

Mikroskoplar


- İnsan gözünün algılaması mümkün olmadığı objeleri oldukça gelişmiş mercekler sayesinde görünür hale getiren ve bunu bilgisayar ortamına da taşıma özelliğine sahip olan mikroskoplar, bilimin çoğu alanında kullanılmaktadır.

Birleşik Işık Mikroskoplarında Görüntü Oluşturma Prensipleri

- *Renklerin ışığı kırmasıyla (aydınlık alan, invert, konfokal, interferens)*
- *Cismin ışığı saçma özelliğiyle (karanlık alan)*
- *Işığın fazını değiştirerek (faz kontrast)*
- *Işığın kutuplaşma (polarizasyon) özelliğiyle (polarizasyon)*
- *Işığın enerjisini değiştirerek (fluoresan, ultraviole)*
- *Elektronların geçirgenlik-yansıma özelliğine bağlı (TEM, SEM).*

Mikroskop türleri

Gözle ayırt edilen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Aydınlık alan mikroskobu** 
2. **Karanlık alan mikroskobu**
3. **Faz kontrast mikroskobu**
4. **Polarizasyon mikroskobu**
5. **İnterferens mikroskobu**
6. **İnvert mikroskobu**

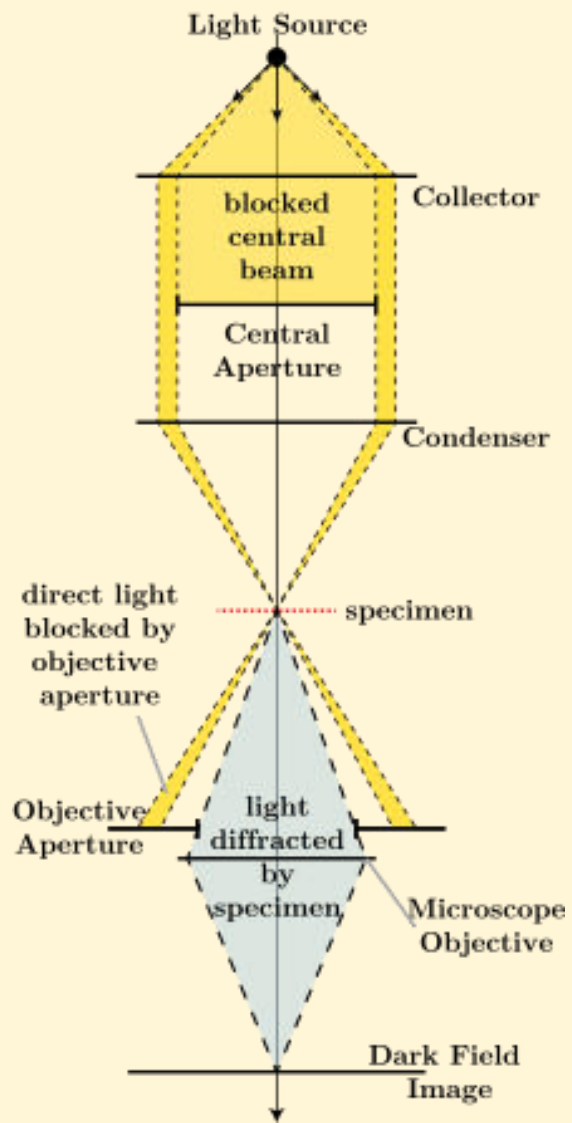
Gözle görülmeyen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

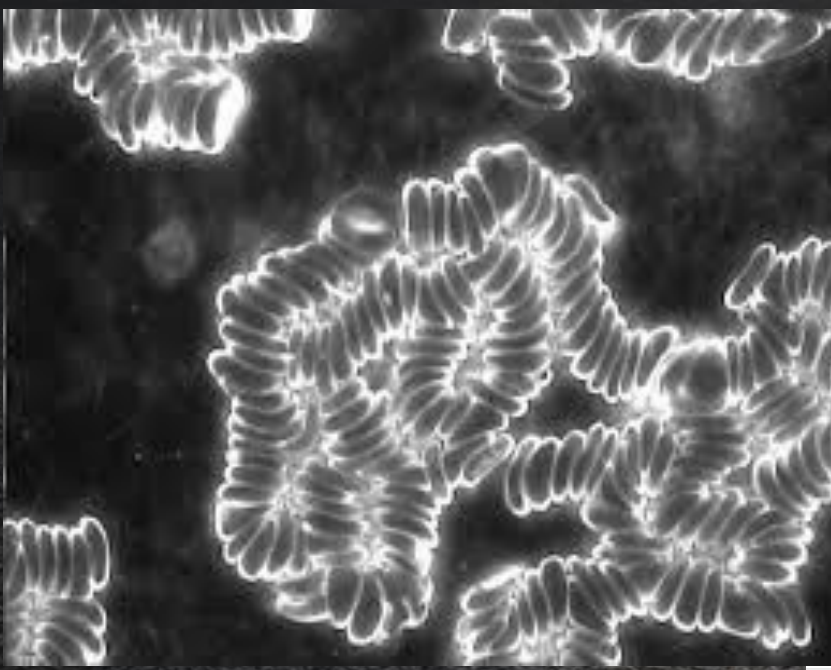
1. **Ultraviyole mikroskobu**
2. **Fluoresan mikroskobu**
3. **Konfokal mikroskobu**
4. **Elektron mikroskoplar**

KARANLIK SAHA MİKROSKOBU

- Bu tip mikroskoplarda kondansörün ortası kapalıdır. Işık, mikroskoba dik değil eğik olarak gelir. Bu durum karanlık bir odada yandan kuvvetle gelen ışıkta aydınlıkta görülemeyen toz taneciklerinin görünür olmasına benzetilebilir.
- Doku kültürlerinde canlı hücreler, çekirdekcik, çekirdek zarı, mitokondri ve lipid damlacıkları parlak, zemini oluşturan sitoplazma ise karanlık olarak görülür.

- Karanlık alan mikroskopunun çalışma prensibi, preparata gelen merkezi ışınların engellenerek sadece oblik ışınların incelenecek örneğe ulaşmasını sağlamaktır. Bu amaçla kondansatörün altına opak bir disk yerleştirilir. Böylece sadece kenardan gelen ışınlar kondansatörden geçerek oblik olarak preparata ulaşır. Öncesinde sadece karanlık bir alan şeklinde görülürken, preparat yerleştirildiğinde oblik ışınlar partiküller tarafından yön değiştirerek objektife, okülere ulaşır. Bu yansımalar karanlık alan içinde parlak aydınlık görüntüler olarak algılanır.

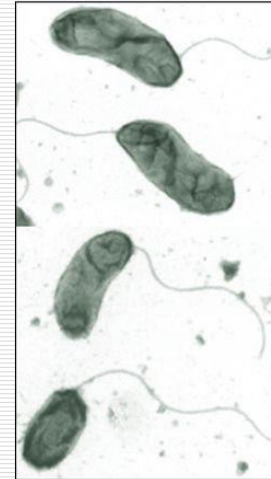




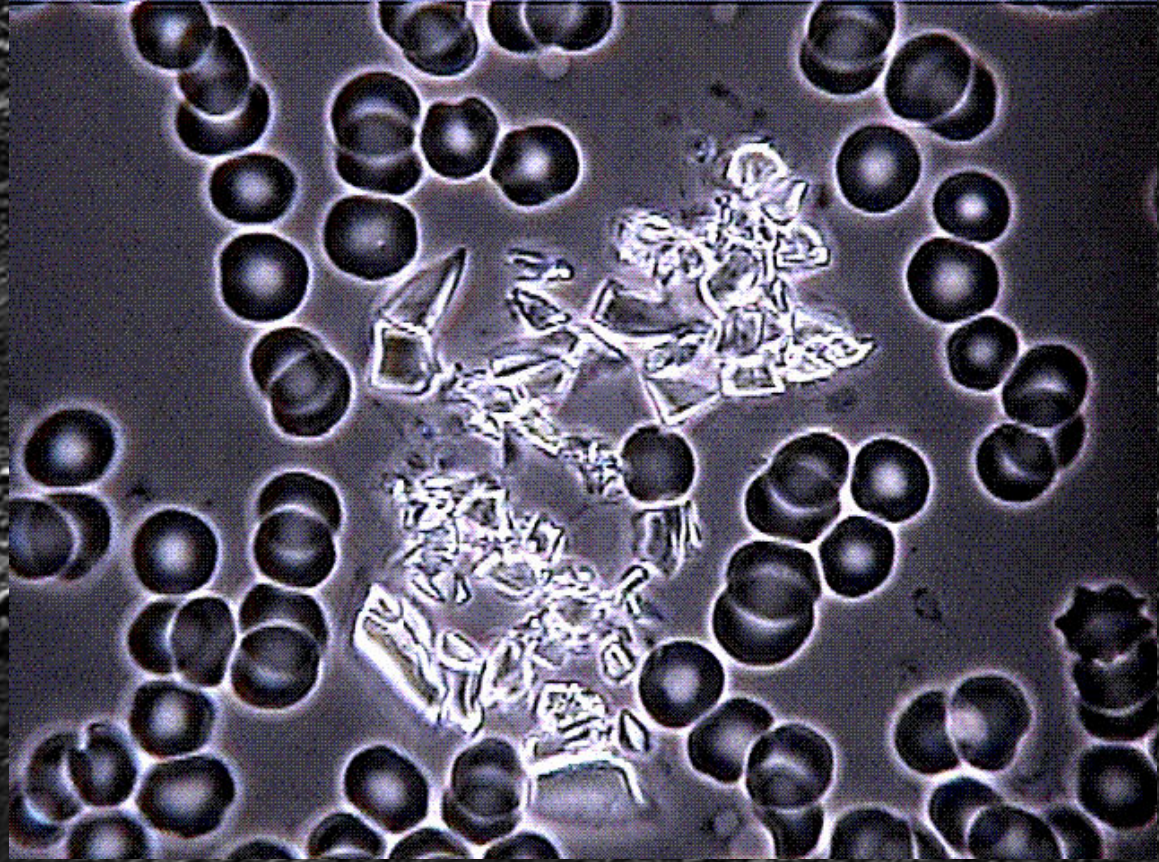
Örneğin bakteri, maya, protozoa içeren süspansiyonlar ya da yanak epitel hücreleri, kan hücreleri gibi hücre ve doku ekstraları bu yöntemle bir ön incelemeye alınabilirler. Hücre kültürlerinin incelemesinde, kültürlerde hareketliliğin (spermatozoa) belirlenmesinde kullanılır. Otoradyografi uygulanmış preparatların incelemesinde kullanılır.

- Kullanım alanları
- Genellikle boyanmamış örneklerin görüntülenmesinde yararlıdır. Havuz suyu, deniz suyu gibi sıvıların içerik incelemesinde kullanılır. Hücre süspansiyonlarında hücrelerin görüntülenmesinde kullanılır

Karanlık Alan Mikroskobu (*Vibrio cholerae*)



- **Kanda kristallerin bulunması bir enfeksiyon ve yangı durumunun habercisi olabileceği gibi zayıf protein sindirimi, gut hastalığı ve fibromilyaljinin de belirtileri olabilir.**



Mikroskop türleri

Gözle ayırt edilen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Aydınlık alan mikroskobu**
2. **Karanlık alan mikroskobu**
3. **Faz kontrast mikroskobu**
4. **Polarizasyon mikroskobu**
5. **İnterferens mikroskobu**
6. **İnvert mikroskobu**

Gözle görülmeyen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Ultraviyole mikroskobu**
2. **Fluoresan mikroskobu**
3. **Konfokal mikroskobu**
4. **Elektron mikroskoplar**

FAZ KONTRAST MİKROSKOBU

- Faz kontrast mikroskopu, materyallerin canlı ve hareketli olarak incelenmesini sağlayabilen bir mikroskoptur.
- Bu tür mikroskoplarla canlı mikroorganizma, hücre kültürü ve spermatozoon gibi yapılarda oluşturdukları ayrı kontrastlarından yararlanılarak tanımlamak mümkün olabilmektedir. Bu nedenle de faz-kontrast mikroskoplar genel biyolojik amaçlar için çok fazla kullanılmaktadır.

Çalışma prensibi

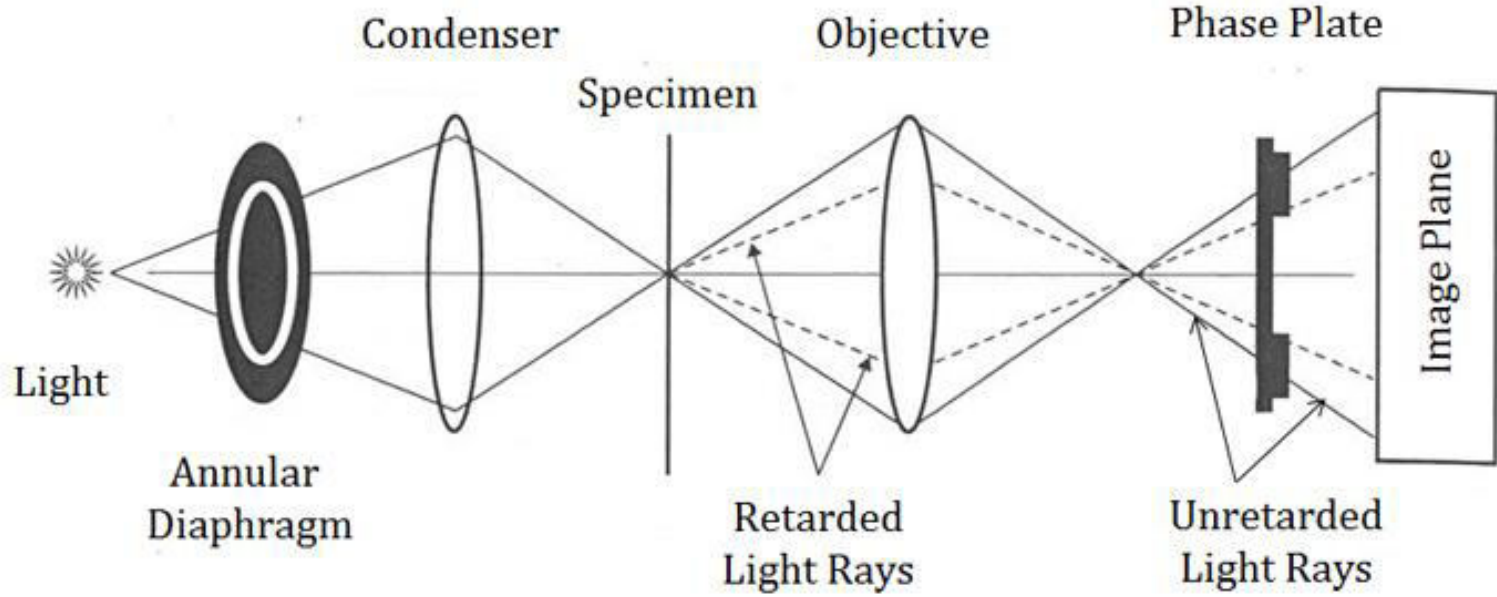
- Temel prensip, ışığın farklı kırılma indislerinin hücre ve hücre dışı oluşumlardan geçerken hızının ve yönünün değiştirilmesini sağlama esasına dayanır.
- Faz kontrast mikroskopunda kondansör diyaframı halka biçiminde annulus adı verilen özel bir diyaframdır. Objektif içine de halka biçiminde özel bir faz plağı yerleştirilmiştir.
- Faz plağını oluşturan madde direk ışınları daha ileri götürdüğü için hafif kırılan ışınlar ile arasındaki dalga uzunluğu farkı artmış olur ve cisim ortamda yeterli bir kontrastta görülür.

- Sıvı bir ortamda canlı olarak mikroorganizma veya hücre incelemek, kendilerini ve iç yapılarını görmek zordur.
- Çünkü incelenecek materyalin ve materyalin içinde bulunduğu sıvının, ışığı kırma indeksi birbirine çok yakındır.



- Normal ışık mikroskopları da bazı değişikliklerle faz-kontrast haline getirilebilir. Bunun için:
- 1- Özel kondansatör: Bu kondansatörde halka şeklinde diyafram dizileri ihtiva eden dönen metal disk bulunur. Bu diyaframlar, objektiflerin NA'sına göre birlikte kullanılır.
- 2- Özel faz objektifleri: Normal objektiflerin arka fokal düzlemine bir faz difraksiyon levhası konarak elde edilir. Bunlar cam levhalardan oluşmuşlardır ve ışığın dalga boyunu $1/4$ 'ü kadar değiştirirler.
- 3- Oküler: Normal oküler kullanılır.

Phase Contrast Microscope

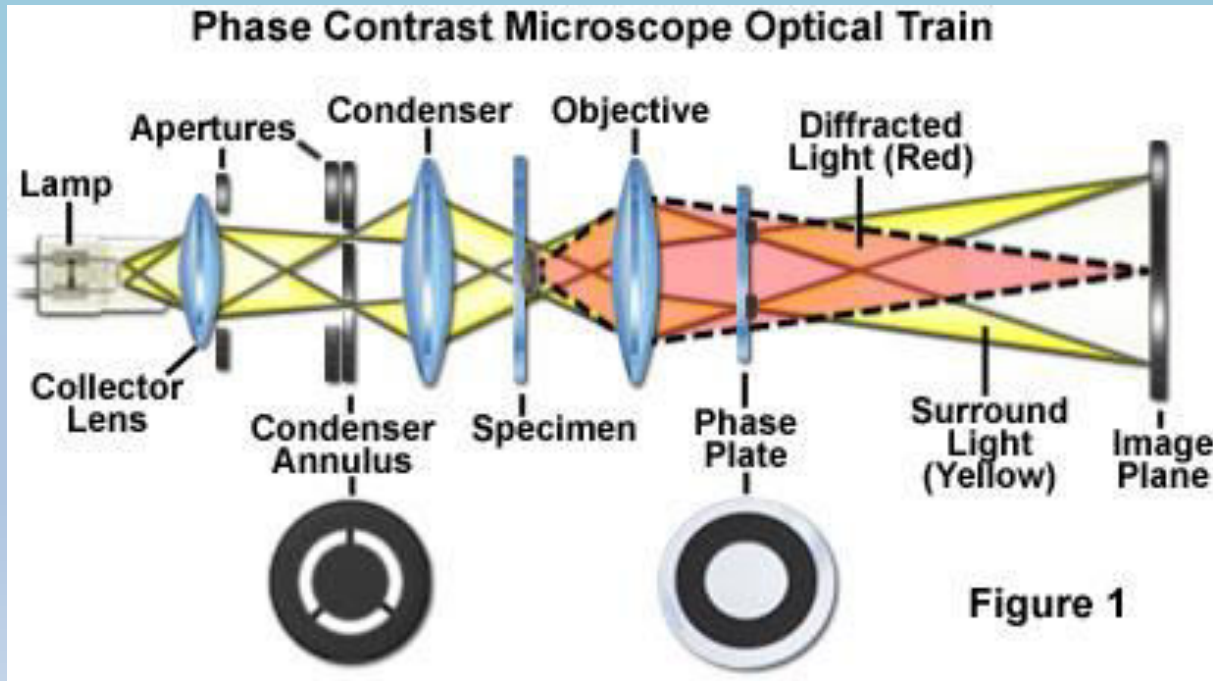


Esas olarak ışık mikroskoplarına benzeyen Faz Kontrast Mikroskobu **faz halkası** ve **faz plağı** içerir.

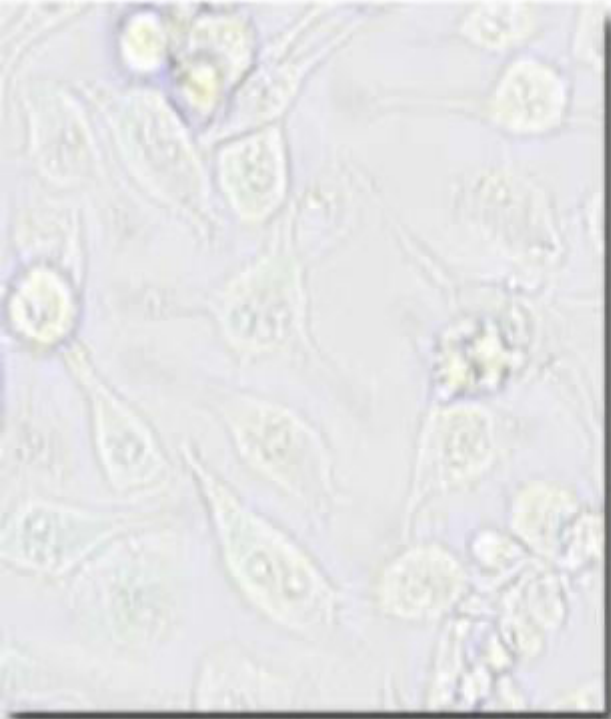
Işık canlı hücreden geçerken fazı değişir. Bu faz değişimi insan gözüyle algılanamaz.

Bu faz değişimini ışık dalga boyunu kısaltıp, genliğini değiştirerek görünür hale getirilir.

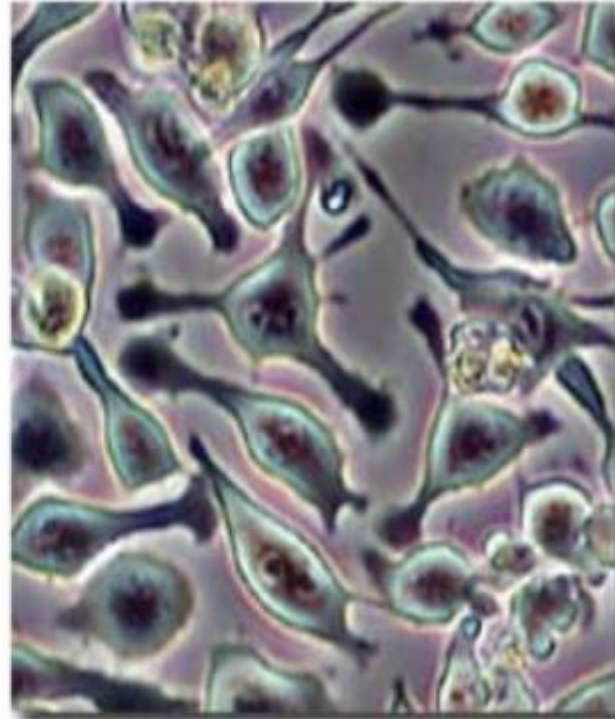
- Işık canlı hücreden geçtiğinde dalga fazı, dalga boyunun $\frac{1}{4}$ 'ü kadar değişir.
- Faz halkasından direkt çıkıp objeden kırılmadan geçen ışınlar faz plağından da kırılmadan geçer.
- Faz halkasından geçip obje tarafından kırılan ışınların dalga boyu $\frac{1}{4}$ kadar kısalır. Faz plağına gelen bu ışınlar burada ayrıca kırılmaya uğrar.



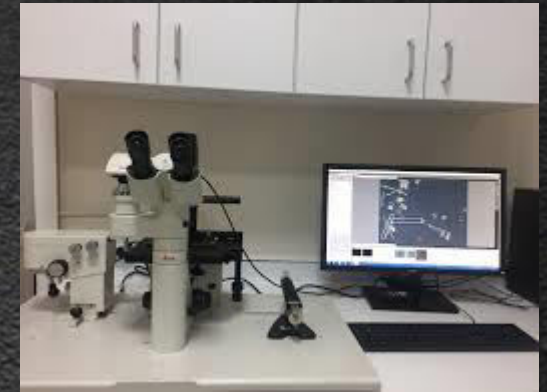
Living Cells in Brightfield and Phase Contrast



Brightfield



Phase contrast



Mikroskop türleri

Gözle ayırt edilen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Aydınlık alan mikroskobu**
2. **Karanlık alan mikroskobu**
3. **Faz kontrast mikroskobu**
4. **Polarizasyon mikroskobu**
5. **İnterferens mikroskobu**
6. **İnvert mikroskobu**

Gözle görülmeyen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Ultraviyole mikroskobu**
2. **Fluoresan mikroskobu**
3. **Konfokal mikroskobu**
4. **Elektron mikroskoplar**

POLARİZASYON MİKROSKOBU

- Bu mikroskop biyoloji alanında ışığı çift kırıcı özelliği olan objelerin incelenmesinde kullanılır. Bu mikroskoplar yardımıyla ışığı çift kıran maddenin en ince yapısı rahatlıkla gözlenebilir.
- Polarizasyon mikroskoplarında nikol prizmaları denilen iki prizma vardır. Bu prizmalar polarizör ve analizör olarak adlandırılır.



- Bu prizmaların birbirlerine dik açı yapacak şekilde yerleştirilmeleri gerekir. Bu prizmalar polarizasyon düzlemlerine gelen ışınları bırakır, diğerlerini tutarlar. Bu nedenle prizmaların biri ya da diğerinden geçen ışın tek düzlemde yayılan polarize ışık olur.
- İncelenecek madde bu iki prizma arasına yerleştirilir. Böylece ışık mikroskopunda seçilemeyen çeşitli kristaller, ipliğimsi yapılar (bağ dokusu fibrilleri, kas lifleri) küçük granüller, yağ damlaları incelenebilir.

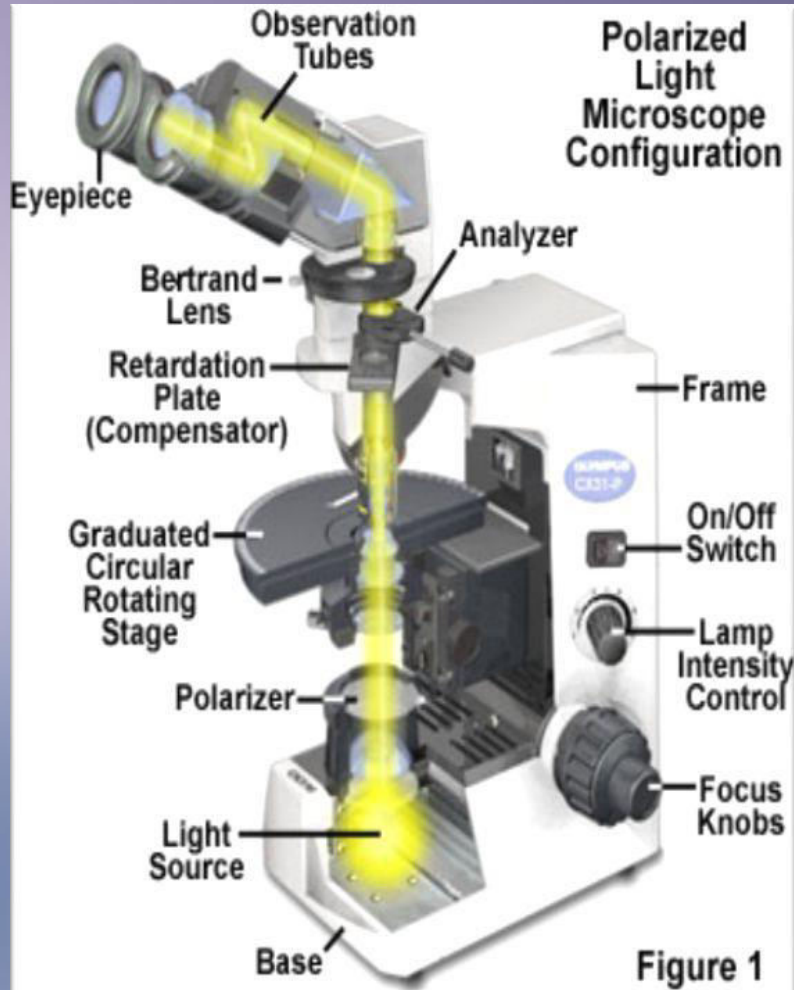
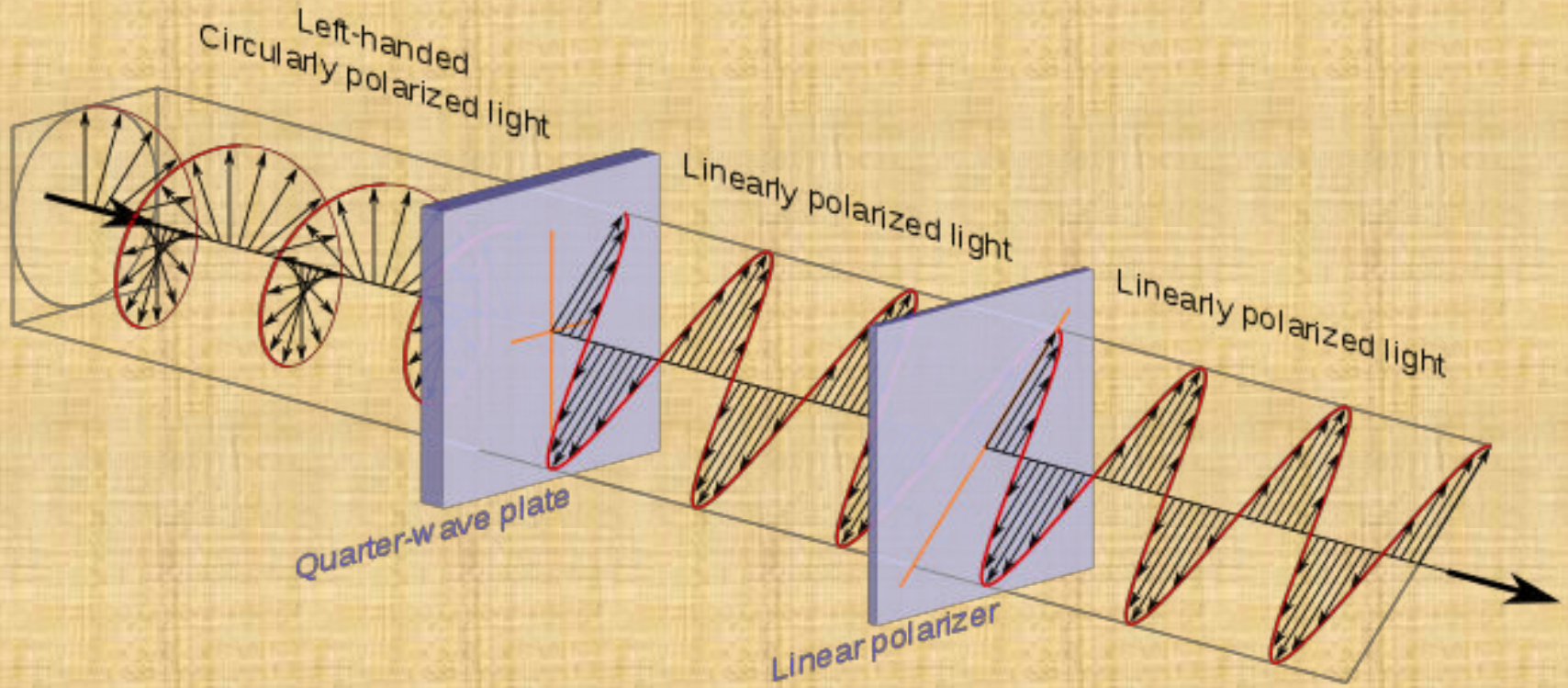


Figure 1

➤ POLARISED LIGHT MICROSCOPE

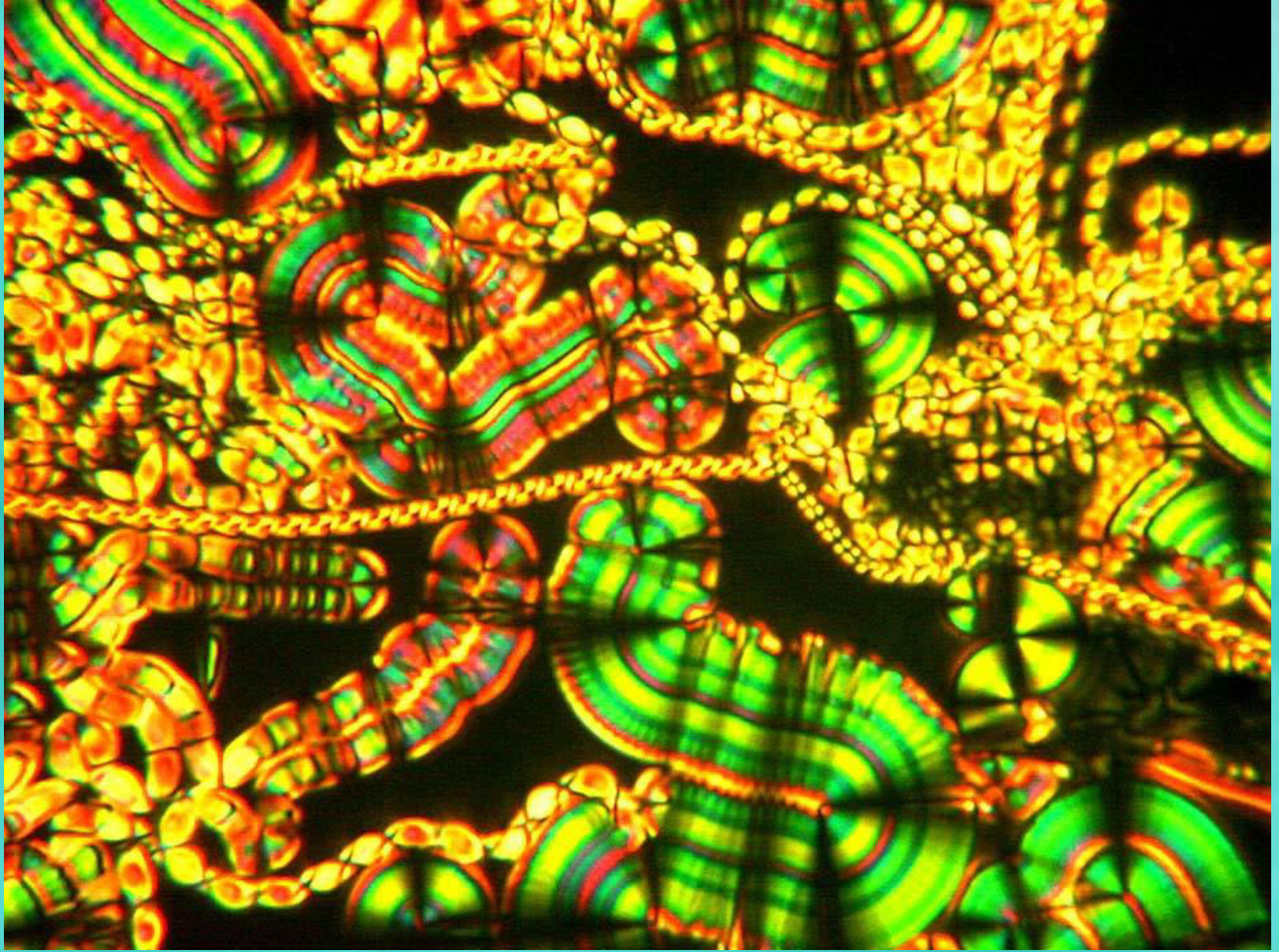
- ❖ Designed to observe optically anisotropic specimen (**BIREFRINGENCE SPECIMEN**)
- ❖ Equipped with **POLARISER** and **ANALYZER**
- ❖ Works on the principle of **INTERFERENCE**



Işığın kutuplaşmasından (polarizasyonundan) yararlanılarak yapılan bir mikroskoptur.

Polarizasyon: titreşimleri tek bir doğrultuda olan ışık dalgaları

Polarizasyon mikroskoplarda ışık kaynağından gelen ışınlar polarizasyon filitreleri veya prizmalarınca linear polarizasyon ışınlarına çevrilirler.



Kontrastı yüksek.
Geolojist
Mineralojist
Kimyager

Mikroskop türleri

Gözle ayırt edilen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Aydınlık alan mikroskobu**
2. **Karanlık alan mikroskobu**
3. **Faz kontrast mikroskobu**
4. **Polarizasyon mikroskobu**
5. **İnterferens mikroskobu**
6. **İnvert mikroskobu**

Gözle görülmeyen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

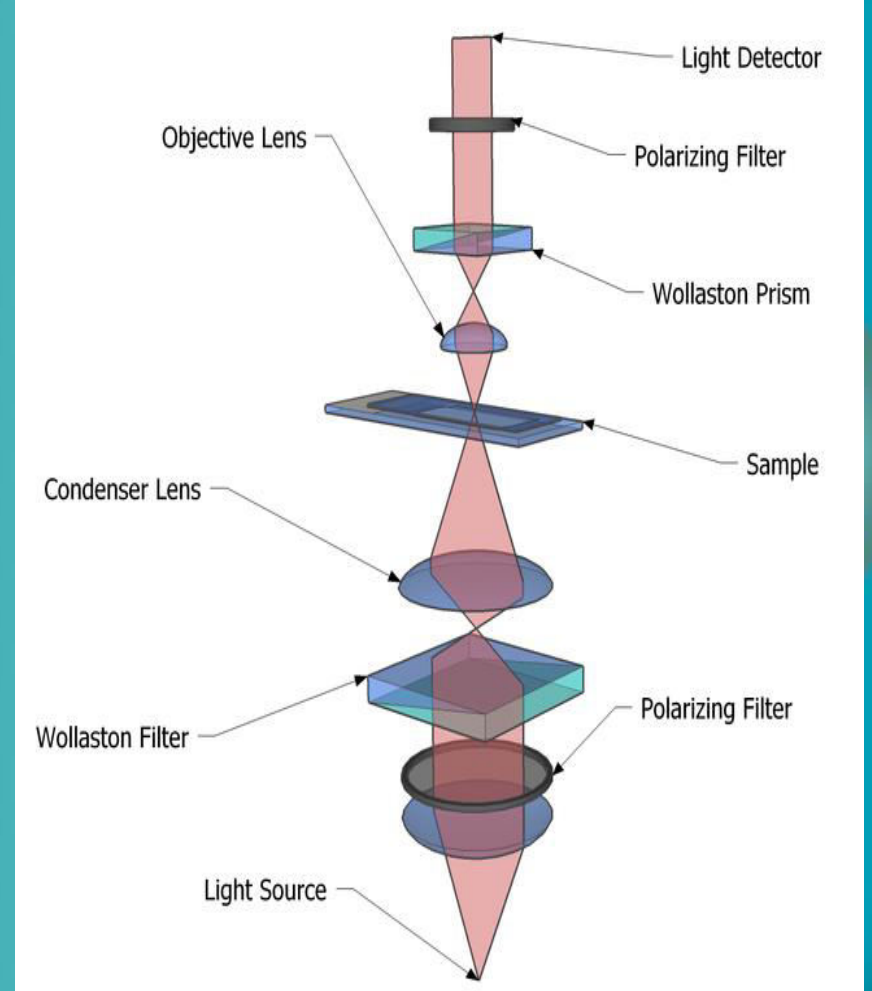
1. **Ultraviyole mikroskobu**
2. **Fluoresan mikroskobu**
3. **Konfokal mikroskobu**
4. **Elektron mikroskoplar**

İNTERFERENS MİKROSKOBU

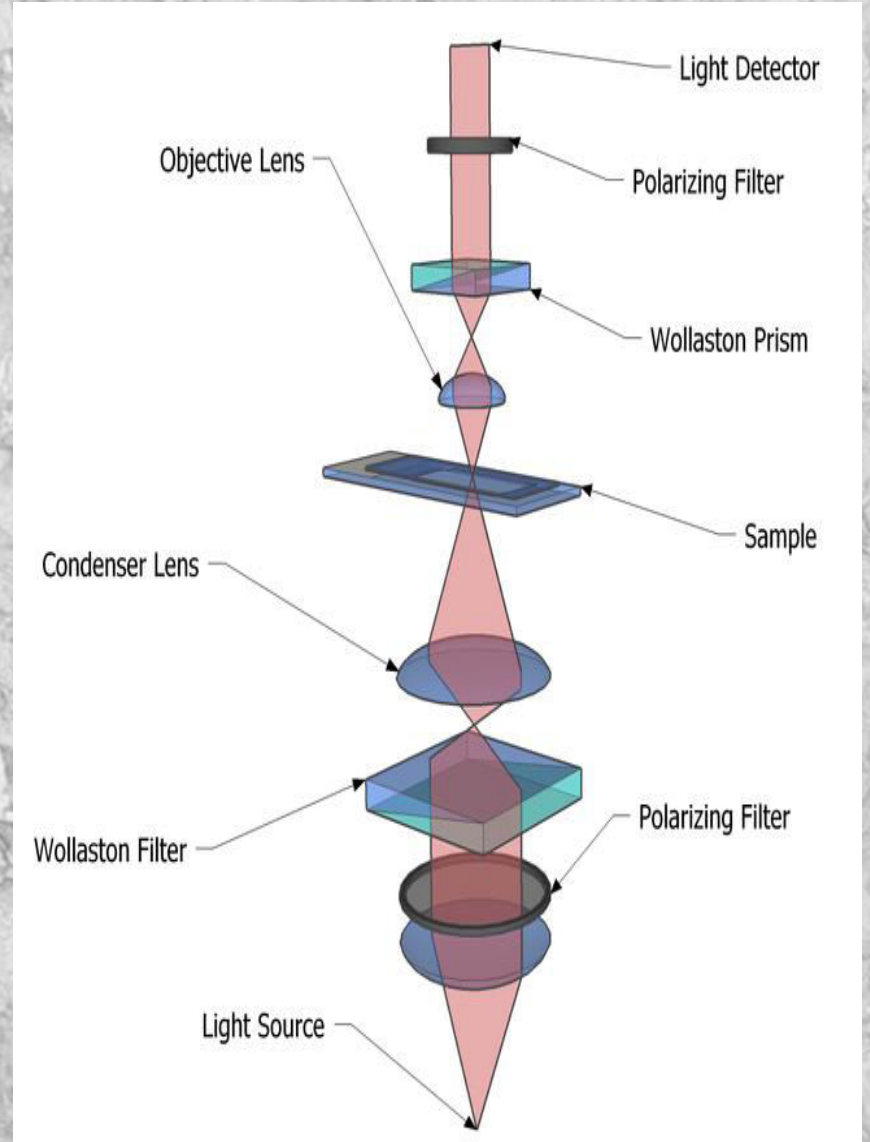
- Faz kontrast mikroskopunun değişik bir versiyonudur. Aralarında bulunan tek fark ışık demetinin kullanımdan kaynaklanır.
- Bir ışık demeti örnekten geçerken diğeri ise örnekten geçemeyen ışık demetidir, değişik bölgelerin farklı yoğunlukları sayesinde kırılma indisleri ile farklılıkları ortaya koyar ve renkli bir görüntü oluşumunu sağlar.

Çalışma prensibi

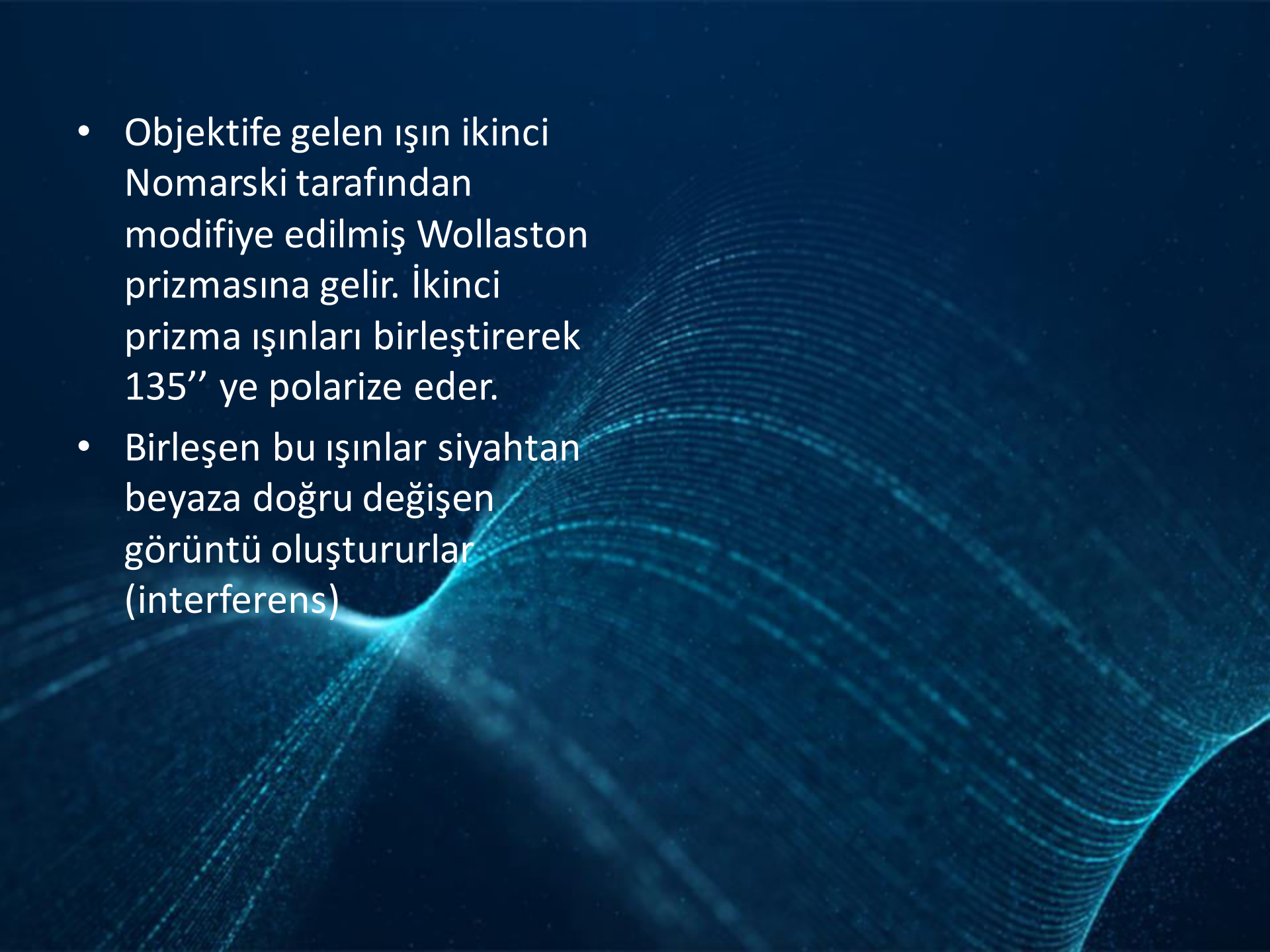
- Işık kaynağından gelen ışık polarize filtreden geçerek 45° polarize edilir.
- Daha sonra Nomarski modifiye wollaston prizmasına gelir ve birbirine 90° açı oluşturacak şekilde iki ışına ayrılır.
- Kırılan ışınlar kondansörden geçerek örneğe gelirler.
- Bu iki farklı ışın örneğin iki farklı noktasına (birbirine 0,2µm mesafede) odaklanırlar.

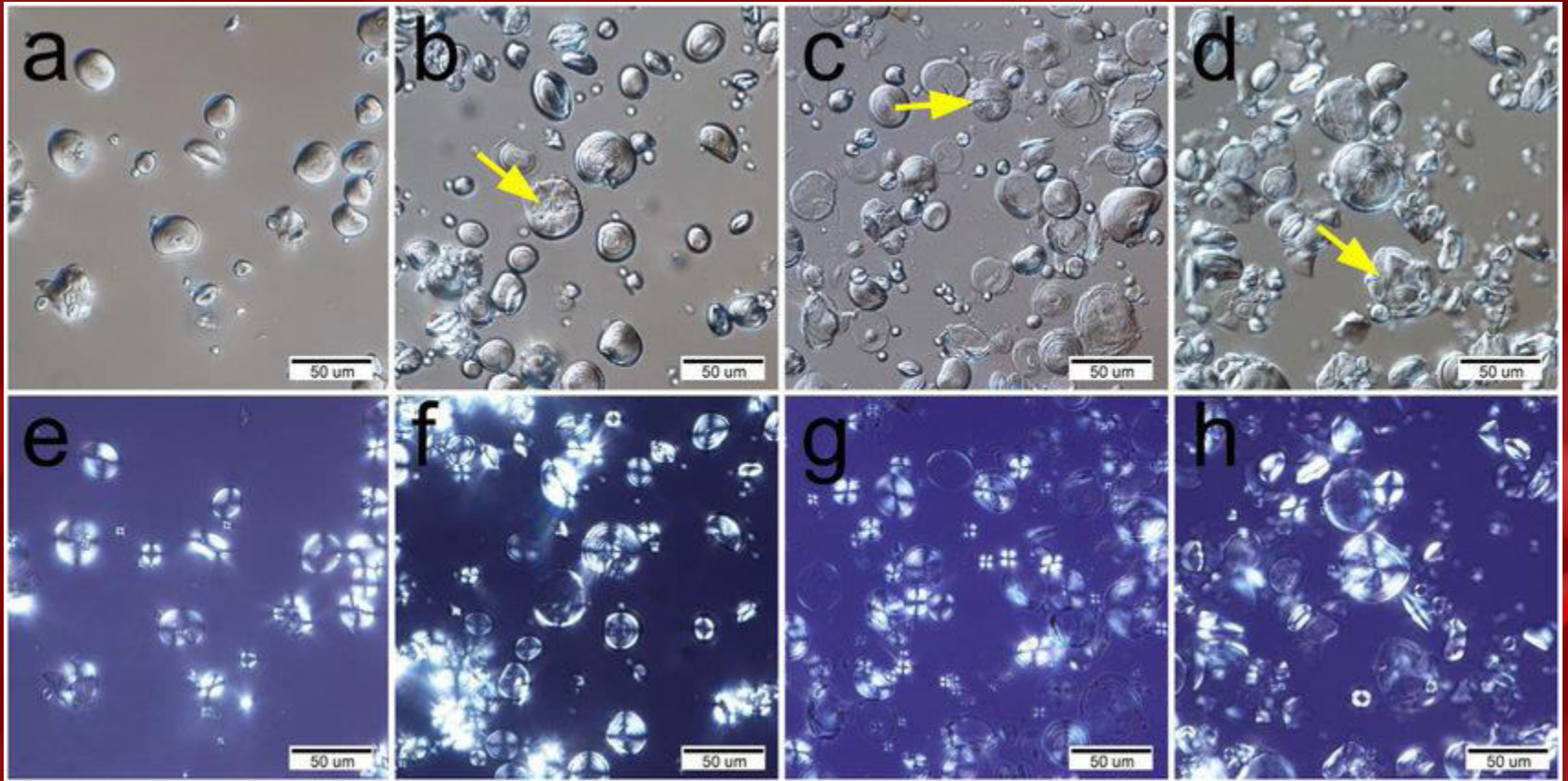


- Örnek boyunca ilerleyen ışınlar bir makas yaparak ayrılır.
- Farklı ışık kırma indeksine ve farklı kalınlığa sahip maddeden geçen ışınlar farklı optik kırılma yolu izler.
- Bu da faz değişimine neden olur.
- Işınlardan biri diğerine göre daha geç lense ulaşır.
- Bu durum farklı optik yoğunluklara neden olur.



- Objektife gelen ışın ikinci Nomarski tarafından modifiye edilmiş Wollaston prizmasına gelir. İkinci prizma ışınları birleştirerek 135°'ye polarize eder.
- Birleşen bu ışınlar siyahtan beyaza doğru değişen görüntü oluştururlar (interferens)

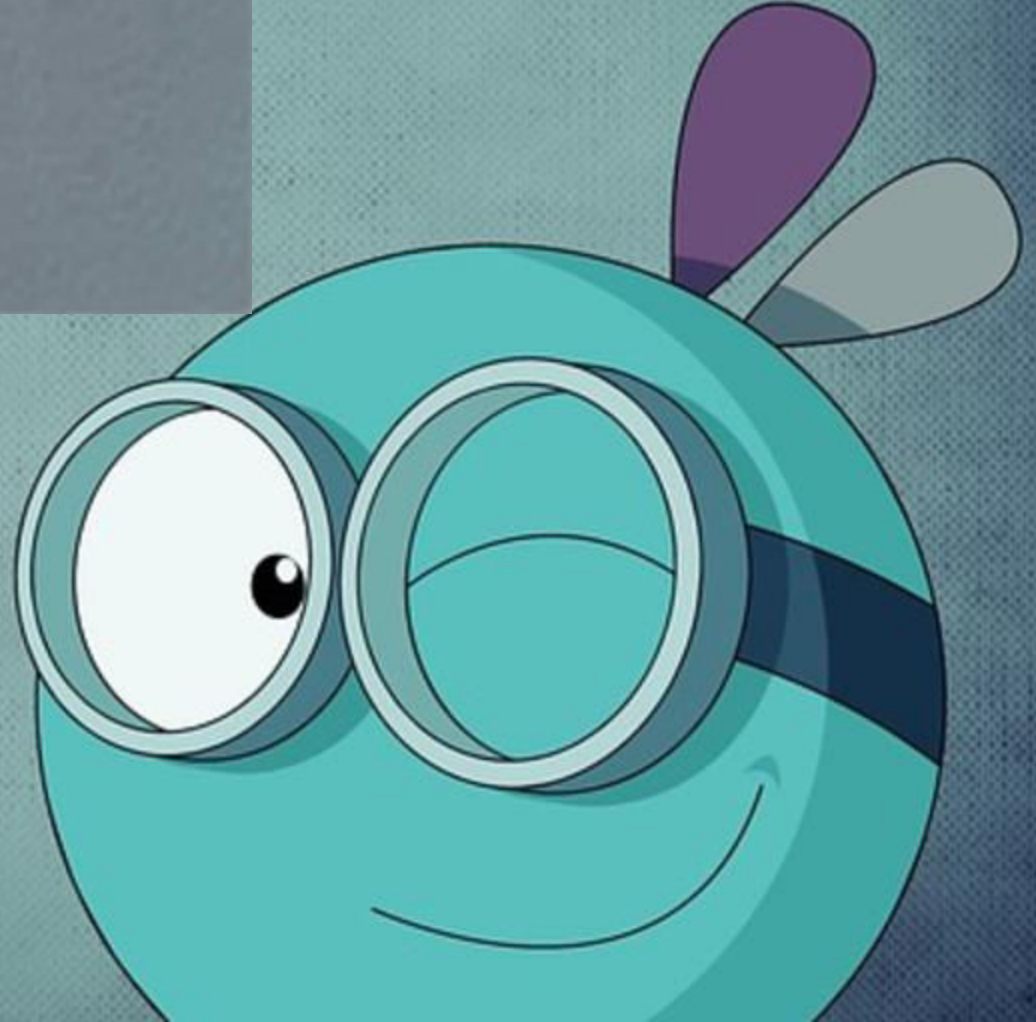




Şeffaf örnekler
3D görüntü.



Suda yaşıyan tek hücreli canlılar, doku kültür smearları gibi canlı biyolojik örneklerin üç boyutlu incelenmesini sağlar. Faz kontrast mikroskopundan modifiye edilmiştir.



Mikroskop türleri

Gözle ayırt edilen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Aydınlık alan mikroskobu** ↘
2. **Karanlık alan mikroskobu** ↘
3. **Faz kontrast mikroskobu** ↘
4. **Polarizasyon mikroskobu** ↘
5. **İnterferens mikroskobu** ↘
6. **İnvert mikroskobu**

Gözle görülmeyen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Ultraviyole mikroskobu**
2. **Fluoresan mikroskobu**
3. **Konfokal mikroskobu**
4. **Elektron mikroskoplar**

İNVERT MİKROSKOP

- Normal ışık mikroskobu yapısında, ancak objektifleri bir mikroskop tablası altına yerleştirilmiş, özellikle bir hücre kültürlerini incelemeye elverişli bir mikroskop.



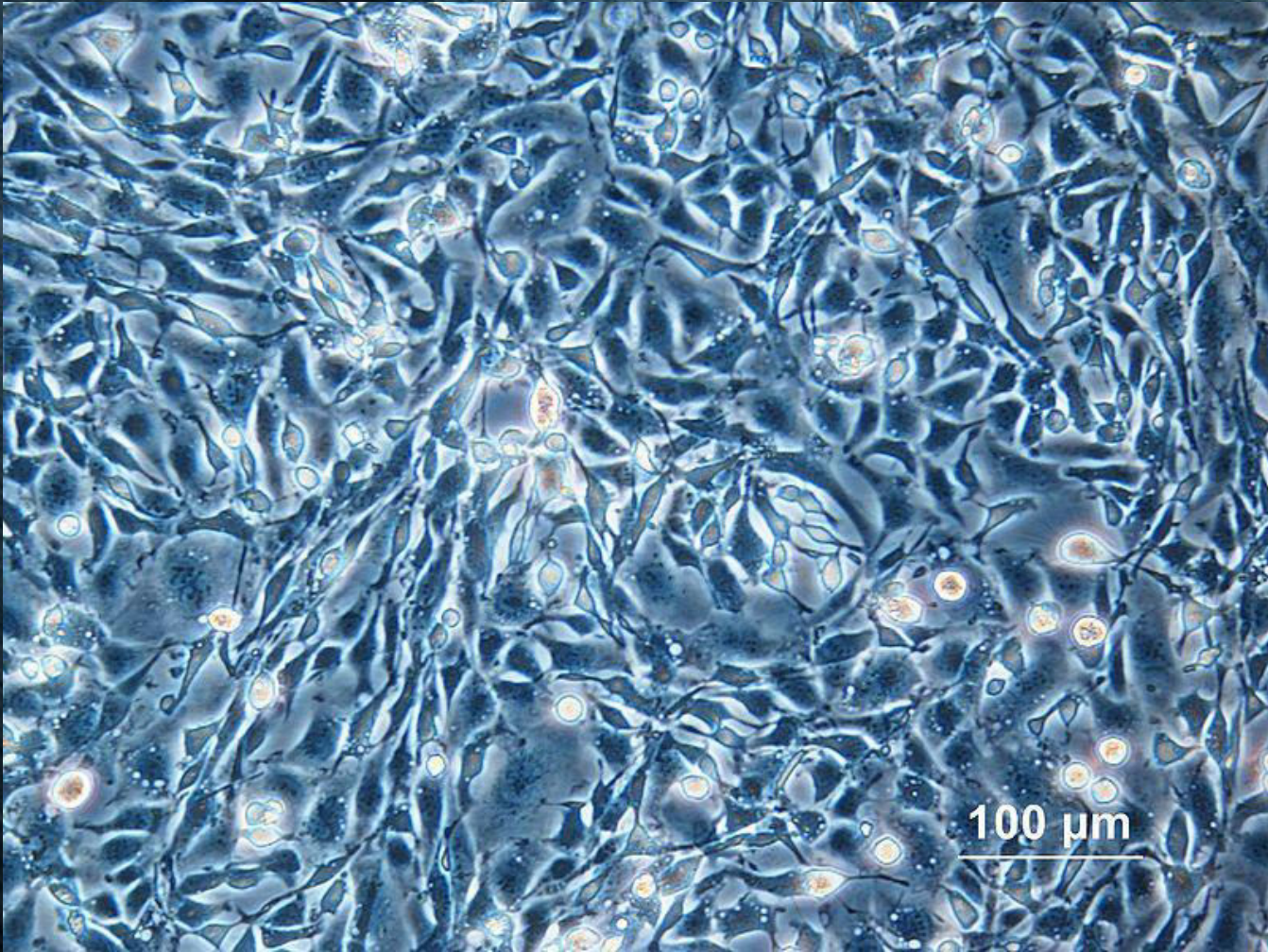
- Tersine mikroskop
- Işık kaynağı, kondansör üstte
- Örnek, objektif altta
- Canlı hücre ve doku inceleme



INVERTED MİKROSKOP

- Doku–Hücre kültürleri, IVF (Mikroenjeksiyon) ünitelerinde kullanılır.
- Petri kapları, Flaskler, Kültür şişelerinin kullanılabilmesine uygun
- Numune mesafesine sahiptir.
- Toplam büyütme Max. 400x civarındadır.
- Genelde faz kontrast tiptedir.





Mikroskop türleri

Gözle ayırt edilen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Aydınlık alan mikroskobu** ↘
2. **Karanlık alan mikroskobu** ↘
3. **Faz kontrast mikroskobu** ↘
4. **Polarizasyon mikroskobu** ↘
5. **İnterferens mikroskobu** ↘
6. **İnvert mikroskobu** ↘

Gözle görülmeyen ışınların kullanıldığı mikroskop türleri

1. **Ultraviyole mikroskobu**
2. **Fluoresan mikroskobu**
3. **Konfokal mikroskobu**
4. **Elektron mikroskoplar**



*"Hiç bir şeye ihtiyacımız yok,
yalnız bir şeye ihtiyacımız vardır,
çalışkan olmak!"*

K. Atatürk

