Metody fizyczne w biologii, medycynie, ochronie środowiska. diagnostyce medycznej i terapii

Wykład 1-4

V rok fizyki Semestr zimowy

Plan:

1. Mikroskopia

- mikroskopy optyczne (zasada działania, wady)
- mikroskop holograficzny
- mikroskop elektronowy
- mikroskop ultradźwiękowy

2. Aktywacja neutronowa

- fizyczne podstawy metody
- źródła neutronów
- zastosowania NAA
- ograniczenia i wady

3. Spektrometria masowa

- metody i podstawy fizyczne
- zastosowania

4. Analiza fluorescencyjna

- fizyczne podstawy metod fluorescencyjnych
- detekcja promieniowania X
- analiza ilościowa i jakościowa

5. Spektroskopia optyczna UV/VIS

- podstawowe procesy atomowe
- właściwości optyczne ciał
- techniki spektroskopii
- przykłady praktycznych zastosowań (LIDAR)
- 6. Systemy pomiarowe stosowane w fizycznych metodach diagnostyki medycznej
 - detektory
 - wzmacniacze
 - przetworniki ADC
 - transmisja informacji
 - przetwarzanie danych
- 7. Podstawy matematyczne tomografii komputerowych

8. Tomografia promieniowania X

- podstawy fizyczne
- zasada działania tomografu komputerowego
- rekonstrukcja obrazu
- 9. Tomografia magnetycznego rezonansu jądrowego
 - podstawy NMR
 - opis metody obrazowania

10. Pozytonowa tomografia komputerowa PET

- podstawy fizyczne
- rozwiązania technicznezastosowania diagnostyczne

11. Ultrasonografia

- podstawy fizyczne
- obrazowanie ultrasonograficzne
- ultrasonografia dopplerowska

12. Elektrokardiografia i encefalografia

- 13. Lasery w medycynie
- 14. Radioterapia nowotworów

Literatura

- Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska, pod red. A. Hrynkiewicza i E. Rokity, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999
- 2. Fizyczne metody diagnostyki medycznej i terapii,

pod red. A. Hrynkiewicza i E. Rokity, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000

MIKROSKOP

Mikroskop - przyrząd do obserwacji małych obiektów

Klasyfikacja

wg rodzaju promieniowania oświetlającego

- optyczne
- elektronowe
- jonowe
- ultradźwiękowe

wg metody obrazowania

- konwencjonalne
- skaningowe
- holograficzne

wg odległości detektora od obiektu

- tunelowe (mikroskopy bliskiego pola)
- pozostałe

wg uzyskiwanej informacji

- określające kształt obiektu
- badające skład pierwiastkowy, chemiczny, strukturę krystaliczną
- mierzące właściwości mechaniczne, elektryczne lub magnetyczne

Historia rozwoju mikroskopu optycznego









Mikroskop z roku 1700

Mikroskop z roku 1800

Obecnie

Mikroskop z roku 1904

Mikroskop z roku 1920



Lupa i jej powiększenie

Lupa – soczewka zbierająca lub mikroskop prosty



Rysunek 1. **Lupa** - soczewka zbierająca lub mikroskop prosty.

Powiększenie kątowe W

$$W = \frac{y_2}{y_1}$$

gdzie

$$\operatorname{tg} \mathcal{G}_1 = \frac{\mathcal{Y}_1}{\delta}$$
 i $\operatorname{tg} \mathcal{G}_2 = \frac{\mathcal{Y}_2}{\delta}$

wiec $W = \operatorname{tg} \mathcal{G}_2 / \operatorname{tg} \mathcal{G}_1$



Rysunek 1. Lupa - soczewka zbierająca lub mikroskop prosty.

Z rys. 1 znajdziemy, że



a ze wzoru soczewkowego mamy, że





$$W = \frac{\delta}{x} = \frac{f+\delta}{f} = 1 + \frac{\delta}{f}$$

Przeciętnie δ~25 cm, lecz dla dalekowidza jest większa ↓ z powiększenia lupy bardziej korzysta dalekowidz



Wzór soczewkowy



i powiększenie wynosi

$$\frac{y_2}{y_1} = \frac{x_2}{f_2} = \frac{f_1}{x_1}$$

W optyce geometrycznej często korzystamy ze wzoru soczewkowego

$$\frac{1}{x} = \frac{1}{\delta} + \frac{1}{f}$$

jest on jednak przybliżony - gdzie ono jest?

Droga wyprowadzenia



Z prawa Snella mamy, że

$$\sin r = \frac{n}{n'} \sin i$$

Stosując twierdzenie sinusów do trójkątów PIO i P'IO oraz po skorzystaniu z powyższego można znaleźć położenie punktu przecięcia załamanego promienia IP' z osią symetrii POP'. W końcowym wzorze mamy złożoną funkcję trygonometryczną katów 9, 9' i r. Dla bardzo małych wartości tych kątów zastępujemy sinus kąta przez jego wartość i wzór się upraszcza do

$$\frac{n}{S} + \frac{n'}{S'} = \frac{n'-n}{R}$$

-brak zależności od kata emisji 9.

Promienie emitowane z P pod dowolnym, lecz dostatecznie małym kątem 9 w stosunku do osi symetrii powierzchni kulistej są po załamaniu ogniskowane w jednym punkcie P'. Dla cienkiej soczewki, tzn. dla ośrodka o współczynniku załamania n zanurzonego w ośrodku o współczynniku załamania n' i ograniczonego z jednej strony powierzchnią kulistą o promieniu R₁ a z drugiej powierzchnią kulistą o promieniu R₂ wzór

$$\frac{n}{S} + \frac{n'}{S'} = \frac{n'-n}{R}$$



dla cienkiej soczewki (*t*≅0) otrzymamy

$$\frac{n'}{S_1} + \frac{n'}{S_2} = \left(n - n'\right) \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}\right)$$

Dla powietrza n'=1

Wielkość D=1/f nazywamy zdolnością zbierającą soczewki

D w dioptriach gdy f, R_1 i R_2 w m

$$D = \frac{1}{f} = \left(n - 1\right) \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}\right)$$

Zasada działania mikroskopu

Mikroskop - układ soczewek



Kondensor -Lacence powere ekseptinie enit wisk optiato obserwowanym przedmiocie O $M = M_1 M_2 \cong \frac{l\delta}{f_1 f_2}$ jąca rzeczywisty, odwrocony i powiększony obraz przedmiotu

Powiększenie obrazu rzeczywistego danego przez obiektyw

lupa, przez która oglądamy obraz

a powiększenie okularu

 $M_1 = \frac{l}{f_1}$

$$M_{2} \cong 1 + \frac{\delta}{f_{2}} \approx \frac{\delta}{f_{2}}$$

MIKROSKOPY OPTYCZNE

Dla typowego mikroskopu

 δ ~250 mm, l praktycznie długość tubusa ~160 - 180 mm f_1 ~2 - 15 mm, f_2 ~15 - 50 mm

więc

$M\,{\sim}50$ - 1500

WADY układów optycznych Aberracja chromatyczna

Zdolność skupiająca soczewki to

$$D = \frac{1}{f} = \left(n - 1\right) \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}\right)$$

Ponieważ współczynnik n zależy od długości światła



Materiał	n_d	$n_F - n_C$
Powietrze	1,0003	0,000003
Woda	1,333	0,0065
Dwusiarczek w	ęgla 1,628	0,0342
Szkło crown	1,519	0,0086
Szkło flint	1,620	0,0171
Ciężki flint	1,800	0,0314
Kwarc	1,459	0,0166

Dla linii żółtej d w widmie helu (d=587.6 nm)

Zmiana długości fali z λ do λ +d λ powoduje zmianę zdolności zbierającej o

$$\delta D = \frac{\delta n}{n-1}D$$

Ponieważ

$$D = \frac{1}{f} = (n - 1) \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

Łącząc ze sobą soczewki wykonane częściowo z różnych materiałów można stworzyć soczewkę złożoną, o częściowo skompensowanej aberracji chromatycznej.

Przykład - układ soczewek ze szkła crown i ciężki flint

- dla zmiany λ od długości F (linia niebieska wodoru)
 do długości C (linia czerwona wodoru) to zakres światła widzialnego zmiana δD/D wynosi odpowiednio 1/60.35 i 1/25.48
- ✓ aby z tych szkieł stworzyć achromatyczny układ o D~1 muszą być spełnione warunki

$$D_1 + D_2 = 1 \qquad \qquad \frac{D_1}{60.35} + \frac{D_2}{25.48} = 0$$

Taki układ soczewsk bedzie miał w sumie D~1 i silnie skompensowaną aberrację chromatyczna spełnioną ściśle dla krańców widma światła widzialnego $D_1 = 1.73$ i $D_2 = -0.73$

Układy achromatyczne z tego samego materiału

Można znaleźć, że zdolność zbierająca dwóch soczewek rozstawionych w odległości d wynosi

$$D = \frac{1}{f} = \frac{1}{f_1} + \frac{1}{f_2} + \frac{d}{f_1 f_2} = (n-1)K_1 + (n-1)K_2 + d(n-1)^2 K_1 K_2$$

mamy silną zależność od n²

gdzie K_i - łączy się z promieniami krzywizny

$$K_i = \left(\frac{1}{r_{1i}} + \frac{1}{r_{2i}}\right)$$

aby układ był achromatyczny musi zachodzić

$$\frac{\partial D}{\partial n} = \frac{\partial \left(\frac{1}{f}\right)}{\partial n} = K_1 + K_2 - 2d(n-1)K_1K_2 = 0$$

Jest to spełnione, gdy

$$d = \frac{1}{2(n-1)} \left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2} \right) = \frac{f_1 + f_2}{2}$$

mamy tu zależność od n a nie od n² - więc aberracja achromatyczna została silnie zredukowana

ABERRACJE MONOCHROMATYCZNE

Aberracja sferyczna



Koma i astygmatyzm



WADY

Mikroskopy optyczne Teleskopy optyczne Aparaty fotograficzne



Konstrukcja elementów mikroskopu optycznego



Układ oświetlający przedmiot

lampa + kondensor

na ogół nie jest wymagane by kondensor był wolny od aberracji optycznych

Najczęściej używane typy kondensorów:

- a) kondensor Abbego skupiający światło lampy na obserwowanym przedmiocie
- *b) kondensor achromatyczny z częściowo skompensowaną aberracją chromatyczną*
- c) kondensor aplanatyczny ze zmniejszoną aberracją sferyczną

OBIEKTYW

Układ soczewek tworzący rzeczywisty i powiększony obraz przedmiotu

- Najczęściej stosowane typy obiektywów mikroskopowych:
- a) o małym powiększeniu, ogniskowa f=25 mm, apertura numeryczna NA<0.15,
- b) typu Listera f=15-25 mm NA do 0.3,
- c) typu Amici f=4 mm NA=0.7,
- d) immersyjny f=2mm, NA 1.3



To najbardziej decyduje o jakości mikroskopu i musi

- bardzo silnie powiększać obraz
- mieć ogniskową ~milimetrów
- zbierać światło z możliwie dużego kąta
- być pozbawiony wad optycznych

Obiektywy o najkrótszych ogniskowych - to obiektywy immersyjne

Apertura numeryczna

(NA) decyduje o rozdzielczości mikroskopu:

definiowana jest jako iloczyn współczynnika załamania środowiska między obiektywem i przedmiotem i sinusem kąta rozwarcia obiektywu liczonego od środkowego punktu płaszczyzny przedmiotu.

Okular - to lupa za pomocą której oglądamy obraz przedmiotu



Gdyby okular składał się z jednej soczewki to tubus mikroskopu musiałby mieć bardzo dużą średnicę, aby promienie z krańców pola widzenia nie były obcinane przez ścianki tubusu. By temu zapobiec okulary buduje się z co najmniej dwóch soczewek. Pierwsza umieszczona tuż przed lub za rzeczywistym przedmiotu obrazem to soczewka polowa, kierująca promienie światła ku osi mikroskopu

Okular - to lupa za pomocą której oglądamy obraz przedmiotu



Okular Huyghens'a (a)

- większe pole widzenia
- lepsza korekcja aberracji

Okular Ramsden'a (b)

- gdy chcemy zmierzyć rozmiary przedmiotu - to obraz dawany przez obiektyw znajduje się przed soczewką polową obiektywu i w tym miejscu umieszcza się szkiełko ze skalą mikrometryczną, która widoczna ostro wraz z przedmiotem pozwala określić jego rozmiary.

Granice zdolności rozdzielczej mikroskopu optycznego

To wynika z falowej natury światła



Rola ugięcia światła przy tworzeniu obrazów w mikroskopie została wyjaśniona przez Abbe'go, a postać granicznej zdolności rozdzielczej przyrządów optycznych pochodzi od Rayleigh'a.

Natężenie światła I na ekranie po oświetleniu go przez punktowe źródło opisuje wzór Airy'ego

$$I = \left(\frac{2J_1(\nu)}{\nu}\right)^2$$

gdzie J₁(ν) to funkcja Bessela 1-go rodzaju, $\nu = 9\rho 2\pi/\lambda$, gdzie λ jest długością fali, 9 katem zbieżności promieni świetlnych a ρ odległość punktu obrazu od jego środka na ekranie.

Graniczną zdolność rozdzielczą otrzymamy rozpatrując dwa otwory i szukając najmniejszej ich odległości, przy której będą jeszcze rozróżnialne.

Otrzymany na ekranie układ ciemnych i jasnych pierścieni



Natężenia pochodzące od tych dwóch szczelin dodają się - jeśli znajdują się zbyt blisko to nie zobaczymy oddzielnych plamek. Rayleigh podał praktyczne kryterium granicznej zdolności rozdzielczej obiektywu przyrządu optycznego:

jeśli maksimum natężenia z jednego źródła pokrywa się z pierwszym minimum z drugiego źródła, to jest to najmniejsza odległość, kiedy możemy źródła światła rozróżnić. Pierwsze minimum z funkcji Airy'ego mamy dla v = 3.86, co w przeliczeniu na odległości pomiędzy szczelinami daje

$$\Delta x = \frac{0.61\lambda}{n\sin\vartheta}$$

gdzie λ jest długością światła, ϑ kątem rozwartości obiektywu, a *n* współczynnikiem załamania ośrodka w którym rozchodzi się światło. Przy założeniu całkowitej spójności światła oświetlającego otrzymamy

$$\Delta x = \frac{\lambda}{n\sin\vartheta}$$

Zwiększenie *n* (olejek imersyjny) lub kąta rozwarcia obiektywu powoduje poprawę wartości - to obecnie daje NA~1.4 → zdolność rozdzielcza równa jest prawie połowie długości fali światła Dalsza poprawa Δx to zmniejśżeintelajacpeprzez użycie np. światła ultrafioletowego lub krótkich fal de Broglie'a wiązki elektronów. **Wartość granicznej zdolności rozdzielczej** wiąże się też z zasadą nieoznaczoności Heisenberga.

Pęd fotonu **p** jest związany z jego wektorem falowym **k** i długością fali poprzez

h**k=p** i k= $2\pi n/\lambda$.

Zgodnie z zasadą nieoznaczoności $\Delta x \cdot \Delta p >h$, więc dla każdej ze składowych wektora falowego zachodzi $\Delta x \cdot \Delta k_{x} >= 2\pi$.

Ponieważ nie można stwierdzić, przez który punkt obiektywu wpadł foton do mikroskopu, więc przy kącie rozwartości obiektywu 9, nieoznaczoność składowej wektora falowego $\Delta k_x \leq 2 |\mathbf{k}| \sin \vartheta$. Z tej nierówności otrzymujemy, że **nieoznaczoność położenia punktu emitującego światło** wynosi

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \,\mathcal{P}}$$

MIKROSKOP WSPÓŁOGNISKOWY (KONFOKALNY) (to rozwiązanie, o zdolności lepszej niż to wynika z kryterium Rayleigh'a)

Idea podana przez Minsky'ego w 1957 r. – wykorzystana przez Lemonsa i Quate'a w mikroskopie akustycznym w 1974 r. i przez Brakenhoffa w mikroskopie optycznym w 1979 r.

Mikroskop skaningowy- oświetlana jest tylko bardzo mała powierzchnia.



IDEA: Funkcja rozkładu natężenia światła oświetlającego przedmiot jak i funkcja czułości detektora są zgodne ze wzorem Airy'ego, lecz sygnał zbierany przez detektor jest proporcjonalny do kwadratu funkcji Airy'ego i jest węższy o czynnik ~1.4 od rozkładu samej funkcji - daje to taką poprawę liniowej zdolności rozdzielczej mikroskopu - poprawa objętościowa ~(1.4)³ ~3. Do *oświetlania* używa się *światła monochromatycznego*, więc aberracja chromatyczna nie występuje. Ponieważ oświetlamy i obserwujemy tylko 1 punkt na osi mikroskopu to aberracja sferyczna jest silnie zredukowana.

Dotychczas w mikroskopach optycznych osiągnięto liniową zdolność rozdzielczą ~130 nm, a teoretycznie można osiągnąć dwukrotnie więcej.

MIKROSKOP HOLOGRAFICZNY

Wymagania stawiane obiektywom mikroskopów

- muszą mieć krótką ogniskową (duże powiększenie)
- duży kąt rozwarcie (duże powiększenie)
- dostatecznie jasny obraz przedmiotu
- wolne od aberracji chromatycznej i sferycznej

_może być spełnion dla jednej odległośc ↓

mała głębia ostrości

Tworzenie kolejnych warstw i przetwarzanie w komputerze na obraz 3-D jest bardzo trudne lub wręcz niemożliwe.

Dużą głębię ostrości i szybką rejestrację otrzymamy stosując technikę holograficzną.

Zapis hologramu to zapis natężenia i fazy promieniowania rozproszonego przez przedmiot.

Interferencja wiązki odbitej z nie zaburzona tworzy grubą przestrzenną strukturę dyfrakcyjną odwzorowaną w kliszy jako 3-D siatka dyfrakcyjna. Po oświetleniu takiej kliszy tylko promieniowanie o tej samej fazie i biegnące w tym samym kierunku nie ulegnie wygaszeniu. Zatem w kliszy zobaczymy trójwymiarowy obraz przedmiotu. Rejestracja holograficzna odznacza się tą właściwością, że każdy element hologramu dostarcza informacji o całym obrazie. Jeśli część

hologramu ulegnie zniszczeniu, to obraz całego przedmiotu będzie widoczny, lecz z mniejszą rozdzielczością.



Schemat mikroskopu holograficznego.



Taki mikroskop służył do badania wzrostu pęcherzyków gazu W naczyniu krwionośnym w funkcji ciśnienia. Osiągnięto rozdzielczość lepszą niż 3μm. Hologramy naświetlano 10 przez___ μs Ζ częstotliwością 20 klatek na sekundę.

MIKROSKOP KONTRASTU FAZOWEGO (mikroskopy jasnego i ciemnego pola)

Obiekt umieszczony w polu światła wprowadza zaburzenie amplitudy i fazy światła. Oko ludzkie czuje jedynie średnią wartość natężenia, tj. średnią wartość kwadratu amplitudy, a zupełnie nie odczuwa fazy światła i jej zmiany.

Całkowicie przezroczysty obiekt mający inną gęstość optyczną niż otoczenie wprowadza tylko zmianę fazy światła i dla oka ludzkiego jest niewidoczny - taki obiekt nazywamy **obiektem fazowym** (np. szkło w wodzie)

Wiele obiektów biologicznych ma własności obiektów fazowych.

Sposób na ujarzmienie tego - interferencja wiązki odbitej i wiązki odniesienia.

jeśli faza wiązki odniesienia zostanie przesunięta o nieparzystą wielokrotność połowy długości fali - to zobaczymy obraz obiektu jako jasny na ciemnym tle.

Mikroskop o takiej konstrukcji to **mikroskop kontrastu fazowego**


MIKROSKOP FLUORESCENCYJNY

- Rozwiązuje trudności związane z obserwacją materiałów całkowicie przezroczystych lub mało widocznych - wykorzystanie w obserwowanych materiałach zjawiska fotoluminescencji (wzbudzanie światłem ultrafioletowym, niebieskim lub zielonym elektronów w atomach do wyższych poziomów energetycznych - w czasie deekscytacji następuje emisja światła fluorescencyjnego (t<0.1 ns) lub fosforencyjnego).
- próbka może być wyznakowana barwnikami fluorescencyjnymi
- fluoryzujące molekuły absorbują światło o określonej długości fali
- wracając do stanu podstawowego uwalniają one energię w postaci światła (fluorescencja) lub ciepła
- emitowane światło ma większą długość fali niż wzbudzające (zgodnie z reguła Stockesa), ponieważ część energii tracona jest na ciepło

MIKROSKOP FLUORESCENCYJNY

- rozwinięto szereg różnorodnych technik wykorzystujących barwniki fluorescencyjne
- pozwalają na uwidocznienie w mikroskopie specyficznych struktur żywych komórek
- od małych nieorganicznych jonów, jak Ca²⁺ czy H⁺
- do makromolekuł takich jak białka, RNA czy DNA





- źródłem światła jest specjalna żarówka (zazwyczaj żarnik rtęciowy lub lampa ksenonowa) emitująca promieniowanie UV
- można także stosować wiązki odpowiadające niebieskiemu i zielonemu obszarowi światła widzialnego
- filtr wzbudzenia umieszczony pomiędzy źródłem światła a lusterkiem dichroicznym, przepuszcza światło o pożądanej długości fali odpowiadającej wzbudzeniu fluorescencji w badanym preparacie
- filtr barierowy (supresyjny) wmontowany w tubus lub okular, przepuszcza jedynie widzialna część widma odpowiadającą emisji substancji fluoryzującej, pochłania ultrafiolet, chroniąc tym samym narząd wzroku obserwatora przed szkodliwym działaniem promieni UV





- Iusterko dichroiczne rozdziela ścieżki wzbudzenia i emisji, stanowi ono filtr interferencyjny odbijający fale o krótszej długości, a przepuszczający efektywnie dłuższe fale, dlatego też nazwano je dichroicznym
- obraz uzyskiwany w mikroskopie fluorescencyjnym jest niejako negatywem obrazu z typowego mikroskopu świetlnego: na ciemnym tle uwidaczniają się świecące (fluoryzujące) struktury komórkowe i tkankowe



W mikroskopach fluorescencyjnych można stosować dwa sposoby oświetlania preparatu:

 system diailuminacji - odpowiada przebiegowi wiązki oświetlającej w normalnym mikroskopie optycznym



□• system epiiluminacji - standardowy w nowoczesnych mikroskopach, w których promienie przechodzą przez obiektyw i padają na preparat z góry, światło emitowane przez preparat przechodzi z powrotem przez ten sam obiektyw. W tym przypadku wiązka wzbudzająca (promienie UV) po przejściu przez preparat ulega rozproszeniu i poza nielicznymi promieniami odbitymi nie wpada do obiektywu, a obraz tworzony jest wyłącznie przez promienie widzialnego zakresu widma emitowane na drodze fluorescencji. Taki sposób oświetlenia preparatu polepsza jakość obrazu i zmniejsza narażenie żywych komórek na kontakt ze szkodliwym ultrafioletem.

- w komórce niewiele jest struktur, które utrudniałyby przechodzenie przez nie promieni świetlnych, dlatego też są praktycznie niewidoczne w zwykłym mikroskopie optycznym, mimo ich selekcji i unieruchomienia
- jedną z metod umożliwiających ich wizualizację jest wybarwianie np. barwnikami organicznymi (*Malachite green, Sudan black, Coomassie blue*), z których każdy posiada powinowactwo do szczególnych struktur w komórce
- np. *hematoxylin* ma powinowactwo do ujemnie naładowanych molekuł, dlatego ujawnia lokalizację DNA, RNA, kwaśnych białek
- alternatywną i ogólnie stosowaną techniką jest wykorzystanie barwników i białek fluoryzujących
- niektóre jednak substancje obecne w komórkach i tkankach mają zdolność do własnej fluorescencji: lipofuscyny, porfiryny, chlorofil, hemoglobina, witamina A

- barwniki fluorescencyjne używane są do znakowania interesujących molekuł (poprzez wiązanie się z nimi) w utrwalonych i żywych komórkach
- ich cząsteczki najczęściej zawierają zdelokalizowane elektrony, formalnie reprezentowane jako sprzężone wiązania podwójne, a więc są to głównie wielopierścieniowe związki aromatyczne
- barwniki są szeroko stosowane w monitorowaniu integralności komórki, w badaniach szlaków endo- i egzocytozy, płynności błon, transdukcji sygnału i aktywności biologicznej enzymów
- w dziedzinie genetyki molekularnej sondy fluorescencyjne znalazły zastosowanie w mapowaniu genomów i analizowaniu chromosomów.

- barwnik fluorescencyjny substancja selektywnie absorbująca i emitująca światło o określonej długości fali, obserwowana barwa jest dopełniającą do światła zaabsorbowanego.
- fotony emitowane przez barwnik maja niższą energię (a tym samym większą długość fali) niż fotony absorbowane, co odpowiada za różnicę w położeniu pików wzbudzenia i emisji.



Profil absorpcji i emisji fluoroforu - Alexa Fluor 555



Maksimum absorpcji i emisji fluorescencji

- kolor fluorescencji zależy od własności substancji fluoryzującej
- barwniki emitują głównie światło widzialne, choć niektóre np. Cy5 lub Cy7 – podczerwone.

w zależności od długości fali emisji, powszechnie używane barwniki można podzielić na emitujące światło:

· zielone: *Cy2*, *fluoresceina* (wzbudzana światłem niebieskim)

 czerwone: rodamina (wzbudzana światłem zielonożółtym), Texas red

• podczerwone: *Cy5*, *Cy7*, *Alexa dyes* (wszystkie używane głównie do znakowania przeciwciał)

żółte: Cy3, Alexa 568

•niebieskie: *DAPI* (absorbuje UV, fluoryzuje na jasnoniebiesko, tworzy fluorescencyjne kompleksy z sekwencjami bogatymi w pary AT w podwójnym łańcuchu DNA, stabilny barwnik dla DNA, zwłaszcza w utrwalonych komórkach)





DNA w jądrze wybarwione DAPI

Trzy markery fluorescencyjne: rodamina – czerwona, barwi wszystkie mikrotubule; fluoresceina – barwi na zielono tubulinę, wymaga wzbudzenia światłem UV, dlatego widoczna na rysunku B, C, D; niebieski barwnik DNA (From K.E. Sawin and T.J. Mitchison, J. Cell Biol. 112:941 954, 1991. © The Rockefeller University *Press.*)



Przy wykorzystaniu barwnika fura-2 przedstawiono odmienne stężenie jonów wapnia (kolor czerwony – najwyższe stężenie Ca²⁺, niebieski – najniższe) w komórce Purkinje'go w móżdżku świnki morskiej. Najwyższe stężenie jak widać jest reprezentowane w dendrytach. (D.W. Tank, J.A. Connor, M. Sugimori, and R.R. Llinas.)

Badanie zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów

- wiele bodźców (np. hormony) powoduje wzrost cytoplazmatycznego stężenia jonów Ca²⁺ do poziomu 10⁻⁶M (podczas gdy poziom ten normalnie waha się w granicach 10⁻⁷M), co w efekcie powoduje zmiany metabolizmu wewnatrzkomórkowego jak np. skurcz mięśni
- fluorescencyjne identyfikatory jonów wapnia są wzbudzane lub emitują niewiele się różniące długości fali, kiedy są związane z jonami wapnia i kiedy są wolne
- *fura-2 przedstawiono odmienne stężenie jonów wapnia (kolor czerwony – najwyższe stężenie Ca²⁺, niebieski – najniższe) w komórce Purkinje 'go w móżdżku comórce Purkinje 'go w móżdżku komórce Purkinje 'go w móżdżku komórce Purkinje 'go w móżdżku*
 - taki typ barwników pozwala na monitorowanie sekunda po sekundzie zmian w stężeniu jonów Ca²⁺ w różnych częściach komórki



Potrójne barwienie fluorescencyjne w komórkach ludzkich: niebieskofioletowy – DNA w dwóch jądrach interfazowych, pośrodku chromosomy trzeciej komórki Diagnostyka chorób

- niektóre leki są fluorochromami, jednym ze sposobów określenia miejsca ich kumulacji w komórce jest wykorzystanie mikroskopii fluorescencyjnej
- przykładem takich leków są preparaty stosowane u chorych na schizofrenię - wywołują one szereg efektów ubocznych, niektóre zagrażające życiu.
- by określić miejsca kumulacji toksycznych substancji w komórce, poddano fibroplasty działaniu różnych leków psychotropowych.
- za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej odkryto, że leki wnikają do komórek gwałtownie i kumulują się w licznych organellach komórkowych i aparacie Golgiego.

Jakie są potrzebne powiększenia, by zobaczyć struktury atomowe



Konieczność sięgnięcia do krótszych, niż w zakresie widzialnym, fal

MIKROSKOP ELEKTRONOWY

Pierwszy mikroskop elektronowy

- \checkmark M. Knoll i E. Ruska w 1932 r
- 35 lat po odkryciu elektronu
- kilka lat po skonstruowaniu pierwszych soczewek elektrostatycznych i magnetycznych
 - dostateczna korekcja aberracji to następne 30 lat



Fala de Broglie'a dla elektronu $\lambda \sim 1.225/E^{1/2}$ (λ - nm, E – eV) (dla elektronu o E = 100 keV $\lambda \sim 0.004$ nm, podczas gdy odległości atomów w sieci krystalicznej to $\sim 0.2 - 0.7$ nm).

> To co psuje – to aberracje sferyczne i chromatyczne. Obecnie zdolność rozdzielcza sięga ~ 0.2 nm dla obiektów krystalicznych i $\sim 1.5 - 2$ nm w materiale biologicznym.

Oddziaływanie elektronów z materiałami

Elektrony w materiałach nie pokonują zwykle zbyt dużych odległości



Przyczyny ograniczenia:

 w materiałach o nieperiodycznej strukturze duży udział zderzeń niesprężystych powoduje zwiększenie rozrzutu energetycznego wiązki, a przez to większą aberrację chromatyczną

- trudność przygotowania dostatecznie cienkiego preparatu powoduje zwiększenie rozmycia geometrycznego i energetycznego wiązki elektronów prześwietlającej preparat, a przez to zwiększenie aberracji sferycznej i chromatycznej
- straty energii elektronów zależą od liczby atomowej Z materiału próbki i od jej gęstości. Tymczasem skład pierwiastkowy i gęstość próbek biologicznych mało zależy od ich pochodzenia. W celu uzyskania lepszego kontrastu trzeba zatem użyć wiązki elektronów o większym natężeniu, a taka wiązka powoduje radiacyjne uszkodzenia próbki, a przez to zniekształcenie obrazu.



Transmisyjny mikroskop elektronowy Transmission Electron Microscope

- elektrony z działa przyspieszane napięciem 10 – 100 keV (w High Voltage Electron microscope ~1-3 MeV)
- ogniskowane przez soczewki kondensora oświetlają pole widzenia o średnicy ~2-50 μm
- po przejściu przez materiał, elektrony nie rozproszone zbierane są przez soczewkę obiektywu o aperturze $\sim 20 100 \ \mu m$
 - ta soczewka tworzy pierwszy obraz
- obraz po powiększeniu przez soczewkę pośrednią i soczewkę projektora rzucany jest na detektor (klisza, ekran, CCD)



Działa elektronowe

- prądy ~ 10^{9-10} A/m²/sr
- próżnia w kolumnie mikroskopu ~10⁻² 10⁻⁵ Pa

Transmisyjny mikroskop elektronowy Transmission Electron Microscope

- regulacja pól magnetycznych w soczewkach pozwala zmieniać powiększenie mikroskopu w granicach x000 - x00 000 razy
- elektrony rozproszone w próbce rejestrowane są przez detektor pierścieniowy – niosą one informację o grubości i składzie pierwiastkowym
- elektrony rozproszone sprężyście pochodzą od struktur periodycznych w próbce i niosą informacje o strukturze krystalograficznej preparatu

Transmisyjny mikroskop elektronowy

Zastosowania:

- analiza mikrostrukturalna
- analiza międzypowierzchni
- struktura krystaliczna
- powiększenie do 1 000 000 razy atomowa zdolność rozdzielcza
- lokalna analiza pierwiastkowa

Próbki:

- grubość do ~0.1 mikrona
- minimalna wielkość ~1mm; maksymalna zależnie od instrumentu
- przygotowanie próbki czasochłonne i skomplikowane

Scanning Electron Microscope

zastosowanie głównie do grubych materiałów stałych

- w przeciwieństwie do klasycznego mikroskopu transmisyjnego nie oświetlamy całej powierzchni, lecz ogniskujemy wiązkę na bardzo małej powierzchni i tą wiązką skanujemy powierzchnię próbki
- rozmieszczone wokół próbki detektory rejestrują rozproszone sprężyście lub niesprężyście elektrony z wiązki pierwotnej, elektrony wtórne o małej energii wybite z materiału, lub promieniowanie X
- obraz próbki rekonstruuje się w pamięci komputera
- zdolność rozdzielcza zdeterminowana jest rozmiarami wiązki skanującej (kilka nm), rozproszeniami oraz absorpcją elektronów

Scanning Transmission Electron Microscope lub Analytical Electron Microscope

analogia do optycznego mikroskopu konfokalnego
wiązka elektronów przechodzi przez próbkę i jest silnie ogniskowana



Próbkę otaczają detektory

- elektrony nie rozproszone rejestruje detektor czuły na energię i z dE/dx określamy lokalnie grubość próbki
- elektrony rozproszone sprężyście do przodu pod katem spełniającym warunek Bragga dostarczają informacji o krystaliczności próbki
- elektrony rozproszone niesprężyście do przodu pozwalają nam na obejrzenie preparatu w trybie obserwacji w polu ciemnym



Scanning Transmission Electron Microscope lub Analytical Electron Microscope

- promieniowanie X daje analizę składu pierwiastkowego próbki
- elektrony wtórne wybite do tyłu umożliwiają obejrzenie próbki z największą zdolnością rozdzielczą porównywalną z rozmiarami wiązki
- elektrony pierwotne rozproszone do tyłu (z kąta rozproszenia i energii) dają informację o rozkładzie głębokościowym materiału próbki
- spektrometria elektronów Augera daje informację o składzie pierwiastkowym przypowierzchniowych warstw atomowych materiału próbki

Skaningowy mikroskop elektronowy

Zastosowania:

- obrazy topograficzne
- analiza mikrostrukturalna
- analiza pierwiastkowa w połączeniu z odpowiednim detektorem (EDAX)
- powiększenie 10 50 000

Próbki:

- minimalna wielkość ~0.1 mm
- próbki muszą być przewodzące lub pokryte przewodzącą warstwą

Napis IBM utworzony z atomów ksenonu zaadsorbowanych na atomowo gładkiej powierzchni kryształu niklu.





Defekty struktury krystalicznej (dyslokacje i granica między dwoma ziarnami polikryształu) widoczne na obrazie uzyskanym za pomocą TEM. Aby uzyskać taki obraz, trzeba najpierw przygotować dostatecznie cienką próbkę z badanego materiału. W tym przypadku (stali nierdzewnej) w końcowej fazie preparatyki zastosowano elektropolerowanie - proces kontrolowanego rozpuszczania próbki w elektrolicie. Defekty deformują strukturę krystaliczną, co zmienia lokalnie warunki dyfrakcji elektronów przechodzących przez próbkę. Prowadzi to do zróżnicowania kontrastu obrazu. Odcinki dyslokacji znajdujące się pomiędzy obu powierzchniami cienkiej próbki widoczne są jako ciemne falujące linie (obraz jest rzutem przestrzennej struktury na płaszczyznę). Przecinająca obie powierzchnie próbki granica ziaren odwzorowana jest jako obszar z rozmytymi ciemnymi prążkami (prążki są wynikiem interferencji fal elektronowych w klinowym obszarze jednego z ziaren, podobnie jak prążki Newtona są wynikiem intereferencji fal świetlnych - widzimy więc tu bezpośrednio efekt falowej natury elektronów!). W obszarze granicy widoczne są też inne dvslokacie

Obraz przekroju rzęsek pierwotniaka Chilodonella cucullulus zarejestrowany za pomocą TEM. Ciekawe jest to, że subtelna struktura rzęsek tego pierwotnego narządu ruchu okazała się taka sama u wszystkich organizmów, od pierwotniaków do naczelnych.



Aby uzyskać taki obraz, pierwotniaka trzeba utrwalić, wodę zastąpić najpierw alkoholem, a potem żywicą epoksydową, utwardzić, pokroić na plasterki o grubości około 0.05 mikrometra, umieścić na siateczkach miedzianych, zanurzyć w roztworze zwiększającym kontrast, wysuszyć i włożyć do mikroskopu elektronowego. Jest to skomplikowana procedura, której opracowanie zajęło wiele lat, a którą dziś rutynowo stosują biolodzy i lekarze zajmujący się badaniami mikroorganizmów i tkanek dla celów badawczych i diagnostycznych.

Przygotowanie preparatów z materiałów biomedycznych

Trudne zadanie z uwagi na:

- próżnia ~10⁻² 10⁻⁵ Pa konieczna jest do zmniejszenia rozproszenia elektronów wiązki, ale również do zapobieżenia kontaminacji apertur mikroskopu i próbki resztkami oleju
- próbki biomedyczne przed włożeniem do komory muszą być odwodnione i proces odwodnienia nie może zniekształcać struktury istotnych elementów materiału (komórek, organelli, ...)
- w mikroskopach transmisyjnych do osiągnięcia dobrej zdolności rozdzielczej straty energii wiązki muszą być bardzo małe, więc grubość próbki musi być od kilku do stu nm
- prądy skanujące wiązki elektronowej są ~10 μA, co przy napięciu przyspieszającym ~100kV i średnicy wiązki ~10nm daje moc ~1W/100nm², czyli ~10GW/mm²
- obraz w mikroskopie transmisyjnym powstaje jako stosunek liczby elektronów nierozproszonych do liczby elektronów rozproszonych – ponieważ prawdopodobieństwo rozproszenia zależy od liczby atomowej i gęstości materiału, więc w przypadku materiałów biomedycznych, w których występują małe różnice gęstości i składu zmuszeni jesteśmy stosować tzw. kontrast

Metody odwadniania materiałów biomedycznych

- kąpiele w rozpuszczalnikach (alkohol, aceton) ten proces usuwa również lipidy i inne rozpuszczalne cząstki
- by temu zapobiec utrwala się lipidy w aldehydzie i czterotlenku osmu, co zatrzymuje również procesy chemiczne zachodzące w żywych układach
 - zamrażanie

aby zapobiec krystalizacji proces zamrożenia musi być nagły (~10000 K/s) i to się przeprowadza w ciekłym azocie lub helu i taki preparat ogląda się pod mikroskopem na specjalnie chłodzonym stoliku

Utrwalone i odwodnione próbki biomedyczne zatopione w specjalnej żywicy epoksydowej lub wosku tnie się na warstwy o grubości ~nm przy pomocy mikrotomu.

Kontrast

 poprawiamy nasycając materiał biologiczny w sposób wybiórczy chemikaliami zawierającymi ciężkie pierwiastki

to jest odpowiednik barwienia w mikroskopii optycznej

np.

białka, kwasy nukleinowe łatwo przyswajają sole uranylowe polisachardydy – żelazo kwas garbnikowy podwyższa gęstość elektronową kolagenu lub elastyny





Obraz mikroskopowo-elektronowy mięśnia szkieletowego (*3000). Widoczny regularny układ białek kurczliwych mięśnia. Trójwymiarowa rekonstrukcja aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej przy pomocy tomografii elektronowej. Cysterny aparatu Golgiego mają kolor niebieski, czerwony, fioletowy i zielony. Siateczka śródplazmatyczna została pokolorowana na żółto.

Fot. PNAS.Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. B. J. Marsh, D. N. Mastronarde, K. F. Buttle, K. E. Howell, J. Richard McIntosh. **PNAS** 98: 2399-2406 (2001).



Błyskawicznie zamrożona komórka jest cięta na kilkaset cieniutkich plasterków, a obraz 3D składany jest komputerowo z obrazów poszczególnych plasterków.

Otrzymany obraz komórki jest wystarczająco dokładny, żeby można było na nim obejrzeć przestrzenne ułożenie poszczególnych części.

Metody obrazowania powierzchni materiałów

TECHNIKA	OGRANICZENIA	ROZDZIELCZOŚĆ
Oko	Retina (siatkówka)	700 000 Å
Mikroskop optyczny	Dyfrakcja światła	3 000 Å
Skaningowy ME	Dyfrakcja elektronów	30 Å
Transmisyjny ME	Dyfrakcja elektronów	1 Å
Jonowy mikroskop polowy	Rozmiar atomów	3 Å
Skaningowa mikroskopia bliskich oddziaływań	Rozmiar próbnika	0.1 – 100 Å

Skaningowa µ-wiązka protonowa

- wykorzystanie wiązki jonów (p, α) z akceleratorów Van de Graaff'a lub z tandemu w mikroskopie skaningowym
- szczeliną obiektywową o średnicy 5-200 µm wycina się dobrze skolimowaną część wiązki
- układ kwadrupolowych soczewek magnetycznych ogniskuje tę część wiązki na badanej próbce, uzyskując na niej obraz szczeliny pomniejszony od kilku do kilkuset razy
- skanowanie próbki poprzez jej mechaniczny przesuw albo poprzez odchylanie wiązki w polu magnetycznym lub elektrostatycznym zdolność rozdzielcza to rozmiary plamki (1.5µm do ~100 nm) i rozproszenie jonów w czasie przejścia przez próbkę



Rozmieszczenie detektorów wokół próbki przy skaningowej mikrowiązce protonowej

- **PIXE** (Particle Induced X-Ray Emission) analiza fluorescencyjna indukowana jonami
- **RBS** (Rutherford Backscattering) rozpraszanie rutherfordowskie do tyłu
- **RFS** (Rutherford Forward Scattering) rozpraszanie rutherfordowskie do przodu
- NRA (Nuclear Reaction Analysis) analiza produktów reakcji jądrowych
- **CCM** (Channeling Contrast Microscopy) mikroskopia kanałowania
- **STIM** (Scanning Transmission Ion Microscopy)- skaningowa mikroskopia przechodzących jonów
- **SEM** (Secondary Electron Microscopy) mikroskopia elektronów wtórnych

Próg czułości przy prądach ~kilkadziesiąt pA uzyskuje się po zogniaskowaniu wiązki do średnicy 0.7 - 1.5 μm. Metody SEM, RFS,STIM można stosować jeszcze przy prądach ~fA ogniskowanych do rozmiarów ~100nm.

MIKROSKOPY TUNELOWE

Efekt tunelowy - przenikanie cząstki przez barierę potencjału wyższą od energii kinetycznej cząstki. Prawdopodobieństwo przejścia rośnie z energią cząstki, a maleje eksponencjalnie z szerokością bariery. Efekt tunelowy opisano w ramach mechaniki kwantowej i jest on konsekwencją zasady nieoznaczoności.



Historia - Izaak Newton odkrył tunelowanie fotonów:

- zgodnie z prawem Snella przy przechodzeniu światła z ośrodka optycznie gęstszego do rzadszego istnieje kąt graniczny, powyżej którego jest ono całkowicie odbite,
- po dosunięciu wypukłej soczewki do ścianki pryzmatu, w którym zachodzi całkowite wewnętrzne odbicie światła, Newton zauważył, że wiązka światła '*przeskakiwała*' przez szczelinę powietrzną, a więc przez obszar dla niej zabroniony,
- natężenie światła 'przeskakującego' malało eksponencjalnie z szerokością szczeliny.

Zdolność rozdzielcza mikroskopów tunelowych

Zasada nieoznaczoności dla pola bliskiego

- dla tego pola składowa wektora falowego prostopadła do granicy ośrodków przybiera wartość urojona
- jeśli jedna ze składowych wektora falowego przyjmuje wartość urojoną, to pozostałe mogą być większe od całkowitej długości wektora, $k_x >> |\mathbf{k}|$
- dla powyższego nieoznaczoność położenia dopuszcza wartości $\Delta x \ll \lambda$
- powyższa relacja mówi, że jeśli zbliżymy detektor do obiektu tak blisko, że znajdzie się on w polu bliskim o dostatecznie dużej amplitudzie, to może osiągnąć zdolność rozdzielczą znacznie lepszą niż długość fali promieniowania, a więc znacznie lepszą niż wynika to z kryterium Rayleigha - inaczej - dla odległości mniejszych niż długość fali promieniowania nie zachodzi zjawisko dyfrakcji.
Zdolność rozdzielcza mikroskopów tunelowych

Jeśli w polu elektromagnetycznym umieścimy oddziałujący z nim obiekt, to na granicy ośrodków zaobserwujemy dwie składowe pola:

- **radiacyjną** w postaci fali rozchodzącej się w przestrzeni, która opisuje emitowane lub rozpraszane przez obiekt pole
- **ewanescentną** w postaci fali periodycznej rozchodzącej się w płaszczyźnie rozgraniczającej obydwa ośrodki, ale o amplitudzie malejącej wykładniczo przy oddalaniu się od tej płaszczyzny (ta składowa nasi też nazwę **pola bliskiego**).

Zjawisko tunelowania opisane jest przez pole bliskie.

Skaningowy mikroskop tunelowy Scanning Tunneling Microscope



- wykorzystuje tunelowanie elektronów pomiędzy próbką i zbliżonym do niej ostrzem z materiału przewodzącego prąd elektryczny
- napięcie próbka-ostrze ~dziesiąte części do 1 V (gradient potencjału ogromny ~1GV/m)

Skaningowy mikroskop tunelowy Scanning Tunneling Microscope



- zmiana d o ~1nm powoduje zmianę I o kilka rzędów wielkości
- regulując d tak, by wartość I była stała otrzymujemy mapę topograficzną - czyli kształt próbki

Zasada działania

- odległość ostrze próbka ~nm
- ruch ostrza góra-dół i prostopadle do powierzchni umożliwia skaner wykonany z rurki piezoelektrycznej z jedną elektrodą wewnątrz i kilkoma zewnętrznymi
- pomiędzy próbką i ostrzem płynie prąd tunelowy

$$I \propto (C/d) V e^{-Cd}$$

- d odległość ostrze-próbka
- V napięcie między ostrzem i próbką
- C proporcjonalne do pierwiastka z wysokości bariery potencjału



Obraz uzyskany techniką skaningowej mikroskopii tunelowej, przedstawiający 48 atomów żelaza osadzonych na powierzchni miedzi

Zdolność rozdzielcza pierwszego mikroskopu tunelowego pozwalała już rozróżniać pojedyncze atomy.

dla energii elektronów tunelujących ~1eV odpowiadająca im długość fali de Broglie λ ~1.2 nm, a typowe odległości atomów w ciele stałym wynoszą ~0.3 nm,

więc przy d<λ zdolność rozdzielcza nie jest już ograniczona dyfrakcją.

- preparaty biologiczne są zwykle przewodnikami elektryczności, więc do ich badania można używać mikroskopów tunelowych
- to rozwiązanie nie wymaga umieszczania preparatów w próżni i nie powoduje zniszczeń radiacyjnych, więc można badać żywe komórki





Fragment powierzchni czerwonego ciałka krwi poddanego działaniu alkoholu etylowego. Widoczne są liczne spękania spowodowane procesem hemolizy.

Skaningowy mikroskop sił

Scanning Force Microscope - Atomic Force Microscope

- na ostrze mikroskopu tunelowego działają siły pochodzące od oddziaływania ostrza z materiałem próbki
- miarą siły działającej na ostrze jest ugięcie beleczki
- tą metodą mierzy się siły <10⁻¹³ N (10⁻⁸ N siła potrzebna do zerwania pojedynczego wiązania chemicznego)
- przyrząd mierzący siły pomiędzy atomami ostrza i atomami nienaładowanego obiektu nosi nazwę mikroskopu sił atomowych
- mikroskop taki pozwala na pomiar nie tylko kształtu, lecz też właściwości mechanicznych jak mikrotarcie, adhezja, właściwości elastyczne.

Skaningowy mikroskop optyczny bliskiego pola Scanning Near Field Optical Microscope

- pierwszy mikroskop optyczny działający w polu bliskim 1986 rok
- tu zdolność rozdzielcza lepsza niż to wynika z kryterium Rayleigha gdy detektor znajdzie się w nieradiacyjnym polu bliskim
- osiąga się to, gdy zbliży się do badanego obiektu światłowód zakończony ostrzem równie cienkim, jak ostrze w mikroskopie tunelowym
- światłowód służy do oświetlania badanego przedmiotu, albo zbiera rozproszone przez przedmiot światło i doprowadza je do detektora
- konstrukcja sterowania i skanowania podobna do tej stosowanej w mikroskopie tunelowym
- trudnością jest otrzymanie dostatecznie cienkiego zakończenia światłowodu
 najlepsze wyniki dla granicy rozdzielczości ~λ/200
- mikroskop ten pozwala zajrzeć pod powierzchnię obiektu, podczas gdy skaningowy mikroskop tunelowy lub mikroskop sił atomowych pozwalają tylko na badanie powierzchni obiektu

Mikroskop ultradźwiękowy



- soczewka (wykonana zwykle z szafiru) to najważniejsza część mikroskopu
- z soczewką styka się przetwornik piezoelektryczny przetwarzający impuls elektryczny wysokiej częstości (od 100 MHz do kilku GHz) na drgania mechaniczne
- próbka umieszczana jest w ognisku soczewki
- sygnał akustyczny odbity od próbki powraca do soczewki i przez przetwornik piezoelektryczny jest przetwarzany na sygnał elektryczny i kierowany do układu detekcji
- skanowanie odbywa się przez mechaniczny ruch stolika z próbką

Mikroskop ultradźwiękowy



- możliwe jest rozwiązanie z dwoma głowicami nadawczą i odbiorczą wówczas mówimy o mikroskopie ultradźwiękowym transmisyjnym
 można rejestrować amplitudę lub fazę sygnału odbitego od próbki
- obrazy akustyczne preparatów biologicznych odznaczają się bardzo silną kontrastowością, a przestrzenna zdolność rozdzielcza mikroskopów ultradźwiękowych sięga ułamka mikrometra