

GÜNÜMÜZDE MİKROSKOP



Hakan AKBULUT*

Biyolojik bilimlerde olduğu kadar endüstrinin bir çok alanında da vazgeçilmez bir araştırma aracıdır mikroskop. Geçen 300 yıl boyunca ışık mikroskobu basit bir alet iken karmaşık bir araştırma aracına doğru gelişme göstermiştir. Bilindiği gibi ilk mikroskop 1600'lü yıllarda yapılmıştır. 1673 yılında Hollanda'lı Anton van Leeuwenhoek'un yaptığı elle tutulan basit mikroskobu, planokonveks ve bikonveks mercekler içeriyordu ve 30 - 275 defa büyütme kapasitesine sahipti. Bu basit aletle bazı bakteriler şekillerini görebilmek mümkündü. Mikroskobun bulunması biyolojik bilimlerde bir çığır açmış ve özellikle de dokuları inceleyen histoloji biliminin doğmasına sebep olmuştur.

Sonraki yıllarda, özellikle 1800'lerin sonlarında Carl Zeiss, Ernst Abbe, Otto Schott ve August Kohler gibi araştırmacılar ışık mikroskobunun gelişmesine hem teorik olarak büyük katkıda bulunmuşlar hem de optik elemanlarını geliştirmişlerdir. Mikroskobun ayırım gücü uzun yıllar önce pratik sınırına ulaşmış-

sa da gelişen lens, bilgisayar ve lazer teknolojisi optik elemanların kalitesini büyük ölçüde geliştirmiş bulunuyor. Yakın bir gelecekte optik mikroskobun ayırım gücünün sınırının, örneğin ultrasound vb. sistemler sayesinde aşılması mümkün görünmektedir. Bu yazıda mikroskop teknolojisindeki ve özellikle mikroskobun biyolojideki kullanımıyla ilgili yeni gelişmeleri özetlemeye çalışacağız.

MİKROSKOBUN ELEMANLARI

Bir mikroskobun elemanları genel olarak incelenen numunenin (meselâ biyolojik, metalürjik veya mineral) yapısına, istenen büyütme gücüne ve son görüntünün şekline (fotoğraf, projeksiyon veya video görüntüsü) göre belirlenir. Lens sistemi - oküler, objektif ve kondansatör - ve aydınlatma kaynağı aletin kalbini teşkil eder. Yine her bir elemanın dizaynı da büyük ölçüde mikroskobun tipine bağlıdır.

Optik Lensler : Mikroskobun optik tüpünün alt ucunda objektifler ve üst ucunda da oküler adı verilen ve cismin büyütülmüş görüntüsünü veren yarınsak mercekler bulunur. Uzun yıllar boyunca optik merceklerdeki küresel ve kromatik sapmalar ve

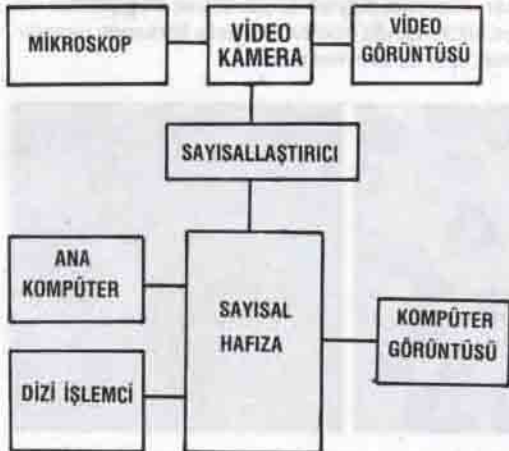
* H.Ü. Tıp Fakültesi

astigmatizm gibi büyük hatalar günümüzde en azından çok pahalı sistemlerde pratik olarak ortadan kaldırılmış durumdadır. Fakat görüntüde ve optik sistemde ışığın sapması bir süre daha mikroskobun ayırım gücünü sınırlandıran majör faktör olarak kalacağı benziyor. Bir cisim uygun ışık kaynağı ile aydınlatıldığında cismin görüntüsü etrafında bir saçak serisi meydana gelir. Bu saçaklar da aletin birbirine çok yakın iki cisimi ayırtma yeteneğini büyük ölçüde etkiler. Mikroskopta bir objektifle birbirinden kesin olarak ayrılabilen iki nokta arasındaki mesafe o objektifin ayırım gücünü yapar. Mikroskobun büyütmesi de bu mesafenin küçüklüğü oranında artar.

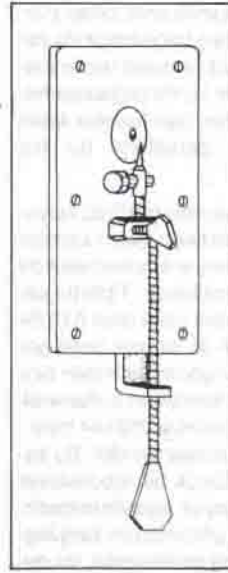
Kondansatör : Kaynaktan gelen ışık demetini kırarak cisim üzerinde toplamaya yarayan bir yakınsak mercektir. Kullanılan kondansatörler mikroskobun tipine göre değişmektedir. Örneğin karanlık saha kondansatörleri yağ immersiyonlu veya kuru olabilmektedir ve daha ziyade düşük büyütmelelerde kullanılırlar. Bunlar o şekilde yapılmışlardır ki, objektife ışık direkt olarak girmemekte ve sadece numunenin kendi parlaklığı karanlık zemin üzerinde görünmektedir. İletilen ışıkla görünebilen çok küçük cisimler (örneğin bakteri kamçıları gibi) sadece bu yolla görülebilirler.

Işık Kaynakları : Işık mikroskobisinde 12 voltluk quartz, halojen lambaları tercih edilmektedir. Çünkü bu kaynaklar iyi bir fotoğraf için gereken 3200 K renk sıcaklığında sabit kalabilmektedir. Günümüz mikroskoplarında ışık şiddeti, voltaj kontrolünü değiştirmeden araya nötral dansite filtreleri koymak suretiyle kontrol edilebilir.

Fotoğraf : Mikrobilgisayar kontrolü altındaki otomatik kamera sistemleri günümüzde bir kural haline gelmiştir. Modern mikroskoplar yapı olarak daha çok kübik, açılabilir veya modüler olma eğilimindedir. Bu yapısal özellikler de aletin stabilitesini ve kuv-



Mikroskop dijital görüntü işleme sisteminin blok diyagramı.



Anton van Leeuwenhoek'un (1673) mikroskobu. Cisim keskin noktaya yerleştirilmekte ve gözlemci gözünü lense iyice yaklaştırmaktadır. Işık kaynağı ise güneştir.

vetini artırmaktadır. Modern mikroskoplarda fotoğraf çekimi otomatik olarak kontrol edilmektedir. Daha önceleri elle ayarlanan pek çok eleman şimdi motorize edilmiş ve otomatikleşmiş durumdadır. Bu elemanlar arasında objektifleri, kondansatörleri, kaba ve ince odaklama ayarını ve düşük büyütmelelerde kullanılan otomatik odağı sayılabiliriz.

BİLGİSAYAR UYGULAMALARI

Hemen hemen her sahada olduğu gibi bilgisayarın mikroskopiye girmesi bu alanda da büyük yeniliklere yol açmıştır. Mikroskopla birleştirilen video kameralar ve bilgisayarlar hücre hareketlerinin incelenmesi, klinikte kan örneklerinin otomatik analizi ve özel olarak işaretlenmiş biyolojik maddelerdeki floresan yoğunluğunun ölçülmesi dahil pek çok yerde kullanılmaktadır.

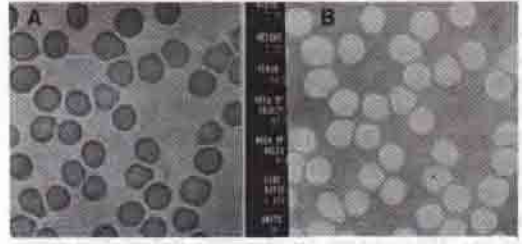
Görüntü - İşleme Teyizatı : Bir mikroskobun normal çıkışı olan optik görüntü, ister direkt olarak görülsün isterse bir fotoğraf filmine alınsın, her iki durumda da bilgisayar için uygun değildir. Zira bilgisayarlar sadece sayısal bilgileri işleyebilmektedir. Bir optik sayısallaştırıcı, optik görüntüyü tarayıp sonra bunu dijital (sayısal) görüntü adı verilen kodlanmış değerler dizisi şekline çevirmek suretiyle bu problemi halledebilir. Yine dijital görüntü elde etmek üzere mikroskoba taşıyıcı fotoğraflıcalar, sayısallaştırıcı tabletler ve fotodiyot dizileri dahil pek çok parça eklenebilir. Her ne kadar bu parçaların her birinin kendilerine özgü avantajları varsa da bilgisayar mikroskobisinde elektronik görüntü oluşturan video kameralar daha çok güven vermektedir.

Bilgisayar mikroskobisinde video teknolojisinin en büyük avantajı görüntü üretim hızıdır ki, bu, standart programlı bir kamera için saniyede 30 görüntü-

ye kadar varmaktadır. Video kameranın çıkışı yüksek hızlı bir video sayısallaştırıcıya bağlandığında kamerayla aynı hızda video sinyali bireysel resim elemanları dizisine dönüştürülür ve bu da bilgisayar hafızasında depolanır. Günümüzde, hızlı hareket eden cisimlerin incelenmesi için genellikle bu hız gereklidir.

Bilgisayar hafızasındaki sayısal görüntü boyutu ve bunu idare etmek için gereken işlem zamanı mikroskop görüntülerinin bilgisayarla işlenmesinde potansiyel bir problem teşkil etmektedir. Tipik bir sayısal görüntü her biri 512 bireysel pixel olan 512 dizi içermektedir ki, her bir pixel de orijinal optik görüntüdeki grinin 256 muhtemel görüntüsünden birini temsil etmektedir. Standart formatları kullanarak işlemde önce bu sayısal görüntünün 262144 byte'lik bilgisayar hafızasına depolanması gerekir. Bu sayısal görüntünün boyutu ise küçük bir laboratuvar bilgisayarının kapasitesini kolayca aşabilmektedir. Eğer bir de aynı anda bir çok görüntünün karşılaştırma amacıyla hafızaya alınması gerekiyorsa, bu durumda problem daha da büyüyecektir. Söz konusu hafıza problemi ayrıca işlem hızını da sınırlandırmaktadır. Bir kaç saniyelik bir gecikme bile, eğer işlenen görüntü yüksek hız veya enstantane uygulamaları için gerekiyorsa kabul edilemez bir durum ortaya çıkarır.

Bu sınırlamalar, dizi işlemcileri adı verilen özel yardımcı aletler kullanmak suretiyle ortadan kaldırılabilmektedir. Bu aletler bir veya daha fazla sayıda dijital görüntüyü depolamak için ayrı ayrı hafızalara sahiptir. İstenen özelliklere sahip değişik dizi işlemcilerini bugün için piyasadan temin etmek mümkündür. Dizi işlemcileri görüntü işleme uygulamaları için gereken zamanı büyük ölçüde azaltmıştır. Özellikle yüksek hızlı uygulamalar için bunların mutlaka kullanılması gerekmektedir. Fakat dizi işlemcilerinin kendileri, örneğin bir doku kültürü hücresinin belirlenmesi ve tanımlanmasında olduğu gibi mikroskopideki daha karmaşık işleri yapabilecek kadar karmaşık değildir. Bunları yapabilmek için dijital görüntü



Görüntü analizi. (a) Orijinal video görüntüsü (b) Periferik kan yaymasındaki alyuvarları karakterize etmek için kullanılan otomatik analiz sonuçları.

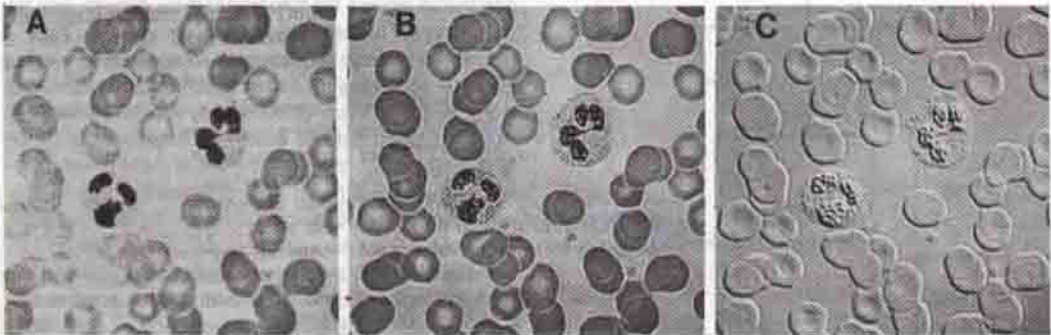
üzerinde ilave birtakım işlemler yapmak gerekmektedir. Bu ilave işlem de görüntü işleme uygulamalarında çoğu zaman sınırlayıcı bir basamak olmaktadır.

Mikroskop görüntülerindeki bilgisayar uygulamalarını başlıca iki bölüme ayırabiliriz : Görüntü analizi ve görüntü işleme. Görüntü analizinde bilgisayar işleminin amacı, tanımlayıcı sayısal değerler elde etmektir. Örneğin bir mikroskop sahasındaki hücrelerin sayısı veya boyanmış bir hücre çekirdeğinin ortalama yoğunluğu gibi.

Görüntü işleme adı verilen ikinci uygulama ise, görüntüyü gözlemciye daha anlamlı hale getirir. Örneğin istenmeyen zemini uzaklaştırmak için görüntü çıkarma işlemleri veya monokrom bir görüntünün kontrastını artırmak için renklendirme programları gibi.

BİYOLOJİDE LAZER VE BİLGİSAYAR MİKROSKOBİSİ

Lazer mikroskopisi, hücre biyolojisindeki temel problemleri inceleyebilmek amacıyla bilgisayar görüntü işlemeyle birleştirilmiştir. Bu çalışmalarda lazer, hücresel olayları seçici olarak değiştirmek veya hücre içinde özel bir bölgede floresans uyandırmak için kullanılmaktadır.



Görüntü artırımı. (a) Bir periferik kan yaymasındaki iki akyuvarın orijinal video görüntüsü (b) Hücre sınırlarını belirginleştirmek amacıyla kullanılan sayısal filtrelemeden sonra aynı görüntü. (c) Yatay bir gradient filtresiyle sayısal filtrelemeden sonraki orijinal görüntü.

Hücre Düzeyinde Mikrocerrahi : İlk defa 1969 yılında MW Berns ve arkadaşları, standart bir faz kontrast mikroskobundan yeşil argon - lazer demetini geçirecek kültür ortamında üretilen hücrelerin kromozomları üzerinde istedikleri noktaya odaklamayı başarmışlardır. Geçen 20 yıl süresince bu teknik ribozomal DNA'daki özel genleri çalışacak ve tüm kromozomları uzaklaştırabilecek hale getirilmiştir. Genetik sahasındaki bu uygulamaların yanı sıra lazer mikrodemeti çekirdekçik, mitokondri, sentriyoller, kloroplastlar, myofibriller ve hücre zarı dahil olmak üzere hücrenin diğer elemanlarına da uygulanabilmektedir.

Bilgisayarın lazerle birleştirilmesi ise lazer uygulamasından sonra çok sayıdaki hücreyi takip etme ihtiyacından doğmuştur. Günümüzde mikroskop bir bilgisayar görüntü işleme sistemi ile kontrol edilebilmektedir. Bu sistem sayesinde bir hücre, zaman içinde hareket ettikçe sürekli olarak optik sahanın merkezinde tutulmuş olmaktadır. Mikroskobideki bu gelişmeler hücre hareketinin mekanizması ve kontrolü ile ilgili çalışmaları oldukça kolaylaştırmıştır. Örneğin bir araştırmada deney ortamında çoğaltılan semender akyuvarları, hücrenin hareketinden sorumlu olduğu düşünülen sentriyol bölgelerinden lazerle ışınlanmıştır. Işınlanmadan önce düz bir hat üzerinde hareket eden hücrelerin ışınlanmadan sonraki hareket patternleri (bilgisayarla izlenerek elde edilen) rastgele olmuştur. Neticede araştırmacılar sentriyol bölgesinin aslında hücre hareketinin kontrolünde rol aldığı sonucuna varmışlardır.

Lazerle Uyanılan Mikrofloresans : Hücre içindeki herhangi bir yapıyı yok etmenin yanı sıra lazer, hücrede istenen bölgelerde floresans uyarmak için de kullanılabilir. İlk çalışmalar daha çok hücre zarının incelenmesi yönünde olmuştur. Zar üzerindeki özgül moleküllerin hareketliliğini incelemek amacıyla bugün de geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Burada lazer, floresanla işaretlenmiş hücrelerin yüzeyinde mikron çapında noktacıklar şeklinde floresans yayar.

Lazerle uyanılan mikrofloresans uygulaması, bugün artık hücre içi bölgelere kadar genişlemiştir. Floresanla işaretlenmiş hareketli moleküllerin hücre bölünmesi esnasındaki hareketlerini ve dağılımını açığa çıkarmak amacıyla çalışmalar daha çok mitotik apereye yönelmiş durumdadır. Yine kasılan kalp kasi hücrelerindeki mitokondrielerin durumu da çalışılan konular arasındadır. Bu çalışmalarda mavi bir helyum kadmiyum lazeri, rhodamin molekülü ile işaretlenmiş bir mitokondri üzerinde bulunan mikron çapındaki bir noktaya odaklanmaktadır. Floresans yoğunluğundaki dalgalanma belli bir süre izlenmekte ve böylece hücrenin belli bölgelerindeki tek tek mitokondrielerin solunum aktivitesiyle bütün hücre aktivitesi arasında ilişki kurmak mümkün olabilmektedir.



TARAYICI AKUSTİK MİKROSKOP

Işık dalgalarının mikroskobide yüzyıllardır kullanılmasına karşılık ses dalgalarının kullanılması sadece 10 yıllık bir geçmişe sahip. Sesle görüntüleme başlangıçta ışıkla karşılaştırılmaz gibi görünmektedir; ışık, maddenin elektriksel ve manyetik alan dalganmalarını içerirken, ses dalgaları maddenin titreşimsel hareketini kapsamaktadır.

Akustik mikroskobide genellikle su veya süpersıvı helyum içeren bir sıvıda odaklanmış ses dalgaları kullanılır. Burada kullanılan ses dalgaları tahmin edileceği gibi frekansı 0.1 ve 10 gigahertz (1GHz = 10⁹Hz) arasında değişen yüksek frekanslı dalgalardır. Bunlar tipik mikrodalga - radar frekanslarıdır ve bu nedenle de akustik mikroskobide mikrodalga teknolojisi rahatlıkla kullanılabilir.

Bir mikroskobun ayırım gücünün tayinindeki en önemli faktör, o mikroskop tarafından kullanılan ışınmanın dalga boyudur. Akustik mikroskobide kullanılan frekanslar optik mikroskobide kullanılanlardan çok daha düşüktür de ses ışıktan daha yavaş yayıldığı için, akustik dalga boyu optik dalga boyu aralığına uygun düşürülebilir. Meselâ 3GHz'de sesin sudaki dalga boyu yeşil ışığın dalga boyuyla (550 nm) aynıdır. 8GHz'de helyum içinde sesin dalga boyu ise sadece 30 nm'dir ki bu, elektromanyetik spektrumun X-ışını kısmına denk gelmektedir.

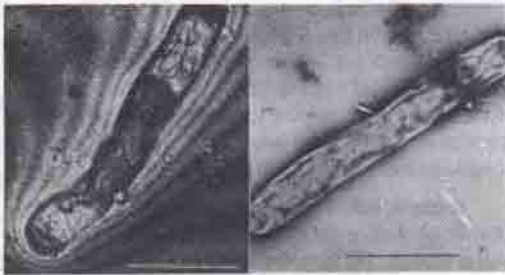
Akustik Mikroskobun Prensipieri : Ses dalgaları ile görüntü elde etmek için öncelikle uygun bir ses üretmek, bunu numune üzerine odaklamak ve sonra da ekoyu almak gerekir. Ses dalgaları üretimiyle ilgili çalışmalar hâlâ gelişme gösterirken, esas olarak çok eski bir kavram olan piezoelektriğe dayanılmaktadır. Piezoelektrik maddeler, bir voltaj uygulandığında ya genişler veya büzülürler. Sonuç ola-

rak bir piezoelektrik plağın etrafındaki dalgali bir voltaj, plağı mekanik olarak titreştirir. Şayet bu plak, ki bunun bir transdüser olduğunu düşünelim, hacimli bir materyale bastırılırsa oluşan ses dalgaları bu hacim içine doğru gönderilir. Eğer hacimdeki ses dalgaları transdüserine tekrar geçerse, sıkışan ve genişleyen sese cevap olarak dalgali bir voltaj açığa çıkacaktır.

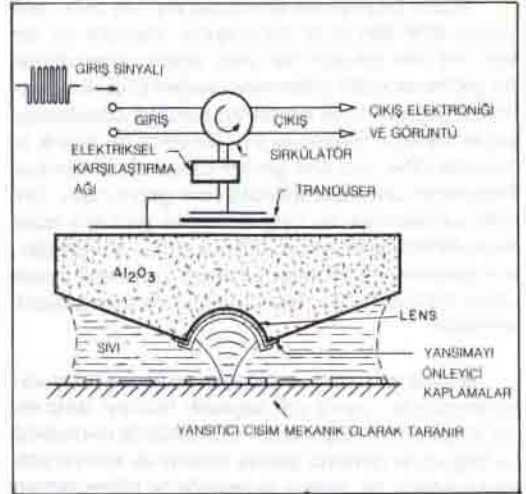
Böylece piezoelektrik bir transdüser geleneksel elektroniklerle birleştirildiğinde hem uygun ses dalgalarını üretmek ve hem de almak mümkün olabilmektedir. Ses dalgalarının odaklanması ışıkta prensiplere çok benzer. Elektrik sinyalleri transdüserine uygulandığında safir (Al_2O_3) içine kümeleşen düz ses dalgaları üretilir. Oluşan düz dalgalar safir mercekten sıvıya geçtikçe içe doğru kırılırlar; çünkü, sesin sıvılardaki hızı katılardakinden daha düşüktür. Aynı durum ışık için de geçerlidir ancak, ışığın hızı farklı ortamlarda pek fazla değişmediği için kırılma o kadar güçlü değildir.

Sıvı ve katı ortamlardaki bu hız farkı, akustik mikroskobide önemli sonuçlar doğurmaktadır. Ses daha yavaş hızla yayıldığı sıvı ortamda kırılmaya uğradıkça, dalgalar da eğri yüzeye dik olarak toplanırlar. Böylece oldukça küresel ve konverjan (birbirine yaklaşan) dalgalar üretilir ve neticede sapması sınırlı bir odak oluşturulur. Sesin sıvılarda fazlaca kırılmaya uğraması optik merceklerde görülen küresel sapma gibi problemleri de ortadan kaldırmaktadır.

Şimdi yüksek frekanslı ses dalgaları üretebildiğimizi ve bunları numune üzerinde bir noktada odaklayabildiğimizi düşünelim. Bu durumda akustik bir görüntüyü nasıl oluşturacağız? Bunun cevabı oldukça basit. Numune boyunca lensi mekanik olarak tarayarak odaktan akustik sinyali, yani ekoyu almak yeterli. Lensin her pozisyonundaki eko şiddeti kaydedilir ve sonuç görüntü bir katod ışını tüpü (CRT) üzerinde gösterilir. Bu görüntüleme sistemi, tıpkı tarayıcı elektromikroskobunkine benzemektedir. Aradaki fark, taramanın burada elektronik olarak değil de mekanik olarak yapılmasından ibarettir.



Kesit yapılmamış bir myxobakterinin süpersıvı helyum akustik mikroskobundaki görüntüsü (a). Aynı bakterinin elektron mikroskobundaki görüntüsü (b).



Tarayıcı akustik mikroskobun yapısı. Çinko oksit bir piezoelektrik transdüserine elektrik sinyalleri uygulanır, bu da katının (Al_2O_3) içine doğru ses dalgalarını üretir. Ses sıvı içinde kırılır, numune üzerinde odaklanır ve sonra eko transdüserine geri döner. Lens, numune boyunca mekanik olarak tarama işlemi yaparken elde edilen eko yoğunluğu lensin pozisyonunun bir fonksiyonu olarak kaydedilir.

Akustik Mikroskobun Geleceği : Günümüzde su ile çalışan tarayıcı akustik mikroskobu, dünyanın birçok yerinden, özellikle Batı Almanya, İngiltere ve Japonya gibi ülkelerden elde etmek mümkündür. Bu aletler, bilim ve endüstride yüzey altı görüntüleme, elastik özelliklerin görüntülenmesi ve tahrip etmeksizin görüntüleme gibi uygulamaya sahalar bulmaktadır. Bu aletlerle elde edilebilen ayırım gücü, 1μ 'dan biraz daha iyidir ve maliyeti de tarayıcı elektron mikroskobundan daha ucuz değildir. Ayrıca sesin suda zayıflaması olayı nedeni ile su mikroskobunun ayırım gücü hiçbir zaman 200 nm 'den daha iyi olamayacaktır.

Süper sıvı helyum akustik mikroskobunda sesin zayıflaması olayı sözkonusu değildir. Hali hazırda bu mikroskobun yana doğru ayırım gücünün 20 nm olduğu gösterilmiş durumda. Ancak bundan da önemlisi, bu mikroskopta frekans artırmak için herhangi bir fiziksel engel bulunmaması ve dolayısıyla ayırım gücünün atomik mesafelere yani $1 - 2 \text{ nm}$ 'ye indirilmesinin mümkün görülmesidir. Bu ayırım gücü akustik kontrast mekanizmaları ve ses dalgalarının tahribatının çok az olması gibi özelliklerle birleştirildiğinde özellikle biyolojik bilimler için oldukça yararlı bir mikroskobu aracı ortaya çıkmaktadır.

Günümüzdeki optik ve akustik mikroskoplardan dizaynı, verimliliği ve yaygın olarak kullanılabilirliği, cam, bilgisayar, lazer ve akustik teknolojilerindeki önemli ilerlemelerin bir sonucudur. □