

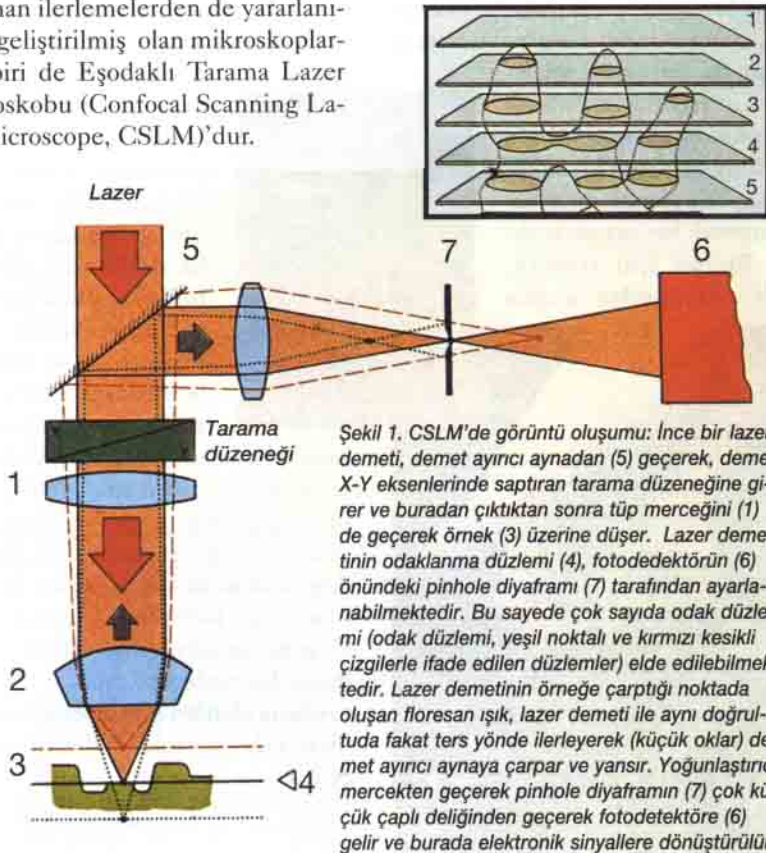
# Işık Mikroskopunda Üçüncü Boyut Eşodaklı Tarama Lazer Mikroskopu

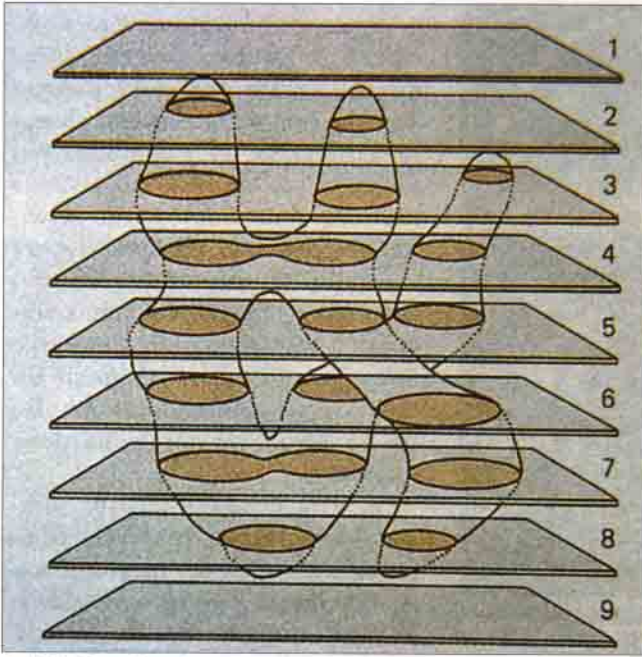
İnsan gözünün görme sınırı altındaki boyutlara sahip olan yapıların incelenmesini sağlayan ışık mikroskopu, günümüzde pek çok bilimsel alanda yararlanılan vazgeçilmez bir araçtır. İlk örneğinin yapılmasından günümüze değin geçen zaman içinde bu aracın temel görüntü oluşturma prensibi değişmemiştir. Buna karşın mikroskopun performansının artırılmasına yönelik çalışmalar sonucunda farklı ışık mikroskopu tipleri geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Bu mikroskoplarda, elektronik ve bilgisayar teknolojisinde sağlanan gelişmelerin de uygulanmasıyla, hesaplanan teorik performans sınırlarına ulaşılmış durumdadır. Elektronik, optik ve bilgisayar teknolojisinde sağlanan ilerlemelerden de yararlanılarak geliştirilmiş olan mikroskoplardan biri de Eşodaklı Tarama Lazer Mikroskopu (Confocal Scanning Laser Microscope, CSLM)'dir.

Netlik alan derinliğinin oldukça küçük olmasından dolayı üç boyutlu görüntü oluşturulamaması, klasik ışık mikroskopunun (optik mikroskop) en önemli kusurudur. Ancak, günümüzde, biyolojiden mühendisliğe kadar uzanan birçok bilim alanında gerçekleştirilen bilimsel çalışmalarda üç boyutlu görüntülerden sıklıkla yararlanılmaktadır. Tarama elektron mikroskopunda üç boyutlu görüntü oluşturulabilmektedir, ancak bu mikroskopta canlı doku ve hücrelerin incelenememesi, incelenecek olan örneklerin hazırlanması aşamasının uzun zaman alması ve maliyetin yüksek olması, renkli görüntülerin direkt olarak elde edilememesi ve özel boyama yöntemleri-

nin uygulanma güçlüğü gibi nedenlerle kullanımı sınırlıdır.

Bilim adamlarının ışık mikroskopunda üç boyutlu görüntü oluşturabilme hayali, 1957 yılında, Massachusetts Teknoloji Enstitüsü araştırmacılarından Marvin Minsky'nin, optikteki eşodaklılık (konfokalite) prensibini mikroskopta uygulamasıyla gerçekleşmiştir. Araştırmacı, "Çift Odaklayıcı-Tablolu Tarama Mikroskopu" olarak adlandırdığı buluşu için 1961 yılında patent almıştır. Adından da anlaşılacağı gibi bu ilk konfokal tarama mikroskopunda tarama işlemi, örneğin üzerine yerleştirildiği tablanın, X ve Y düzlemlerinde hareket ettirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Ne yazık ki Minsky'nin bu buluşu uzun yıllar ilgi çekmemiş; ancak bilgisayar ve elektronik teknolojilerinde sağlanan gelişmeler sonucunda daha da yetkin duruma getirilen bu mikroskop türü, son yıllarda oldukça geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Geliştirilerek uygulamaya sokulan son sistemdeyse çok küçük çaplı bir lazer demeti, örnek içinde istenen herhangi bir derinlikteki (Z eksenindeki) bir noktada odaklanarak, X ve Y eksenleri boyunca hareket ettirilebilmekte, yani tarama işlemi gerçekleştirilmektedir (Şekil 1). Mikroskopun bu özelliği sayesinde, oldukça kalın bir doku bloğu içinde çok sayıda optik düzlem oluşturulabilmektedir. Lazer demetinin çarptığı her noktada gerçekleşen floresans olayı sonucu oluşan ışınlar bir optik dedektör tarafından nokta-nokta algılanıp, elektronik sinyallere dönüştürülmekte, elde edilen bilgilerin tümü bilgisayar tarafından dijital ortamda depolanmaktadır. Bu bilgilerin işlenmesi sonucundaysa hareketsiz üç boyutlu görüntülere ek olarak, hareket-





Şekil 2. Bu mikroskopta, kalın bir doku örneğinden bir mikrotomla ince kesitlerin alınmasının benzeri işlem pinhole diyaframının ileri-geri hareketiyle gerçekleştirilir. Ancak buradaki olay sanal düzlemlerde lazer demetinin odaklanması ve bu düzlemdeki doku kısmının taranmasından başka birşey değildir (solda). Şekil 3. Bu resimde bir cep saatindeki yansıtıcı düzlemlerden farklı düzlemlerde kaydedilmiş görüntüler izlenmektedir. Bu görüntüler galeri yöntemiyle elde edilmiştir (sağda).

li (döndürülen) görüntüler oluşturulabilmekte, hatta taranan tüm optik düzlemlerin oluşturduğu blok içinde istenen düzlemden geçen kesit görüntüleri de elde edilebilmektedir.

CSLM'de incelenen örneğin kalınlığı boyunca çok sayıda optik düzlemlerin oluşturulabilmesi, sistemdeki "pinhole (iğne deliği) diyafram" olarak da adlandırılan ve optik detektörün hemen önünde bulunan bir diyaframla sağlanmaktadır. Diyaframın delik çapı değiştirilmeden, ileri-geri hareket ettirilerek oluşturulan farklı optik düzlemlerden gelen ışınlar optik detektöre düşürülür ve bu düzlemlerin ayrı ayrı görüntülerinin oluşturulması sağlanır. Pinhole diyaframın ileri-geri hareketleri bilgisayar kontrolü altında gerçekleştirildiğinden; tek bir örnekte, çok dar aralıklarla fazla sayıda optik düzlem elde edilebilmektedir.

Bu mikroskopta büyütme oranı, ekranda oluşan görüntü alanı ile incelenen örnekte taranan alanın birbirine oranlanması ile belirlenir; taranan alan ne kadar küçükse, büyütme oranı da o kadar büyüktür. Başka bir deyişle bilgisayar, lazer demetine ne kadar küçük bir örnek alanını taratabilirse (zoom yeteneği), mikroskobun büyütme oranı o kadar yüksek olmaktadır. Mikroskoplarda görüntü netliğinin bir ölçüsü olan ayırt etme

(resolution power) ise eşodaklı tarama lazer mikroskobunda, incelenen örneğin hacimsel elementlerinin büyüklüğüne, objektif merceğin büyütme katsayısıyla bu merceğin sayısal açıklığına bağlıdır. Klasik ışık mikroskobunda objektifin sadece yatay düzlemdeki ayırt etme gücü önemliyken, CSLM'de dikey ayırt etme gücü de önemlidir ve ışık mikroskobuyla karşılaştırıldığında oldukça üstün olan bu özelliği nedeniyle CSLM'de üç boyutlu görüntü elde edilebilmektedir (Şekil 2).

## CSLM'de Üç Boyutlu Görüntü Oluşturma Yöntemleri

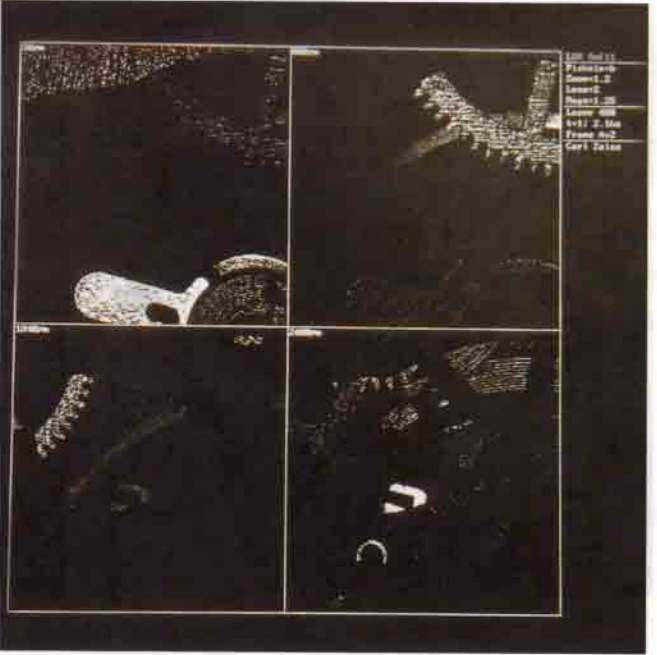
**1- Galeri yöntemiyle görüntü oluşturulması:** Üç boyutlu (3D) görüntü oluşturmanın en basit ve en pratik yolu, preparattan elde edilen çok sayıda optik kesit verisinin aynı anda görüntülenmesidir. Bu yöntemde bütün optik kesitlerden elde edilen sayısal veriler, birbirini takip eden bir seri şeklinde görüntü oluşturulmasında kullanılır (Şekil 3,5).

**2. Projeksiyon hesaplama yöntemiyle (sanal sonsuz odak derinliğinden yararlanılarak) görüntü oluşturulması:** Bir örnekten elde edilen tüm veri kayıtları projeksiyon

halinde de görüntülenebilir. Bu yöntemde bilgisayar tüm keskin görüntü optik kesitlerden oluşan bir görüntü derlemektedir. Bunun en basit yolu, Z-ekseni boyunca en parlak gri değerlerinin projeksiyonudur.

Artırılmış odak derinliği yöntemiyle üç boyutlu görüntü oluşturulmasında yararlanılan saydamlık (transparency) yöntemiyle daha karmaşıktır. Bu yöntemde optik kesit serilerindeki grilik düzeyleri (değerleri), farklı saydamlık düzeyleri olarak belirlenir ve oluşturulan görüntü, yüzey ayrıntılarının görüntüsüdür. Her iki durumda da, objektif merceğin odak derinliği sanal olarak sonsuzdur. Sonuç olarak, okülerin dikey Z ekseninde 0,5  $\mu\text{m}$ 'lik bir derinliği net olarak görüntülemesiyle (örneğin immersiyon objektifi ile) 100  $\mu\text{m}$  derinliğindeki bir alanın net görüntüsü elde edilmiş olacaktır (Şekil 4).

**3. Dönel (Rotasyonel) görüntü animasyonlarının oluşturulması:** Bu mikroskopta, örneğe dik Z eksenini boyunca derinlemesine görüntüler elde edilmekle kalınmaz, aynı zamanda belirli açılardan bakılmıyormuş izlenimi veren görüntüler de elde edilebilir. Bu tip görüntülerin elde edilmesinin bir yolu, oluşturulan 3D görüntünün, her biri bir öncekinin belirli bir açıyla ( $\sim 10^\circ$ ) döndürülmesiyle elde edilen görüntülerin bir-





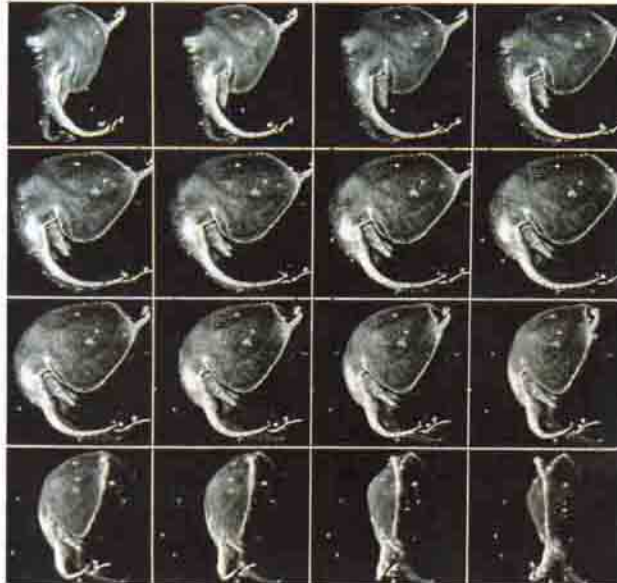
Şekil 4. Sanal olarak oluşturulan sonsuz odak derinliğinden yararlanılarak floresan boya ile boyanmış olan kemikten elde edilen bir seri optik kesitin projeksiyonu ile elde edilen üç boyutlu görüntü.

leştirilmesiyle oluşturulmasıdır. Bu yolla, cismin seçilen bir eksen etrafında tam bir tur tamamlanmaya değin döndürülmüş görüntüsü elde edilir. Bu görüntüler ekranda uygun ve yeterli bir hızla art arda oluşturulduğunda, izleyici, monitörde dönen bir cisim görüntüsü izler, çünkü insan beyni ancak yavaş akan görüntüleri ayırt edebilir; yüksek hızlardaysa ardışık görüntüleri birbirinin devamı olarak algılar (Şekil 5).

**4. Stereo görüntülerin oluşturulması:** Günlük yaşamda bizden çok fazla uzakta olmayan nesnelere iki farklı doğrultuda görürüz. Yani her iki gözümüz, birbirinden yaklaşık 5-6 cm kadar uzaklıktaki (gözbebekleri arası mesafe) iki ayrı noktadan farklı

iki açıyla aynı cisme bakar. İşte beyin, bu iki farklı açıdan alınan görüntüyü birleştirerek üç boyutlu tek bir görüntü algılar. Bilgisayar bize incelenen yapının istediğimiz bakış açısından bakıldığında oluşan görüntüsünü hesaplayabildiğinden, bu yolla sağ ve sol gözümüzle aynı ayrı gördüğümüz iki görüntünün birleştirilmesiyle oluşturulan üç boyutlu tek (stereo) görüntünün de elde edilmesi olanağı vardır. Böyle bir stereo görüntü çifti monitörde yan yana oluşturulabilir ve uygun yardımcı görme aygıtlarıyla üç boyutlu olarak izlenebilir. deneyimli bir gözlemci, yardımcı ekipman (özel gözlük veya mercekle sistemi) olmadan da bu iki görüntüyü 3 boyutlu görüntü olarak izleyebilir.

Şekil 5. Bir su piresinin 128 optik düzlem kesitinden elde edilen verilerin kullanılmasıyla oluşturulan rotasyonel görüntüsü. Sol üstten başlayarak sağa doğru gidildiğinde objenin hareketi (biraz daha sola döndüğü) izlenmekte. Bu görüntüler kısa zaman diliminde monitörden art arda görüldüğünde, su piresinin sağdan sola doğru döndüğü izlenimi oluşturmaktadır.



Stereo görüntü oluşturmanın başka bir yolu da, monitörde biri sadece kırmızı, öteki de yeşil renkten oluşan iki farklı görüntünün üst üste oluşturulmasıdır. Bu iki görüntüden biri sol, ötekisi de sağ gözle bakıldığında algılanan görüntüdür. Stereo görüntünün algılanması için bundan sonra yapılması gereken işlem ise, biri (sağ) yeşil, diğeri de (sol) kırmızı filtreye takılı olan bir gözlükle monitöre bakmaktır. Beyin bu iki renkli görüntüden tek görüntü oluşturur. Bu tip bir görüntüye anaglif de denir (Şekil 6).

**5. Preparattaki değişik yüksekliklerin farklı renklerle kodlanmasıyla görüntü oluşturulması:** Bu yöntem projeksiyon hesaplama yönteminin biraz daha geliştirilmiş biçimidir ve görüntü oluşturma amacıyla her bir renk, farklı düzlemlerdeki aynı yükseklikleri ifade edecek şekilde seçilir. Elde edilen görüntü, Z-ekseni boyunca, incelenen yapıların değişik renklerle ifade edildiği bir haritası şeklindedir. Şöyle de denilebilir, farklı düzlemlerdeki yapılar değişik renklerle ifade edilmektedir. Normal bir haritadaki gibi yükseltmeler (örneğin dağlar) kırmızı tonlarla, derinlikler (örneğin denizler) mavi tonlarla belirlenir. Değerlendirmenin daha kolay yapılabilmesi için ekranın sol üst köşesinde, ilk kesitten itibaren değişik derinlikleri gösteren bir renk skalası da gösterilir ve bu anahtar, üstten başlayarak hangi renklerin ne kadar derinlikte olduğunu ifade eder (Şekil 7).

**6. Ortogonal kesit görüntülerinin oluşturulması:** Bir örneği tümüyle kapsayacak biçimde optik düzlem kesit görüntüleri alınarak kaydedildiğinde, bilgisayar yardımıyla bu yapıdan istenen pozisyonda bir profil-görüntüsü oluşturma olanağı da ortaya çıkmaktadır. Mikroskobun "Ortogonal kesit" işlevini, birbirine dik olan üç ayrı düzlem kesitlerin görüntüsünün elde edilebilmesi olanağını sağlamaktadır. Üç boyutlu görüntü veri kümesi içinden bir nokta (voxel) seçilir ve bu noktada birbirine dik olan üç düzlemdeki görüntüler otomatik olarak ekranda görünür.

Örnekten kaydedilmiş olan bütün optik düzlem kesit görüntüleri baştan başa kullanılarak da 3 boyutlu

bir üstten bakış görüntüsü de kolayca elde edilebilir.

**7. Oblik kesit görüntülerinin oluşturulması:** Eğer X, Y ve Z eksenlerine göre bir yön açısı ve bir eğim açısı seçilirse, ortogonal kesitler dışında ve onlarla belirli açılar yapan bir eğik kesit görüntüsü de hesaplanabilir ve monitörde gösterilebilir. Örneğin, birbirlerine X, Y ve Z ekseninden herhangi birine paralel bir hatla birleştirilemeyen, belirgin iki yapının yer aldığı bir görüntünün hesaplanması ve oluşturulması bu yolla gerçekleştirilebilir. Böyle bir görüntünün sadece 5 koordinat vermekle, bilgisayarca önceden elde edilen optik düzlem görüntüleri veri kümesinden elde edilmesini hayalimizde canlandırmak oldukça zordur; ancak bu işlem mikroskobun gelişmiş bilgisayar yardımı ile bir tuşa basmakla kolaylıkla yapılabilir (Şekil 8).

## Mikroskobun Performansı

Bu mikroskop, özellikle kalın kesitler üzerinde floresans mikroskopi çalışması yapılacaksa veya yüzey ayrıntılarının incelenmesi gerektiği durumlarda çok yararlıdır. CSLM'yle 0,3 µm kalınlığında optik kesitler elde edilebilir. Bu tekniğin diğer bir yararı da, bir örnek üzerinde aynı anda farklı parametrelerin elde edilebilmesine ve farklı niceliklerin belirlenebilmesine olanak sağlamasıdır. Biyolojide birden fazla ve farklı flo-



**Şekil 6.** Bu şekilde bir bitki kökünde mitozla bölünmekte olan hücrenin geç anafaz evresinde iki kutba göç eden kromozomları görülmektedir. Boyamada DNA'yı boyayan özel bir floresan boya kullanılmıştır. Bu resme dikkatle bakılırsa biri kırmızı öbürü yeşil renkte üst üste binmiş iki (ayrı) görüntü vardır (anaglyph). Eğer bu iki stereo görüntüye uygun bir gözlükle (biri yeşil diğeri kırmızı filtrelili) bakılırsa üç boyutlu görülecektir.

resan boylarla boyanmış preparatların aynı anda incelenmesi büyük önem taşımaktadır. CSLM'de üç ayrı floresan boya için üç farklı kayıt kanalının kullanılabilmesi, bu isteği karşılamaktadır.

Bu mikroskopta veriler dijital sinyaller halinde elde edildiğinden, daha net görüntüler elde edilebilir. Ayrıca görüntüler üzerinde ölçüm yapılabildiği gibi uygun görüntü işleme ve analiz işlemleri de bu veri kümesi üzerinde kolayca gerçekleştirilebilir. Mikroskobun güçlü bilgisayarı ve filtre sistemleri yardımıyla standart görüntü işleme her zaman yapılabilir. Görüntülerin bilgisayar ortamına aktarılması ve verilerin diğer sistemlerle matematiksel uyumu ku-

sursuzdur. Bu sayede uygun bir network yardımıyla başka bilgisayarlara veri aktarımı da yapılabilir.

Bu mikroskopta, oluşturulan görüntüler üzerinde uzunluk, alan ve çevre uzunluklarının belirlenebilmesine ek olarak, özgül olarak işaretlenen bir maddenin yoğunluk ölçümleri de yapılabilir. Bu işlemde gri değerleri çeşitli pixeller halinde hem görüntü oluşturmada ve hem de histogram verilerinin hesaplanmasında kullanılabilir. Sistemdeki makrofonksiyonlar, bu tip ölçümlerin, geniş veri toplulukları üzerinde otomatik olarak hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlar.

Daha ileri yazılım paketleri (topografi ve zaman serileri gibi) yardımıyla bu mikroskop, malzemelerde yüzey araştırmaları ve kinetik fizyoloji çalışmalarında da kullanılabilir. Örneğin hücre içi iyon konsantrasyonlarının ve pH'sının zamanla değişimi aynı anda gösterilebilir.

CSLM, hücre ve dokuların işlevsel durumda incelenmesini, bu yapıların üç boyutlu izlenebilmelerini ve görüntülerinin elde edilebilmesini, sonuç olarak bu yapıların daha kolay anlaşılabilmelerini sağlamaktadır. Bunun da ötesinde, canlı olayları üç boyutlu olarak, zaman fonksiyonu da ilave edilmiş halde, yani bu olaylarda zaman içinde oluşan değişiklikleri de kapsayacak şekilde (4 boyutlu mikroskopi) incelenebilir. Mikroskop, hemen hemen tüm floresans ve refleksiyon preparatlarında başarıyla kullanılabilir.

Optikteki eşodaklılık prensibi ile lazer ve bilgisayar teknolojisinde ortaya çıkan en son gelişmeleri bünyesinde barındıran bu mikroskop, yakın bir gelecekte biyoloji, tıp, malzeme bilimi, yan iletken teknolojisi, gıda bilimi alanlarında yaygın bir kullanım alanı bulacaktır.

İlhami Çelik-Murat Boydak<sup>1</sup>  
H. Hüseyin Dönmez<sup>2</sup>

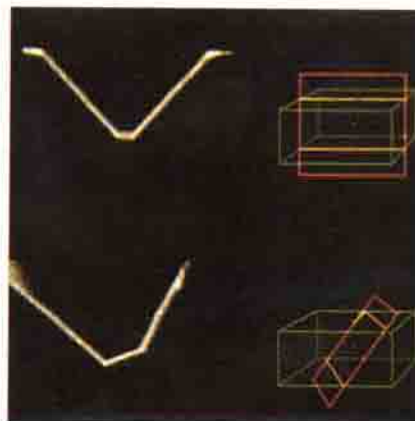
<sup>1</sup>S.Ü. Vet. Fak. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Konya  
<sup>2</sup>Y.S.Ü. Vet. Fak. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Van

### Kaynaklar

- Blöck, J.G.G. and van Aalst, H. "Confocal Scanning Light Microscopy in food". *Research Food Res. Int.* 26:297-311, 1993  
Borlinghaus, R. "Microscopy and Third Dimension". *Zesis Information* 4:37-9, 1995  
Çelik, I ve ark. *Mikroskop bilimi ve histolojik teknikler*. S.Ü. Vet. Fak. Öğrenci notları, Konya, 1995  
Lichtman, J.W. "Confocal microscopy". *Scientific American*, s.30-35, Ağustos 1984



**Şekil 7.** Yüksekliklerinin farklı renk kodları ile ifade edilmiş bir üç boyutlu görüntü. Burada bir göz kasındaki kanama odağının hematoxilen-eozin boyanmasıyla elde edilmiş görüntüsü izlenmektedir. Kırmızıdan maviye gidildikçe derinlik artmaktadır.



**Şekil 8.** Bir metal yüzeyinden elde edilmiş olan tepesi kesik piramit benzeri şekildedeki eğik kesitlerin görüntüleri (solda). Soldaki iki görüntünün elde edilmesinde yararlanılan optik kesitlerin alındıkları düzlemler (sağda).