

150366

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İZOLE HÜCRELERİN TARAMALI ELEKTRON
MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ İÇİN HAZIRLAMA
YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Bio. Burcu Emine TEFON

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Alp CAN

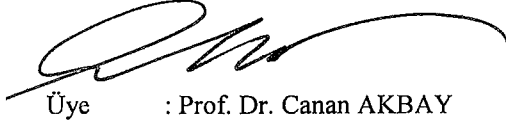
**ANKARA
2004**

150366

Profesör Doktor. Alp CAN danışmanlığında, Burcu Emine TEFON tarafından hazırlanan bu çalışma 3.11.2004 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

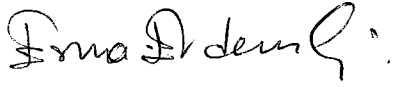
Başkan : Prof. Dr. Alp CAN

İmza: 


Üye : Prof. Dr. Canan AKBAY

İmza:

Üye : Prof. Dr. Esra ERDEMLİ

İmza: 

Üye : Prof. Dr. Serdar DİKER

İmza:



Üye : Doç. Dr. Cengiz SANCAK

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım

İmza:.....


Profesör Doktor Nejat AKAR
Enstitü Müdürü

İzole Hücrelerin Taramalı Elektron Mikroskopunda İncelenmesi İçin Hazırlama Yöntemlerinin Geliştirilmesi

ÖZET

Bu çalışmada izole hücrelerin taramalı elektron mikroskopunda incelenebilmesi için hazırlama yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlandı. İzole hücreler olarak kan hücreleri kültür hücreleri, ovositler ve spermatozoonlar kullanıldı. Bu hücreler Trump's çözeltisi, Karnowsky çözeltisi ve gluteraldehit+sodyum fosfat tamponu ile değişen zaman uzunluklarında fiske edildi. Ardından hücreler osmiyum tetraoksit+fosfat tamponunda değişen sürelerde ikinci kez fiske edildi. Postfikse edilen hücreler aseton ya da etanol kullanılarak dehidrate edildi. Hücreler, kritik nokta kurutucusunda (CPD) ya da havada kurutma yöntemiyle kurutuldu. Kurutulan hücreler değişik kalınlıklarda altın-paladyum (Au-Pd) ile kaplandı ve SEM'de sekonder elektron dedektörü kullanılarak incelendi.

Uygulanan bu kimyasal ve mekanik işlemler sırasında hücrelerin yüzey yapılarının ne kadar korunduğu ve hücre kaybının olup olmadığı araştırıldı.

Sonuç olarak Trump's fiksatifinin bütün hücreler için uygun fiksatif olduğuna karar verildi. Fiksasyon süreleri hücrelere göre 30dk ile 24 saat aralığında değişik uzunluklarda tutuldu. Kültür hücreleri ve ovositler postfikse edildiğinde daha iyi sonuç alınırken kan hücrelerinde ve spermatozoonlarda postfiksasyona gerek duyulmadı. Tek hücrelerin hepsinin, kurutma aşamasını kolaylaştıran ve yüzey gerilimini en aza indiren etanolün artan derişimlerinde 10-15dk arasında dehidrate edilmesine karar verildi. Kan hücreleri dışında bütün hücreler CPD'de üç kez yıkanarak kurutuldu. Daha sonra hücreler yüzey yapılarına ve büyüklüklerine göre 10-15nm kalınlığında Au-Pd ile kaplandılar.

Yukardaki işlemlerin uygulanması halinde yapılan çalışmalarda yüzeye tutunma probleminin ortadan kalktığı, hücre kaybının olmadığı ve yüzey yapılarının iyi korunduğu görüldü.

Anahtar Sözcükler: kan hücreleri, kültür hücreleri, ovosit, preparasyon, spermatozoon, taramalı elektron mikroskobu

Development of Preparation Methods For Examining Single Cells In Scanning Electron Microscope

ABSTRACT

In this study we aimed to develop preparation methods for examining single cells for scanning electron microscopical detection. Blood cells, culture cells, oocytes and spermatozoons were used as single cells.

These cells were fixed for different time periods with Trump's solution, Karnowsky solution and glutaraldehyde+sodium phosphate buffer. Then the cells were fixed for different time periods with osmium tetroxide+ sodium phosphate buffer. The cells which were postfixed were then dehydrated by using acetone or ethanol. The cells were dried using critical point dryer (CPD) or in air. Dried cells were coated with gold-palladium (Au-Pd) using a sputter coater in different thickness and examined in scanning electron microscope using secondary electron detector. During the chemical and mechanical processes implemented, how good the surface structure of the cells were protected and whether there is cell loss or not have been investigated.

As a result, Trump's fixative appeared to be the most suitable fixative for all cells. Varying fixation periods tested from 30 minutes to 24 hours. When cultured cells and oocytes were postfixed, better results were taken however post-fixation is not so effective in blood cells and spermatozoa. It is concluded that all of the single cell preparations need have been dehydration using varying concentrations of ethanol, which facilitates the drying process and minimizes surface tension in 10-15 minutes. Furthermore, all cell preparations had to be coated with Au-Pd in 10–15nm thickness in order to preserve the surface ultrastructure.

In the condition that the mentioned procedures above have been implemented, it is concluded that the problem of implantation to surface has been disappeared, there has not been cell loss and the surface structures have been protected in good condition.

Conclusively, fixation, dehydration and drying processes used in isolated cell preparations vary due to the all type.

Key Words: blood cells, cultured cells, oocyte, preparation, scanning electron microscope, spermatozoon

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Taramalı elektron mikroskopunun geçmişi oldukça eski olmasına karşın örnek hazırlamaya ilişkin yapılan çalışmalara pek sık rastlanmamaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte kullanım alanı oldukça genişleyen taramalı elektron mikroskobu hücre, doku ve organların incelenmesinde kullanılmakta ve bunun için teknikler geliştirilmektedir. Bu çalışma izole hücreler gibi hazırlanması oldukça zor olan örneklerin taramalı elektron mikroskopunda incelenmesi için hazırlama yöntemlerinin geliştirilmesini amaçlamaktadır ve Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü tarafından 2001 K 120240 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Bana araştırma olanağı sağlayan ve beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof.Dr. Alp CAN'a (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi), Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Canan AKBAY'a ve tüm Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı hocalarına, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı asistanları; Dr. Özgür ÇINAR'a, Dr. Sinan ÖZKAVUKÇU'ya, Dr. Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU'na, Dr. Abdullah ŞEKER'e, Dr. Tuğba ZEYREK'e ve teknisyenimiz Remzi ATA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Burcu Emine TEFON
Ankara, Ekim 2004

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. Elektron Demeti - Örnek Etkileşimleri.....	2
2.1.1. Geri Yansıyan Elektronlar.....	2
2.1.2. İkincil Elektronlar.....	2
2.1.3 X-Işını Demeti.....	3
2.2. Taramalı Elektron Mikroskopunun Temel Yapısı ve Çalışma Prensibi.....	3
2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopunun Temel Yapısı.....	4
2.2.2. Taramalı Elektron Mikroskopunun Çalışma Prensibi.....	7
2.7. Taramalı Elektron Mikroskobu Çeşitleri.....	8
2.7.1. Kriyo-SEM.....	8
2.7.2. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu.....	8
2.3. Elektron Mikroskopunda Görüntü Almada Değişkenler.....	9
2.3.1. Hızlandırılmış Akım.....	9
2.3.2. Gölgeleme.....	10
2.3.3. Örnek Eğimi.....	11
2.3.4. Geri Yansıyan Elektronlar.....	11
2.3.5. Örneğin Yüklmesi.....	12
2.3.6. Örneğin Örselenmesi.....	12
2.3.7. Kontaminasyon.....	13
2.3.8. Çalışma Aralığı.....	13
2.3.9. Sayısal Açıklık.....	14
2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu İçin Doku Hazırlama Yöntemleri.....	16
2.4.1. Tespit (Fiksasyon).....	16
2.4.2. Suyunu Giderme (Dehidrasyon).....	19
2.4.3. Kurutma.....	19
2.4.4. Kaplama.....	24
2.5. Doku Hazırlamada Fiziksel Yöntemler.....	28
2.5.1. Dondurma Yöntemi.....	29
2.5.2 Dondurma Kurutma Yöntemi.....	29

İÇİNDEKİLER

2.6. Doku Hazırlamada Kullanılan Özel Yöntemler.....	29
2.6.1 Işık Mikroskobu İçin Hazırlanan Dokuların SEM İçin Hazırlanması.....	29
2.6.2 Replikasyon.....	29
2.6.3 Dondurma Kırma Yöntemi.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Kültür Hücreleri.....	31
3.2. Kan Hücreleri.....	31
3.3. Spermatozoonlar.....	31
3.4. Ovositler.....	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Kültür Hücreleri.....	34
4.2. Kan Hücreleri.....	38
4.3. Spermatozoonlar.....	41
4.4. Ovositler.....	44
5. SONUÇ.....	49
6.KAYNAKLAR.....	53

SİMGELER DİZİNİ

Au	Altın
CO ₂	Karbon dioksit
CPD	Critical Point Dryer- Kritik Nokta Kurutucusu
EM	Elektron Mikroskobu
ESEM	Enviromental Scanning Electron Mikroscope- Çevresel Elektron Mikroskobu
GA	Gluteraldehit
H ₂ O	Su
Hg	Civa
Mag	Magnification-Büyütme
NA	Numerical Aperture- Sayısal Açıklık
NaH ₂ PO ₄	Sodyum dihidrojenfosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
Pd	Paladyum
PMT	Photo Multiplier Tube- Çoklayıcı Işın Tübü
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu
OMM	Oocyte Maturation Medium- Ovosit Olgunlaştırma Ortamı
OsO ₄	Osmiyum tetraoksit
WD	Working Distance- Çalışma Aralığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Örnekten yansıyan elektron demetleri.....	3
Şekil 2.2. Taramalı elektron mikroskobu.....	4
Şekil 2.3. Taramalı elektron mikroskobu yapısı.....	5
Şekil 2.4. Hızlandırılmış akımın görüntü almadaki diğer değişkenlerle ilişkisi.....	10
Şekil 2.5. Düzgün olmayan yüzeylerde elektronların yansıma şekilleri.....	11
Şekil 2.6. Geri yansıyan elektronlarla alınan damar içi görüntüsü.....	12
Şekil 2.7. Geri yansıyan elektronlarla alınan sünger görüntüsü.....	12
Şekil 2.8. Kümüls- ovosit kompleksi görüntüsü (WD=3mm).....	13
Şekil 2.9. Kümüls- ovosit kompleksi görüntüsü (WD=38mm).....	13
Şekil 2.10. Çalışma mesafesinin görüntü almadaki diğer değişkenlerle ilişkisi.....	14
Şekil 2.11. Sayısal açıklığın görüntü almadaki diğer değişkenlerle ilişkisi.....	15
Şekil 2.12. Kümüls- ovosit kompleksi görüntüsü (NA=30µm).....	15
Şekil 2.13. Kümüls- ovosit kompleksi görüntüsü (NA=50µm).....	15
Şekil 2.14. CO ₂ izotermalleri.....	20
Şekil 2.15. CO ₂ izotermalleri.....	23
Şekil 2.16. CPD odası ve tasarımı.....	23
Şekil 2.17. Kritik nokta kurutucusu.....	24
Şekil 2.18. Gazlı yük alışverişindeki akım karakteristikleri.....	25
Şekil 2.19. Saçarak kaplama cihazı.....	28
Şekil 2.20. Dondurma-kırma yöntemiyle hazırlanmış böbrek.....	30
Şekil 4.1. Yaşlı fibroblast	35
Şekil 4.2. Yaşlı fibroblast	35
Şekil 4.3. Yeteri kadar fiske edilmemiş Vero hücresi.....	35
Şekil 4.4. Mitozun anafazındaki Vero kültür hücreleri.....	37
Şekil 4.5. Yaşlanmaya başlamış olan Vero kültür hücresi etrafında hücrelerle çok sayıda temas yüzeyi gerçekleştirilmiştir	38
Şekil 4.6. Trombositler ve eritrositler.....	39
Şekil 4.7. Hipertonik fiksatifte eritrosit.....	40
Şekil 4.8. Eritrositler.....	40
Şekil 4.9. Eritrositler ve lökosit.....	41
Şekil 4.10. Filtre metoduyla hazırlanan spermatozoon görüntüleri.....	43
Şekil 4.11. Spermatozoonlar.....	43
Şekil 4.12. Küçük büyütmede alınmış spermatozoon görüntüsü.....	43
Şekil 4.13. 6 saat süren Trump's fiksasyonu nedeniyle örnekte kırılmalar.....	46
Şekil 4.14. Kümüls ovosit kompleksi.....	46
Şekil 4.15. Çıplak ovosit ve etrafında tek tük kümülüs hücresi.....	47
Şekil 4.16. Çıplak ovositin yüzeyi.....	47

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Kritik noktada kurutmada kullanılan maddelerin kritik sıcaklık ve basınçları.....	21
Tablo 2. Dehidrasyonda kullanılan sıvıların yüzey gerilim değerleri.....	22
Tablo 3. CPD için kullanılan geçiş sıvılarının kritik sıcaklık ve kritik basınç değerleri.....	22
Tablo 4. Kaplama cihazındaki parametreler.....	27
Tablo 5. İzole hücrelerin taramalı elektron mikroskopunda incelenmesi için bulunan standartlar.....	50
Tablo 6. Taramalı elektron mikroskopunda inceleme için hazırlanan böcek ve bitki preparatları için bulunan standartlar.....	51
Tablo 7. Taramalı elektron mikroskopuna hazırlanan akciğer ve böbrekte sıvı azotla dondurma kırma metodu kullanılarak bulunan sonuçlar.....	52



GİRİŞ

Elektron mikroskoplarının (EM) kullanılmaya başlaması 60 yıl öncesine dayanmaktadır. Bu mikroskopların keşfinin asıl sebebi ışık mikroskoplarından sağlanan görüntülemedeki sınırlamanın üstesinden gelmektir. Bu ise elektron mikroskoplarında elektronların kullanılmasıyla dalga boyunun 0,1nm'den daha aza düşürülmesi, böylece 0,5µm görünür dalga boyu ile görüntü almada ışık mikroskoplarının sınırlandırılmasının ortadan kaldırılması demektir.

EM'nin analiz yapmada kullanım alanlarının bu kadar geniş olması gelişimlerinin de hızlı olmasını sağlamıştır. Günümüzde EM iki ana grup altında incelenmektedirler: İlki olan taramalı elektron mikroskobu daha çok yüzey yapılarının incelenmesinde kullanılır, ikinci olan geçirmeli elektron mikroskobu örneklerin içyapılarının incelenmesinde kullanılır.

Taramalı elektron mikroskobu, kullanma amacına göre değişmekle birlikte genel olarak yüzey yapılarının incelenmesi sağlar. Görüntü örnek üzerine elektronların gönderilmesi ve örnekten yansıyan elektronların yakalanarak sayısal ortama aktarılmasıyla elde edilir. Taramalı elektron mikroskobunun, maddelerin topografik özelliklerini göstermek, element analizlerini yapabilmek, kimyasal kompozisyonları hakkında bilgi vermek gibi çok yönlü kullanım alanlarının olması özellikle yaşam bilimleri başta olmak üzere metalurji, kimya mühendisliği gibi pek çok alanda kullanımını zorunlu kılmaktadır.

Taramalı elektron mikroskobundan alınan görüntülerde çözünürlükteki ve alan derinliğindeki başarılı sonuçlar ışık mikroskobuyla kıyaslandığında büyük ses getirmiştir.

Taramalı elektron mikroskobunun kullanımının bu kadar fonksiyonel olması sonucu özellikle hücrelerin, dokuların ve organların incelenmesine önem verilmiş, örneklerin incelenmesi için hazırlık yöntemleri geliştirilmiş ve bu konularda birçok çalışma yapılmıştır. Ancak genel olarak bakıldığında izole hücreler olan kan hücreleri, spermatozoon, ovosit, kültür hücreleri gibi bağımsız olarak bulunan hücrelerin taramalı elektron mikroskobunda çalışılmasının ne kadar zor olduğu görülmektedir. Belli bir tutunacak dokuya gerek duymayan bu hücrelerin incelenme için hazırlanmaları aşamasında yüzey yapılarının bozulmadan korunması oldukça güçtür ve bu da yapılan çalışmalarda araştırmacıların önüne problem olarak çıkmaktadır.

Yapılan bu tez çalışmasında izole hücrelerin taramalı elektron mikroskobu için hazırlanma yöntemlerinin geliştirilmesini amaçlanmıştır. Çalışmamızın, bu tekniğin ilerlemesine ve yeni çalışmalara ışık tutmasına faydalı olacağını düşünüyoruz.

KURAMSAL TEMELLER

Genel bilgiler kısmında taramalı elektron mikroskobunun yapısı hakkında bilgi verilmiş, görüntü almadaki değişkenlerden ve dokular için uygulanan genel hazırlık işlemlerine de kısaca yer verilmiştir.

Genel bilgiler kısmında kullanılan mikrograflar Prof. Dr. Alp CAN ve Burcu Emine TEFON tarafından alınmıştır.

2.1. Elektron Demeti - Örnek Etkileşimleri

Herhangi bir cisim üzerine elektron demeti gönderildiğinde elektronların örneğe ulaştıktan sonra izleyecekleri iki yol vardır; elektronlar ya örneğe çarpıp geri yansır ya da örnekten geçerler. Örnekten geçen elektronlar geçirmeli elektron mikroskobinin konusudur. Taramalı elektron mikroskobunda inceleme, örnek üzerine gönderilen elektron demetinin (primer elektronlar) örnekten yansması sonucu oluşan elektronların kullanılması esasına dayanır. Primer elektronların örneğe penetre olması örneğin atomik numarasına, bombardıman sırasındaki enerji yoğunluğuna ve örneğin eğimine bağlıdır (Yanez ve Barbosa 2003). Işınlara ve örnek arasındaki etkileşim kullanılarak, farklı tür inceleme yöntemleri sayesinde örnek hakkında çok çeşitli bilgiler edinilebilir. Örneğin geçirmeli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope-TEM) örnekten alınan kesitten geçen elektronların farklı açılarla yayılmasından kaynaklanan kontrast bir görüntü oluşturur. Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM) ise yansıyan elektronları kullanarak görüntü oluşturur. Örnekten yansıyan elektronlar geri yansıyan elektronlar, ikincil elektronlar ve x-ışını demeti olmak üzere üç çeşittir ve hepsinin kullanımı farklı amaçlar içindir (Şekil 2.1.).

2.1.1. Geri yansıyan elektronlar (Backscattered electrons)

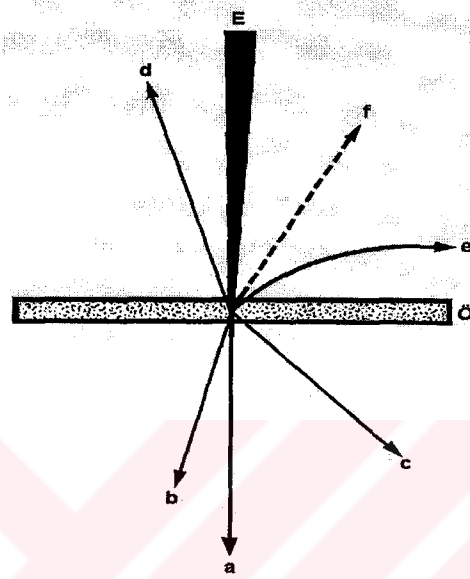
Gelen elektronlarla yansıyan elektronların enerji düzeyleri aynıdır yani bu elektronlar örneğe çarptıktan sonra enerjilerinden kaybetmeden geri yansır (Şekil 2.1.'de d). Bu elektronlar kullanılarak örnekteki kimyasal faz farklılıkları hakkında ve az da olsa örneğin topografisi hakkında bilgi edinilebilir.

2.1.2. İkincil elektronlar (Secondary electrons)

Bu elektronlar örnekteki bir atomun yüksek enerjili elektron demetini soğurması ve düşük enerjili bir elektron demeti yayması sonucu ortaya çıkan elektronlardır (Şekil 2.1.'de e), örnek üzerine gelen elektronun enerjisi yansıyan elektrondan daha fazladır. İkincil elektronlar SEM'de görüntü almada en sık kullanılan elektronlardır ve örneğin topografik resminin oluşmasını sağlarlar. Bu elektronların oluşturduğu sinyaller büyüklük, yayılım ve örneğin morfolojisi hakkında bilgi edinilir (Yanez ve Barbosa 2003). Bu tür sinyaller kinetik enerjileriyle sınırlıdır, örnek tarafından bütün elektronlar 50 kV'dan daha düşük bir enerji ile yansır (Goldstein et al. 1992).

2.1.3 X-Işını demeti

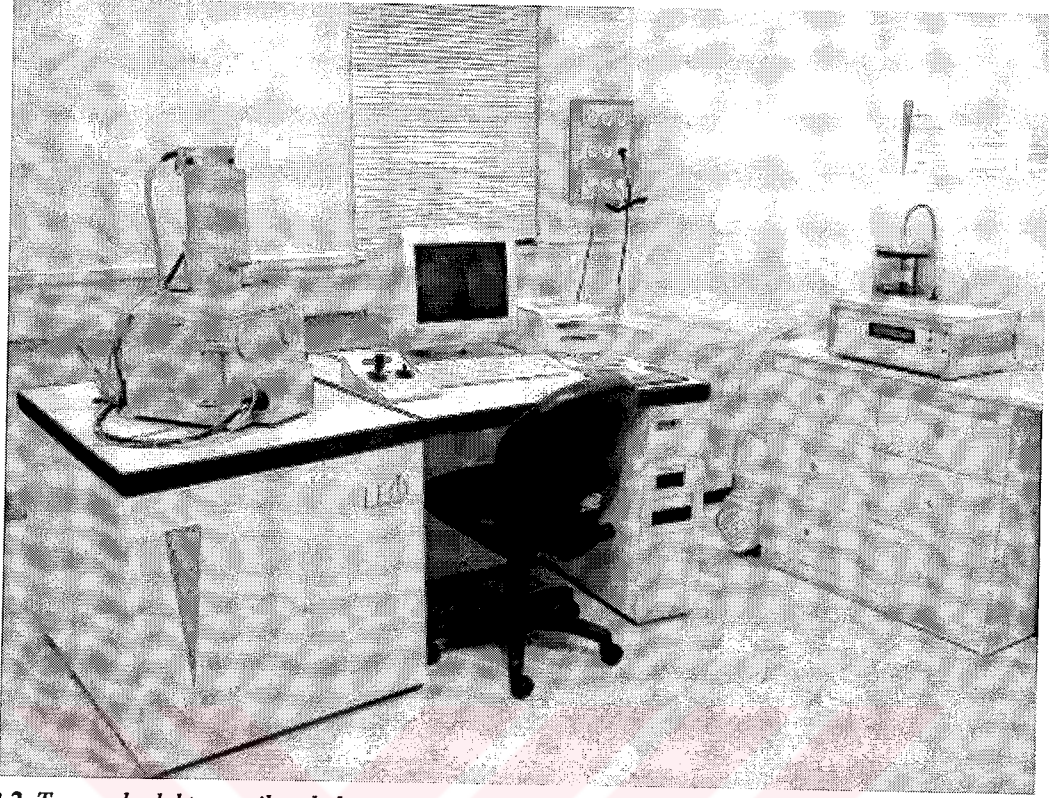
Gelen elektron demetinin örnekteki bir atomun iç yörüngelerinden bir elektron koparması ve bunun yerine dış yörüngelerden bir elektron geçmesi sonucu oluşan x-ışını demetidir (Şekil 2.1.'de f). Bu ışın yayılımıyla da örneğin elemental analizi yapılabilir.



Şekil 2.1. Örnekten yansıyan elektron demetleri: (E) primer-gelen elektronlar (d) geri yansıyan elektronlar, (e) ikincil elektronlar, (f) x-ışını yayımları

2.2. Taramalı Elektron Mikroskopunun Temel Yapısı ve Çalışma Prensibi

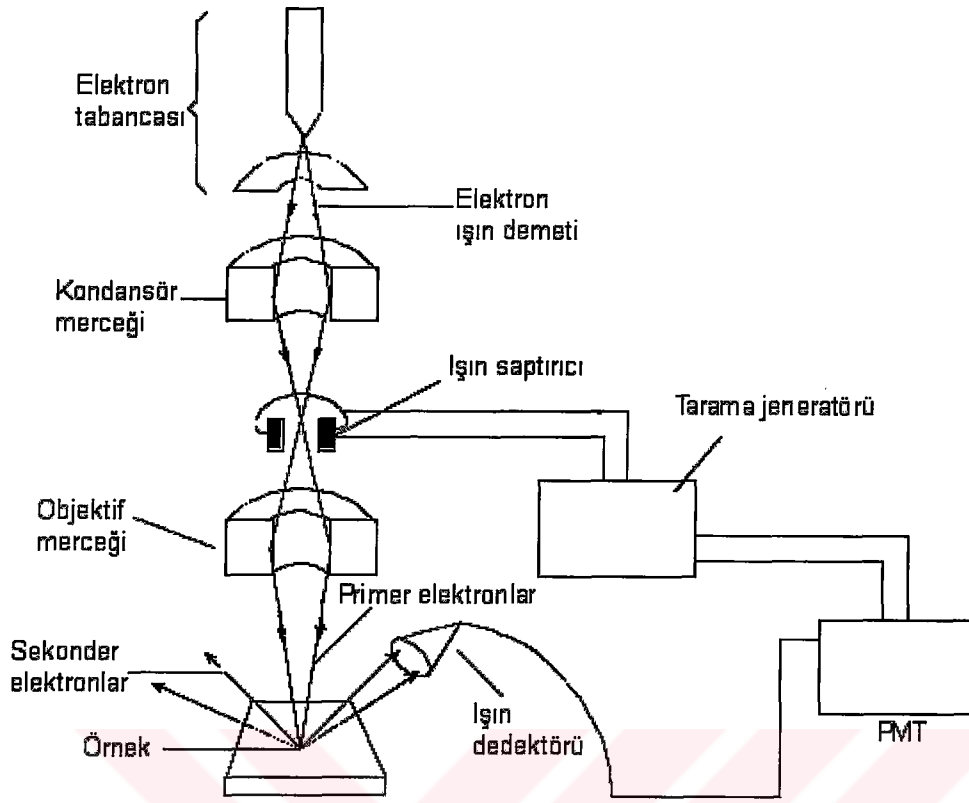
SEM'de görüntü oluşturma örnek üzerine gönderilen elektron demetinin örnekten yansması ve yansıyan sinyallerin algılanması esasına dayanır. SEM ile yapılan çalışmalarda elde edilen görüntüler üç boyutlu görüntülerdir. SEM tekniklerinin kullanılması görüntülerde mükemmel alan derinliğine ve üç boyutlu morfolojiyi tanımlamaya oldukça elverişlidir (Yanez ve Barbosa 2003).



Şekil 2.2. Taramalı elektron mikroskobu

2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskobunun Temel Yapısı

Elektron Tabancası: Kolonun en üst kısmında bulunur, elektron kaynağı olarak görev yapar. Isıtılan tungsten filamandan ayrılan elektronlar vakumlanmış kolon içinde anoda doğru hız kazanarak hareket ederler ve mikroskobun merkezinde yer alan kondansör merceğinden geçerler, böylece 1–30 kV arasında belli bir voltaj oluşması sağlanır (Chescoe ve Goodhew 1990). Burada yer alan özel bir aygıt aynı zamanda tabancayı terk edip örnek üzerine gönderilecek elektron sayısını kontrol eder.



Şekil 2.3 Taramalı elektron mikroskobu yapısı

Kondansör Merceği: Manyetik bobinlerden oluşurlar, modern mikroskoplardaki bütün mercekler aynı yöntemle çalışır. Mikroskobun eksenine paralel olacak şekilde elektromanyetik alan yaratırlar (Chescoe ve Goodhew 1990). Elektron tabancasından çıkan elektronları sıkıştırıp bir elektron demeti oluşmasını sağlarlar.

Işın Saptırıcı: Oluşan elektron ışın demeti ışın saptırıcı adı verilen manyetik bobinler tarafından saptırılır, böylece elektronların örnek üzerinde çizgiler şeklinde tarama yapması sağlanır.

Objektif Merceği: Elektron demetinin örneğin üzerine odaklanmasında görev alır. Objektif lensinin içinde platinden yapılmış bir disk bulunur. Görevi lens hatalarını en aza indirmek ve görüntünün derinliğini ayarlamaktır.

Örnek Tutucu: Örnek odacığı adı verilen kısımda yer alır. Mikroskopta incelenecek olan örneğinyerleştirildiği bölümdür. x, y, z, düzlemlerinde hareket ederek, örneğin sağa sola hareketini ya da örneğin kendi etrafında dönmesini (R) ve yatırılmasını (T) sağlayarak incelenecek yüzeyi değiştirmeyi ve görüntü almayı kolaylaştırır.

Dedektörler: SEM’de yapılacak olan incelemeye göre değişik enerji düzeylerinde yansıyan elektronları algılayan sistemlerdir. Örnek yüzeyine çarpıp yansıyan elektronlar burada toplanır ve PMT’ye aktarılırlar.

Örnekten yansıyan elektron çeşitlerine göre değişik dedektör tipleri vardır. Mikroskopların birçoğunda iki-üç tip dedektör bir arada kullanılabilir. Örneğin ve dedektörlerin konumu gelen elektron demetinin örneğe ulaşmasına izin verecek ve örnekten yansıyan elektronların mümkün olduğu kadar çok toplanmasını sağlayacak şekilde ayarlanmalıdır. Dedektörlerin sabit olması nedeniyle elektronların daha iyi yakalanmasını sağlamak için örneğin yeri değiştirilir, örnek eğilir ya da ekseni etrafında döndürülür.

İkincil elektronları yakalamak için genelde Everhart-Thornley dedektörü kullanılır. Dedektör, örnekle arasında yaklaşık 45° açı bulunacak şekilde yerleştirilir. Geniş yayılım gösteren ikincil elektronların dedektör tarafından tutulabilmesi için dedektörle örnek arasındaki eğimin iyi ayarlanması ve örnek-dedektör arasındaki mesafenin en aza indirilmesi gerekmektedir.

Yüksek enerjili geri yansıyan elektronlar için de Everhart-Thornley dedektörü ikincil elektronların bu dedektör tarafından algılanmasını engelleyecek özel bir mekanizma ile birlikte kullanılır. Dedektör ile örnek arasındaki açı 90° olmalıdır. Bu pozisyonla dedektör örnekten yansıyan geri yansıyan elektronların çoğunu yakalayabilir.

X-ışını dedektörleri örneğe mümkün olduğunca yakın yerleştirilir. Silisyum (Lityum) yarı iletken dedektör hareket edebilen bir mekanizma üzerine yerleştirilir ve böylece örnek ile dedektör arasındaki mesafe ayarlanabilir. Örneğe 45°'lik açıyla ve yakın yerleştirilen dedektörlerin, 45°'lik açıyla ve uzak yerleştirilen dedektörlerden daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (Chescoe ve Goodhew 1990).

Işın Çoğaltıcı Tüp (Photo Multiplier Tube-PMT): Detektörlerce tutulan elektronların oluşturduğu sinyaller burada amplifiye edilir ve bu sinyaller sayısal analog çeviricilere aktarılarak sayısal görüntünün oluşması sağlanır.

Vakum Sistemi: Elektron mikroskoplarındaki vakum sisteminin iki temel özelliği vardır. İlki, elektron demetlerinin gaz moleküllerine çarpıp saçılmalarını engellemek ve elektron tabancasından örneğe giden elektronların bir metre yol alabilmelerini sağlamak için kolondaki havayı uzaklaştırmaktır. İkinci özelliği ise örneğin, lenslerin ya da elektron tabancasının havadaki gazlarla (özellikle karbon) kontamine olmasını engellemektir. Günümüzdeki vakum sistemleri kolon içindeki basıncı 10^{-6} – 10^{-11} mm Hg'ye kadar düşürülebilmektedir ki bu da hava basıncının yaklaşık 1/1,218,000' i kadardır (Chescoe ve Goodhew 1990). Vakum elde etmek için birkaç tür pompa ardarda yerleştirilerek dereceli vakum sağlanır.

a) Dairesel Pompa: Gazı uzaklaştırmak için kullanılan en basit mekanik pompalardır, bunun için yağ tankına gömülmüş devirli vanalar kullanılır. Oldukça ucuz maliyeti olmasına karşın gürültülü çalışması, koku yapması ve titremeye neden olması nedeniyle ancak çok gerekli olduğunda kullanılır.

b) Turbomoleküler Pompa: Günümüzdeki birçok elektron mikroskopunda dairesel pompayla birlikte bulunmaktadır. Oldukça hızlı dönen bir fan sistemi ile çalışır ve gazı boşaltım sisteminden dışarı atar. Atmosfer

basıncını 10^{-5} Torr'a kadar düşürebilir ve sistemin yağ ile kontamine olmasını engelleyici özelliği vardır. Fanın çok hızlı devir yapması yüzünden ömrü azdır.

c) Difüzyon Pompası: Yağ ya da cıva ile çalışır. Yağ ve cıva ısıtılınca oldukça fazla buhar oluşturabilirler. Difüzyon pompaları, basınç 10^{-1} Torr'un (10 Pa) altındayken iş görebilir, bu nedenle mikroskobun basıncı dairesel pompa ile düşürülmelidir. Dezavantajı; ısıtılarak oluşturulan buharın kolondan uzaklaştırılmasının zorluğudur. Birçok taramalı elektron mikroskobunda difüzyon ve dairesel pompa yerini turbomoleküler pompaya bırakmıştır.

2.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobunun Çalışma Prensibi

SEM basit olarak kapalı devre bir televizyon sistemi gibi karakterize edilebilir. Mikroskop sütununun üst kısmında bulunan elektron tabancasında yer alan ve katot görevi gören tungsten filamanın ısıtılmasıyla elektronlar yayılmaya başlar. Katot genelde 1–30 kV arasında tutulur. Elektron tabancası elektron kaynağı olarak görev yapmaktadır.

Tabancanın alt kısmında üç sıra olarak dizilmiş elektromanyetik lens yer alır. Bunlar hem elektron tabancasından çıkan elektronlara hız kazandırırken hem de elektronların küçük bir noktada odaklanmasını olanaklı kılarlar, böylece bir elektron demeti oluşturulur.

Oluşan elektron demeti ışın saptırıcı bir mekanizma yardımıyla örnek üzerinde taramalar yapar. Işın saptırıcılar objektif merceğinin üst kısmında yer alır.

Örnek odası mikroskop sütununun taban kısmında ve elektron demeti doğrultusunda yer alır. Örnek odasındaki tablaya örnek yerleştirilir ve bu tablanın çeşitli eksenlerde hareket etmesi yardımıyla örnek incelenir.

Objektif lensi elektron demetinin örnek yüzeyine düşmesini sağlar. Işın saptırıcılarca tarama yapan ışınlar objektif merceğinden geçerek örnek yüzeyine ulaşırlar. Örneğe en yakın olan bu kısmın temiz olması ve doğrultusunun değişmemesi gerekmektedir. Böylece yüksek çözünürlük sağlanabileceği gibi astigmatizm hataları ve elektron yığılması nedeniyle oluşacak kirlilikler de engellenmiş olur.

Difüzyon pompası ve dairesel pompa sütun ve örnek odası kısmında yer alır. SEM'in en iyi şekilde çalışabilmesi için örnek odası ve sütundan uygun vakumda tutulması gerekmektedir. Bu vakum düzeyi genelde 10^{-4} Torr'dan daha düşüktür. Örnek odasındaki vakumun kalitesi çözünürlüğü arttıracak gibi kontaminasyonu da en aza indirir. Uygun olmayan vakumda hidrokarbonlar elektron demetinin doğrultusunu bozacak ve kontaminasyon çok hızlı gerçekleşecektir.

2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu Çeşitleri

2.3.1. Kriyo-SEM

Örneklerin dondurulup incelenmesine yarayan bir sistemdir. Bu incelemeyi yapabilmek için taramalı elektron mikroskopunda düşük sıcaklıklarda incelemeyi sağlayan özel bir aparatın takılması gerekmektedir. Aynı zamanda soğukta preparasyonu sağlayacak aletlerin de bulunması gerekir. Örnekleri dondurma işlemi sırasında daha çok sıvı nitrojen kullanılmaktadır.

Kriyo-SEM'in kullanılmasıyla oda ısısında sıvı halde bulunan dış macunu, dondurma, bal gibi maddelerin incelenmesi sağlanabilir. İncelenecek materyallerin önce dondurulup sonra kırılması yöntemiyle de bu materyallerin içyapıları doğal olarak incelenebilir.

Bu yöntemle kimyasal fiksasyon aşamasının kaldırılmasıyla örnekteki doğal yapılar korunarak incelenebilmektedir. Dehidrasyon sırasında olabilecek ince yapıların kaybı da dehidrasyon aşamasına ihtiyaç duyulmadığından ortadan kaldırılacaktır. Preparasyon aşaması 10dk kadar kısa olabildiğinden zaman kaybı yaşanmayacaktır.

2.3.2. Çevresel Taramalı Elektron Mikroskobu (Enviromental Scanning Electron Mikroscope-ESEM)

Yeni bir teknik olan ESEM klasik SEM'in bütün avantajlarına sahip olmakla birlikte ek olarak vakumun örnek çevresinde oluşturduğu baskıyı ortadan kaldırmaktadır (Danilatos 1991). ESEM'in temel avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- 1) Kontaminasyon ESEM'e zarar vermez. Kirli ve dışarıya gaz veren örnekler preparasyona tabii tutulmadan incelenebilmektedir.
- 2) Örnek odacığındaki gaz iyonizasyonu yüklenme etkisine sebep olan geçirgen olmayan örneklerin görüntülenmesini mümkün kılar.
- 3) Özel bir detektörün kullanılması nedeniyle ısıya duyarlılık ortadan kaldırılır ve ısı ilişkili çalışmalar yapılabilir. Örneğin; oksidasyon-korozyon (Link 1993), lehim ve maden parçalarının yapıştırılması çalışmaları (Kirchner 1993), polimerizasyon sürecinin in situ incelenmesi (Manero et al. 1999).
- 4) Islak örneklerin kurutulmasına gerek kalmamaktadır. ESEM ortama doymuş su buharı vererek örneği tamamıyla sulu tutmaktadır.
- 5) ESEM oldukça dinamik bir süreçtir. Hidrasyon, dehidrasyon, dondurma, ısıtma testleri oldukları anda kaydedilebilmektedir (Tartera et al. 2000).

6) ESEM’de yapılan incelemelerde minimal preparasyon kullanıldığı için artefaktların oluşmasını engeller ve zaman kazancını artırır, çok çeşitli örneklerin incelenmesini olanaklı kılar (Manero et al. 2003).

2.4. Elektron Mikroskopunda Görüntü Almada Değişkenler

2.4.1. Hızlandırılmış Akım (Accelerating Voltage)

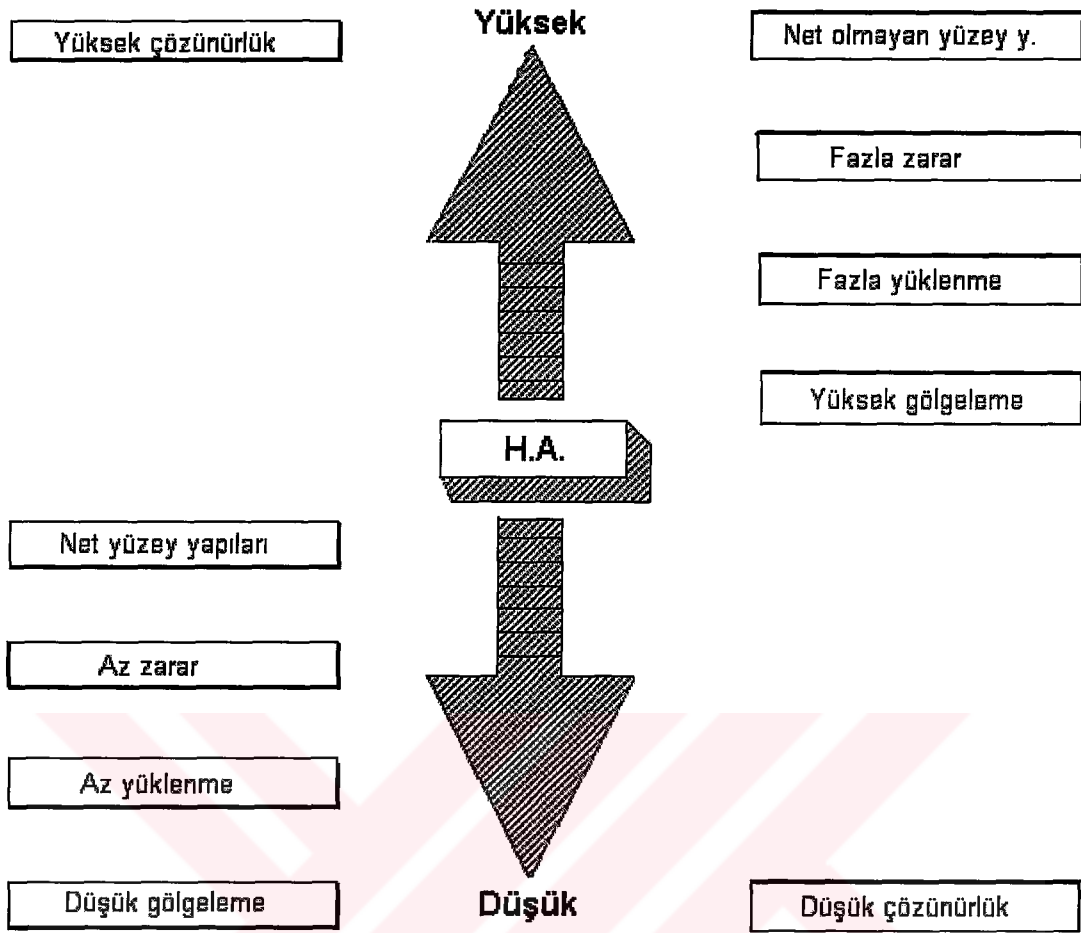
Örnek üzerine gönderilen elektron miktarıdır.

Hızlandırılmış akım ne kadar az olursa örnek yüzeyine çarpan elektron miktarı da o kadar az olacaktır. Eğer örneğin yüklenmeye karşı dayanıklılığı azsa örnek üzerine gönderilen kV’nin azaltılmasıyla çarpan elektron sayısı belli bir dengede tutulur ve bu problem çözülebilir. Hızlandırılmış akımın azaltılmasıyla örneklerde yüklenme olmayacak ve bazı örnekler altın ya da karbonla kaplanmadan incelenebilecektir (Chescoe ve Goodhew 1990). Ancak unutulmamalıdır ki en iyi görüntüye ulaşabilmek için iletken olmayan örneklerin kaplanması zorunludur.

Genelde SEM’de çözünürlüğü arttırmak için 20–30 kV kullanılmaktadır. Ancak çalışılan kV ölçütü örnek yüzeyine de bağlı olarak değiştirilebilir. Genelde düzgün yüzeye sahip örneklerin incelenmesinde düşük kV yeterli iken pürüzlü yüzeylerin incelenmesinde yüksek kV’ye çıkılmaktadır (Chescoe ve Goodhew 1990). Düşük kV’da sinyali optimize etmek için anot ile katot arasındaki mesafe azaltılır bu da anodun başka bir geometriyle yerleştirilmesiyle mümkün olabilir.

Örnek üzerine gönderilen elektronların fazla olması genelde alınan görüntüde ayrıntı kaybına, gölgeleme etkisi dediğimiz çok fazla aydınlık ve çok fazla karanlık alan oluşmasına, örnekte yüklenmeye ve buna bağlı olarak da örneğin zarar görmesine neden olur. Ancak örnek üzerine ne kadar çok elektron gönderilirse çözünürlük adı verilen, yani iki noktanın ayırt edilebilme gücü de o oranda artacaktır. Buna göre örnek üzerine gönderilen akım ne kadar düşük olursa çözünürlük o aranda azalacaktır ancak olumlu olarak örnek yüklenmeyecek, hasar görmeyecek, gölgeleme etkisi azalacak ve örnek yüzeyindeki ayrıntı kaybı da o oranda engellenmiş olacaktır.

Taramalı elektron mikroskopunda inceleme yaparken her örneğin en iyi görüntüyü verebileceği optimum akım bulunmalıdır. Düşük voltajdan yüksek voltaja çıkılarak uygun değer bulunursa örneğin yüklenmesi ve sonuncunda da bozulması da önlenmiş olur. Örnek üzerine gönderilen akım ne kadar büyük olursa polimerlerin yüksek büyütmede incelenmesi sırasında ve özellikle ölçümlerde hata oranı o kadar yükselir (Yanez ve Barbosa 2003).

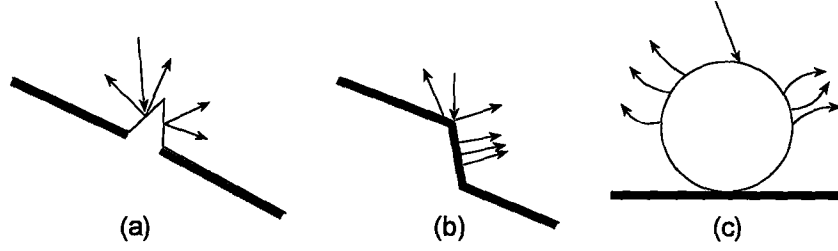


Şekil 2.4. Hızlandırılmış akımın görüntü almadaki diğer değişkenlerle ilişkisi

2.4.2. Gölgeleme

Alınan mikrograflarda çok aydınlık ya da çok karanlık alanların bulunmasına gölgeleme denir. Gölgeleme etkisi nedeniyle yüzeyde ayrıntı kaybı olacağından istenmeyen bir değişkendir.

Gölgelemenin nedenlerinden biri incelenen örnek yüzeyinin düzgün olmamasıdır, bu gölgeleme etkisini artırır. Yüzeyden yansıyan elektronların sinerjisiyle incelenen alanda çok aydınlığa ve karanlığa neden olması da gölgeleme özelliğini arttıran bir diğer değişkendir. Hızlandırılmış akımın az ya da çok olması da gölgelemeye sebep olabilir. Yüksek voltajda gölgeleme etkisi artar.



Şekil 2.5. Düzgün olmayan yüzeylerde elektronların yansıma şekilleri. (a) çıkıntılı yüzey (b) sivri kenarlı yüzey (c) yuvarlak yüzey

2.4.3. Örnek Eğimi

Örnek eğimi de görüntü almadaki değişkenlerdendir. Taramalı elektron mikroskopunda örnek incelenirken örneğe kazandırılan her eğim farklı bir yüzeyi inceleme şansı verecek bu da farklı topografik bilgiler sağlar.

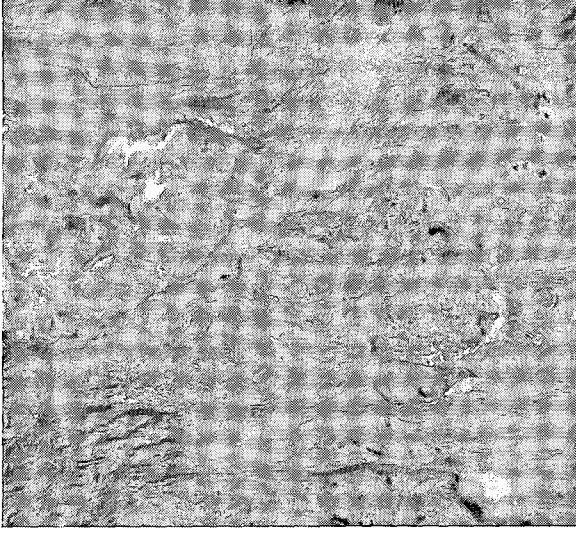
Örneğe verilen optimum eğimle örnekten yansıyan, detektörlerde toplanan ikincil elektronların miktarı o oranda artar ve alınan görüntüler daha iyi görüntüler olur. Örnek yüzeyine uygun eğim verilince; örnek yüzeyindeki parlaklık farklılıkları ortadan kalkar.

2.4.4. Geri Yansıyan Elektronlar (Backscattered Electrons)

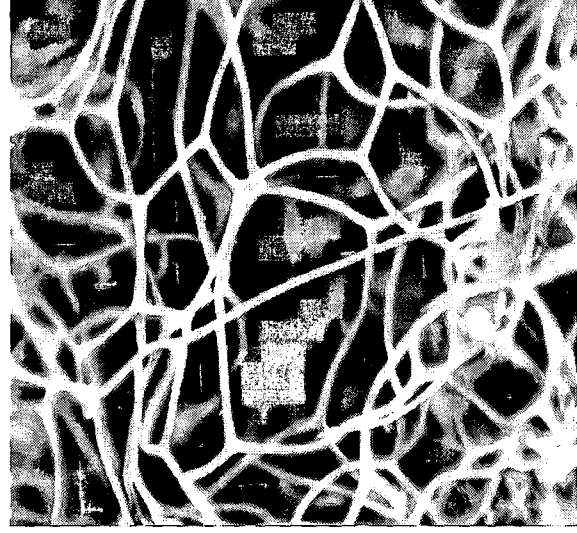
Geri yansıyan elektronları kullanarak örnek hakkında iki çeşit bilgi elde edilir. İlk olarak uygun boyamalarla ve uygun preparatlarla kimyasal kompozisyonu hakkında, ikinci olarak da ikincil elektronlardan elde edilen kadar iyi olmasa da örneğin topografisi hakkında kısmi bir bilgi edinilebilir.

Geri yansıyan elektronlar güçlü olarak örnekten yansıdıkları için bunların yayılım alanları da o ölçüde geniştir. Bu nedenle bunların oluşturdukları görüntüde çözünürlük ikincil elektronların oluşturdukları görüntüdeki çözünürlüğe göre daha düşüktür. Belirli bir alandan alınan veri bunlarda daha dağınıktır. Ne var ki bunlar ikincil elektronlardan daha yüksek enerjiye sahip olduklarından örnek bu elektronlar kullanıldığında yüklenmeye ve kontaminasyona daha dayanıklı olur.

Örneğin yüzey topografisi hakkında elde edilen bilgi, geri yansıyan elektronların sayısı ve örneğin atomik numarasının ilişkisi sonucu oluşan kontrast nedeniyle baskılanır. Eğer bu sinyaller ortadan kaldırılsa topografik bilgi tekrar elde edilebilir (Chescoe ve Goodhew 1990). Örnek izole edici bir tabakayla kaplanırsa ikincil elektron görüntüleri örneğin yüklenmesini engeller. Bütün taramalı elektron mikroskoplarında ikincil elektron detektörü olmasına karşın geri yansıyan elektron detektörleri sonradan eklenebilir.



Şekil 2.6. Geri yansıyan elektronlarla alınan damar içi görüntüsü (Büyütme:750x)



Şekil 2.7. Geri yansıyan elektronlarla alınan sünger görüntüsü (Büyütme:350x)

2.4.5. Örneğin Yüklenmesi

Taramalı elektron mikroskopunda inceleme yapmak için örneğin üzerine elektron gönderilir. Bu da demek oluyor ki örnek inceleme sırasında elektron bombardımanına tutulur, bu bombardıman sonucu örnek yüklenebilir. Örneğin yüklenmesi alınan mikrograflarda normal olmayan kontrasta sebep olurken aynı zamanda görüntüde ve preparat yapısında deformasyona sebep olur.

Bu istenmeyen sonuçların olmasını engellemek için hem örnek üzerine gönderilen kV düşürülmelidir hem de örnek üzerine gelen elektronlarla örnekten yansıyan elektronlar arasında örneğe verilecek uygun bir eğimle denge sağlanmalıdır.

Yüksek voltajda örneğin yüklenmesi sonucu görüntüde oldukça fazla kontrast oluşur ve buna bağlı olarak da ayrıntılar kaybolur. Örnek üzerine gönderilen akım şiddeti azaltılınca bu kontrast ve örneğin yüklenmesi etkisi ortadan kaldırılır.

2.4.6. Örneğin Örselenmesi

Örnek üzerine gönderilen akım miktarının fazla olması, örneğin akıma bırakıldığı sürenin uzun olması ve örneğin yapısından kaynaklanan nedenler örneğin örselenmesine sebep olabilir.

Örneğin zarar görmesini engellemek için; gönderilen akım şiddeti minimumdan başlayarak artırılır, böylece optimum akım şiddeti bulunurken örnek daha az bombardımana maruz kalacağından daha az hasar görecektir. Aynı zamanda örneğin kaplama kalınlığını değiştirmek de örneğin zarar görmesini engeller (kaplama işlemi örneği iletken hale getirdiği için üzerinde elektron birikmesini engelleyecektir). Örneğin elektron bombardımanına tutulduğu sürenin azaltılmasıyla da örnek hasara uğramaktan alıkonulabilir.

2.4.7. Kontaminasyon

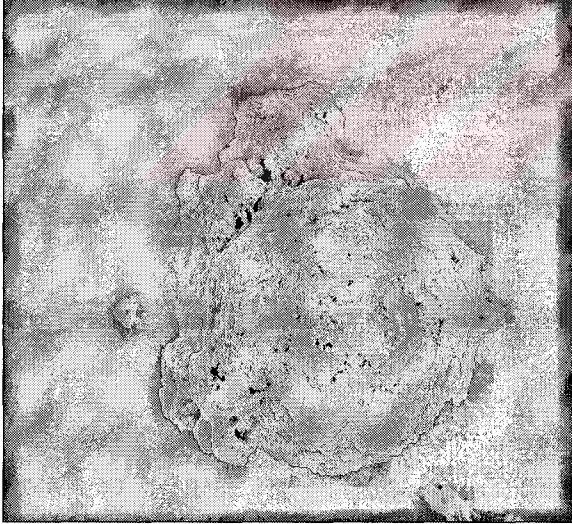
Görüntü alırken istenmeyen gaz çıkışı nedeniyle incelenen kısımda kararma ve bozulma meydana gelir. Bu gaz çıkışı örneğin kendinden, örneğin yapıştırıldığı yapıştırıcıdan ya da örnek ve yapıştırıcı arasındaki etkileşimden kaynaklanabilir. Örneğin kendinden kaynaklanan kontaminasyona uzun elektron bombardımanı nedeniyle örnekten ayrılan karbon atomları neden olur.

Kontaminasyonu engellemek için yapıştırıcı az kullanılmalı, örneğin bombardımana tutulduğu süre azaltılmalı ve inceleme sırasında mümkün olduğunca küçük biyolojik materyaller kullanılmalıdır.

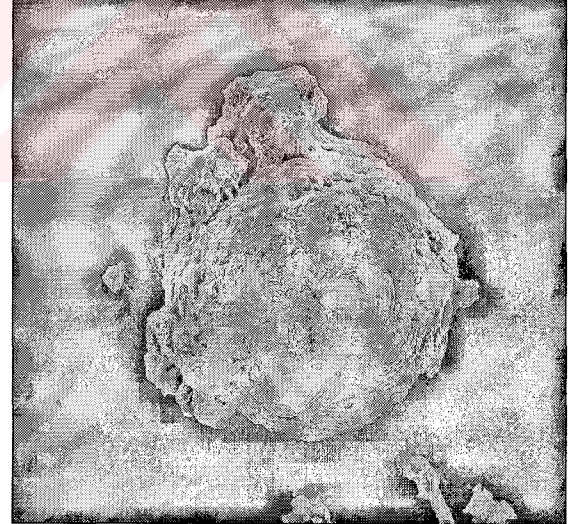
2.4.8. Çalışma Aralığı (Working Distance-WD)

Objektif merceğiyle örnek arasındaki mesafeye denir. Bu mesafe ne kadar küçük olursa odaklanan alandaki çözünürlük o derece artar ancak alan derinliği denilen, yani görüntünün her yerinde aynı derecede netlik sağlayabilme olasılığı o oranda azalır. Çalışma mesafesi büyüdükçe çözünürlük azalır ancak bu kez de alan derinliği artar.

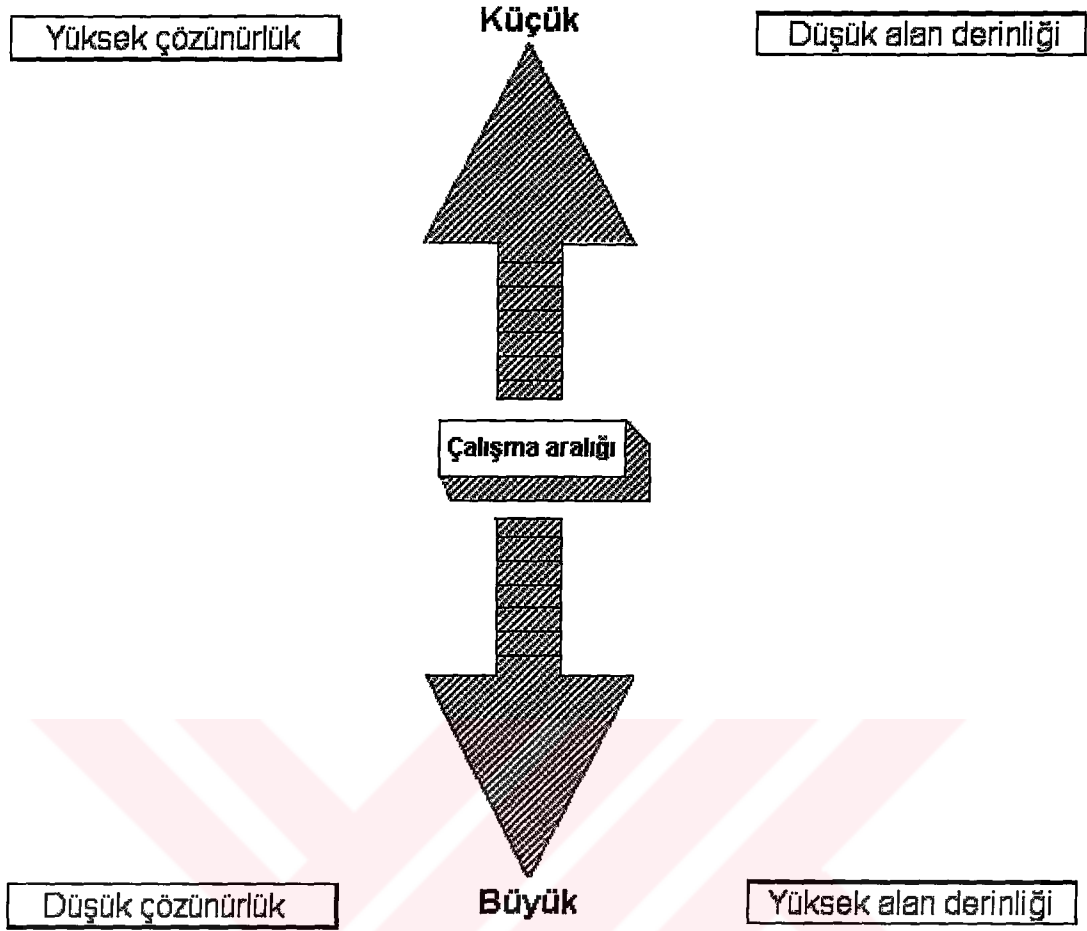
Aşağıda Şekil 2.8. ve Şekil 2.9.'da görüldüğü gibi 3mm'lik çalışma mesafesinde çözünürlük fazlayken alan derinliği azalmıştır. İkinci resimde ise WD 38mm'ye çıkarıldığında alan derinliği artmış ancak çözünürlük azalmıştır.



Şekil 2.8. Ovosit görüntüsü WD:3mm



Şekil 2.9. Ovosit görüntüsü WD:38mm

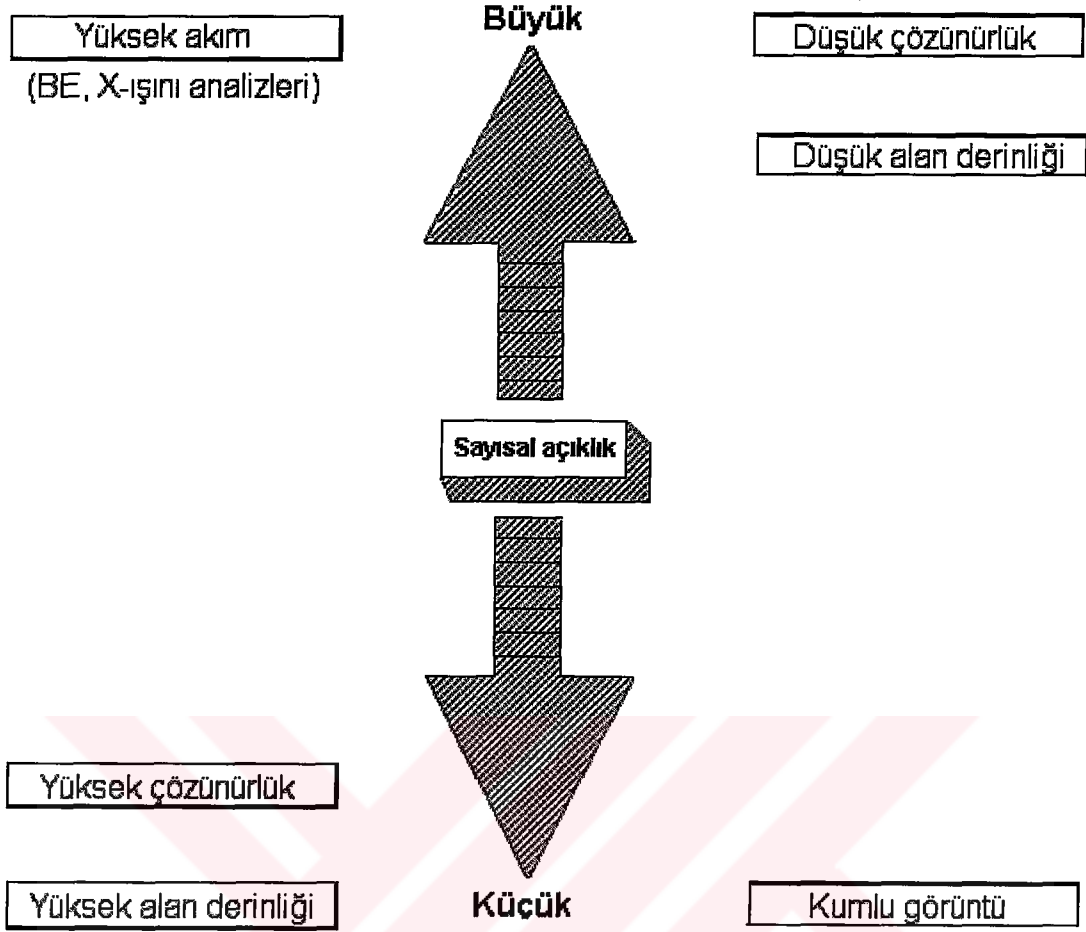


Şekil 2.10. Çalışma mesafesinin görüntü almadaki diğer değişkenlerle ilişkisi

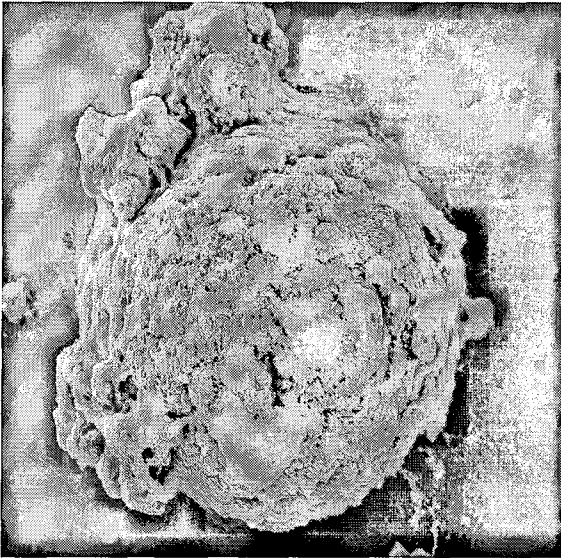
2.4.9. Sayısal Açıklık (Aperture Size-NA)

Objektif lensinin açıklığına denir.

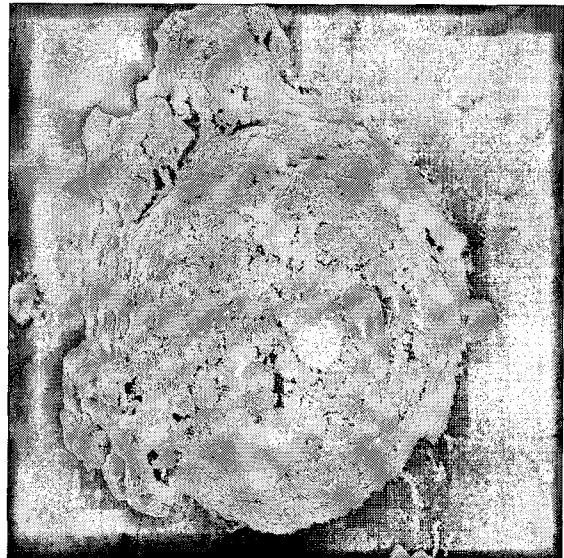
Bu açıklığın ayarlanmasıyla örnekteki birim alana düşen akım yoğunluğu ayarlanabilir. Sayısal açıklık küçüldükçe alan derinliği ve çözünürlük artacaktır, ancak bu görüntünün kumlu olmasına neden olur. Eğer sayısal açıklık artırılırsa alan derinliği ve çözünürlük azalacaktır. Geri yansıyan elektronlarla yapılan analizlerde ve X-ışını analizlerinde sayısal açıklığın büyük olması tercih edilir, bu şekilde örnek üzerine gelen akım daha şiddetli olur.



Şekil 2.11. Sayısal açıklığın görüntü almadaki diğer değişkenlerle ilişkisi



Şekil 2.12. Kümüls ovosit kompleksi görüntüsü
NA:30 μ m



Şekil 2.13. Kümüls ovosit kompleksi görüntüsü
NA:50 μ m

Üstteki resimlerde alınan görüntülerde sayısal açıklığın küçülmesiyle alan derinliğinin ve çözünürlüğün artmakta olduğu, sayısal açıklığın büyümesiyle ise hem alan derinliğinin hem de çözünürlüğün azaldığı görülmektedir.

Elektron mikroskobu mikrograflarının en iyi şekilde olması için astigmat hatasının ortadan kaldırılması gerekir, astigmat hatası gelen ışının doğru aksta gelmemesinden kaynaklanır. Görüntü almada diğer değişkenler optimum aydınlık ve kontrastın bulunması gibi görüntüyü alan kişiye bağlı olarak değişebilecek değişkenlerdir. Görüntü alma cihazın kendisinden, çalışılan laboratuvar koşullarından etkilenebilir.

2.5. Taramalı Elektron Mikroskobu İçin Doku Hazırlama Yöntemleri

SEM'in hücreler ve yumuşak dokular için kullanılmaya başlaması üzerinden uzun bir süre geçmiştir. Işık mikroskobuyla karşılaştırıldığı zaman alan derinliği ve çözünürlükte sağladığı büyük artış sayesinde SEM canlı bilimlerinde biyolojik yapıların daha ayrıntılı olarak incelenmesine olanak sağlamıştır (Kessel ve Shih 1976) .

Ancak SEM'in kullanımında geçmişte bazı problemler ortaya çıkmıştır. Böcek ağzı, polen kemik, diş gibi morfolojik yapılarının korunması kolay olan sert materyallerin SEM'de incelenmesi başarıyla gerçekleştirilirken yumuşak, sulu dokuların korunmasında zorluklar baş göstermiştir. Bu zorluklar ilk tespit, ikincil tespit, dehidrasyon, kurutma ve kaplama gibi yöntemlerin geliştirilmesiyle ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır.

İlk olarak taramalı elektron mikroskobu çalışmalarında diş, saç, kemik, tırnak gibi sert dokular kullanılmıştır (Boyde ve Stewart 1962). Bu tür örnekler daha önce bahsedildiği gibi kurutma aşamasında özgün yapılarını koruyabildikleri gibi düşük voltaj ve düşük büyütmelerde metal kaplamaya gerek duyulmaksızın incelenebilirler. Kayalar, kabuklular, küçük böcekler ve polen gibi bitki yapıları ise SEM'de tespiti gerek duyulmadan incelenebilirler. Ancak görüntülenmeden önce bu yapıların altın-paladyum, karbon gibi iletken maddelerle kaplanması elektron bombardımanına tutulduklarında örneklerin yüklenmesi gibi etkileri ortadan kaldıracaktır. Genelde EM'da incelenecek örnekler vakum altında tutulurlar ve basınç 10^{-4} ile 10^{-6} Torr arasında değişir.

2.5.1. Tespit (Fiksasyon)

İncelenen canlı ister bitki ister hayvan olsun iç ve dış yapısı araştırılırken mümkün olduğu kadar doğal yapısına uygun kalsın istenir. Biyolojik materyallerin incelenmeleri sırasında doğal yapılarını kaybetmemeleri için tespit edilmeleri gerekir.

Ancak canlılardan alınan örneklerde protein içerdiklerinden dolayı bunu sağlamak oldukça zordur. Tespit işlemi örnekteki proteinleri geri dönüşümsüz olarak lineer hale geçirirken lipidlerin de birbirlerine

sabitlenmesini sağlar. Aynı zamanda tespit edilen doku tespit işlemi sayesinde sonraki işlemlerin zararlarına karşı da korunmuş olur.

Hücrelerin, Dokuların ve Organların Kimyasal Tespiti:

SEM çalışmaları sırasında çeşitli tespit çözeltileri denenmiştir. Genelde fiksatiflerin çoğu TEM’de kullanılanlara oldukça benzemektedir.

- 1) %1 ya da %2’lik osmiyum tetroksit (OsO_4) 0,5 M ya da 1,0 M sodyum fosfat ya da sodyum kakodilat tamponu içinde çözülmüş (pH:7,2–7,4)
- 2) %1,5–3 glutraldehit (GA) 0,5 M ya da 1 M’lik sodyum fosfat ya da sodyum kakodilat tamponunda (pH:7,2–7,4)
- 3) Karnowsky’s ((Karnowski 1965) paraformaldehit-glutraldehit fiksatif
- 4) Trump’s paraformaldehit-glutraldehit fiksatif
- 5) GA ve OsO_4 ’ten oluşan “kokteyl” fiksatif. Daha çok %1,25’lik GA ile %2’lik OsO_4 ’ün 0,1 M sodyum kakodilat tamponu içinde (pH:7,2–7,4) hazırlanmasıyla elde edilir.

Biyolojik materyallerin tespitinde daha çok aldehit grubu tespit çözeltileri tercih edilir: Bunlardan başlıcaları glutraldehit (GA) ve formaldehit (FA). Glutraldehit ve formaldehitin 0,1 M fosfat tamponu içinde çözülmüş %2,5-3’lük çözeltileri pH: 7,2–7,4 olacak şekilde kullanılır. Ancak daha çok su içeren dokularda pH daha alkali olarak ayarlanabilir (pH:7,6–8,0).

Yaygın olarak örnekler öncelikle ilk fiksatif olarak kullanılan GA ile tespit edilir, bunu bir tampon çözeltisiyle yıkama takip eder ve ardından ikincil fiksatif olan OsO_4 kullanılır. Hem GA hem de OsO_4 nonkoagüle fiksatiflerdir (Hayat,1970). Bazı durumlarda ise dokuların sadece OsO_4 ile tespit edilmesi mümkündür.

Genelde tespit çözeltisinin dokuya girme süresi 1mm için 1 saattir, kısa süre yapılan fiksasyon dokunun tam olarak tespit olmamasına neden olurken uzun süren fiksasyon ise dokuda kırılmalara yol açar. GA, FA’ya göre daha yavaş penetre olan bir fiksatifir aynı zamanda toksik özellik gösterdiği için çalışılırken dikkatli olunmalıdır. OsO_4 de dokulara GA gibi oldukça yavaş girer. Bu nedenle iyi bir fiksasyon için örneklerin küçük doku blokları halinde hazırlanmaları gerekmektedir. Ek olarak GA’da fiksasyon dokular için yaklaşık 24–48 saat kadar sürer ve bu süre zarfında fiksatif iki kere değiştirilmelidir (Kessel ve Shih 1976).

Birçok tek hücre örneğin; protozoa, kan hücreleri, sperm vb gibi fiksatifin osmolalitesine karşı oldukça duyarlıdır (Bessis ve Weed 1972). Örneğin memeli eritrositleri hipertonic ortamda yüzeylerinde çıkıntılar oluşur ya da hipotonik ortamda bikonkav yapılarını kaybederek yuvarlaklaşırlar. Böyle durumlarda fiksatif yoğunluğunu fiske edilen dokuya yaklaştırmak gerekir. Bunun için fiksatife şükroz ekleyerek osmolalitesi ayarlanır.

Mukus tabakasıyla kaplı olan mide, bağırsak, trakea gibi dokuların fiksasyonunda OsO_4 kullanılması oldukça yaygındır. Ancak bu dokuların fiksasyondan önce bir tampon çözeltiyle ya da Ringer's solüsyonuyla yıkanması gerekir. Doku bloklarından mukusun uzaklaştırması için örneklerin %1'lik sodyum karbonat çözeltisiyle yıkanması gerekir. Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanmasında Ringer's solüsyonu kullanılır, pH hidroklorik asit ile 8'e ayarlanır (Kessel ve Shih 1976). Genelde biyolojik materyallerin SEM için tespiti aldehitlerle yapılır ve fiksasyon süresi saatlerden günlere kadar değişebilir. Doku daha sonra tamponla, tuzla ya da distile suyla 30–60dk arasında değişen sürelerde birçok kez yıkanır. Ardından ikincil fiksasyon için %1-2'lik OsO_4 kullanılır ve bu tespit 1–3 saat kadar $+4^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilir.

Biyolojik materyallerin SEM için hazırlanması oldukça geniş bir alandır literatürde çok çeşitlilik gösterebilir, eklemeler yapılabilir.

Laboratuvarlarda SEM çalışmalarında en çok kullanılan tespit çözeltilerinin hazırlanışları:

Trump's Fiksativ (4F:1G):

10 ml %37-40'lık Formaldehit
4 ml %25'lik Gluteraldehit
1,16 g NaH_2PO_4
0,27 g NaOH
86 ml distile su
(pH=7,2-7,4)
 $+4^\circ\text{C}$ 'de en az 3 ay saklanır

Gluteraldehit+ Kakodilat Çözeltisi:

%4' lük süktroz
3,2 g kakodilat
10 ml %25' lik gluteraldehit
90 ml distile su
(pH=7,2-7,4)
 $+4^\circ\text{C}$ 'de en az 3 ay saklanır

Karnovski Çözeltisi:

25 ml %4' lük formaldehit
5 ml % 25'lik gluteraldehit
50 ml'ye tamamlanacak şekilde 0,2 M Sorenson sodyum fosfat tamponu
(pH=7,2-7,4)
 $+4^\circ\text{C}$ ' de 1-2 hafta saklanabilir

%2,5'lik Gluteraldehit+ 0,1M OsO₄ Çözeltisi

10 ml %25'lik gluteraldehit

10 ml 0,2 M sodyum fosfat tamponu

40 ml distile su

(pH=7,2-7,4)

+4 °C' de 1-2 hafta saklanabilir

2.5.2. Suyunu Giderme (Dehidrasyon)

Örneğin içindeki suyun bir sonraki basamak için hazırlanması için aracı çözeltilerle yer değiştirmesi gerekmektedir. Bunun için de daha çok alkol, asteen veya toksik özellik gösteren amil asetat serileri kullanılmaktadır. Örnek sırasıyla %50 - %75 - %95 ve %100'lük alkollerden geçirilir. Bu sırada örnek içindeki suyun alkolle yer değiştirmesi kademeli olarak sağlanır. Dehidrasyonun süresi inceleme yapılacak materyale göre değişiklik gösterebilir ancak genelde 3-5mm'lik dokular ve hücreler için her derişimde 15dk tutulması yeterli olur.

Organ ya da doku bloklarının dehidrasyon sırasında taşınması kolaydır ancak izole (tek) hücrelerin (ör; spermatozoa, protozoa) ince lamellere tutturulmasıyla ya da santrifüj tüpleri içinde dehidrate edilmeleriyle gerçekleştirilir. Santrifüj edilen hücreler solüsyon değiştirilmeden önce tüpün dip kısmından alınır. Dehidrate edilen örnekler saf alkol ya da asetondan alınarak kurutma işlemine tabii tutulur.

2.5.3. Kurutma

Dehidrasyondan sonraki basamak kurutmadır. Kurutma biyolojik materyaller için iki şekilde olabilir:

1-Havada Kurutma

2-Kritik Noktada Kurutma

Havada Kurutma: Bu tür kurutma yumuşak dokuların büzülmesine neden olacağı için daha çok kemik, diş gibi sert materyallerin kurutulmasında tercih edilir. Kurutmada ortaya çıkan artefaktlar, eğer hücreler ve yumuşak dokular incelenecekse oldukça önem kazanır. Geçmişte örnekler genellikle tespit edilir, distile suyla yıkanır, vakumlu desikatörde kurutulur ve hemen ardından SEM'de çalışılırdı. Ancak daha sonraları havada kurutma sırasında hücrelerdeki ve yumuşak dokulardaki suyun ya da tespit çözeltilisinin buharlaşması sırasında oluşan yüzey gerilimi nedeniyle yapılarının bozulduğu gözlemlenmiş ve bu yöntem terk edilmiştir.

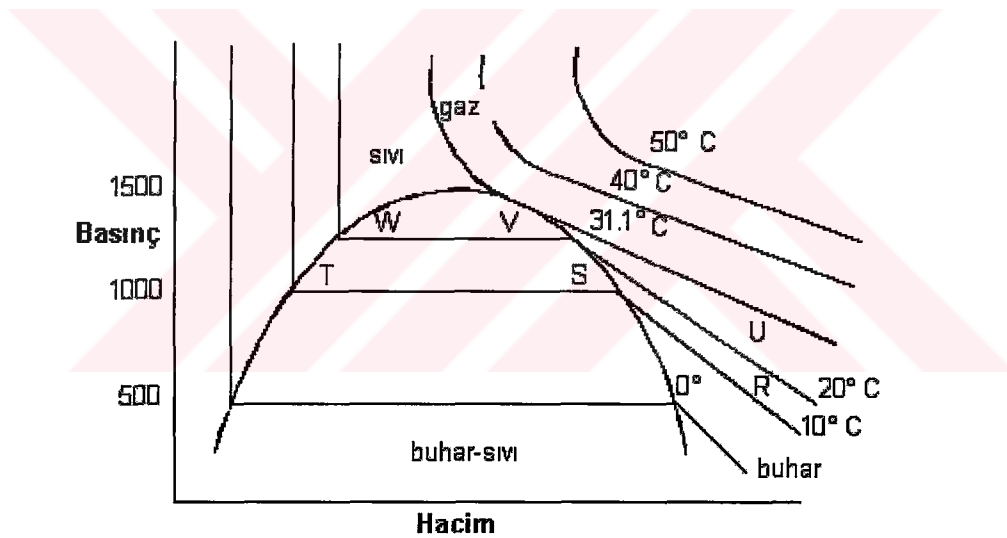
Kritik Noktada Kurutma: Bu teknik elektron mikroskobiye Anderson (1951) tarafından kazandırılmıştır ve günümüzde CO₂'nin kullanıldığı kritik noktada kurutma yaygın olarak uygulanmaktadır (Anderson 1951).

İncelenecek olan örneğin havada kurutulması örnekte deformasyona ve yapısında hasarlara neden olabilir. Bu tür hasarların birincil nedeni yüzey gerilimi etkisidir. Örnekteki sıvı buharlaşırken örnek, faz

sınırında bulunan birçok gücün etkisi altında kalabilir. Örnek ortamı olarak kullanılan suyun oluşturduğu yüzey gerilimi asetonun oluşturduğu gerilimden çok daha fazladır. Havada kurutma sırasında suyun oluşturduğu yüzey gerilimi sonucu oluşan hasarın, suyun daha az yüzey gerilimi oluşturan başka bir sıvıyla yer değiştirmesiyle azalması beklenir.

“Maddenin Bulunduğu Halin Devamlılığı” adı verilen durum yüzey geriliminin sıfıra indirildiği bir kurutma tekniğidir. Sıvılaştırılan gazın ısısı arttırıldığında örnekteki içbükey yapı düzelecek ve yüzey geriliminde de azalma görülecektir. Eğer yüzey gerilimi çok azalırsa sıvı yüzeyi kararsız hale gelir ve sonuçta ortadan kalkar. Bu “Kritik Nokta’ya” ulaşıldığında sıvıdan gaza geçiş sırasında örnekte hal değişikliği olmayacaktır. Sıvı içindeki bir örneğin kuru gaz ortama geçişiyle yüzey temasının engellediği belirlenmiştir bu da *kritik noktada kurutma* olarak adlandırılır.

Sonuçta CO₂’nin kullanımına kadar götüren deneylerin prensibinde sabit kütlede, değişik sıcaklıklarda ve belli bir basınç altında gazın hacim değişikliklerinin ölçümü yer almaktadır. Sonuçlar en iyi basınç ve hacim grafik serilerinde değerlendirilebilir. Şekil 2.14’te görülen eğriler izotermaller olarak adlandırılmıştır.



Şekil 2.14. CO₂ izotermalleri

10°C’deki izotermallere bakıldığında, düşük basınçta CO₂’nin buhar halinde bulunduğu ve R-S noktaları arasında gaz karakteristikleri sergilediği görülmektedir. S noktasından sonra basınçtaki çok az artışla buhar aşamasından sıvı aşamasına geçtiği görülür. Bu doymunluk fenomeni olarak isimlendirilir. S-T arasında basınç gerçek olarak sabit kalır. Bu sırada hacim azalır ve T noktasında grafik neredeyse dikey hale gelir, bu aşamadan sonra basıncın artmasıyla birlikte hacimde yok denecek kadar az değişiklikler görülür, sıvı baskıdan tamamen kurtulur. 20°C izotermalindeki karakteristikler de genelde bahsedilen gibidir ancak V ve W noktaları arasında küçük farklılıklar görülür. 10°C’lik izotermalde S-T noktaları buhardan sıvı hale geçiş sırasında hacimde meydana gelen değişikliği göstermektedir. Bu da doymuş buhar ve sıvının yoğunluklarının birbirine yaklaştığının ispatıdır. Dikey W’deki çok az sapma yüksek basınçta baskının yüksek olduğunu gösterir. Bu ipuçları da sıvı ve gaz durumları arasındaki özelliklerin birbirine çok yakın ve tesadüf olduğunu gösterir. Buna

ek olarak 31°C'deki izotermal dikey bir devamlılık göstermez. Bunun olduğu noktaya da *kritik sıcaklık* denir ve *kritik basınç* ve *yoğunlukla* ilgilidir. Eğer bir sıvı kritik sıcaklığa kadar ısıtılırsa yapıda içbükeylik görülmeyecektir, yüzey gerilimi sıfır olacaktır ve sıvı ya da gaz özelliklerinin hangisini taşıdığı ayırt etmek mümkün olmayacaktır. Böylece durumda devamlılık sağlanmış olacaktır. Bu ısının üzerinde gaz, basınç uygulamasıyla sıvılaştırılmaz ve kesin olarak konuşulursa bir madde yalnızca kritik ısının üzerinde gaz olarak sınıflandırılmalıdır. Basınç uygulamasıyla sıvılaştırma olasılığının olduğu daha düşük ısı da gaz buhar olarak isimlendirilir.

Kritik noktada kurutmanın, sıvıdan gaza geçişi yüzey gerilimi ve buna bağlı etkiler olmadan gerçekleştirebilen bu nedenle de hassas biyolojik materyaller için uygun bir kurutma tekniği olduğu anlaşılabılır. Tablo 1'de CO₂ ile birlikte yaygın olarak kullanılan maddelerin kritik değer sabitleri görülmektedir. Yapılan çalışmalarda suyun direkt örnekten uzaklaştırılması sırasında oldukça yüksek ısı hasarına neden olduğu görülmüştür.

KRİTİK DEĞERLER		
MADDELER	KRİTİK SICAKLIK (°C)	KRİTİK BASINÇ (psi)
Hidrojen (H ₂)	-234,5	294
Oksijen (O ₂)	-118	735
Nitrojen (N ₂)	-146	485
Karbon dioksit(CO ₂)	+31,1	1072
Karbon monoksit (CO)	-141,1	528
Su (H ₂ O)	+374	3212

Tablo 1. Kritik noktada kurutmada kullanılan maddelerin kritik sıcaklık ve basınçları

Bu nedenle karbon dioksitin kritik noktada kurutma yönteminde en uygun ortam olduğuna karar verilmiş, böylece *geçiş sıvısı (transitional fluid)* olarak adlandırılmıştır. Ancak CO₂ suyla uyumlu olmadığından CO₂'ye uyumlu başka bir sıvının önce suyla yer değiştirmesi sağlanır, buna da *aracı sıvı (intermediate fluid)* denir. İdeal olarak örnekteki su çıkarıldığı için *dehidrasyon sıvısı (dehydration fluid)* da denilebilir. Bunun için her iki işlemin kullanıldığı yere veya zamana göre bu işlemler değişik isimlendirilirler. Örnek hazırlama işlemleri sırasında hangi aşamada kullanıldığına göre dehidrasyon sıvısı ya da aracı sıvı adını alır.

a) ARA BASAMAK: Dehidrasyon ya da aracı sıvının olduğu aşamayı içine alır.

(Islak Örnek) H₂O → Aseton → CO₂ → Kritik Noktada Kurutma → Kuru Örnek

Örnek genelde değişik yoğunluklardaki dehidrasyon sıvısı ile muamele edilir, sonuçta suyun bir aracı sıvı ile yer değiştirmesi sağlanır. Bunun nedeni aracı sıvının oluşturduğu yüzey geriliminin daha az olmasıdır. Buna bağlı olarak da örnekte örnek odasına taşınması sırasında meydana gelebilecek buharlaşma sonucu oluşan hasarların en aza indirilmesi sağlanmış olur. Ayrıca bu CO₂ ile uyumlu olduğu için kritik nokta kurutma

cihazında (CPD)'de sert gerçekleşen yıkama işlemi sonrasında örneğin bozulmadan kalmasını sağlar. Tablo 2'de aracı sıvıların yüzey gerilimi görülmektedir.

(Islak Örnek) $H_2O \rightarrow$ Aseton $\rightarrow$ %30*---%50 $\rightarrow$ CO_2^{**} $\rightarrow$ CPD (Kuru Örnek)

*50/60/70/80/90 her biri için 10 dk

** 3 kere yıkama

CPD İÇİN DEHİDRASYON SIVILARI/ARACI SIVILAR	
MADDE	YÜZEY GERİLİMİ (dyn/cm)
Etanol	23
Aseton	24
Freon (113)	19

Tablo 2. Dehidrasyonda kullanılan sıvıların yüzey gerilim değerleri

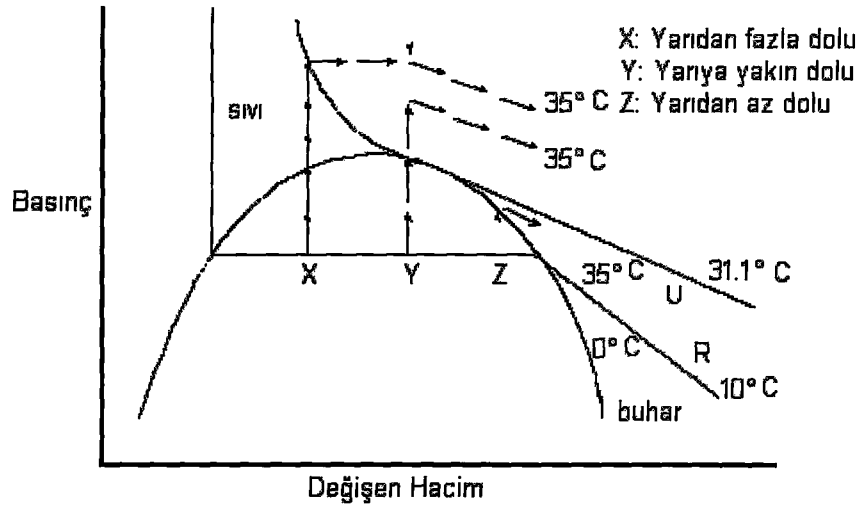
Örnek aracı sıvı içinde odacığa transfer edildikten sonra odacık aracı sıvının geçiş sıvısıyla yer değiştirmesi için bir kaç kez yıkanır.

b) GEÇİŞ BASAMAĞI: yukarıda belirtildiği gibi kritik noktada geçiş değerleri belirlenmiştir (CO_2 için $31,1^\circ C$ ve 1072 psi). Ancak unutulmamalıdır ki bu izotermaller belli bir kütlede ve basınç altında değişik serideki sıcaklık sabitleri için belirlenmiştir. CPD uygulamalarında geçiş sıvısı ile hacim sabit tutulduğunda bazı bilgilere ulaşılmıştır. Freon 13 ve nitröz oksit de sıklıkla olmasa da CPD'de CO_2 yerine kullanılabilir (Porter 1972).

CPD İÇİN KULLANILAN GEÇİŞ SIVILARI		
MADDE	KRİTİK SICAKLIK ($^\circ C$)	KRİTİK BASINÇ (psi)
Karbon dioksit	+31,1	1072
Freon 13	+28,9	562
Freon 23	+25,9	495

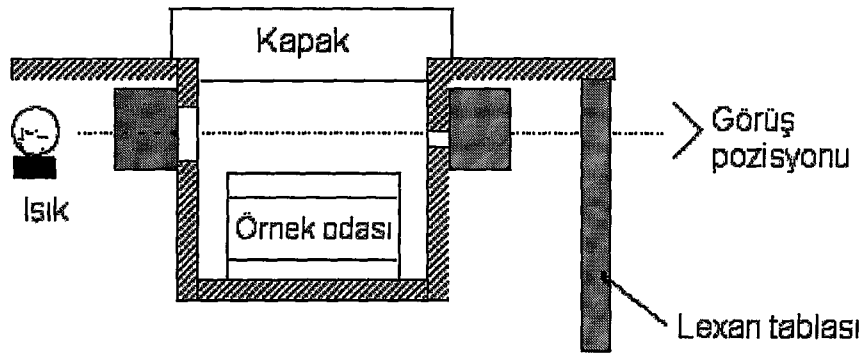
Tablo 3. CPD için kullanılan geçiş sıvılarının kritik sıcaklık ve kritik basınç değerleri

Basınçlar sıcaklık uygulanmasıyla belirlenmiştir. Kritik noktanın altında bir sıvı alınır, kritik noktanın üstünde gazın geçişi belirlenir böylece başlangıç ve bitiş noktaları arasındaki ilişkiye bakılır. Bu döngü CPD'nin tasarım ve performansına bağlıdır. CO_2 izotermalleri (Şekil 2.15.) günümüzde halen kullanılmaktadır. Oklar ise CPD'de farklı durumları temsil etmektedir.



Şekil 2.15. CO₂ izotermalleri

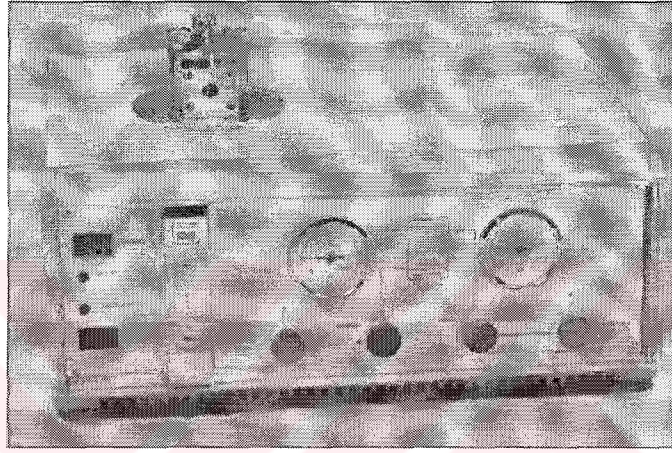
X durumu (odacık yarısından fazla dolu) göz önüne alınırsa ve ısı 10°C'den 35°C'ye çıkarılırsa sıvının gaza geçiş yapmasını sağlar. Basınç artışı sıvı genişleyene kadar oldukça hızlı olacaktır ve bu kademeye kritik ısıya ulaşılmalıdır. Bu *Going Around (Etrafından Geçme) Kritik Noktası* olarak adlandırılacaktır. Böyle durumlarda fazla basıncı düşürmek için basınç supabı kullanılır. Y durumunda (odacık yarısı kadar dolu) ise kritik basınca ve sıcaklığa ulaşma zamanında gerçekleşecektir. Z durumunda (oda yarısından az dolu) ise buharlaşma kritik sıcaklığa ulaşmadan gerçekleşecektir ve aynı zamanda örnek tamamen geçiş sıvısıyla kaplanmadığı için kaplanmayan kısımlarda buharlaşma meydana gelecektir. Bu nedenle tüm hacminin %50'lik kısmının doldurulması idealdir. Bu yıkamalar sırasında örneğin tamamen kaplanamaması durumunu engelleyecek ve ek olarak kritik sabitlere fazla basınç ya da buharlaşma gibi durumlar olmadan ulaşılmasını sağlayacaktır.



Şekil 2.16. CPD odası ve tasarımı

Ayrıca basıncı azaltma evresinde ısıyı bir şekilde kritik ısının üzerinde sürdürmek tavsiye edilen bir durumdur. Bunun yapılmasının nedeni gazın tekrar yoğunlaşmasından kaçınmaktır. Bunun dışında, basıncın eşitlenmesi sürecinde örneğin zarar görmemesi için bu azaltma kontrollü olmalıdır (Anonim 1999).

Örnekler örnek odasında kururken çok değişik aygıtlar tarafından tutulurlar. Delikli metal taşıyıcılar ya da delikli plastik kapsüller bu amaçla kullanılabilir. Bu taşıyıcılardaki delikler buharlaşmayı ve dehidrasyon sıvısının uzaklaşmasını kolaylaştırır. Hücrelerin lamellere ya da plastik petrilere tutunması sağlandıysa bu lamelleri üst üste dizerek kurutulan örnek sayısını arttırmak mümkündür.



Şekil 2.17. Kritik nokta kurutucusu

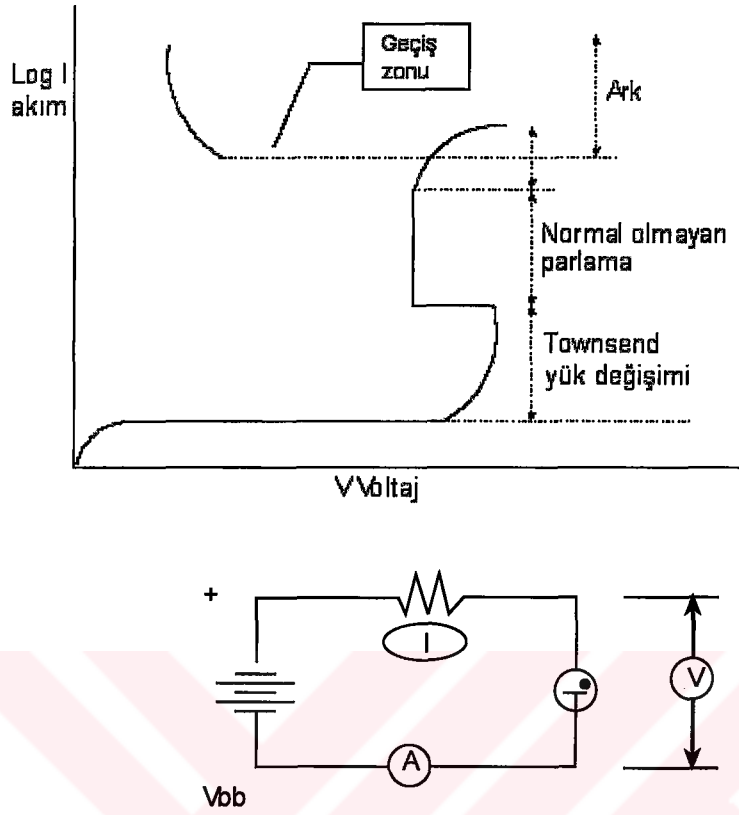
2.5.4. Kaplama

Taramalı elektron mikroskopunda inceleme örneğin üzerine elektron gönderilmesi ve gönderilen elektronların örnek yüzeyinden farklı yansması ve yansıyan bu sinyallerin değerlendirilmesi sonucunda yapılır. Buna göre örnek yüzeyinin görüntülenebilmesi için elektronları en iyi şekilde yansıtacak bir medde ile kaplanması gereklidir. Aynı zamanda inceleme sırasında örnek üzerine gönderilen elektronlar da örneğe yük kazandırır, örneğin yapısını bozar, bu nedenle taramalı elektron mikroskopunda incelenecek preparatların iletken olması gerekir. Bu hem görüntü kalitesini hem de çözünürlüğü artırır. İletken olmayan örnekler genelde iyi iletken maddelerle kaplanır. Bunlar altın, paladyum, platin ve bazen de alüminyum olabilir. İletken olan maddelerin inceleme için kaplanmasına gerek yoktur.

Kaplama işlemi, “saçarak kaplama” (sputter coater) adı verilen özel kaplama cihazlarında yapılır. Önce ortamdaki havanın argon gazıyla yer değiştirmesi, daha sonra vakumlu ortamda plazma fazına geçen altın-paladyum taneciklerinin örneğin üzerine istenilen kalınlıkta saçılması sağlanır.

Üstte bahsedilen saçılma, gazlı parlama durumunda anot ve katot arasındaki yük değişimiyle sağlanır. Bu olay uygun gazın ve uygun materyalin seçilmesiyle güçlendirilebilir. Kaplama kalınlığı alınan mikrografların

kalitesinin iyi olmasında oldukça etkilidir, fazla kalınlık gölgeleme etkilemesine neden olur, az kalınlıkta ise çözünürlük düşer, örnek yüklenir.



Şekil 2.18. Gazlı yük alışverişindeki akım karakteristikleri

Eğer Argon gibi ağır bir gaz katot gaz tüpüne konursa, serbest iyonlar ve elektronlar diğer elektroda hareket edecektir ve bu sayede düşük bir akım oluşacaktır.

Voltajın artırılmasıyla, elektronların gaz atomlarıyla çarpışması sonucu bir iyonizasyon meydana gelir ve bu "Townsend" yük değişimi olarak adlandırılır. Voltaj kırılma potansiyelini (*breakdown potential*) aştığında ise kendini besleyen ışıkla karakterize edilen parlak bir yük değişimi meydana gelir.

Akım yoğunluğu ve voltaj azalması (voltage drop) göreceli olarak sabit kalır, parlaklığın arttığı alanda ise toplam akımdaki artış doyuma ulaşır. Halihazırda bulunan voltajın artışıyla akım yoğunluğu ve voltaj düşüşü artar, buna *normal olmayan parlama alanı* (*abnormal glow region*) adı verilir.

Mevcut enerji kaynağındaki daha fazla artış katot noktasına doğru parlamayı arttıracaktır ve burada ark yük değişimi belirgindir.

Böyle kuvvetli bir yük değişimi meydana geldiğinde, tüpte karakteristik parlak yük değişimi sergilenecektir. Yapılan bu türlü adlandırmanın sebebi bu olayın ışık parlamasıyla gerçekleşmesidir. Serbest

iyonların ve elektronların diğer elektroda hareketi sırasında Bir yük değişimi olduğu bilinmektedir. Bu yük değişimi katottaki pozitif iyon bombardımanı ile hareketlenen iyonların hareketlenmesi sonucu meydana gelen ve kendini besleyen bir yük hareketidir. Bu hareket ikincil elektronların ve güçlendirilmiş iyonların oluşmasına neden olur. Sonuçta pozitif iyonların aşırı hareketlenmesiyle katot yakınında pozitif yüklü bir alan oluşur. Voltajdaki düşüş ise *katot düşüşü (cathode fall)* olarak adlandırılır. Eğer yük değişimi uzun ve dar bir tüpte olursa çeşitli karakteristikler sergileyecektir.

Crookes karanlık alanı denilen alandaki pozitif iyon yoğunluğu oldukça yüksektir. Sonuçta bu alanla katot arasında oldukça dikkat çekici bir voltaj düşüşü (voltage drop) tespit edilmiştir. Oluşan elektrik alanı katottaki ikincil elektron yayılımını meydana getiren pozitif iyonları hızlandırır. Bu elektronlar anot doğrultusunda hızlanırlar ve yük değişimine neden olan pozitif iyonların iyonizasyonunu sağlarlar. Ortamda gaz bulunması sonucu da negatif parlaklık bölgesinde şiddetli bir ışık parlaması görülür. Bu aşamadan sonra elektronlar yetersiz iyonlaşma enerjisine ya da tahrik enerjisine sahip olurlar, bu alanda *Faraday karanlık alanı* denir. Anoda doğru küçük ve hızlandırılmış olan bir iyonizasyon tahriki oluşur, böylece gaz tekrar parlak hale geçer.

Parlak yük değişimi durumunda katot iyon bombardımanına maruz kalır, katot materyalindeki erozyon da *plazma saçılması (plasma sputtering)* olarak adlandırılır. Saçılmayı takiben saçılan atomların çok yönlü depolanması sonucu orijinal katot materyalin kaplanması gerçekleşir. Bu uygulama taramalı elektron mikroskopunda örnek yüzeyinin görünür hale gelmesini sağlamak için elektrik iletkenliği olan ince bir film oluşturulmasını amaçlar. Elektrik iletkenliği olan film yüklenmeyi engeller, ısı hasarını azaltır ve ikincil elektron yayılımını güçlendirir.

Direk akım (direct current), kaplama için en çok kullanılan düzenlemede, negatif katot hedef materyalin saçılmasını sağlar (tipik olarak hedef materyal için altın kullanılır), kaplanan örnek anot tarafında yer alır (anot topraklanmıştır ve etkili bir zemin potansiyeli vardır). Arzu edilen çalışma basıncı (relative vakuum) genelde iki kademeli olan devirli pompayla sağlanır. Argon gibi bir gazın içeri alınması ise hassas kontrol supabıyla gerçekleştirilir.

Saçılma sırasındaki parlak yük değişimi hedef materyalin ve çevresel gazın basıncına bağlıdır. Hedef materyal için daha çok altın, altın-paladyum, platin ve gümüş serileri kullanılır. Altın yüksek elektrik iletkenliği nedeniyle tercih edilen bir materyaldir. Saçılma başı ve saçılma güç kaynağı karşıdaki hedef örneğin sınırları üzerinde etkili olacaktır. Depolanma miktarı akım bağımlı olarak gerçekleşir. Eğer doğru parlaklık alanında çalışılıyorsa karakteristikler daha önce anlatılan gibidir, akımdaki değişiklikler saçılma voltajındaki küçük değişimler için uygundur. Depolanma oranı sistemde denenen küçük basınç değişimlerine karşı ise hassas olmamalıdır.

Uygun saçılma kafası tasarımı düşük voltajda çalışmalıdır ve sonuçta cihaza verilen enerji düşük olmalıdır. Böylece hedef ve yüksek enerjili elektronlardan (hassas örnekler için en önemli hasar nedeni) kaynaklanan ışıklı ısınma azaltılır. Saçılma başının verilen materyal için *uygun tane büyüklüğü (finer grain size)* oluşturması gerektiği de belirtilmiştir. İçeri alınan gazın parlak yük değişimi sırasında parçalanmaması-bozulmaması gerekmektedir. Argon yüksek atomik kütleyle sahip olduğundan hedef materyalin etkili bombardımanı için uygun iyon kaynağını oluşturur. Bu etkinlik miktarı basınçla ters orantılı olan *main free path'e (mfp)* bağlıdır. Eğer mfp çok kısa olursa bombardıman için yetersiz bir enerji kaynaklık edecektir ve bu da hedeften saçılan materyalin hareketini engelleyecektir. Eğer mfp çok uzun olursa eksik yetersiz çarpışmalar meydana gelecektir ve buna ek olarak saçılan materyalin akışı gaz difüzyonu nedeniyle değişecek ve etkili çok yönlü yük değişimi azalacaktır.

Eğer saçılma başında bahsedilen karakteristikler gerçekleştirilirse uygulamaların çoğunda örneğin konduğu yeri soğutmak gereksizdir. Eğer bu karakteristiklere uyulmazsa örneğin temel ısısının azalmasına neden olacaktır ve zaten çoğu örneğin ısı geçirgenliği düşüktür. Hassas örneklerde ön ısıtma yapılması ve temel ısının azaltılması istenir ve bu kaplamada uygun tane büyüklüğünün azalmasını sağlar. Açık ki performansla uyummadığı halde bu çok yönlü sistem taramalı elektron mikroskopunda istenen bir durumdur. Özellikle uygun tanecik büyüklüğü, tek tip kaplama ve düşük sıcaklık girişi gibi karakteristikler göz önüne alınırsa uygun soğutucu sistemin gerçekleştirilmesi mümkün olacaktır. Ampirik tasarımlarla da kanıtlandığı gibi parlak yük değişimi için pozitif iyonların oluşması şarttır. Bazı saçılma kafalarında disk hedefle birlikte halkasal bir mıknatıs ve toplayıcı bulunur.

Bütün sonuçlar kaplayıcıda az enerji girişli düşük voltajın temel alındığını gösterir. Işıklı ısınma ve elektron bombardımanı dolayısıyla oluşabilecek ısı hasarı olasılığı ise burada önemsiz tutulmaktadır.

ÖZELLİKLER	DEĞERLER
Vakum (Torr)	0,1–0,05 Torr
Saçılma voltajı (V)	100–150 V
Akım (A)	0–50 mA
Kaplama kalınlığı (nm/dk)	0–50 nm/dk
Parçacık büyüklüğü (nm)	5 nm'den küçük
Isı miktarı (°C)	10°C'den düşük

Tablo 4. Kaplama cihazındaki parametreler

Hedef materyalin voltajla depolanma akımının ve vakumun seçiminde kesin parametreler kullanılması tatmin edici olabilir. Bu koşullar sağlandığında 10 nm kaplama kalınlığına, 2 nm tanecik büyüklüğüne ve

1°C'den daha düşük ısılara ulaşmak mümkün olabilir. Kaplama cihazının kullanımı kesin olarak belirlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobunun performansının daha da artabilmesi kaplama cihazı serisinin kapasitesine bağlıdır.

Katodda hedef materyal olarak sıklıkla altın kullanılır. Daha küçük tanecik büyüklüğü ve daha ince kaplama için hedef materyal olarak ise krom kullanılabilir. Ancak bu materyalle saçılmayı gerçekleştirebilmek için devirli vakum pompasıyla sağlanandan daha iyi bir vakum sağlamak gerekmektedir.



Şekil 2.19. Saçarak kaplama cihazı

2.6. Doku Hazırlamada Fiziksel Yöntemler

2.6.1. Dondurma Yöntemi

Bu teknikte dondurulan doku ve organlar SEM'de incelenir. Bu teknik hızlı preparasyona olanak sağladığı gibi örneği de canlılık özelliklerine yakın halde korur. Buz oluşumu nedeniyle artefaktlar olsa da bunlar dikkate değecek derecede önemli sonuçlar doğurmazlar. Ancak bu yöntem kullanıldığında dokunun çabuk incelenmesi, düşük büyütmede çalışılması gerekir.

Donmuş örneklerin incelenmesini mümkün kılan soğuk preparat tablasını içeren SEM ilk olarak Echlin ve Moreton (1973) tarafından denenmiştir. Bu yöntemin sonucu olarak günümüzde Kriyo SEM olarak adlandırılan elektron mikroskobu ve bunun preparasyonu için kullanılan özel aletler geliştirilmiştir.

2.6.2 Dondurma Kurutma Yöntemi

Bu teknik örneğin dondurulmuş haldeyken kurutulması esasına dayanır. İlk kullanılma amacı kültür hücrelerinin SEM’de incelenmesi içindir. Tespitin ardından çok az suyla kaplanmış hücreler sıvı nitrojende soğutulmuş Freon 12 vasıtasıyla 158°C’ye soğutulur. Örnekler 80°C’deki dondurma kurutma ünitesine aktarılır. Birkaç saat sonra suyun süblimleşmesinin ardından örnekler 40°C’ye ısıtılır, böylece 2–6 saat içinde örneklerin kurutulması sağlanmış olur. Bir sıvı nitrojen soğutma cihazı kurutma işlemi sırasında ortaya çıkan suyu tutmak için kullanılır. Daha sonra örnekler SEM’de incelenmek üzere kaplanır.

Bu yöntem CPD işlemi sırasında çeşitli artefaktların oluşmasını önlediği gibi özellikle hücrelerdeki filopodya, mikrovilli, lamellipodya gibi yapıların incelenmesinde kullanılır (Porter et al. 1972). Bu yöntemin geliştirilmesi incelenen örneklerdeki ayrıntıların korunma olasılığını arttıracaktır.

2.7. Doku Hazırlamada Kullanılan Özel Yöntemler

2.7.1 Işık Mikroskobu İçin Hazırlanan Dokuların SEM İçin Hazırlanması

Birçok çalışmada örnekler ışık mikroskobunda incelenmek amacıyla parafine ya da kolodyuma gömülür. Bu doku bloklarının da basit bir prosedürle SEM için uyarlanması mümkündür (Hodgkin 1972). Parafin benzenle iki yıkama sonucunda uzaklaştırılır, ardından doku %100’lük etanol ya da asetona alınır, CPD metodu kullanılarak kurutulur, kaplanır ve SEM’de incelenir. Kolodyuma gömülmüş örnekler ise asetonla muamele edilir, böylece kolodyum uzaklaştırılır ve örneğin hazırlanmasına devam edilir.

2.7.2 Replikasyon

Replikasyon, deri ve diş gibi canlı örneklerin yerinden oynatılmadan negatif ya da pozitif kopyalarının oluşturulması esasına dayanan, indirekt incelemeye olanak sağlayan bir yöntemdir. İncelenecek deri dokusunda tüylerin korunmasının istenildiği bölgelerde silikon lastik ya da epoksi kalıp kullanılarak derinin kopyası çıkarılır. Bu teknikte silikon lastik deriye bastırılır, oluşan kopya alınır, kaplanır ve SEM’de incelenir. Avuç içi derisinde ise selülozik bir tabaka avuç içine birkaç dakika bastırılır, oluşan negatif kopya direkt olarak SEM’de incelenebilir (Fujita et al. 1961).

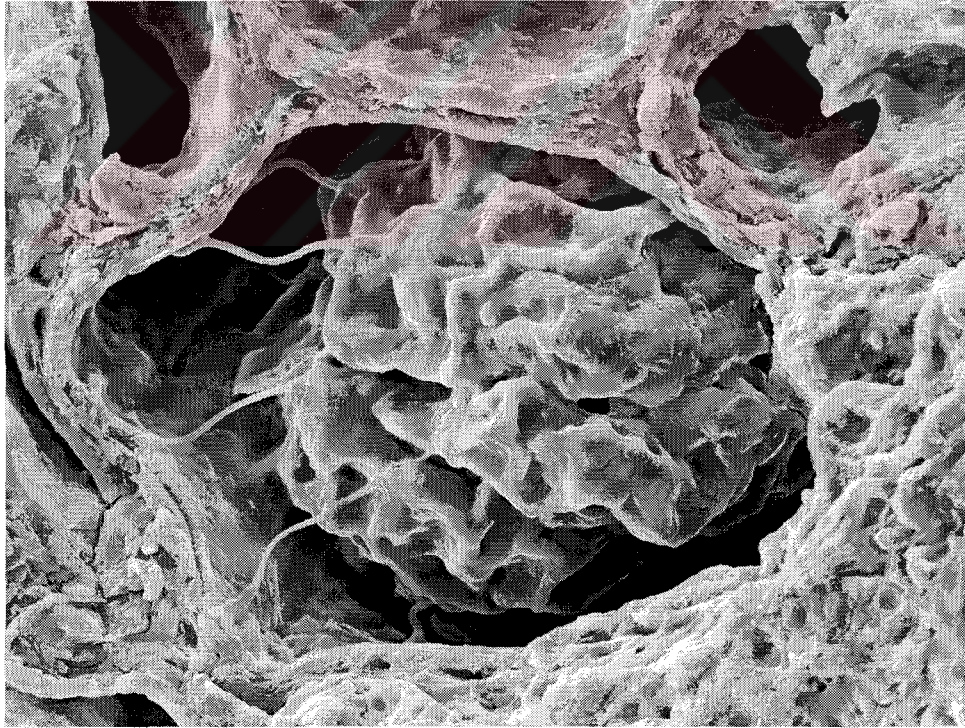
Mine, dentin gibi sert dental yapıların incelenmesi iki basamakta gerçekleştirilir. Orijinal materyal bir tarafı asetonla yumuşatılmış olan asetat teyple kopyalanır. Islak taraf örneğe gelecek şekilde yerleştirilir, teybin

yüksek olmayan bir basınçta sertleşmesi sağlanır. Negatif kopya alındıktan sonra içi silikon lastikle doldurulur ve polimerizasyonunun gerçekleşmesi beklenir. Polimerizasyon gerçekleşince pozitif kopya kaplama ve inceleme için hazırdır. Yumuşak dokularda ve kırılğan yapılarda ise hidrokolloid bir materyal kullanılabilir (Pameijer ve Stallard 1973).

2.7.3 Dondurma Kırma Yöntemi

Bu metodun uygulanmasıyla örneğin hem iç hem de dış yapıları incelenebilir. Bu metotla intraselüler yapıların ekstraselüler yapılarıyla ilişkilerini öğrenmek de mümkündür.

Sıvı nitrojende dondurulan doku bir bıçak yardımıyla ikiye kesilir, parçalar tekrar sıvı nitrojene atılır. Kırılma yönünü kaybetmemek için doku çentik atılarak işaretlenir. Dondurup kırma örneğin preparasyonu sırasında her aşamada gerçekleştirilebilir. Eğer fiksasyon ardından bu işlem uygulanacaksa dokunun gliserinde bekletilmesi gereklidir (Nemanic 1972). Eğer bu işlem % 70'lik alkolden sonra uygulanacaksa sıvı nitrojende doku kendiliğinden kırılabilir (Lim 1971). Bu kendiliğinden kırılma özellikle iç kulak gibi hassas yapılarda oldukça fonksiyoneldir. Dondurma kırma metodu %100'lük alkolden ya da örnek CPD ile kurutulduktan sonra da uygulanabilir (Kessel ve Shih 1976)..



Şekil 2.20. Dondurma-kırma yöntemiyle hazırlanmış böbrek; glomerul ve bowman kapsülü (Büyütme:2500x)

Şekil 2.20.'de görülen örnek,2 saat GA ile fiske edildikten sonra sıvı nitrojende dondurulmuş, kırılmış ve GA ile tekrar 1 saat fiske edilmiştir. Örnek CPD'de kurutulmuş 20 nm kalınlığında Au/Pd ile kaplanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kültür Hücreleri

Taramalı elektron mikroskobu için kültür hücrelerinin hazırlanması aşamasında 12, 24 ve 48 saat kültüre edilmiş maymun böbrek fibroblastları olan Vero hücreleri kullanıldı. Hücreler 24 gözlü kültür kaplarında ince lameller üzerinde yetiştirildi.

SEM için örnek hazırlama prosedüründe hücreler sırayla fiksasyon, postfiksasyon, dehidrasyon, kurutma, kaplama aşamalarından geçirildi. Bu işlemlerden geçirilen hücreler taramalı elektron mikroskopunda incelendi. Örneklerin hazırlanışı ve sonuçlar Bölüm 4.1.de verilmiştir.

3.2. Kan Hücreleri

Parmak ucu delinerek elde edilen 1ml periferik kan bir lamel üzerine damlatılarak yayma preparasyon hazırlandı.

SEM için örnek hazırlama prosedüründe örnekler sırayla fiksasyon, postfiksasyon, dehidrasyon, kurutma, kaplama aşamalarından geçirildi. Bu işlemlerden geçirilen hücreler taramalı elektron mikroskopunda incelendi. Örneklerin hazırlanışı ve sonuçlar Bölüm 4.2.de verilmiştir.

3.3. Spermatozoonlar

Laboratuvarda devam eden çalışmadan kalan ejaküle spermatozoonlar kullanıldı.

SEM için örnek hazırlama prosedüründe spermatozoonlar sırayla fiksasyon, postfiksasyon, dehidrasyon, kurutma, kaplama aşamalarından geçirildi. Bu işlemlerden geçirilen hücreler taramalı elektron mikroskopunda incelendi. Örneklerin hazırlanışı ve sonuçlar Bölüm 4.3.te verilmiştir.

3.4. Ovositler

Laboratuvarda devam eden başka bir çalışmada Bulb-C türü farelerden alınan kümülüs ovosit kompleksleri ve çıplak ovositler kullanıldı.

SEM için örnek hazırlanma prosedüründe ovositler sırayla fiksasyon, postfiksasyon, dehidrasyon, kurutma, kaplama aşamalarından geçirildi. Bu işlemlerden geçirilen hücreler taramalı elektron mikroskopunda incelendi. Örneklerin hazırlanışı ve sonuçlar Bölüm 4.4.te verilmiştir.



ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Günümüzde birçok hücre, hücre kültürü ve doku kültürü tekniklerinin gelişmesiyle beraber izole edilip kullanılabilir. Bu da beraberinde in vitro ortamda normal ve normal olmayan hücrelerin incelenmesini kolaylaştırırken hücre farklılaşması, hücre-hücre etkileşimleri, hücre transformasyonları ve hücre kimyası gibi konularda bilgi edinmemizi kolaylaştırmaktadır. Işık mikroskoplarının sınırlı çözünürlükleri ve alan derinlikleri nedeniyle yüzey incelemelerinde taramalı elektron mikroskopları böyle araştırmalar için tercih edilmektedir (Kessel ve Shih 1976).

İn vitro fertilizasyon tekniklerinin gelişmesiyle spermatozoon ve ovositlerin yapısının anlaşılması, döllenme sırasında birbirleriyle olan ilişkileri gibi konular önem kazanmıştır (Xia et al. 2001). Birçok canlının üreme hücrelerinin gelişimi elektron mikroskobu kullanılarak tanımlanmaya çalışılmıştır (McClusky 2003). Yine fertilizasyon esnasında Zona pellucida ya da ovositlerdeki yüzey değişiklikleri, zigot gelişimi ve bölünmeler üzerine taramalı elektron mikroskobu kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (Phillips and Shalgi 1980). Spermatozoonlardaki anomaliler bu yöntem kullanılarak tespit edilebilir.

Tek hücrelerle ilgili çalışmalar bütün zorluklarına rağmen süregelmektedir. İzole hücreler olan kan hücreleri, spermatozoon, ovosit, kültür hücreleri gibi bağımsız olarak bulunan hücrelerin taramalı elektron mikroskopunda çalışılması oldukça zor olan materyallerdir. Belli bir tutunacak dokuya ihtiyaç duymayan bu hücrelerin incelenme için hazırlanmaları aşamasında yüzey yapılarının bozulmadan korunması oldukça güçtür ve bu da yapılan çalışmalarda araştırmacıların önüne problem olarak çıkmaktadır. Aynı zamanda bu hücreler mekanik işlemlere maruz kaldıklarında bulundukları yüzeylerden ayrılmakta ve kaybolmaktadırlar, özellikle ovosit gibi yuvarlak hücrelerde bu problem oldukça önemli olmaktadır. Ovositin yüzeyini kaplayan Zona pellucida'nın ve ovosit yüzeyinin neye benzediği araştırmacılar için hala tartışılan bir konu olmaktadır. Zona pellucida'nın ve ovosit hücrelerinin SEM için hazırlanması sırasında korunması çok zordur. Yapılan birçok yayında yüzey yapıları farklı bulunmuş ve bunun artefaktlar nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (Phillips ve Shalgi 1980). Yine örnekleri SEM için hazırlamanın var olan birçok değişken (mekanik, gözlemsel, deneysel) nedeniyle zor olduğu bilinmektedir.

Bu çalışma hem incelenmesi bu kadar önemli ve yaygın olan izole hücrelerin hazırlanmasını geliştirmeyi hem de yukarıda sözü edilen soru işaretlerini ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır.

İzole hücrelerin taramalı elektron mikroskopunda incelenmesi için hazırlama yöntemlerinin geliştirilmesini amaçlayan bu çalışma için aşağıdaki yöntemler izlenmiştir.

4.1. Kùltür Hùcreleri

Taramalı elektron mikroskobu için kùltür hùcrelerinin hazırlanması aşamasında 12, 24 ve 48 saat kùltüre edilmiş maymun böbrek fibroblastları olan Vero hùcreleri kullanıldı. Bu hùcreler 24 gözlü kùltür kaplarında ince lameller üzerinde yetiştirildi. Bu hùcreler tek katlı hùcreler oldukları için bu tür çalışmalarda tercih edilen hùcrelerdir (Santos et al. 2001).

Değişik sürelerde kùltüre edilen hùcrelerin vasatları alındıktan sonra kurumaya neden olmadan hùcreler +4°C' de ya Trump's fiksatifinde (pH:7,2-7,4) ya Karnowsky çözeltisinde (pH:7,2-7,4) ya da %2,5'lik gluteraldehit 0,1M sodyum fosfat tamponunda (pH:7,2-7,4) fiske edildi. Fiksasyon süreleri 0,5 saatten başlayarak 1 saat, 2 saat, 3 saat olarak artırıldı.

Fiksasyondan sonra hùcreler kurutulmadan sodyum fosfat tamponu ile 30dk yıkandı.

Bazı hùcreler hemen dehidrasyona alınırken bazı hùcreler ise %1'lik OsO₄ + 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH:7,2-7,4) ile post fiksasyona tabii tutuldu. Postfikse edilen hùcrelerin fiksasyon süreleri 15dk.dan başlayarak 30dk, 60dk, 90dk.ya kadar çıkarıldı.

Postfikse edilen hùcreler kurutulmadan sodyum fosfat tamponu ile 30dk yıkandı.

Fiksasyon aşamasının ardından hùcreler dehidrasyona alındı. Bu aşamada iki değişken olarak hem etanol ya da aseton (Applichem) kullanıldı. Hùcreler, oda ısısında %50-%75-%95 ve %100'lük etanol ya da aseton serilerinden geçirildi. Her aşamada hùcreler 5dk.dan başlayarak 10dk, 15dk ve 20dk tutuldu.

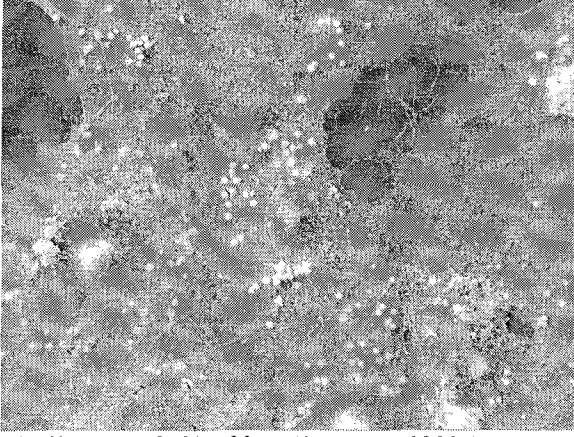
Dehidrate edilen hùcrelerin bir kısmı havada kurutulurken bir kısmı kritik nokta kurutucusuna (CPD, Emitech K850) alındı. CPD'deki hùcreler en az 3'ten başlayarak en fazla 8'e ulaşan banyo seferlerine tabii tutuldu.

Lameller alüminyum iletken bantla (EMS), iki taraflı yapıştırıcı karbon bantla (EMS) ya da iletken karbon yapıştırıcı (EMS) kullanılarak örnek tutuculara (EMS) yapıştırıldı.

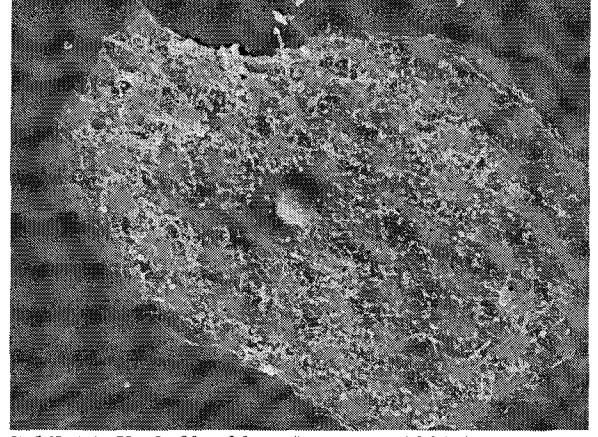
Örnek tutuculardaki lameller kaplama cihazı vasıtasıyla (Emitech K850) 10nm kalınlıktan başlayarak 15nm, 20nm ve 25nm kalınlıklarında altın paladyum ile kaplandı.

Hazırlanan preparatlar taramalı elektron mikroskobunda (Leo 438 VP) incelendi.

İncelenme sonucunda hücreler için belirli kıstaslar bulundu. İncelenen hücreler fibroblast benzeri hücreleri olduğu için bu hücrelerin kültür süreleri uzatıldığında yaşlandıkları ve dolayısıyla lamellere çok iyi tutundukları için yüzeyden çok fazla ayırt edilemedikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.1.-Şekil 4.2.). Yapılan çalışmalarda 48 saat kültüre edilen hücrelerden daha iyi sonuç alınmıştır.

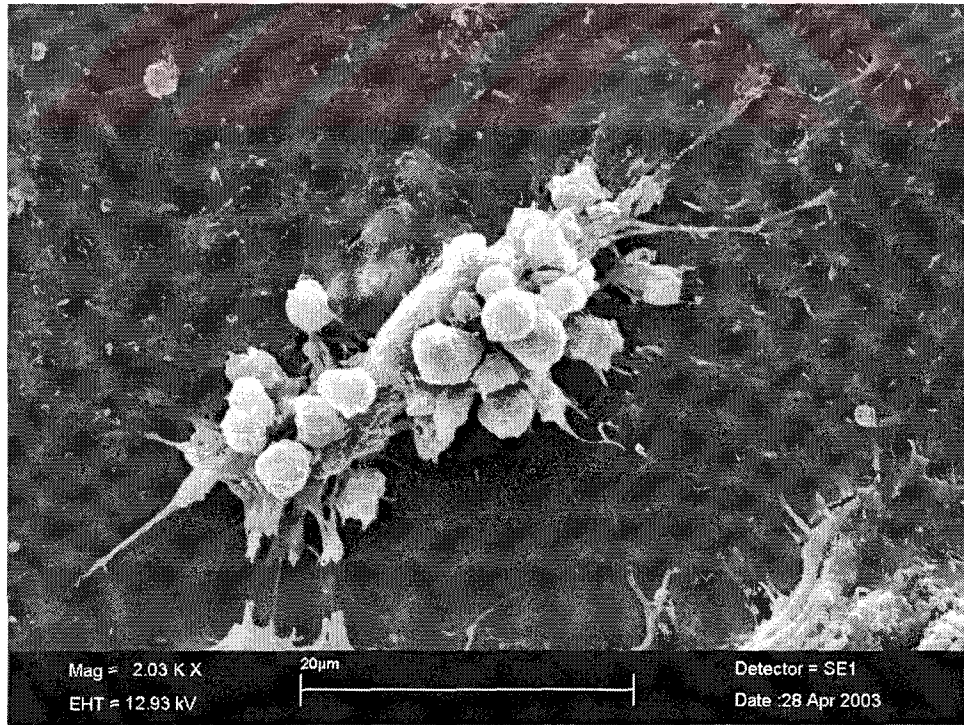


Şekil 4.1. Yaşlı fibroblast (Büyütme: 1000x)



Şekil 4.2. Yaşlı fibroblast (Büyütme: 1000x)

Fiksasyon süresini belirlemede az fiske edilen hücrelerin yapılarının korunmadığı (Şekil 4.3.) çok fiske edilen hücrelerde ise kırılmalar tespit edilmiştir. Yine fiksatif tercihinde Trump's çözeltisinin kullanılan diğer fiksatiflere nazaran daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle hücrelerin 1 saat Trump's çözeltisi (pH:7,2-7,4) ile fiske edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.3. Yeteri kadar fiske edilmemiş Vero hücresi. Yüzey yapılarının korunamadığı, hücrenin şeklini kaybettiği gözlemlenmektedir (Büyütme: 2030x)

Hücrelerin 30dk sodyum fosfat tamponu ile yıkanmasının yeterli olduğu görülmüştür.

Vero hücrelerinin %1'lik OsO_4 + 0,1 M sodyum fosfat tamponu (pH:7,2–7,4) ile 30dk postfiksasyonunun yüzey yapılarının korunması açısından ideal olduğu bulunmuş, daha uzun ve kısa fiksasyon sürelerinde iyi sonuç alınamamıştır.

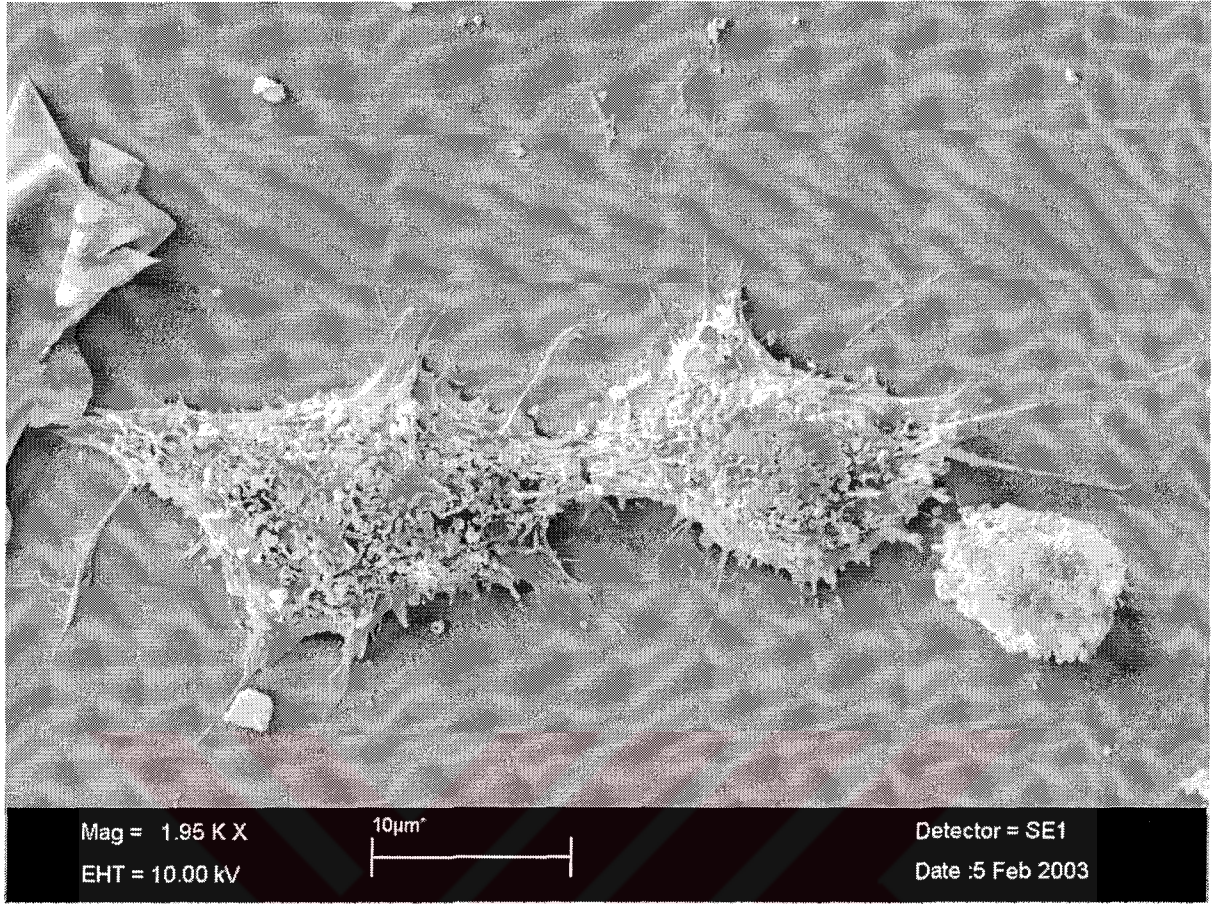
Dehidrasyonda yayınlarda da özellikle kullanıldığı belirtilen (Santos et al. 2001) ve yüzey gerilimini en aza indirdiği bilinen etanol kullanıldı. Etanol CPD'de kurutmaya geçiş için önerilmektedir (Anonim 1999). Hücrelerin %50-%75-%95-%100 etanol serilerinde 10dk dehidrate edilmesinin iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir.

Kurutmada havada kurutulan hücrelerin yüzey yapılarını koruyamadığı ancak kritik nokta metoduyla kurutulan hücrelerin ise iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Lamellerde kültüre edilen bu hücrelerin mekanik bir işlem olan CPD'de kuruma sırasında kaybolduğu gözlenmiş ve bu kaybı en aza indirmek için dehidrasyon sıvısının CO_2 ile yer değiştirdiği basamak olan banyo aşamasının 3 kez tekrarlanmıştır.

Kurutulan örnekler örnek tutuculara alüminyum iletken bantla iki taraflı yapıştırıcı karbon bantla ya da iletken karbon yapıştırıcı kullanılarak örnek tutuculara yapıştırılmıştır ve bu üç yapıştırıcının kullanılmasının sonucu etkilemediği gözlemlenmiştir.

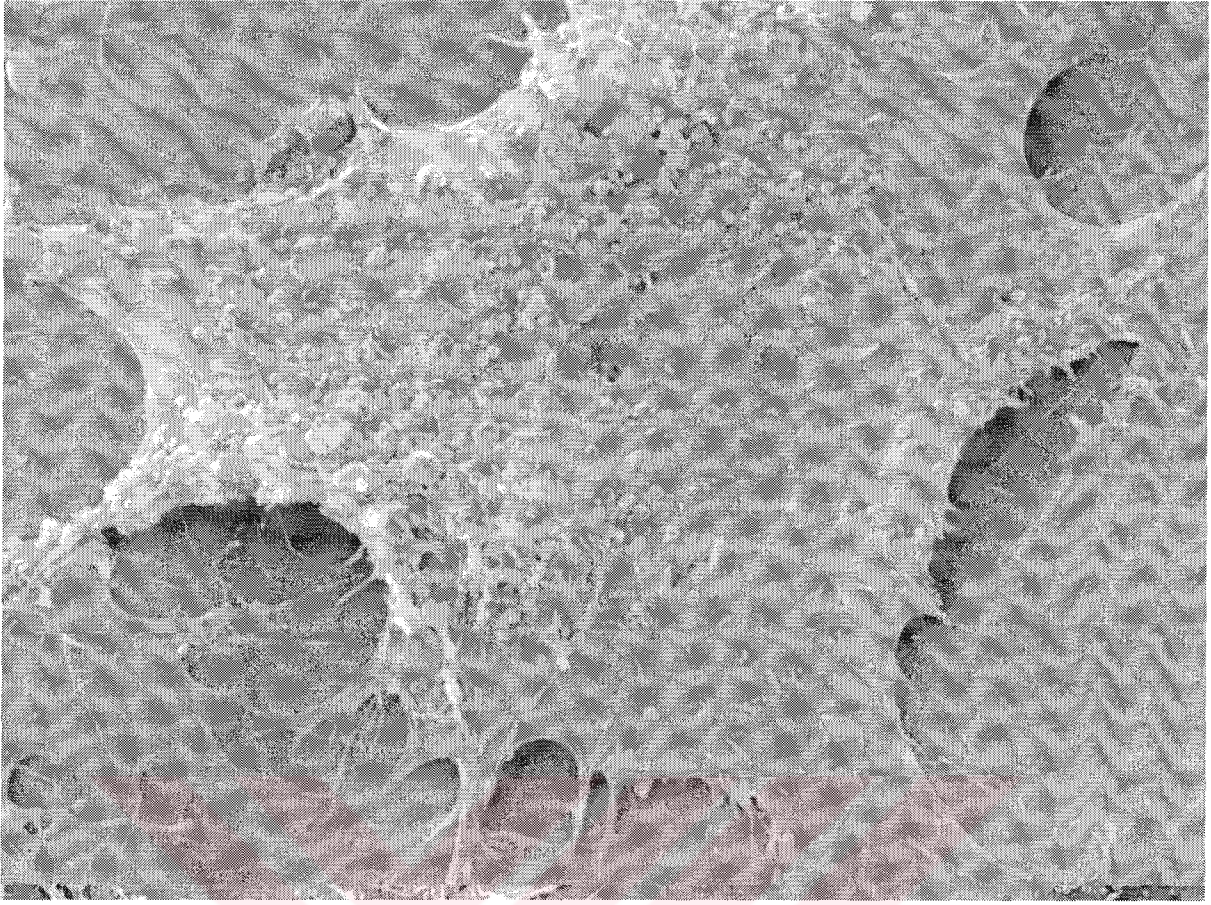
Kaplama için optimum kalınlık 10nm olarak bulunmuş ve hücreler 10nm kalınlığında Au/Pd ile kaplanmıştır. Daha kalın kaplamalarda gölgeleme efekti oluşurken daha ince kaplamalarda örnek yüklenmekte ve deformasyona maruz kalmaktadır.

Kaplanan örnekler taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir.



Şekil 4.4 Mitozun anafazındaki Vero kültür hücreleri (Büyütme: 1950x). 1 saat Trump's ile ardından 30dk OsO_4 ile tespit edilen hücreler dehidrate edildi, CPD'de kurutuldu ve 10nm kalınlığında kaplandı.

Şekil 4.4.'te ve Şekil 4.5 'te görülen iki örnek yukarıda anlatılan prosedürlere uyularak hazırlanmıştır. Şekil 4.4. mitozdaki hücreleri göstermektedir. Şekil 4.5.'teki örnekte hücrenin filopod ve lamellipodları net olarak görülmektedir.



Şekil 4.5. Yaşlanmaya başlamış olan Vero kültür hücresi etrafında hücrelerle çok sayıda temas yüzeyi gerçekleştirilmişti. (Büyütme: 8000x). 1 saat Trump's ile ardından 30 dk OsO_4 ile tespit edilen hücreler dehidrate edildi, CPD'de kurutuldu ve 10nm kalınlığında kaplandı.

4.2. Kan Hücreleri

1 ml taze insan periferik kanı lamelin üzerine damlatıldı. Hücreler ikisi de yayınlarda kullanıldığı belirtilen Trump's fiksatifinde (pH:7,2–7,4) ya Karnowsky çözeltisinde (pH:7,2–7,4) ya da %2,5'lik gluteraldehit +0,1M sodyum fosfat tamponunda (pH:7,2–7,4) ,+4°C'de 20dk fikse edildi.

Fiksasyonla birlikte kan hücreleri havada 15dk kurutuldu.

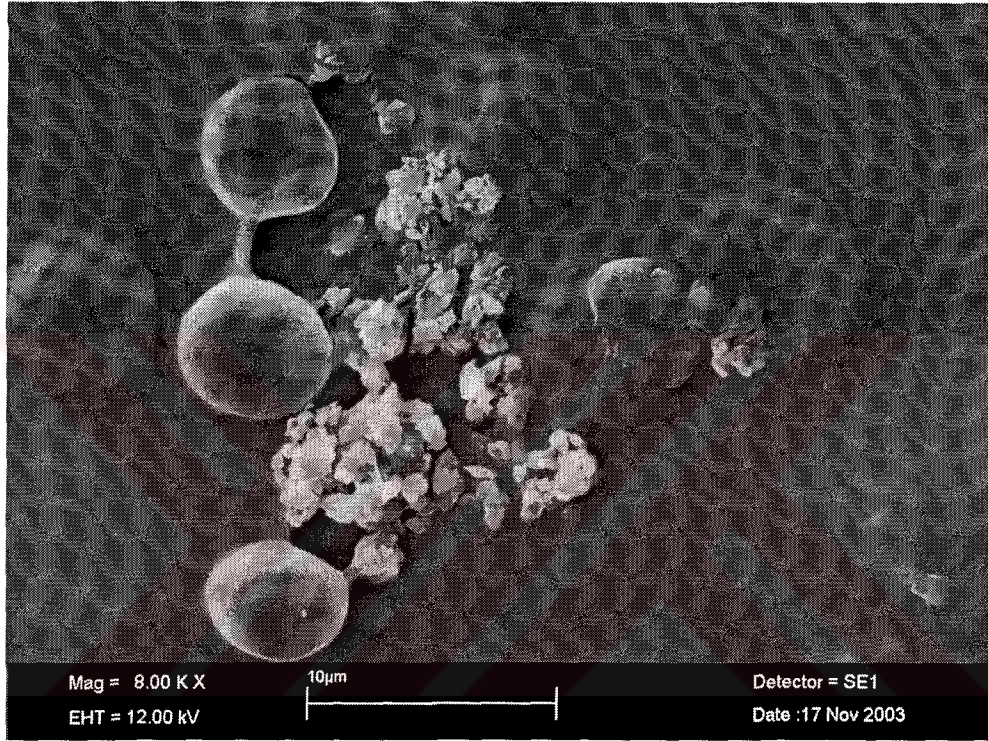
Lameller alüminyum iletken bantla (EMS), iki taraflı yapıştırıcı karbon bantla (EMS) ya da iletken karbon yapıştırıcı (EMS) kullanılarak örnek tutuculara (EMS) yapıştırıldı.

Örnek tutuculardaki lameller kaplama cihazı vasıtasıyla (Emitech K850) 10nm kalınlıktan başlayarak 10nm, 20nm ve 25nm kalınlıklarında altın paladyum ile kaplandı.

Hazırlanan preparatlar taramalı elektron mikroskopunda (Leo 438 VP) incelendi.

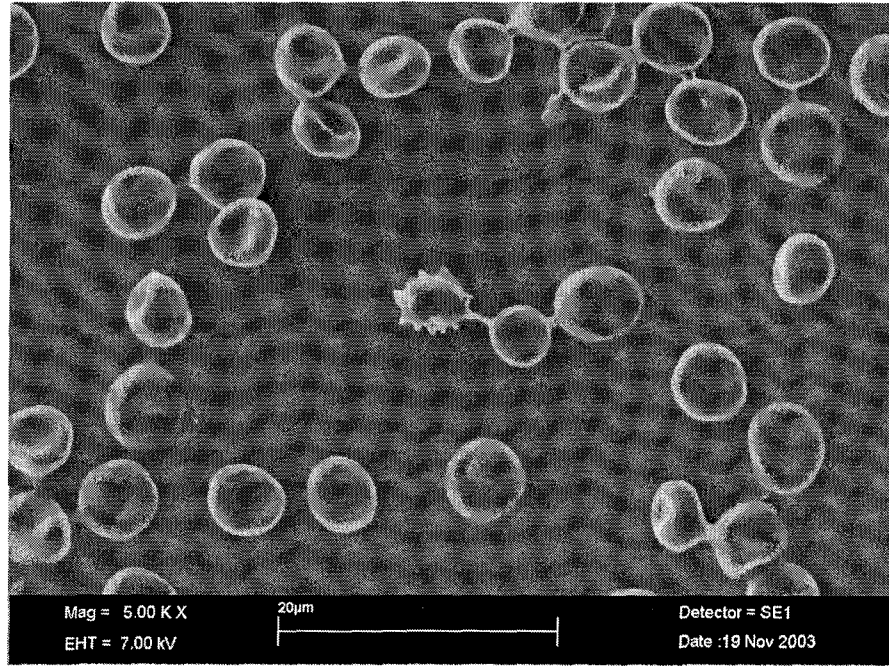
Yapılan yayma kan preparatı 15dk %2,5'luk gluteraldehit+0,1M sodyum fosfat tamponu (pH:7,2-7,4) +4°C'de 20 dk ile fiske edildi ve kurutuldu. Kurutulan preparat dehidrate edilmedi. Kan hücreleri 10nm Au/Pd ile kaplandığında optimum sonuç alınmıştır.

Şekil 4.6. bu prosedüre uyularak alınmış bir görüntüdür. Eritrositlerin ortasında megakaryositlerden oluşan kan pulcukları (trombositler) görülmektedir (Büyütme: 5000x, 16,50 kV).

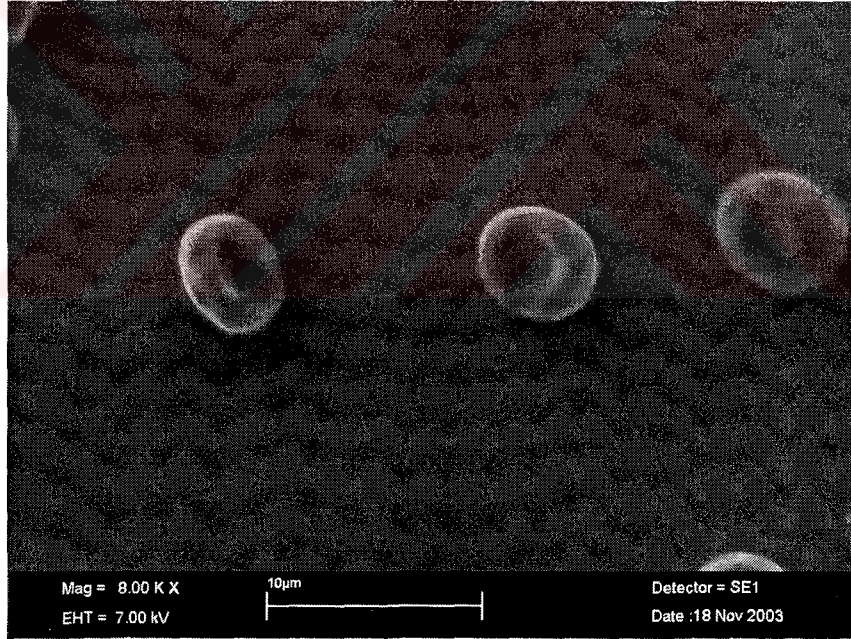


Şekil 4.6. Trombositler ve eritrositler. Lamel üzerindeki insan periferik kanı 15dk GA çözeltisi ile fiske edildi, havada kurutuldu, 10nm kalınlığında Au/Pd ile kaplandı.

Şekil 4.7.'de hipertonik Karnowski fiksatifinde tespit edilen eritrositin bikonkav yapısını kaybedip yüzeyinde çıkıntılar oluştuğu görülmektedir.



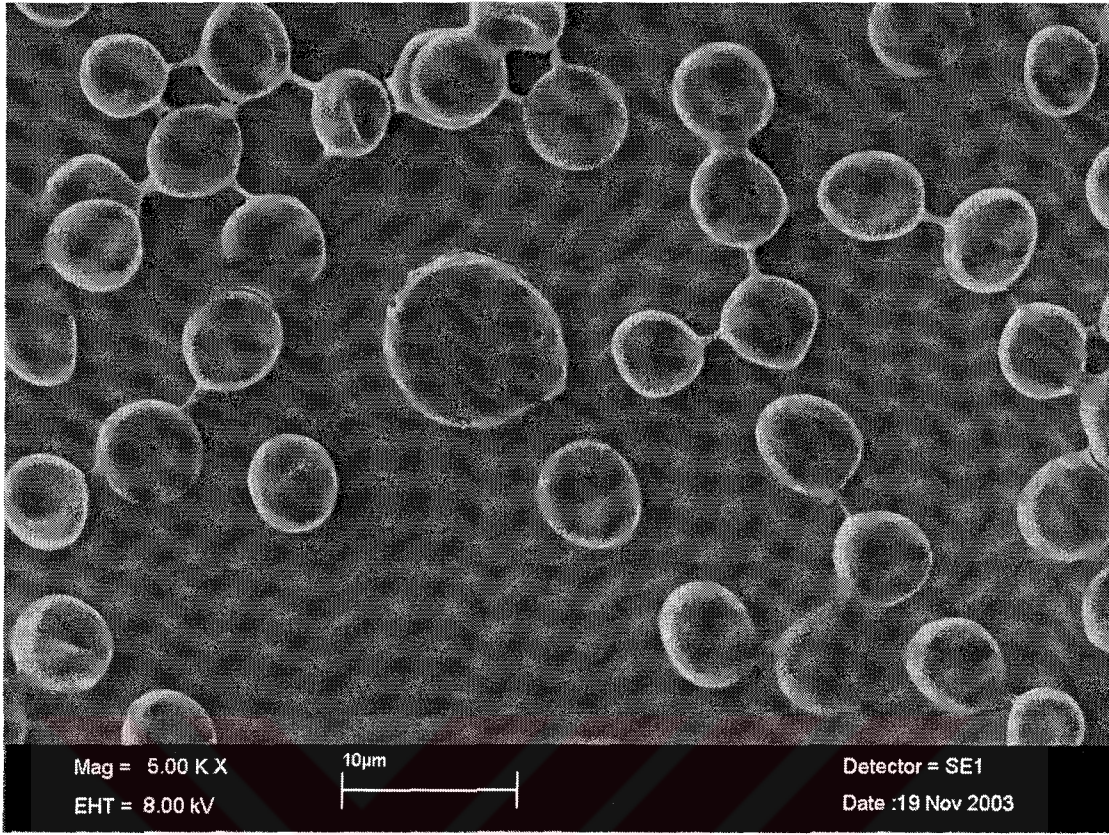
Şekil 4.7. Hipertonik KAarnowski fiksatifinde eritrosit (Büyütme:5000x). Lamel üzerindeki insan periferik kanı 15 dk GA çözeltisi ile fiske edildi, havada kurutuldu, 10nm kalınlığında Au/Pd ile kaplandı.



Şekil 4.8. Eritrositler. Lamel üzerindeki insan periferik kanı 15 dk GA çözeltisi ile fiske edildi, havada kurutuldu, 10nm kalınlığında Au/Pd ile kaplandı.

Şekil 4.8. bikonkav yapıları kaybedilmemiş, iyi fiske olmuş eritrositlerin 8000 büyütmede alınmış resmini göstermektedir.

Şekil 4.9.'da 5000 büyütmede 8 kV ile alınmış lökosit ve eritrositler görülmektedir.



Şekil 4.9. Eritrositler ve lökosit.

4.3. Spermatozoonlar

Laboratuarda devam etmekte olan deneyden arta kalan ejaküle spermatozoonlar kullanıldı. Bu spermatozoonlar sodyum fosfat tamponuyla üç kez 600g de 10dk santrifüj edilerek yıkandı.

Bu hücreler 1 saat, 2 saat ile 3 saatlik sürelerde +4°C'de (Mortimar 1994) Trump's fiksatifinde (pH:7,2-7,4), ya Karnowsky çözeltisinde (pH:7,2-7,4) ya da %2,5'lik gluteraldehit +0,1M sodyum fosfat tamponunda (pH:7,2-7,4) fikse edildi.

Fikse edilen hücreler sodyum fosfat tamponu ile 3 kez 600g de santrifüj edilerek yıkandı.

Bu aşamadan sonra iki yöntem izlendi. Ya hücreler %1'lik poli-L-lizin kaplı lameller üzerine damlatılarak alındı ya da sperm süspansiyonu 0,45µm çaplı bir filtreden geçirildi. Filtre üzerinde toplanan hücreler 10 ml taze tamponun filtreden geçirilmesi ile yıkandı, kurumamasına özen gösterildi.

Filtredeki ve lamel üzerindeki hücreler %50-%75-%95 ve %100'lük etanol ya da aseton (Applichem) serilerinden geçirildi. Her aşamada hücreler 5dk.dan başlayarak 10dk, 15dk ve 20dk tutuldu.

Dehidrate edilen hücrelerin bir kısmı havada kurutulurken bir kısmı kritik nokta kurutucusuna (CPD, Emitech K850) alındı. CPD'deki hücreler en az 3'ten başlayarak en fazla 8'e ulaşan banyo seferlerine tabii tutuldu.

Lameller alüminyum iletken bantla (EMS), iki taraflı yapıştırıcı karbon bantla (EMS) ya da iletken karbon yapıştırıcı (EMS) kullanılarak örnek tutuculara (EMS) yapıştırıldı.

Örnek tutuculardaki lameller kaplama cihazı vasıtasıyla (Emitech K850) 10nm kalınlıktan başlayarak 15nm, 20nm ve 25nm kalınlıklarında altın paladyum ile kaplandı.

Hazırlanan preparatlar taramalı elektron mikroskopunda (Leo 438 VP) incelendi.

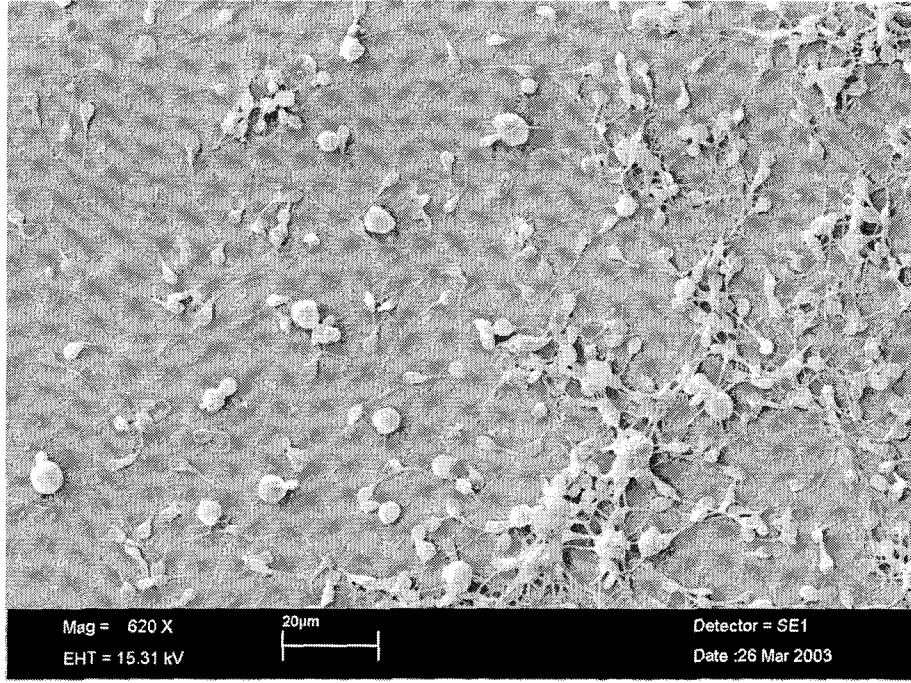
Yapılan incelemelerde spermatozoonların elektron mikroskopunda incelenmeye hazırlanması için uygulanması gereken prosedür aşağıdaki şekilde bulunmuştur:

Spermatozoonlar yayınlarda sıklıkla kullanıldığı belirtilen sodyum fosfat tamponuyla üç kez 600g de 10dk santrifüj edilerek yıkanır. Bu hücreler 2 saat boyunca Trump's fiksatifinde (pH:7,2-7,4) bekletilir. Fikse edilen hücreler sodyum fosfat tamponu ile 3 kez 600g de santrifüj edilerek yıkanır. Hücrelerden bir kısmı %1'lik poli-L-lizin kaplı lameller üzerine damlatılarak alınabilir ya da sperm süspansiyonu 0,45µm çaplı bir filtreden geçirilir. Filtre üzerinde toplanan hücreler 10ml taze tamponun filtreden geçirilmesi ile yıkanır, kurumamasına özen gösterilir.

Filtredeki ya da lamellerdeki hücreler %50-%75-%95 ve %100'lük etanol serilerinde 600g'de 10'ar dk santrifüj edilerek dehidrate edilir.

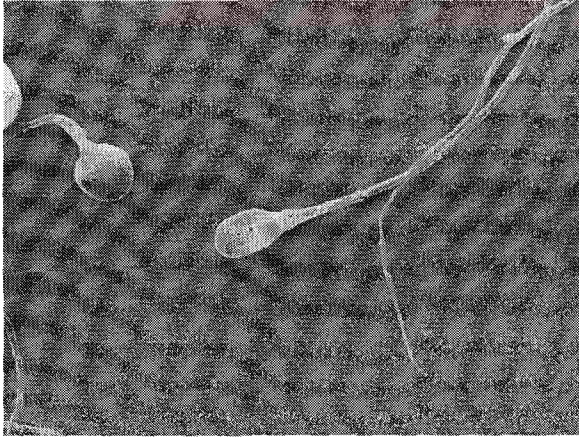
Bu hücreler CPD'de 3 banyo tekrarıyla kurutulur. Kurutulan örnekler örnek tutuculara alüminyum iletken bantla, iki taraflı yapıştırıcı karbon bantla ya da iletken karbon yapıştırıcı kullanılarak örnek tutuculara yapıştırılır.

Spermatozoonlar diğer hücrelerde olduğu gibi 10nm kalınlığında Au/Pd ile kaplanır. Kaplanan örnekler taramalı elektron mikroskopunda incelenir.

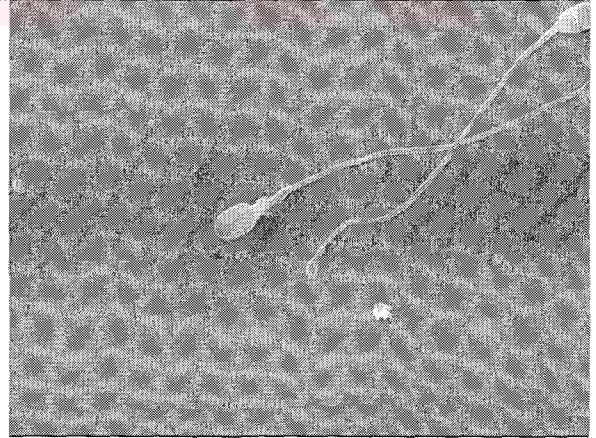


Şekil 4.10. Filtre metoduyla hazırlanan spermatozoon görüntüleri. 24 saat Trump's ile fiske edilen spermatozoonlar yıkanıp filtreden geçirildi, dehidrasyondan sonra CPD'de kurutuldu 10nm kalınlığında Au/Pd ile kaplandı.

Şekil 4.10.'da filtre yöntemi kullanılarak hazırlanmış spermatozoonların 620x büyütmede ve 15,31 kV'de alınmış mikrografları görülmektedir.



Şekil 4.11. Spermatozoonlar



Şekil 4.12. Küçük büyütmede alınmış spermatozoon görüntüsü

Şekil 4.11.'de 8000x büyütmede 16 kV'de ve Şekil 4.12.'de 5000x büyütmede 18 kV'de alınmış spermatozoon resimleri görülmektedir.

4.4. Ovositler

Canlı ovositler %1'lik ya da %2'lik poli-L-lizin kaplı lameller üzerine alındı. İki saat boyunca ovosit olgunlaştırma sıvısında (Oocyte Maturation Medium-OMM) 37 °C'de CO₂ etüvünde bekletilerek hücrelerin lamele tutunması sağlandı.

Kültüre edilen bu hücrelerin vasatları alındıktan sonra kurumalarına imkan vermeden hücreler ya Trump's fiksatifinde +4°C'de (pH:7,2–7,4) ya Karnowsky çözeltisinde (pH:7,2–7,4) ya da %2,5'lik gluteraldehit +0,1M sodyum fosfat tamponunda (pH:7,2–7,4) fikse edildi. Fiksasyon süreleri 0,5 saatten başlayarak 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 6 saat olarak artırıldı.

Fiksasyondan sonra hücreler kurutulmadan sodyum fosfat tamponu ile 30dk yıkandı.

Bazı hücreler hemen dehidrasyona alınırken bazı hücrelere ise %1'lik OsO₄ + 0,1 M'lık sodyum fosfat tamponu (pH:7,2–7,4) ile +4°C'de 30dk post fiksasyona tabii tutuldu. Postfikse edilen hücrelerin fiksasyon süreleri 15dk.dan başlayarak 30dk, 60dk, 90dk.ya kadar çıkarıldı.

Postfikse edilen hücreler kurutulmadan sodyum fosfat tamponu ile 30dk yıkandı.

Postfiksasyon aşamasının ardından hücreler dehidrasyona alındı. Bu aşamada iki değişken etanol ya da aseton (Applichem) kullanıldı. Hücreler, oda ısısında %50-%75-%95 ve %100'lük etanol ya da aseton serilerinden geçirildi. Her aşamada hücreler 5dk.dan başlayarak 10dk, 15dk ve 20dk tutuldu.

Dehydrate edilen hücrelerin bir kısmı havada kurutulurken bir kısmı kritik nokta kurutucusuna (CPD, Emitech K850) alındı. CPD'deki hücreler en az 3'ten başlayarak en fazla 8'e ulaşan banyo seferlerine tabii tutuldu.

Lameller alüminyum iletken bantla (EMS), iki taraflı yapıştırıcı karbon bantla (EMS) ya da iletken karbon yapıştırıcı (EMS) kullanılarak örnek tutuculara (EMS) yapıştırıldı.

Örnek tutuculardaki lameller kaplama cihazı vasıtasıyla (Emitech K850) 10nm kalınlıktan başlayarak 15nm, 20nm ve 25nm kalınlıklarında altın paladyum ile kaplandı.

Hazırlanan preparatlar taramalı elektron mikroskopunda (Leo 438 VP) incelendi.

Sonuçta; canlı ovositler %1'lik poli-L-lizin kaplı lamellerde kültüre edildiğinde hücrelerin yuvarlak yapılarından dolayı lamellere çok iyi tutunmadığı ve mekanik işlemler sırasında kaybolduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle ovosit hücreleri %2'lik poli-L-lizin kaplı lamellerde kültüre edilmişlerdir. Ayrıca ovositlerin daha iyi tutunmasını sağlamak için bunlar yüzeye daha iyi tutunan kümülüs hücreleriyle birlikte kültüre edilmişlerdir.

Hücrelerin Trump's fiksatifinde (pH:7,2-7,4) 2 saat fiske edilmesiyle diğer fiksatif ve fiksasyon sürelerine göre daha iyi sonuç elde edildiği izlenmiştir.

Fiksasyondan sonra hücreler kurutulmadan sodyum fosfat tamponu ile 30dk yıkanmıştır.

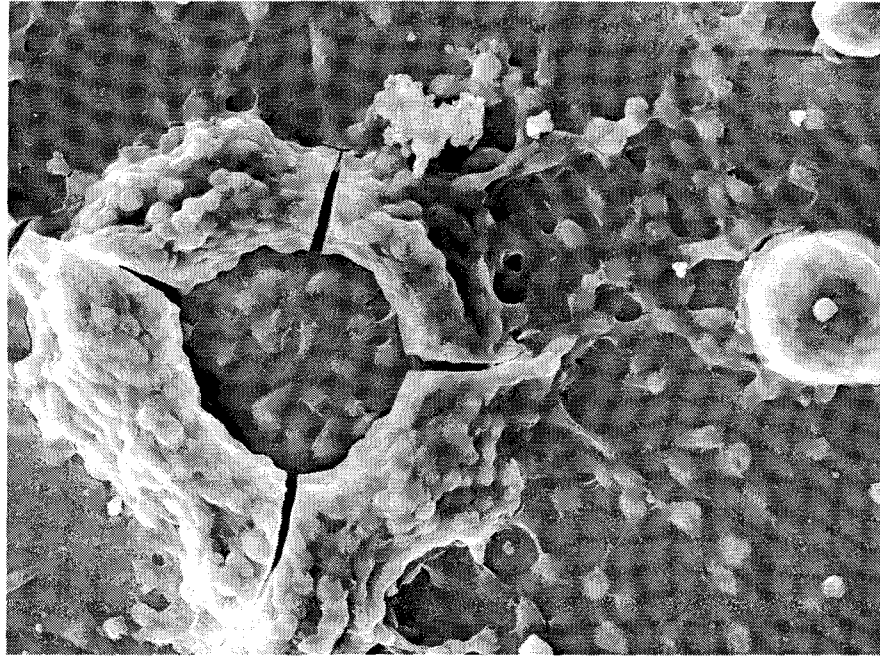
Hücrelerin %1'lik OsO_4 + 0,1 M'lık sodyum fosfat tamponu (pH:7,2-7,4) ile 30dk postfikse edilmesiyle daha iyi sonuç alınmıştır.

Dehidrasyon sıvısı olarak etanol seçilmiştir ve hücrelerin büyüklüklerinden dolayı bunlar %50-%75-%95-%100'lük etanol serilerinde 15'er dk dehidrate edilmişlerdir.

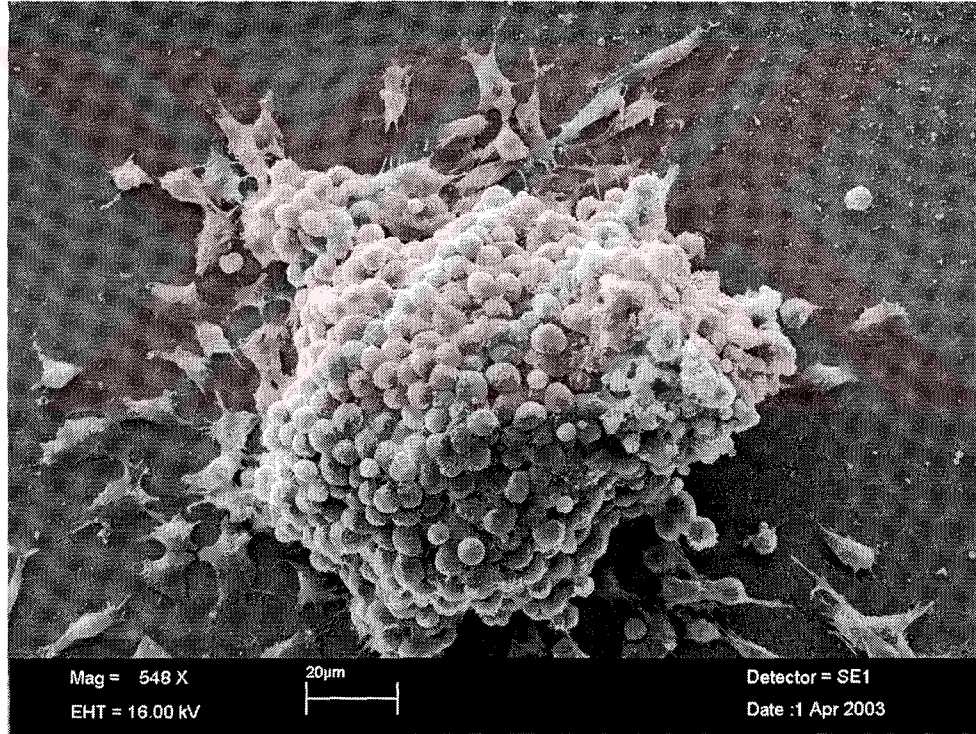
Havada kurutulan hücrelerin yüzey yapılarını koruyamadığı ancak kritik noktada kurutma metoduyla kurutulan hücrelerin ise iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Hücrelerin kaybolmaması için banyo aşaması 3 kere tekrarlanmıştır.

Kurutulan örnekler örnek tutuculara alüminyum iletken bantla iki taraflı yapıştırıcı karbon bantla ya da iletken karbon yapıştırıcı kullanılarak örnek tutuculara yapıştırılmıştır ve bu üç yapıştırıcının kullanılmasının sonucu etkilemediği gözlemlenmiştir.

Kaplama için optimum kalınlık ovositlerin diğer hücrelerden büyük olması nedeniyle 15nm'ye çıkarılmıştır ve hücreler 15nm kalınlığında Au/Pd ile kaplanmıştır.



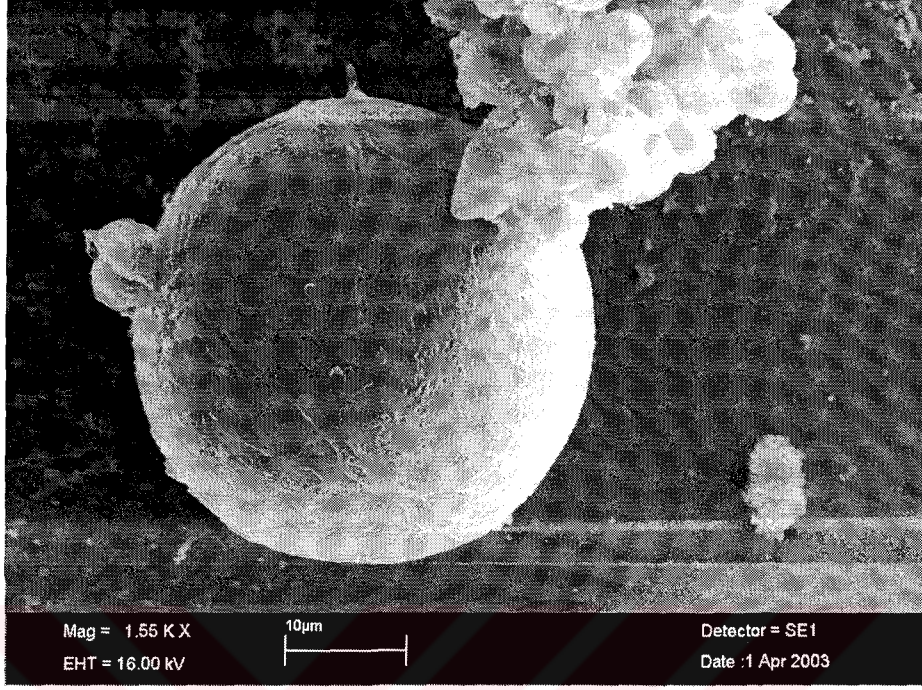
Şekil 4.13. 6 saat süren Trump's fiksasyonu nedeniyle örnekte kırılmalar olmuştur (Büyütme:750x)



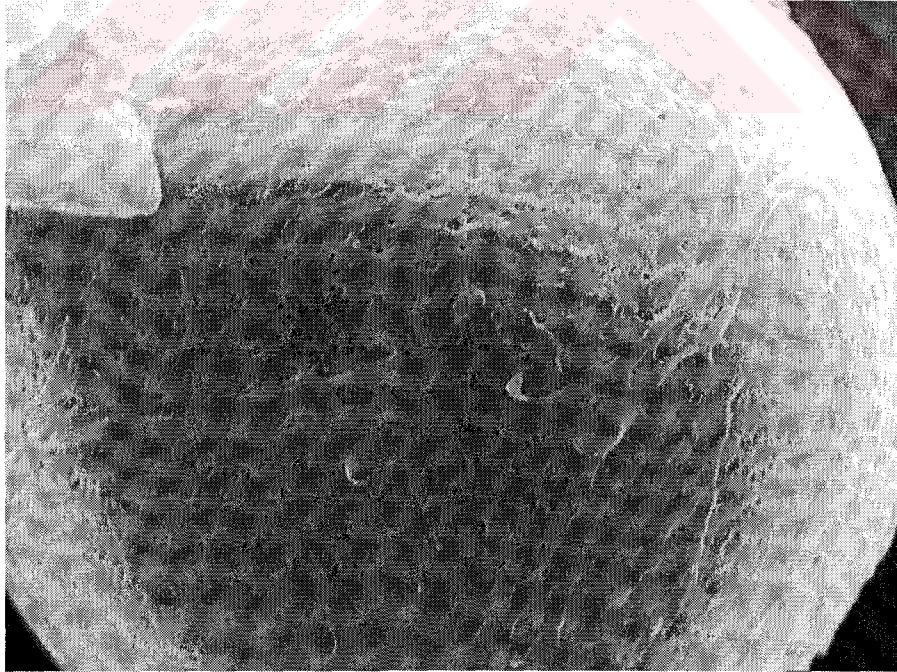
Şekil 4.14. Kümülüs ovosit kompleksi. Trump's ile 2 saat ardından OsO₄ ile 30 dk tespit edilen hücreler dehidrate edildi, CPD'de kurutuldu ve kaplandı

Şekil 4.13.'da fazla süren fiksasyon nedeniyle hücrelerde kırılma görülmektedir (Büyütme:750x, 15 kV). Aynı zamanda tutunma problemi olduğundan ovosit düşmüş geride sadece folikül hücreleri kalmıştır. Tutunma problemi kümülüs hücreleriyle kültüre etmenin yanı sıra kullanılan poli-L-lizinin derişiminin artırılmasıyla ortadan kaldırılmıştır.

Şekil 4.14.'te kümülüs oosit kompleksi görülmektedir. Resim 548 büyütmede 16 kV'de alınmıştır. Ovosit kümülüs hücrelerinin merkezinde yer almakta ve bu hücreler tarafından çevrelenmektedir.



Şekil 4.15. Çıplak ovosit ve etrafında tek tük kümülüs hücreleri. Trump's ile 2 saat ardından OsO₄ ile 30 dk tespit edilen hücreler dehidrate edildi, CPD'de kurutuldu ve kaplandı



Şekil 4.16. Çıplak ovositin yüzeyi. Trump's ile 2 saat ardından OsO₄ ile 30 dk tespit edilen hücreler dehidrate edildi, CPD'de kurutuldu ve kaplandı

Şekil 4.15.te 1550 büyütmede 16 kV'da ve şekil 4.16.da 7500 büyütmede 18 kV'da alınmış ovosit hücreleri görülmektedir. Hücrelerin yüzey yapıları ayrıntılı olarak görülebilmektedir.

Yapılan deneyler sırasında aynı zamanda Zona pellucida'nın kaybolup kaybolmadığı araştırılmıştır. Örnek hazırlama işlemlerinin her basamağında örnekler konfokal mikroskobunda incelendiğinde dehidrasyon basamağında Zona pellucida'nın yer yer eridiği gözlemlenmiştir.



SONUÇ

Çalışmamızda izole hücreler için kullanılan tespit yöntemlerinin geliştirilmesini ve bu yöntemleri optimize etmeyi amaçladık. Laboratuvar şartlarında, kullanılan fiksatifin seçiminden fiksasyon süresine, kurutuma yönteminden miktarından kaplama kalınlığına örneklerin hazırlanması aşamasında birçok değişken kullanıldı. Özellikle bir dokuya bağımlı olmayan, tek bulunan bu hücrelerin yüzey yapılarının korunmasının çok zor olduğu, aynı zamanda mekanik etkilerin uygulandığı hazırlık aşamalarında bu hücrelerin kayboldukları da gözlemlendi. Bu çalışmada taramalı elektron mikrogramları şeklinde elde edilen sonuçlar bizi fiksatiflerin, fiksasyon sürelerinin, dehidrasyon için kullanılan sıvıları ve bunların uygulanma sürelerinin, hücrelerin lamellere tutturulması için gerekli uygulamaların, kurutma yöntemlerinin seçiminin ve bunların uygulanma sürelerinin, kaplama kalınlığının ne olması gerektiğine dair ideal sonuçlara götürmüştür. Hücreleri kaybetmemek ve yapılarını korumak için en uygun değerlere ulaştık. İzole hücrelerle yapılan çalışmada bulunan bu sonuçlar Tablo 5'te belirtilmiştir. Yine değişik preparatlarla yapılan çalışmalarda bulunan sonuçlar da Tablo 6 ve Tablo 7'de gösterilmiştir. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte bu inceleme yöntemlerinin iyileştirileceği, bu konuda diğer SEM çalışmaları gibi oldukça yoğun çalışmalar yapılacağını düşünmekteyiz.



Preparat	Fiksasyon	Fiksatif	Fik. süresi	Post fiksasyon	Fiksatif süresi	Dehidrasyon	Deh. sıvısı	Deh. süresi	Kurutma	Kurutma tipi	Banyo tekrarı	Kaplama	Kap. materyal kalınlığı
Kültür hücreleri	Uygulandı	Trump's	1 saat	Uygulandı	%1'lik OsO ₄	Uygulandı	Alkol	10dk	Uygulandı	CPD	3 kez	Uygulandı	Au/Pd 10nm
Kan hücreleri	Uygulandı	%2,5'lik GA	15dk	Uygulanmadı	—	Uygulanmadı	—	—	Uygulandı	Havada kurutma	—	Uygulandı	Au/Pd 10nm
Spermatozoon	Uygulandı	Trump's	2 saat	Uygulanmadı	—	Uygulandı	Alkol	10dk	Uygulandı	CPD	3 kez	Uygulandı	Au/Pd 10nm
Ovosit	Uygulandı	Trump's	2 saat	Uygulandı	%1'lik OsO ₄	Uygulandı	Alkol	15dk	Uygulandı	CPD	3 kez	Uygulandı	Au/Pd 15nm

Tablo 5. İzole hücrelerin taramalı elektron mikroskopunda incelenmesi için bulunan standartlar

Preparat	Fiksasyon	Fiksatif	Fiksasyon süresi	Postfiksasyon	Dehidrasyon	Deh. sıvısı	Deh. süresi	Kurutma	Kurutma tipi	Kaplama	Kaplama materyali	Kaplama kalınlığı
Böcek ¹	Uygulandı	Trump's	24 saat	Uygulanmadı	Uygulandı	Alkol	25dk	Uygulandı	Havada kurutma	Uygulandı	Au/Pd	25nm
Bitki ²	Uygulanmadı	—	—	Uygulanmadı	Uygulanmadı	—	—	Uygulanmadı	—	Uygulandı	Au/Pd	20nm

Tablo 6. Taramalı elektron mikroskopunda inceleme için hazırlanan böcek ve bitki preparatları için bulunan standartlar

1 Böcek türleri: *Sitophilus granarius*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Rhyzopertha dominica*

2 Bitki türleri: *Saintpaulia ionantha*, *Pyrachanta coccinea*

Preparat	Fiksasyo	Fiksasyon uygulaması	Dehidrasyon	Dehidrasyon sıvısı	Dehidrasyon süresi	Kurutma	Kurutma çeşidi	Banyo tekrarı	Kapalama	Kaplama Materyali	Kapalama kalınlığı
Böbrek	Uygulandı	Trump,s ile 30dk fiksasyon→Sıvı azotta fiksasyon→Kırma→T rump's ile 2 saat fiksasyon	Uygulandı	Alkol	25dk	Uygulandı	CPD	8 kez	Uygulandı	Au/Pd	25nm
Akciğer	Uygulandı	Trump,s ile 30dk fiksasyon→Sıvı azotta fiksasyon→Kırma→T rump's ile 2 saat fiksasyon	Uygulandı	Alkol	25dk	Uygulandı	CPD	8 kez	Uygulandı	Au/Pd	25nm

Tablo 7. Taramalı elektron mikroskopuna hazırlanan akciğer ve böbrekte sıvı azotta dondurma kırma metodu kullanılarak bulunan sonuçlar

KAYNAKLAR

- Anderson TF. 1951. Techniques for the preservation of three dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans N.Y. Acad Sci Ser 11,13*: 130–134
- Anonim. 1999. Sputter coating incorporating emitech K500, K550, K575 and K675x. Technical Brief, England
- Anonim. 1999. Critical point drying incorporating emitech K850. Technical Brief, England
- Bessis M, Weed RI. 1972. Preparation of red blood cells for SEM a survey of various artifacts. In *Scanning Electron Microscopy*, Johhary O, Corvin I eds. IITRI 5: 289–296
- Boyde A, Echlin P. 1973. Freeze and freeze drying- a preparative technique for SEM. In *Scanning Electron Microscopy*, Johhary O, Corvin I eds. IITRI 6: 759–766
- Boyde A, Stewart ADG. 1962. SEM of the surface of developing mamalian dental enamel. *J Ultrasruct Res* 7:159-172
- Chescoe D, Goodhew P. 1990. The operation of transmission and scanning electron microscopes. Royal Microscopical Society: Oxford Science Publications
- Echlin P, Moreton R. 1973. The preparation, coating and examination of frozen biological materials in the SEM. In *Scanning Electron Microscopy*, Johhary O, Corvin I eds. IITRI 6: 325–332
- Fujita T, Tokunawa J, Ionue H. 1969. Scanning electron microscopy of the skin using celluloid impressions. *Arch Histol Jap* 30: 321–326
- Hayat MA. 1970. Principle and Techniques of Electron Microscopy: Biological App Vol:1. New York: Van Nostrand Reinhold Co.
- Goldstein J, Newbury D, Echlin P, Joy D, Roming A Lyman CH, Fiori CH, Lifshin E. 1992. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. New York: Plenum pres.
- Hodgkin NM. 1972. Scanning electron microscopy in biological material, comparative technique. *Microstructures* 3: 17–22
- Karnowsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137 A
- Kessel RG, Shih CY. 1976. *Scanning electron microscopy in biologie*. New york: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Kirchner KW. 1993. Copper/solder intermetallic growth studies. *Microsc Res Tech* 25: 503–508
- Lim DJ. 1971. Scanning electron microscopic observation on non-mechanically cryofractured biological tissue. *Scanning Electron Microscopy*, Johhary O, Corvin I eds. IITRI 4: 257–264
- Link LF. 1993. Copper thick film sintering studies in an enviromental scanning electron microscope. *Microsc Res Tech* 25: 503–508
- Manero JM, Mason DV, Marsal M, Planell JA. 1999. Application of the technique of enviromental scanning electron microscopy to the paper industry. *Scanning* 12: 36–39
- Manero JM, Gil FJ, Padros E, Planell JA. 2003. Applications of enviromental scanning electron microscopy in biomaterials field. *Microsc Res Tech* 61: 469–480
- McClusky LM. 2003. A scanning electron microscopic study of germ cell maturwtion in the reproductive tract of the male soupfin shark. *Acta Zoologica* 84: 69–76
- Meakin JD, Fallon LM. 1973. Low magnification scanning electron microsocopy. In *Scanning Electron Microscopy*, Johhary O, Corvin I eds. IITRI 6: 145–150
- Mortimar D. 1994. *Sperm preparation techniques for SEM and TEM*. Practical Laboratory Andrology, Oxford University Pres: 168–173

- Nemanic MK. 1972. Critical point ,cryofracture and serial sectioning. In Scanning Electron Mycroscopy, Johhary O, Corvin I eds. IITRI 5: 297–304
- Pameijer CH, Stallard RE. 1973. Three replicatetechniques for biological specimen preparations. In Scanning Electron Mycroscopy, Johhary O, Corvin I eds. IITRI 6: 357–364
- Phillips DM, Shalgi R 1980. Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. J of Ultrastructure Res 72: 1–12
- Porter KR, Kelley D Andrews PM. 1972. The preparation of cultured cells and soft tissues for scanning electron microscopy. Illinois: In Proccedings of the Fifth Annual Stereoscan Scanning electron Mircsoscropy Colloquium, kent Cambridge Scientific
- Santos AR, Barbanti SH, Duek EAR, Dolder H, Wada RS, Wada MLF. 2001. Vero cell growth and differentiation on poly(l-lactic acid) membrans of different pore diameters. Artificial Organs 25(1): 7–13
- Tartera J, Marsal M, Manero JM. 2000. Enviromental scanning electron microscopie studies on moulding sand in heating and remoistening . 64th World Foundry Congress. p 200–210
- Xia P, Wang Z, Zengming Y, Tan J, Qin P. 2001. Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electrone microscope and transmission electron microscope. Cell Tissur Res 303: 271–275
- Yanez M, Barbosa SE. 2003, Changes in particle area measurements due to scanning electron microscope accelerating voltage and magnification Microsc Res Tech 61: 463–468



ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Ankara’da doğdu. İlk ve ortaöğrenimini Ankara’da tamamladı. 1998 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2002 yılında mezun oldu. 2002–2003 yıllarında Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Alan Öğretmenliği Programı’nda Tezsiz Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2002 yılında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans programına kayıt oldu.

Şu an Ortadoğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde asistan olarak görev yapmaktadır.

