

DALGA OPTİĞİ VE MİKROSKOPLAR

Sefika Hatipoğlu*

Mikroskopla çalışılırken mikroskopik görüntünün oluşumunda önem kazanan dalga optiği konusu, genellikle hiç ele alınmaz. Oysa mikroskopların çalışma prensiplerinin anlaşılması, bu konuyla ilgili bazı kavramların da irdelenmesini gerektiriyor. Işık dalgaları, fazları, dalgaların uyumluluk, girişim ve kırılma özelliklerine bir göz atmak, bu konuda daha bütünsel bir bakış açısı kazanmamızı sağlayabilir.

Işık ışınları, sinüs dalgaları halinde yayılmakta. Aşağıdaki şekilde ışık dalgasının fiziksel özelliklerini görebiliyoruz.

Herhangi bir noktanın, ışık dalgasının belirli bir "fazında" bulunduğundan söz edilir. Aşağıdaki şekilde a ve d noktalarının ışık dalgasının aynı fazlarında, b ve c noktalarının ise dalganın farklı bir fazında olduğu görülüyor.

Aynı dalga boyunda olan, aynı düzlemde salınan ve aynı zamanda aynı uzaysal noktada etkili olan ışık dalgaları "eşvreli (koherent)" olarak nitelendirilirler. Bu özellikleri bulandıran ışın dalgaları, karşılıklı etkileşime (interferans = girişim) özelliğini de kazanmış olurlar. Bu durumda koherent dalga dizileri birlikte yeni bir ışık dalgasında birleşirler. Yeni dalganın genliği, girişim yapan dalgaların genlikleri ve faz ilişkileri tarafından belirlenir.

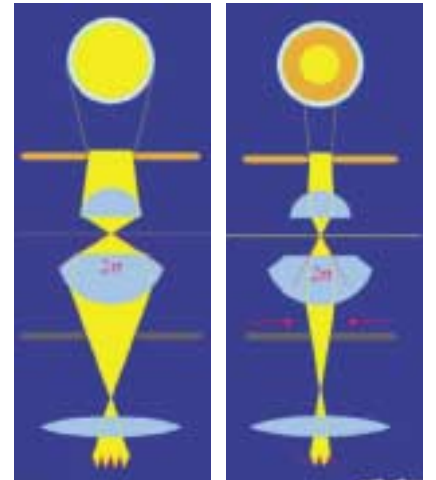
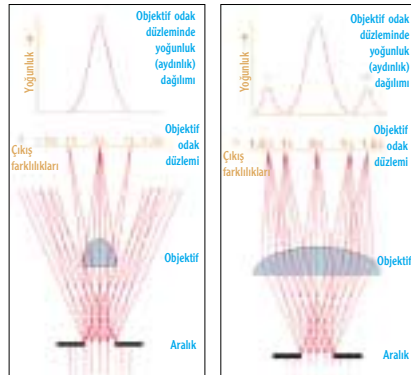
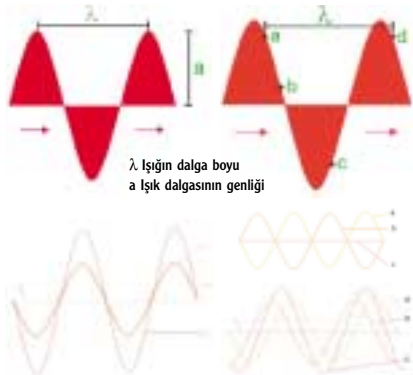
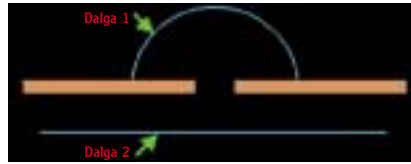
Aşağıdaki örnekte a ve b dalgaları aynı fazlarda seyretmektedirler. Oluşan yeni dalga c, dalgaların genliklerinin geometrik eklenmesiyle oluşur. a ve b dalgaları aynı şiddette genliğe sahip olduklarından, oluşan yeni dalganın genliği iki katına çıkar.

Aşağıdaki ikinci örnekteyse, a ve b dalgaları yarım dalga boyu farkla yayılmakta. Oluşan dalganın genliği, yine diğerlerinin genliklerinin toplamı. Ancak dalgalar karşılıklı olarak birbirlerini söndürdüklerinden, genlikleri de birbirine eşit olduğundan, oluşan yeni dalganın genliği 0 olur. Üçüncü örnekteyse a ve b dalgaları birbirlerini

1/4 dalga boyu faz farkıyla izlemekteler. Bu durumda oluşacak yeni dalganın genliği birinci örnektekinden düşük, ikinci örnektekinden büyük olacaktır. Su dalgalarında görülen kırılma özelliği, ışık dalgalarında da var. Bir engelle karşılaşılan ışık dalgaları,

buldukları bir açıklıktan yarım daire oluşturarak geçerler. Dalgaların kırılması olayı, mikroskopi tekniğinde de ortaya çıkar. Aralıktan geç-

miş olan dairesel dalga, birbirine paralel ışınlardan oluşmuştur. Bu birbirine paralel ışınlar objektife girince odak noktasında birleşirler. Bu noktada olaya katılan bütün dalga dizileri girişim gösterir. Bütün dalgalar aynı fazdaysa, şiddet oldukça yükselir ve en yüksek parlaklığa ulaşılır. Bu düzeydeki parlaklık "maksimum 0 düzeni" olarak adlandırılır. Tersi durumdaysa yarım dalga boyu faz farkına sahip dalga-



Sayısal açıklık (NA) büyüdükçe aydınlık alan da büyük (solda); NA küçüldükçe aydınlık alan da küçülüyor ve karanlık alanlar ortaya çıkıyor (sağda).

Elektron Mikroskopi

Elektron mikroskopi tekniğinde elektromanyetik odaklama söz konusudur. Aktive edilmiş elektron demetleri örnek içinden geçerken kırılır ve üst yüzeyden yansıtılırlar. Elektron demetleri elektrik akımıyla kızdırılan çok ince iğne formundaki katotlar tarafından üretilir ve anotta bulunan yüksek gerilim tarafından emilir. Hızlandırılmış elektronlardan oluşan ışınlar, ışık mikroskobundaki ışın yolunu izlerler. Bu mikroskopların lens sistemlerinin içinden elektrik akımı geçer ve çevrelerinde manyetik alan oluşur. Uygun olarak yapılandırılmış mıknatıslar, ışık mikroskoplarında merceklerin gördüğü ışığı görürler.

Işınları önce kondensörde toplanır ve nesneden geçerken sapma gösterirler. Sapmanın derecesi ortamdaki elektron yoğunluğuna bağlıdır. Atom kütlesi ne kadar fazlaysa sapma da o kadar fazladır. Biyolojik nesnelere düşük kütle ağırlıklı karbon, hidrojen, azot ve oksijen atomlarından oluştuğu için çok sınırlı kontrast gösterirler. Bunun için preparatlar ağır metallerle işlem görürler.

Bir elektron mikroskobunun yapısı



Preparat kalınlığının da 100 nm'den daha fazla olmaması önerilir. Preparat, kalın olması durumunda elektronların emilmesiyle doğan ısıdan etkilenerek nesneyi bozar. Bu yüzden elektron mikroskoplarında canlı nesnelere gözlenmez.

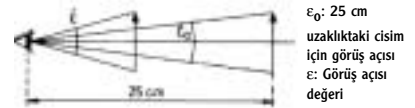
Elektronlar yüksek gerilim altında ve vakumda hızlandırılırlar. Çünkü hava, elektronların hızlanmasını önler. Nesneye girdikten sonra dağılıma uğrayan elektronların objektifte toplanmasıyla oluşan ara görüntü, projektifle daha da büyütülür. Burada oluşan resim, floresans gösteren plakada görünür hale getirilir. Elektron mikroskoplarında görüntü siyah-beyazdır.

Modern cihazlarda biyolojik nesnelere çözünürlüğü 0,2-0,3 nm'yi bulabiliyor. Bu şekilde de 300 000 kez büyütme gerçekleştirilebilir. Elektron ışınlarının dalga boyu ne kadar azsa (ör. 0,001 nm) çözünürlük o kadar fazladır.

Elektron mikroskoplar kontrastlaştırılmış ultra ince doku preparatları, izole edilmiş hücre zarı parçaları, virüsler, makromoleküler kompleksler, DNA ve proteinler gibi moleküller ve proteinlerin immün işaretleme çalışmalarında kullanılırlar.

parat için karakteristiktir. Bu görünüm "primer ara görüntü" olarak adlandırılır. Bu aşamadan sonra ışınlar ara görüntü düzleminde girişim yaparlar. Ne kadar çok bükülmüş ışın dalgası girişim yapmak üzere buraya ulaşırsa, mikroskopik görüntü nesneyi o kadar iyi temsil eder. Sayısal açıklık (numerik apertür) ne kadar büyük olursa, girişim yapmak üzere objektifin odak düzlemine ulaşan bükülmüş ışın sayısı da o kadar fazla olur.

Mikroskopların Yapısı ve Görüntü Oluşumu

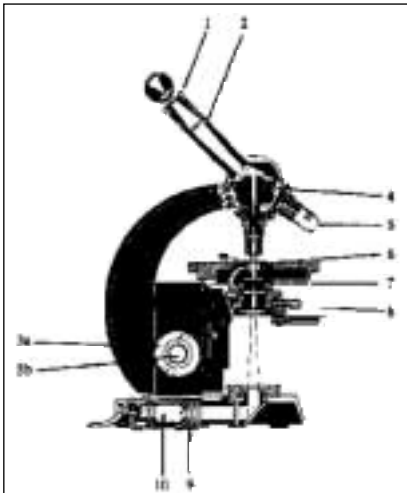


İnsan gözünün çözebilirlik yeteneği veya görme keskinliği çok küçük ya da çok uzakta olan cisimler için sınırlıdır. Görüş açısı ne kadar büyükse, cisimler de o kadar büyük görünürler. Görüş açısı, nesnenin alt ve üst kenarlarından göze ulaşan ışınlar tarafından oluşturulur.

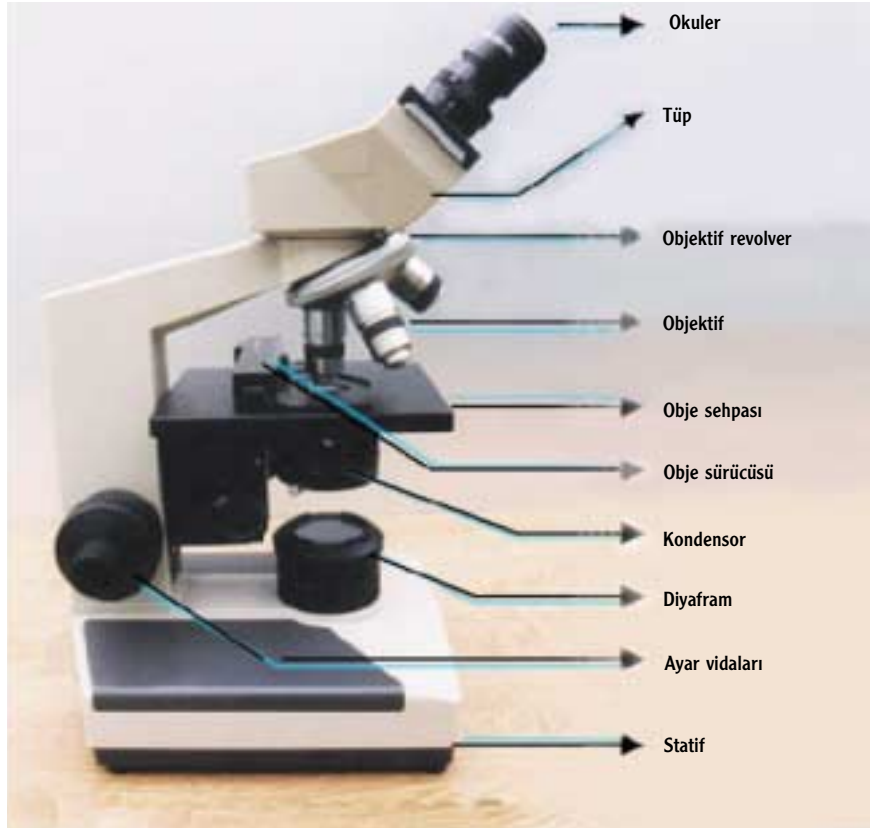
lar birbirlerini söndüreceklerinden, objektifin odak düzleminde tam bir gölge oluşacaktır. 1,5 dalga boyu faz farkı olan dalgalar girişim yaptıklarında, birinciden daha açık olmak üzere, objektif odak düzleminde görece

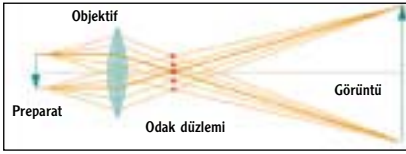
koyu bir bölge oluştururlar.

Böylece, objektifin odak düzleminde aydınlık ve karanlık bölgelerin ortaya çıkardığı kompozisyona "kırılma figürü" denir. Her preparat bir kırılma figürü oluşturur ve bu bölge her pre-



- 1- Okuler: İkinci büyütme basamağı
- 2- Okuler tüpü: Okuleri bulunduran tüp
- 3a- Makrometre: Kaba ayar düğmesi
- 3b- Mikrometre: İnce ayar düğmesi
- 4- Objektif revolveri: Objektifleri değiştirir
- 5- Objektif: İlk büyütme basamağı
- 6- Obj. sehpa: Preparat düzlemi
- 7- Kondensör diyaframı: Resmin kontrastını ayarlar
- 8- Kondensör: Filtre taşıyıcısıyla birlikte ışığı toplar
- 9- Kondensör - önmercek: Yedek toplatıcı mercekler
- 10- Düzenleyici trafosuyla birlikte ışıklandırma düzeneği: Işık şiddetini ayarlar.





Bir ışık mikroskopunun çalışma prensibi

Nesne göze ne kadar yakınlaştırılırsa görüş açısı o kadar büyür ve cisim daha büyük görünür. Bu aralık 10 - 25 cm arasında değişir. Göze 10 cm'den daha yakın olan nesnelere net olarak görülemezler, çünkü göz artık bu uzaklıktan sonra çok zor uyum gösterir.

Optik araçlar işte bu görüş açısını artırırlar. Bir optik cihaz için subjektif büyütme değeri $V = \epsilon / \epsilon_0$ 'dır. ϵ_0 nesneden 25 cm uzaklıktaki bir gözün görüş açısı ve ϵ optik cihazla sağlanan görüş açısıdır. Mikroskoplar, cisimleri büyütme

yarayan büyüteçlerden daha karmaşık yapıdadırlar. Basit bir mikroskop belirli aralıklarla yerleştirilmiş olan iki dışbükey mercekle oluşur. Objektif, reel bir görüntü oluşturur. Bu "ara görüntü" bir okuler aracılığıyla gözlemlenir.

Büyütme: Objektif ve okulerin büyütmelerinin çarpımı, pratik olarak mikroskopun büyütme değerini verse de, büyütmenin he-



Bir fazkontrast objektifi

40x
0.70: Sayısal açıklık
160: Mekanik tüp uzunluğu
0.17: 0.17 mm kalınlığındaki lameller için hazırlanmış bir objektif

Karanlık Alan Mikroskopisi

Bu mikroskopi tekniğinde ışık, objektife dolaylı yoldan gider. Objektife giden ışınlar karanlık alan kondensörü tarafından özel olarak oluşturulurlar. Işın yolunda preparat bulunmadığında alan tamamen karanlıktır. Preparat yerleştirildiğinde ışınların preparattaki yapılarda kırılması, yansımaları ve kırılıma uğramasıyla dağılan ışık, objektife ulaşarak görünür bir resim oluşturur.



Özellikle yapıların çeperleri karanlık arka alanda parlak hale gelir; iç kısım genellikle karanlık kalır (pozitif kontrast). Nesne ve içinde bulunduğu ortamın kırıcılık indisleri ne kadar farklıysa ışığın dağılması da o kadar kuvvetli olur. Bu fark azsa kontrast da azdır.



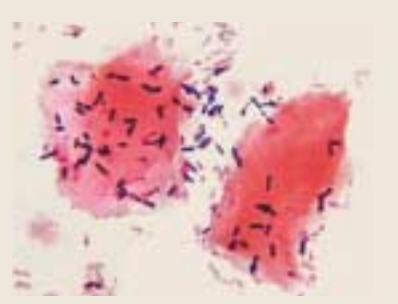
saplanmasında tüpün uzunluğu da rol oynar. Tüp ne kadar uzunsa büyütme de o kadar kuvvetlidir.

Kondensör de iyi kalitede bir görüntüden objektif kadar sorumludur. Kondensör, ışığı en iyi ve en verimli şekilde toplar ve görüş alanının düzenli şekilde aydınlatılmasını sağlar.

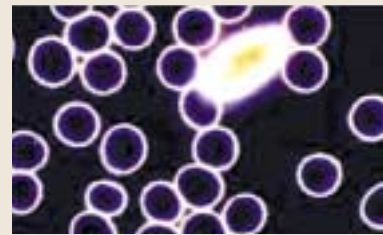
Sayısal açıklık (NA: Numeric Aperture) Objektif içinden geçen ışık miktarı için kullanılan bir ölçü olan NA, merceğin dış çapı / odak uzaklığı ile ifade edilir. Işık miktarı ne kadar çoksa, NA

Aydınlık Alan Mikroskopisi

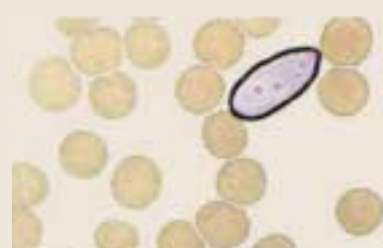
Işık mikroskopunun klasik görüntüleme tekniğidir. Preparat, kondensör tarafından üretilen ve alttan gelen ışın demetiyle aydınlatılır. Mikroskopik görüntüde preparat parlak arka alanda koyu veya boyanmış olarak görünür. Kontrasttan zengin preparatlar bu teknikte iyi sonuç verebilirler.



Aydınlık alan mikroskopuyla görünen boyanmış bir preparat ve kontrast oluşturan algler.



Karanlık alanda kırmızı kan hücreleri



Aydınlık alanda kırmızı kan hücreleri

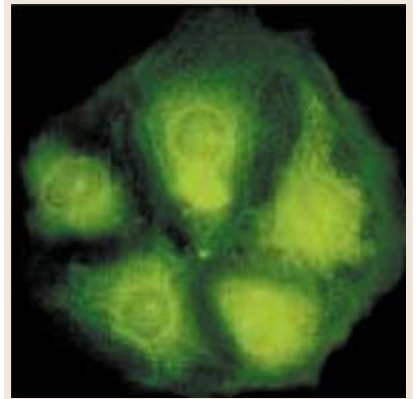


o kadar büyük ve objektifin çözebilirliği de (birbirine çok yakın duran iki noktayı birbirinden ayırma, ayrı ayrı gösterebilme yeteneği) o kadar iyidir. Nesneyle objektif arasında özel bir yağ (immersiyon yağı) bulunursa, çözünürlük oranı daha da yükselir. Özellikle büyük büyütmelerde kullanılan bu özel yağ, yüksek kırıcılık indisine sahiptir. İmmersiyon yağının bu özelliğine bağlı olarak, hava ortamında kuvvetli şekilde saparak objektiften kaçan ışınlar da objektif içine alınır. Sonuç

Floresans Mikroskopisi

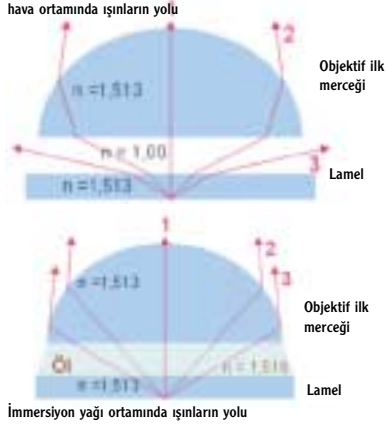
Bu tekniğin prensibi, moleküller tarafından emilen ışınların bir kısmının, uzun dalga boyulu, düşük enerjili ışınlar olarak geri verilmesidir. Preparatlar floresan boya ile boyanarak dolaylı bir floresans oluştururlar.

Floresans mikroskoplarda UV ve mavi ışınları odaklayan, civa buharlı yüksek basınçlı lambalar kullanılır. Işınları yoğunlaştıran bir mercekle sistem ve ışın demetlerini toplayan iris diyaframı bulunur. Buralardan ayrılan ışınlar emici filtrelerden geçerek preparata ulaşırlar. Filtreler sadece floresans oluşturacak dalga boyundaki ışınların geçmesine izin verir. Kısa dalga boyulu ışınlar preparata ulaşır. Objektif bir kondensör gibi davranarak ışığı preparat üzerinde toplar. Uzun dalgalı floresans ışınları preparattan tekrar optik sisteme yansır ve ışınlar da tekrar filtrelerden geçerek floresan olmayanları ışık kaynağına geri gönderilirler. Floresan nitelikli olanlar okulelere ulaşırlar ve görüntü oluşur.



Floresans mikroskopide karanlık alan kondensörünün kullanılması önerilir.

Floresans mikroskoplar, kloroplastlar ve özellikle mikrobiyolojik ve immunolojik preparatların incelenmesinde işlev görür.



olarak, objektif tarafından alınan ışık miktarı da çözünürlüğü etkiler. Objektiflerin çözme yeteneği, kullanılan ışığın özellikleriyle de ilgili. Çözünürlük sınırları, d , ışığın dalga boyuna ve objektifin NA'sına bağlıdır.

$$d = \lambda / NA_{obj}$$

λ için genellikle 550 nm seçilir.

Görünür ışık, bildiği gibi, 400-800 nm dalga boylarındaki elektromanyetik dalgalardan oluşur. Objektifin açısal değeri ne kadar büyükse, preparattaki ayrıntıları o kadar iyi çözer. Fakat objektiflerde genellikle açısal değer yerine sayısal açıklık (NA) değeri verilir.

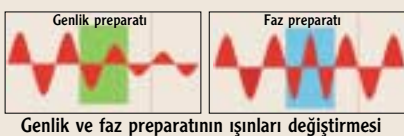
Fazkontrast mikroskopisi

Bu mikroskopi tekniğinin prensibini anlayabilmek için öncelikle genlik ve faz preparatlarından söz etmek gerekir.

1. Genlik preparatları: Boyanmış histolojik preparatlar ve kloroplastlar mikroskop alanında rahatça seçilebilirler. Bu tür preparatların özelliği kendiliklerinden kontrast oluşturmalarıdır. Bu preparatlar görülebilir ışık tayfının belirli bir bölümünü emerler. Işık dalgalarının genlikleri azaldığı için, alanın aydınlığı da azalmış olur.

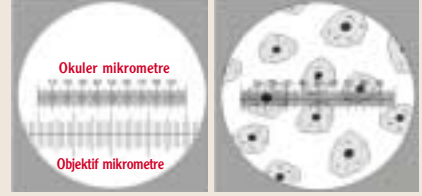
2. Faz preparatları: Bakteriler, hücre organelleri, stoplazma, kan hücreleri, fağositler şeffaf yapılar oldukları için, ışık dalgasının genliğini değil, çevrelerindeki ortamın kırıcılık indisini etkilerler. Suyun 1.33, stoplazmanınkiyse 1.35'tir. İki ortamın kırıcılık indisleri arasındaki fark çok azdır. Yüksek kırıcılık indisi bir ışık dalgası üzerine frenleyici etki yapar. Bu durumda bir ışık dalgası preparattan ayrıldıktan sonra fazı değişir. Genlik etkilenmese de delaysız mikroskop ışığıyla kıyaslandığında fazı değişmiş olur; ancak faz değişiklikleri göz tarafından algılanamaz. Ortaya çıkan faz değişiklikleri genlik değişikliklerine çevrilerken belirgin bir kontrast oluşturulur. Genlik preparatının, bir ışık dalgasına olan etkisi.

Böylece fazkontrast tekniği, oluşan faz değişikliği



Preparattaki nesnelerin büyüklüklerinin ölçülmesi

Bu işlem için, özel olarak tasarlanmış objektif ve oküler mikrometrelerden yararlanır. Objektif mikrometre, üzerinde 100 eşit aralığa bölünmüş bir ölçek bulunduran bir lamdır. Ölçekte, iki çizgi arası 10 mm'dir. Oküler mikrometreyse herhangi bir birim taşımayan ve oküler içine yerleştirilen başka bir ölçek bulundurur. Objektif mikrometre önce bir preparat gibi nesne sehпасına yerleştirilir ve oküler mikrometredeki 10 çizgili bir bölümün objektif mikrometrede kaç mikrometreye karşılık geldiği saptanır. Sonra objektif mikrometre yerine preparat yerleştirilir. Okülerde mikrometre olarak belirlenmiş aralık aracılığıyla preparattaki nesne-



Fazkontrast mikroskobunun şematik yapısı (solda).

Bir preparatın aydınlık alan ve faz kontrast mikroskobundaki görüntüleri

nin büyüklüğü ölçülür. Aşağıdaki örnekte hücre çapı 120 mikrometre olarak bulunmuştur.

Objektifin ayrıntıları ne kadar iyi çözdüğü, objektifin açısal değeri yanısıra, preparatla objektif arasındaki ortamın kırıcılık indisine de bağlıdır. Eğer bu ortam, yalnızca kırıcılık indisi 1 olan havaysa, o zaman çözünürlük objektifin yarım açısal değerinin sinüsünden yola çıkılarak hesaplanır. Pratikte NA için ulaşılabilecek en büyük değer 0,95'dir. Bu da 72 derecelik bir açıya karşılık gelir. Çözünürlüğün hesaplanmasında, ışığın dalga boyu, 0,55 mikron olarak alınır. Bu değer, insan gözünün en duyarlı olduğu görülebilir ışığın dalga boyudur.

$d = \lambda / 2NA_{obj}$ formülüne göre çözünürlük, $NA=1,40$ olarak alınırsa; $0,55/2 \times 1,40 = 0,19 \mu m$ bulunur. Işık mikroskobuyla ulaşılan değer $0,2 \mu m$ 'dir. İnsan gözü, herhangi bir aracı olmaksızın $0,2-0,3$ mm mesafeli ayrıntıları ayırtma kapasitesine sahiptir.

Bir mikroskopta ayrıntılar yalnızca objektifle çözülür. Çözünürlük objektif tarafından sağlanmazsa okülerin büyütmesinin artırılması bir yarar sağlamaz; çünkü oküler, objektif tarafından zaten büyütülmüş olan görüntüyü yalnızca biraz daha büyütür. Bu nedenle objektif ve okülerin toplam büyütmesi, objektifin NA'sının 500 veya 1000 katını geçmemelidir.

Objektifin sayısal açıklığı yanısıra kondensörün de sayısal açıklığından söz edilir; fakat buna aydınlatma apertürü ya da aydınlatma açıklığı denir ve değeri kondensörün üzerinde yer alır. Kondensörün bu aydınlatma açıklığı diyaframlar kullanılarak ayarlanabilir. Diyafram açıldığında çözünürlük artar, fakat kontrast azalır. Kondensörün görevi kontrast ve çözünürlükten en verimli düzeyde bir bileşim sağlamaktır. Bu da diyafram çapının, tüp çapının 2/3'si olacak şekilde ayarlanmasıyla mümkün olur.

Işık mikroskoplarının, aydınlatma şekillerine göre aydınlık alan mikroskobu, karanlık alan mikroskobu, faz kontrast mikroskobu, diferansiyel interferans kontrast mikroskobu tipleri bulunur.

* Doç., Dr. Akdeniz Üniversitesi Burdur Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

Kaynaklar
Wilson K., Goulding KH. Methoden der Biochemie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991
<http://www.biochem.mpg.de/vaam-fg/mikroskopie/rsm2.html>
<http://www.mikroskopie.de/Kurs/kurs.htm> (Dr. Christian Lingfeld)
http://www1.rz.uni-hamburg.de/biologie/b_online/d03/03e.htm
<http://www.weihenstephan.org/~joachenk/zeisschn.html>