



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

ФАКУЛТЕТ „Фармация“

ЦЕНТЪР ЗА ДИСТАНЦИОННО ОБУЧЕНИЕ

Лекция №12 *Медицинска физика*

Микроскопи. Оптични микроскопи - устройство, принцип на действие, разделителна способност, увеличение.

Корпускулярни микроскопи - принцип на действие, разделителна способност, увеличение, устройство.

Трансмисионен и сканиращ електронни микроскопи. Атомно-силов микроскоп

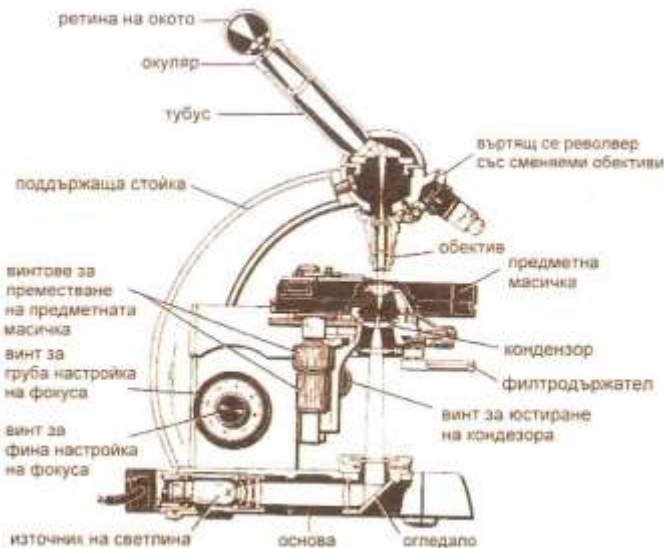
проф. Константин Балашев, д.х.н.

Оптични микроскопи

Възможност за по-големи увеличения, съчетана с добро качество, е получаваният от лупата увеличен образ да се увеличи допълнително с втора лупа. Тази възможност е реализирана в по-сложни оптични прибори за наблюдаване на микрообекти - **микроскопите**.

Устройство и принцип на действие

Светлинният микроскоп (от гръцки: **микрос** - малък, **скопео** - гледам) е оптичен прибор за получаване на силно увеличени образи на обекти, невидими с просто око.



- осветителна част (лампа или огледало),
- кондензор,
- предметна масичка (за обекта),
- обектив,
- окуляр
- винтове за грубо и фино фокусиране.

В съвременните светлинни микроскопи обективът и окулярът представляват система от лещи.

Обективът създава увеличен, обърнат и действителен образ на обекта.



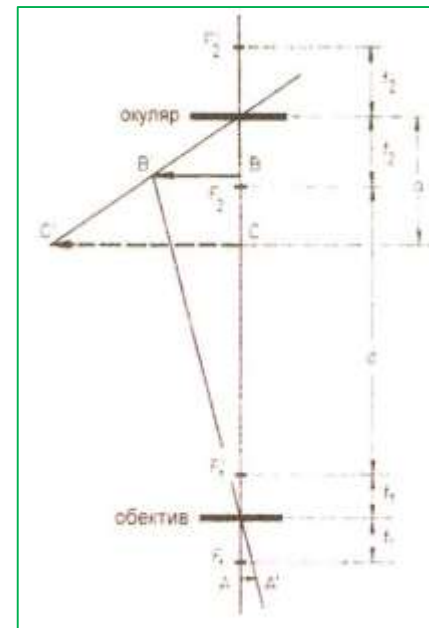
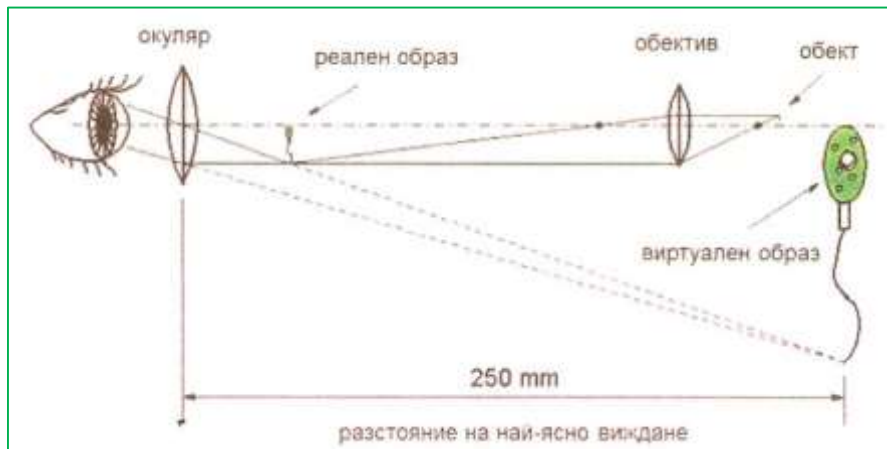
Окулярът действа като лупа и дава вторично увеличен, прав и недействителен образ на минималното разстояние на най-ясно виждане на окото (25 cm).



Общото увеличение N на микроскопа е произведение от увеличенията на обектива $N_{об}$ и окуляра $N_{ок}$:

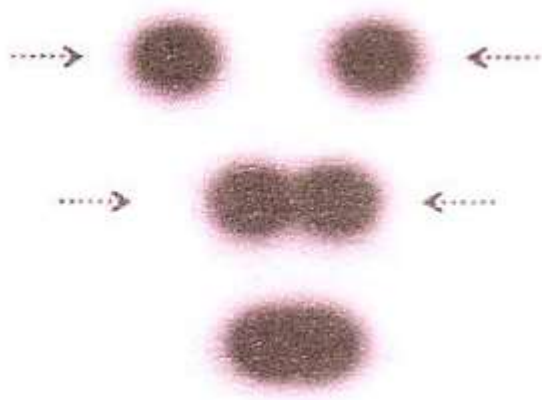
$$N = N_{об} N_{ок} = \frac{LD}{f_{об} f_{ок}}$$

L е разстоянието между фокусните равнини на обектива и окуляра, $f_{об}$ - фокусното разстояние на обектива, D - разстоянието на най-ясно виждане на окото, а $f_{ок}$ - фокусното разстояние на окуляра.



Общото увеличение може да бъде направено сравнително голямо чрез намаляване на $f_{об}$ и $f_{ок}$ (до около 3 000 пъти), но от това няма особена полза, тъй като е съпроводено с намаляване на разделителната му способност, което влошава качеството на получавания образ.

Ето защо се работи с т.нар. **максимално полезно увеличение**. Полезно е онова максимално увеличение на микроскопа, при което все още могат ясно да се виждат нови детайли на обекта, ненаблюдаеми с по-малки увеличения. При максималното полезно увеличение е реализирана максималната разделителна способност (т.е. **минималното разделително разстояние**).

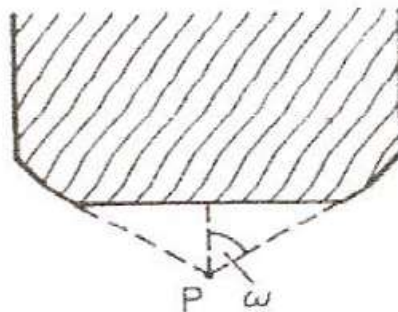


Минимално възможното разделително разстояние се ограничава от явлението дифракция на светлината. Вследствие отклоняването ѝ от праволинейната посока на разпространение при преминаване край оптични нееднородности, съизмерими по размери с дължината на вълната, образът на точка от обекта се получава не като точка, а като диск с диаметър $d = \frac{1.2\lambda}{n \sin \omega}$, където λ е дължината на светлинната вълна, n - показателят на пречупване на средата между обекта и обектива, а ω - половината от ъгъла между крайните лъчи, влизащи в обектива (т.нар. *апертурен ъгъл*). По тази причина образите на две близко разположени точки от обекта ще се припокриват.

Минималното разстояние между две точки, при което техните дисковидни образи все още могат да се възприемат като отделни, е $0.5d$. Това всъщност е разделителното разстояние на микроскопа:

$$\delta_{\text{микроскоп}} = 0.5d = \frac{0.6\lambda}{n \sin \omega}$$

Следователно, ако искаме да повишим разделителна способност на микроскопа (т.е. да се намали разделителното му разстояние), необходимо е да се реализират максимални показател на пречупване n и апертурен ъгъл ω , както и да се използва светлина с минимална λ .



За светлинните микроскопи тези показатели могат да достигнат следните екстремни стойности: $\lambda_{\min} = 400 \text{ nm}$, $n_{\max} = 1.5$ (с имерсионна течност) и $\omega_{\max} = 70^\circ$. При тези условия минимално достижимото разделително разстояние за светлинните микроскопи е $\delta_{\text{микроскоп}} = 0.2 \mu\text{m}$. В сравнение с това на невъоръжено око то е 1 000 пъти по-малко. Затова максимално възможното полезно увеличение на светлинния микроскоп ($\frac{\delta_{\text{око}}}{\delta_{\text{микроскоп}}}$) е около 1 000 пъти.

КОРПУСКУЛЯРНИ МИКРОСКОПИ

Полезното увеличение при светлинните микроскопи е само около 1 000 пъти. По-голямо увеличение (до около 3 000 пъти) може да бъде постигнато за сметка на намаляване на разделителната им способност. Една възможност за постигане на по-голямо полезно увеличение, съчетано с по-голяма разделителна способност, е да се използват по-късовълнови лъчения от друг тип. Това е реализирано при т.нар. корпускулярни микроскопи.

Физични принципи на корпускулярната микроскопия

Съгласно квантовата механика, не само вълните притежават корпускулярни свойства, но и обратно - всички микрочастици (електрони, протони и пр.) притежават вълнови свойства.

Така например, електрон, който се движи със скорост v , притежава (съгласно т.нар. формула на дьо Бройл) свойствата на вълна с дължина $\lambda = \frac{h}{mv}$, където h е константата на Планк, m - масата на частицата (електрона), а mv - нейния импулс. От електродинамиката е известно, че ако един електрон със заряд e и маса m се ускори в електростатично поле с потенциална разлика U , той получава импулс $mv = \sqrt{2meU}$. От горните две формули следва, че дължината на вълната на дьо Бройл, която се аташира към движещата се микрочастица е $\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meU}}$ или $\lambda = \frac{1.2}{\sqrt{U}}$

Може да се пресметне, че ако един електрон се ускори в електростатично поле с разлика в потенциалите например $U = 100 \text{ kV}$, той ще притежава свойствата на вълна с дължина $\lambda = 0,004 \text{ nm}$, т.е. 100 000 пъти по-малка от минимално възможната при светлинния микроскоп (400 nm). Това дава възможност за използване на поток от ускорени електрони (или други микрочастици) вместо светлинен сноп в прибори за наблюдаване на микрообекти, които ще притежават по-голяма разделителна способност. Такъв апарат е *електронният микроскоп*.

Трансмисионен електронен микроскоп

Има два вида електронни микроскопи: ***трансмисионни и сканиращи***.

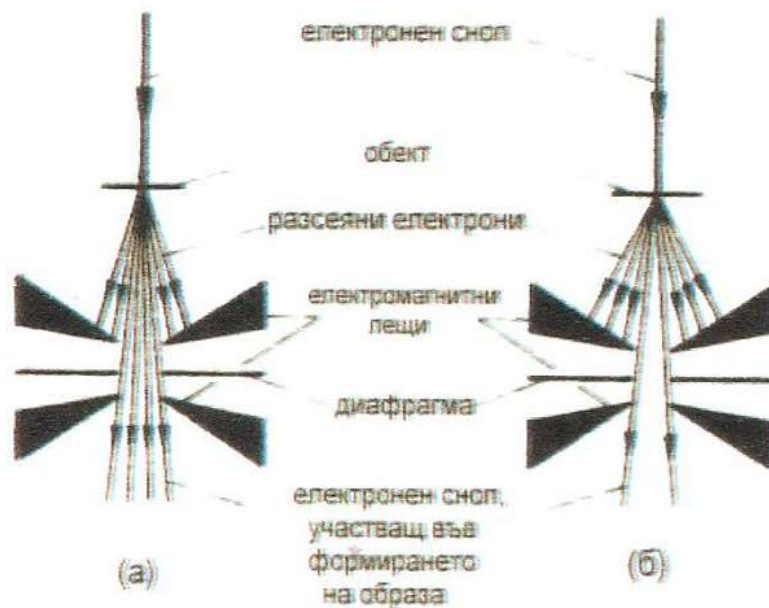
Картината при трансмисионния електронен микроскоп се получава с помощта на електронен лъч, който преминава през обекта. Той се управлява чрез електромагнитни взаимодействия. Свободните електрони се насочват по посока на пръстеновидни аноди. Вместо стъклени лещи се използват магнитни, които имат същата функция като стъклените при оптичния микроскоп. Освен това задължителна е и система за вакуум, която предотвратява отклоняването на електроните и сблъскването им с външни частици по техния път.



Устройството на електронния микроскоп е аналогично на това на светлинния. Състои се от осветителна система (източник на електрони и кондензорна леща), поставка за наблюдавания обект, обективна леща, проекционна система и луминесциращ екран или фотоплака, върху които се получава образът. Лещите при електронния микроскоп са електростатични или електромагнитни.

Получаването на образа е основано на различното разсейване на движещите се електрони от различни участъци на обекта (а не на различия в поглъщането им). По-плътните участъци разсейват електроните под по-голям ъгъл.

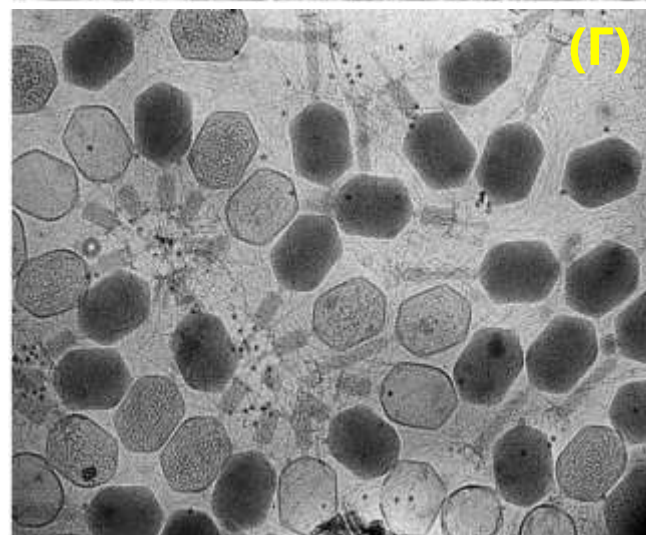
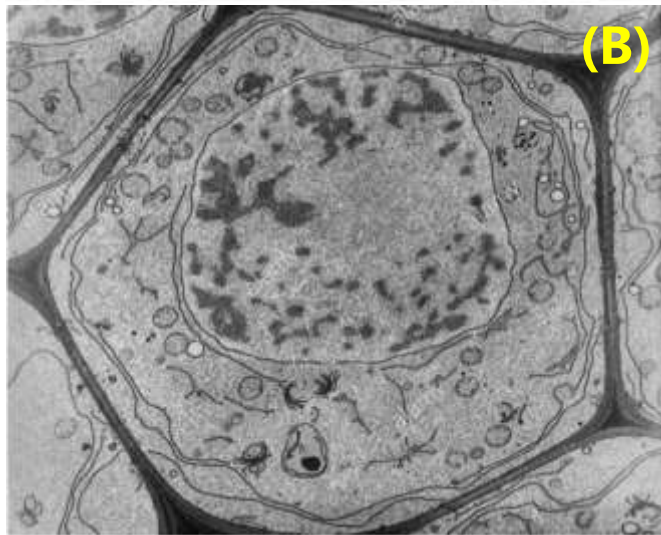
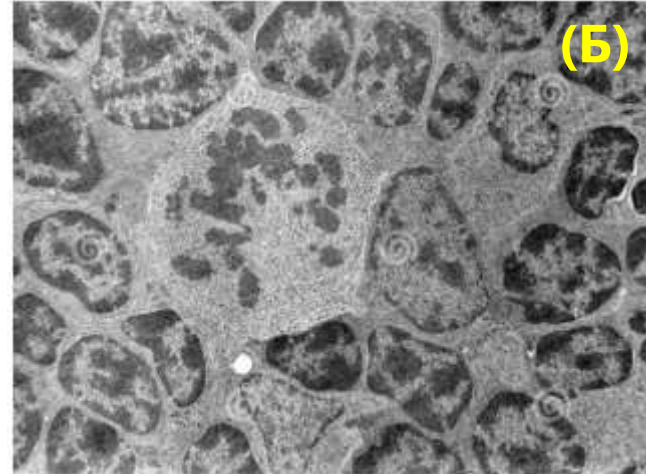
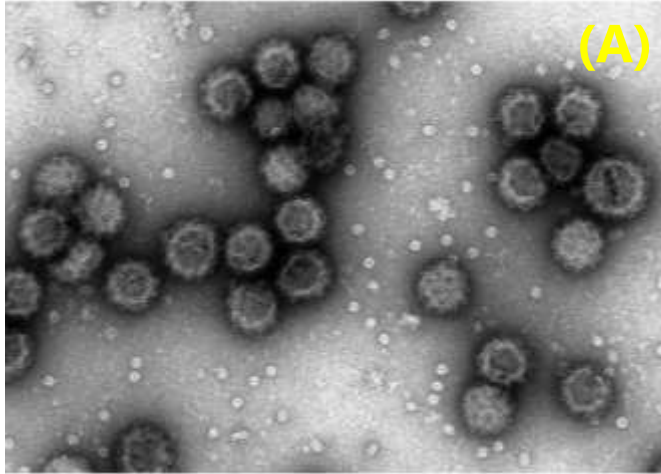
Тези отклонени електрони не участват във формирането на образа. По такъв начин, на по-плътните участъци от обекта съответстват по-малко електрони, достигащи до луминесциращия екран и тези места ще светят по-слабо. На схемата е илюстрирана ролята на разсейването на електроните при формирането на образа в електронния микроскоп: (а) *електронен сноп след слабо разсейващ детайл*, (б) *електронен сноп след силно разсейващ детайл*.



При електронния микроскоп има редица особености.

- В корпуса на микроскопа е необходимо да се поддържа вакуум $10^{-3} Pa$ (или $10^{-8} atm$, което е 100 милиона пъти по-ниско от атмосферното налягане), за да се избегне пречещото разсейване на електроните при удари с молекули на въздуха.
- По аналогична причина е необходимо и лиофилизиране на наблюдавания препарат за отстраняване на водните молекули.
- Препаратите се включват в пластмаса или парафин и от тях се вземат за наблюдаване много тънки срезове (с дебелина до $100 nm$) също за избягване на излишното разсейване на електрони.
- За по-силно полезно разсейване на електроните от наблюдаваните структури с цел получаване на по- контрастен образ върху препарата се наслоява тънък слой тежък метал (например осмий), който ги прави по- плътни.

Снимки с трансмисионен електронен микроскоп на: (А) Вирус-подобни частици (VLP), които наподобяват вируси, но не съдържат генетичен материал и следователно не предизвикват инфекции; (Б) Митотична клетка, заобиколена от интерфазни клетки. Хромозомите са тъмните зони; (В) Растителна клетка на царевица; (Г) Бактериофаги.

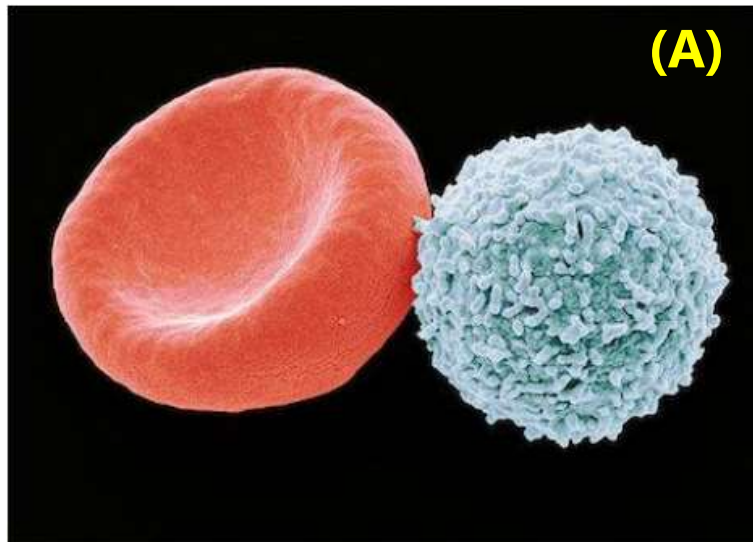


Сканиращ електронен микроскоп

Сканиращият електронен микроскоп се използва за изучаване на повърхности. Обектът се сканира (обхожда се точка по точка) от фокусиран електронен сноп (диаметър $< 5 \text{ nm}$). Отразените или избити електрони се улавят от детектор и след обработка на сигнала върху монитор се получава образ на релефа на повърхността на обекта. Този образ е обемен, тъй като детекторът за избитите или отразени електрони е поставен в единия край на тръбата и ако електроните се отклонят в друга посока, съответната точка се отчита като "тъмна", а ако отклонението е в посока на детектора - като "светла".

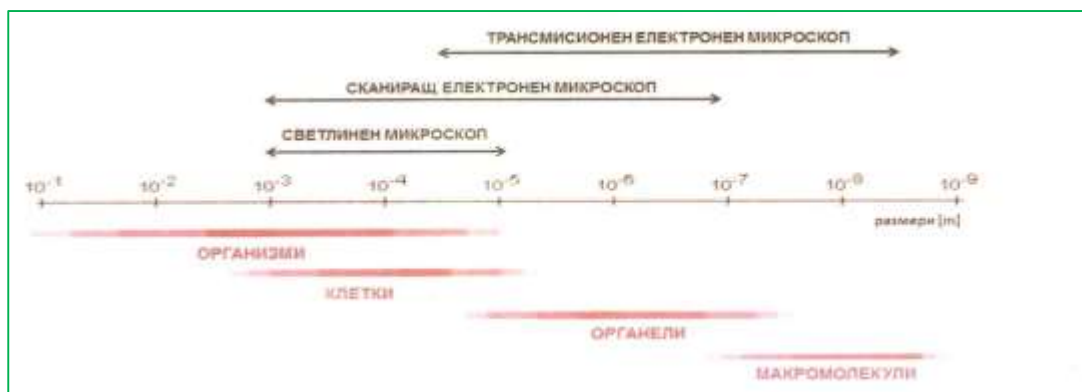
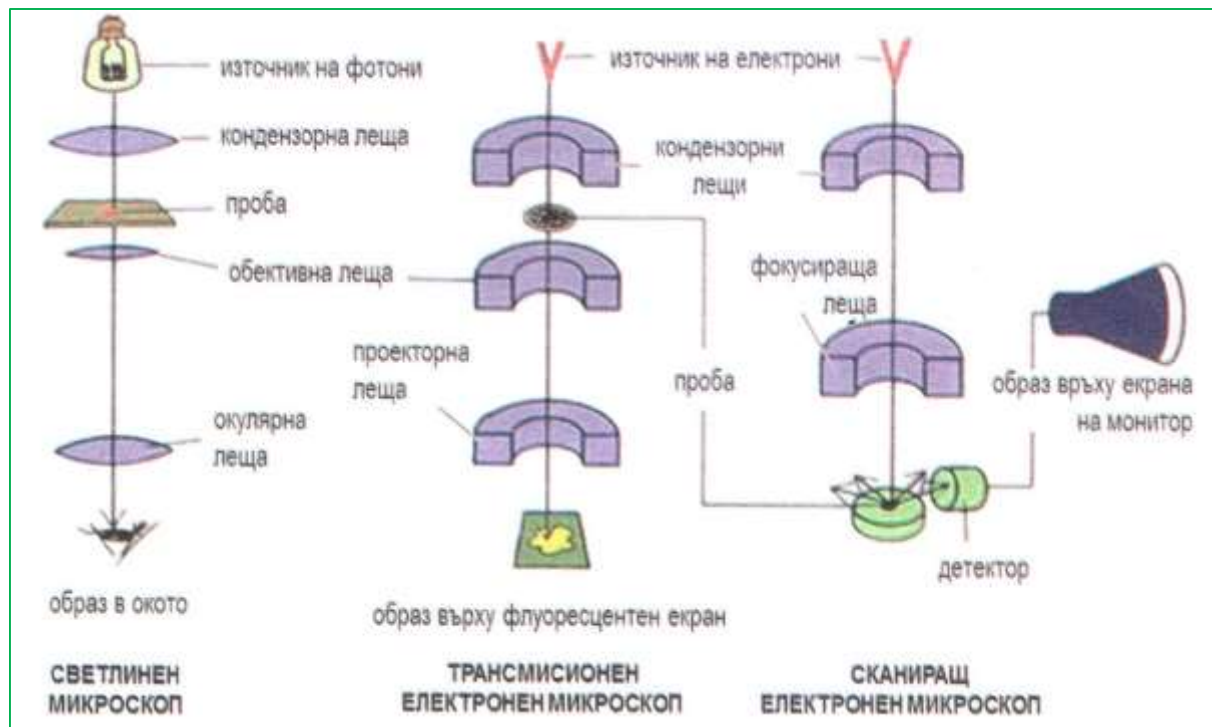
Сканиращият електронен микроскоп може да увеличава от 30 до 300 000 пъти (типичните увеличения са до 2 000 пъти). Той разширява ограничения диапазон на увеличение на оптичния (само около 1 000 пъти) и е особено полезен за анализ на обекти с релефна повърхност.

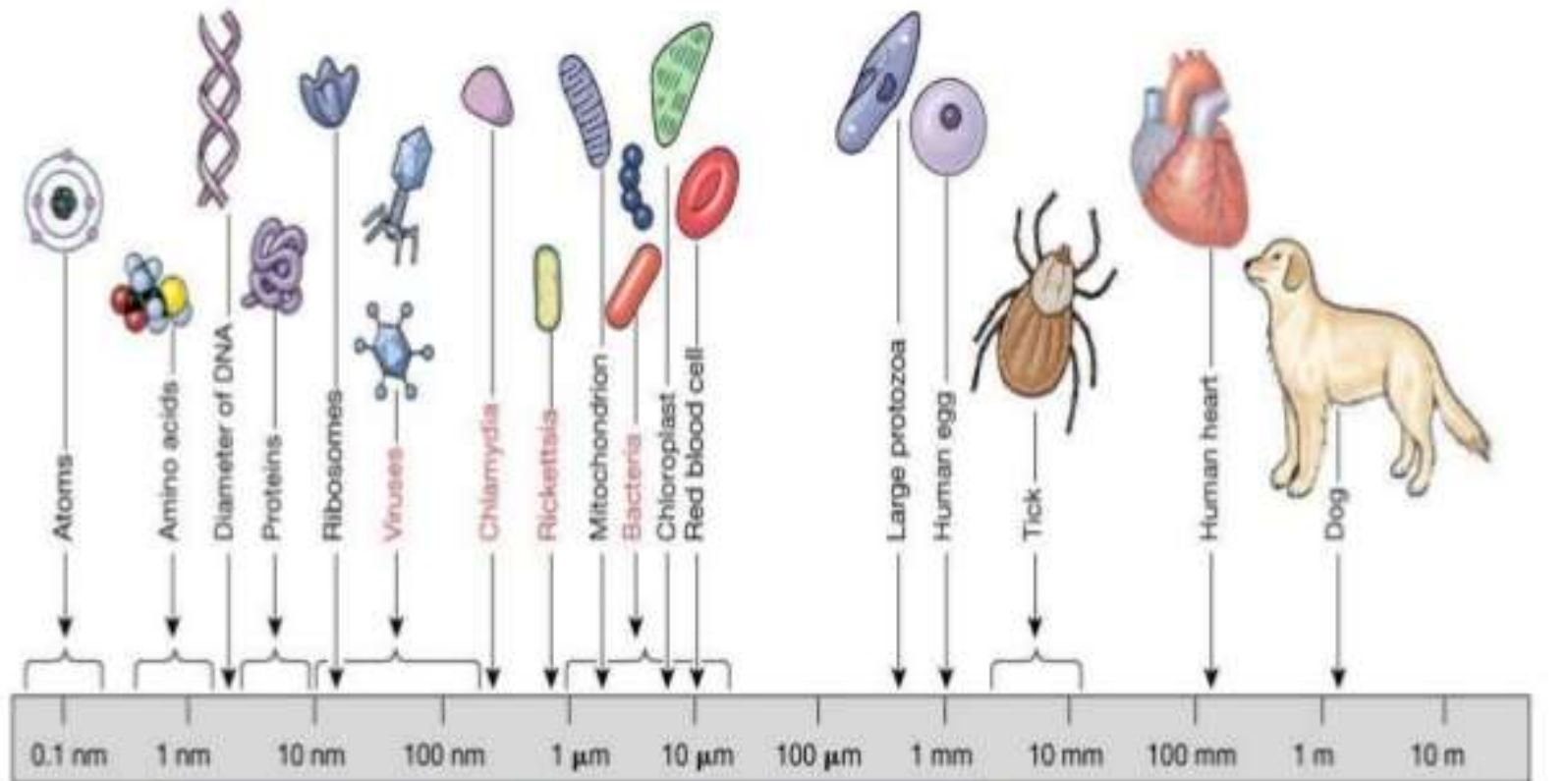
Снимки получени със сканиращ електронен микроскоп. : (А) Кръвни клетки; (Б) Нервни клетки (неврони).



За получаване на по-качествени образи е необходимо да се отразяват или избиват максимално количество електрони. При изследване на непроводящи обекти това се постига чрез покриване с тънък слой въглерод или благороден метал (злато, паладий, платина). Сканиращият електронен микроскоп може да работи и в трансмисионен режим. В този случай разделителната способност е пониска, но за сметка на това може да бъде наблюдавана по-голяма площ от обекта.

Принципните схеми на светлинните и електронни микроскопи са сравнени по-долу, заедно с метричните диапазони на приложимост при наблюдение с тези микроскопи.





Transmission electron microscope

Scanning electron microscope

Compound light microscope

Unaided human eye

2/10/2016

bhargava

7/17/2020

18

Кратки исторически бележки за развитието на атомно-силския микроскоп (AFM)

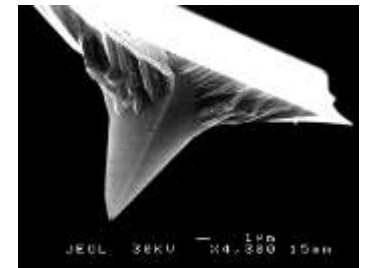
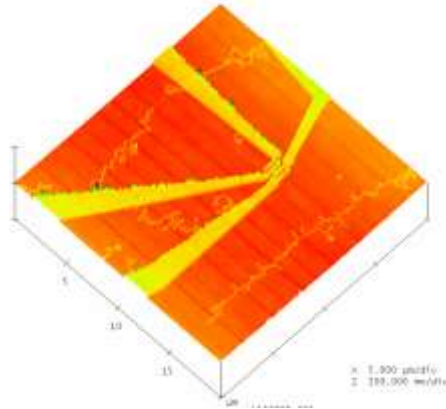
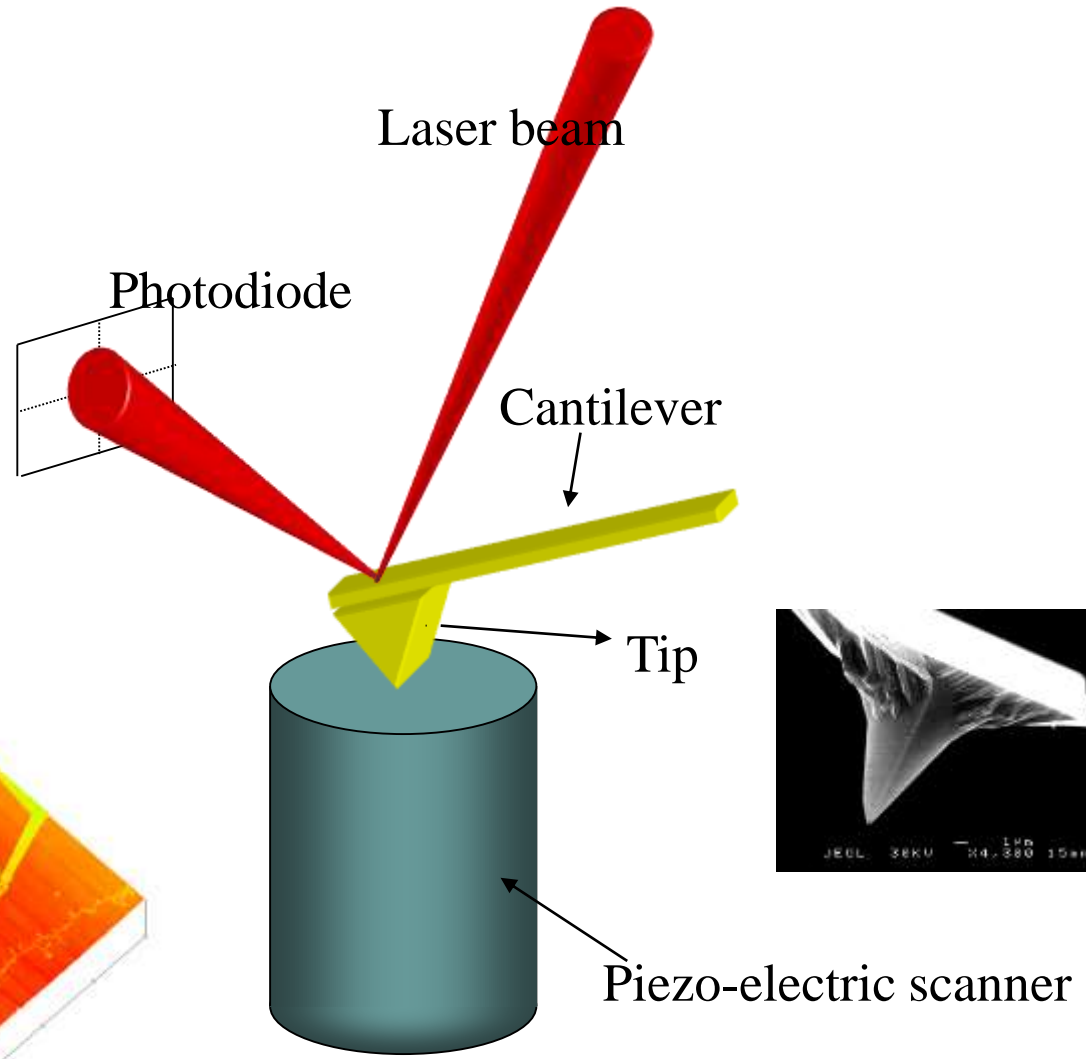


The Nobel Prize in Physics 1986
Heinrich Rohrer and Gerd Binnig "for their design of the scanning tunneling microscope."

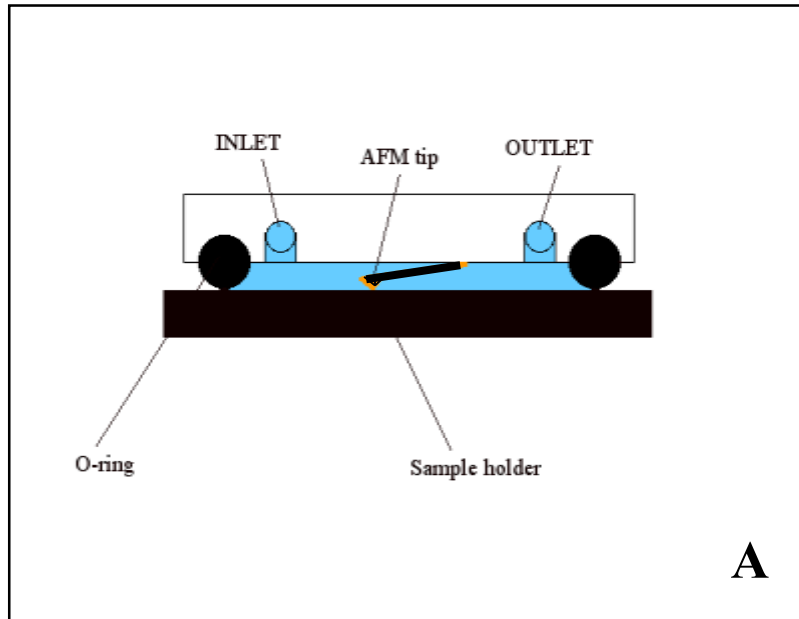


Prater C.B., Butt H.J., and **Hansma, P.K.**, Atomic force microscopy, *Nature*, **345**, (1990), 839-840

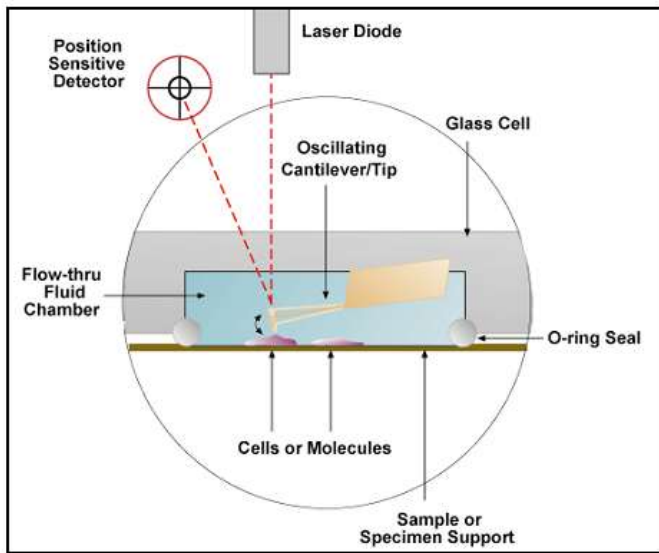
Принцип на атомно силовия микроскоп (AFM)



Течна клетка на AFM



Видове течни клетки



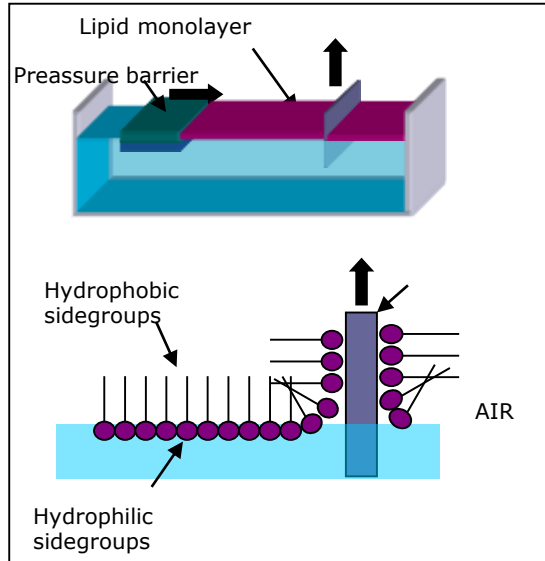
Regular fluid cell



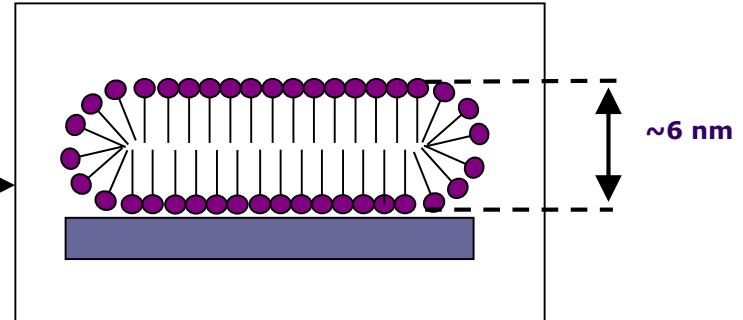
Perfusing Stage Incubator

Подготовка на проби за AFM

Langmuir-Blodgett technique



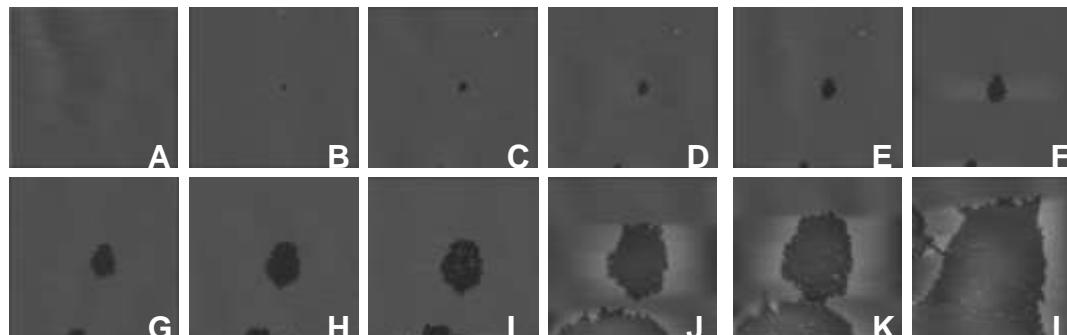
Sample-Lipid Double Layer

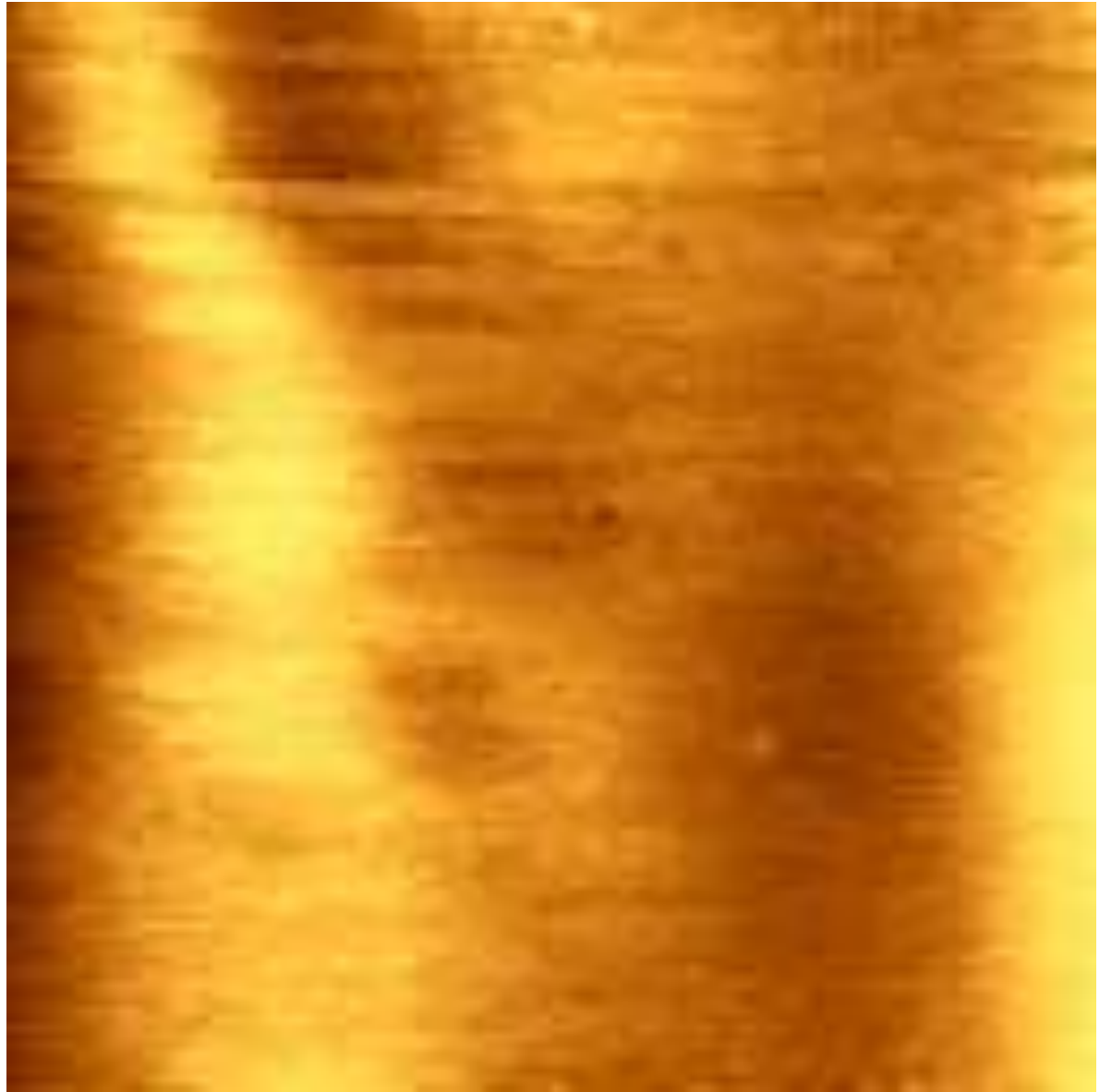


Sample transfer into the AFM liquid cell

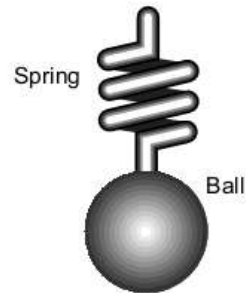
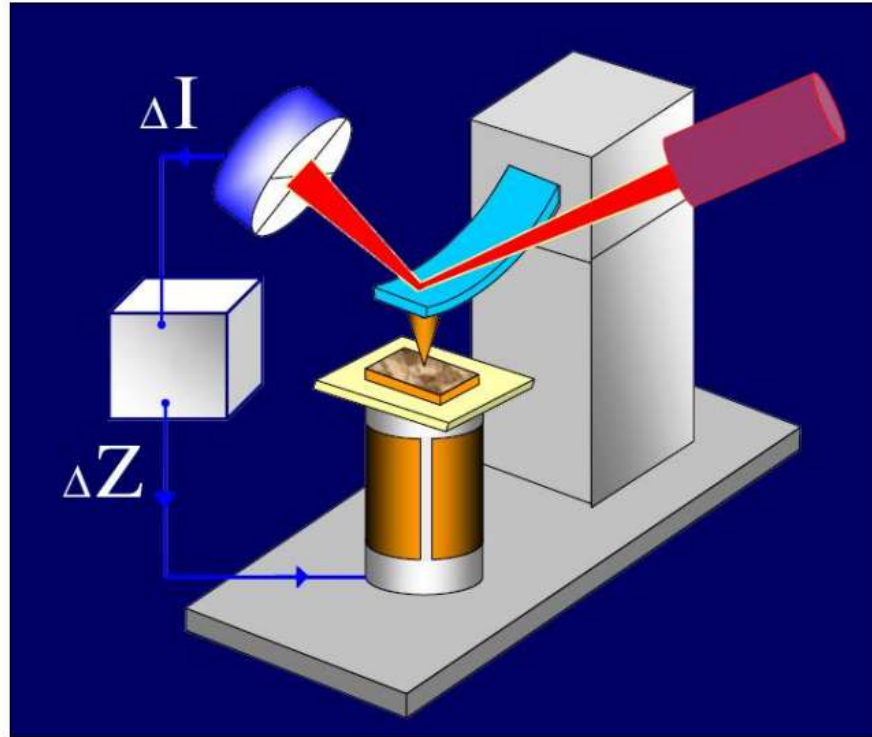


Obtaining real time AFM images





Физически принцип на атомно силова микроскоп

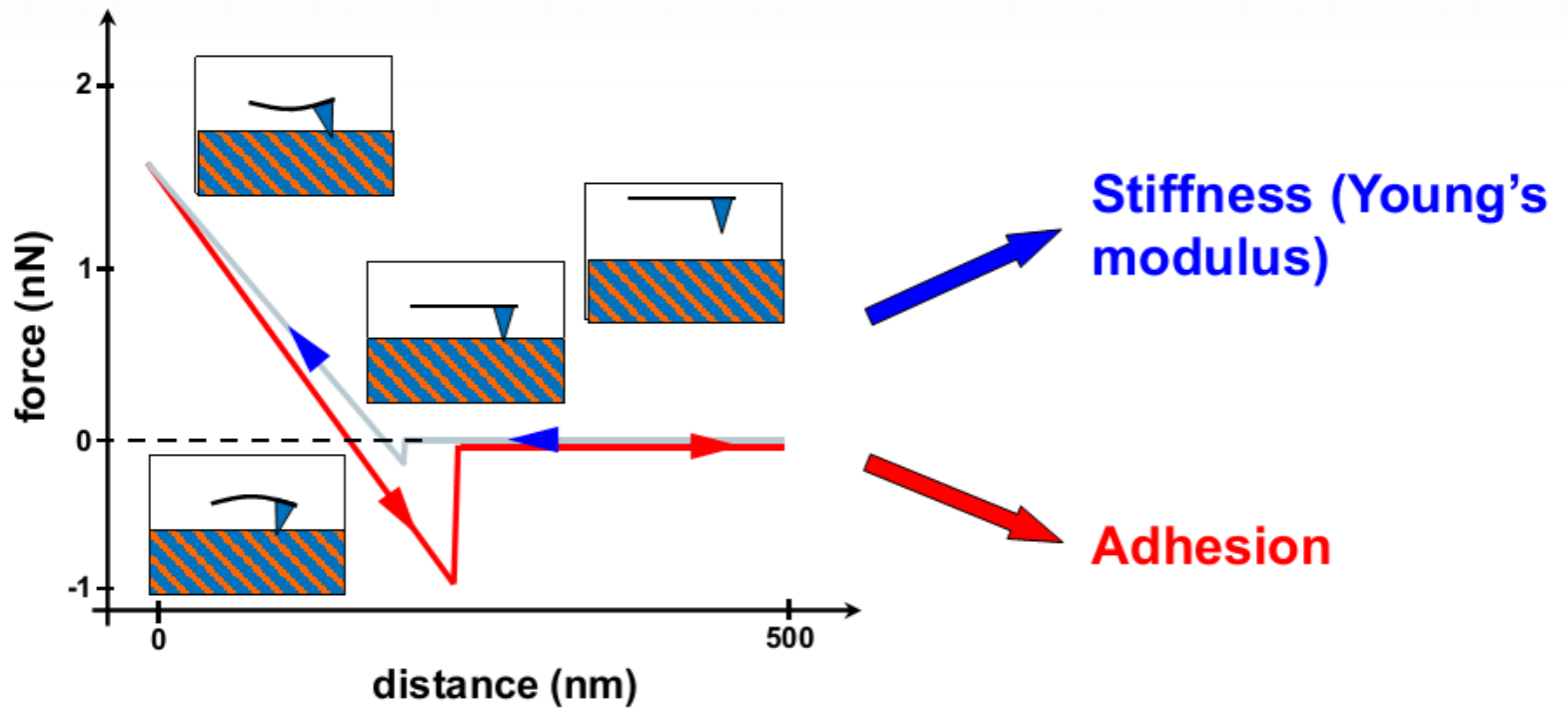


$$F = -k d_c$$

Why force measurements are essential in biology?

- Mechanical properties of cells are determined by the dynamic behavior of their cytoskeleton.
- Alterations of the mechanical phenotype of the cell can lead to severe malfunctions or disease (cancer, malaria, neurodegeneration).
- Cancer cells are known to be softer than their normal homologues.
- AFM is the tool of choice to measure cells mechanical properties ex vivo and to correlate a change in mechanical properties with:
 - Drug treatment
 - Aging
 - Pathology

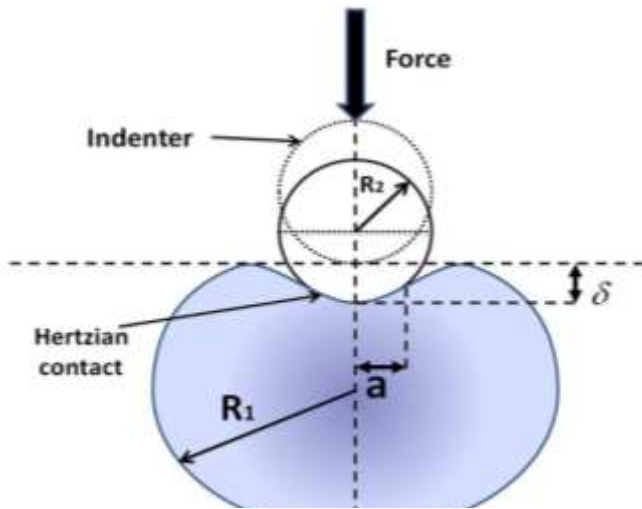
Force Spectroscopy



Single force



Force volume

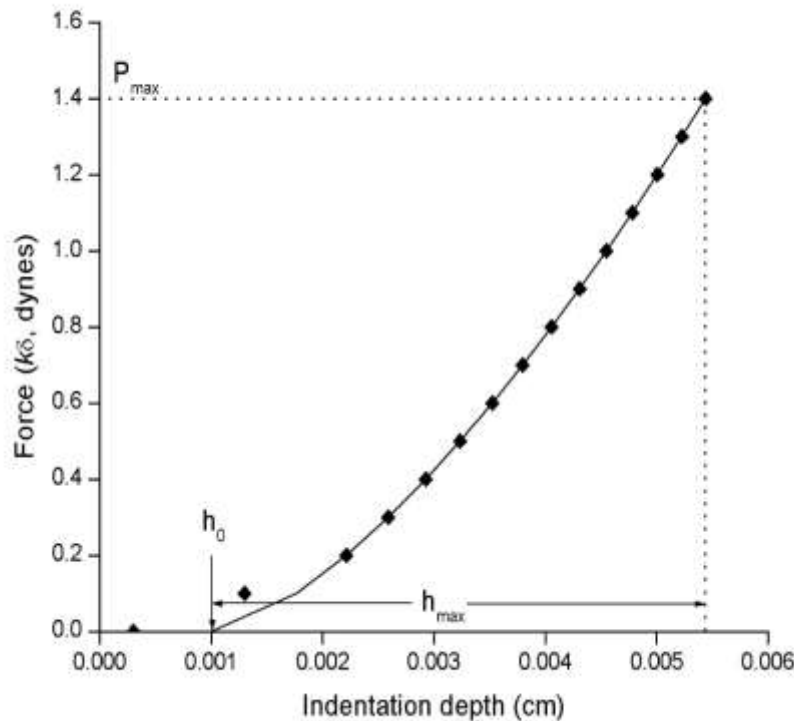


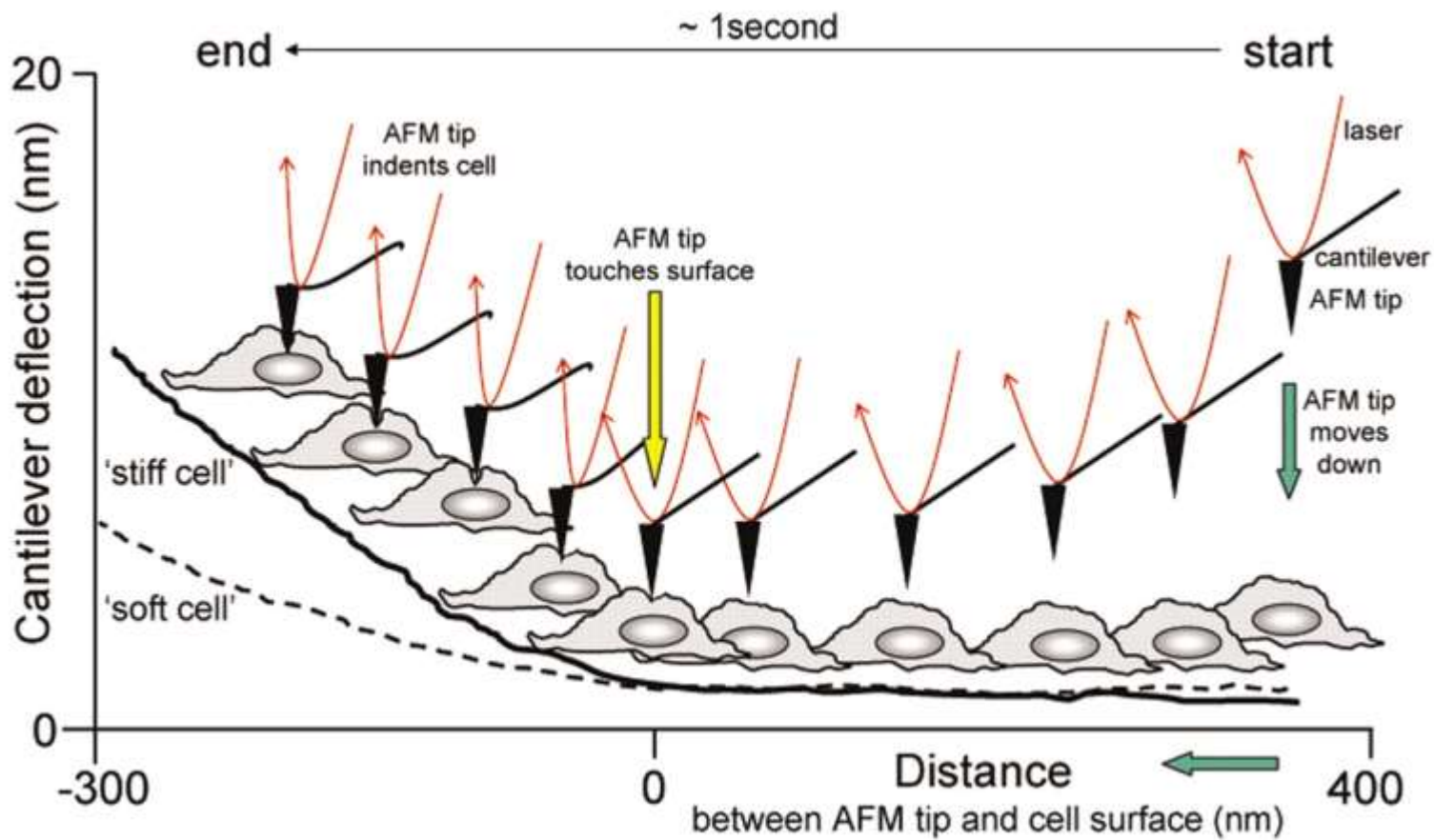
$$E = \frac{3(1-\nu^2)P_{\max}}{2\sqrt{2} a h_{\max}}$$

Where ν is the Poisson's Ratio, P_{\max} is the maximum force, h_{\max} is the maximum indentation depth and a is the radius of contact as computed below:

$$a = \left(2Rh_{\max} - h_{\max}^2\right)^{1/2}$$

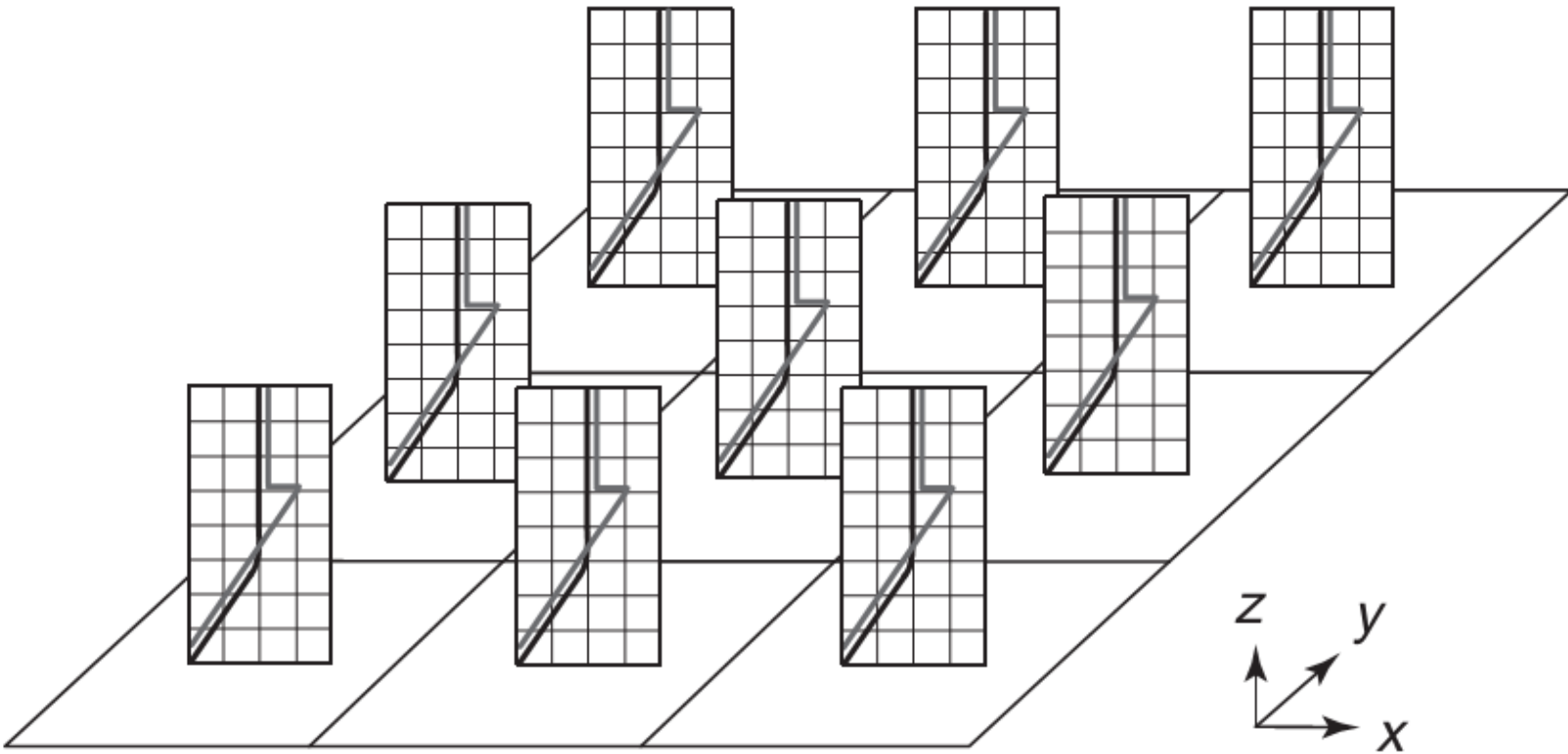
Where R is the radius of the indenter sphere.



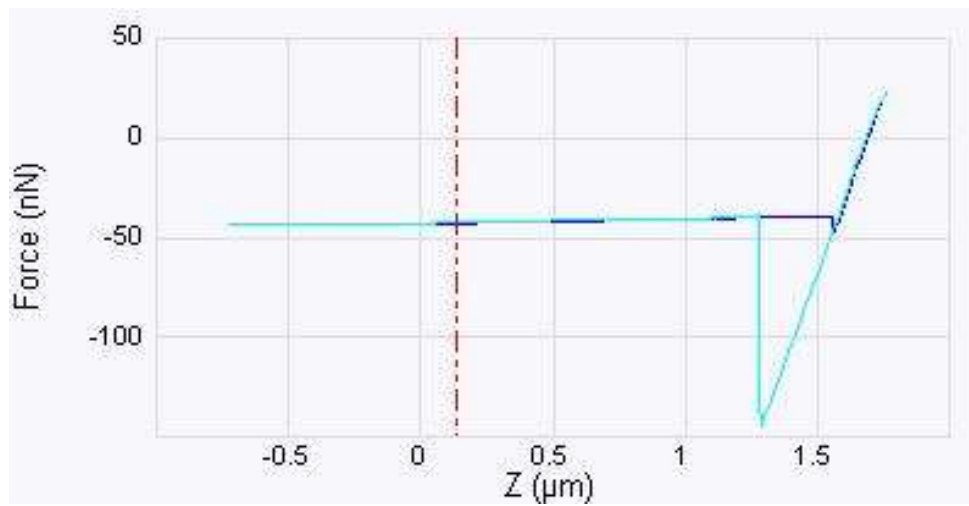
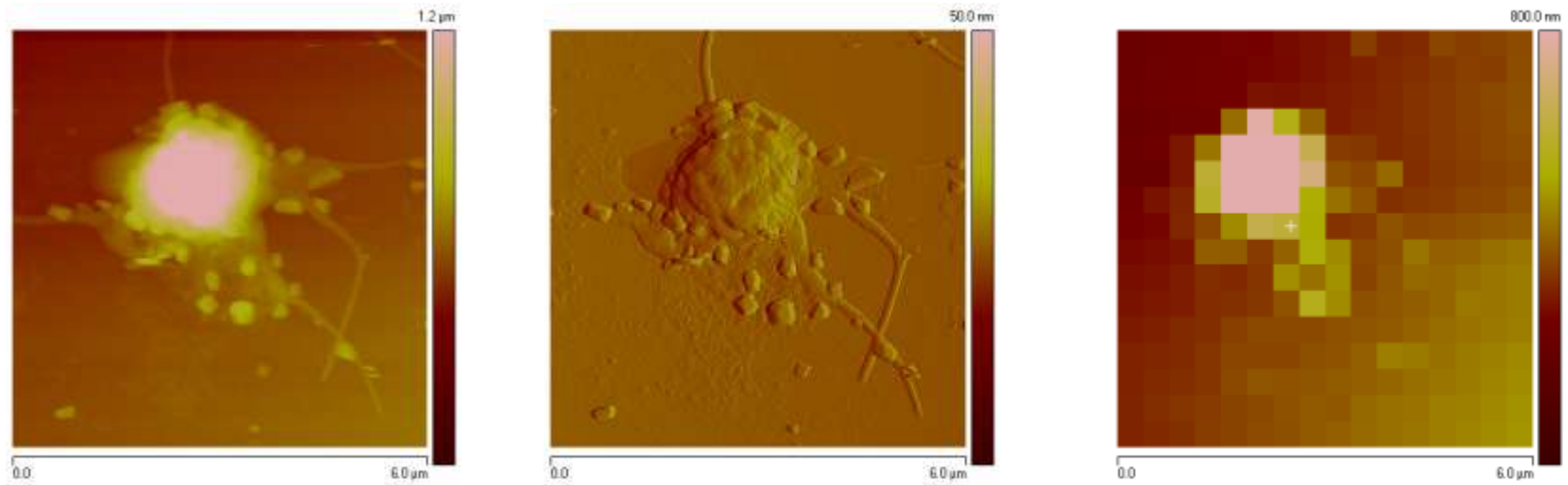


a

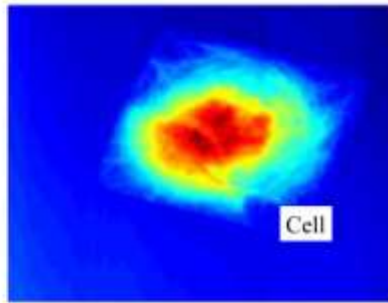
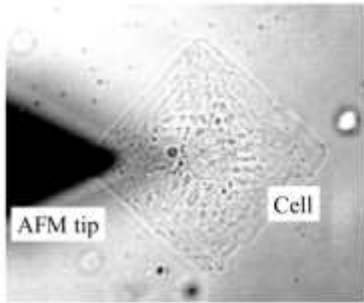
Force-volume imaging



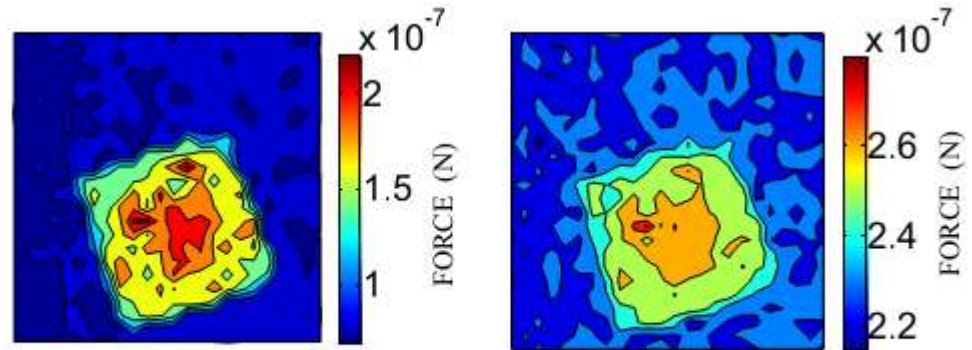
Force-volume images of platelets



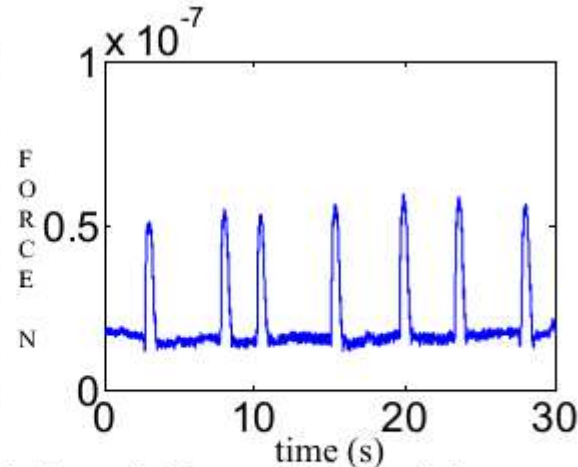
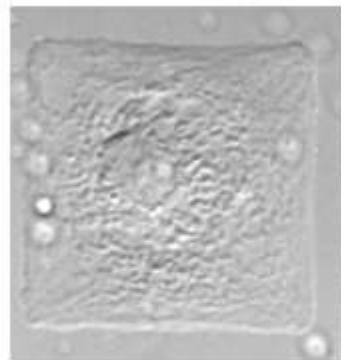
Single cardiac myocytes on island probed in vivo in real time with AFM



Optical (left) and AFM (right) image of cardiac cell grown on square micropatterned substrate.



Force volume slices showing increased force due to cell nucleus in the center.



Single cell (right) and Force exerted by beating (left)

Studying the Cell Mechanics of Mouse Hybridoma (MH) and Bovine Aortic Endothelial (BAE) cells by Atomic Force Microscopy based Probes

Figure 2. The optical microscope images of the two cell lines (A) Mouse Hybridoma (MH) and (B) Bovine Aortic Endothelial (BAE) cells. The inset is an AFM image of certain location of the BAE cell.

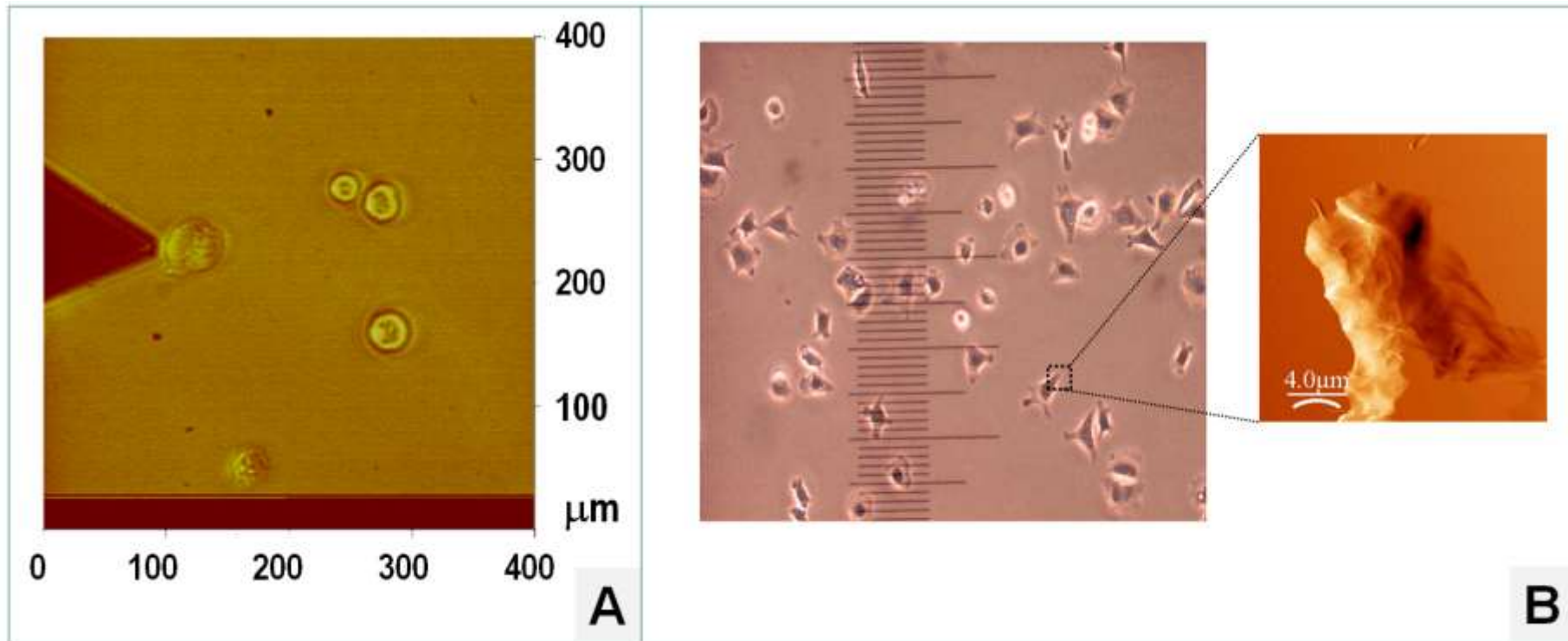


Figure 3. (A) An AFM topography image of a BAE cell obtained in contact mode. The nucleus is clearly distinguished from the remaining features of the BAEC cell. The scanning parameters were $z=3.6\ \mu\text{m}$, and $x\times y=60\times 30\ \mu\text{m}$); (B) Changes in cell morphology recorded in real time in the course AFM imaging. The left image was captured immediately after performing the force measurements on the cell while the right one was taken after 10 min of scanning.

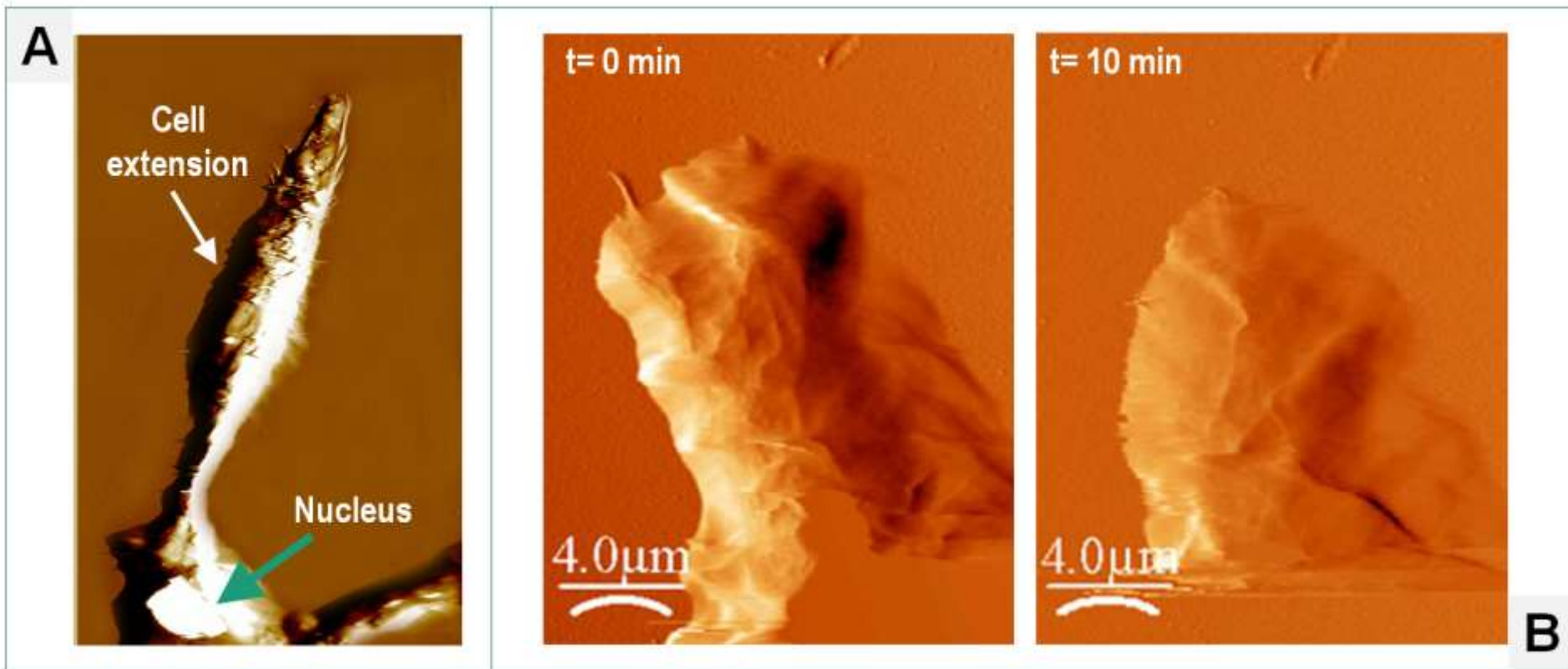
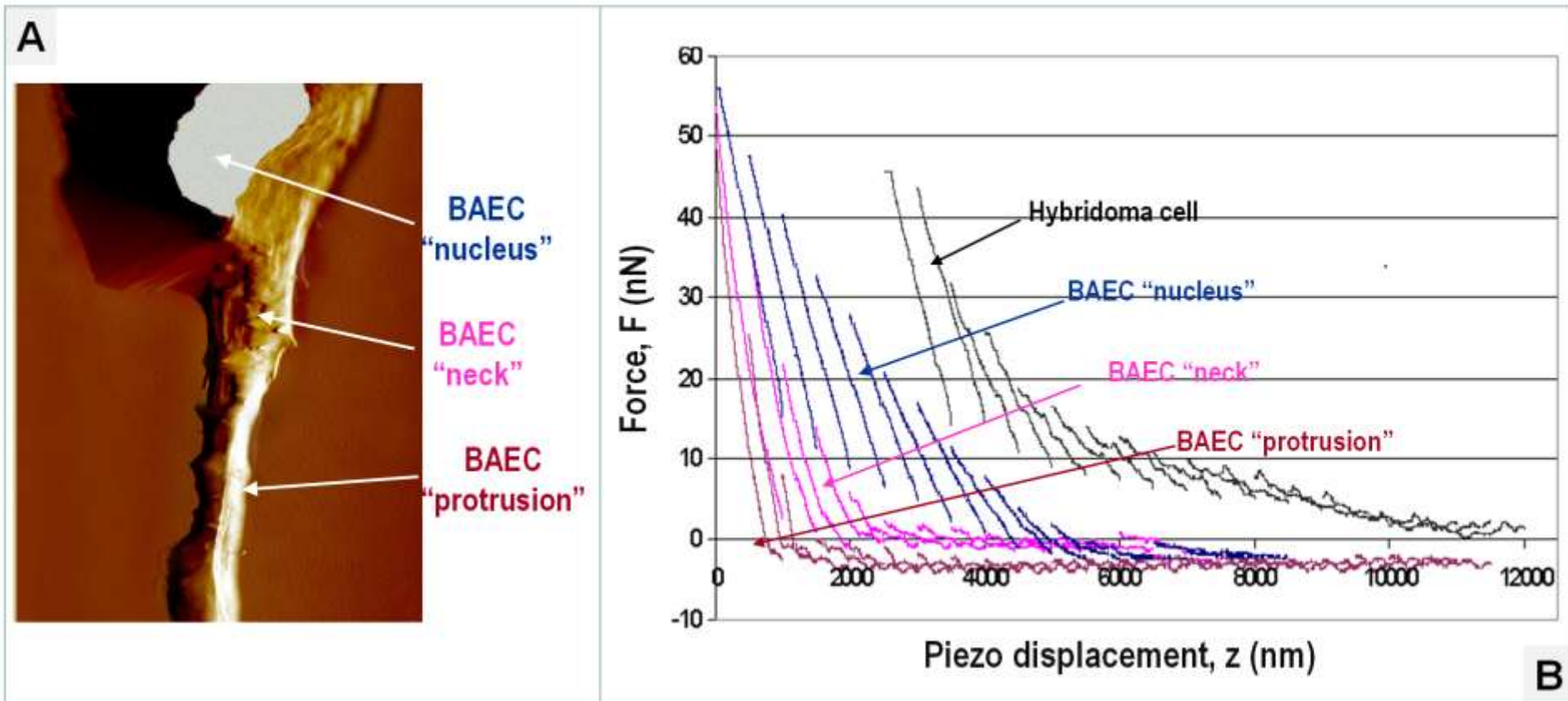
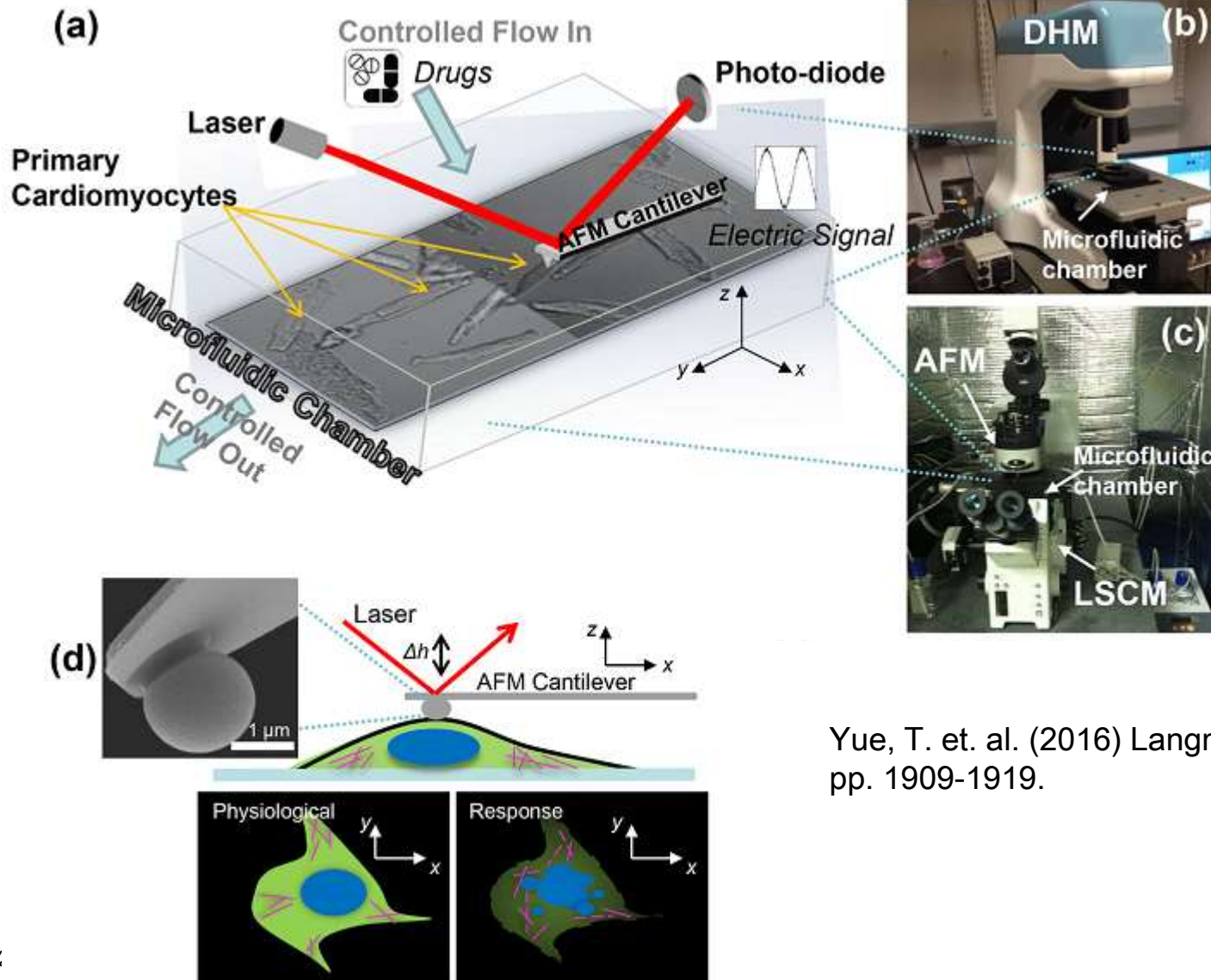


Figure 6. Loading/unloading force cycles applied with contact mode cantilever with spring constants ~ 0.3 N/m on a (A) HM and (B) BAE cell.



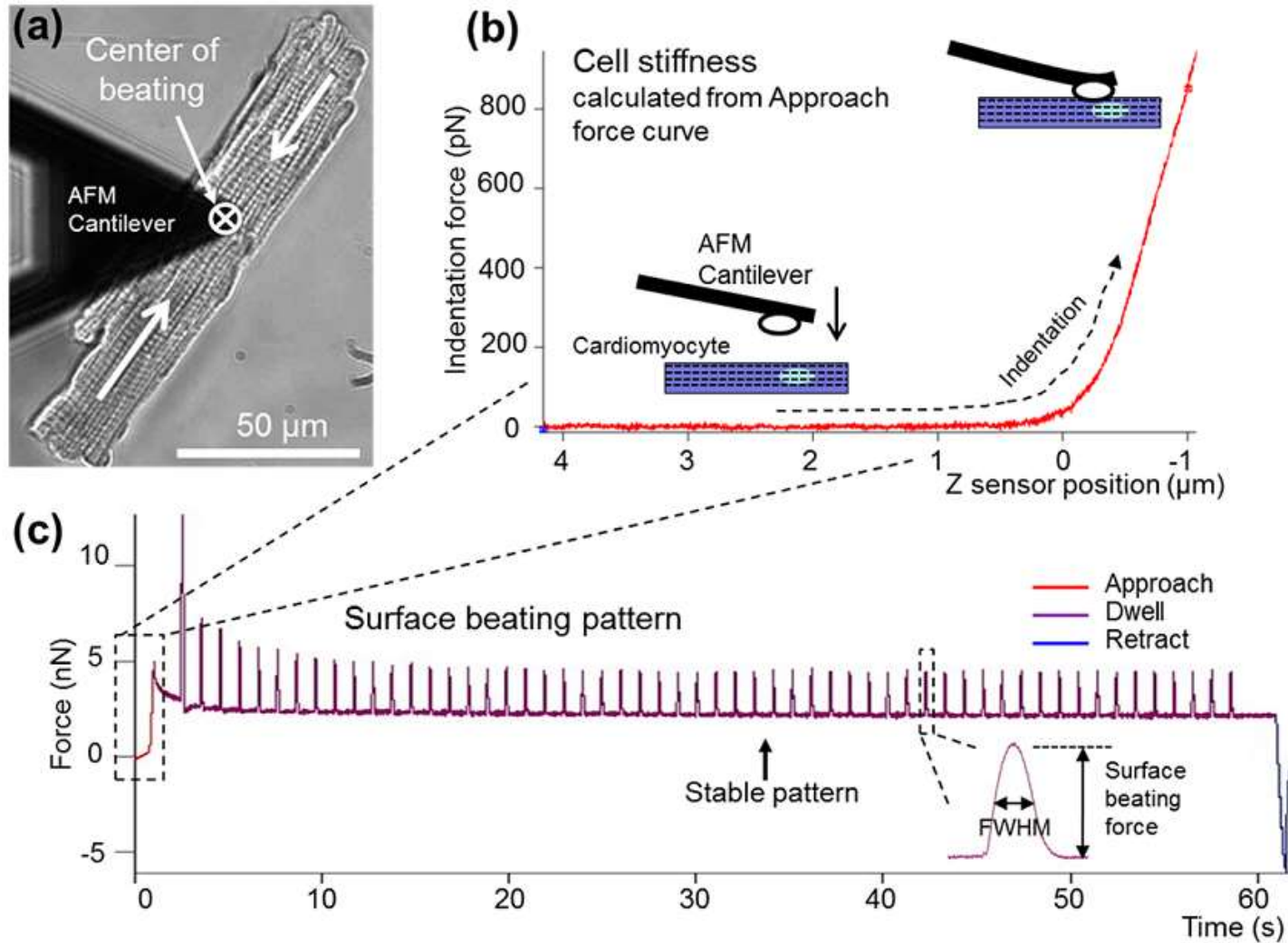
Quantifying Drug-Induced Nanomechanics and Mechanical Effects to Single Cardiomyocytes for Optimal Drug Administration to Minimize Cardiotoxicity



Yue, T. et. al. (2016) Langmuir, 32 (7), pp. 1909-1919.

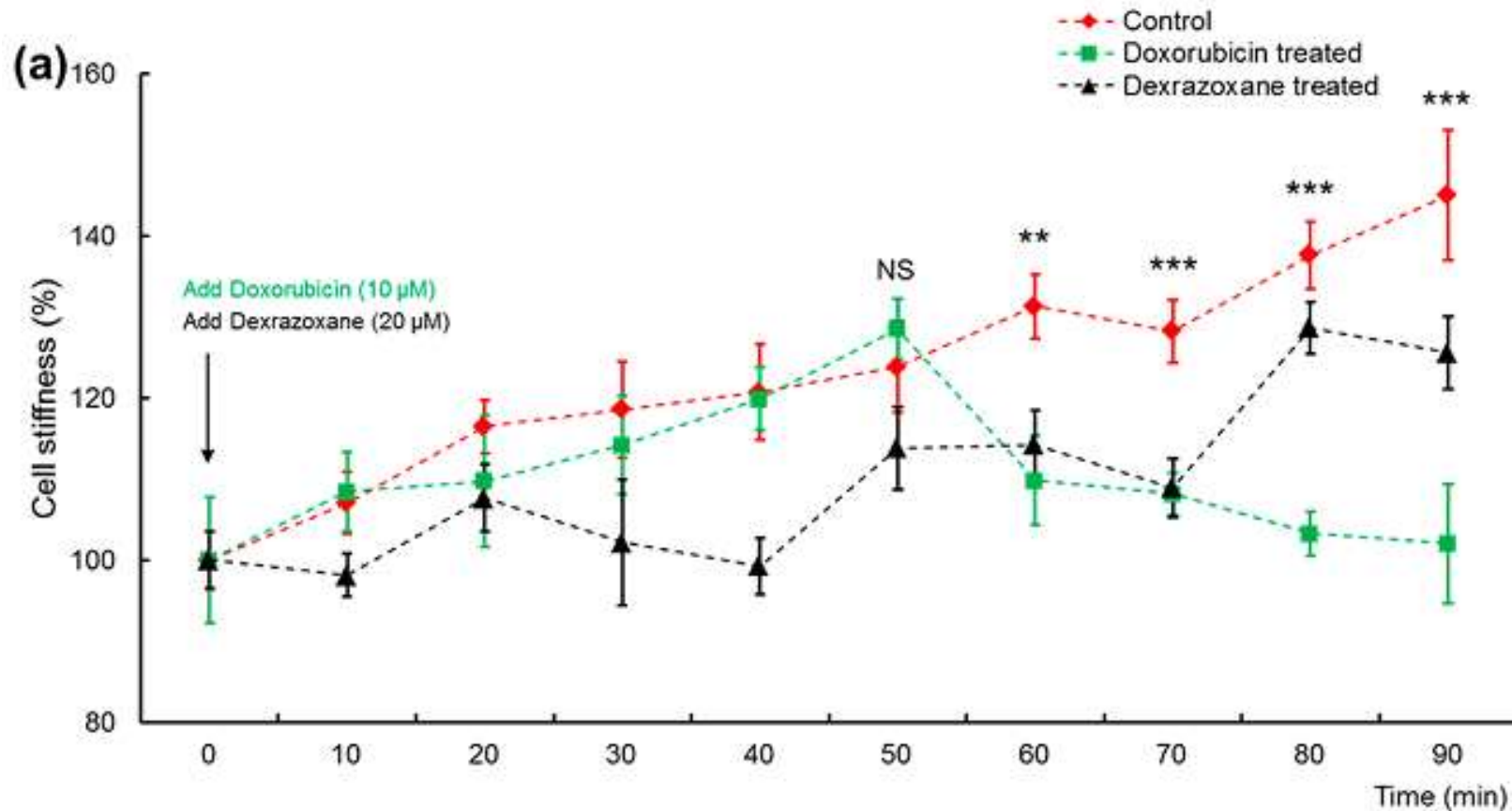
Quantifying Drug-Induced Nanomechanics and Mechanical Effects to Single Cardiomyocytes for Optimal Drug Administration to Minimize Cardiotoxicity

Yue, T. et. al. (2016) Langmuir, 32 (7), pp. 1909-1919.



Quantifying Drug-Induced Nanomechanics and Mechanical Effects to Single Cardiomyocytes for Optimal Drug Administration to Minimize Cardiotoxicity

Yue, T. et. al. (2016) Langmuir, 32 (7), pp. 1909-1919.



Quantifying Drug-Induced Nanomechanics and Mechanical Effects to Single Cardiomyocytes for Optimal Drug Administration to Minimize Cardiotoxicity

Yue, T. et. al. (2016) Langmuir, 32 (7), pp. 1909-1919.

