

SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEKOKULU



PATOLOJİ LABORATUVAR TEKNİKLERİ PROGRAMI

PLT104-Histoteknoloji 2

Öğretim Görevlisi Dr. Nurhan ÇON

MİKROSKOBUN TARİHÇESİ, ÇEŞİTLERİ, IŞIK MİKROBU KULLANIMI

PLT104-Histoteknoloji 2

Hafta-11



Mikroskobun Tarihçesi ve Mikroskop Çeşitleri



Mikroskop

- Mikroskop, çeşitli merceklerin kullanılması ve düzenlenmesi ile objelerin görüntülerinin büyütülmesine olanak veren bir alettir.
- Bir diğer önemli işlevi de dereceli bir şekilde büyütülen objelerin çözünürlüğünü veya netliğini artırmaktadır.



Mikroskobun Tarihçesi

- Mikroskobu, ilk önce Hollandalı Zacharias Janssen'in, 1590 yılında bir teleskobu tadil etmek suretiyle meydana getirdiği kabul edilmektedir.
- Bugünkü mikroskobun ana prensiplerini ise 17. asırda Hollandalı Anton van Leeuwenhoek ve İngiliz Robert Hooke bulmuşlardır.



Mikroskop Çeşitleri

- Aydınlanma kaynağına göre iki tip mikroskop vardır:
- Işık mikroskoplar
- Elektron mikroskoplar



Mikroskop Çeşitleri

- Işık mikroskobu
- Faz kontrast mikroskobu
- Karanlık saha mikroskobu
- Floresan mikroskobu
- Polarizasyon mikroskobu
- Konfokal mikroskop
- Ters (inverted) mikroskop
- Stereomikroskop
- Transmisyon elektron mikroskobu (TEM)
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM)



Işık Mikroskobu

- Laboratuvarlarda rutinde kullanılan mikroskoplardır.
- Mekanik ve optik bölümlerden oluşur.
- Optik parçalar:
 - Objektif
 - Oküler
 - Kondansatör



Işık Mikroskobu

- Objektif; incelenen nesnenin aydınlatılan görüntüsünü okülere doğru büyütür ve izdüşümünü oluşturur.
- Oküler; bu görüntüyü daha da büyütür ve gözlemcinin retinası ya da bir fotoğraf plakası üzerine düşürür.
- Kondansatör; incelenen nesneyi aydınlatan bir ışık demeti oluşturacak şekilde, ışık kaynağından gelen ışığı toplayıp odaklar.



Işık Mikroskobu

- Objektifler çeşitli büyütme kapasitelerine sahip olup 4 veya 5 adet bulunabilirler.
- Büyütme oranları 4x, 10x, 40x 100x gibi ifadelerle üzerlerinde yazılıdır.
- Amaçları;
 - Objenin herhangi bir yerinden gelen ışınları birleştirmek
 - Bu ışınları odak noktasında toplamak
 - Odak noktasında oluşan imajı büyütmek



Işık Mikroskobu

- Bazı mikroskoplarda tek gözle bakılan bir oküler (monoküler), çoğunluğunda ise iki gözle bakılan çift oküler (binoküler) bulunur.
- Bazı binoküler başlıklarda, fotoğraf makinesi yerleştirmek için üçüncü bir tüp daha bulunur.
- Bazılarında da aynı anda iki kişinin bakabileceği tertibatlar bulunmaktadır.



Işık Mikroskobu

- Mekanik kısım:
 - Oküler ve objektifleri taşıyan tüp
 - Mikroskobu tutmaya yarayan kol
 - Preparatı koymak için tabla
 - Mikroskobun sağlamca oturmasını sağlayan taban



Işık Mikroskobu

- Mikroskopta ayrıntılı, net bir görüntü elde edilmesini sağlayan en önemli etken **çözümleme gücüdür**.
- Çözümleme gücü (rezolüsyon); iki parçacığın ayrı nesneler olarak görülebildiği en küçük mesafe anlamına gelir.
- Işık mikroskoplarının en yüksek çözümleme gücü yaklaşık $0.2\ \mu\text{m}$ 'dir.
- $0.2\ \mu\text{m}$ 'den daha küçük nesneler ışık mikroskopunda seçilemezler.



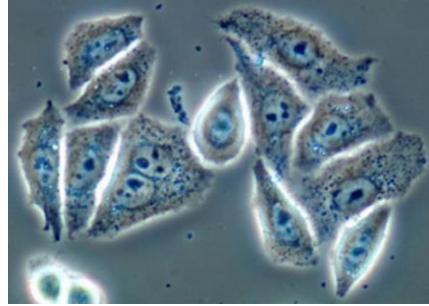
Faz Kontrast Mikroskobu

- Boyanmamış biyolojik örnekler genellikle saydamdır ve tüm bölümleri hemen hemen aynı optik yoğunluğa sahip olduğundan ayrıntılı olarak görüntülenemez.
- Faz kontrast mikroskobu, geçirgen nesneden seçilebilir görüntüler elde edebilen bir mercek sistemine sahiptir.
- Temel ilkesi, farklı kırma indislerine sahip yapılardan geçerken hızını ve yönünü değiştirmesine dayanır.



Faz Kontrast Mikroskobu

- Yapılar birbirlerine göre daha açık veya koyu görülür.
- Canlı hücrelerin tespit ve boyama yapılmadan, canlılığına zarar vermeden incelenmesini mümkün kılar.



Karanlık Saha Mikroskobu

- Özellikle spiroketleri görmede ve hareket muayeneleri yapmakta kullanılmaktadır.
- Özel kondansatörler yardımıyla sağlanan karanlık sahada, alttan gelen ışık, kondansatörün ortasındaki siyah ışık geçirmeyen bölgenin yanlarından girerek preparat üzerine gelir.
- Karanlık alanda bulunan objenin yansıttığı ışık, bakan kişinin gözüne ulaşır ve obje parlak, alan karanlık görülür.



Karanlık Saha Mikroskobu

- Karanlık saha muayeneleri için;
 - Kullanılacak lam, ince, pürüzsüz ve yağsız olmalıdır.
 - Lam üzerinde hazırlanan preparat çok kalın ve çok kesif olmamalıdır.
 - Muayene olacak obje kondansatörün fokusu üzerinde bulunmalıdır.
 - İyi bir görünüm için, gerekirse kondansatör hafifçe aşağı/yukarı indirilip kaldırılabilir.



Floresan Mikroskobu

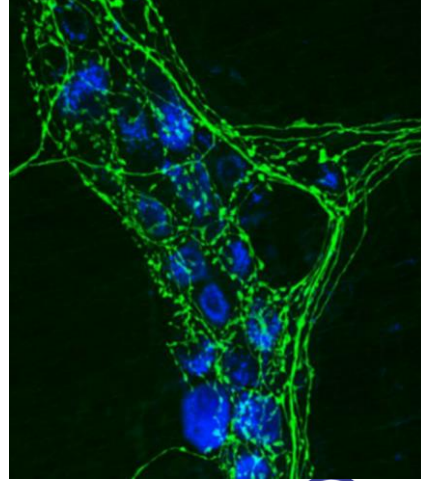
- Bazı floresan maddeler uygun dalga boyundaki ışık altına tutulduğunda daha uzun dalga boyunda ışık yayarlar. Bu olaya **floresans** denir.
- Floresan mikroskopta doku kesitleri morötesi ışık altına tutulur.
- Floresan maddeler karanlık bir zemin üzerinde parlak parçacıklar şeklinde izlenir.
- Güçlü bir mor ötesi ışık kaynağının kullanıldığı sistemde, araştırmacının gözlerini korumak amacıyla ışığı süzecek özel filtreler kullanılır.



Floresan Mikroskopu

- Bu amaçla kullanılan boyalar;

- auramin,
- acridin orange,
- berberin sulfat,
- thioflavin,
- thiazo-sarı,
- corifosfin,
- fluorescein,
- rhodamine,
- ...



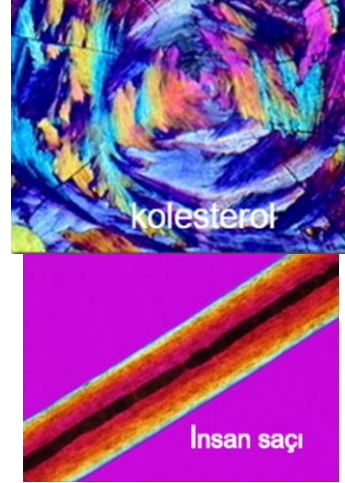
Polarizasyon (Kutuplaştırma) Mikroskopu

- Kutuplaştırıcı bir filtreden geçen normal ışık sadece bir yönde titreşerek filtreden çıkar.
- Bu filtrenin üzerine, ikincisi ilkinin dik olacak şekilde bir filtre daha yerleştirilince ışık geçmez ve karanlık alan etkisi olur.
- İki filtre arasına, belli bir yöne doğru yönelmiş moleküller içeren doku yapıları yerleştirilirse, polarizörden çıkan ışığın eksenini saptırırlar.
- Sonuç olarak koyu zemin üzerinde yapılar parlak görünür.



Polarizasyon (Kutuplaştırma) Mikroskobu

- Kutuplaştırılmış ışığın titreşim yönünü saptırma yeteneğine **çift kırma** denir ve bu özellik kristalli maddeler ya da yönelmiş moleküller içeren maddelerde mevcuttur.



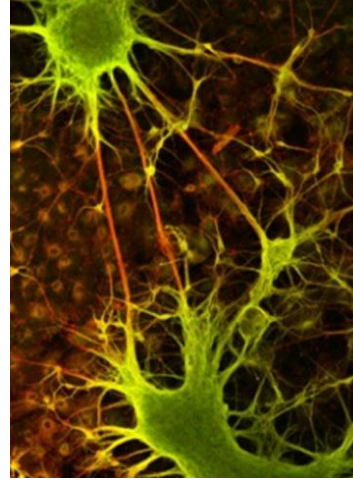
Konfokal Mikroskop

- Bir hücre ya da kesitin çok ince bir düzlemine tam olarak odaklanabilmeyi olanaklı kılar.
- Tekniğin dayandığı temel ilkeler:
 - Örnek çok ince bir ışık demetiyle aydınlatılır.
 - Örnekten gelen görüntü küçük bir delikten geçer.
- Sonuçta yalnızca odaklanan düzlemdeki görüntü algılayıcıya ulaşırken, bu düzlemin önünde ve arkasında kalan görüntüler engellenir.

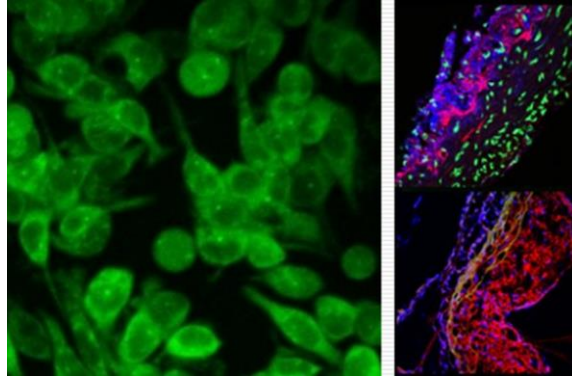


Konfokal Mikroskop

- Çoğu konfokal mikroskopta şu düzenleme kullanılır:
 - Işık kaynağı olarak lazer kullanılır.
 - Daha geniş alanları gözlemlemek için ışık kaynağı örnek üzerinde hareket ettirilmelidir.
 - İncelenecek olan örneğin floresan bir molekülle işaretlenmesi gerekir.
 - Örnekten yansıyan ışık, görüntünün oluşturulmasında kullanılır.
 - Yansıyan ışık bulucu tarafından yakalanır ve işaret elektronik olarak alıcıda görülebilecek hale gelir.



İnverted Mikroskop



- Genellikle biyolojik bilimlerde, hücre ve doku kültürlerindeki canlı hücrelerin incelenmesi için kullanılır.



Stereomikroskop

- Stereo mikroskoplar sabit dürbün mantığı ile çalışan, 3 boyutlu görüntü elde etmeyi sağlayan bir mikroskop türüdür.
- Düşük büyütme ile derinlikli görüntü elde etmek için ve gözle görülen cisimlerin yüzeyini incelemek amaçlı kullanılırlar.
- Çoğunlukla diseksiyonda kullanılır.
- Lam ve lamel kullanılmaz.

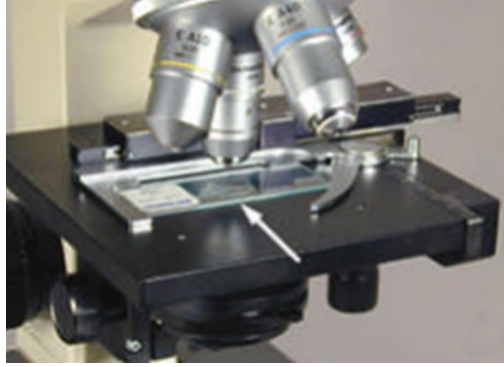


Işık Mikroskobu Kullanımı



Mikroskop Kullanım Basamakları

1. Preparat tabla üzerindeki sıkıştırma klipslerine yerleştirilir ve ışık kaynağı açılır.



Mikroskop Kullanım Basamakları

2. Her zaman en düşük büyütme seviyeli objektifle çalışmaya başlanır.



Mikroskop Kullanım Basamakları

3. Okülerden bakılarak görüntü belirinceye kadar kaba ayar düğmesi (makrovida) ile tabla üst seviyeye doğru hareket ettirilir.



Mikroskop Kullanım Basamakları

4. Kaba ayar yapıldıktan sonra ince ayar düğmesi (mikrovida) ile net bir görüntü elde edilinceye kadar ayar yapılır.



Mikroskop Kullanım Basamakları

5. Hareketli revolver kullanılarak daha büyük büyütme seviyeli objektife geçilir.
6. Mikrovida ile netlik ayarı yapılır.
7. Daha büyük görüntü için yine hareketli revolver ile büyük büyütme dereceli objektife geçilir.
8. Görüntü mikrovida ile netleştirilir.



Mikroskop Kullanım Basamakları

9. Her büyütmede ışığa gereksinim artacağından diyafram biraz daha açılmalıdır.



Mikroskop Kullanım Basamakları

10. İnceleme bittikten sonra revolver ile en düşük büyütme dereceli objektife dönülür.
11. Makrovida ile tabla en alt seviyeye indirilir.
12. Işık kaynağı kapatılır ve preparat tabla üzerinden alınır.



Dikkat Edilecek Noktalar

- Mikroskop, bir elle altından diğer elle kolundan sıkıca tutularak daima iki elle taşınmalıdır.
- Mikroskobun konulduğu masanın sağlam, sallantısız; oturulacak sandalyenin rahat bakmayı sağlayacak, yüksekliği ayarlanabilen nitelikte olması gerekir.
- Mikroskop masanın kenarına fazla yakın konmamalı ve masanın üzerindeki gereksiz şeyler önceden kaldırılmalıdır.



Dikkat Edilecek Noktalar

- Mikroskopun kablolarının altta kalıp ezilmemesine dikkat edilmelidir.
- Kullanmadan önce ve kullandıktan sonra en küçük objektifin görüntü tüpünün önünde olmasına dikkat edilmelidir.
- Sıvı içindeki bir cisim inceleneceği zaman lamın üzerindeki sıvı damlası lamel ile kapatılır. Aksi takdirde yanlışlıkla sıvı içine giren objektifler zamanla bozulabilir.



Dikkat Edilecek Noktalar

- Objektif ve okülerler gereksiz yere kesinlikle yerlerinden çıkarılmamalıdır.
- Mikroskopların merceklerine elle dokunulmamalıdır.
- Yumuşak dokulu, kalıntı bırakmayan, temiz bir bezle her kullanımdan sonra mikroskop temizlenmelidir.



Dikkat Edilecek Noktalar

- 100'lük büyütme ile inceleme yapıldıysa, başta immersiyon objektifi olmak üzere mikroskobun herhangi bir yerinde immersiyon yağ bulaşı bırakılmamalıdır.
- İnceleme bittikten sonra ışık kaynağı açık unutulmamalıdır.
- Mikroskop, kullanılmadığı zamanlarda özel kılıfı veya kutusu içinde muhafaza edilmelidir.

