

ELEKTRON MİKROSKOP VE KULLANMASI

Doç. Dr. Turan GÖKSAN

Tabiat insanlara beş duyu ile yetinmemiş o teçhizatı daha mükemmelleştirecek akıl ve zekâyı da bahşetmiştir. Bu sayede bir takım cihazların yapılması mümkün olmuş ve bu suretle ilim ve teknik bugünkü seviyesine ulaşmıştır.

Gözün görme kudreti kifayetsizliğinden doğan eksiklikleri gidermek üzere ilk defa lup bulunmuş, önceleri statifsiz, sonraları statif ile kullanmak suretiyle görülebilen, numuneleri 6-10 defa büyötmek ve biraz daha tafsîlâtla incelemek mümkün olmuştur (Romeis, 1948). Ancak bu pek küçük ihtiyaca cevap veriyordu. Yapılan devamlı çalışmalar sonunda 1665 de Hook basit bir mikroskop imâl etmiş, 1673-1716 senelerinde de Van Leeuwenhoek bugünkü anlamıyla mikroskobu istimal sahasına ve ilmin hizmetine tahsis etmişti (Greep, R.O. 1954). Bu cihaz zamanımıza kadar muhtelif tekâmül safhalarından geçerek, polarizasyon, karanlık saha, ultraviolet, faz kontrast ve stereo mikroskoplarının bulunması suretiyle ilmin muhtelif şubelerinin ilerlemesine ve araştırmacıların görme kudretinin artmasına hizmet etmiştir. Bu mikroskopların da arzu edilen her şeyi görmemesi adeseletin kifayetsizliğinden ziyade görmeye yarayan ışın dalgalarının uzunluğundan ileri geliyordu. Günlük hayatımızda kullandığımız ışın dalgalarının uzunluğu 0.4-0.7 mikrondur (Auger, P. 1945). Görölmesini arzu ettiğimiz nümune, kullandığımız ışın dalgalarının yarısından küçük olmamalıdır (Wyckoff, 1949). Daha küçük cisimler gözle görülen ışığı kâfi derecede örtemeyeceğinden adese, cismin mükabil kenarlarından geçen ışın demetlerini ayıramıyacaktır (Spektrum, 1958). Bu hale göre ışık mikroskobu ile azamî 0.2 mikron büyüklüğünde cisimcikler görülebilecektir.

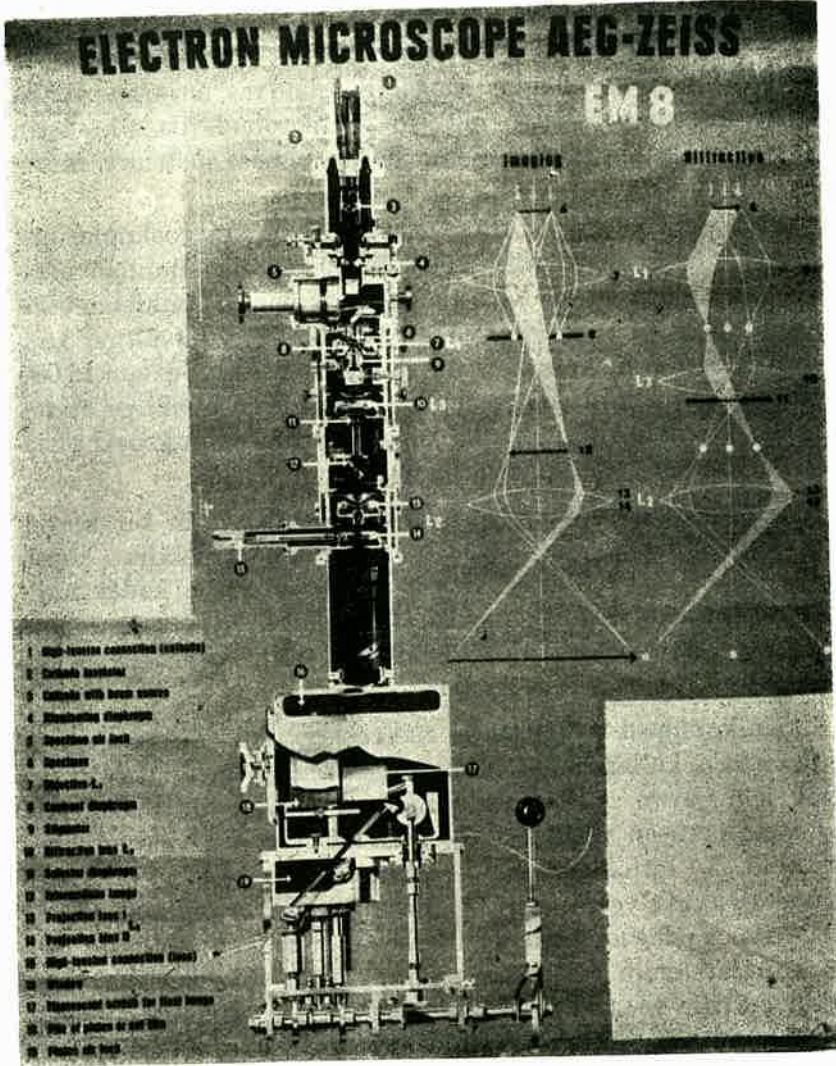
Konumuzu histoloji sahasına teksif edince, eskidenberi ışık mikroskobu ile görülen bazı teşekküllerin bünyesi tama-

miyle meçhul bulunuyordu. Histoloji sahasında durum böyle olduğu gibi tıp ve biyolojinin diğer dalları da bundan farklı değildi. Virusların mevcudiyeti biliniyor, fakat şekilleri, hele bünyeleri bilinmiyordu. İşte bu ihtiyaçlar karşısında, daha kısa dalgalar aranmasına lüzum hasıl olmuştur. Her ne kadar tabiatda mevcut kozmik ışınlar 0.0001 A ,gamma ışınlarıysa 0.01 - 1.4 A uzunluğunda ise de birinciler atmosfere varmamakta, stratosferin su buharı tarafından tutulmakta, atmosfere varsalar da bunların hayatla telifi kabil görülmemektedir. Çünkü dalga boyu kısalдықça kinetik enerji artmakta ve hayat tehlikeleri de buna paralel olarak çoğalmaktadır (Kovacs, R. 1949). Gamma ışınları radioaktif madenlerin bulunduğu bazı bölgelerde bulunmakta, hayat için önemli tehlikeler doğurmaktadır. Bazı maden ocaklarında çalışan işçilerin akciğer kanserine fazla müptelâ olmaları bu sebeptendir. 0.06-1000 Angström uzunluğunda olan röntgen ışınları, nötronlar, elektronların elektrik hamulesi yüksek ve sür'atleri çok fazladır. Bunları cam adeselerden geçirmek suretiyle mihrak teşkil etmek mümkün değildir. Fakat elektronlar vakum altında elektrik alanları teşkil etmek suretiyle kolayca kontrol altına alınabilir. İşte bu esastan elektron mikroskop fikri doğmuştur.

Tarihçe : Bu teoriyi ilk defa 1924 de de Brogli ortaya atmış, 1926 da Busch tarafından pratiğe intikal ettirilmiştir (Schluge, H. 1959). İlk elektron mikroskop 1931 de Knoll ve Ruska tarafından yapılmıştı. Bundan sonra 1934 de Borries ve Ruska Siemens firması tarafından ticaret sahasına sevk edilen elektron mikroskopu imâl etti. 1934 de Belçika'da Morton'un yaptığı elektron mikroskop ilk defa tıpta ve bakterilerin incelenmesinde kullanıldı. Bundan sonra, Amerika'da R.C.A., Hollanda'da Philips firmaları elektron mikroskop imâl etmeğe muvaffak olmuşlardır. Bundan maada Fransa, İngiltere, İsviçre, Rusya ve diğer bazı memleketlerde muhtelif firmalar tarafından elektron mikroskoplar imâl edilmiştir (Gürtürk, 1956; Mahl, 1951; Reimer, 1959).

Halen kullanılan elektron mikroskoplar ya elektro-statik veya elektro-magnetiktir. AEG Zeiss firmasının mamûlu olan elektron mikroskop elektro-statiktir. İsviçre'de bir firma (Trüb ve Tauber) elektro-statik ve magnetik adeseleri aynı

cihazda birleştirmek suretiyle bir elektron mikroskop yapma-
ğa muvaffak olmuştur. Bunlardan gayrı bütün cihazlar elek-
tro-magnetiktir (Reimer, 1959). Enstitümüzde bulunan cihaz
AEG Zeiss firmasının elektro-statik mikroskobudur (Re-
sim : 1).



Resim : 1 AEG-Zeiss Elektron mikroskobunun kesiti

Prensibi : Elektron mikroskoplar takriben 40,100 KW ce-
reyana tahammül ederler. Işık menbaı katod olarak kullanı-

lan Wolfram teli, Wehnelt silindiri ve anoddan ibarettir. Buradan çıkan ışınları vakum altında özel bir kondansatörden geçirdikten sonra, obje üzerinde teksif etmek ve muhtelif elektriki sahalar teşkil eden madenî adeselerden geçirdikten sonra ekran üzerinde objenin moleküllerinin şeklini veya ekran yerine konan fotoğraf plâğı üzerinde resmini almak esasına dayanmaktadır.

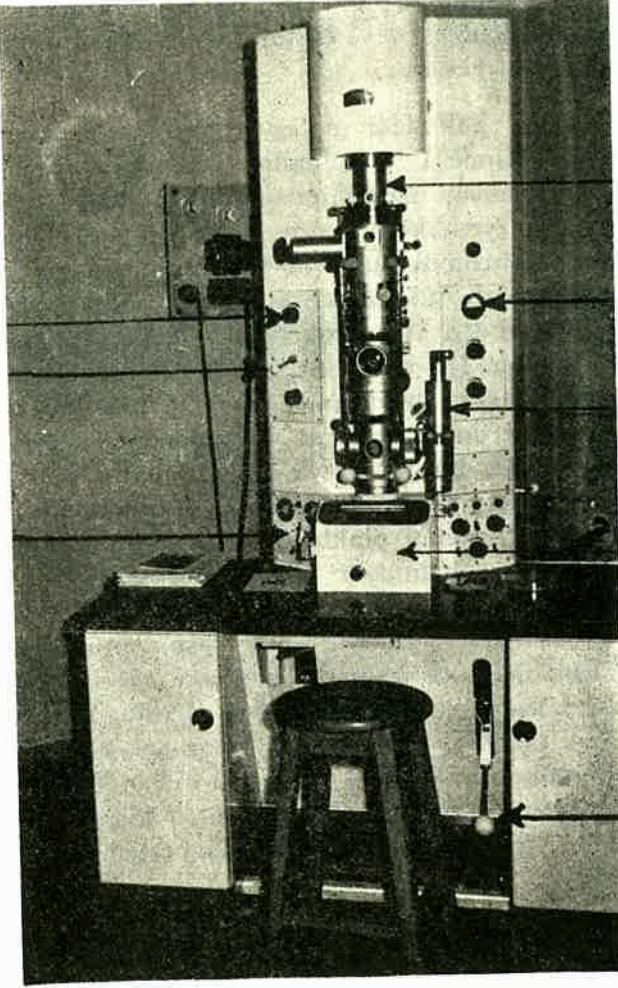
Elektro-statik olanlar magnetik olanlara nazaran daha küçük cereyanla çalıştığı gibi, magnetik olanlarda adeselerin daha çok ısınmasından objenin harap olması mahzuru nisbeten giderilmiştir.

Büyütme kudreti: AEG Zeiss elektron mikroskoplarının normal büyültmeleri 1.500, 5.000 15.000 defadır. Bundan maa- da cihaza ilâve edilen ve ışık mikroskobunda bulunan okülere karşılık bir okülerle yukarıda zikredilen büyültme kudretini 20 defa daha artırmak mümkündür. Resimde azamî 15.000 defa büyütülmüş olarak alınmakta, daha fazla büyütme agrandizörle mümkün olmaktadır .Diğer firmaların mikroskoplarının büyültmeleri de bu civardadır.

Bahsi geçen büyültmeleri cihazdaki adeselerin bir kısmının kullanılmaması ve elektrik irtibatında değişiklik yapılması suretiyle küçültmek ve 800, 2.500 ve 800 e kadar indirilmesi mümkündür. Bunlardan ayrı olarak ziya mikroskopları gibi, 200 ve 600 defa gibi hafif büyültmelerle incelemele- re imkân veren tertibat vardır.

Kullanılması : Elcktron mikroskop ışık mikroskopları gibi hemen kullanılamaz. Cihazı kullanmağa hazır hale getirmek için yarım saatten fazla zamana ihtiyaç vardır. Bu da 1/ âlete cereyan verilmesi, 2/ hazırlayıcı ve ön vakumun teşekkülü, 3/ diffüziyon pompasının ısınması, 4/ hakikî vakumun teşekkülü ve nihayet 5/ cihazda bulunan yüksek voltaj ağlarının ve diğer yardımcı merkezlerin ısınması içindir. Bütün bunlar temin edildikten sonra, evvelâ yüksek voltaj düşmesi çevrilir ve arkasından katoda ceryan vermek suretiyle 50.000 voltluk yüksek tevettür sayesinde ekran üzerine cismin moleküllerinin hayali düşmüş bulunur. Bu kadar yüksek ceryan yakında bulunanlara zarar vereceğinden cihazın arka tarafına ve kapalı bulundurulmuş kısımla yerleştirilmek suretiyle kullananların korunması sağlanmıştır.

Cihaz bir yazı masasıyla irtibatta olarak monte edilmiş önde vakum altında çalışan ışık menbaı ve madenî adeseleri ihtiva eden bir tüp, ekran veya ekran yerine konan fotoğraf plâkları, gerisinde yüksek tevettür cihaz ve ağırlarıyla bunlardan ayrı olarak vakum temin eden iki pombadan ibarettir. (Resim 2).



Resim : 2 Sağ yukarıdan aşağıya; 1 — Katod mahfazası, 2 — Yüksek tevettür müşiri, 3 — Oküler, 4 — Fotoğraf plâkları ve yanında resmin aksettiği ekran, 5 — Fotoğraf plâklarının dışarıya alınmasını sağlayan kol, sol yukarıdan aşağıya, 6 — Elektrik cereyanını ayarlayan düğme, 7 — Hareketli ile çeşitli büyütmeleeri sağlayan kol, 8 — Sol frontal plâkta vakum müşirleri, difüzyon pompası, yüksek cereyan ve katod düğmeleri.

Kullanma sahaları : Mikrobiyolojide, günbegün artan bir tempo ile tıpta olduğu kadar sanayide de mühimdir, sanayide maden halita ve kristallerinin, oksit zerrelere incelemlerinde, plâstik, dokuma ve kauçuk sanayiinde istifade edilmektedir.

Teknoloji: Tıpta süspansiyon halinde bulunan maddelerin direkt incelenmesi veya histoloji ve histopatolojide kesitler yapmak suretiyle olur.

Süspansiyon halindeki materyeli incelemek için evvelâ cam lâmlar üzerinde 1 % kollodion veya daha iyisi chloroformda 3 % formvar mahlûlünden filmler hazırlanır. Bunlar küçük karelere ayırdıktan sonra, Petri kutusuna doldurulan destile suya daldırılmak suretiyle filimlerin lamdan ayrılması temin edilir. Kare şeklindeki bu küçük film parçacıkları destile su yüzeyinden avlanarak cihazın kendi lâmları üzerine konur. Lamlar 1/2 cm. kutrunda 1/2-1 mm. kalınlığında bronzdan yapılmıştır. Ortalarında bir çukurluk ve 1 mm. kutrunda açıklık vardır. Burası da takriben 50 kareye bölünecek şekilde küçük bir tel ağ ile kapatılmıştır. İşte formvar veya kollodion ışık mikroskoplari için kullanılan lamlara karşılık filimden mamûl plâklardır. Kuruduktan sonra üzerlerine süspansiyon halindeki incelencek materyel konur. Üzerinde film yapılmış cam lamlar bakteri kolonileri üstüne bastırılmak suretiyle bir kısım mikrop organizmanın film üzerinde kalması sağlanır. Doku kültürleri için de aynı hazırlık yapılır. Bakteri ve viruslar santrifugasyondan sonra izotoniye temin için biraz şekerli suyla film üzerine alınabilir. İncelencek materyel hidrofor ise filin üzerine 0.1 % serum albumin solüsyonundan küçük bir damla koymak suretiyle incelenir. Bu usul tababetten ziyade sanayide kullanılır.

Fikzasyon : Dokuların bozulmadan incelenmesi için fikzasyona tâbi tutulmaları lâzımdır. Bunun için de en iyi metod osmium asidi ile yapılandır. Adı geçen fikzâtörün dokulara nüfuz kabiliyeti az olduğundan, hassas dokular sür'atle bozulurlar. Bu sebepten başka tesbit solüsyonları aranmış olduğu gibi osmium fikzasyon metodunda da değişiklikler yapılmıştır. Bunlardan birisi osmium solüsyonunda bırakılan

parçaların buz dolabında muhafaza edilmesine ve düşük ıharette bozulmanın daha yavaş olacağı esasına dayanır. Bundan başka, potassium permanganat, bichromate de potasse ve formolden de istifade düşünülmüştür. Formalin ile yapılan fikzasyonlarda kristaller aldatici sonuçlar verdiğiinden terkedilmiştir.

Fikzasyondan sonra ışık mikroskoplariyle incelenecek objeler için parafine yatırma usulü burada mahzurludur. Çünkü parafine yatırılmış bloklardan bir mikrondan ince kesitler elde etmek mümkün olmadığı gibi, bu maddenin kırışma ve katlanmaları da artefaktlara sebep olur. Bu sebepten en uygunu methacrylate'a yatırmaktır.

Kesit yapma : Mutad mikrotomlar gayet ince spiral yivleri bulunan yatık, şakuli ve kızaklı mikrotomlardır. Bunlarla en ince 1 mikron, ıslah edilmiş olanlariyle 0.2 mikron kalınlığında kesitler elde edilir. Fakat bu kalınlık da elektron mikroskop için incelemeye elverişli olmadığından, çünkü elektronların nüfuz kabiliyeti azdır. (Ham 1953), daha yüksek kabiliyetli mikrotomların bulunması icabetmiştir. Bunlar ultra mikrotomlardır. Bu cihazlarla 100-1000 Angström kalınlığında kesitler elde edilir. Bunlar yivli değildir. Blok uzun ve elektrikle ısınan bir madenî çubuk ucuna tesbit edilerek kesilir. Kesmek için çelik, cam ve elmas bıçaklar kullanılır. Çelik bıçaklar kullandığımız traş bıçaklarına benzer. Camdan olanlar 4-6 mm. kalınlığındaki camların 45 derecelik açı ile kırılması suretiyle elde edilir. Elmas bıçaklar hepsinden daha elverişli olup ince ve güzel kesitler yapmak imkânını sağlar. Bu şekilde elde edilen kesitler veya kurutulmuş kolloidal dispers sistemler elektron mikroskopta incelenmeden evvel, ağır madenler (Platin, altın, gümüş) ile üzerlerine takriben 50 Angström kalınlığında bir tabaka teşkil etmek üzere gölgelendirilir. Bu hem elektronlar karşısında kontrastı temin eder, hem de numunelerin tahrip edilmelerinin önüne geçer ve görüş daha emniyetli olur.

Şimdiye kadar bahsettiğimiz muamelelerden geçen parçaların incelenmesiyle ışık mikroskopunda görülmeyen bir çok ince yapılar elektron mikroskopta görülmekte ve bildiğimiz nice hakikatlar meydan çıkmaktadır. Meselâ, kas-

lardan yalnız iskelet kası ile kalp kasının enine çizgili bulunduğu kollagen tellerin ve düz kasların ise uzunluğuna bir takım telciklerden ibaret bulunduğu zannedilirdi. Elektron mikroskop ile sonuncuların da enine çizgiler gösterdiği, bu çizgilerin myoflament'lerden ibaret bulunduğu, çizgili kaslarda bunların 22.000, kollagen tellerin 640 düz kasların 145 Angström uzunluğunda bulunduğu tesbit edilmiştir. (Romeis, 1957).

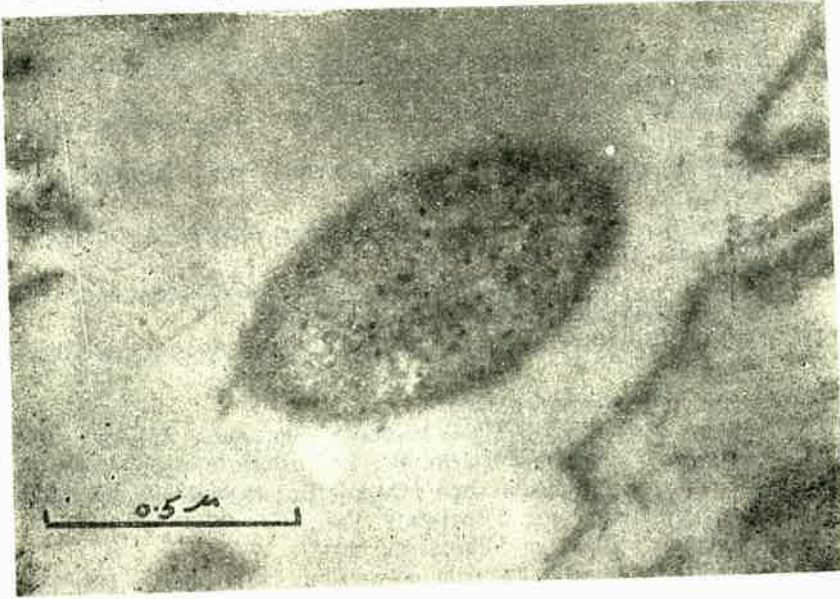
Normal bir karaciğer hücresinde 2.000 kadar mitochondrium vardır. Işık mikroskopu ile bunların çomak, bileyi taşı veya granül şeklinde olduğu, elektron mikroskopta bunların çift duvarlı ve içinde bir takım bölmelerin bulunduğu anlaşılmıştır. (Resim 3).



Resim : 3 Pankreas hücresinde longitudinal, oblik ve enine üç mitochondrium kesiti (Maximow-Bloom: G. Palade'dan)

Böbrek üstü bezi medulla'sından, chrom tuzları, osmium tetroxyde ve amonyaklı gümüş nitratla redükte edilen hücrelerin sitoplazmalarında adrenalin veya catechol amine gurbundan olduğu sanılan chromaffin granuların elektron mikroskop incelenmelerinde bunların da mitochondrium'lar gibi fakat onlardan tamamıyla ayrı 175 Angström büyüklüğünde bir takım organeller olduğunu meydana çıkarmıştır. (Ejöst-rand ve Wetzstein, 1956).

Mastocyt'lerin sitoplasması metakromatik granularla tıkabasa dolu olduğu biliniyordu. Elektron mikroskopa herbir granulanın müteaddit ve daha küçük teşekküllerden ibaret bulunduğu tesbit edilmiştir (Köksal, 1953. Resim 4)



Resim : 4 Bir mastocyte granulasının kesiti.

Bundan maada, tıbbın diğer sahalarında, mikrobioloji de, immünolojide ve patolojide de elektron mikroskoptan çok faydalanılmaktadır. Işık mikroskopyu ile interkapiller glomerulosklerozlu böbreklerde ilk zamanlarda tesbit edilemeyen interkapillar hiyalin birikmesinin, elektron mikroskopya incelemede çok evvelden başladığı, ilk lezyonun bazal membran kalınlaşmasıyla kendini gösterdiği, hiyalin maddenin

inter deęil intrakapillar olduğu, biriken maddenin endotel hücrelerine gitmek suretiyle glomerul kapillerinde obliterasyon husule getirdięini göstermiřtir. (Farquhar, et al. 1959).

L İ T E R A T    R

1. **Auger, P.:** What are cosmic rays. University of Chicago Press, Chicago, (1945).
2. **Farquhar, M. G. et al.** Diabetic glomerulo - selorosis; electron and light microscopy. A. J. Path. Vol. 35, No. 4 (1959).
3. **Greep, R. O.:** Histology. Blakiston Comp. New York, (1954).
4. **G  rt  rk, S.:** Elektron mikroskop. Ankara Üniversitesi Basımevi (1956).
5. **Ham, A. W.:** Histology. II. bası,   .B. Lippincot Comp. Montreal, (1953).
6. **Kovacs, R. K.:** Electrotherapy and light therapy. Lea and Febiger, Philadelphia, (1949).
7. **Köksal, M.:** Doku mast h  creleri hakkında. Acta Medica Turcica, Vol. 5, No. 3-4, (1953).
8. **Mahl, H., G  lz, E.:** Elektronenmikroskopie. Veb Bibliographisches Institut, Leipzig, (1951).
9. **Payzın, S.:** Riketsiya ve virus hastalıkları. Güney Mat. Gazetecilik T.A.O., Ankara, (1952).
10. **Reimer, L.:** Elektronenmikroskopische Untersuchungs und Pr  parationsmethoden. Springer Verlag, (1959).
11. **Romeis, B.:** Mikroskopische Technik. Leibniz Verlag, München, (1948).
12. ————Ders Notları, (1957).
13. **Schluge, H.:** Histoloji Enstit  s  ndeki Konferanst. Ankara, (1959)
14. **Sjöstrand, F. S. ve Wetzstein, R.:** Elektronenmikroskopische Untersuchung der ph  ochromen (chromaffin) granula in den Markzellen der Nebenniere. Experienta, Vol. 12/5, (1956).
15. **Spektrum :** Elektron Mikroskop, (1958).
16. **Wyckoff, R. W. G.:** Electron microscopy. Interscience publisher, New York, (1949).