

Mikroskop ansiklopedisi

Doç. Dr. Sait EN; Ege Üniversitesi Tıp Fak. Patoloji AD.

Patoloji pratiğinde basit öğrenci mikroskoplarından başlayıp, her türlü uygulamayı yapabilecek ara tırma mikroskoplarına kadar uzanan eski veya yeni, oldukça geni bir mikroskop jenerasyonu bulunmaktadır. Burada rutin patoloji laboratuvarında bulunabilecek özelliklerdeki bir ara tırma mikroskopu üzerinde mikroskopa ait temel yapılar ve mikrofotografik uygulama özellikleri ile gelişmiş önemli mikroskoplar ve uygulamalar özetlenecektir.

Genel olarak mikroskop, mekanik ve optik bölüm olmak üzere iki ana bölüm içermektedir.

Mekanik bölüm

Mikroskopta ana gövdeyi oluşturan ve optik bölüm elemanlarını taşıyan kısımdır. Bu bölümde gövde, mikroskop ayağı, obje tablası, ayna, makro ve mikro vida düzenekleri yer almaktadır. Ara tırma mikroskoplarının çoğunda bazı ekileme özellikleriyle bu yapı korunmaktadır.

Gövde;

mikroskopun bütün mekanik ve optik elemanlarını taşıyacak sağlamlık ve biçimdedir, gereğinde mikroskoba eklenebilecek mikrofotografi veya diğer aygıtları taşıyabilir.

Mikroskop ayağı:

Gövde ile birlikte diğer mikroskop bölümlerini üzerinde taşıyan kısımdır. Modern mikroskoplarda ışık kaynağı ve bundan gelecek ışınların kondansöre iletilmesini taşıyacak optik elemanları içine alabilecek biçimde bir yapı kazanmıştır ve gövde ile birlikte değerlendirilebilir.

Obje tablası:

Mikroskopik preparatların kalaylıkla yerleştirilmesi ve izlenebilmesi için genelde geniş ve dikdörtgen biçimde yapılmaktadır. Tek veya iki preparat alabilir. Tabla içine gömülü ayna sistemi, preparatın objektif önünde son derece duyarlı bir şekilde çalıştırma ve ayağı-yukarı hareketini sağlar. ayna hareket vidalarında elin kolayca ulaşabileceği bir biçimde sağa veya sola yerleştirilebilir. Modern motorize mikroskoplarda ayna elektronik kontrollü ve motorize olabilir, bilgisayar tarafından kontrol edilebilir.

Makro ve mikro (kaba-ince ayar) vida düzenekleri;

Preparatta gözlenen mikroskopik alanın netliğini sağlamak üzere, obje tablasına kaba (makro) ve ince (mikro) hareket yaptıran bir vida düzenekleri oluşturmaktadır. Gelişmiş ara tırma mikroskopu ve fotografi mikroskoplarında ayarlar elektronik kontrollü motorize olabilir ve fokus yapılabilir.

Optik bölüm

Mikroskopun optik bölümünde; oküler, oküler tüpleri, objektif, kondansör ve ışık kaynağı yer almaktadır.

Oküler;

Optik sistemdeki görevi, objektif ile koordine çalışır ve objektif tarafından oluşturulan görüntüyü kendi büyültme oranı kadar büyülterek göze ulaştırır.



Oküler üzerindeki büyültme gücünü (X6.3, 10, 15, 20, 30), görüş çapını belirleyen rakamlar (18, 20, 22, 26.5) ile bazı tanımlayıcı harfler (UW, SWF) bulunur. **UW** veya **UWF**, “**Ultra Wide - Ultra Wide-Field**” ultra geni alan benzer şekilde **WF** “**Wide-Field**” geniş alan, **SW** yada **SWF** “**Super Wide-Field**” super geni alanı gösterir. **H**, **HE** yada “**High Eyepoint**” okülerin gözlükle kullanılabilirliğini gösterir. **CF** düzeltilmeli objektiflerle kullanılabilirliğini gösterir. Genel olarak okülerlerden birinde diyoptri ayarı yapmaya olanak sağlayan bir mekanizma eklenir. Okülerlerden gözün uzaklığını belirleyen ve odak ışığının yansımalarını engelleyecek bir lastik çerçevede bulunur.

Mikroskopta kullanılacak oküler, kullanılan objektifin türüne uyacak şekilde seçilmelidir. Mikroskopik incelemelerde Apokromat ve Plan objektiflerle birlikte mutlaka Plan-Kompens (PK) tipi okülerler kullanmak gereklidir. Aksi halde görüntünün renk ve görüntü kusurları tam olarak düzeltilmez.

Tüp:

Tüp klasik olarak monooküler eski mikroskoplarda belirlenebilir, okülerin devamını oluşturur içinde sanal imaj oluşturur. Modern mikroskopların çoğunda, iki gözle bakmaya olanak verecek şekilde “binoküler” özellikte, bazılarında fotoğraf kamerası eklenebilmek üzere bir fotoğraf tüpü “trinoküler”, tüp sistemine eklenir bu yapıya dahil edilerek sonlanmaktadır. Trinoküler sistemlerde fotoğraf bölümüne görüntü iletimi prizmalar ile kontrol edilerek devreye alınmakta ve/veya farklı oranlarda ışık dağıtılabilir.

Eklemeler eklenecekse bu arada sisteme uygun şekilde eklenir ve görüntü dağıtımı yapılabilir. Bir mikroskopta yan görüntü dağıtımları ile gözlemci sayısı 21 kişiye kadar yükseltilir. Bu sırada işletme için ok sistemide devreye girer.

Objektif:

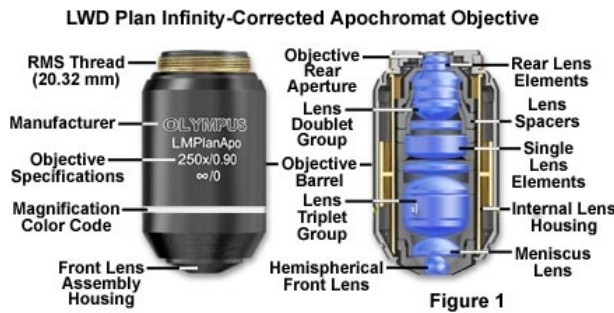
Mikroskopun optik bölümü içerisinde en önemli kısımdır. Mikroskopik objeyi büyültme gücü oranında büyütülerek ara görüntüyü oluşturur, tüp yoluyla okülere görüntü iletilir. Bir mikroskopun büyütme gücü, objektifin büyültme gücü ile okülerin büyültme gücü çarpımı kadardır.

Mikroskoplarda görüntü kalitesi üzerinde birinci etken objektifin optik yapısıdır. Mikroskoplarda kullanılan objektifleri optik yapısı bakımından; a) Akromat, b) Apokromat, c) Plan apokromat d) flörit objektifler olarak ayırdedebiliriz.

Akromat objektifler: Genelde basit ö rence mikroskopları ve rutinde kullanılan bazı mikroskoplarda akromat objektifler bulunmaktadır. Bunlar, görüntü kusuru yönünden düzeltilmemi, renk kusuru yönünden de yalnızca sarı-ye il renge göre çok iyi düzeltilmi objektif grubunu oluştururlar.

Plan objektifler: Karakteristik bir mercek kusuru olarak görüntü alanının bükülmesi lenslerde ortaya çıkmaktadır. Yani merkez nettir, kenarları net olmamakta, aksine kenarları net yapıldı ı zamanda da merkez net olmamaktadır. Bu görüntü kusuru, özel optik yapı ve i iklikleriyle ortadan kaldırılarak Plan objektif serisi oluşturulmu tur. Plan objektifler renksel kusurlarının düzeltilmesi durumuna göre, Planakromat, Planfluorit ve Planapokromat yapısında olabilirler.

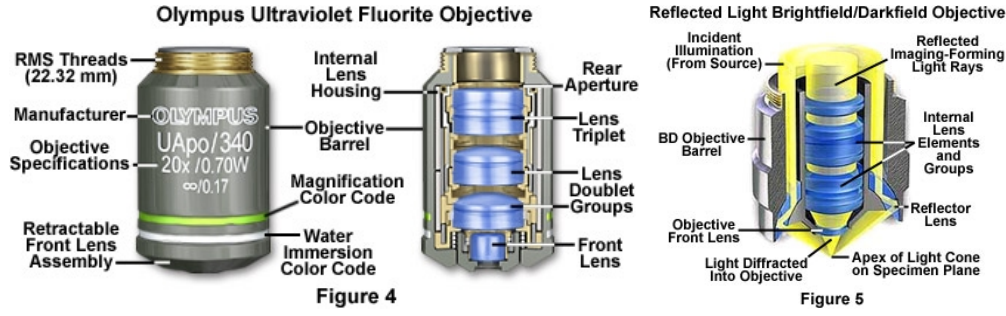
Fluorit sistem: Bu objektif tipi renksel kusurları çok iyi düzeltmeyi sa layan bir optik yapı içermektedir. Son yıllarda bu objektifler çok iyi geli tirilmi, özellikle mikrofotografide ve Fluoresan mikroskopide yaygın olarak kullanılmı lardır.



Objektiflerin adlandırılmalarında üzerlerine yazılan kısaltmalarla yapılmaktadır. Fluorit objektifler “FL”, Apokromat objektifler “Apo”, Plan objektiflerde “Plan” veya “PI” kısaltmalarıyla gösterilirler.

Bunlardan ba ka her objektifin üzerinde, objektifin büyültme gücü, apertür açıklı ı, tübüs uzunlu u ve lamel kullanımına ili kin rakamlar, renkler yer almaktadır.



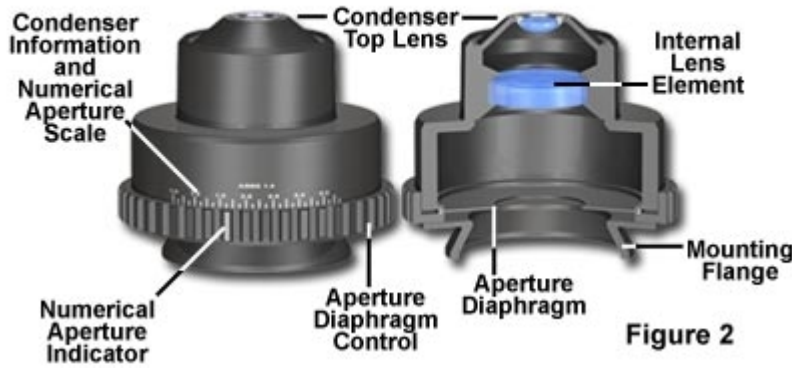


Kondansör;

Optik sistemde ışık kaynağından gelen ışık preparat üzerine homojen olarak dağıtılır, yapısına göre de iki aydınlatma yöntemlerinin uygulanmasına olanak veren bir optik sistemdir. Optik özelliklerine göre : a) Basit kondansörler, b) Aplanatik kondansörler, c) Aplanatik-Akromatik kondansörler, d) Faz kontrast kondansörleri, e) Karanlık alan kondansörleri olarak ayrılırlar.

Basit kondansörler: çoğunlukla iki mercekli olup renk kusurları yönünden düzeltilmemişlerdir. Daha çok basit optik mikroskoplarında kullanılırlar.

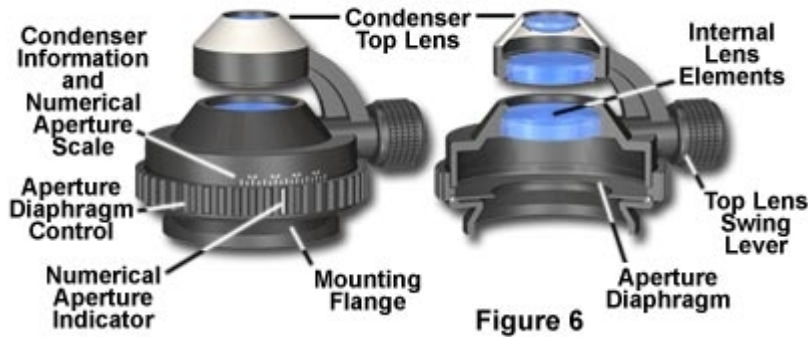
Abbe Condenser (Numerical Aperture = 1.25)



Aplanatik kondansörler: Mercek yapısı nedeniyle daha iyi kalitede bir aydınlatma sağlarlar. Renksel kusurları orta derecede düzeltilmiştir.

Aplanatik-Akromatik kondansörler: Optik aydınlatma yönünden çok iyi gelişmiş mercek sistemi ile renk kusurları yönünden tamamen düzeltilmişlerdir.

Swing-Out Top Lens Condenser (Numerical Aperture = 1.35)



Faz kontrast kondansörleri: Optik yapısı bakımından Aplanatik-Akromatik yapıdadır. Ayrıca kondansörün içine her objektif için ayrı ayrı, bir eksen etrafında döner bir biçimde

düzenlenmiş faz halkaları yerleştirilir. Faz kontrast kondansörü ile beraber mikroskopa özel faz kontrast objektifleri takılarak faz kontrast çalıştırılabilir. Faz kontrast objektifleri içinde de her objektife özgü ayrı ayrı faz halkaları vardır. Hangi büyütme objektifi kullanılıyorsa kondansörde o objektife uygun faz halkası optik eksene getirilir. Faz kontrast çalışmanın temeli, boyanmamış preparatlarda objede bulunan yoğunluk farklarını faz farklarına dönüştürerek objenin detaylı bölgelerini farklı yoğunluklarda göstermeye dayanmaktadır. Bu yöntemle özellikle canlı doku ve hücre örnekleri zarar görmeden hücre ayrıntıları yönünden çok daha iyi incelenebilmektedir.

Karanlık alan kondansörü: Kondansörün optik yapısı nedeniyle ışık kaynağından gelen ışık, kondansör içindeki belirli yüzeylerden yansıtılarak objeye belli bir açıda ışığın girmesine neden olur. Bu sistemde objedeki yapılardan yansımayan hiçbir ışık objektif görüş alanına giremez. Karanlık alan kondansörleri kuru ve yağlı olmak üzere iki tiptir. Kuru tipte kondansör ile preparat arasında ışık iletici herhangi bir ortama gerek yoktur. Yağlı karanlık alan kondansöründe ise, kondansör üst merceği ve preparatın alt yüzü arasında ışık iletimi için immersiyon yağı veya gliserin kullanılmaktadır.

Işık kaynağı:

Gerek mikroskopik aydınlatma gerekse mikrofotografide oldukça önemli bir bölümü oluşturur. Bugünkü modern mikroskoplarda aydınlatmada ışık kaynağı olarak çoğunlukla düşük voltajlı yüksek ışık güçlü halojen lambalar kullanılmaktadır. Normal mikroskopik aydınlatmada kullanılan 6 Volt 20-30 Watt lambalar, ara tırma mikroskoplarda yerini 12 Volt 100 Watt Halojen lambalara bırakır. Mikroskopik aydınlatmada bu lambalar görünür ışık dalga bandındaki çalışmalarda kullanılmaktadır. Işık mikroskopik aydınlatmada led ampüllerde kullanıma girmiştir. Gövde üzerinde ışık şiddetini ayarlayan reosta ve açma kapama düğmesi yer alır.

Ultraviyole dalga boyunda ışıkların kullanıldığı floresan mikroskopide ise, güçlü ışık veren cıva buharlı yüksek basınç altında hazırlanmış detaylı güçlerde özel lambalar kullanılmaktadır. Bunlar, üreten firmanın kendine özgü kısaltılmış simge ve rakamlarıyla belirtilmektedir. Bunlara HBO 50, HBO 100, gibi lambalar örnek verilebilir. Floresan incelemede kullanılan ışık dalga boyları 313, 334, 365, 406, 435, 546 ve 578nm dir ve özel filtreler bu amaca uygun olarak seçilir. Yeni uygulama olarak floresan aydınlatmada spesifik dalga boylu led ampüllerde kullanılmaya başlanmıştır. Zeiss'in Colibri sisteminde aynı anda birden fazla led ışık ile farklı dalga boylarında aydınlatma ile çalışmak olasıdır.



halojen lamba



cıva arklı lamba

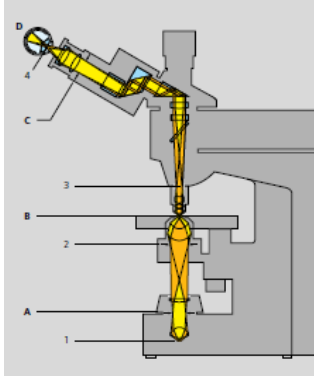


ksenon arklı lamba

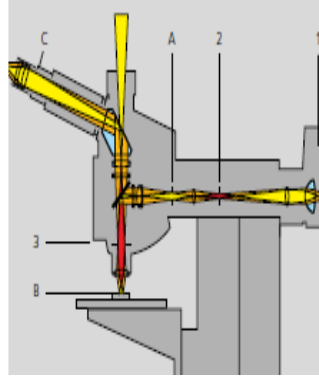
Xenon lambalar oldukça parlak ışığa ihtiyaç duyulan yansıtıcı "reflekted" mikroskopide tercih edilir. Halojen lambadan parlak ışık veren cıvalı lambaların yoğunluk pikine ulaşmakla floresan mikroskopide kullanılabilir.

Mikroskopta aydınlatma yöntemleri:

Değişik bilim dallarında kullanılan mikroskoplarda, mikroskopta incelenen objenin özelliğine göre, özel aydınlatmalar sağlayacak yapısal değişiklikler görülmektedir. Biyoloji ve tıbbın değişik alanlarında kullanılan mikroskoplarda genel olarak alttan (içten – geçirgen – transmitted) ve üstten (yansıtmalı- reflected) aydınlatma yapabilecek bir optik yapı bulunmaktadır.



geçirgen görüntüleme



yansıtmalı görüntüleme

Bir ara tırma mikroskobunda aynı anda hem görünür ışık dalga boyunda alttan aydınlatma ve flüoresan ışıkla üstten aydınlatma yapılabilmektedir.

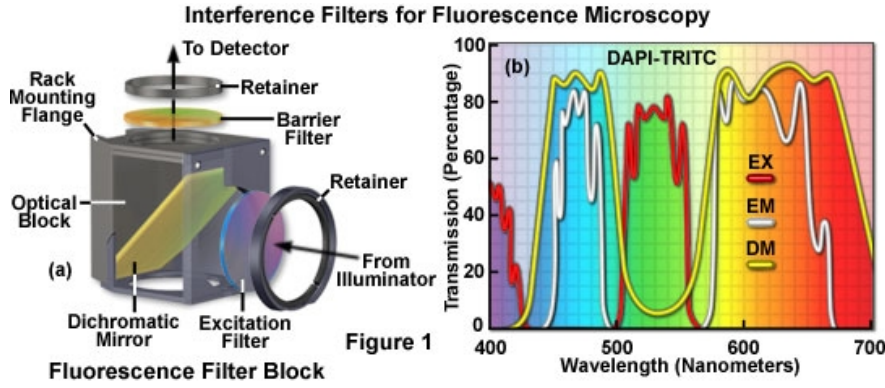
Biyolojinin bazı alanlarında, örneğin botanik, zooloji ve paleobotanikte, objelerin dış yüzeyini incelemek üzere üstten aydınlatmada kullanılabilecek ışık yansıtmalı (reflected-light) objektifler geliştirilmiştir. Bunlarda objeyi aydınlatacak ışık, tübus ve objektif içindeki özel ayna yüzeylerden yansıtılarak obje yüzeyine ulaşmakta, aydınlatılmış obje yüzeyinden elde edilen görüntüde ortadaki objektif tarafından okülere iletilmektedir. Üstten aydınlatmada birden fazla aydınlatma tipi, özellikle ışık geçirmeyen objelerin incelenmesinde metalurji ve mineraloji bilim dallarında kullanılmaktadır. Bu dallarda kullanılan mikroskoplarda üstten aydınlatmada ışık yolu resim’de gösterilmiştir. Burada, objektif-oküler eksenine eklenen bir yarı geçirgen prizma ile preparatın aydınlatılması ve preparattan gelen görüntünün incelenmesi doğrudan doğruya objektif içerisinden yapılmaktadır.

Patolojide özel mikroskopi uygulamaları

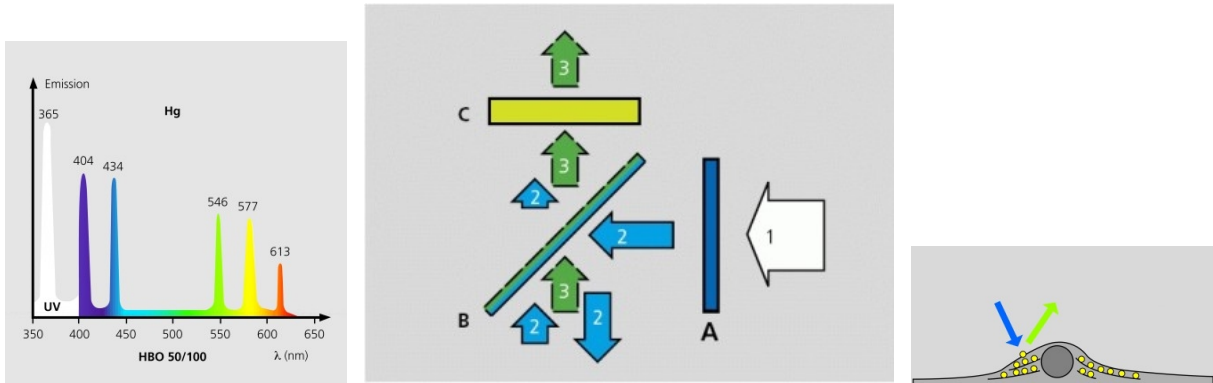
Patoloji uygulamaları genelde parlak-aydınlık saha ve geçirgen ışıkla, ve farklı boyama yöntemleri ile yapılmaktadır. Birçok uygulamada doku bütünlüğü bozulmadan ve boyama yapılmadan değerlendirme de gerekebilmektedir. Bu durumlarda özel mikroskopi uygulamaları yapılmaktadır. Bunlara örnek olarak ışığın üstten uygulandığı reflected mikroskopi ve/veya karanlık saha uygulamalar ile ultraviyole ışıklarla görüntüleme örnek verilebilir.

Flüoresan mikroskopi

Cıva veya ksenon arklı güçlü ışık kaynakları ile mümkün olur. Özel filtreler yardımı ile belli dalga boyunda aydınlatılan doğal yada yapay olarak boyanmış flüoresan ışık veren maddeler incelenir. Siyah zeminde flüoresan veren yapılar değerlendirilir.



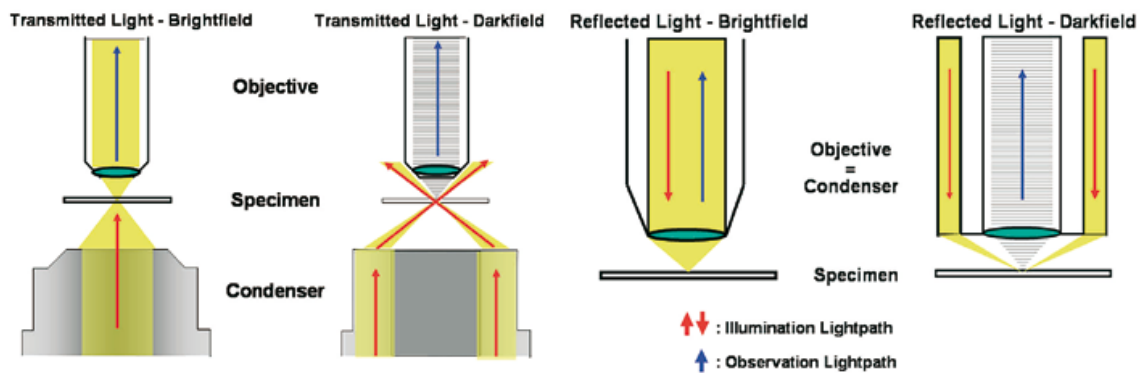
Genelde reflected- yansıtımlı teknik kullanılır. Civa arklı lambanın belli bir dalga boyundaki ışığı yansıtan doku üzerine yönlendirilir. Bu ışıkta renk veren otoflöresan veya boyalı maddeler siyah zeminde flöresans verir. Burada basit olarak FITC ile işaretli monoklonal antikolar kullanılabilir gibi digital fotoğrafı yardımıyla üstü üste bindirilen fotoğraflarla farklı filtre setleri kullanılarak çoklu flöresan boyama (FISH) yapılabilir. Özel flörid objektifler kullanılması daha uygundur.



Flöresan mikroskopide dalga boyları. FITC boyamada, mavi olarak gelen UV ışık, yansıtıcı olarak okülerden göze yansır.

Karanlık saha mikroskopisi

Özel kondansör ve objektiflere ihtiyaç duyar, ışık alttan veya reflected olarak üstten uygulanabilir. Reflected karanlık sahada objektifler LWD (Long Working Distance), uzun çalıma mesafesi ULWD ve ELWD (Ultra-Long Working Distance), (Extra-Long Working Distance) olarak belirlenir.



Polarizasyon mikroskobu

Rutin parlak saha ışık mikroskopisindeki polarizasyon mikroskopunda polarizör ve analizör olmak üzere iki filtre bulunur ve ışık patikasına yerleştirilir. Polarizör tablanın altında ışık kaynağının üstünde bulunur, 360 derece döndürülme imkanı vardır, soldan sağa veya doğu batı yönünde vibrasyona izin verir. Analizör ise genellikle kuzey güney yönde düzenlenmiş tir ve objektifin üzerinde bulunur. Bazı sistemlerde analizörde döndürülebilir. Kullanılmadığında ışık patikasından çıkarılabilir. Özellikle amiloid birikimlerinin Kongo kırmızısı boyamasında elma yeşili refle vermesinde önemlidir. Ayrıca dokudaki kristaller polarizasyon ile çok kolay tanımlanabilir.



İşık mikroskobu için polarizör ve analizörden oluşan polarizasyon filtreleri ile basit ara parça

Mikrofoto sistemleri

Günümüzde mikrofotografi sistemleri, değişik üreticilerin ürettiği oldukları mikroskoplara eklenebilen, basitten yüksek çözünürlük ve hız kadar değişik özelliklerde digital makinalardan oluşmaktadır. Bazıları görüntüyü üzerindeki belleğe aktaran digital fotoğraf makinaları iken, bazıları yanında kontrol ve depolama için bilgisayara ihtiyaç duyan kameralardan oluşur.

Digital fotoğrafının gelişimi ile fotoğraf çekmek çok kolaylaşmıştır. Bu makinalarda klasik fotoğrafide karşımıza çıkan film seçimi, pozlandırma süresi ve ayarları tam otomatik olarak yapılmaktadır. Kullanılan makinalar günlük hayatta kullanılan digital fotoğraf makinaların mikroskoba uyarlanmış ekileri olabilir. Bu durumda özel ara adaptörler ve özel mikroskop ayarları gerekecektir. Ancak son zamanlarda özel digital kameralar, ara ekipmanlar (depolama ve görüntüleme için) yada bilgisayar kullanımı daha ön plandadır. Bu sistemlerden doğrudan barkovizyon veya televizyon gibi cihazlara direkt aktarım da mümkün olabilmektedir.

Bu görüntüler telekonferans ve konsultasyon için kullanılabilir. Bazı özel yazılım ve mikroskoplar ile konferansa katılanlar ve derlendirciler mikroskoba uzaktan kumanda edebilirler.

Sanal mikroskopi

Özel yapılmış mikroskoplar ve kamera sistemleri ile preparatlar taranır ve bilgisayar ortamına aktarılır. Depolanan görüntü özel programlarla bilgisayar ekranı üzerinde, mikroskopta olduğu gibi dolaşıp, büyütülerek incelenir. Kongrelerde ve bazı dergilerdeki olgu sunumları, konsultasyonlar ve çok merkezli çalışmalar bu şekilde yapılabilmektedir. Gelecekte öğrenci, asistanların eğitim arıvlerinin bu şekilde oluşturulması ve internet ile eğitim, sınavların

bilgisayar üzerinden gerçekle tirilmesi olası olacaktır. Daha ütöpik olarak laboratuvar dı ndan preparatlarımıza ula ma ve tanı koyma imkanına sahip olabilece iz.

Bu araçlar mikroskop üreticilerin kendi ortaklıkları veya geli tirdikleri sistemler (Nikon-aperio, Olympus-dotslide) ile yürümektedir. Mikroskop firmaları kendilerini bu ekilde gelece e hazırlamakta, mikroskopa alternatif olarak sunmaktadır. Bu konudaki örnek uygulamalar <http://www.patoloji.med.ege.edu.tr/nepathol/sanal%20mikroskobi.html> internet adresinde gösterilmi tir. Dokuz Eylül Üniversitesi ö renci e itiminde kendi sistemini kullanmaktadır. <http://194.27.56.209/mirax/> . Burada bir preparatın görüntüsü, doku boyutu yanısıra tarama çözünürlü ü, ve sistemne göre de i mekte olup 40 GB'a ula abilmektedir. Tarama süresi ise 2 dakikalara kadar inmi tir.

Elektron mikroskobi,

Elektron mikroskop örne in elektronik olarak büyütülmü görüntüsünü olu turan bir mikroskop tipidir. Örne i görüntülemek için elektron partiküllerini kullanır ve büyütülmü görüntü olu turur. Optik ık mikroskobuna göre görülebilir (foton) dalga boyu 100,000 kez küçük oldu undan 1,000,000 kat büyük görüntü olu turabilir, optik mikroskobun büyütmesi ise 2,000 kat ile sınırlıdır. Görüntü olu tururken, elektron akımını kontrol etmek ve odaklamak için elektrostatik ve elektromagnetik "lens"ler kullanır.

Optik mikroskop kalitesinde olan ilk elektron mikroskop 1933 te Ernst Ruska tarafından olu turuldu. Patent ise 1931 yılında Siemens tarafından alınmı tı, Rutka 1937 yılında Siemens ile çalı maya ba ladı, 1939 da ilk ticari geçirgen elektron mikroskop (Transmission Electron Microscope (TEM)) ortaya çıktı

Transmisyon elektron mikroskop; Yüksek voltajlı elektron akımı imaj olu turmak için kullanılır, Elektron tabancası elektronları yayar, elctron kayna ı tungsten Flamanlı bir katoddur. Elektron ı nları +100 keV (40 to 400 keV) anod ile hızlandırılır, elctrostatik ve elektromagnetik lensler ile odaklanır ve incelenecek örne in içinden geçer. Dı arı çıkan ı nlar mikroskopun objektif lens sistemiyle büyütülür ve bu bilgi flöresan görüntüleme ekranına aktarılır. Görüntü olarak de i ik ortamlarda depolanır. CCD kamera ile yakalanan görüntüler bilgisayar veya monitorlerde görüntülenebilir. TEM görüntülerde de sferik aberrasyonlar sınırlayıcıdır, yeni jenerasyon düzelticiler ile bu düzeltilip rezolüsyon artırılmı tir. Yüksek rezolüsyonlu TEM'lerde (**High Resolution TEM HRTEM**) rezolüsyon 0,5 Angstrom (50 picometre) altına inmi tir (50 milyon büyütme).

Taramalı elektron nikroskop (Scanning electron microscope (SEM)) TEM'den farklı olarak SEM'in elektron ı nları örne in tam görüntü bilgisini içermez. Örnek dört tarafından elektron ı nları ile taranır ve örne in her kö esinde elektron demetleri enerji kaybeder ve kayıp enerji ısı, ık, elektronlara sekonder dü ük enerji, veya x ı nına çevrilir. Örnekte enerjinin olu tu u bölüme göre bu sinyallerin yo unlu unun görüntüsü SEM görüntüsünü olu turur. Genel olarak SEM imaj kalitesi TEM'e göre dü üktür. SEM görüntüsü örne in yüzeyini gösterir.

KAYNAKLAR

1. <http://www.zeiss.de/C1256B5E0047FF3F/?Open>
2. http://www.microscopy.olympus.eu/microscopes/About_Microscopy_7436.htm
3. <http://olympusmicro.com/primer/anatomy/anatomy.html>
4. <http://194.27.56.209/mirax/>
5. <http://www.patoloji.med.ege.edu.tr/nepathol/sanal%20mikroskobi.html>
6. <http://www.path.uiowa.edu/virtualslidebox/>