευθερία της δημιουργίας. Με λίγα λόγια, οποιοδήποτε σχέδιο μπορεί να πάρει υλική υπόσταση χάρη στην τεχνολογία αυτή. Αυτό σε συνδυασμό με την εύκολη πρόσβαση που μπορεί να έχει κανείς σε έναν 3D print εκτυπωτή προωθεί τη δημιουργικότητα, την ανακάλυψη νέων τεχνολογιών και πατεντών, την ανάδειξη των γνώσεων ανθρώπων που μέχρι πρότινος ήταν δυσκολότερο. Όλα αυτά είναι μόνο τα άμεσα προτερήματα που αφορούν τη δημιουργικότητα. Σε δεύτερο χρόνο, το θέμα αποκτά κοινωνική υπόσταση, καθώς η εύκολη και δωρεάν πρόσβαση στη γνώση και ο εκμηδενισμός των επικοινωνιακών αποστάσεων μεταξύ των ανθρώπων τους έχει ωθήσει στη συνεργασία με ένα κοινό σκοπό. Υπάρχουν διάφορα “open projects” που εκπροσωπούν ακριβώς αυτό. Για παράδειγμα, το πρότζεκτ “UC2” (You see too) τρέχει σε μία πλατφόρμα (GitHub) και έχει ως σκοπό την κατασκευή ενός μικροσκοπίου, όπως και η εργασία αυτή. Εν ολίγοις, άνθρωποι συνεργάζονται μεταξύ τους, ανταλλάσσουν γνώσεις, καινοτομούν και γενικώς συμβάλλουν όσο μπορεί ο καθένας για να φτάσουν όλο και πιο κοντά στο στόχο τους. Συνεχίζοντας με πιο πρακτικά πλεονεκτήματα, η τρισδιάστατη εκτύπωση είναι τόσο προσιτή από τον απλό κόσμο χάρη στο χαμηλό κόστος των κατασκευών. Από τα πιο διαδεδομένα υλικά που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις εκτυπώσεις είναι το “PLA” (polylactic acid) που είναι θερμοδιαστελλόμενο. Η τεχνική εκτύπωσης που χρησιμοποιεί το υλικό αυτό ονομάζεται “FDM” (Fused Deposition Modeling) [8]. Πιο συγκεκριμένα, νήμα του υλικού αυτού εισέρχεται στην κεφαλή του εκτυπωτή η οποία ανεβάζει σταδιακά θερμοκρασία μέχρι να σταθεροποιηθεί, περίπου στους 235° C και το ρευστοποιεί. Έπειτα, η κεφαλή αφήνει υλικό στον άξονα x,y βάσει του σχεδίου. Έπειτα από το πρώτο πέρασμα έχει δημιουργηθεί ουσιαστικά μία δισδιάστατη κάτοψη της βάσης του σχεδίου. Στη συνέχεια, η κεφαλή μετακινείται ελάχιστα χιλιοστά πιο πάνω και είναι έτοιμη να εκτελέσει το δεύτερο πέρασμα. Ύστερα από έναν αριθμό περασμάτων, έχει πλέον δημιουργηθεί ένα τρισδιάστατο αντικείμενο. Να σημειωθεί ότι το “PLA” αφού αφήσει τη θερμή κεφαλή μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου στερεοποιείται ξανά. Η εικόνα 29. δείχνει παραστατικά την αρχή της διαδικασίας. Από που εισέρχεται το υλικό και που τελικά αποτυπώνεται.



Εικόνα 29. Τεχνική FDM.

https://www.researchgate.net/figure/A-schematic-illustration-of-the-FDM-3D-printing-technology_fig1_333719097

Το “PLA” είναι φθηνό υλικό σε σχέση με αντίστοιχες μεταλλικές κατασκευές και κληρονομεί και τις ιδιότητές του όπως το μειωμένο βάρος. Βέβαια, υστερεί σε στιβαρότητα αλλά αναλόγως τον σκοπό της κατασκευής είναι χρησιμότερο να είναι ελαφριά και φορητή. Οι τρισδιάστατες κατασκευές δεν περιορίζονται όμως μόνο στην ατομική χρήση. Βιομηχανίες έχουν εντάξει την κατασκευαστική αυτή μέθοδο και σε αρκετές περιπτώσεις βασίζονται και κυρίως σε αυτή. Για παράδειγμα, ταχεία ανάπτυξη γνωρίζει ο κλάδος των ιατρικών εμφυτευμάτων που με χρήση κατάλληλων βιοϋλικών σχεδιάζονται κι εκτυπώνονται.

6.2 Μεθοδολογία

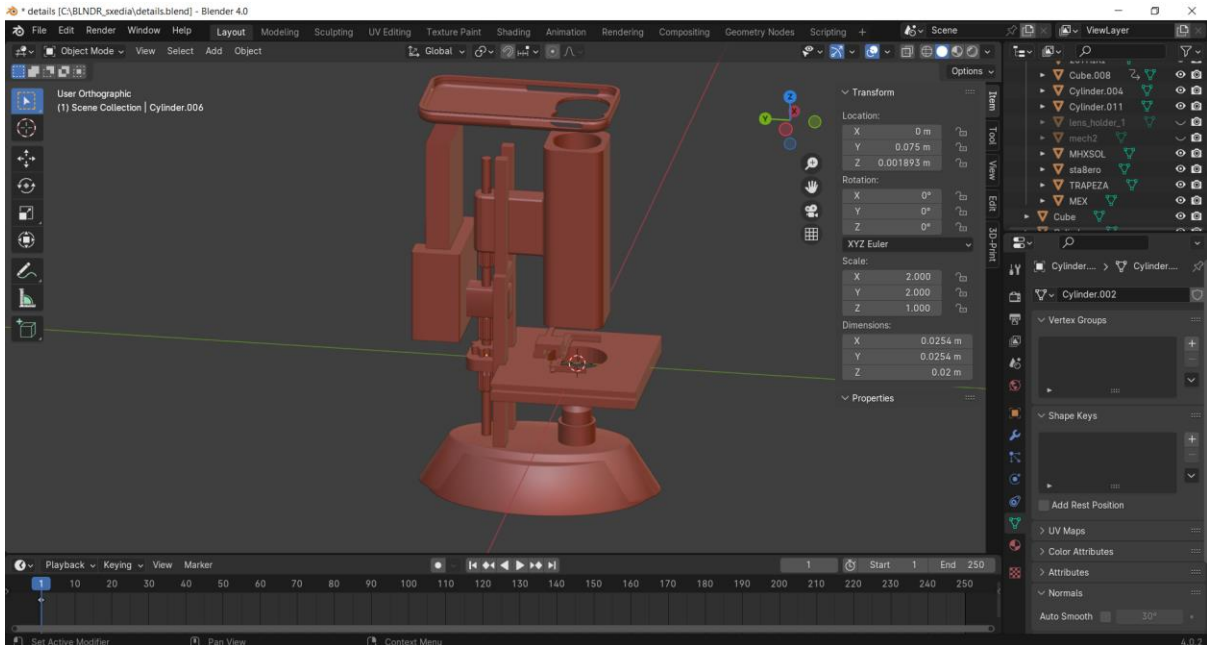
Γενικά, η εκτύπωση τρισδιάστατων κατασκευών είναι μόνο μία συνιστώσα ενός μεγαλύτερου συνόλου. Η αλληλουχία που ακολουθείται για να φτάσει κανείς στο τελικό αποτέλεσμα περιλαμβάνει την ιδέα, το σχέδιο, την εκτύπωση και την μετέπειτα επεξεργασία.

Πρώτη δουλειά λοιπόν, είναι να οραματιστεί κανείς το σχέδιο. Αυτό βέβαια δεν σημαίνει πως είναι εξαρχής γνωστή η τελική του μορφή. Από κάπου γίνεται η αρχή κι έπειτα ακολουθεί το σταδιακό χτίσιμο. Επιπλέον πρέπει να έχει κανείς υπόψη ορισμένες προϋποθέσεις και παραμέτρους καθώς “χτίζει” το σχέδιο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση σημαντικές παράμετροι είναι η σωστή ευθυγράμμιση όλων των στοιχείων έτσι ώστε να μην αποκλίνει από τα προβλεπόμενα η φωτεινή ακτινοβολία και υποβιβάσει την τελική απεικόνιση. Κύριο μέλημα είναι επίσης η μηχανική του. Εφόσον το σχέδιο πρόκειται για κατακόρυφη κατασκευή πρέπει να ληφθούν υπόψη όλες οι δυνάμεις που δρουν στο σύστημα αυτό. Πόσο μάλλον στην συγκεκριμένη περίπτωση που ο άξονας που συνδέει όλα τα στοιχεία μεταξύ τους διαφέρει από το κέντρο βάρους της συνολικής κατασκευής. Στη συνέχεια, δεδομένου ότι το σχέδιο είναι άρτιο φυσικά και τηρούνται οι προϋποθέσεις για την ομαλή λειτουργία του σειρά έχει η

ευχρηστία του, το ποσοστό ευκολίας και άνεσης που θα προσφέρει στον χρήστη. Τέλος, σειρά έχει το εμφανισιακό κομμάτι. Στόχος πρέπει να είναι μία κατασκευή απλή δίχως περιττά στοιχεία που περιπλέκουν τη δομή της εκτός κι αν εξυπηρετούν από αισθητική άποψη. Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω είναι τα νοητά εφόδια που καλείται κανείς να έχει πριν ξεκινήσει να σχεδιάζει.

Ξεκινώντας λοιπόν, από το πρακτικό κομμάτι, πρώτο βήμα είναι η επιλογή της εφαρμογής σχεδίασης. Γι' αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε το "blender", ένα νέο σε σχέση με άλλα προγράμματα τρισδιάστατης σχεδίασης. Ένας από τους λόγους επιλογής του είναι ότι διατίθεται δωρεάν. Άλλος σημαντικός λόγος είναι η δημοτικότητα του. Πρόκειται για ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πρόγραμμα καθώς συνδυάζει χαρακτηριστικά κι από άλλες εφαρμογές δίνοντας τα ύστατα αποτελέσματα. Η δημοτικότητα του το καθιστά "ζωντανό", δηλαδή υπάρχουν πολλά διαθέσιμα διαπαιδαγωγικά βίντεο κι ενεργές κοινότητες που προωθούν την πιο εύκολη και γρήγορη κατανόηση του προγράμματος.

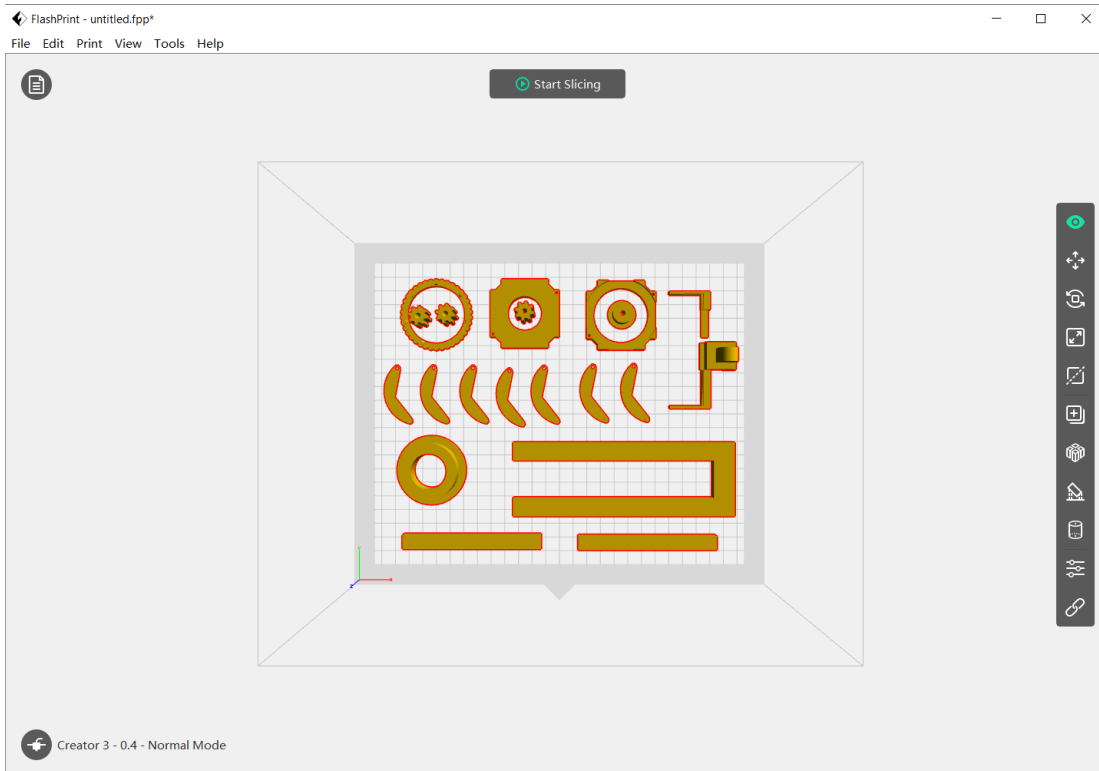
Αφού έχει επιλεγεί και το πρόγραμμα σχεδίασης, σειρά έχει η διαδικασία. Χρειάζονται μερικές εβδομάδες για να εξοικειωθεί κανείς με το πρόγραμμα και τα εργαλεία του όμως η φιλοσοφία του είναι αρκετά απλή. Ξεκινώντας από ένα απλό γεωμετρικό σχέδιο δίνονται οι σωστές διαστάσεις κι έπειτα τροποποιείται βήμα βήμα βάσει της αρχικής ιδέας. Στην περίπτωση αυτή, η αρχή έγινε από την τράπεζα του δείγματος, τους μηχανισμούς κίνησης σε x,y άξονα που προσαρμόστηκαν πάνω στην τράπεζα, τη βάση του μικροσκοπίου, τον μηχανικό σωλήνα και τέλος τη βάση για το κινητό που θα λειτουργήσει ως μέσο ψηφιακής απεικόνιση. Αρκετά χρονοβόρα διαδικασία γιατί στην πραγματικότητα δεν γίνεται να πάνε όλα βάσει σχεδίου. Υπάρχουν πολλές αναπροσαρμογές καθόλη τη διάρκεια της σχεδίασης, εμπόδια που μπορεί να συναντήσει κανείς λόγω ελλιπούς γνώσης χειρισμού του προγράμματος ή απλά επειδή δεν τα είχε λάβει υπόψη. Αξίζει να τονιστεί η σωστή κλίμακα που πρέπει να έχει το σχέδιο. Καλώς ή κακώς υπάρχουν γνώσεις οι οποίες αποκτούνται με την εμπειρία. Έτσι κι εδώ οι διαστάσεις των αντικειμένων είναι μια από αυτές τις περιπτώσεις. Για παράδειγμα, κουμπώματα μεταξύ διατάξεων πρέπει να διαφέρουν κατά μερικά δέκατα του χιλιοστού κι αυτό γιατί η ακρίβεια του εκτυπωτή είναι συνήθως 1 χιλιοστό. Όμως το σχέδιο στον υπολογιστή έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα (pixels). Έτσι όταν η διακριτική ικανότητα του υπολογιστή μεταφράζεται στον εκτυπωτή χάνονται υποδιαιρέσεις του χιλιοστού και μπορεί στο τελικό σχέδιο να μη χωράνε να κουμπώσουν δύο αντικείμενα ή να υπάρξει επιπλέον χώρος ανάμεσα τους. Παρόλα αυτά αν τύχει η παραπάνω περίπτωση υπάρχουν τρόποι λύσης του ζητήματος αυτού που θα σχολιαστούν πιο κάτω.



Εικόνα 30. Απεικόνιση του σχεδίου στο περιβάλλον του Blender.

Παραπάνω απεικονίζεται μία προεπισκόπηση του σχεδίου στο περιβάλλον του προγράμματος blender. Η επιλογή κάθε κομματιού του μικροσκοπίου με τον κέρσορα εμφανίζει λεπτομερείς πληροφορίες για αυτό όσο αφορά τη γεωμετρία και την κλίμακα του.

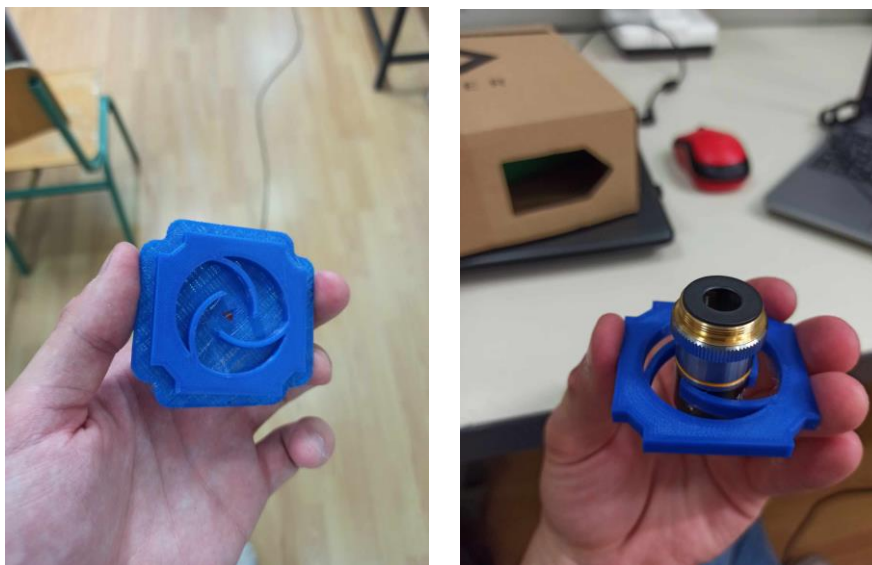
Έπειτα, ακολουθεί η εξαγωγή του σχεδίου από το πρόγραμμα σχεδίασης και εισαγωγή στον 3D εκτυπωτή. Το πιο συνηθισμένο σενάριο είναι ο εκτυπωτής να έχει δικό του λογισμικό όπου μεταφέρεται το σχέδιο σε μορφή “.stl”. Εκεί γίνονται οι τελευταίες επεξεργασίες και το “slicing” όπου είναι ουσιαστικά μία προεπισκόπηση του τρόπου με τον οποίο θα εκτυπωθεί το σχέδιο. Ποια θα είναι η πυκνότητα του, που χρειάζεται να μπου στηρίγματα, το σχήμα της αρχικής πλατφόρμας που θα πατήσει πάνω και θα εκτελεστεί το σχέδιο, η ταχύτητα της εκτύπωσης και άλλες σχετικές πληροφορίες. Στηρίγματα χρειάζονται κατά τη διάρκεια της εκτύπωσης διότι όπως έχει προαναφερθεί ο εκτυπωτής αφήνει υλικό και χτίζει από κάτω προς τα πάνω. Για παράδειγμα, μεγάλες γέφυρες, κοιλότητες που μπορεί να έχει το σχέδιο αν δεν έχουν στήριγμα μπορεί να καταρρεύσουν πριν προλάβει να ολοκληρωθεί η διαδικασία. Όταν τελειώσει το “slicing” μένει το “G code”. Αυτό πρόκειται ουσιαστικά για τη γλώσσα επικοινωνίας μεταξύ υπολογιστή και εκτυπωτή. Είναι δηλαδή κώδικας που το περιεχόμενό του είναι όλες οι κινήσεις που θα χρειαστεί να κάνει ο εκτυπωτής για να βγει το σχέδιο. Μετά το τέλος της εκτύπωσης είναι επόμενο ότι πρέπει να αφαιρεθούν η πλατφόρμα και τυχόν στηρίγματα που χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψει το τελικό προϊόν. Για τη διαδικασία αυτή μπορεί να χρειαστούν ορισμένα εργαλεία. Συνήθως ένας μικρός κόφτης αρκεί αλλά ανάλογα την πολυπλοκότητα του σχεδίου και το πλήθος του παραπάνω υλικού που χρησιμοποιήθηκε, χρήσιμο είναι και ένα πιστολάκι ζέσεως που θα βγάζει ζεστό αέρα και θα καθιστά την αφαίρεση υλικού πιο εύκολη.



Εικόνα 31. Περιβάλλον 3D εκτυπωτή της Flashforge..

Παραπάνω παρατηρείται το περιβάλλον του προγράμματος του εκτυπωτή. Περιλαμβάνει μία προεπισκόπηση των κομματιών προς εκτύπωση και έχει και διάφορες επιλογές αλληλεπίδρασης. Ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να ταξινομήσει όπως αυτός επιθυμεί τα κομμάτια για να χωρέσουν να φτιαχτούν σε μία εκτύπωση. Μπορεί να πειραματιστεί με την κλίμακα τους, να βάλει στηρίγματα όπου χρειάζεται, να κάνει slice και να δει τον εκτιμώμενο χρόνο εκτύπωσης, να πειραματιστεί με την πυκνότητα των κομματιών. Ακόμα, υπάρχουν και επιλογές που αφορούν τον εκτυπωτή όπως το ποια κεφαλή του θα χρησιμοποιηθεί για την διαδικασία. Αφού έχουν προγραμματιστεί όλα, συνδέεται μέσω IP υπολογιστής και εκτυπωτής, φορτώνεται το σχέδιο και ξεκινάει η διαδικασία.

Σε αυτό το σημείο ακολουθεί η συναρμολόγηση του μικροσκοπίου και η τελική διόρθωση όπου χρειάζεται. Επιστρέφοντας στα προαναφερθέντα περί κουμπωμάτων, στην περίπτωση που δεν ταιριάζουν, τότε μία λύση είναι να τριφτεί το επιπλέον υλικό. Στην αντίθετη περίπτωση, όπου το υλικό είναι ελλιπές, αν έχουμε μία τρύπα μεγαλύτερων διαστάσεων εκ των επιθυμητών, μία λύση είναι το γέμισμα της τρύπας με εποξική ρητίνη (υγρό γυαλί) και το άνοιγμα της εκ νέου με τρυπάνι. Μία καλή συμβουλή για την ελαχιστοποίηση της ταλαιπωρίας που μπορεί να συναντήσει κανείς που θα ακολουθήσει μία αντίστοιχη διαδικασία είναι αντί για την κατασκευή μεγάλων και ενιαίων κατασκευών, η προτίμηση μικρότερων που θα συνδέονται μεταξύ τους. Έτσι, αν υπάρχει κάποιο λάθος μη επιδιορθώσιμο να μη χρειαστεί να αντικατασταθεί ολόκληρη η κατασκευή αλλά μόνο εκείνο το μικρό κομμάτι. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται το κόστος και το υλικό που χρησιμοποιείται καθώς και ο χρόνος εκτύπωσης.



Εικόνα 32. Συγκρατητής αντικειμενικού φακού πριν και μετά την αφαίρεση του υλικού πλατφόρμας.

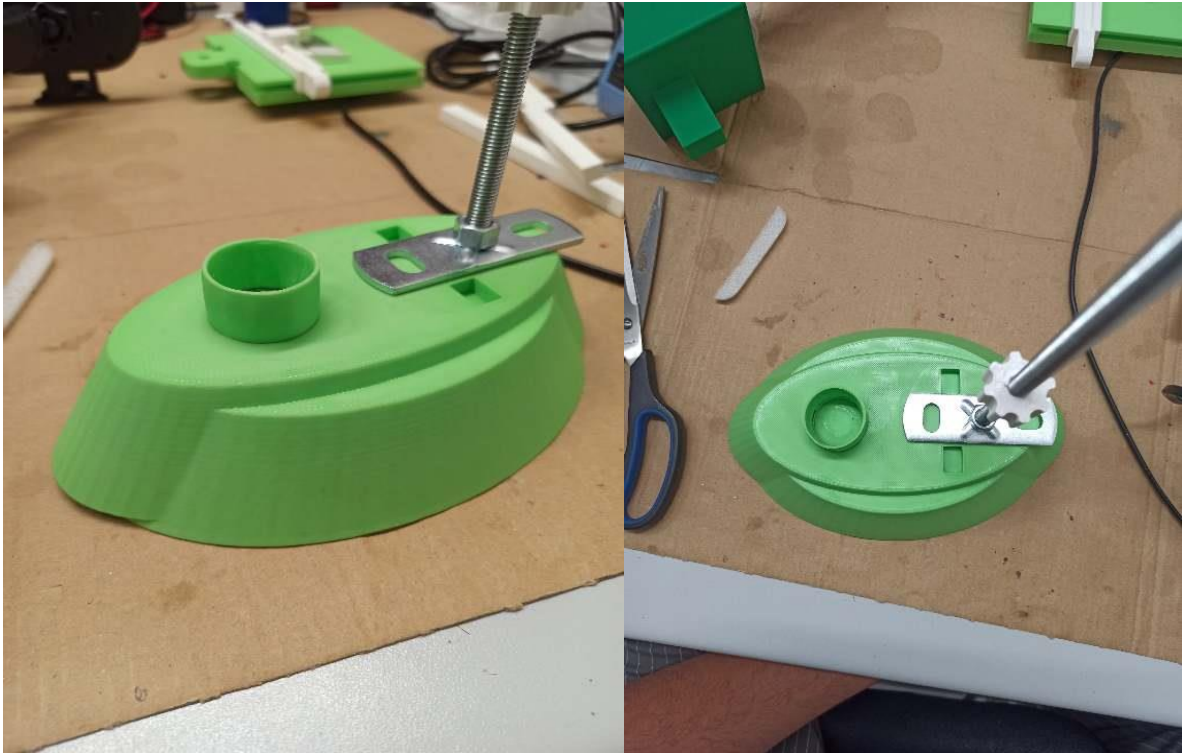
Στην εικόνα 32. παρατηρείται ο συγκρατητής του αντικειμενικού φακού όπως βγήκε από τον εκτυπωτή (αριστερή εικόνα) κι έπειτα από την αφαίρεση του επιπλέον υλικού (δεξιά εικόνα). Εν κατακλείδι, αυτά είναι τα βασικά πράγματα που παρατηρήθηκαν κατά την περάτωση της διαδικασίας.

6.3 Σχολιασμός παρούσας κατασκευής

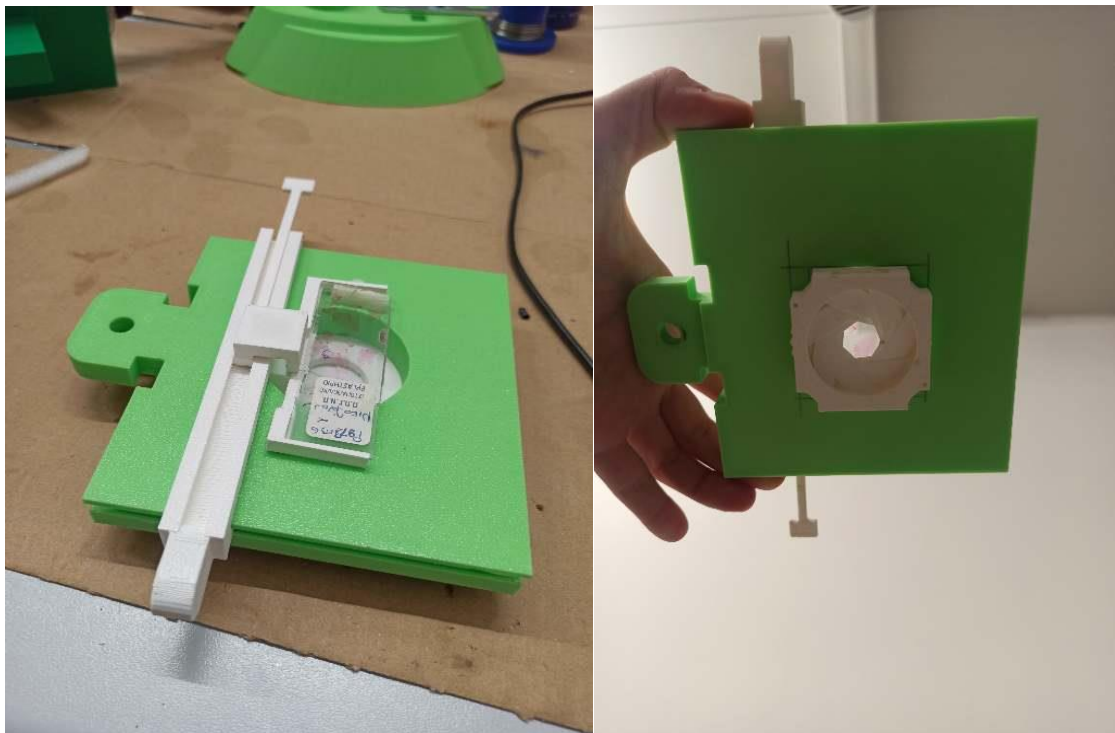
Η βάση του μικροσκοπίου είναι ουσιαστικά η αρχή του μικροσκοπίου. Εκεί προσδένονται αρκετά στοιχεία όπως ο φακός που αποτελεί την πηγή του φωτός, το σταθερό που περιορίζει την κίνηση στον οριζόντιο άξονα και η ντίζα όπου αποτελεί τη “σπονδυλική στήλη” της κατασκευής.

Η τράπεζα δείγματος πρόκειται για μία απλή ορθογώνια κατασκευή με μία τρύπα στο κέντρο για να διέρχεται το φως και μία θήκη στην αριστερή του πλευρά όπου εκεί εφαρμόζει “συρταρωτά” ο μηχανισμός κίνησης του y άξονα. Όπως φαίνεται κι από τις εικόνες παρακάτω, ο μηχανισμός x άξονα εφαρμόζει αντίστοιχα πάνω στον μηχανισμό y άξονα και έχει μία προέκταση για τη διευκόλυνση του χρήστη. Η τράπεζα στηρίζεται από το πίσω μέρος της πάνω στη ντίζα. Επιπλέον, φέρει από κάτω ένα διάφραγμα. Το διάφραγμα αποτελεί σχέδιο του πρότζεκτ “UC2” (You.see.too) που θα αναφερθεί παρακάτω και αποτελείται από 7 “φύλλα” απαγκιστρωμένα σε έναν γριναζοειδή δακτύλιο και η τετράγωνη δομή αποτελεί το καπάκι του. Από όλες τις πλευρές του τετραγώνου προεξέχει από λίγο ο γριναζοειδής δακτύλιος κι από εκεί δίνεται η δυνατότητα ρύθμισης της οπής του.

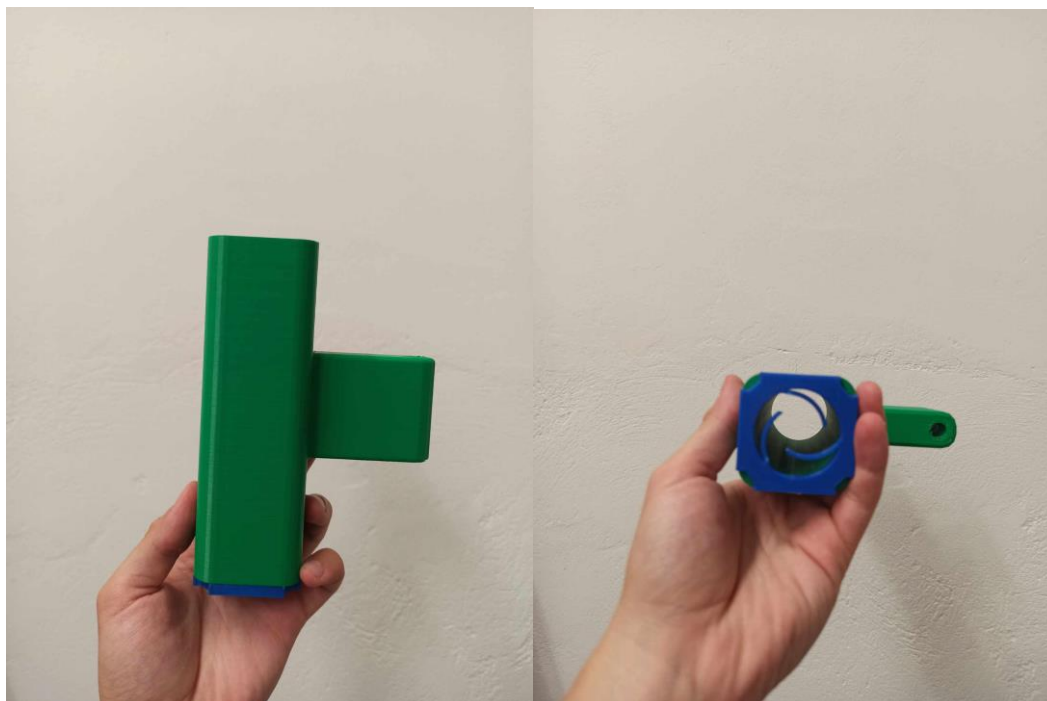
Η κατασκευή του μηχανικού σωλήνα πρόκειται για ένα σωλήνα 16 εκατοστών όπως ορίζει η θεωρία σαν σωστό μήκος για τη σωστή εστίαση του ειδώλου του αντικειμενικού φακού στο φακό παρατήρησης. Από κάτω ο μηχανικός σωλήνας φέρει ένα συγκρατητή αντικειμενικού φακού, που αποτελεί κι αυτός σχέδιο του πρότζεκτ UC2, και ο ίδιος στηρίζεται κι αυτός στη ντίζα.



Εικόνα 33. βάση μικροσκοπίου μαζί με τη ντίζα, τη βάση της ντίζας και ένα κοχλία



Εικόνα 34. τράπεζα δείγματος εξοπλισμένη με τους μηχανισμούς κίνησης στους άξονες x,y και το διάφραγμα



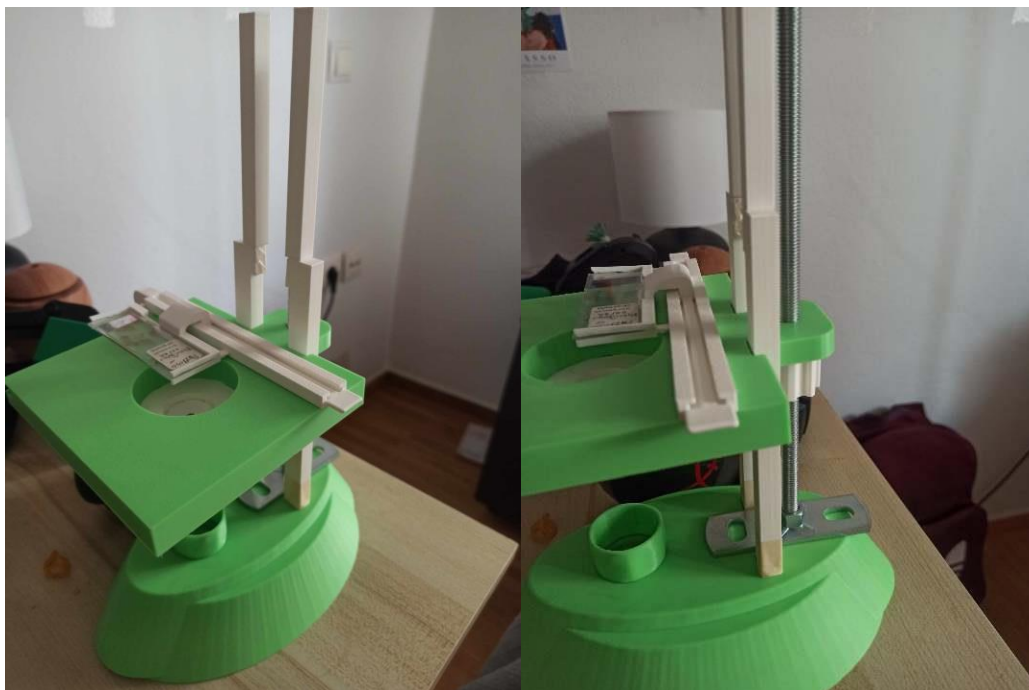
Εικόνα 35. μηχανικός σωλήνας μαζί με τον συγκρατητή του αντικειμενικού φακού

Αυτό το σχέδιο πρόκειται για έναν απλό μηχανισμό που συγκρατεί τη βάση του κινητού. Ο λόγος που έγινε η παραπάνω επιλογή για το σχέδιο είναι διότι καθόλη τη διάρκεια της κατασκευής υπήρξαν πολλές απρόοπτες καταστάσεις που οδήγησαν σε εκ νέου κατασκευή ορισμένων κομματιών. Στην περίπτωση αυτή, φαίνεται ιδανικότερο η κατασκευή η οποία θα στηρίζεται το κινητό να μπορεί να έχει ευελιξία ως προς τις κινήσεις της για να μπορέσει ο παρατηρητής να την προσαρμόσει ανάλογα για να λάβει τη βέλτιστη εικόνα. Επίσης, διαφορετικά κινητά μπορούν να τοποθετηθούν πάνω στη βάση και να προσαρμοστεί όλο το σύστημα. Μία εξ ολοκλήρου 3D printed βάση κινητού θα ήταν πολύ χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία, επομένως προτιμήθηκε η εναλλακτική αυτή.

Η ντίζα έχει πολλά να προσφέρει στο σύνολο της κατασκευής. Αρχικά, πρόκειται για ένα ελαφρύ αλλά ταυτόχρονα σταθερό άξονα στον οποίο θα συγκρατηθούν τρεις σημαντικές δομές. Με τη χρήση μεταλλικής βάσης πάνω στη βάση του μικροσκοπίου προσδίδεται επιπλέον σταθερότητα. Ταυτόχρονα, στη ντίζα πάνω υπάρχουν παξιμάδια και γρανάζια που χρησιμεύουν στην μετακίνηση των δομών που στηρίζονται πάνω τους στον άξονα z.



Εικόνα 36. γρανάζι για την κίνηση στον z άξονα



Εικόνα 37. Σταθερό.

Το σταθερό που φαίνεται στην εικόνα 37, κουμπώνει πάνω στη βάση κι αποτρέπει την κίνηση της τράπεζας του δείγματος και του μηχανικού σωλήνα στον οριζόντιο άξονα.



Εικόνα 38. θήκη βάσης κινητού.

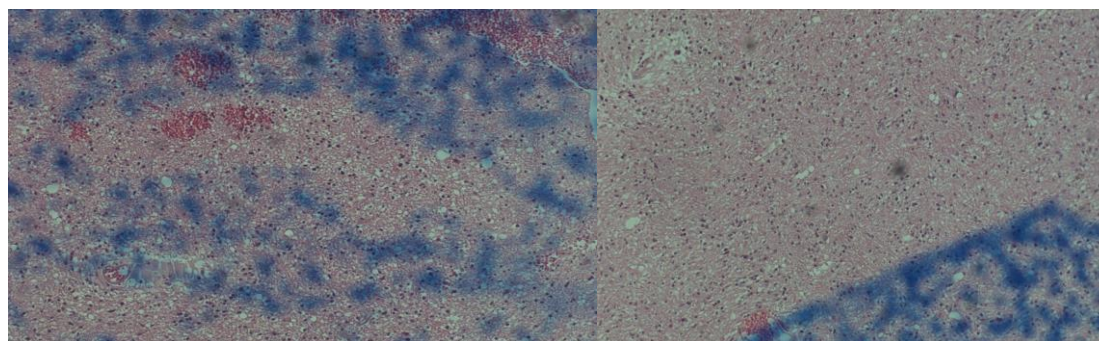
Στην εικόνα 38, φαίνεται μία βάση κινητού εμπορίου στην οποία έχει σχεδιαστεί και εκτυπωθεί μία θήκη που έχει υποδοχή για να τοποθετηθεί στην ντίζα. Η βάση του κινητού έχει τη δυνατότητα περιστροφής και επιμήκυνσης του βραχίονά της.

Οι παρακάτω εικόνες έχουν φωτογραφηθεί με κάμερα κινητού “Huawei P20” και χρήση αντικειμενικού φακού x10. Η λήψη της εικόνας δεν ήταν ιδιαίτερα εύκολη διαδικασία, καθώς χρειάζεται αρχικά η σωστή τοποθέτηση του κινητού πάνω από το μηχανικό σωλήνα με σκοπό την καλύτερη εστίαση στο δείγμα. Άλλη μία δυσκολία που υπήρξε στη συνέχεια είναι η

υπερβολική έκθεση φωτός του δείγματος. Αυτό βέβαια ρυθμίζεται κι από το διάφραγμα το οποίο ήταν όσο πιο κλειστό γινόταν. Παρόλα αυτά η ακτινοβολία που περνούσε το δείγμα και συνέχιζε στο μηχανικό σωλήνα ήταν αρκετά έντονη έτσι ώστε να δυσκολεύει την σωστή εστίαση της κάμερας του κινητού πάνω σε αυτό. Δοκιμάστηκαν διάφορα ημιδιαπερατά υλικά όπως ριζόχαρτο σαν φίλτρο εξασθένησης και ομογενοποίησης της φωτεινής δέσμης όμως τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα με τον φακό ως έχει. Πιο κάτω φαίνονται εικόνες που πάρθηκαν από μικροσκόπιο Leica με αντικειμενικό φακό x10. Κύριοι παράγοντες που επηρέασαν τα αποτελέσματα είναι ότι προφανώς είναι πιο ολοκληρωμένο σύστημα του μικροσκοπίου της Leica από άποψη οπτικών στοιχείων και από δόμηση. Επίσης το μικροσκόπιο της εργασίας αυτής δεν ακολουθεί τον κανόνα φωτισμού κατά Köhler πράγμα που επηρέασε την τελική εικόνα.



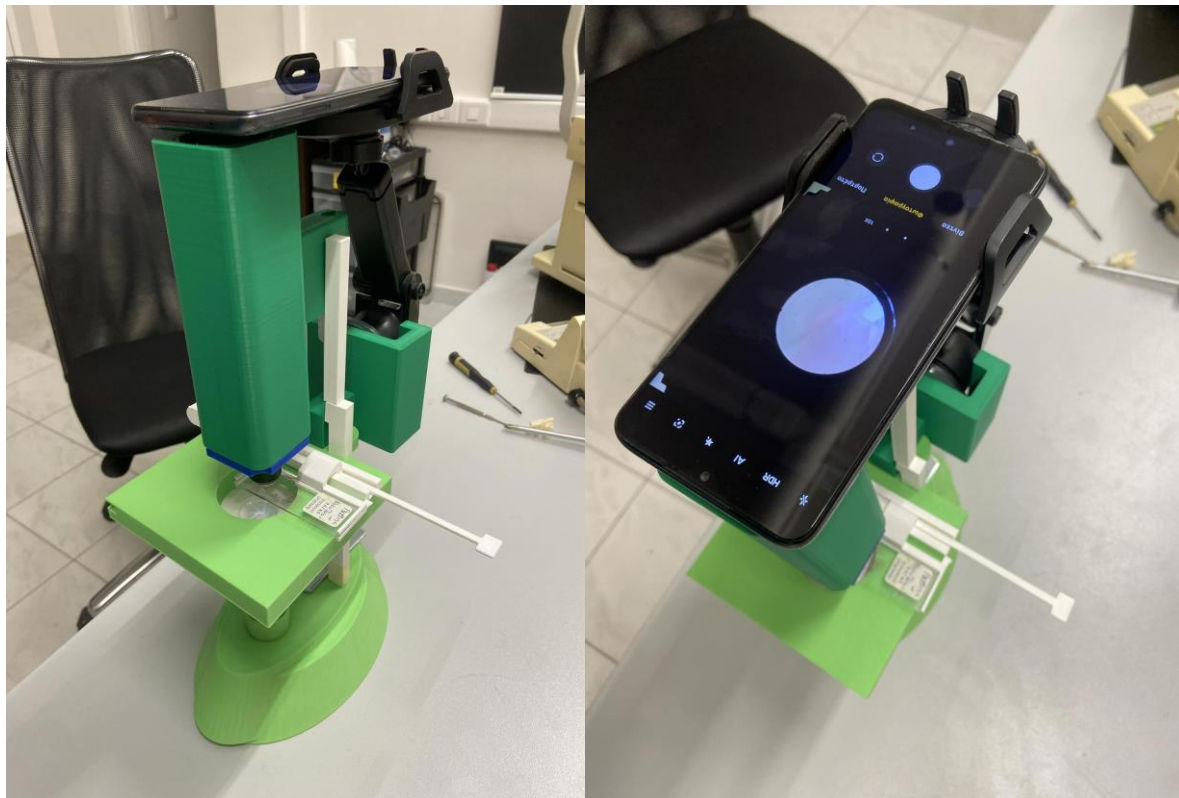
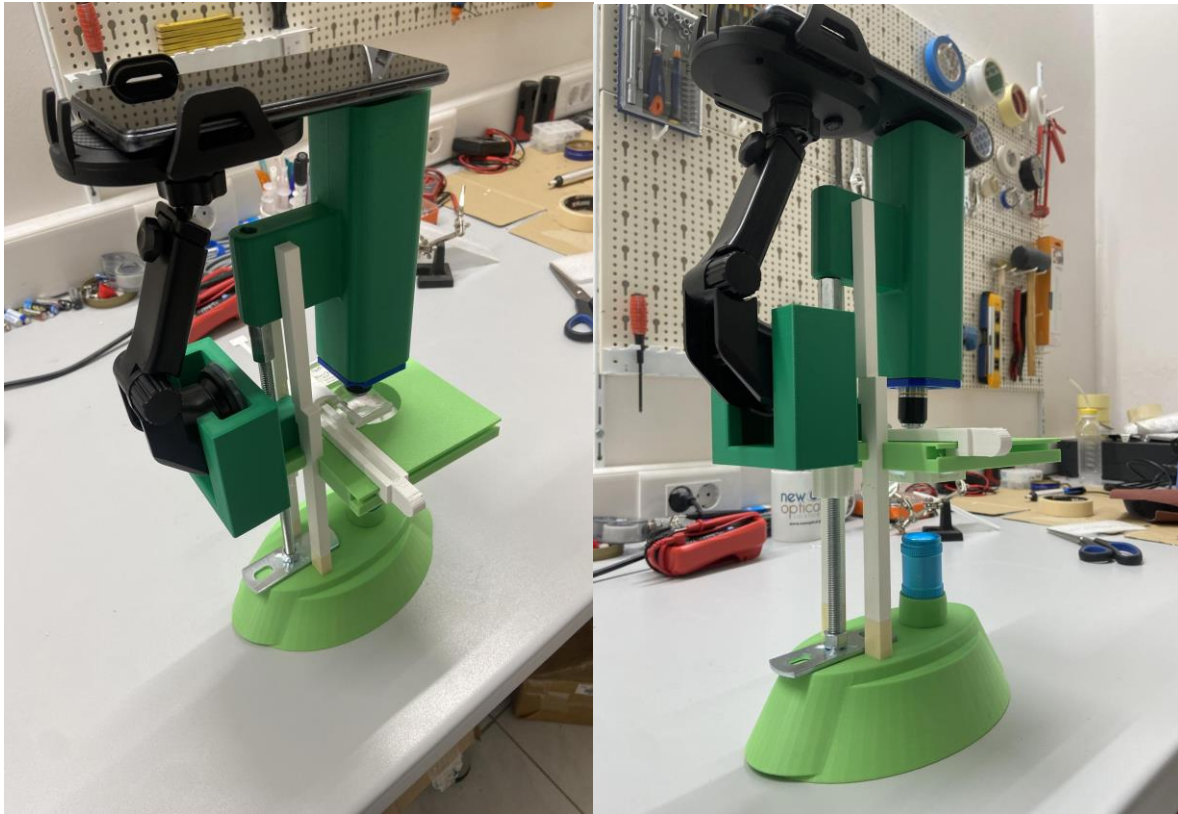
Εικόνα 39. εικόνες από Huawei P20 με μεγέθυνση x10 και αντικειμενικό φακό x10



Εικόνα 40. εικόνες από μικροσκόπιο Leica με αντικειμενικό φακό x10.

Παρακάτω φαίνεται και το μικροσκόπιο ολοκληρωμένο σε λειτουργία.

3D PRINTED ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΙΚΡΙΩΜΑΤΟΣ ΟΠΤΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ



Εικόνα 41. Ολόκληρο το 3D εκτυπωμένο μικροσκόπιο σε λειτουργία.

6.4 Παρόμοια πρότζεκτ

Σε μία περίοδο όπου οι διαδικασίες έχουν αρχίσει να περιπλέκονται όλο και περισσότερο είναι αναγκαία η ύπαρξη σχετικών “Open Source” πρότζεκτ. Η τεχνολογία των μικροσκοπίων στοχεύει συνεχώς να βελτιώσει τα αποτελέσματα των εικόνων της, όμως στην πορεία έχει δημιουργήσει περίπλοκες δομές και διατάξεις οπτικών μέσων που την καθιστούν απροσέγγιστη για τους ανθρώπους πέρα των βιομηχανιών που ασχολούνται με την παραγωγή τους. Γι’ αυτό το λόγο πρότζεκτ όπως το “FlyPi”, “OpenFlexure”, “miCube” και “UC2” φροντίζουν να κρατήσουν την επαφή μεταξύ ανθρώπου και μικροσκοπίου. Διαθέτοντας στο διαδίκτυο όλη την πιθανή γνώση που μπορεί κανείς να χρειαστεί για την κατασκευή, σύνδεση και λειτουργία ενός συμβατικού μικροσκοπίου, δημιουργείται ουσιαστικά μία κοινότητα αλληλεπίδρασης και ανταλλαγής γνώσεων. Ο πρακτικός στόχος, βέβαια, είναι η κατασκευή ενός πιο οικονομικού και απλουστευμένου μικροσκοπίου που θα έχει επαρκή διακριτική ικανότητα για μελέτη βιολογικών μικροοργανισμών. Από κάτω φαίνονται μερικές φθηνές εναλλακτικές για διάφορα στοιχεία ενός μικροσκοπίου.

Function	DAQ, Signal acquisition	Fiber-Coupling	Low SNR Camera	Image Acquisition	Data Logger	Motion	Objective Lens	Laser
	Red Pitaya	Optical Pickup	Huawei P20	Raspicam	ESP32	Stepper+Z-Stage	Cellphone Camera Lens	Single-Mode Laser, 635nm,150mW
Price	250 €	5 €	400 €	10 €	2 €	20 €	12 €	50 €

	Ti Model: PCIe-6374	Thorlabs, Piezo NanoMax	Andor iXon emCCD Camera	Basler CMOS camera	Data Logger	Piezo Actuator for Z-movement	Zeiss Objective, 20x, NA=0.3	Coherent Laser Module
Price	2500 €	4000 €	1500 €	500 €	1000 €	5000 €	1000 €	10.000 €



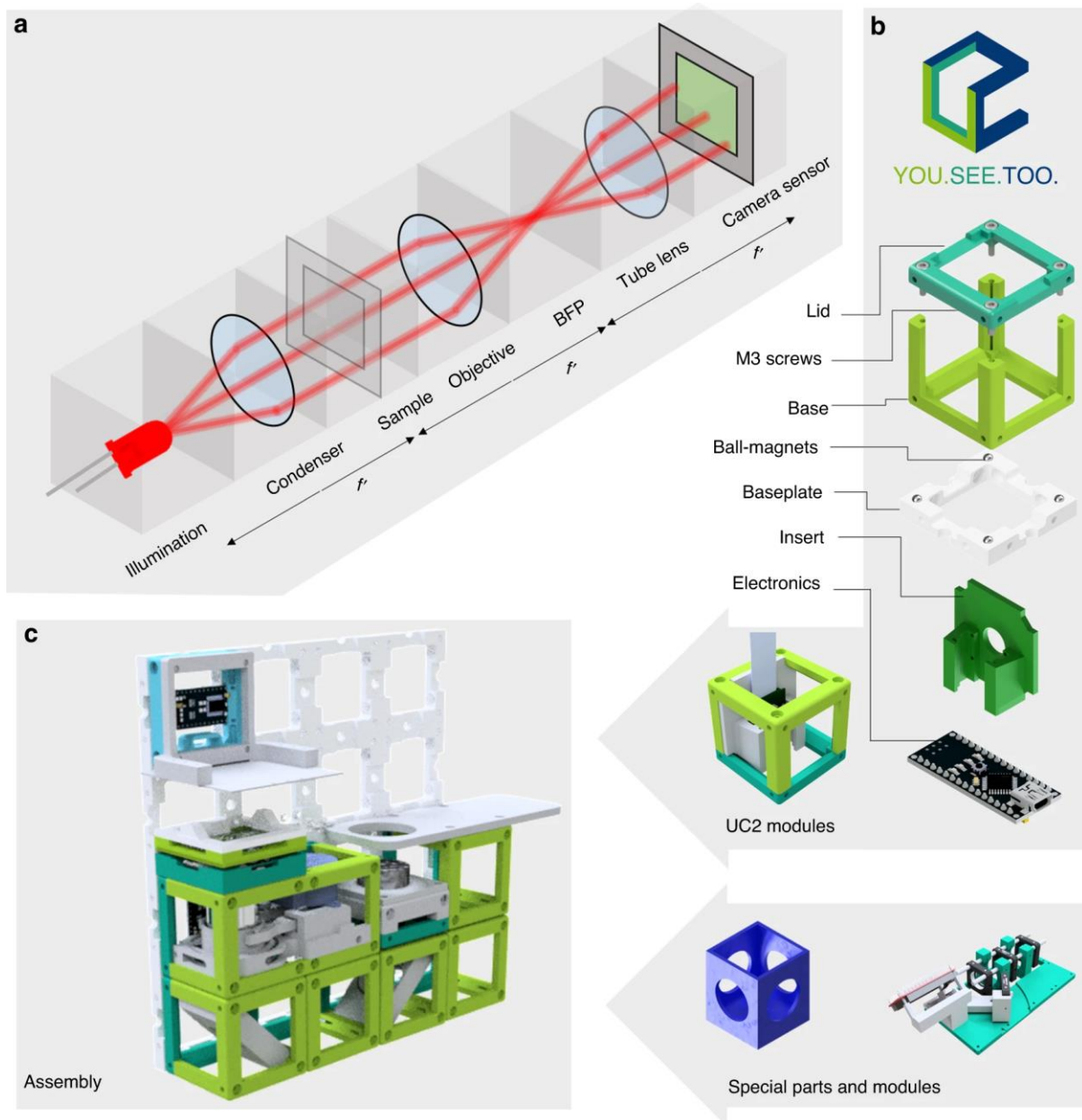
Εικόνα 42. Οικονομικές εναλλακτικές για την κατασκευή μικροσκοπίου.

<https://www.leibniz-ipht.de/en/departments/microscopy/research/a-microscope-for-everyone/>

6.4.1 UC2

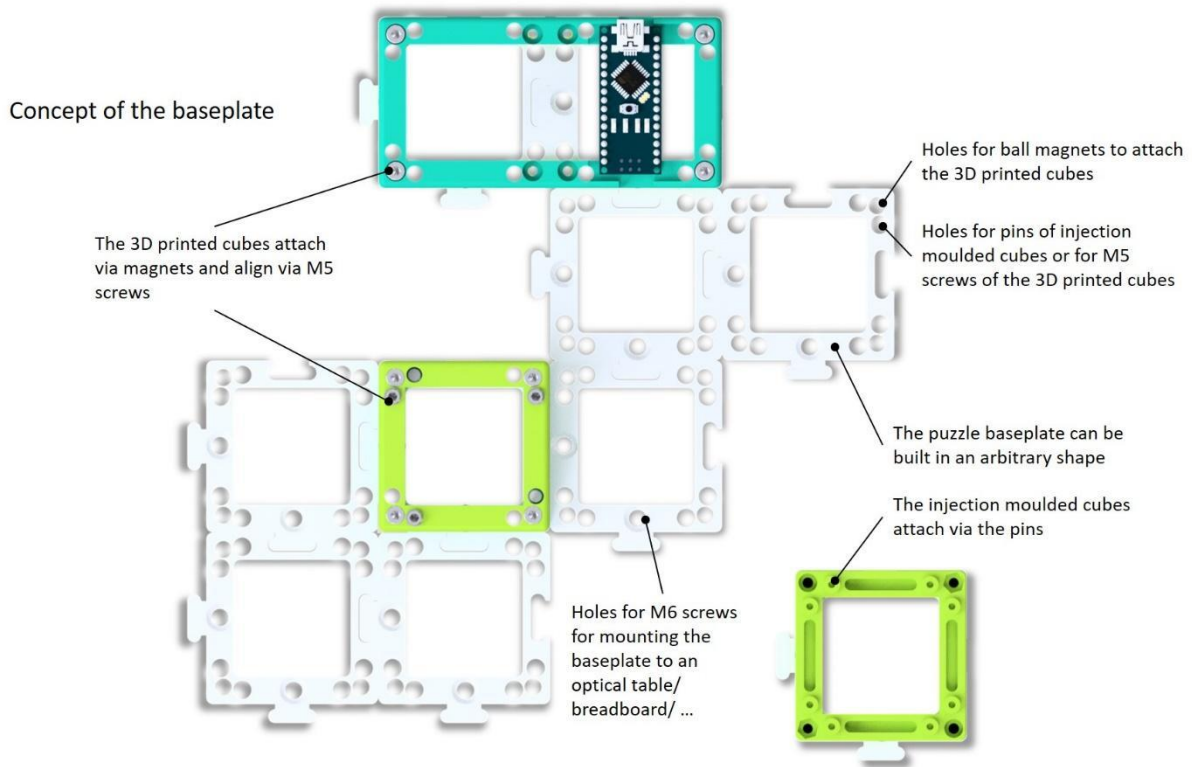
Τα παραπάνω είναι αναφορά στους στόχους του “UC2” (You.See.Too) [9]. Μία πρώτη ματιά στη δομή του μικροσκοπίου αυτού πείθει πως η απλουστευμένη μορφή του είναι πιο προσιτή στο ευρύ κοινό. Ξεκινώντας, λοιπόν, από την αρχική του ιδέα, το “UC2” προτείνει πως τα στοιχεία του όπως οι φακοί, η πηγή, ο ανιχνευτής θα περιλαμβάνονται σε κύβους, πράγμα που κάνει πιο εύκολη την συναρμολόγηση και την τροποποίηση τους. Πιο συγκεκριμένα, ο εξωσκελετός του μικροσκοπίου πρόκειται ένα απλό σχέδιο κύβου με καπάκι που κουμπώνει για σταθερότητα. Έχουν “υποδοχές” και “εξογκώματα” όπως τα κομμάτια ενός παζλ για να μπορούν να συνδέονται μεταξύ τους σε x και y άξονα. Επιπροσθέτως, περιέχουν μικρές μαγνητικές μπίλιες για πιο εύκολη εφαρμογή και αναδιάταξη ακόμα και στον z άξονα. Μέσα στον κύβο θα μπουν πλαστικές θήκες ανάλογα το εξάρτημα που θα τοποθετηθεί για να το

συγκρατήσουν στο εσωτερικό. Έπειτα από δοκιμές αποφασίστηκε ότι 50mm που είναι η κάθε πλευρά του κύβου είναι οι ιδανικές διαστάσεις καθώς, σκοπός είναι οι σωστές αποστάσεις κάθε στοιχείου έτσι ώστε να ανταποκρίνεται στο εστιακό βάθος. Άλλωστε έχει γίνει ήδη κατανοητό πως η σωστή τοποθέτηση των στοιχείων ενός μικροσκοπίου παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της εικόνας. Τα ηλεκτρονικά του μέρη μπορούν κι αυτά να τοποθετηθούν μέσα στους κύβους με κατάλληλες θήκες. [9] Στην εικόνα 43. φαίνεται α) η τοποθέτηση των στοιχείων του μικροσκοπίου και η πορεία της φωτεινής δέσμης, β) ο εξωσκελετός και ο τρόπος με τον οποίο συναρμολογείτε, γ) το πως ενώνονται οι κύβοι μεταξύ τους για να δημιουργήσουν τελικά ένα λειτουργικό μικροσκόπιο



Εικόνα 43. εξωτερική δόμηση του μικροσκοπίου UC2.

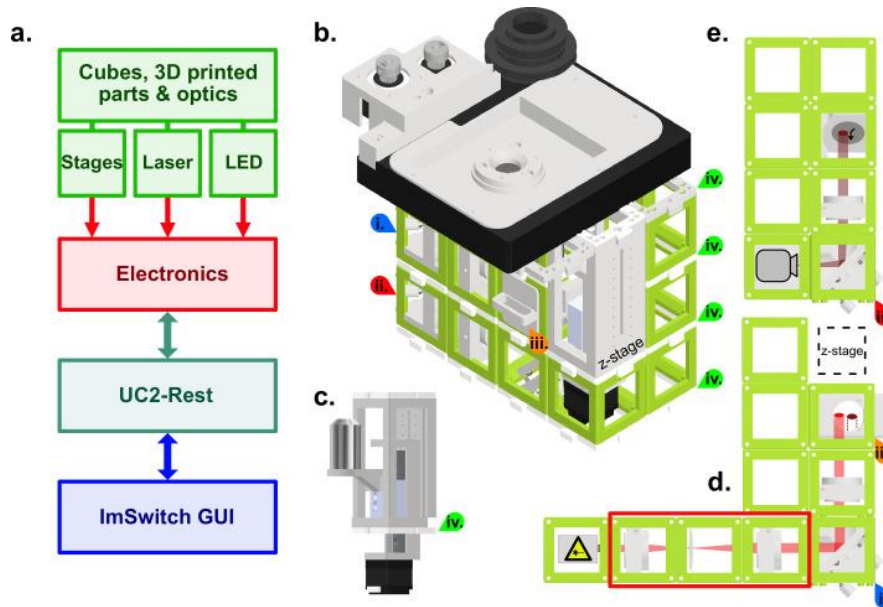
<https://www.nature.com/articles/s41467-020-19447-9>



Εικόνα 44. Επιπλέον σχολιασμός του εξωσκελετού του UC2

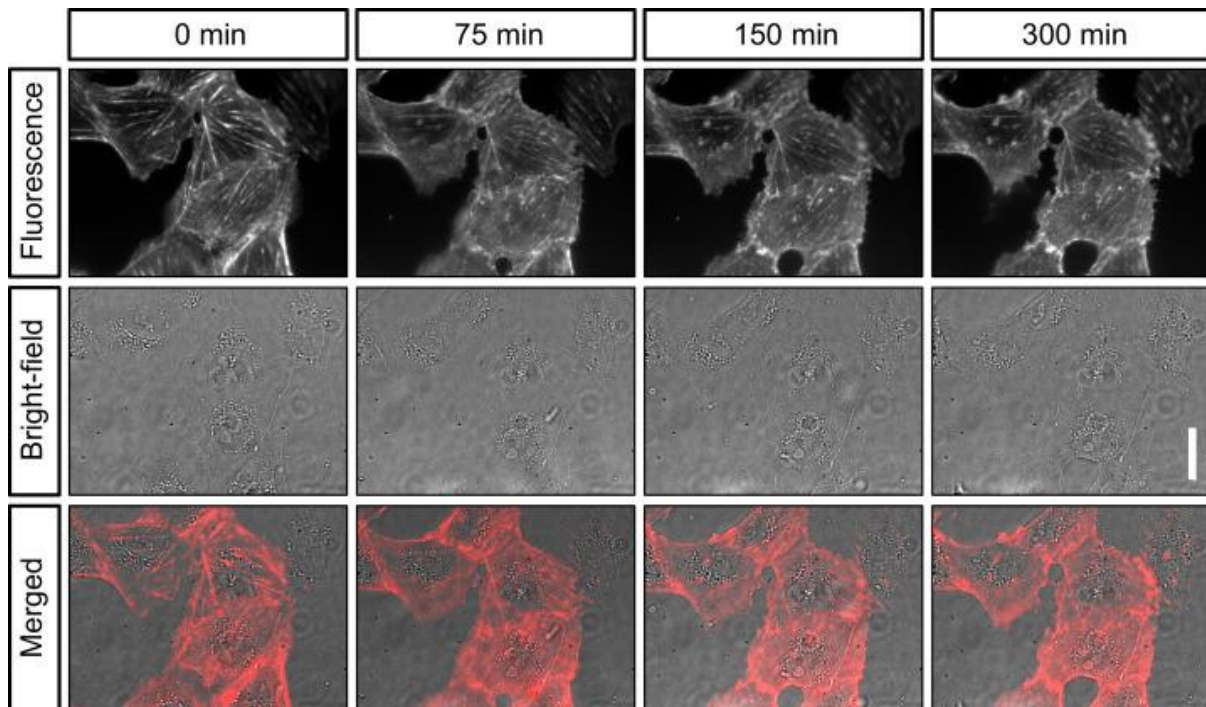
<https://www.nature.com/articles/s41467-020-19447-9>

Στην εικόνα 44. φαίνεται πιο αναλυτικά η δομή του εξωσκελετού και ποιες εσοχές δέχονται μαγνήτες και ποιες βίδες. Επιπλέον, ένα από τα πολύ βασικά προτερήματα του μικροσκοπίου αυτού είναι η εύκολη τροποποίηση του αναλόγως την τεχνική απεικόνισης που θα επιλέξει ο χρήστης. Για παράδειγμα, παρακάτω φαίνεται η διάταξη ενός μικροσκοπίου φθορισμού. Όπως φαίνεται κι από την εικόνα 45, η λευκή οριζόντια κατασκευή είναι ο μηχανισμός κίνησης στον x,y άξονα ο οποίος κινείται με μοτέρ. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο συγκρατητής του δείγματος έχει κυκλική μορφή και είναι αυτός στη μέση του μηχανισμού x,y. Από κάτω φαίνεται και ο μηχανισμός κίνησης άξονα z. Τα κομμάτια αυτά δεν αποτελούν μέρος του “UC2” όμως φαίνεται πόσο εύκολα έχουν ταιριάξει στη δομή του. Στη δεξιά πλευρά φαίνεται πιο παραστατικά τα στοιχεία του μικροσκοπίου ξεκινώντας από την πηγή laser, κάτω αριστερά, έως τον ανιχνευτή, πάνω δεξιά. Ως εκ τούτου, οι εικόνες που μπορεί να παράξει ένα τέτοιο μικροσκόπιο αναλόγως και της ποιότητας των οπτικών μέσων και ανιχνευτών που έχουν τοποθετηθεί μπορεί να φτάσει μέχρι μερικά μικρόμετρα. Η χρήση του “UC2” περιλαμβάνει συχνά “in vitro” παρατήρηση παρακολούθηση κυττάρων όπως φαίνεται παρακάτω. [10]



Εικόνα 45. Μικροσκόπιο UC2 για μικροσκοπία φορτισμού

<https://elifesciences.org/articles/89826/figures>



Εικόνα 46. Παρακολούθηση κυττάρου σε διάρκεια 5 ωρών.

<https://elifesciences.org/articles/89826/figures>

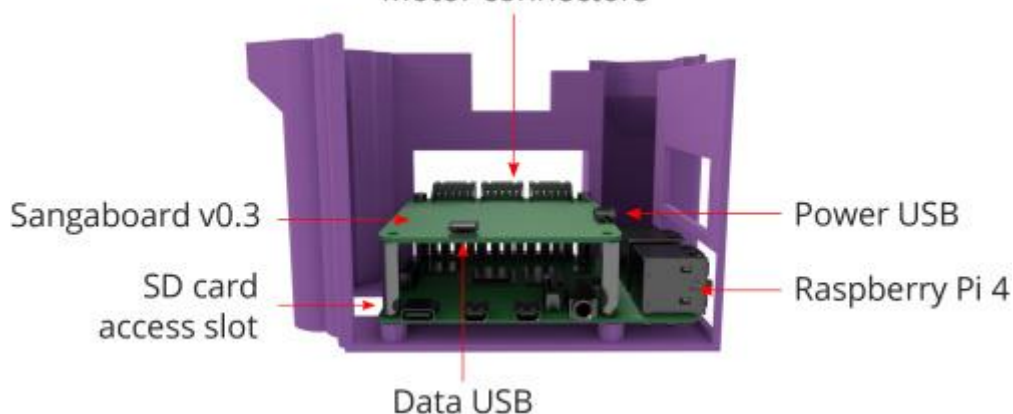
6.4.2 OpenFlexure

Το πρότζεκτ αυτό είναι εξίσου μεγάλο από άποψη δημοτικότητας και πιο προσεγμένο για καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης, περιλαμβάνει δύο σχέδια, το “delta stage”[11] και το “block stage”[12]. Ξεκινώντας από το “delta stage”, μακροσκοπικά το μικροσκόπιο αυτό αποτελείται τη βασική δομή όπου εκεί προσδένονται όλα τα υπόλοιπα οπτικά στοιχεία και μηχανισμοί και από μία κενή βάση ακριβώς από κάτω από τη βασική δομή στην οποία περιέχονται όλα τα ηλεκτρονικά μέρη. Η βασική δομή περιλαμβάνει δύο κλιπάκια των οποίων ο ρόλος είναι να συγκρατούν το δείγμα. Στην περίπτωση του “delta stage”, το δείγμα είναι σταθερό και υπάρχουν τρεις βηματικοί κινητήρες και γρανάζια που ελέγχουν την κίνηση στον οριζόντιο άξονα με μεγάλη ακρίβεια μέσω προγράμματος. Η κίνηση στον κατακόρυφο άξονα επιτυγχάνεται με τη μετακίνηση των οπτικών μέσων κι όχι του δείγματος. Το δείγμα φωτίζεται από πάνω με “LED”. Κάτω από το δείγμα, θέση έχει ο αντικειμενικός φακός. Υπό κανονικές συνθήκες, σειρά θα είχε ο μηχανικός σωλήνας κι έπειτα ο ανιχνευτής. Σε αυτή την περίπτωση όμως, για να περιοριστεί το μέγεθος του του μικροσκοπίου χρησιμοποιείται ένας φακός διόρθωσης μήκους του μηχανικού σωλήνα. Αυτός ουσιαστικά επιτρέπει το σχηματισμό της εικόνας δίχως να χρειάζεται σωλήνας 16 εκατοστών μέσα στην κατασκευή. Αμέσως μετά το μηχανισμό του φακού αυτού, τοποθετείται ο ανιχνευτής για ψηφιακή απεικόνιση. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιείται το “Raspberry pi camera v2”. Αυτό φαίνεται στην παρακάτω εικόνα ως το μικρό pcb πλακίδιο με την ενσωματωμένη κάμερα. Η ευρύτερη πλακέτα είναι το “Raspeberry pi” και αποτελεί μέρος του μικροσκοπίου καθώς εκεί συνδέεται ο ανιχνευτής και ελέγχεται η κίνηση των βηματικών κινητήρων.

Για την κατασκευή του προαναφερθέντος μικροσκοπίου λήφθηκαν υπόψη πολλές πτυχές. Οι δημιουργοί του είχαν ως στόχο τη δημιουργία ενός φθηνού μικροσκοπίου, φιλικό προς το χρήστη το οποίο θα έβρισκε χρήση σε εργαστήρια κι όχι μόνο. Όλοι αυτοί οι στόχοι επιτεύχθηκαν καθώς υπολογίζεται πως η εξ ολοκλήρου κατασκευή του μικροσκοπίου αυτού υπολογίζεται στα λίγο παραπάνω από 300 ευρώ. Τριακόσια ευρώ εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό μοιράζεται στα οπτικά στοιχεία, κυρίως τους φακούς. Όσον αφορά το δεύτερο στόχο, από την αρχή της κατασκευής κιόλας είναι εμφανές ότι πρόκειται για μία εύκολη διαδικασία. Αρχικά, η βασική δομή είναι ένα σχέδιο. Αυτό σημαίνει ότι με την εκτύπωση του κομματιού αυτού έχει ήδη ολοκληρωθεί μεγάλο μέρος της κατασκευής. Επίσης, το σχέδιο δεν απαιτεί πολλά στηρίγματα κατά την εκτύπωση του πράγμα που σημαίνει ότι έχει λιγότερη δουλειά ο κατασκευαστής στο “καθάρισμα” του. Περιλαμβάνει λίγα ακόμα εκτυπωμένα κομμάτια τα οποία συναρμολογούνται εύκολα και προσδένονται πάνω στη βασική δομή με μικρές βίδες. Δε χρειάζονται ειδικά εργαλεία δηλαδή ούτε εξειδικευμένες γνώσεις. Η χρήση του είναι κι αυτή εύκολη μέσω του ειδικού προγράμματος που παρέχει το “Open Flexure” και η τροποποίηση του ανάλογα τη μέθοδο απεικόνισης που επιλέγει ο χρήστης, δεν περιλαμβάνει ριζικές αλλαγές. Το μικροσκόπιο αυτό είναι ικανό για απεικόνιση φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου και απεικόνιση με διατεταγμένα “LED”. [11]



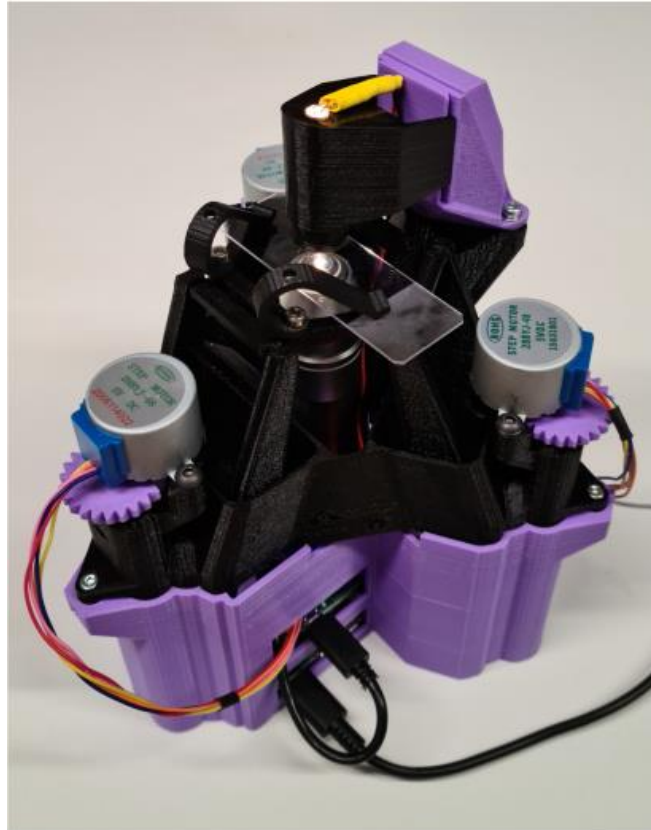
Motor connectors



Εικόνα 47. Raspberry pi και camera v2 ενσωματωμένα στην κάτω βάση του delta stage.

https://www.researchgate.net/figure/The-computing-parts-are-housed-tidily-in-the-base-of-the-OpenFlexure-Delta-Stage-This_fig2_357014333

Οι δυνατότητες αυτού του μικροσκοπίου είναι πολλές. Αρχικά, το μέγεθος και το βάρος του το καθιστούν εύκολα φορητό. Είναι εύκολη η σύνδεση και ο χειρισμός του. Πάνω στο Raspberry pi υπάρχουν υποδοχές για να συνδεθεί η οθόνη του υπολογιστή, πληκτρολόγιο και ποντίκι. Το πρόγραμμα που παρέχει το “OpenFlexure” επιτρέπει τη χρήση του μικροσκοπίου είτε δια ζώσης είτε εξ αποστάσεως με σύνδεση στο ίντερνετ. Το πρόγραμμα περιλαμβάνει την κίνηση των αξόνων, την απεικόνιση και μερικές επιλογές για τη βελτίωση της εικόνας αφού έχει ληφθεί. Η διακριτική του ικανότητα όπως θα φανεί παρακάτω είναι απολύτως ικανοποιητική για δείγματα μερικών μm . Η εικόνα από κάτω έχει παρθεί από ένα εκπαιδευτικό βίντεο στο οποίο ο άνθρωπος συναρμολογεί μέσα σε λίγα λεπτά το μικροσκόπιο delta stage και απεικονίζεται καθαρά ένα βραδύπορο.



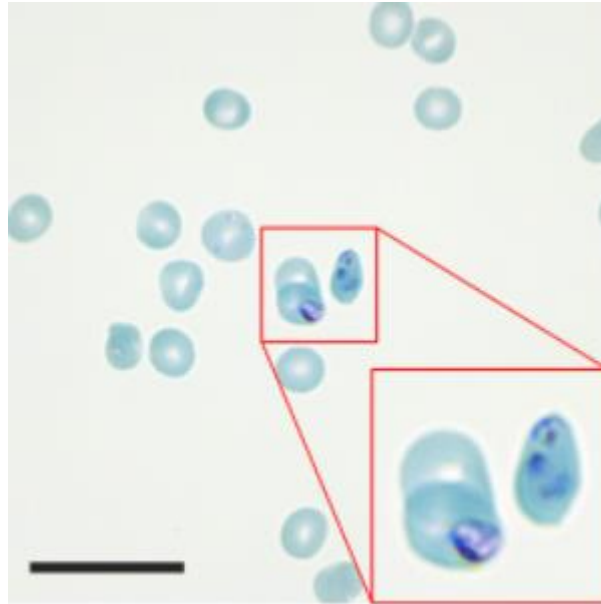
Εικόνα 48. OpenFlexure Delta stage ολοκληρωμένο

<https://opg.optica.org/oe/fulltext.cfm?uri=oe-30-15-26377&id=477856>



Εικόνα 49. απεικόνιση βραδύπορου

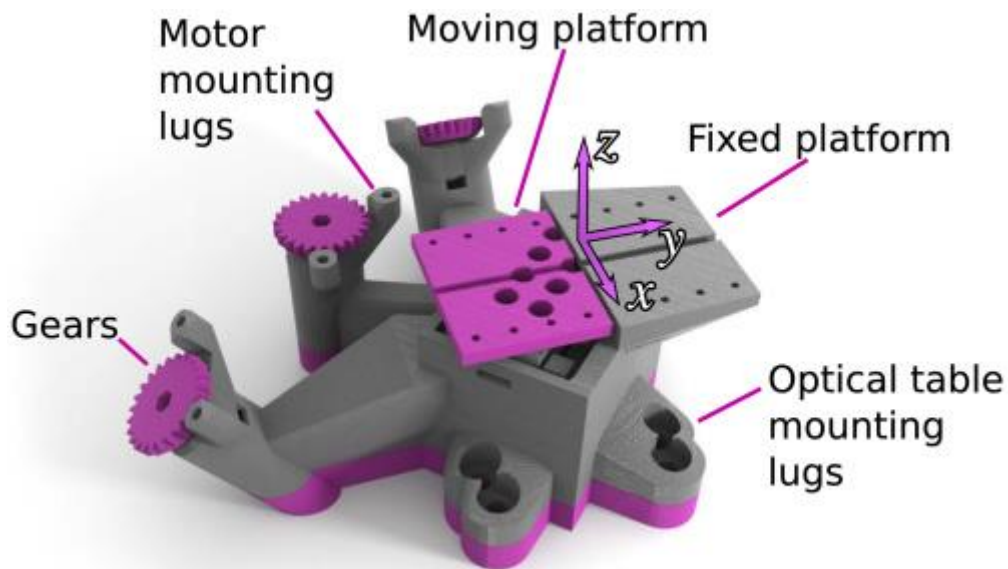
https://www.youtube.com/watch?v=eATcGuTz6To&t=8s&ab_channel=VittorioSaggiomo



Εικόνα 50. ερυθρά αιμοσφαίρια με ελονοσία. κλίμακα 20 μ m

<https://opg.optica.org/oe/fulltext.cfm?uri=oe-30-15-26377&id=477856>

Παρακάτω απεικονίζεται το μικροσκόπιο “block stage”. Κύρια δομική διαφορά του είναι ότι έχει μία κινητή τράπεζα για τις κινήσεις στους άξονες x,y σε αντίθεση με το delta stage που είναι σταθερό το δείγμα και κινούνται τα οπτικά μέσα. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του “block stage” είναι η κίνηση της τράπεζας με πολύ μικρό βήμα, κάτω από mm. Η κατασκευή του είναι κατάλληλα σχεδιασμένη έτσι ώστε να απορροφά μεγάλο μέρος κραδασμών που προέρχονται από τα μοτεράκια με σκοπό να πετύχει αυτόν τον πολύ μικρό βηματισμό. [12] Στην εικόνα 46. απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά του “block stage”.

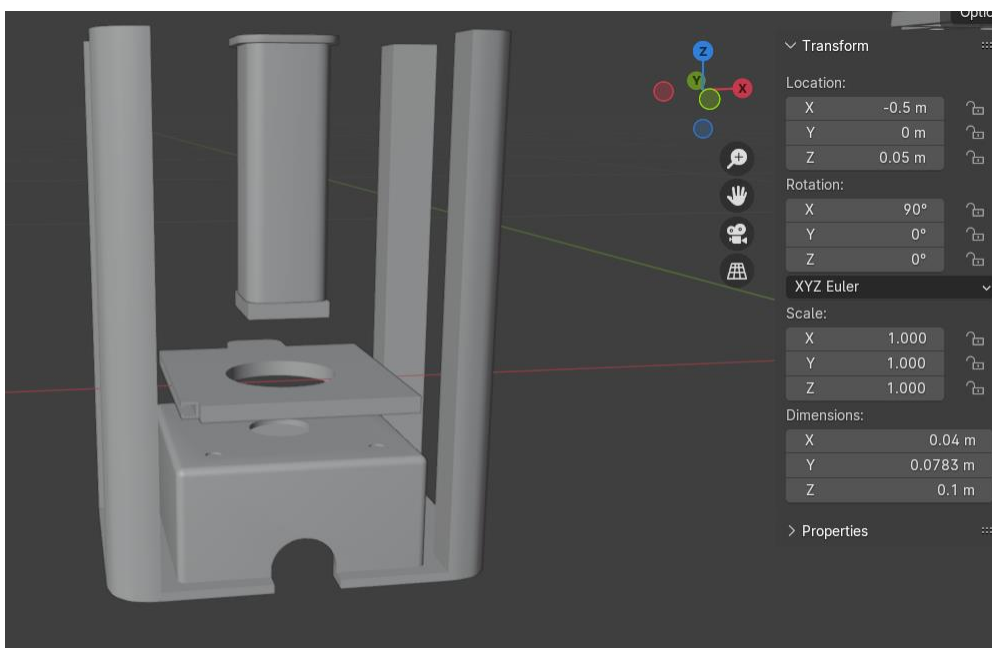


Εικόνα 51. OpenFlexure block stage

<https://opg.optica.org/oe/fulltext.cfm?uri=oe-28-4-4763&id=426579>

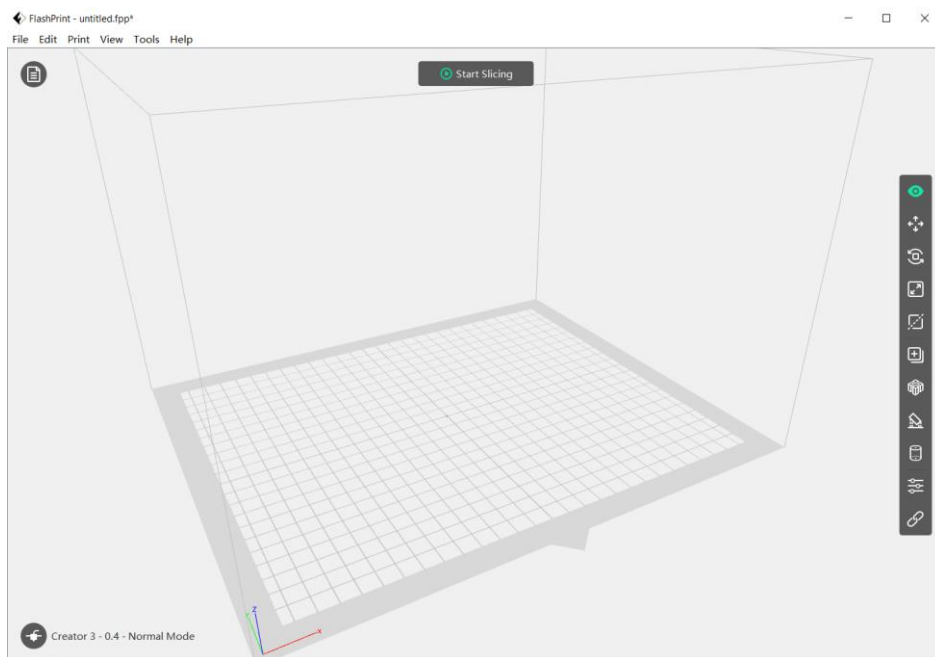
7. Σχολιασμός και συμπεράσματα

Η περάτωση αυτής της εργασίας οδήγησε σε κάποια συμπεράσματα και συνειδητοποιήσεις. Αρχικά, είναι πολύ δύσκολο να προσδιορίσει κανείς το χρόνο που μπορεί να χρειαστεί να φέρει εις πέρας ένα τέτοιο πρότζεκτ. Αυτό οφείλεται στο στόχο που θέλει ο ίδιος να πετύχει, δηλαδή αν σκοπός του είναι ένα οπτικό μικροσκόπιο το οποίο έχει καλή διακριτική ικανότητα και ταυτόχρονα είναι φιλικό προς το χρήστη, τότε σαφώς αυξάνεται ο χρόνος που θα χρειαστεί για να ολοκληρωθεί ένα τέτοιο έργο. Επίσης, ρόλο παίζει και η συχνότητα με την οποία ασχολείται κανείς με αυτό. Τέλος, πέρα από τα βασικά αυτά κριτήρια, σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει άμεσα το χρόνο ολοκλήρωσης του έργου είναι οι απρόοπτες καταστάσεις που καλείται ο δημιουργός να αντιμετωπίσει στην πορεία. Από την έναρξη κιόλας της εργασίας υπάρχει ένας καταιγισμός πληροφοριών οι οποίες πρέπει να φιλτραριστούν. Από τη θεωρία των μικροσκοπίων μέχρι την εξοικείωση με το πρόγραμμα σχεδίασης. Κάθε κομμάτι χρειάζεται να αναλυθεί ξεχωριστά και να του δοθεί η ανάλογη βάση. Ξεκινώντας από το πρόγραμμα σχεδίασης, ένα χαοτικό περιβάλλον με την πρώτη ματιά, πολλή πληροφορία και αλληλεπιδράσεις. Με το χρόνο ο χρήστης του προγράμματος μαθαίνει να αγνοεί τα εργαλεία και τις πληροφορίες που δεν του χρησιμεύουν στον σκοπό του και συνεχώς εξοικειώνεται. Σε περιπτώσεις σαν κι αυτή, μπορεί να υπάρχει κάποια έμπνευση από παρόμοια πρότζεκτ, παρόλα αυτά δεν σημαίνει ότι ξεκινάει κανείς με ένα πλάνο και παραμένει το ίδιο ως το τέλος. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει αρκετός πειραματισμός ώσπου να καταλήξει κανείς σε αυτό που θεωρεί ιδανικό για την περίπτωσή του. Όπως και σε αυτή την εργασία υπήρξαν πολλές δοκιμές, πολλά σενάρια που οδήγησαν σε μικροαλλαγές, ακόμα και περιπτώσεις που αποδείχθηκαν αδιέξοδα. Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα για παράδειγμα, ένα παλιό σχέδιο βάσης μικροσκοπίου το οποίο δε μοιάζει ούτε στο ελάχιστο με το τελικό.



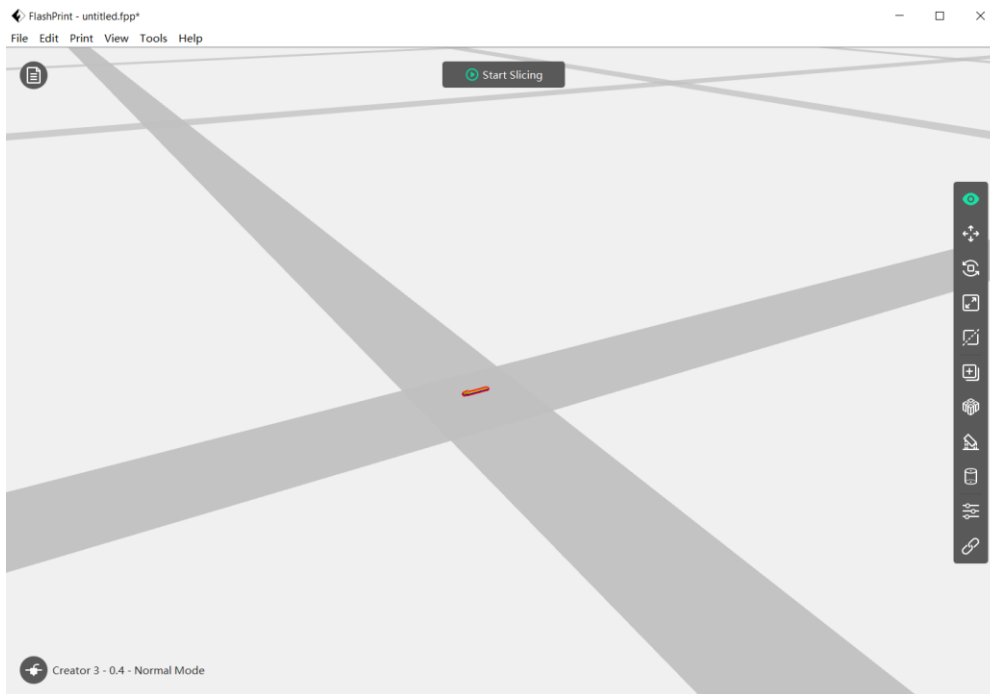
Εικόνα 52. Παλιό σχέδιο βάσης μικροσκοπίου.

Ένα άλλο εμπόδιο που έκανε τη διαδικασία πιο δύσκολη ήταν η εκτύπωση. Υπήρξαν θέματα συμβατότητας μεταξύ υπολογιστή και 3D εκτυπωτή, αλλά ακόμα κι όταν αντιμετωπίστηκαν αυτά, ήρθαν άλλες προκλήσεις να τις διαδεχτούν. Κύριο θέμα ήταν ότι πολύ συχνά τα εκτυπωμένα κομμάτια δεν ανταποκρίνονταν στις διαστάσεις που τους είχαν δοθεί. Για παράδειγμα, στη βάση του μικροσκοπίου δε χωρούσε ο φακός στη θήκη, ούτε το σταθερό στις υποδοχές, καθώς και στην τράπεζα δείγματος δε χωρούσαν οι μηχανισμοί y και x. Ακόμα και όταν μετά από προσπάθεια κούμπωναν μεταξύ τους, υπήρχε θέμα στην κίνηση τους αφού ήταν ελάχιστος ο ελεύθερος χώρος. Όσον αφορά αυτό το θέμα, δεν φάνηκε ποτέ ξεκάθαρα ποιο ήταν το πρόβλημα, βέβαια μπορούν να γίνουν μερικές εικασίες. Αρχικά, η μικρή κλίμακα στην οποία έπρεπε να εκτυπωθούν κάποια κομμάτια ενδέχεται να δυσκόλεψε το έργο του εκτυπωτή. Μία δεύτερη άποψη είναι ότι όταν μεταφέρθηκαν τα πρώτα αρχεία σε μορφή .stl στο πρόγραμμα του εκτυπωτή αυτή ήταν η εικόνα.



Εικόνα 53. “Κενό” περιβάλλον προγράμματος εκτυπωτή.

Με μία πρώτη ματιά το περιβάλλον του προγράμματος του εκτυπωτή φαίνεται κενό. Στην πραγματικότητα όμως, αν μεγεθυνθεί η εικόνα στο κέντρο θα εμφανιστεί το παρακάτω.



Εικόνα 54. 1000 φορές μικρότερη κλίμακα αντικειμένου.

Αυτό που συμβαίνει είναι ότι για κάποιο λόγο το “Blender” κατά την εξαγωγή των αρχείων του η κλίμακά τους γίνεται 1000 φορές μικρότερη. Επομένως, σε κάθε εξαγωγή απαιτούνταν η ρύθμιση x1000. Όταν η σχεδίαση γίνεται σε κλίμακα “mm” τα δεκαδικά τους ψηφία μπορούν να θεωρηθούν αμελητέα γιατί ο εκτυπωτής δεν έχει τόσο καλή διακριτική ικανότητα. Βέβαια όταν στο τέλος της σχεδίασης πολλαπλασιαστεί η κλίμακα x1000 τότε παίζουν ρόλο εκείνα τα δεκαδικά ψηφία και μπορεί να επηρεάσουν τις διαστάσεις της τελικής εκτύπωσης. Αυτό το θέμα οδήγησε σε παραπάνω επεξεργασία μετά την εκτύπωση. Αφαίρεση υλικού με γυαλόχαρτο, κεφαλές λείανσης που κουμπώνουν σε ηλεκτρικό τρυπάνι. Πολλές φορές όμως ήταν μάταιη η προσπάθεια και το κομμάτι θα χρειαζόταν επανεκτύπωση.

Άλλα θέματα που προέκυψαν λόγω ελλιπών γνώσεων πάνω στο πρόγραμμα σχεδίασης ήταν η εκτύπωση της βάσης του μικροσκοπίου. Επειδή ο σχεδιασμός της βάσης έγινε με μία τεχνική στην οποία ένα σχήμα συγχωνεύεται με ένα άλλο, κατά την εκτύπωση αντί να έχει κανονικό γέμισμα σε όλο τον όγκο της, το άνω τέταρτο της βάσης βγήκε κούφιο. Παρόλα αυτά δεν επηρεάστηκε κάπου η υπόλοιπη κατασκευή από το γεγονός αυτό επομένως παρέμεινε ως έχει. Γενικά υπήρξαν αρκετά σχεδιαστικά αδιέξοδα τα οποία χωρίς τη βοήθεια κάποιου ειδικού κατανάλωσαν χρόνο και ενέργεια στην επίλυσή τους.

Σε μία κατασκευή σαν αυτή που ουσιαστικά είναι πρωτότυπη, δηλαδή δοκιμάζεται πρώτη φορά η λειτουργικότητά της, στόχος ήταν να μην υπάρχουν μεγάλα μεμονωμένα κομμάτια και να είναι ευμετάβλητες οι αποστάσεις μεταξύ τους. Αυτό βοηθάει στο να γίνουν οι κατάλληλες ρυθμίσεις για το βέλτιστο αποτέλεσμα χωρίς να χρειαστεί να εκτυπωθούν διπλά και τριπλά ορισμένα κομμάτια. Αυτός ήταν και ο λόγος που επιλέχθηκε η χρήση της βάσης κινητού εμπορίου. Τα πλεονεκτήματά της είναι ότι μπορεί οποιοδήποτε κινητό να προσαρμοστεί πάνω της, επιτρέπει την αλλαγή του μήκους της αναλόγως των αναγκών και συνεισφέρει στην ολική μηχανική σταθερότητα. Το τελευταίο είναι απόρροια του κέντρου βάρους που έχει η κατασκευή. Σε προηγούμενα πλάνα όπου το κινητό θα ήταν απαγκιστρωμένο στον μηχανικό

σωλήνα υπήρχε το εξής θέμα. Οι κάμερες των κινητών βρίσκονται συνήθως στο δεξιό μέρος της συσκευής με αποτέλεσμα να μετατοπιζόταν το κέντρο βάρους ολόκληρης της κατασκευής προς τα αριστερά. Αυτός ήταν και ένας από τους βασικούς λόγους που απορρίφθηκε σαν ιδέα.

Σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι επειδή στόχος της εργασίας είναι η κατασκευή ικρίωματος οπτικού μικροσκοπίου, λείπει ένα βασικό κομμάτι το οποίο θα αναβάθμιζε ολόκληρο το μικροσκόπιο. Αυτό δεν είναι άλλο από τα ηλεκτρονικά του. Τα ηλεκτρονικά προσδίδουν ακρίβεια στο χειρισμό και έλεγχο του μικροσκοπίου και δίνουν τη δυνατότητα ψηφιακής παρατήρησης και επεξεργασία της εικόνας μέσω προγράμματος. Η κατασκευή της παρούσας εργασίας λειτουργεί με ανεξάρτητα στοιχεία. Για παράδειγμα χρήση μικρού φακού για φωτεινή πηγή, κάμερα κινητού για λήψεις εικόνων, χειροκίνητη μετακίνηση των αξόνων. Επιπλέον, εφόσον έχει γίνει αναφορά στο οικονομικό κομμάτι ως προτέρημα στα “open source” πρότζεκτ, ας σημειωθεί κι εδώ το κόστος της κατασκευής. Τα έξοδα περιλαμβάνουν τη φωτεινή πηγή η οποία στην περίπτωση αυτή είναι ένας μικρός φακός αξίας 5 ευρώ. Πέρα από αυτό και λαμβάνοντας υπόψη ότι ο αντικειμενικός φακός είναι δανεικός από το εκπαιδευτικό ίδρυμα κι ότι ήδη υπάρχει στην κατοχή του κατασκευαστή κινητό με κατάλληλη κάμερα για λήψη εικόνων, τα υπόλοιπα έξοδα ήταν λίγα. Εκτυπώσεις μερικών κομματιών του μικροσκοπίου σε εξωτερικό φορέα κόστισαν στο σύνολο 30-40 ευρώ. Μεταλλικά στοιχεία όπως η ντίζα και η βάση της κόστισαν 1-2 ευρώ. Επομένως, ο πιο επιτυχής τομέας της εργασίας αυτής είναι ότι κατάφερε να κρατήσει ένα πολύ οικονομικό χαρακτήρα και ταυτόχρονα να προσφέρει τα βασικά αποτελέσματα.

Στη μορφή που είναι το μικροσκόπιο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί κυρίως για εκπαιδευτικό σκοπό. Πειραματισμός με διαφορετικές φωτεινές πηγές, αντικειμενικό φακό, ρυθμίσεις των διατάξεων, δείγματα, κυρίως ιστολογικά.. Σύγκριση αποτελεσμάτων με εικόνες από μικροσκόπιο εμπορίου κι έπειτα συζήτηση περί βελτιώσεων του συγκεκριμένου μικροσκοπίου ή σχολιασμός φαινομένων και λόγων που μπορεί η εικόνα να είναι υποδεέστερη. Το πλεονέκτημα της κατασκευής αυτής είναι η προσαρμοστικότητα του και το πως μπορούν να αλλάξουν ριζικά τα μέρη του αναλόγως την εφαρμογή. Αυτή του η ιδιότητα του επιτρέπει να προσαρμόζεται και σε άλλες τεχνικές μικροσκοπίας. Για παράδειγμα, αν αφαιρεθεί το διάφραγμα κάτω από τη βάση και προστεθεί ένα αντίστροφο διάφραγμα ή ένα σταθερό “spider stop” που έχει αναφερθεί παραπάνω τότε ως αποτέλεσμα θα προκύψει ένα μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου. Αντίστοιχα, αν κάτω από την τράπεζα δείγματος τοποθετηθεί φίλτρο οριζόντιας πόλωσης φωτός και πάνω από το μηχανικό σωλήνα εφαρμοσθεί φίλτρο κάθετης πόλωσης φωτός τότε το μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου μετατρέπεται σε πολωμένου φωτός. Βέβαια, πρέπει να γίνουν αλλαγές και στην τράπεζα δείγματος για πιο ολοκληρωμένα αποτελέσματα, πιο συγκεκριμένα, μετατροπές που θα επιτρέπουν την κίνηση στους 4 άξονες, x,y,z και περιστροφή.

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις αποτελούν μία μακροσκοπική όψη στο πως προσεγγίζει κάποιος για πρώτη φορά το θέμα αυτό και φαίνεται επίσης και η εξέλιξη του με την πάροδο του χρόνου μέχρι να ολοκληρωθεί το έργο του. Ακόμη μία απόδειξη ότι η τεχνολογία της 3D εκτύπωσης είναι ένα εκλαϊκευμένο εργαλείο που δίνει τη δυνατότητα πρόσβασης σε απλούς ανθρώπους, χωρίς κάποια ειδικευση στον παραπάνω τομέα, σε μονοπάτια που πριν από αυτή ήταν άβατα. Συνοψίζοντας, κι από τα άλλα πρότζεκτ καταλαβαίνει κανείς ότι όλο αυτό το “κίνημα” πρόκειται για σοβαρό εγχείρημα. Από τα καινοτόμα σχέδια που παρέχουν, μέχρι τα πολύ καλά αποτελέσματα που παράγουν, έχει γίνει κατανοητό πως η τεχνολογία αυτή δεν είναι

απλά εργαλείο μάθησης κι εξοικείωσης αλλά έχει εγκατασταθεί κι εξελίσσεται συνεχώς παρέχοντας πρωτοπόρες ιδέες και βελτιώσεις που μπορούν να επηρεάσουν ακόμη και τα μικροσκόπια του εμπορίου θετικά.

Βιβλιογραφία/Αναφορές

1. Murphy, D.B. 2001. Fundamentals of Light Microscopy and Digital Imaging, p. 43-59. Wiley-Liss, New York.
2. Φυσική του ανθρώπινου σώματος, (2002) CAMERON J. SKOFRONICK J. GRANT R. Επιμέλεια: Ε. Γεωργίου - Ε. Γιακουμάκη - Σ. Κόττου - Κ. Νταλλές - Α. Σερέφογλου - Α. Σκυλάκου Λουίζη, Εκδόσεις ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ.
3. Davidson, M.W. and M. Abramowitz. 2002. Optical microscopy, p.1106-1141. In J.P. Horniak (Ed.), Encyclopedia of Imaging Science and Technology, vol. 2. John Wiley and Sons, New York. https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/referencelibrary/pdfs/Davidson_Abramowitz_Optical_Microscopy.pdf
4. Inoué, S. and R. Oldenboug. 1995. Microscopes, p. 17.1-17.50. In M.Bass, E.W. Stryland, D.R. Williams, and W. Wolfe (Eds.), Handbook of Optics: Devices, Measurements, and Properties, vol. 2. McGraw-Hill, New York.
5. So, P. T., Dong, C. Y., Masters, B. R., & Berland, K. M. (2000). Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annual review of biomedical engineering*, 2, 399–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.2.1.399>
6. Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacio, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., & Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793), 1642–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>
7. Stefan W. Hell and Jan Wichmann, (1994) "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt. Lett.* 19, 780-782 <https://opg.optica.org/ol/abstract.cfm?URI=ol-19-11-780>
8. Kristiawan, Ruben Bayu, Imaduddin, Fitriani, Ariawan, Dody, Ubaidillah, and Arifin, Zainal. (2021) "A review on the fused deposition modeling (FDM) 3D printing: Filament processing, materials, and printing parameters" *Open Engineering*, vol. 11, no. 1, pp. 639-649. <https://doi.org/10.1515/eng-2021-0063>
9. Diederich, B., Lachmann, R., Carlstedt, S. *et al.* (2020) A versatile and customizable low-cost 3D-printed open standard for microscopic imaging. *Nat Commun* 11, 5979. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19447-9>
10. Zehrer AC, Martin-Villalba A, Diederich B, Ewers H.(2024 Mar) An open-source, high-resolution, automated fluorescence microscope. *Elife*. <https://elifesciences.org/articles/89826>
11. Samuel McDermott, Filip Ayazi, Joel Collins, Joe Knapper, Julian Stirling, Richard Bowman, and Pietro Cicuta, (2022) "Multi-modal microscopy imaging with the OpenFlexure Delta Stage," <https://opg.optica.org/oe/fulltext.cfm?uri=oe-30-15-26377&id=477856>
12. Qingxin Meng, Kerriane Harrington, Julian Stirling, and Richard Bowman, (2020) "The OpenFlexure Block Stage: sub-100 nm fibre alignment with a monolithic plastic flexure stage. <https://opg.optica.org/oe/fulltext.cfm?uri=oe-28-4-4763&id=426579>