

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYOD LAZER İLE ETKİLESEN BİYOLOJİK HÜCRELERİN
İNCELENMESİ İÇİN LAZER TARAMALI KONFOKAL
MİKROSKOP DİZAYNI**

YÜKSEK LİSANS

Fizikçi Çağrı Kaan AKKAN

Anabilim Dalı: Fizik

Danışman: Prof. Dr. Arif DEMİR

KOCAELİ, 2009

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DIYOD LAZER İLE ETKİLESEN BİYOLOJİK HÜCRELERİN
İNCELENMESİ İÇİN LAZER TARAMALI KONFOKAL
MİKROSKOP DİZAYNI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fizikçi Çağrı Kaan AKKAN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 21 Mayıs 2009

Tezin Savunulduğu Tarih: 11 Haziran 2009

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Arif DEMİR

()

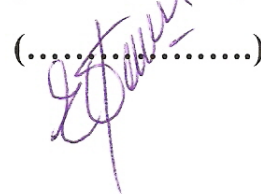
Üye

Prof. Dr. Necdet ASLAN

()

Üye

Doç. Dr. Elif KAÇAR

()

KOCAELİ, 2009

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans tezimi yazmamda bana verdiği güven, destek ve sağladığı tüm imkânlardan dolayı ve ayrıca bilime olan bağlılığımı arttırdığı için sayın hocam Arif DEMİR' e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Şuanda Almanya Leibniz-Institut Für Neue Materialien' da CVD / Biooberflächen grubunda çalışma imkânı tanıyan sayın hocam O. Cenk AKTAŞ' a tezimi yazmam için bana gösterdiği sabır ve destek için, bilgi ve kaynak alışverişinde bana destek olan sayın hocalarım Elif KAÇAR ve Timur CANEL' e, çalışma arkadaşlarım Erhan AKMAN, Belgin GENÇ, Levent CANDAN, Pınar DEMİR, Mesure MUTLU, Serdar BABUR ve Sinem SİPAHİOĞLU' na verdikleri bilgiler ve gösterdikleri manevi desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bana gösterdikleri sabır ve sonsuz destekten dolayı tüm aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	vii
ÖZET	ix
İNGİLİZCE ÖZET	x
BÖLÜM 1. GİRİŞ	1
BÖLÜM 2. LAZERLER ve ÇALIŞMA İLKELERİ	3
2.1. Giriş	3
2.2. Lazer Nedir?	3
2.3. Lazerlerin Tarihçesi	4
2.4. Lazerlerin Fiziksel Temeli	6
2.3. Lazer Işığının Özellikleri ve Uygulama Alanları	8
2.3.1. Lazer Işığının Özellikleri	8
2.3.2. Lazerin Uygulama Alanları	9
2.4. Optik Ölçüm Sistemleri	9
2.4.1. Girişimölçerler	10
2.4.2. Spektrometreler	13
BÖLÜM 3. MİKROSKOPLAR	15
3.1. Giriş	15
3.2. Mikroskop Nedir? Mikroskopların Tarihçesi	15
3.3. Optik Mikroskopların Çalışma Prensibi	16
3.3.1. Küresel Mercekler	18
3.3.2. Objektifler	20
3.3.2.1. Daldırma Ortamı	23
3.3.2.2. Sayısal Açıklık	24
3.3.2.3. Lamel Düzeltmesi	25
3.3.2.4. Çalışma Mesafesi	25
3.3.3. Oküler	25
3.3.4. Kondansörler	26
3.3.5. Görüntü Oluşumu	26
3.4. Mikroskop Çeşitleri	27
3.4.1. Stereoskopik Mikroskoplar	28
3.4.2. Polarizasyon Mikroskobu	28
3.4.3. İnterferens Mikroskobu	29
3.4.4. Faz-Kontrast Mikroskobu	30
3.4.5. Flüoresans Mikroskobu	31
3.4.6. Elektron Mikroskobu	32
3.4.7. Yakın Alan Taramalı Optik Mikroskop (SNOM)	33
BÖLÜM 4. LAZER TARAMALI KONFOKAL MİKROSKOPLAR	34
4.1. Giriş	34

4.2. Konfokal Mikroskopların Tarihçesi	34
4.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta Görüntü Oluşturulması	35
4.4. Konfokal Mikroskoplarda Kullanılan Teknik Ekipmanlar	41
4.4.1. Objektifler	41
4.4.1.1. Küresel Hatalar	43
4.4.1.2. Koma	43
4.4.1.3. Astigmatizm	44
4.4.1.4. Alan Eğriliği	45
4.4.1.5. Bükülme	45
4.4.1.6. Boylamsal Renk Kusurları	46
4.4.1.7. Düzlemsel Renk Kusurları	47
4.4.2. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskoplarda Kullanılan Lazerler	47
4.4.3. Flüoresans Işıma ve Konfokal Mikroskopide Kullanılan Flüoroforlar	48
4.4.4. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopide Kullanılan Foton Detektörleri	52
4.4.4.1. Foton Çoğaltıcı Tüpler	52
4.4.4.2. CCD Detektörler	53
4.4.5. Akusto Optik Taranabilir Filtre	55
4.4.6. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopların Avantajları	55
BÖLÜM 5. DİYOD LAZER İLE ETKİLESEN BİYOLOJİK HÜCRELERİN İNCELENMESİ İÇİN LAZER TARAMALI KONFOKAL MİKROSKOP DİZAYNI	56
5.1. Giriş	56
5.2. Tasarımda Kullanılan ve Üretimde Kullanılacak Olan Cihazlar	56
5.2.1. Objektif	56
5.2.2. Tarama Eksenleri	57
5.2.3. CCD Kamera	58
5.2.4. Spektrometre	59
5.2.5. Optik Elemanlar	59
5.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Dizaynı ve Görüntü Oluşturulması	59
5.4. Tasarlanan Cihazın Mevcut Cihazlara Göre Üstünlükleri	62
BÖLÜM 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	65
KİŞİSEL YAYINLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Lazer kavitesi ve fotonların çoğalarak lazer oluşması	7
Şekil 2.2: Michelson Girişim ölçeri. Detektöre giden ışıklar bir mercekten geçirilerek dairesel saçaklar gözlenir.	12
Şekil 2.3: Lazer kullanılarak oluşturulan Michelson girişimölçerinden bir saçak görüntüsü	13
Şekil 2.4: Mikro-Raman Spektrometresi lazerin kullanıldığı hassas ölçüm alan bir cihazdır.	14
Şekil 2.5: Prizmadan geçirilen beyaz ışık dalga boylarına ayrılır ve görünür bölgedeki spektrumu verir.	14
Şekil 3.1: Standart bir ışık mikroskobu	17
Şekil 3.2: Işık mikroskoplarının çalışma prensibini anlatan şema	17
Şekil 3.3: Işığın küresel yüzeyden kırınımı	18
Şekil 3.4: Mercek çeşitleri	19
Şekil 3.5: Zemax optik programında tasarlanmış 40X sonsuz düzeltmeli apokromat objektif	20
Şekil 3.6: Sonlu ve sonsuz düzeltmeli objektifleri anlatır çizim	21
Şekil 3.7: Objektif kalitelerini küresel hataların düzeltilmesine göre anlatan şekil.	22
Şekil 3.8: Objektifin tanıtımı	22
Şekil 3.8: Daldırma ortamı objektifin kullanılması gereken ortamı belirtir	23
Şekil 3.10: Sayısal açıklığı gösteren çizim	24
Şekil 3.11: Geniş alan oküleri	25
Şekil 3.12: Kondansörlerin büyütme oranlarına göre ışık verme gereklilikleri	26
Şekil 3.13: Mikroskopta görüntü oluşumu	27
Şekil 3.14: Stereo Mikroskop	28
Şekil 3.15: Polarizasyon Mikroskobu	29
Şekil 3.16: İnterferans Mikroskobu	30
Şekil 3.17: Faz-Kontrast Mikroskobunun optik görüntüsü ve faz farkı gösterimi	31
Şekil 3.18: Flüoresans Mikroskobu	32
Şekil 3.19: SEM ile alınmış nanowire görüntüleri (INM-Leibniz - Institut für Neue Materialien, Almanya)	33
Şekil 3.20: SNOM dan bir görüntü ve snom' a ait bir görüntü	33
Şekil 4.1: Airy disk görüntüsü	36
Şekil 4.2: Eksenel çözünürlüğün görüntüsü	37
Şekil 4.3: İlk konfokal mikroskobun prensibi	37
Şekil 4.4: Farklı bir konfokal tasarımı	38
Şekil 4.5: Lazer taramalı konfokal mikroskobun şeması	39
Şekil 4.6: Yeşil geçirgen dikroik filtre dalga boyu seçicilik eğrisi	40
Şekil 4.7: Spinning disk yöntemi örnek ya da ışığı hareket ettirmeden tarama imkânı sağlar	40
Şekil 4.8: Küresel hata olmadan ve küresel hatayla odaklama	43
Şekil 4.9: Koma kusurunu belirten şekiller	44

Şekil 4.10: Astigmatizmi anlatır şekil. Sol taraf daha ileri, sağ taraf daha az astigmatizme sahip.....	44
Şekil 4.11: a) ışıklar mercekten geçtikten sonra oluşan alan eğriliği, b) merkez nokta odaklandığında kenarlarda ki görüntü bulanıklığı, c) perde kenarlara netleşecek şekilde ilerletirilirse merkezde görüntü kaybolur....	45
Şekil 4.12: İçe ve dışa bükülmeler.....	46
Şekil 4.13: Boylamsal renk kusurları.....	46
Şekil 4.14: Düzlemsel renk kusurlarını gösterir şekil.....	47
Şekil 4.15: Flüoresans ve fosfor esans için titreşim ve enerji seviyeleri.....	49
Şekil 5.1: Tasarımda kullanılan Olympus 40X Plan-Akromat sonsuz düzeltmeli mikroskop objektifi.....	57
Şekil 5.2: Tasarımda kullanılan hareket eksenleri.....	58
Şekil 5.3: Tasarımda kullanılan CCD kamera ve spektral bant.....	58
Şekil 5.4: Yüksek lisans tezi için tasarlanan lazer taramalı konfokal mikroskop.....	60
Şekil 5.6: Yüksek lisans tezi için tasarlanan cihazın 3 boyutlu oluşturacağı görüntülerin oluşacağı örnek.....	60
Şekil 5.7: LATARUM' da tasarlanan konfokal mikroskoptan bir görüntü.....	61
Şekil 5.8: LATARUM' da tasarlanan konfokal mikroskoptan bir görüntü.....	61
Şekil 5.9: Tasarlanan mikroskobun ilk deneylerinden alınan spektrum verileri.....	76

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Kazanç ortamına ve dalga boyuna göre değişen lazer çeşitleri.....	5
Tablo 3.1: Daldırma ortamları ve renk kodları.....	24
Tablo 4.1: LSCM de kullanılan lazer çeşitleri ve dalga boyları.....	48
Tablo 4.2: LSCM de kullanılan flüorofrom boyalar ve uyarılma ve yayılma dalga boyları.....	50
Tablo 5.1: Tasarımda kullanılan hareket sisteminin özellikleri.....	57
Tablo 5.2: Tasarımda kullanılan optik elemanları gösterir tablo.....	59

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

ns	: nano saniye
fs	: femto saniye
μm	: mikro metre
nm	: nano metre
ΔE	: İki enerji seviyesi arası enerji farkı
$E_{\bar{u}}$: Üst enerji seviyesi
E_l	: Alt enerji seviyesi
$N_{\bar{u}}$: \bar{u} enerji seviyesi sayı yoğunluğu
N_l	: l enerji seviyesi sayı yoğunluğu
$\tau_{\bar{u}}$: \bar{u} enerji seviyesinin yaşam süresi
$A_{\bar{u}l}$: \bar{u} seviyesinden l seviyesine bir elektronun geçiş olasılığı
$N_{\bar{u}}^0$: \bar{u} seviyesinin başlangıçta ki sayı yoğunluğu
$\rho(v)$: enerji yoğunluğu
hv	: foton enerjisi
h	: Planck sabiti
v	: foton frekansı
v'	: merkez frekans
k_B	: Boltzman sabiti
T	: Sıcaklık
$B_{\bar{u}l}$: \bar{u} seviyesinden l seviyesine ışımalı geçiş olasılığı
$B_{l\bar{u}}$: l seviyesinden \bar{u} seviyesine ışımalı soğurma olasılığı
g	: enerji seviyelerinin istatistiksel ağırlığı
c	: ışık hızı
I	: ortamdan çıktıktan sonra ışık şiddeti
I_0	: ortama girmeden önce ışık şiddeti
α	: soğurma katsayısı
z	: ortam kalınlığı
γ	: kendiliğinden geçiş olasılıkları
Γ	: ışımalı geçiş olasılıkları
λ	: dalga boyu
θ	: ıraksama açısı
M^2	: demet kalitesi
ω_0	: lazer ışığının odaklandığında ki bel yarıçapı
P	: güç
E	: Enerji
f	: frekans
t	: zaman
DIN	: Alman Endüstri Normu
JIS	: Japon Standartları
n	: ortam kırılma indisi
θ	: sayısal açıklık açısı
s_0, s_i	: mesafe

R_1, R_2 : Eğrilik yarıçapları
 f : odak mesafesi
 d : mercek kalınlığı
 $\#, D$: mercek çapı
 NA : sayısal açıklık
 r_{airy} : Airy disk yarıçapı
 η : örnek kırıcılık indisi
 Φ : iş fonksiyonu
FWHM: Yarı Maksimumda ki Bant Genişliği
LSCM: Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop/Mikroskopi
LATARUM: Lazer Teknolojiler Araştırma ve Uygulama Merkezi
CCD : Yük çiftlenimli cihaz
PMT : Foton çoğaltıcı tüp
 R : Foto katodun tepkisi
QE : Kuantum verimliliği
 m : kazanç
 d : dinodların ikincil yayılma oranı
 S : sinyal
 G : gürültü
DC : doğru gerilim
 δ : faz farkı

DİYOD LAZER İLE ETKİLESEN BİYOLOJİK HÜCRELERİN İNCELENMESİ İÇİN LAZER TARAMALI KONFOKAL MİKROSKOP DİZAYNI

Çağrı Kaan AKKAN

Anahtar Kelimeler: Lazer, tarama, konfokal, mikroskop, hücre, biyoloji, medikal

Özet: Lazerler kullanım alanları oldukça geniş olan ışık kaynaklarıdır. Endüstriyel alandan medikal alanlara kadar birçok alanda hizmet vermektedir. Lazerlerin bir diğer kullanım alanı olan mikroskoplarda bugün biyolojik ve medikal uygulamalarda yaygın bir şekilde yer almaktadır. Lazer taramalı konfokal mikroskoplarda lazerlerin temel ışık kaynağı olarak kullanıldıkları mikroskoplardır. Eş frekanslı ve monokromatik bir ışık kaynağı olduklarından tercih edilmektedirler.

Bu yüksek lisans tezinde diyod lazerlerin hücrelerde yaratacakları etkileri gözlemlemek ve katı cisimlerinde yüzey topografını da çıkartmak amacıyla Lazer Teknolojileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde tasarlanmış ve ilk deneyleri yapılmış olan lazer taramalı konfokal mikroskop anlatılmıştır.

**DESIGN of a LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPE to
INVESTIGATE THE CELLS WHICH ARE INTERACTED WITH DIODE
LASERS**

Çağrı Kaan AKKAN

Key Words: Laser, scan, confocal, microscope, cell, biology, medical

Abstract: Lasers are light sources with large usage area. They are serving to many application like from industry to medical. Another usage area of lasers is microscopes which are using in many applications in biology and medical. And Laser Scanning Confocal Microscopes are the devices which are using lasers as a light source. Scientist prefers lasers as a Light source in microscopy because of their monochromatic and same frequency light.

In this master thesis, a laser scanning confocal microscope design introduced which is designed for investigate the affects of diode lasers on cells and showing the topography of rigid surfaces at Laser Technologies Research and Application Center.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Lazerler ıraksama açısı neredeyse 0 olan yani yüksek oranda paralel ve eş frekanslı olduklarından ve yüksek güçlere ulaşılabilmesi nedeniyle bugün birbirinden farklı alanlarda hizmet vermektedirler. Sanayide metallerin ve diğer malzemelerin kesilmesi, kaynak edilmesi ve delinmesinin yanı sıra bilimsel alanlarda da çalışmalara imkân sağlayan lazerler günümüzde tıp ve biyoloji sektörlerinde de yer edinmişlerdir. Tıp alanında ameliyathanelere girerek göz kusurlarının düzeltilmesinden burun ameliyatlarına ve dokuların kesilmesi, buharlaştırılması ya da yakılarak tedavisi gibi birçok alanda hizmet vermektedirler. Biyolojik alanda ise lazerler, yukarıda belirtilen özelliklerinden dolayı vazgeçilemeyen ışık kaynaklarıdır. Mikroskoplar ise biyoloji ve tıp alanlarında temel olarak kullanılmakla beraber, metaller ve diğer katı cisimler gibi örneklerin nm mertebelerinde incelemeleri için özel tasarım mikroskoplarda vardır. Bu tez çalışmasında mikroskoplarda lazerlerin kullanım avantajları, buna bağlı olarak Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopların diğer optik mikroskoplara göre avantajları ve donanımlarında kullanılan optik ve elektronik cihazlar incelenerek ve gerek hücre, gerekse katı cisimlerin incelenmesi için kullanılacak yeni bir lazer taramalı konfokal mikroskop tasarımı gerçekleştirilmiştir.

Bölüm 2 de genel olarak lazerlerin tarihçesi, özellikleri, çalışma prensipleri, lazer çeşitleri ve lazerlerin kullanım alanlarıyla birlikte, lazerlerinde içlerinde yer aldığı bazı optik sistemler anlatılmıştır

Bölüm 3 te mikroskopların çalışma prensipleri ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Ayrıca günümüzde kullanılmakta olan bazı mikroskop çeşitleri hakkında literatür bilgisi verilmiştir.

Bölüm 4 te Bölüm 3 teki bilgilerin temelini oluşturduğu ve tezin ana şeklini oluşturacak olan konfokal mikroskoplar hakkında detaylı bilgiler verilmiştir.

Bölüm 5 te Lazer Teknolojileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (LATARUM) da Diyod Lazer ile etkileşen biyolojik hücrelerin incelenmesi için tasarlanan lazer taramalı konfokal mikroskop anlatılmıştır.

Son olarak bölüm 6 da tez çalışmasının sonuçları belirtilerek, bu sonuçlara dayanarak yapılabilecekler hakkında önerilere yer verilmiştir.

BÖLÜM 2. LAZERLER VE ÇALIŞMA İLKELERİ

2.1. Giriş

Lazerler 1917 yılında Albert Einstein tarafından uyarılmış yayılmanın gerçekleşebileceğinin kuramsal olarak ispatlamasından sonra hızlı bir şekilde gelişmeye başlamışlardır. Bugün birbirinden farklı birçok sektörde aktif bir şekilde kullanılan lazerler, birbirinden farklı olanaklar ve kolaylıklar sağlamaktadırlar. Bu bölümde lazer sistemlerinin tarihsel gelişimini veren kısa bir tarihsel özet ile birlikte, deneysel çalışmalarda kullanılan lazer sistemlerinin fiziksel temelleri, çalışma ilkeleri, diğer ışık kaynaklarından ayıran özellikleri ve kullanım alanları hakkında bilgiler verilecektir.

2.2. Lazer Nedir?

Lazer kelimesi yabancı kökenli olup, aslında LASER olarak yazılır. “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” yani uyarılmış ışımaya kuvvetlendirilmiş ışık anlamına gelen cümledeki kelimelerden baş harfler alınarak kısaltılmıştır. Temellerinin 1917 yılında Albert Einstein tarafından atılmasından bu yana sürekli olarak gelişim gösteren lazerler bugün ise sanayiden eğlence sektörüne, bilimsel araştırmalardan tıbbi uygulamalara ve günlük hayatta sıklıkla karşılaştığımız barkot okuyucular ve CD-DVD gibi medya araçlarında ve daha birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadırlar. Lazerin çıkış dalga boyu, lazeri oluşturacak aktif ortamın özelliklerine bağlıdır. Buna bağlı olarak bugün X-ışınlarından uzak kızıl ötesine kadar farklı dalga boylarında lazerler yapılmıştır (Tablo 2.1) ve bununla birlikte bu lazerlerin güçleri mikro-watt mertebelerinden tera-watt mertebelerine kadar değişim gösterir [1].

Lazerlerin diğerk bir özelliği ise aktif ortamlarına bağlı olarak sürekli (CW) ya da atımlı (pulsed) olarak çalışmalarıdır. HeNe ve Ar-iyon gibi birçok gaz lazeri ve Nd^{3+} ve $Ti^{3+}:Al_2O_3$ katıhal lazerleri sürekli lazerlerdir. Sürekli lazerlerde çıkış gücü frekansa bağlı olarak değişir. $Ti:Al_2O_3$ gibi katıhal lazerleri ve boya lazerleri gibi sıvı kazanç ortamlı lazerler ise atımlı lazerlere örnektirler. Nd: YAG lazerleri ise hem sürekli hem de atımlı lazerlerdir. Atımlı lazerler için iki farklı güç tanımı yapılabilir. Bunlar ortalama güç ve tepe gücüdür [2]. Ortalama güç atımlı bir lazerin çalışma frekansının lazerin çıkış enerjisi ile çarpımı sonucu hesaplanır. Tepe gücü ise lazerin çıkış enerjisinin atım süresine bölünmesi ile hesaplanır. Tepe gücü ns ve fs gibi lazerler için oldukça yüksek değerlerdedir [3].

2.3. Lazerlerin Tarihçesi

Lazerin ilk temeli Charles Townes tarafından MASER in üretilmesiyle atılmıştır. Bu cihaz iletişim amacıyla eş frekanslı mikro dalgalar üretir ve dalga boyu 1.25cm dir. 1958 yılında Townes ve Schawlow MASER' in bir aynalardan oluşan optik bir kavite içine koyarak güçlendirebileceklerine dair bir makale yayınladılar ve bu yayınlarıyla Nobel ödülünü kazandılar. 1960 yılında Hughes Araştırma Laboratuvarlarından Theodore Maiman bir flaş lambası, aktif ortam olarak bir yakut kristali ve optik kavite olarak ta kristalin arka kısmına yüksek yansıtıcılı bir materyal koyarak ilk lazer işiğını üretti [4]. 1961 yılında Bell Laboratuvarlarında A. Javan, W. Bennett ve D. Harriott tarafından ilk gaz lazeri üretildi. Bu lazer He-Ne lazeriydi. Aynı laboratuvarda L. F. Johnson ve K. Nassau ilk Neodymium lazerini kanıtladılar. 1962 yılında General Electric Araştırma Laboratuvarlarından R. Hall ilk yarı iletken lazeri, 1963 yılında Bell Laboratuvarlarından C. K. N. Patel ilk CO_2 lazerini keşfetti [4]. 1964 te W. Bridges argon iyon lazerini, 1966 da W. Silfvast, G.R. Fowles ve B. D. Hopkins ilk mavi He-Cd metal buhar lazerini üretti. Aynı yıl içinde P. P. Sorokin ve J. R. Lankard IBM laboratuvarlarında ilk sıvı lazeri ürettiler [4]. 1970 te ilk vakum mor ötesi lazer üretildi. 1975 te ilk excimer lazer, aynı yıl J. van der Ziel ve çalışma arkadaşları tarafından ilk kuantum kuyu lazeri galyum arsenit yarı iletkeninden üretildi. 1975 te ilk dalga boyu değiştirilebilir lazer,

1985 te D. Matthews tarafından ilk X-Ray lazer üretildi. 1986 da ilk Ti-Sap, 1991 de ZnSe kullanılarak ilk mavi-yeşil diyot lazer, 1994 te ilk kuantum şelale lazeri,1996 da GaN temelli ilk mavi diyot lazer üretildi [4].

Tablo 2.1: Kazanç ortamına ve dalga boyuna göre değişen lazer çeşitleri [1].

Kazanç Ortam	Lazer Tipi	Dalga Boyu
UZAK KIZILALTI		
Er: Glass	Katı hal	1540 nm
YAKIN KIZILALTI		
Cr: Forsterite	Katı hal	1150-1350 nm
HeNe	Gaz	1152 nm
Argon	Gaz-iyon	1090 nm
Nd: YAP	Katı hal	1080 nm
Nd: YAG	Katı hal	1064 nm
Nd: Glass	Katı hal	1060 nm
Nd: YLF	Katı hal	1053 nm
Nd: YLF	Katı hal	1047 nm
InGaAs	Yarı iletken	980 nm
Krypton	Gaz-iyon	799.3 nm
Cr: LiSAF	Katı hal	780-1060 nm
GaAs/GaAlAs	Yarı iletken	780-905 nm
Krypton	Gaz-iyon	752.5 nm
Ti: Sapphire	Katı hal	700-1000 nm
GÖRÜNÜR BÖLGE		
Ruby	Katı hal	694 nm
Krypton	Gaz-iyon	676.4 nm
Krypton	Gaz-iyon	647.1 nm
InGaAlP	Yarı iletken	635-660 nm
HeNe	Gaz	633 nm
Ruby	Katı hal	628 nm
HeNe	Gaz	612 nm
HeNe	Gaz	594 nm
Cu	Metal buhar	578 nm
Krypton	Gaz-iyon	568.2 nm
HeNe	Gaz	543 nm
DPSS	Yarı iletken	532 nm
Krypton	Gaz-iyon	530.9 nm
Argon	Gaz-iyon	514.5 nm
Cu	Metal buhar	511 nm
Argon	Gaz-iyon	501.7 nm

Tablo 2.1: (Devamı) Kazanç ortamına ve dalga boyuna göre değişen lazer çeşitleri [1].

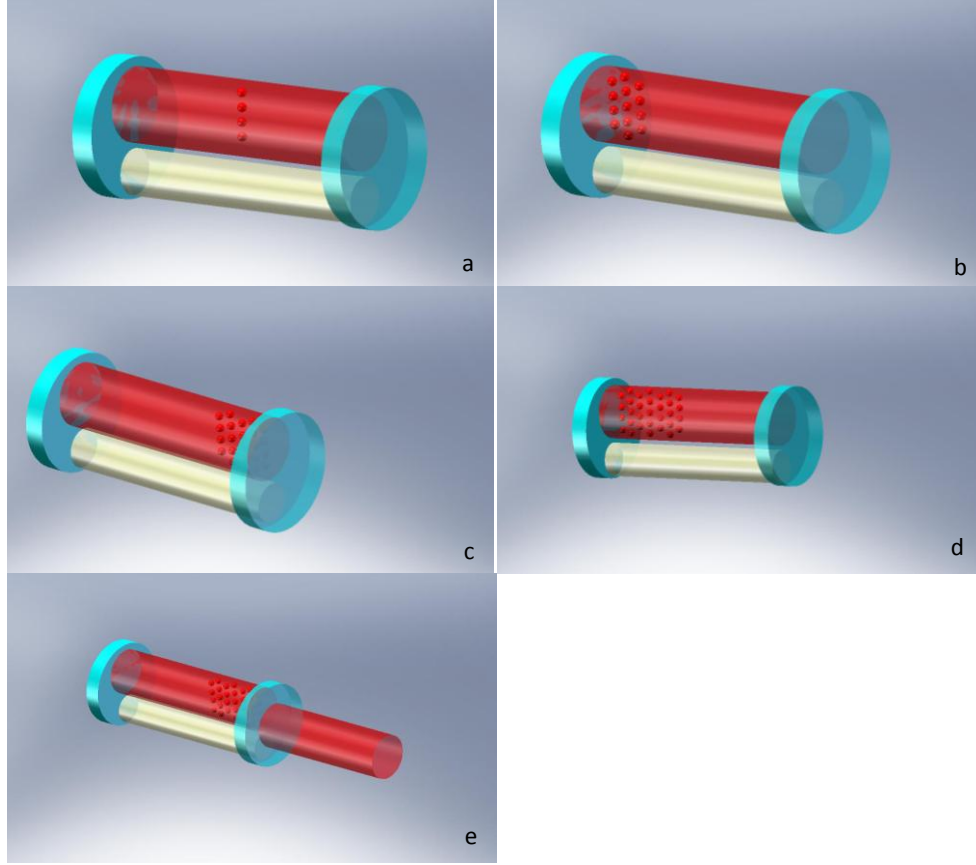
Argon	Gaz-iyon	496.5 nm
Argon	Gaz-iyon	488.0 nm
Argon	Gaz-iyon	476.5 nm
Argon	Gaz-iyon	457.9 nm
HeCd	Gaz-iyon	442 nm
N ₂ ⁺	Gaz	428 nm
Krypton	Gaz-iyon	416 nm
YAKIN MOR ÖTESİ		
Argon	Gaz-iyon	364 nm (UV-A)
XeF	Gaz (excimer)	351 nm (UV-A)
N ₂	Gaz	337 nm (UV-A)
XeCl	Gaz (excimer)	308 nm (UV-B)
UZAK MOR ÖTESİ		
Krypton SHG	Gaz-iyon /BBO kristal	284 nm (UV-B)
Argon SHG	Gaz-iyon /BBO kristal	264 nm (UV-C)
Argon SHG	Gaz-iyon /BBO kristal	257 nm (UV-C)
Argon SHG	Gaz-iyon /BBO kristal	250 nm (UV-C)
Argon SHG	Gaz-iyon /BBO kristal	248 nm (UV-C)
KrF	Gaz (excimer)	248 nm (UV-C)
Argon SHG	Gaz-iyon /BBO kristal	244 nm (UV-C)
Argon SHG	Gaz-iyon /BBO kristal	238 nm (UV-C)
Argon SHG	Gaz-iyon /BBO kristal	229 nm (UV-C)
KrCl	Gaz (excimer)	222 nm (UV-C)
ArF	Gaz (excimer)	193 nm (UV-C)

2.4. Lazerlerin Fiziksel Temeli

Bir lazer 3 ana bileşenden oluşur.

- 1) Uyarılmış ışımayı sağlayacak olan kazanç ortamı
- 2) Kazanç ortamında nüfus tersinimini sağlayacak pompalama kaynağı
- 3) Çıkan fotonların sayısının eksponansiyel olarak artması için 2 aynadan oluşan bir rezonatör veya optik kavite

Temel olarak bir lazer ışığının oluşumu şöyledir;



Şekil 2.1: Lazer kavitesi ve fotonların çoğalarak lazer oluşması

İki ayna arasına yerleştirilen kazanç ortamı ve kimi kavite sistemlerinde görüldüğü üzere pompalama kaynağı ile lazer ışığı üretimi için ilk basamak sağlanmış olur. Aktif ortam lazerin kullanım alanı için fark edeceğinden değişiklik gösterir. Bu ortam katı, sıvı veya gaz olabilir. Pompalama kaynağı ise bir gerilim kaynağı, flaş lambası ya da başka bir lazer olabilir. Pompalama kaynağı ile uyarılarak aktif ortamdan yayınlanan fotonlar aynalar arasında ki yansımalar ile tekrar tekrar aktif ortamdan geçerler ve bu geçişler esnasında aktif ortam gerek pompalama kaynağı gerekse aynalardan yansıyan fotonlar aracılığıyla uyarılır. Bu uyarımlar sonucunda kavite içinde ki foton sayısı eksponansiyel olarak artar. Belirli bir doymuşluğa ulaşan ışık, belirli bir geçirgenliğe sahip olan aynadan paralel bir şekilde dışarı çıkar (Şekil 2.1).

2.3. Lazer Işığının Özellikleri ve Uygulama Alanları

2.3.1. Lazer ışığının özellikleri

Lazer ışığının diğer ışıklardan farklı olarak özel bir durumu vardır. Açılımından da anlayacağımız üzere; “Uyarılmış Işımayla Kuvvetlendirilmiş Işık”, lazerler kuvvetlendirilmiş ışıklardır ve güçleri oldukça büyük değerlere ulaşabilir. Elbette ki bu lazerin yapısı, dalga boyuna bağlı olarak değişen bir özelliktir. Lazeri lazer yapan özelliklerin başında paralel bir ışık huzmesi olmaları ve eş frekanslı olmaları gelir. Kaviteden çıkan tüm fotonların frekansı $\nu = (E_2 - E_1)/h$ değerine sahiptir. Bu nedenle lazerlerin bant genişliği sıradan ışıklara göre daha dardır. Frekanslarının sabit olması $\nu = \lambda/c$ frekans-dalga boyu dönüşümünden de renklerinin tek renk olduğunu gösterir. Bu özelliklerinden dolayı lazer ışıkları monokromatik yani tek renkli ışıklardır.

Lazer ışığı paralel ya da üretim kalitelerine bağlı olarak, yani kavite tasarımlarına bağlı olarak neredeyse paralel olduklarından yönlendirilebilen ışıklardır. Bu özellik lazer ışıklarını aynalar vasıtasıyla bir noktadan başka bir noktaya, yayılmasında herhangi bir değişim olmadan taşınmasını sağlar. Yukarıda belirtildiği gibi üretim kalitelerine bağlı olarak lazer ışıklarının paralelliğinde bir süre sonra bir sapma gözlenebilir. Bu lazerin dalga boyuna, demetin odaklandığında oluşabilecek en küçük yarıçapına ve demetin kalitesi olarak belirtilen M^2 faktörüne bağlıdır. Buna göre ıraksama açısı denklem (2.10) ile verilir.

$$\theta = M^2 \frac{\lambda}{\pi \omega_0} \quad (2.1)$$

Burada θ ıraksanımın yani sapmanın yarı açısıdır. Bu değeri ölçmenin en kolay yolu ise, bir demet şekillendirici kullanarak belirli mesafelerde demetin yarıçapını ölçmektir [5].

Lazerlerin güçleri, aktif ortamı pompalamak için kullanılan kaynaktan verilen güce bağlı olarak değişir. Bu değerler mikro-watt mertebelerinden kilo-watt mertebelerine

dek ulaşabilirler. Lazerlerin güçleri lazerin türüne göre de farklılık gösterir. Eğer kullanılan lazer sürekli bir lazer kaynağı ise (CW) bu durumda sadece ortalama güçten bahsedilebilir. Eğer kullanılan lazer atımlı bir lazer ise bu durumda iki farklı güç terimi bulunur. Ortalama Güç ve Tepe Gücü. Ortalama güç, atımlı lazerin çalışma frekansına bağlı olarak

$$P = E \times f \quad (2.2)$$

formülü ile hesaplanır. Burada E atım enerji, f çalışma frekansdır. Tepe gücü ise lazerin atım süresine bağlı olarak

$$P = \frac{E}{t} \quad (2.3)$$

formülü ile hesaplanır. Burada E yine enerji olmak üzere t lazerin atım süresidir.

2.3.2. Lazerin uygulama alanları

Lazerler her gün gelişen teknoloji ile beraber gelişmelerine devam etmektedirler. Her geçen gün lazerlerin yeni bir kullanım alanı keşfedilse de günümüzde lazerler çoğunlukla sanayide kesme, kaynak ve delme işlemlerinde, güzellik ve estetik alanında, askeri alanda silah amaçlı olarak, tıbbi ve biyolojik alanda incelemelerde ve cerrahi müdahalelerde, madde analizleri ve ölçüm sistemlerinde, iletişimde, eğlence sektöründe ve daha birçok alanda kullanılmaktadırlar.

2.4. Optik Ölçüm Sistemleri

Bazı optik ölçüm sistemlerinde lazerlerin kullanılması, daha kesin bilgi elde etmeye imkân tanır. Bunun için eski sistemlerde kullanılan ışık kaynakları yerlerini kimi sistemlerde lazerlere bırakmışlardır. İçerisinde lazer olan bazı sistemlere Girişimölçer ya da interferometreler ve bazı spektrometreler örnek gösterilebilir.

2.4.1. Girişimölçerler

Optik girişim, bileşen ışık şiddetlerinin toplamından farklı bir bileşke ışık şiddeti meydana getiren iki veya daha çok ışık dalgasının etkileşmesi olayına girişim, oluşacak olan bu girişimden yararlanarak ortaya sonuç çıkartmaya yarayan sistemlere de girişimölçer denir. İki veya daha fazla ışık dalgası üst üste gelme ilkesi uyarınca uzayın bir noktasında oluşan bileşke elektrik alan “E” vektörü, bu vektörü oluşturan bileşenlerin vektörel toplamına eşittir. Üst üste gelme ilkesinin bir önemli noktası, toplanacak olan vektörel büyüklüklerin aralarında ki faz farkları, hedef noktada girişim çizgileri oluşturmasıdır. Eğer toplanan vektörler arasında faz farkı yoksa bu vektörlerin elektrik alan şiddetleri, oluşacak olan bileşke elektrik alanı destekler ve yüksek bir ışık şiddeti oluşturur. Eğer iki bileşen arasında belirli bir faz farkı varsa bu durumda vektörler birbirlerini etkisizleştirirler ve herhangi bir ışık gözlenmez. Bileşke elektrik alanı oluşturan vektörle ayrılırsa aşağıdaki denklemler elde edilir [6].

$$E(x, t) = E_0 \sin[\omega t - (kx + \varepsilon)] \quad (2.4)$$

E_0 x eksenine doğrultusunda ilerleyen harmonik değişimin genliğidir. $-(kx + \varepsilon) = \alpha(x, \varepsilon)$ olmak üzere $E(x, t)$ yi aynı hız ve frekansa sahip bileşenlerine ayrıldığında

$$E_1 = E_{01} \sin[\omega t + \alpha_1] \quad (2.5)$$

$$E_2 = E_{02} \sin[\omega t + \alpha_2]$$

Bu denklemlerdeki sinüsler açılarak toplanırsa bileşke elektrik alan

$$E = (E_{01} \cos \alpha_1 + E_{02} \cos \alpha_2) \sin \omega t + (E_{01} \sin \alpha_1 + E_{02} \sin \alpha_2) \cos \omega t \quad (2.6)$$

olur.

Toplam değişim;

$$E = E_0 \cos \alpha \sin \omega t + E_0 \sin \alpha \cos \omega t$$

$$E = E_0 \sin (\omega t + \alpha) \quad (2.7)$$

şeklinde olur. Böylece tek bir değişim E_1 ve E_2 sinüsel dalgalarının üst üste gelmesiyle oluşur. Bileşke dalga harmoniktir. Bileşke dalganın genliği ve fazı bileşenlerinden farklı dahi olsa, frekansın bileşenlerinininkiyedir. Bileşke elektrik alanının zamandan bağımsız kısımları ele alınıp kareleri alınırsa E_0^2 eşitlik 2.8 de önerildiği gibi

$$E_0^2 = E_{01}^2 + E_{02}^2 + 2E_{01}E_{02} \cos(\alpha_2 - \alpha_1) \quad (2.8).$$

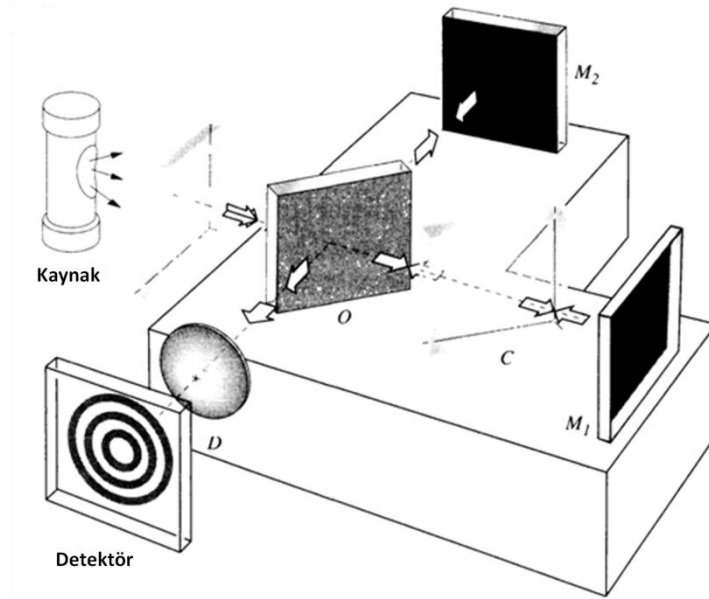
şeklinde olur ve burada ki " $2E_{01}E_{02} \cos(\alpha_2 - \alpha_1)$ " terimi girişim terimi olarak bilinir ve bu terimdeki " $\delta = \alpha_2 - \alpha_1$ " terimi faz farkını gösterir. Bu faz farkı $\delta=0, \pm 2\pi, \pm 4\pi, \dots$ olduğunda bileşke genlik en büyük, $\delta=0, \pm\pi, \pm 3\pi, \dots$ olduğunda ise bileşke genlik en küçüktür. Bu faz farkı iki dalganın aldıkları yoldan da kaynaklanabilir. Bu durumda α dönüşümü tersine yapılırsa

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda_0} n(x_1 - x_2) \quad (2.9)$$

olur ve buradaki " $n(x_1 - x_2)$ " terimi *Optik Yol Farkı*'ni verir. Burada n ortamın kırılma indisidir. " $x_1 - x_2$ " Δx yol farkına karşılık geldiğinden, eğer bileşke dalgayı oluşturan dalgalar arasında ki bu yol farkı $\Delta x \ll \lambda$ ise yapıcı girişim, $\Delta x = \lambda/2$ ise yıkıcı girişim söz konusudur [6].

Bir girişimölçer de beyaz ışık kullanmak yerine tek renk bir ışık yani lazer kullanmak saçakların daha iyi gözlenmesini, böylece ölçümlerden daha kesin sonuçlar alınmasını sağlar. İki ayrı ışık kaynağı kullanarak girişim desenlerini gözlemlemek mümkün olmayan bir durumken lazerlerin faz uyumlulukları bu durumu ortadan kaldıran bir etkidir. Ancak buna karşın kaynakların ikisi de beyaz ışık veriyorsa

belirgin olmasa da girişim deseni gözlemek mümkündür. Beyaz ışığın bu noktada ki dez avantajı saçakların gözlenmesi için aynalı bir sistem kullanıldığında yol farkının sıfıra yakın olması önem teşkil ederken, lazerler için 10cm lik bir fark bile hemen hemen etki etmez [6]. Farklı tasarımlarda aynalı girişimölçerler kullanılsa da en çok bilineni Michelson girişimölçeridir (Şekil 2.2). Tarihi bir öneme sahip olması nedeniyle ilk akla gelen tasarımdır. Bir demet bölücü, bir ışık kaynağı, iki ayna, bir mercek ve bir gözlem düzleminde oluşan basit bir düzendir. Aynalar arasında ki yol farkı değiştirilerek girişim desenlerindeki değişim gözlenebilir ve bir çok optik ölçüm bu yolla sağlanabilir. Bu yöntemle o zamanlarda olduğu kabul edilen, elektromanyetik salınımın ilerlemesini sağlayan eter denen ortamın olmadığını ispatlamıştır. Lazer kullanıldığında ise saçaklar daha belirgin şekilde gözlenir (Şekil 2.3) [6].



Şekil 2.2: Michelson Girişim ölçeri. Detektöre giden ışıklar bir mercekten geçirilerek dairesel saçaklar gözlenir [6].



Şekil 2.3: Lazer kullanılarak oluşturulan Michelson girişimölçerinden bir saçak görüntüsü [6].

2.4.2. Spektrometreler

Spektrometreler bir maddenin ya da birbirine karışmış elektromanyetik dalgaların birbirinden ayrılarak analizlerinin yapılmasına imkân sağlayan ölçüm sistemleridir. Optik sistemlerde kırınım ve geçirme ızgaraları ya da geleneksel prizmalar kullanılır. Bu optik elemanlara gelen ışıklar ortamların dalga boylarına göre farklı kırıcılık indislerini kullanarak dalga boylarına ayırır (Şekil 2.5). Böylece bir gözlem noktasında ya da bir detektörde bu dalga boyları kolaylıkla gözlemlenebilir. Beyaz ışığın spektrumu alındığında mevcut tüm görünür bölge renkleri gözlemlenir. Her zaman dışarıdan gelen bir ışık kaynağının spektrumunun detekte edilmesi söz konusu değildir. İçeriği bilinmeyen maddelerin analizlerinde de spektrometreler önemli görev üstlenirler. Örneğin metal bir plaka üzerine uygulanan bir enerji ile metal plakadan yayılan fotonlar spektrometreler aracılığıyla toplanarak metalin içindeki bileşenler belirlenebilir. Bölüm 4 te de incelenmiş olan Rayleigh kriterine göre çözünürlüğün artırılması için dalga boyunu küçültmek bir çözüm yoludur. Bunun için spektrometre tasarımlarında da madde analizinde ise dalga boyunun olabildiğince küçük olması çözünürlüğü arttıracığından bugün X ışınlarının kullanıldığı spektrometrelerde mevcuttur (XPS). Günümüzde sıklıkla kullanılan spektrometreler FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), Mikro Raman

Spektrometresi (Şekil 2.4), VIS-UV (görünür bölge ve mor ötesi) spektrometreleri, XPS (X-ray Photon Spectroscopy) spektrometreleridir. Bunların içinde lazerin kullanıldıkları ise FTIR ve Raman spektroskopi yöntemleridir. Bugün ayrıca Kütle spektroskopisinde de lazerler yer almaktadır [7].



Şekil 2.4: Mikro-Raman Spektrometresi lazerin kullanıldığı hassas ölçüm alan bir cihazdır [8].



Şekil 2.5: Prizmadan geçirilen beyaz ışık dalga boylarına ayrılır ve görünür bölgede ki spektrumu verir [9].

BÖLÜM 3. MİKROSKOPLAR

3.1. Giriş

Mikroskoplar gözümüzle görmemizin mümkün olmadığı cisimleri görünür hale getiren cihazlardır. Günümüz tıp ve biyoloji biliminde önemli rol oynayan cihazlardır. Ayrıca endüstriyel alanda da malzemelerin incelenmesi için mikroskoplar kullanılmaktadır. Farklı alanlarda çalışmak için farklı mikroskop tasarımları yapılmıştır ve gün geçtikçe de bu cihazlar yeni tekniklerle gelişmektedir. Bu bölümde geleneksel mikroskopların tarihçesi, genel özellikleri, çalışma prensipleri ve mikroskopların temelini oluşturan parçaları incelenecek ve bazı mikroskop çeşitleri için bilgiler verilecektir.

3.2. Mikroskop Nedir? Mikroskopların Tarihçesi

Mikroskoplar gözümüzle göremediğimiz cisimleri, büyütme özellikli mercekler kullanarak görünür hale getiren optik sistemlerdir. Adından da anlaşılacağı üzere İngilizce yazımına bakılırsa Micro-scope kelimelerinin birleşiminden oluşur. Micro bilindiği üzere mikro yani çok küçük anlamındadır ve scope ise genişlik, saha anlamlarındadır. Ancak bu cihazlar her durumda görmek istediklerimizi bize göstermezler. Bunun için üzerlerinde farklı büyütme oranlarına sahip özel objektif denen optik sistemleri vardır. Bu sistemler sayesinde farklı boyutlardaki cisimleri, en uygun büyüklükte görebiliriz.

1590 Yılında Zaccharias Johnson ve oğlu Hans bir takım deneyler sonucunda ilk büyütme özellikli mercekleri keşfetmişlerdir [10]. 1632-1723 yılları arasında Hollanda'da yaşamış olan Anton van Leeuwenhoek eğitimsiz biri olmasına rağmen tesadüf eseri büyütme özellikli bir cam kullanmış ve bu sayede zamanının ilk en iyi mikroskoplarını yapmıştır [10]. Ayrıca kendisi bakterileri, tek hücreli canlıları tanımlayan ve kan hücrelerinin yuvarlaklığı teorisinin belirlenmesinde yardımcı olan

ilk kişidir. Leeuwenhoek un çalışmalarını takip eden Robert Hook bir su damlasının içinde ki canlı organizmaları gözlemiştir ve daha sonra kendi tasarımını hayata geçirmiştir [10]. 19. yüzyılda en gelişmiş mikroskopu Amerikalı Charles A. Spencer üretmiştir [10]. Bugün ise birbirinden farklı mikroskoplar, farklı alanlarda yerlerini almışlardır.

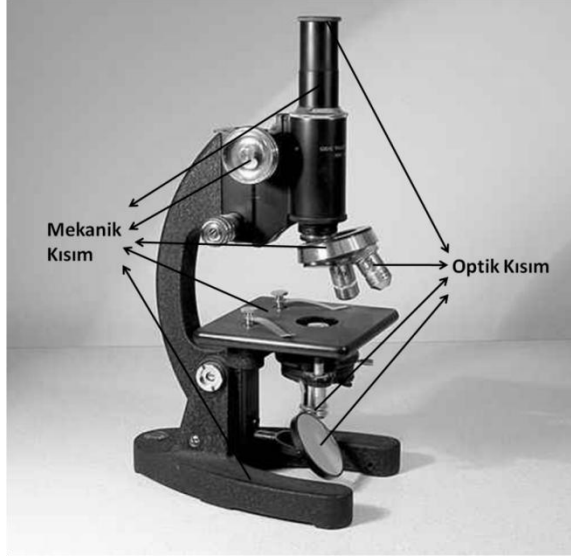
3.3. Optik Mikroskoplarının Çalışma Prensibi

Optik mikroskoplar Şekil 3.1 den de anlaşılabilceği üzere iki temel bileşende incelenir.

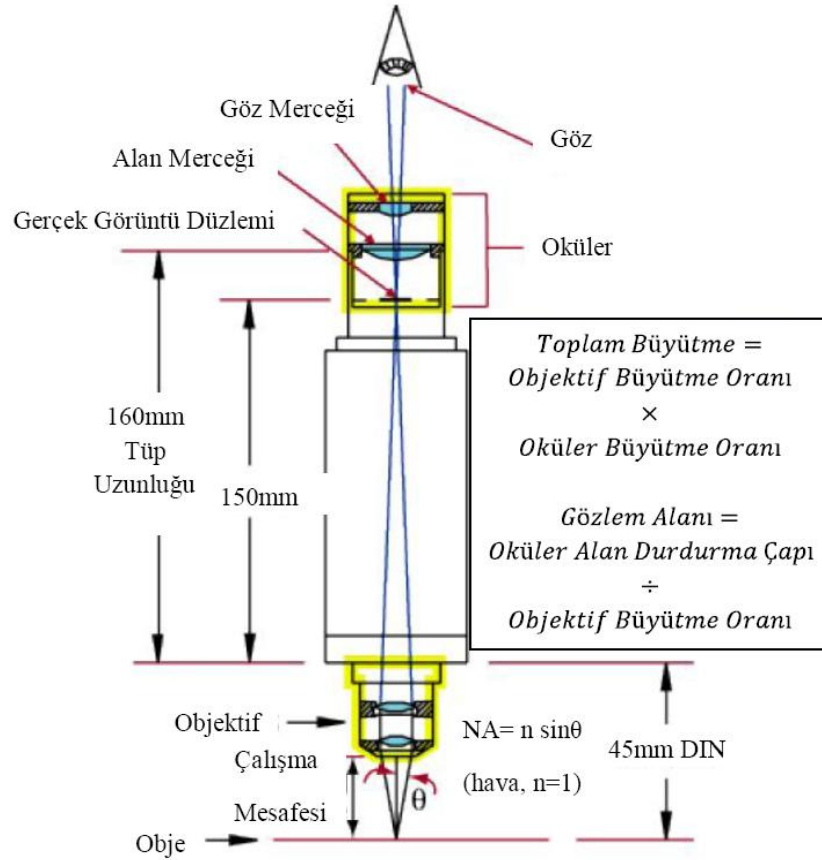
1. Optik Kısım
2. Mekanik Kısım

Optik kısım 3 temel elemandan oluşur: Objektif, Oküler ve Kondansör.

Objektifler farklı çözünürlük ve renk düzeltme özelliklerine sahip olan birincil elemanlardır. Uygulama alanlarına bağlı olarak farklı büyütme oranlarına sahiptirler. Oküler ikincil optik eleman olup objektif büyütmesini belirli bir oranda ikinci kez büyütüp göze taşıyan elemandır. Farklı büyütme oranları ve farklı tasarımlara sahiptirler. Üçüncü optik kısım ise kondansör yani ışık toplayıcısı olarak bilinir. İncelenecek örneği alttan düzgün bir aydınlatma sağlamak amacıyla tasarlanmış optik elemanlardır. Mekanik kısım ise birkaç bölümdür. Bunlardan birincisini “tube lens” yani tasarlanan objektife bağlı olarak objektif ile oküler arası mesafedir. Bu mesafe sıklıkla kullanılan DIN yani Alman Endüstri Normu (Deutsche Industrie Norm) standartlarındaki objektifler için 160mm dir. Bu değer JIS standartlarında yani Japon Standartlarında (Japanese Standard) 170mm dir (Şekil 3.2). Örneğin konulduğu preparat tablası, kondansör dan gelen ışığın geçebilmesi için üzerinde bir delik olan, örneği tutmak için kısıkaçlar ve ileri-geri, sağa-sola ve yukarı-aşağı hareketi sağlayabilmek için gerekli olan hareket sistemleri vardır. Bunun haricinde mekanik aksamdaki diğer önemli bir parça olan Revolver yani farklı büyütme oranlarındaki objektiflerin üzerine takıldığı döner parça da mekanik aksam içinde yer alır (Şekil 3.1). [11, 12]



Şekil 3.1: Standart bir ışık mikroskobu [13].



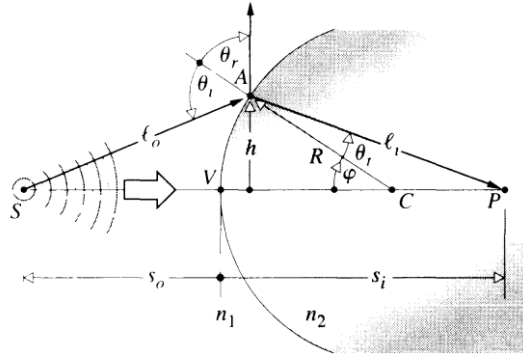
Şekil 3.2: Işık mikroskoplarının çalışmasını anlatan şema [12].

Bir mikroskopta en önemli kısımlar optik elemanlardır. Bu kısımları incelemeden önce geometrik optik incelenmelidir.

3.3.1. Küresel mercekler

Mercekler üzerlerine düşen ışığı kıran optik elemanlardır. Uygulama alanlarına göre geçirgenliği farklı olan maddelerden yapılabilmekle birlikte, geçirgenliğin artması için üzerlerine yansıtma önleyici kaplamalarda yapılabilir. Silindirik ve küresel olarak ikiye ayrılırlar. Bu çalışmada mikroskop optik elemanlarında tercih edilmelerinden dolayı küresel mercekler incelenmiştir.

Mercekler, 2 yüzeyi de belirli bir eğrilik yarıçapına sahip optik elemanlardır. Bu sayede üzerlerine gelen ışığı odaklar ya da dağıtırlar.



Şekil 3.3: Işığın küresel yüzeylerden kırınımı [6].

Bir merceğin odak uzaklığı eğrilik yarıçapına ve üretildiği malzemenin kırılma indisine bağlı olarak değişir. Merceğin odak uzaklığını bulmak için kullanılan denklem mercek yapıcısı formülü olarak geçer. Şekil 3.3 te görüldüğü gibi, s_o kaynağın mercek tepe yüzeyinin iz düşümüne olan ve s_i mercek tepe noktasının iz düşümünden eğri yüzeyin merkezine olan mesafeler, n_1 ışığın eğri yüzeyden içeri girdikten sonra ki ortamın kırıcılık indisi ve R_1 ve R_2 değerleri de Şekil 3.3 te temsil edilmese de mercek yüzeylerinin eğrilik yarıçapları olmak üzere mercek yapıcı formül

$$\frac{1}{s_o} + \frac{1}{s_i} = (n_l - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \quad (3.1)$$

ve

$$\lim_{s_o \rightarrow \infty} s_i = f_i$$

$$\lim_{s_i \rightarrow \infty} s_o = f_o \quad (3.2)$$

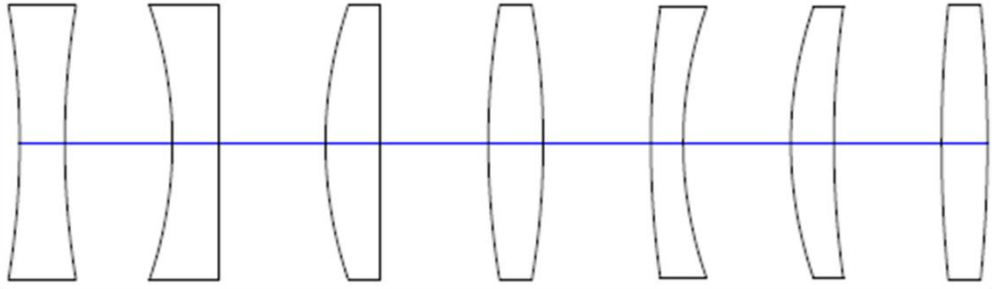
ile verilir. Buna göre,

$$\frac{1}{f} = (n_l - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \quad (3.3)$$

ve

$$\frac{1}{s_o} + \frac{1}{s_i} = \frac{1}{f} \quad (3.4)$$

şeklindedir. Ancak bu denklemler ince mercekler için geçerlidirler. Bu denklemler üzerinden yola çıkılarak şu anda bilinen 7 farklı mercek tipi vardır. Şekil 3.4 te görüldüğü gibi mercek çeşitleri sırasıyla: iki yüzeyi de iç bükey olan bi-concave, bir yüzeyi iç bükey olan plano-concave, bir yüzeyi dış bükey olan plano-convex, iki yüzeyi de dış bükey olan bi-convex, bir yüzeyi dış diğer yüzeyi iç bükey olan pozitif ve negatif menüsküs lensler ve en iyi odaklamayı sağlayan asferik lenslerdir.



Şekil 3.4: Mercek çeşitleri [14]

Kalın mercekler içinse denklem biraz farklıdır. d merceğin optik eksenini boyunca olan kalınlığı olmak üzere odak uzaklığı;

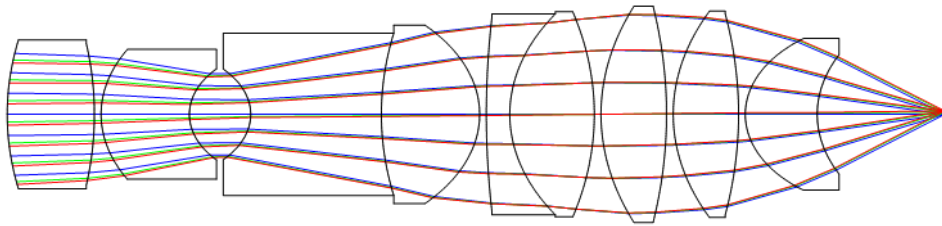
$$\frac{1}{f} = (n_l - 1) \left[\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} + \frac{(n_l - 1)d_l}{n_l R_1 R_2} \right] \quad (3.5)$$

olur. Optik hesaplamalar merceklerin odak uzaklıkları temel alınarak yapıldığından bu denklemler mutlaka bilinmesi gereken denklemlerdir. [6]

3.3.2. Objektifler

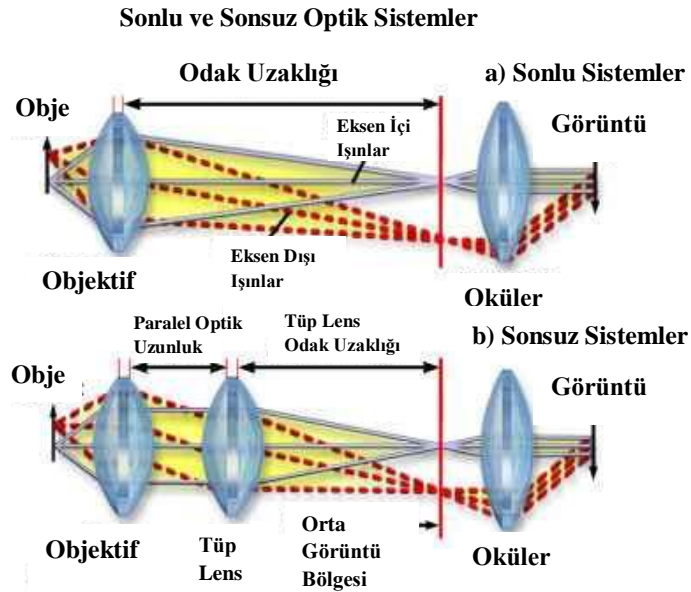
Objektifler tüm optik mikroskopların en önemli ve tasarımları en zor olan parçalarıdır. Farklı büyütme oranlarına sahip olan bu optik parçaların içlerinde birden fazla mercek bulunur (Şekil 3.5). Bu sayede optik bazı kusurlar en iyi şekilde giderilmeye çalışılır. Bu optik kusurların derecelerine göre objektifler kendi aralarında gruplandırılırlar. Ayrıca sadece kusurlara bağlı olarak değil, özelliklerine ve standartlarına bağlı olarak ta gruplandırılırlar.

Birinci gruplandırma standartlarına göre bölüm 3.3 te DIN ve JIS standartları altında anlatılmıştır.



Şekil 3.5: Optik programında tasarlanmış 40X sonsuz düzeltmeli objektif apokromat objektif

İkinci gruplandırma ise sonsuz düzeltmeli ve tüp uzunluklu objektifler olarak yapabiliriz. Tüp uzunluklu objektifler yukarıda belirtildiği üzere DIN ve JIS standartlarında olan objektiflerdir ve objektifin ön odak noktasından aldığı görüntüleri, okülerle objektif arasındaki DIN standartları için 150mm olan Field Stop yani Alan Durdurma çizgisine yeniden odaklayan optik sistemlerdir (Şekil 3.2). Sonsuz düzeltmeli objektiflerde ise adlarından da anlaşılacağı üzere ön odak noktasından aldığı görüntüyü objektifin arka merceğinden paralel olarak çıkaran optik sistemlerdir. Bu tarz objektiflerde görüntünün oluşturulabilmesi için “Tube Lens” yani tüp uzunluk merceği ek bir aksesuar olarak kullanılır (Şekil 3.6). Optik kusurların düzeltmelerinin sağlanabilmesi için uygun mercekler kullanılarak oluşturulan sistemler olabilirler. Farklı büyütme oranlarına sahip bu optik parçaların odak uzunlukları 1X yani 1 kat büyütme için $f=200\text{mm}$, 2X yani 2 kat büyütme için odak uzaklıkları $f=400\text{mm}$ olur (Şekil 3,6) [15].



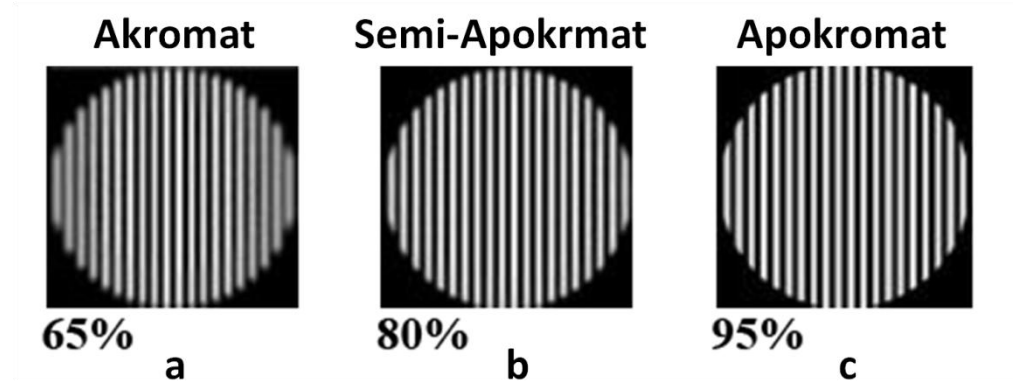
Şekil 3.6: Sonlu ve Sonsuz düzeltmeli objektifleri anlatır çizim [16].

Kusur düzeltmelerine göre ise objektifler 3 ana gruba ayrılırlar (Şekil 3.7). Bunlar:

1) Akromatik Objektifler: Küresel bozukluğu bir, eksensel kromatik bozukluğu iki renk için düzeltir. Fiyatları en ucuz olan objektif türüdür. İçinde ki mercek sayısı azdır. [10]

2) Apokromatik (plan): Küresel bozukluğu iki, eksensel kromatik bozukluğu üç renk için düzeltir. En yüksek fiyatlı objektif türüdür. [10]

3) Semi-Apokromatik (semi-plan): Akromatik ve Apokromatik objektiflerin arasında ki düzeltme oranların sahiptirler. [10]



Şekil 3.7: Objektif kalitelerini küresel hataların düzeltilmesine göre anlatan şekil. a) en düşük düzeltme oranlı objektif (Akromatik), b) orta düzeltme oranlı objektif (Semi-plan, Fluorite ya da semi- apokromat), c) en yüksek düzeltme oranlı apokromat objektif [12].

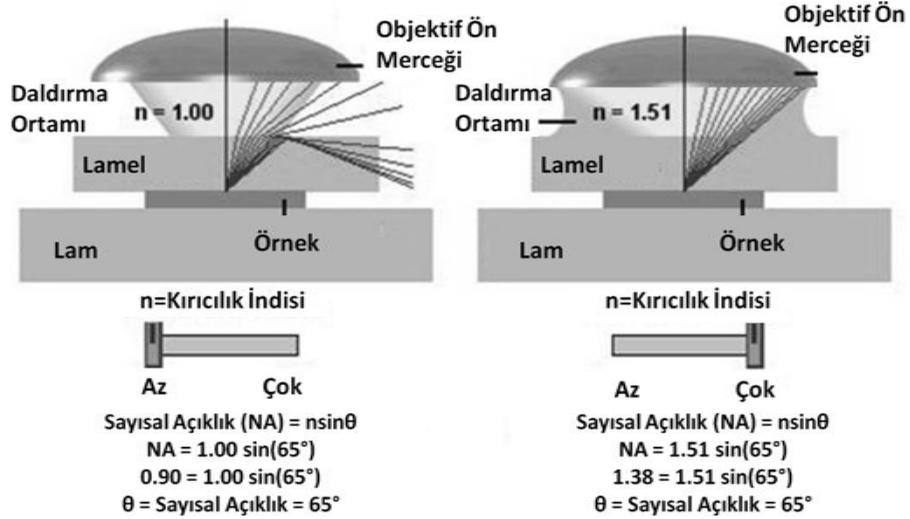
Bir objektifin özellikleri mercekleri tutan metal kılıfın üzerine yazılmıştır (Şekil 3,8).



Şekil 3.8: Objektifin tanıtımı [16].

Objektif seçilirken bu özelliklerine dikkat edilerek seçilmelidir. Bu özelliklerin arasında bir objektifi tanımlayan belli başlı özellikler Daldırma Ortamı, Sayısal Açıklık, Lamel Düzeltmesi ve Çalışma Mesafesidir. Şimdi bunları inceleyelim.

3.3.2.1. Daldırma ortamı



Şekil 3.9: Daldırma ortamı objektifin kullanılması gereken ortamı belirler [10].

Daldırma ortamı objektifin ön merceği ile lamel arasında kullanılacak ortamın kırılma indisini tanımlayan özelliktir. Tüm objektiflerde metal kaplamanın üzerinde bu ortam tanımlanmıştır. Genellikle küçük büyütme oranlı objektiflerde bu ortam hava olduğundan kırılma indisi $n=1$ olarak verilir. Ancak Şekil 3.8 de de görüldüğü gibi objektifin büyütme oranı değiştikçe kullanılması gereken ortamın kırılma indisi de değişmelidir. Böylece mercek ile kullanılan ortamın kırıcılık indisleri birbirlerine daha yakın olacağından ışıklar daha az kırılmaya uğrar ve objektife daha çok ışık girer. Bu özellik objektifin sayısal açıklığının artması için de önemli bir özelliktir. Daldırma ortamı olarak kullanılan birkaç çeşit malzeme vardır. Bunlar Tablo 3.1 de tanımlanmaktadır.

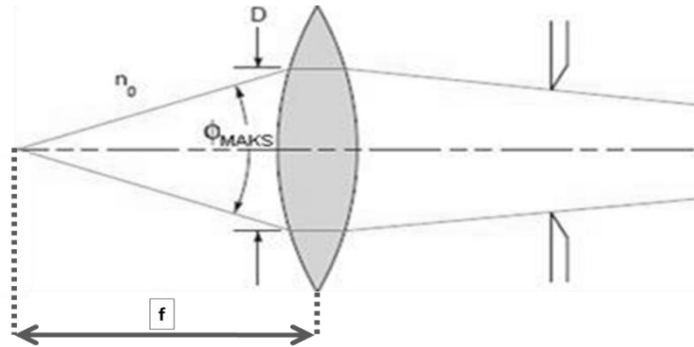
Tablo 3.1: Daldırma ortamları ve renk kodları [17].

Daldırma Ortamı	Renk Kodu
Yağ	Siyah
Gliserin	Turuncu
Su	Beyaz
Özel	Kırmızı

Genellikle kullanılan daldırma ortamı kırılma indisi camın kırılma indisiyle aynı değere sahip olan özel Daldırma Yağ'ıdır. Bu Tablo 3.1 de Yağ olarak verilmektedir ve kırılma indisi $n=1,5$ tur.

3.3.2.2. Sayısal açıklık

Sayısal açıklık bir objektifin en önemli özelliklerinden biridir. Bu, objektifin ışık toplama kapasitesinin göstergesidir. Bir objektif ne kadar çok ışık toplayabiliyorsa alınacak olan görüntü o kadar kaliteli olur. Sayısal açıklık hesaplaması temel olarak objektiften çıkarak örnek üzerine odaklanan ışığın objektifle yaptığı açının yarısıdır (Şekil 3.10) [10].



Şekil 3.10: Sayısal açıklığı gösteren çizim [10].

Büyük açılar için sayısal açıklık;

$$NA = n \times \sin \frac{\theta}{2} \quad (3.6)$$

küçük açılar için ise;

$$f/\# = \frac{F}{D} = \frac{1}{2 \times NA} \quad (3.7)$$

olarak tanımlanır. Burada F : objektif odak uzaklığı, D : objektifin ön merceğinin kullanılabilir çapı, $f/\#$ da bir gösterimdir [10].

3.3.2.3. Lamel düzeltmesi

Lamel genellikle 0.17mm kalınlığında ve kırılma indisi 1,5 olan camdan üretilir. Bu özellik optik kusurlara sebep olabileceğinden lamel düzeltmesi yüksek sayısal açıklıklı objektiflerde objektif içinde ki hareketli bir mekanizma ile gerçekleştirilir. Ancak bu hatalar 0,4 ve daha küçük sayısal açıklıklar için kabul edilebilir değerdedirler [10].

3.3.2.4. Çalışma mesafesi

Çalışma mesafesi objektifin büyütme oranına bağlı olarak objektifin ön merceği ile lamel arası mesafedir. Objektifin büyütme oranı arttıkça çalışma mesafesi küçülür [10].

3.3.3. Oküler

Okülerler objektifin büyüttüğü gerçek görüntüyü ikinci kez büyüterek sanal görüntü oluşturan optik elemanlardır (Şekil 3.11).

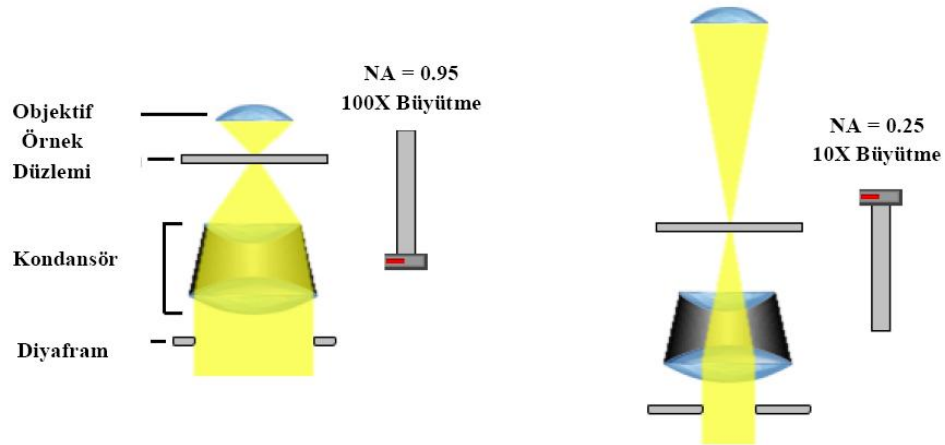


Şekil 3.11: Geniş alan oküleri [15].

3 temel tasarıma sahiptirler. Huygenian, Ramsden ve düzeltici okülerler. Bunlar aralarında ki fark kullanılan mercek çeşitleri ve hata düzeltmeleridir. 10X, 15X ve 20X lik büyütme oranlarında tasarımlar mevcuttur. Bu sayede optik bir mikroskopla ulaşılabilecek en büyük büyütme oranı 2000X yani 2000 kat büyütme [18].

3.3.4. Kondansörler

Kondansörler alttan aydınlatmalı mikroskoplarda örneği aydınlatmak için kullanılacak olan ışığı örnek üzerine odaklayan optik sistemlerdir. Farklı tasarımlara, optik kusur düzeltme yeteneklerine ve sayısal açıklığa sahiptirler. Merceklerin altında bulunan diyafram, örnek aydınlatılması için gerekli olan ışık miktarını ayarlamaya yarar (Şekil 3.12) [19].

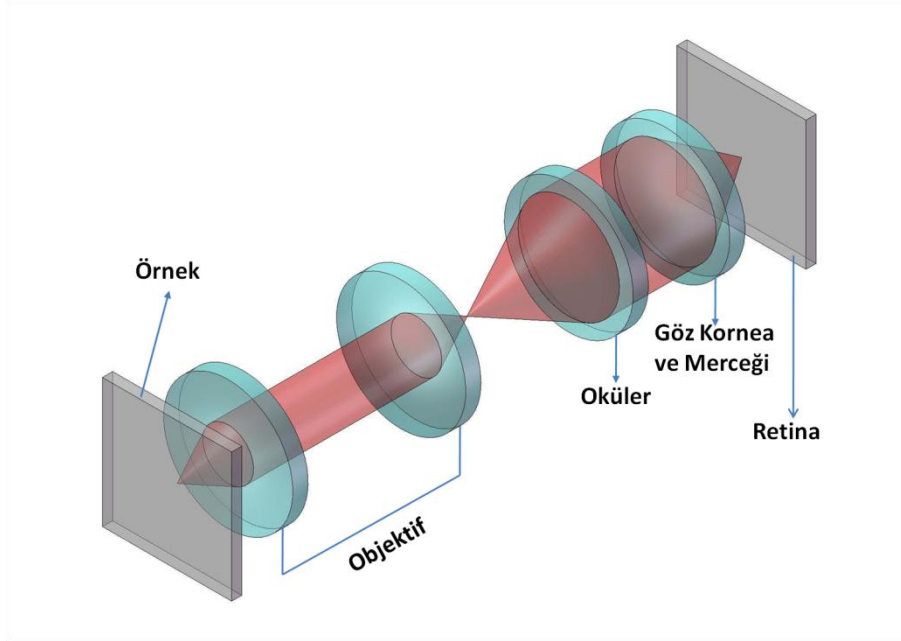


Şekil 3.12: Kondansörlerin büyütme oranlarına göre ışık verme gereklilikleri [19].

3.3.5. Görüntü oluşumu

Işık kaynağı tarafından oluşturulan ışık kondansörden geçerek lam ve lamel arasında konmuş olan örneğin üstüne odaklanır. Aydınlatılan örnekten yayılan ışıklar belirli bir büyütme oranına sahip objektif tarafından toplanır. Objektifin sayısal açıklığı, görüntünün kalitesi açısından büyük önem taşır. Objektif yukarıda belirtildiği gibi ya sonsuz düzeltme verebilir ya da belirli tüp uzunluğunda objektifin topladığı ışıklar odaklanarak yeniden görüntü oluşturur. Belirli büyütme oranı ve düzeltme becerisine

sahip okülerler objektifin odakladığı bu ışıkları toplar ve gözün retina tabakasında odaklanacak şekilde paralelleştirir. Bu noktada bilinmesi gereken önemli ayrıntı şudur, objektifin oluşturduğu görüntü gerçek görüntü, okülerin oluşturduğu görüntü sanal görüntüdür. Şekil 3.13 görüntü oluşumunu göstermektedir.



Şekil 3.13: Mikroskopta görüntü oluşumu

3.4. Mikroskop Çeşitleri

Kullanım alanlarına göre mikroskoplar farklılık gösterir. Bu mikroskopları şöyle sıralayabiliriz: Stereoskopik mikroskoplar, Polarizasyon mikroskobu, Faz Kontrast mikroskobu, İnterferens mikroskobu, Metalürji mikroskobu, Elektron mikroskobu, Karanlık alan mikroskobu, Flüoresans mikroskop, X-Ray mikroskobu, Confocal Laser Scanning mikroskop, Saha emisyon mikroskobu, Atomik Kuvvet Mikroskobu, Cevher Mikroskopisi, Yakın Alan Taramalı Optik Mikroskop [20]. Bu mikroskoplardan bazıları alt başlıklar halinde ayrıntılı şekilde incelenmiştir.

3.4.1. Stereoskopik mikroskoplara

Bu mikroskoplara Greenough tarafından iki mikroskobun birleştirilmesiyle yeniden tasarlanmıştır. [18] Böylece iki gözümüzü de kullanma imknmz vardır. İki gözün farklı ayırma gücü daha doğru stereo görüntüler almamza imkân sağladı. Bu cihazın içinde bulunan prizma ile görüntü kaldırılır böylece daha ufak cisimleri inceleme imkn doğar. Ancak bu mikroskoplara mekanik aksamaların sayısal açıklık değerini kısıtlaması gibi bir dez-avantaja sahip olup ve 120X büyütmeden daha fazla bytmeye imkân vermezler (şekil 3.14 [18]).



şekil 3.14: Stereo Mikroskop [21].

3.4.2. Polarizasyon mikroskobu

Bu mikroskoplara cisimlerin polarize ışıkla olan görüntülerinin incelenmesi için polarize ışık kullanan parlak alan mikroskoplardır. Bilinen geleneksel mikroskoplara kondansör kısmına veya okülerin üstüne veya içine polaroid konması ile de elde edilebilen cihazlardır (şekil 3.15) [18].



Şekil 3.15: Polarizasyon Mikroskobu ve polarizasyon [21, 22].

3.4.3. İnterferens mikroskobu

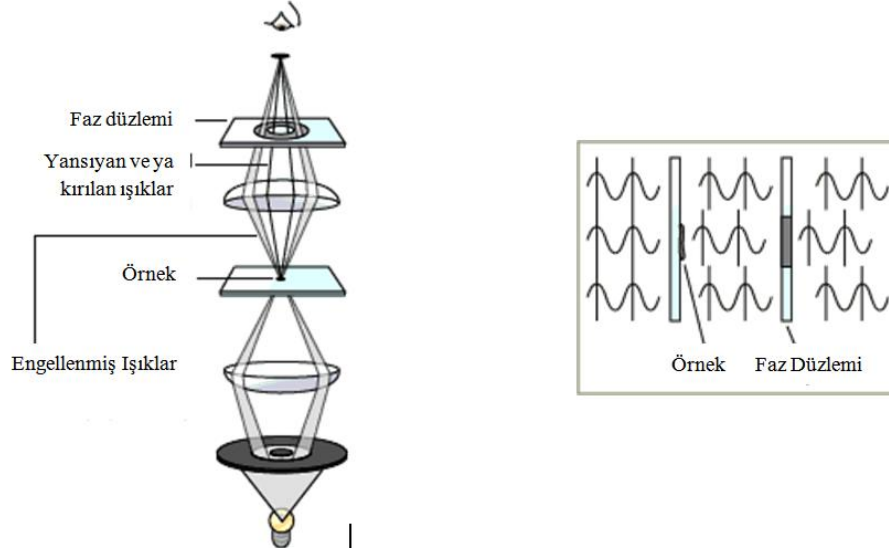
Adından da anlaşılacağı üzere girişim deseni oluşturmaya yönelik bir mikroskop sistemidir. İki çeşit interferens mikroskop vardır. Çoklu ışın interferens ve iki ışın interferens yöntemi vardır [18]. Çoklu ışın yönteminde incelenecek örnek düz metalik iki yansıtıcı arasına yerleştirilir ve paralel monokromatik ışıkla aydınlatılır. Tekrarlanan yansımalarla örnekten geçen ışıklar bir girişim deseni oluşturur ve bu şekilde optik yol farkı hesaplanır. İki ışın yönteminde ise eş fazlı aydınlatma ışığı ikiye ayrılarak bir tanesi örnek üzerine odaklanır diğer odak dışından gelecek şekilde örneğe düşürülür. Işıkların daha sonra tekrar birleştirilmesiyle oluşacak olan girişim deseninden optik yol farkı hesaplanır (Şekil 3.16) [18].



Şekil 3.16: Olympus interferans mikroskobu ve iki ışın yöntemini anlatır çizim [21].

3.4.4. Faz-kontrast mikroskobu

Neredeyse şeffaf olan örnekler kırılma indislerine ve kalınlıklarına bağlı olarak optik yol farkı gösterirler. Prensibinde dairesel bir diyafram kondansörün önüne yerleştirilir. Eğer bu dairesel diyafram eşit olarak aydınlatılırsa objektifin odak noktasından içeride mercek sistemleri arasında bu daire görülebilir. Ancak bir örnek incelenmek istendiğinde bazı ışıklar objektif içinde kırınım düzlemine doğru kayma yapar. Bu noktaya yerleştirilecek bir kırınım tabakası çeşitli biçimde örnekten ve arka plandan gelen ışıkların kaymasını sağlar (Şekil 3.17) [18].



Şekil 3.17: Faz-Kontrast Mikroskobunun optik görüntüsü ve faz farkı gösterimi[23].

3.4.5. Flüoresans mikroskobu

Floresans mikroskobu, konfokal mikroskoba en çok benzeyen tasarımıdır. Görüntülemeye dayalı prensipleri hemen hemen aynıdır. Temel olarak geleneksel optik mikroskopları baz alır ancak içerisinde belirli eklentiler vardır. İncelenecek örnekler, gözlenmesi beklenen yapının içini renklendirecek özel bir flüoresans boya ile boyanır. Boyanan örnekler daha sonra mikroskobun objektifi içinden gelen flüoresans ışık ile aydınlatılır ve özel boyayla etkileşen ışığın dalga boyunda belirli bir kayma olarak objektiften geri geçer ve flüoresans filtrelerden geçerek kamera üzerine düşürülerek görüntü oluşturulur (şekil 3.18)

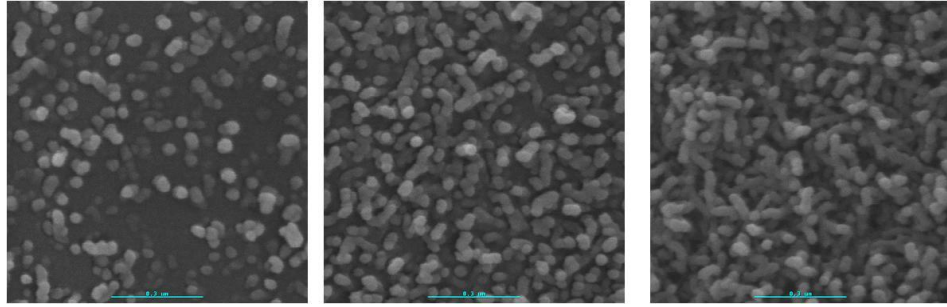


Şekil 3.18: Flüoresans mikroskobu [24].

3.4.6. Elektron mikroskobu

Parçacıkların aynı zamanda dalga özelliğinin de kullanıldığı özel bir mikroskop türüdür. Çalışma prensipleri elektronların demetler halinde elektrik alan ile etkileşip bir noktaya odaklanmasına dayanır. Elektronların denk geldikleri dalga boyları oldukça küçük olduğundan optik mikroskopların göremeyecekleri kadar ufak cisimleri görmeye olanak sağlar. Çözünürlükleri birkaç nm(nano metre) civarındadır. Çalışmaları için vakum ortamına ihtiyaç duyarlar ve vakum ortamı içinde iki odacıkları bulunur. 2 tip elektron mikroskobu vardır. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Geçirgen Elektron Mikroskobu (TEM). Geçirgen Elektron mikroskoplarında elektron ışını çok ince bir örneğe yönlendirilir. Elektron mikroskobunda, projeksiyon mercekleri olarak adlandırılan mercekler gerçek görüntüyü flouresans ya da fotografik film üzerine düşürmelidir, çünkü gözümüz elektron görüntüsünü doğrudan göremez. Tem için kullanılan örnekler çok ince olmalıdır. 10-20nm kadar ince örnekler özel yöntemlerle hazırlanabilmektedir. Taramalı Elektron Mikroskoplarında ise daha kalın örnekler elektron ışınlarının yüzeyden yansması ile incelenebilir. Elektron ışını örnek yüzeyine odaklanır ve örnek yüzeyini taramaya başlar. Işının örnek yüzeyini taramaya başlamasıyla

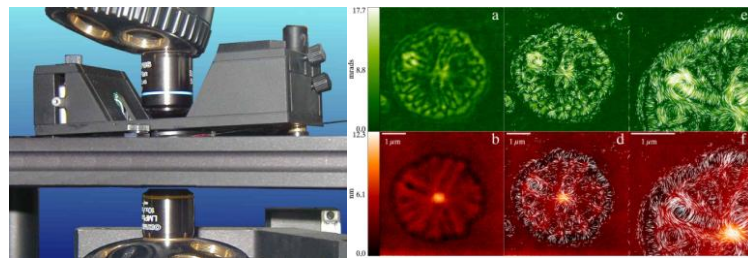
yüzeyden yansıyan elektronlar örneğe göre birkaç yüz volt pozitif voltajda tutulan anot ile toplanır. Toplayıcı anottaki akım yükseltilir ve katot ışın tüpündeki mikroskop ışını ile eşzamanlı olarak taranan elektron ışınlarını değiştirmek için kullanılır. Bu nedenle katot ışın tüpü örneğin oldukça büyütülmüş olan görüntüsünü alır. SEM 'in ayırma gücü 10nm mertebesindedir. (Şekil 3.19) [25].



Şekil 3.19: SEM ile alınmış nanowire görüntüleri (INM-Leibniz Institute, Almanya)

3.4.7. Yakın alan taramalı optik mikroskop (SNOM)

Mikroskoplarda görüntü oluşturmada sayısal açıklık ve kullanılan ışığın dalga boyuna bağlı olarak bir takım sınırlamalar vardır. Tasarımının arkasında ki fikir, ışığın kırınımına uğramadan görüntü alınabilmesine dayanır. Birkaç yüz nm kalınlığında olan özel proplar ile incelenecek örneğe birkaç nm mesafede yaklaşılır ve örnek aydınlatılır. Örnekten yayımlanan ışıklar objektif yardımıyla toplanır. Böylece aydınlatmak için kullanılacak ışık kırınımına uğramadan, bir dalga boyu kadar yol kat edmeden örneğe ulaşmış olurlar ve yüksek çözünürlüklü görüntüler optik bir mikroskopla elde edilmiş olur. Tarama kafası için piezo sistemlerden yararlanır. Bu birkaç nm arayla tarama olanağı sağlar (Şekil 3.20) [26].



Şekil 3.20: SNOM dan bir görüntü ve SNOM'a ait bir görüntü [27, 28].

BÖLÜM 4. LAZER TARAMALI KONFOKAL MİKROSKOPLAR

4.1. Giriş

Geleneksel optik mikroskopların oldukça ileri teknolojik cihazlarla modernize edilmiş hali olan Lazer Taramalı Konfokal Mikroskoplar, özellikle canlı hücreler gibi ince örneklerden görüntü alabilme özellikleri sayesinde biyoloji ve medikal alanda oldukça rağbet gören cihazlardır. Bu mikroskoplar görünür bölgede ışık yayan lazerlerle ve her lazerle etkileşim sonucu yayılacak olan ışıkların çoğaltılıp anlamlı sinyaller haline getirilmesi için foton-çoğaltıcılarla veya detektörler ile donatılmışlardır. Bu mikroskoplar kalınlıkları 100µm ye kadar olan örneklerden görüntü alabilirler. En büyük özellikleri ise 3. boyutta tarama yapabilmeleridir. Böylece bir bilgisayar yazılımı desteğiyle incelenecek cismin 3 boyutlu görüntüsü oluşturulabilir. Bu da bu mikroskobu kullanan uzmanlara daha gerçekçi bir inceleme yapma imkânı sağlar. Bu bölümde konfokal mikroskopların tarihçesi, teknik özellikleri, donanımlarında kullanılan cihazlar ve farklı tasarımları üzerinde bilgi verilecektir.

4.2. Konfokal Mikroskopların Tarihçesi

Lazer taramalı konfokal mikroskobun temelleri 1950 yılında Harvard Üniversitesi'nde ileri doktora öğrencisi olan Marvin Minsky tarafından atıldı [29] ve 1961 yılında patentlendi. Minsky'nin amacı renksiz beyin hücrelerinin nöral iletişimlerini görüntülemektir. Minsky'nin çalışmalarını takiben 1960 yılının sonlarında M. David Egger ve Mojmir Petron çoklu ışın konfokal mikroskobu geliştirdiler [29]. Yaptıkları tasarımda dönen bir disk kullanarak renksiz beyin hücreleri ve sinir uç noktalarını görüntülemeyi başardılar. Bu alandaki çalışmalar sonucunda Egger mekanik lazer taramalı konfokal mikroskobu üretti. 1970lerin sonları ve 1980ler de gelişen teknolojiyle bu mikroskoplar bilgisayarlarla kontrol edilmeye başlandı ve lazer teknolojisinin gelişmesiyle de ışık kaynaklarının yerini

lazerler aldı [29]. Minsky'nin patent süresinin dolması üzerine pratikte olan konfokal mikroskop birkaç bilim adamı tarafından çalışır hale getirildi. 1979 yılında alman fizikçi G. Fred Brakenhoff taramalı konfokal mikroskobu geliştirdi ve hemen hemen aynı zaman içerisinde Colin Sheppard ta görüntü biçimlendirilmesi için teorik destekte bulundu. Tony Wilson, Brad Amos, and John White bu fikri daha da büyüterek 1980 lerin sonlarına doğru flüoresans boyalı hücrelerin incelenmesinde bu cihazın kullanılabileceğini kanıtladı [29]. İlk ticari ürün ise 1987 yılında ortaya çıktı. 1990 lı yıllarda ise tarama aynaları geliştirildi, lazerlerin güçleri arttı ve lazer dalga boyları ile örtüşen flüorokrom boyalar üretilmeye başlandı[29]. Bugünkü mikroskoplar ise lazerin şiddetini ve gelen ışıkların dalga boylarını ayarlayan Acusto Optik Değişken Filtreler (Acusto Optic Tunable Filter) ile donatılmışlardır ancak tüm ileri teknolojisine rağmen optik mikroskoplar hala bu cihazların merkez sistemleridir. [29, 30]

4.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopta Görüntü Oluşturulması

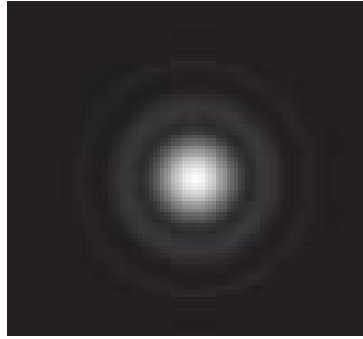
1873-1884 yılları arasında modern ışık mikroskopisinin temellerini atan Ernst Abbe ışığın örnekteki ve objektifteki kırınımının görüntü çözünürlüğünü nasıl etkilediğini belirledi ve bu sorunların düzeltilmesi için şu kuralı yayınladı [31]:

$$d_{min} = \frac{1.22\lambda_o}{NA_{obj}+NA_{cond}} \quad (4.1)$$

Burada d_{min} periyodik kafes arasında ki minimum boşluk, λ_o kullanılan ışığın dalga boyu NA_{obj} objektifin sayısal açıklığı ve NA_{cond} kondansörün sayısal açıklığıdır. Sonsuz küçük bir ışımaya yapan bir noktanın merkezindeki parlak alana Airy Disk denir (şekil 4.1). Düzlemsel çözünürlük olarak tanımlanır ve etrafında karanlık, parlak diye giden Airy kırınım desenlerinin en içteki karanlık halkasının yarıçapı

$$r_{Airy} = 0.61 \frac{\lambda_o}{NA_{obj}} \quad (4.2)$$

olarak verilir [31]. R_{Airy} örnek düzleminde ki iki parlak nokta arasında ki mesafe olarak verilir. Eğer iki parlak nokta arası mesafe “d” r_{Airy} den büyük ya da eşitse çözünürlük iyi demektir. Buna Rayleigh faktörü denir ve iki ışık eğer eş fazlı olarak yayılmıyorsa söylenebilir. Eğer ışıklar eş fazlı ise genlikleri şiddetlerine göre daha ön plana çıkar ve çözünürlüğü artırır. Optik sistemlerde çözünürlüğü arttırmak için dalga boyunu küçültmekte ayırma gücünü yani çözünürlüğü arttıran bir faktördür. Nokta objelerin çizgisel çözünürlüklerinin kondansörün kalitesine ve NA sına bağlı olduğunu 1950 de Hopkins ve Barham söylemişlerdir [31].

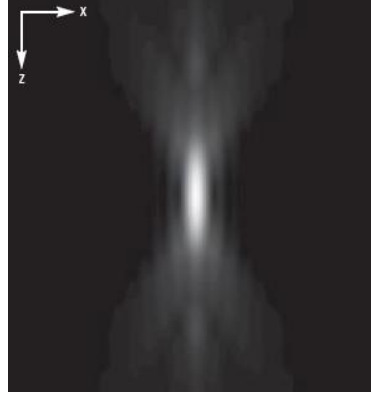


Sekil 4.1: Airy Disk Görüntüsü [23].

Eksensel çözünürlük ise bir 3 boyutlu ışık kaynağının z ekseninde ki çözünürlüğü olarak bilinir. Düzlemsel çözünürlüğe benzer olarak eksensel çözünürlük, z ekseninde en yakın 2 noktanın görülebilirliği olarak tanımlanır. Bu çözünürlük geometrik ışın takibi ile değil, dalga optiği ile tanımlanır. Buna göre 3 boyutlu kırınım çizgilerinin merkezinden ilk minimum düzlemsel noktaya olan uzaklığı z_{min} :

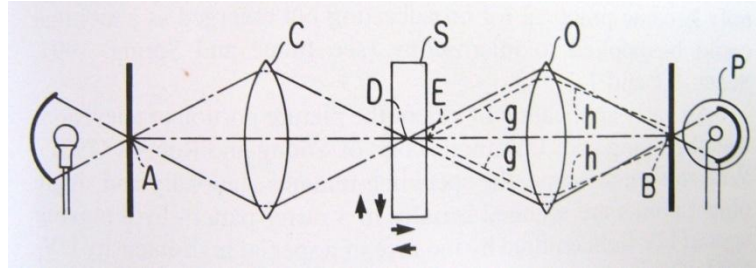
$$z_{min} = \frac{2\lambda_0\eta}{NA_{obj}^2} \quad (4.3)$$

olarak bilinir [31]. Burada η objenin yani incelenecek örneğin kırılma indisidir. Her ne kadar z_{min} objektifin sayısal açıklığının karesi ile ters orantılı olsa da, düzlemsel çözünürlüğün kontrastı objektifin sayısal açıklığı ile ters orantılıdır. Bu sebepten düzlemsel ve eksensel çözünürlüklerin oranı dalga boyundan büyük olur ve objektifin sayısal açıklığı ile ters orantılıdır [6, 31].



Şekil 4.2: eksensel çözünürlüğün görüntüsü [32].

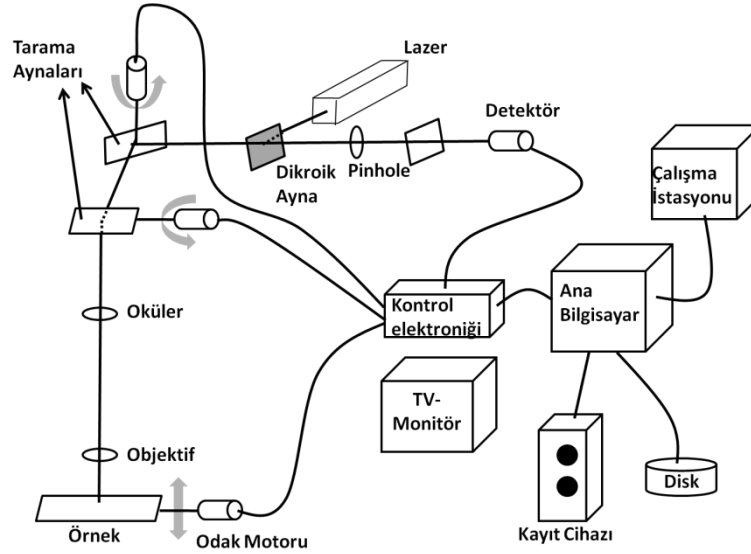
Konfokal mikroskopların özelliği ilk tasarımdan bu yana gelen, pinhole denen ışığı temizlemeye yarayan mikron mertebelerinde ki delikleri kullanarak, odak dışı görüntülerin engellenmesiyle çözünürlüğün arttırılmasını sağlamak birincil amaçtır (Şekil4.3) [30].



Şekil 4.3 İlk konfokal mikroskobun prensibi[31].

Burada A ve B aydınlatma ve yayılma ışıklarını düzenleyen deliklerin c odaklayıcı, O toplayıcı mercek ve S örneği göstermektedir. Şekilden anlaşılacağı üzere sadece D noktası yani odak noktasından gelen ışıklar B ile gösterilen delikten den geçerek P ile gösterilen foto tüp e ulaşır. E odak dışında kaldığı için B pinhole ünden geçmez. Konfokal mikroskobun başka bir tasarım şeklide Şekil 4.4 te verilmiştir [31].

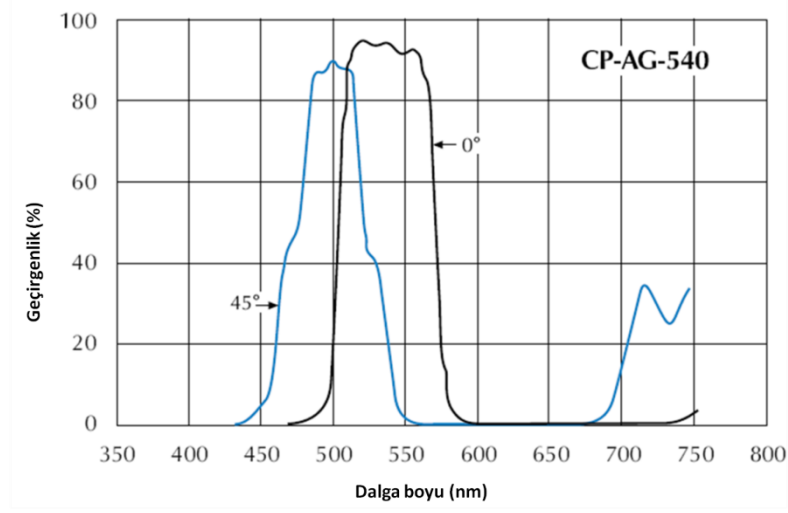
gibi paralel olacağından herhangi bir sorunla karşılaşmaz. Lazer ışığını flüoresans ışıktan ayırmak için belirli bir dalga boyunu geçirme özellikli “dichroic aynalar” ya da “dichroic filtreler” kullanılır (Şekil 4.6-4.6). Flüoresans ışık bir mercekle yardımıyla bir pinhole üzerine odaklanır. Pinhole ün amacı yukarıda da belirtildiği gibi odak dışından gelecek olan ışıkları engellemektir. Çünkü objektif örnekten yayılan ışıkları alırken, odaklandığı noktayla birlikte odağının dışından gelecek olan ışıkları da toplayacaktır. Ancak bu ışıkların objektife giriş açıları farklı olacağına pinhole den geçemeyecekler ve burada takılacaklardır. Bu şekilde çözünürlük artırılmış olur. Pinhole den geçen ışıklar foton çoğaltıcı olarak bilinen photo-multiplier a girer ve burada fotonlar çoğaltılır. Bunun sebebi ise pinhole den geçen foton sayısının düşük olmasıdır. x ve y eksenlerinin adım adım taraması sonucu foton çoğaltıcının bilgisayara gönderdiği sinyaller işlenerek görüntü piksel piksel oluşturulur. Aynı işlemler z ekseninde tekrar edilerek incelenecek örneğin bilgisayar destekli 3 boyutlu görüntüsü üretilmiş olur. (Şekil 4.5)



Şekil 4.5: Lazer Taramalı Konfokal Mikroskobun Şeması [31].

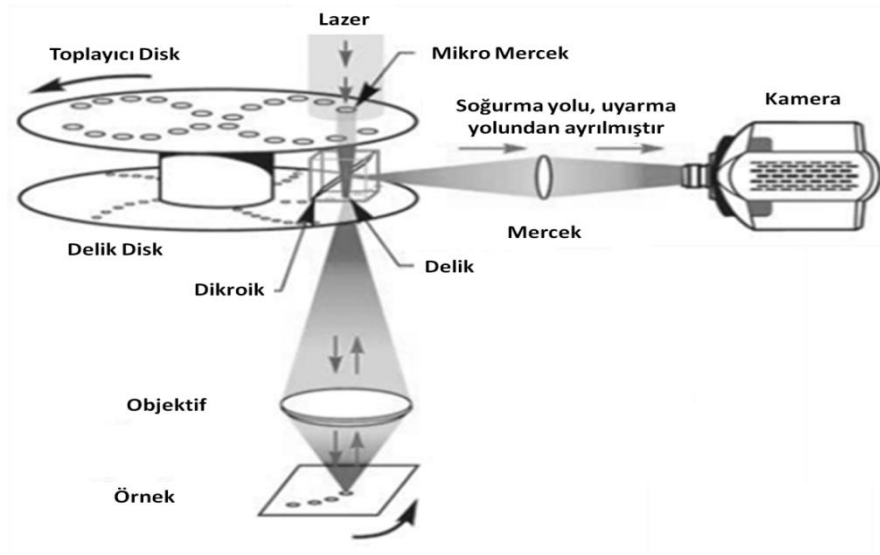
Bir diğer yöntem ise ışık yerine aynı sistemde örneğin hareket ettirilmesidir [33]. Bu sistemde lazer ışığı tarama aynaları olmaksızın objektifin içine girer ve örnek üzerine odaklanır. İncelenecek örneğin bütün bir görüntüsünün oluşturulması için örnek x-y ve z eksenlerinde adım adım hareket ettirilir. Bir önceki sistemde anlatıldığı üzere toplanan flüoresans ışıklar objektiften geri dönerek dichroic filtreden geçer. Geçen

ışıklar pinhole üstüne odaklanır ve pinhole ü geçen ışıklar detektör tarafından algılanır. Yukarıda ki prensiple aynı olmak üzere görüntü oluşturulur.



Şekil 4.6: Yeşil geçirgen dikroik filtre dalga boyu seçicilik eğrisi [34].

Üçüncü sistemde tarama bakımından bu iki sistemden çok daha farklı bir yöntem kullanır. Bu yöntemde örnek ya da ışık hareket ettirilmeksizin üzerinde belirli bir düzene göre açılmış delikleri olan bir disk, belirli bir hızla dönerek lazer ışığının farklı noktalarda örneği taramasına imkân sağlar.



Şekil 4.7: Spinning disk yöntemini örnek ya da ışığı hareket ettirmeden tarama imkânı sağlar [35].

Şekil 4.7 den de anlaşılacağı üzere, dönen disk iki katmandan oluşur. İlk katman lazer ışığının geçip odaklanacağı mikro lensler ile donatılmıştır. Odaklanan ışık dikroik bir aynadan geçerek objektife girer ve numunenin üzerinde diskin belirlediği noktalarda tarama yapar. Geri dönen flüoresans ışıklar gene diskte ki pinholelerden geçer ve dikroik aynadan yansyarak bir mercek yardımıyla kamera üzerine gönderilir.

Görüntülerin işlenmesi kısmı tüm tasarımlar için aynıdır. Detektör türü ne olursa olsun ışık elektrik sinyallerine dönüştürülerek görüntü oluşturulur. Burada Einstein'ın Nobel ödülünü kazandığı "Fotoelektrik Olay" ön plandadır. Foto elektrik olay bilindiği üzere bir metal üzerine ışık düşürüldüğünde yüzeyden elektron koparılabilceğini gösterir. Bu olay 1877 yılında Hertz tarafından keşfedildiyse de Einstein tarafından ispatlanmıştır [36, 37] .

4.4. Konfokal Mikroskoplarda Kullanılan Teknik Ekipmanlar

Konfokal mikroskoplarda önem arz eden elemanlar; objektifler, lazerle, flüoresans boyalar, detektörler ve elektro-optik cihazlardır.

4.4.1. Objektifler

Çözünürlük, karşıtlık, alan derinliği, örneğin incelenebilecek olan alanı mikroskopi'de objektifin özelliklerine bağlıdır. LTKM'de objektifin aynı zamanda kondansör olarak kullanılıyor olması yüksek optik düzeltme ve minimum kayıp gerektirir. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop objektiflerinde aranan içlerinde en az sayıda mercek kullanarak yüksek foton verimliliği, çözünürlüğün yüksek olduğu bir çalışma mesafesinde kromatik hataların düzeltildiği optik özellikli bir sistemdir. Objektiflerde genelinde rastlanan bir sorun ise yağ ortamında kullanılan objektiflerin su temelli örneklerin incelenmesi sırasında, örneklerin kırılma indisi farklarından ötürü küresel hataların oluşmasıdır. Bu sebepten Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopi'de yüksek sayısal açıklıklı, lamel ve kromatik hataların düzeltildiği, daldırma ortamının su olduğu objektifler tercih edilir [12].

Optik bir sistemde daha öncede belirtildiği üzere çözünürlük örnek üzerinde ki en yakın iki noktayı ayırt edebilme özelliği olarak bilinir ve kullanılan ışığın dalga boyuna ve objektifin sayısal açıklığına bağlı olarak değişir. İdeal bir kırınım limitli objektifte görüntü düzleminde oluşacak olan Airy Disk in çapı;

$$d_{Airy} = \frac{1.22\lambda}{\eta \sin\theta} \quad (4.5)$$

olur. Sayısal açıklıklığın eşitlik 3.6 ile gösterimini eşitlik 4.5 için kullanırsak bu ifade eşitlik 4.6 olur. Ancak burada ki θ , eşitlik 3.6 da ki $\theta/2$ ye karşılık gelmektedir.

$$d_{Airy} = \frac{1.22\lambda}{NA} \quad (4.6)$$

Buna bağlı olarak ta Rayleigh ölçütüne göre Airy diskin yarıçapı eşitlik 4.2 olur. Mikroskop objektiflerinde çözünürlük YMTG olarak kısaltılan Yarı Maksimumda ki Tam Bant Genişliği ne bağlıdır ve bu değeri deneysel olarak ölçmek mümkündür. Konfokal mikroskopide nokta aydınlatma ve detekte söz konusu olduğundan sadece bu noktaların nokta dağılım fonksiyonu detekte edilir. Bu sebepten standart mikroskoplara göre airy diskin yarıçapı yani alansal çözünürlük %30 daha yüksek olur. Buna göre konfokal mikroskobun alansal çözünürlüğü;

$$r_{airy} = 0.4\lambda/NA \quad (4.7)$$

olur ve aynı sebepten incelenecek örneğin kırılma indisine bağlı olarak eksensel çözünürlüğü yani alan derinliği

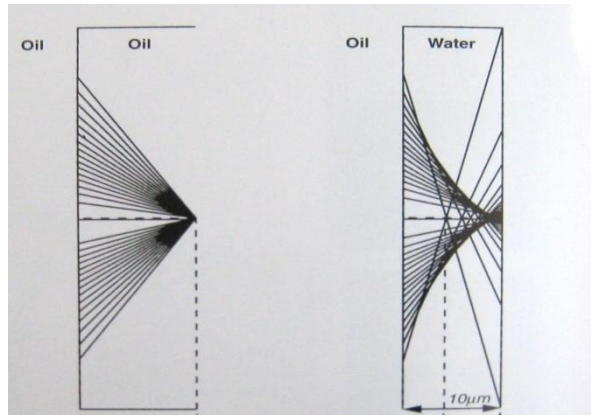
$$z_{min} = 1.4\lambda\eta/NA^2 \quad (4.8)$$

olur.

Bir objektifte görülebilecek hatalar şunlardır: Düzlemsel ve boylamsal kromatik hatalar, küresel hatalar, koma, astigmatizm, alan eğriliği ve bükülme [31, 37].

4.4.1.1. Küresel hatalar

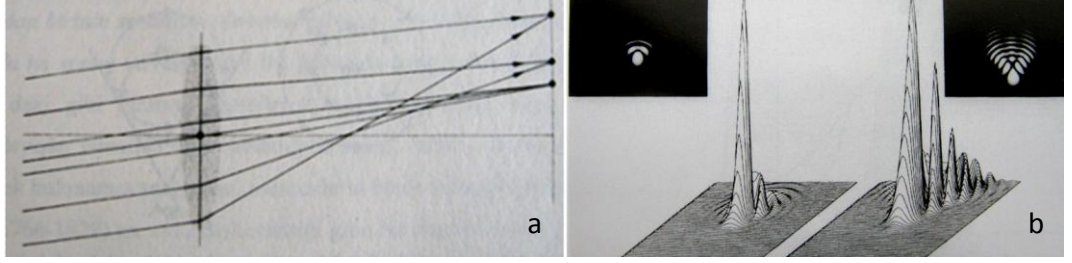
Küresel hatalar objektife ya da tüp merceğine gelen ışıkların optik eksenden uzaklaştıkça aynı odak noktasında odaklanmamasından kaynaklanan hatalardır (Şekil 4.8). Bu hatalara objektifin kendisinin ürettiği küresel olmayan dalga cepheleri, objektifin uygunsuz kullanımı, yanlış kalınlıkta lamel kullanımı veya tüp uzunluğunun yanlış tasarlanması ve daldırma ortamında yanlış kırılma indisli sıvı kullanılması yol açar [31].



Şekil 4.8: Küresel hata olmadan ve küresel hatayla odaklanma [31].

4.4.1.2. Koma

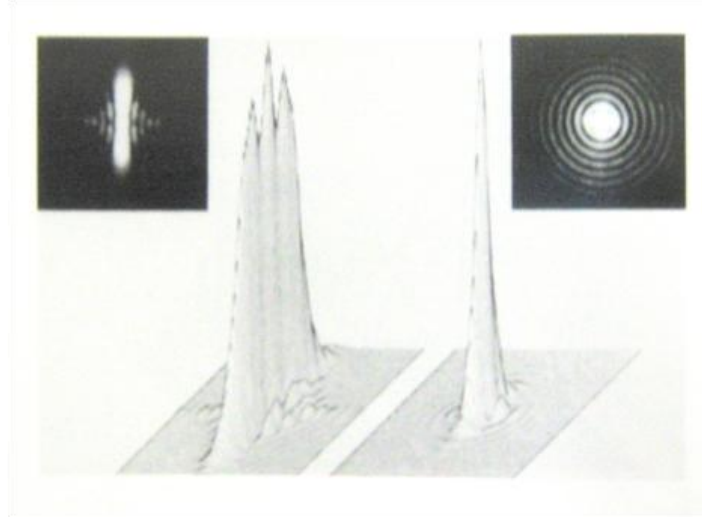
Işıkların merceğe eğik bir açıyla gelmesi sonucu görüntü noktasında optik eksenden uzakta bir bölgede görüntü oluşması kusuruna koma denir. Başka bir deyişle, merceğe açılı gelen ışıkların aynı görüntü düzlemi üzerinde farklı noktalarda odaklanması kusurudur. Şekil 4.9a dan anlaşılacağı gibi birbirine paralel olarak gelen ışıklar mercekten geçtikten sonra görüntü düzlemi üzerinde farklı noktalarda odaklanırlar. Şekil 4.9 b de bu kusurun 3 boyutlu gösterimidir [6].



Şekil 4.9: Koma kusurunu belirten şekiller [6, 31].

4.4.1.3. Astigmatizm

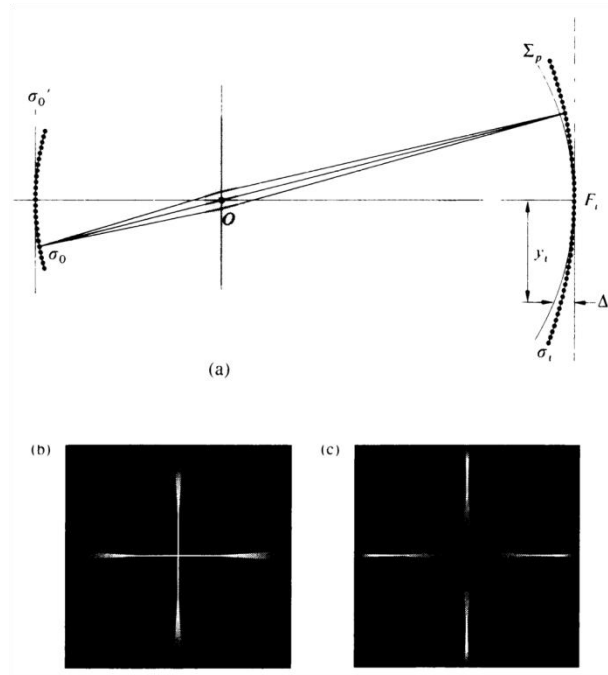
Tanjantial ve sagital ışınların farklı odak noktalarında görüntü oluşturması sonuncu gözlenen optik kusurdur. Görüntünün netliğini direkt olarak etkileyen kusurdur [38].



Şekil 4.10: Astigmatizmi anlatır şekil. Sol taraf daha ileri, sağ taraf daha az astigmatizme sahip [31].

4.4.1.4. Alan eğriliği

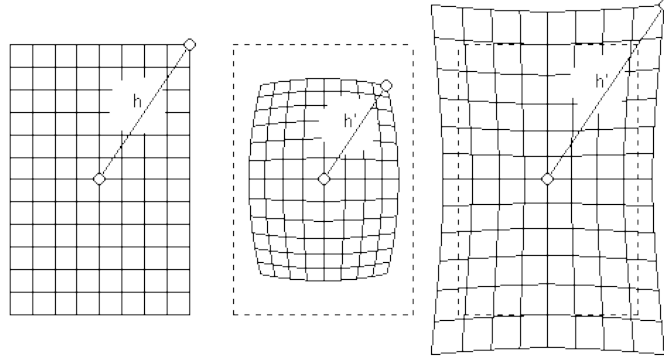
Belli büyüklükteki açıklıklarda ortaya çıkan eğrilmiş görüntü yüzeyi Petzval Alan Eğriliği denilen temel kusurdan kaynaklanır [6]. Petzval yüzeyi yakınsak bir mercek için içbükey olurken, ıraksak bir mercek için dışbükey olur. Bu kusur birleşik merceklerle ortadan kaldırılır. Bu kusur yakınsak ve ıraksak merceklerin uygun biçimde bir araya getirilmesi ile alan eğriliği ortadan kalkar [6].



Şekil 4.11: a) ışıklar mercekten geçtikten sonra oluşan alan eğriliği, b) merkez nokta odaklandığında kenarlarda ki görüntü bulanıklığı, c) perde kenarlara netleşecek şekilde iletirilirse merkezde görüntü kaybolur [6].

4.4.1.5. Bükülme

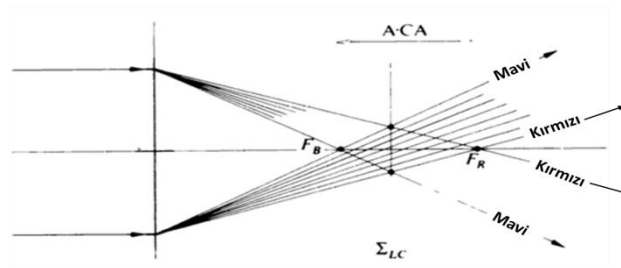
Merkezden kenarlara doğru olan alanın non-lineer büyümesi, mevcut eksen dışı görüntüyü eksendeki görüntüden içeri ya da dışarı doğru büyütür. Yani merceğin farklı bölgelerinin farklı odak uzaklıkları olması nedeniyle farklı büyütmelere sahip olmasından kaynaklanır. Kalın merceklerde daha çok gözlenirken, ince merceklerde böyle bir sorun olmamaktadır (Şekil 4.12) [6, 38].



Şekil 4.12: İçe ve dışa bükülmeler merceğin farklı bölgelerinin farklı odak uzaklıklarına sahip olması sebebiyle oluşur [39].

4.4.1.6. Boylamsal renk kusuru

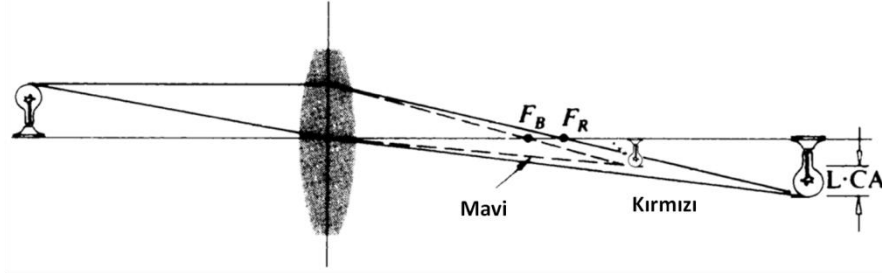
Objektifin odak uzaklığının kullanılan ışığın dalga boyuna göre değişmesine bağlı renk kusurudur. Farklı dalga boyları bir mercekte geçtikten sonra farklı noktada odaklanırlar. Kusurun düzeltilmesi için akromatik mercek çiftleri kullanılır. Böylece temel olarak kırmızı ve mavi renkler aynı noktaya odaklanır (Şekil 4.13). [31]



Şekil 4.13: Boylamsal renk kusuru [6].

4.4.1.7. Düzlemsel renk kusurları

Dalga boyunun değişimine bağlı olarak büyütme oranında ki değişmedir. Eğer objektif farklı dalga boyları için farklı büyütme gösteriyorsa bu görüntünün kenarlarında kırmızı ve mavi çizgilerin oluşmasına sebep olur (Şekil 4.14) [31] .



Şekil 4.14: Düzlemsel renk kusurunu gösterir resim [6].

4.4.2. Lazer taramalı konfokal mikroskoplarda kullanılan lazerler

Lazer ışığının koharent yani eş frekanslı olması ve yüksek paralelliği Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopi'de avantaj sağlayan bir özelliktir. Ancak bu sistemlerde lazerin ıraksaması oldukça önemli bir detaydır. İraksanımın az olması doğru odaklanma için istenen koşuldur. Belirli bir mesafede lazer çapının ne kadar büyüdüğünü belirlemek için şu eşitlik kullanılır:

$$D = 2L \tan \theta \quad (4.9)$$

Burada L; uzaklık, θ ; ıraksama açısı ve D; L mesafe sonra lazerin çapı olarak verilir. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskoplarda kullanılan lazerler Tablo 4.1 de verilmiştir [17].

Tablo 4.1: LSCM de kullanılan lazer çeşitleri ve dalga boyları [31].

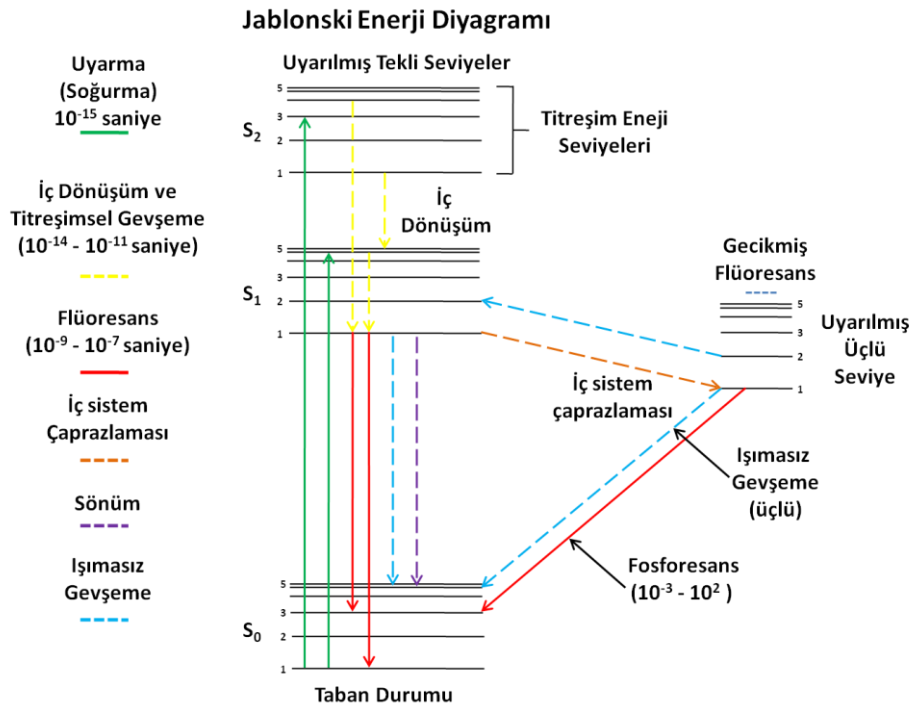
Lazer Türü	Dalga boyu(nm)
HeCd	325
Argon-İyon	351
Argon-İyon	364
Argon-İyon	351,364
Diyot	405
Diyot	408
DPSS	430
Diyot	440
HeCd	442
Argon-İyon	458, 514
Argon-İyon	488
Diyot	488
DPSS	532
Yeşil HeNe	543
Sarı DPSS	561
Kripton-İyon	568
Kripton/Argon	488, 568, 647
Turuncu HeNe	594
Kırmızı HeNe	632.8
Diyot	630
Diyot	635
Diyot	638
Diyot	750
HeNe	1152
Boya	630
Ti:Sa-Mai-Tai	750-850 ya da 710-920
Ti:Sa-Mira	690-1000
Ti:Sa-Tsunami	680-1050
NIR	700-900

4.4.3. Flüoresans ışına ve konfokal mikroskopide kullanılan flüoroforlar

Flüoresans; lüminesans ailesinden, fiziksel, kimyasal ya da mekanik olarak uyarılan bir molekülün ışık yayması olayıdır. Bir molekülün UV ya da Görünür Bölgede foton soğurması fenomenine foto lüminesans denir ve flüoresans ve fosfor esans olmak üzere ikiye ayrılır. Bu fiziksel olaylar uyarılmış seviyenin elektronik konfigürasyonuna ve soğurma bandına bağlıdır [37].

Flüoresans olayı atomların ve moleküllerin belli bir dalga boyunda ki ışıkları soğurup, daha büyük dalga boylu ışık yayması olayıdır. Bu oldukça kısa bir süreçtir. Fosfor esans ta fiziksel olarak aynı olmasına karşın ışık yayma süreci daha uzundur. Duyarlı bir molekülün gelen fotonu soğurup uyarılmış hale geçmesi birkaç femto-saniye sürerken, uyarılmış seviyelerde ki elektronların düşük enerji seviyeli titreşimsel relaksasyonu ise piko-saniyeler mertebesinde. Büyük dalga boylu ışıkların salınıp molekülün taban durumuna geçmesi ise birkaç nano-saniye alır [37].

Fiziksel sistem Şekil 4.15 ten de görüleceği üzere UV veya Görünür Bölge bir ışıkla flüoroforlar S(1) in yüksek titreşim enerji seviyelerine ya da S(2) nin orta titreşim enerji seviyelerine uyarılır. Tipik bir flüoroforu geniş bant bir ışık kaynağıyla uyarırsak Şekil 4.15 te gösterilen geçişlerden daha farklı geçişlerde gözlenmesi mümkündür ancak bu geçişler elbette ki molekülün soğurma bandına bağlıdır. Bu geçişlerin bazıları diğer geçişlere göre daha baskın ya da sönük kalabilir. Soğurma olayından hemen sonra genellikle ilk geçişler 2. Enerji seviyesinden 1. Enerji seviyesine olur. Elektronların bu seviyede bekleme süreleri birkaç nano-saniye civarındadır. 1. Enerji seviyesinden taban durumuna geçiş eğer bir foton yayılımı sonucu oluyorsa bu olaya Flüoresans ışması ya da sadece Flüoresans denir.































































































Şekil 4.15: Flüoresans ve fosfor esans için titreşim ve enerji seviyeleri [37].

Lazer Taramalı Konfokal Mikroskoplarda da incelenecek biyolojik örneklerin belirginleştirilmesi için Flüoresans Mikroskopisinde olduğu gibi örnekler uygun flüorokrom boyalarla boyanırlar. Boyama için kullanılan flüoresans boyalar ve uyarılma dalga boyları tablo 4.2 de verilmiştir [37].




























Tablo 4.2: LTKM de kullanılan flüorofrom boyalar ve uyarılma ve yayılma dalga boyları [37].

Flüorofor	Soğurma Dalga Boyu (nm)	Yayılma Dalga Boyu (nm)	Kullanılan Lazer
Asit Fuchsin	540	630	Yeşil He-Ne
ACMA (Aminochloromethoxyacridine)	430	474	Mavi Diyot
Acridine Turuncu (Bound to DNA)	502	526	Argon-İyon
Acridine Red	455-600	560-680	Argon- İyon
Acridine Yellow	470	550	Argon- İyon
Acriflavin	436	520	Mavi Diyot
AFA (Acriflavin Feulgen SİTSA)	355-425	460	Mavi Diyot
Alexa Fluor 350	346	442	Helyum-Kadmium
Alexa Fluor 405	401	421	Mavi Diyot
Alexa Fluor 430	433	541	Mavi Diyot
Alexa Fluor 488	495	519	Argon- İyon
Alexa Fluor 500	503	525	Argon- İyon
Alexa Fluor 514	518	540	Argon- İyon
Alexa Fluor 532	532	553	Kripton-Argon
Alexa Fluor 546	556	573	Yeşil He-Ne
Alexa Fluor 555	555	565	Kripton-Argon
Alexa Fluor 568	578	603	Kripton-Argon
Alexa Fluor 594	590	617	Turuncu He-Ne
Alexa Fluor 610	612	628	Turuncu He-Ne
Alexa Fluor 633	632	647	Kırmızı He-Ne
Alexa Fluor 647	650	665	Kripton-Argon
Alexa Fluor 660	663	690	Kırmızı Diyot
Alexa Fluor 680	679	702	Kırmızı Diyot
Alizarin Complexon	530-560	580	Yeşil He-Ne
Alizarin Red	530-560	580	Yeşil He-Ne
AMCA	350	445	Helyum-Kadmium
Aminoactinomycin D	555	655	Kripton -Argon
6-Aminoquinoline	355	550	Helyum-Kadmium
Aniline Blue	370	509	Argon-Ion
ANS (Anilinonaphthalene Sulfonic Acid)	385	485	Mavi Diyot
Anthroyl Stearate	361-381	446	Argon-İyon

Tablo 4.2: (Devamı) LTKM de kullanılan flüorofrom boyalar ve uyarılma ve yayılma dalga boyları [37].

APC (Allophycocyanin)	650		661		Kripton -Argon
Astrazon Brilliant Red 4G	500		585		Argon-İyon
Astrazon Orange R	470		540		Argon-İyon
Astrazon Red 6B	520		595		Argon-İyon
Astrazon Yellow 7 GLL	450		480		Argon-İyon
Atabrine	436		490		Mavi Diyot
ATTO-TAG CBQ	465		560		Argon-İyon
ATTO-TAG FQ	486		591		Argon-İyon
Auramine O	460		550		Argon-İyon
Aurophosphine	450-490	 	515		Argon-İyon
Aurophosphine G	450		580		Argon-İyon
BAO 9-(Bisaminophenyloxadiazole)	365		395		Argon-İyon
BCECF	505		530		Argon-İyon
Berberine Sulphate	430		550		Mavi Diyot
Bisbenzamide	360		600-610	 	He-Cd
BOBO-1, BO-PRO-1	462		481		Argon-İyon
BOBO-3, BO-PRO-3	570		604		Kripton-Argon
Blancophor FFG Solution	390		470		Mavi Diyot
Blancophor SV	370		435		Argon-İyon
BODIPY FL	503		512		Argon-İyon
BODIPY TMR	542		574		Yeşil He-Ne
BODIPY TR	589		617		Sarı He-Ne
BODIPY 492/515	490		515		Argon-İyon
BODIPY 493/503	500		506		Argon-İyon
BODIPY 500/510	509		515		Argon-İyon
BODIPY 505/515	502		510		Argon-İyon
BODIPY 530/550	533		550		Kripton -Argon
BODIPY 558/568	558		568		Kripton -Argon
BODIPY 564/570	564		570		Kripton -Argon
BODIPY 581/591	582		590		Sarı He-Ne
BODIPY 630/650	625		640		Kırmızı He-Ne
BODIPY 650/665	647		665		Kırmızı He-Ne
BODIPY 665/676	665		676		Kırmızı Diyot
Brilliant Sulphoflavin FF	430		520		Mavi Diyot
BTC (Benzothiazole Calcium Indicator)	401, 464	 	529		Mavi Diyot
Calcein	494		517		Argon-İyon
Calcein Blue	370		435		Argon-İyon
Calcium Crimson	590		611		Sarı He-Ne
Calcium Green	505		532		Argon-İyon
Calcium Orange	549		576		Yeşil He-Ne
Calcofluor (RW Solution)	370		440		Argon-İyon
Calcofluor White	440		500-520	 	Mavi Diyot
Calcofluor White (ABT Solution)	380		475		Argon-İyon
Calcofluor White (Standard Solution)	365		435		Argon-İyon

Tablo 4.2: (Devamı) LTKM de kullanılan flüorofrom boyalar ve uyarılma ve yayılma dalga boyları [37].

Carbocyanine LDL	520 	560 	Argon-İyon
5-(and 6-)-Carboxy SNARF-1 Indicator	548 (Low pH)  576 (High pH) 	587 (Low pH)  635 (High pH) 	Kripton -Argon
5-Carboxynaphthofluorescein	598 	668 	Sarı He-Ne
6-Carboxyrhodamine 6G	525 	555 	Argon-İyon
Cascade Blue	400 	425 	Mavi Diyot
Cascade Yellow	402 	545 	Mavi Diyot
Catecholamine	410 	470 	Mavi Diyot
CCF2 (GeneBLAzer)	402 	520 	Mavi Diyot
CellTracker Blue	353 	466 	Helyum-Kadmium
CellTracker Green BODIPY	522 	529 	Argon-İyon
CFDA (Carboxyfluorescein Diacetate)	495 	520 	Argon-İyon
Chinacrine	450-490  	515 	Argon-İyon

4.4.4. Lazer taramalı konfokal mikroskopide kullanılan foton detektörleri

Lazer taramalı konfokal mikroskopide 3 çeşit detektör tipi kullanılır. Bunlar foton çoğaltıcılar (Photo Multiplier) foto diyotlar ve CCD (Charged Coupled Devices) kameralardır. Bunlardan foton çoğaltıcılar ve CCD detektörler aşağıda incelenmiştir.

4.4.4.1. Foton çoğaltıcı tüpler

Foton Çoğaltıcı Tüpler (FÇT) üzerlerine düşen fotonu soğuran ışığa duyarlı yüzeyi olan ve böylece güçlendirilmiş bir elektrik yükü oluşturmak için foto elektronlar üreten cihazlardır [30]. Bu cihazlarda foto katot denen, foto elektrik olayla elektron koparılmasını sağlayan plakalar bulunur. Temel yapısı bir vakum ortamında birbirini takip eden dinod ve anotlardan oluşur. Foto katotlar alkali metal ya da yarı iletken malzemedir üretilir. Koparılan elektronların kinetik enerjileri bir sonra ki dinoda aktarılarak plakalardan daha çok elektron koparılmasına yol açar ve böylece sonuçta sayılan elektron sayısı ilk kopan elektronlara göre daha fazla olur yani gelen foton sinyali güçlendirilmiş olur.

Foto katodun bir dalga boyuna hassaslığı ise spektral yanıt ya da tepki (R) olarak belirtilir ve

$$R = (q \times KV \times q)/hc \quad (4.10)$$

olarak verilir [30]. Burada q elektron yükleri, KV ise detektörün kuantum verimliliğidir. Bir detektörün kuantum verimliliği foto sensörün çıkışında elektronlardan detekte edilebilen, gelen fotonların bir kesiridir. Detektörün kuantum verimliliği algıladığı dalga boyuna göre değişim gösterir. Bir FÇT nin kazancı ise eşitlik

$$m=d^n \quad (4.11)$$

ile verilir. Burada m; kazanç, d; dinodlar için ikincil yayılma oranı ve n; dinod sayısıdır. Bir PMT de alınan sinyali etkileye bilecek gürültüler oluşur. Bunlar fotonun vurma gürültüsü, PMT nin karanlık gürültüsü ve güçlendirici sistemlerin gürültüleridir. Bunlara göre bir PMT de sinyalin gürültüye oranı ne kadar yüksekse PMT nin kalitesi o kadar iyidir [30, 33, 37] .

4.4.4.2. CCD detektörler

CCD ler (Charge Coupled Devices) ışık şiddetini zamana bağlı olarak elektrik sinyaline dönüştüren cihazlardır. En önemli ve evrensel uygulamaları ise görüntü sensörleridir. Fotoelektrik etkiyle görüntü ışıklarını yakalamak için genellikle sıra halinde hücrelerden oluşurlar. Genel olarak ışık kaynağından gelen fotonların yakalanması ilk iş olur. Burada fotoelektrik etkiyle elektronlar koparılır. Koparılan elektronlar küçük hücrelerde toplanırlar ve sayılmak üzere transfer edilirler. Elektron sayımıyla gelen ışık şiddeti arasında bir değer belirlenir ve bu değerler koordinatlara bağlı olarak saklanır. Foton madde ile ilişki kurarken o maddenin bant genişliği en önemli parametredir. Düşük enerjili (kırmızı) fotonlar soğurulmak için madde içinde daha uzun yol alır, En düşük enerji limiti ise yasaklı bant genişliği ile orantılıdır ve

düşük enerjili fotonlar hiç bir şekilde etkileşmez. Kullanılan materyalin özelliğine göre belli bir değerden sonra yarı iletken, fotonlara karşı kör denebilir. p-tipi kristal üzerine silikon dioksit kapladıktan sonra metal elektrot yerleştirirsek basit bir hücre (kova) yapısı elde edilir. Bunlardan bir dizi yan yana koyarsak ve uygulanan voltajlar ile oynarsak hücre içindeki biriken yük kolayca dizi boyunca kaydırılabilir. Hücreleri matris şeklinde organize edersek önce her satırda olan toplanmış yük sıra ile çıkış sütununa aktarılır sonrada bu sütun tekrar kaydırılarak sıra ile okunur. Böylece matris üzerinde olan her hücre adresleri ile birlikte okunmuş olur.

Silikon yüzey yapısındaki olumsuzluklar, elektrotların direk yüzey üzerinde olması fonksiyon açısından çeşitli kayıp ve düzensizliklere sebep olur. Bunu önlemek için elektronların hareket ettiği bölgenin yüzeyden uzaklaştırılması gerekir. Gömülü kanal, elektron transferi sırasındaki olumsuzlukları kaldırır, kayıpları azaltır. Temelde silikon yarı iletken olarak kırmızı fotonlara daha hassastır [40]. Silikon üzerinde olan elektrot yapısı (yaklaşık 0.5 mikron kalınlık) ise mavi foton akısının bir kısmının yapı içinde soğurulmasına sebep olur. Pratik olarak CCD mavi fotonlara kör denebilir. Problemi yenmek için CCD yongasını ters çevirerek fotonların arka taraftan içeri girmesini sağlar. Ancak bu durumda fotonların kristal içinde elektrot yapısına yakın bölgede soğurulmasını sağlamak için kristalin inceltilmesi gereklidir (10-30 mikron). Netice olarak çok iyi mavi ve mor duyarlılığı elde edilir.

Bir CCD de karşılaşılabilecek sorunlar; aktif yüzeyden yansımalar, çok inceltirse kırmızı fotonlar yeterli soğurma yoluna sahip olmadığı için tutulamaz ve buna bağlı olarak CCD nin kırmızı duyarlığında azalmaya, ince silikon içerisinde oluşan yansımalar girişim yapısına sebep olur, inceltme sonunda yüzey düz olmazsa odaklanma problemi ortaya çıkar ve arka yüzeyde silikon açıkta olduğundan silikon dioksit oluşur ve yüzeyde pozitif yük birikimine sebep olabilir [41].

Bir CCD detektörün sinyal gürültü oranı tıpkı PMT lerde istendiği gibi yüksek olmalıdır. Buna göre bir CCD nin sinyal gürültü oranı

$$\frac{S}{G} = \frac{q \times I}{(q \times I + R)^{1/2}} \quad (4.12)$$

eşitliği ile verilir. burada q elektron yükü, I poz süresi içinde piksel üzerine düşen foton sayısı ve R okuma gürültüsüdür [40, 41].

4.4.5. Akusto optik taranabilir filtre

Akusto optik taranabilir filtreler elektro optik cihazlar olup, LSCM de kullanılan lazerlerin dalga boylarını ve şiddetlerini kontrol eden ünitelerdir. Akustik dalgalarla cihazda kullanılan kristalin dalga boylarına göre geçirgenliği değiştirilerek dalga boyu seçimi ve şiddet ayarlaması yapılabilir. Cihazda kullanılan kristaller teleryum dioksit ve ya kuartz anisotropik kristalleridir [30].

4.4.6. Lazer taramalı konfokal mikroskopların avantajları

LSCM lerin geleneksel ve flüoresans mikroskoplarına göre avantajları

- Işık saçılmalarından kaynaklanan bulanıklığın azaltılması ya da kaldırılması
- Etkin çözünürlüğün arttırılması
- Sinyal-gürültü oranının geliştirilmesi
- Işık saçılmalarının fazla olduğu kalın örneklerin incelenebilmesi
- x ve y düzleminde tüm örnek üzerinde tarama imkânı
- z ekseninde tarama eklentisi (3 boyutlu görüntü oluşturulması)
- Elektronik büyütme imkânı
- Örneğin optik özelliklerine göre en ideal çalışma imkânı
- Basit ekipmanlar kullanarak karmaşık karşıtlık efekti
- Daha az karmaşık objektif kullanımına imkân vermesi

olarak sıralanabilir [31, 33].

BÖLÜM 5. DİYOD LAZER İLE ETKİLESEN BİYOLOJİK HÜCRELERİN İNCELENMESİ İÇİN LAZER TARAMALI KONFOKAL MİKROSKOP DİZAYNI

5.1. Giriş

Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Dizaynı, Lazer Teknolojileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (LATARUM) yapılmıştır. Bu mikroskobun tasarlanmasındaki amaç, maliyetleri çok yüksek olan LTKM'lerin ülke çapında daha uygun maliyetle üretilip yaygınlaştırılmasını sağlamaktır. Cihaz Bölüm 3 ve Bölüm 4 te bahsedilen kıstaslar dikkate alınarak teorik olarak tasarlanmış ve uygulamaya geçilmiştir. Tasarlanan ve gerçekleştirilen cihazı diğer LTKM'lerden ayıran özelliği, 104T158 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında LATARUM' da tasarlanan ve gerçekleştirilen spektrometrenin kullanılmış olmasıdır.

5.2. Tasarımda Kullanılan ve Üretimde Kullanılacak Olan Cihazlar

Tasarımda kullanılan objektif, tarama eksenleri, CCD kamera, spektrometre ve Optik elemanlar Bölüm 5.2 nin alt bölümlerinde ayrı ayrı açıklanmıştır.

5.2.1. Objektif

Tasarlanan cihazda tek dalga boylu lazer kullanıldığından oluşacak olan flüoresans ışığında tek bir belirgin dalga boyu olacaktır. Bu sebepten ilk tasarım olarak kullanılan objektif Bölüm 4 te bahsedilen yüksek düzeltme oranlı objektif yani apokromatik objektif değildir. Bunun yerine apokromatik objektifin bir alt modeli olan Olympus firmasının plan-akromat ya da semi-apokromatik objektifi kullanılmıştır. Semi-apokromatik objektifler bilindiği üzere kromatik hataları 2, küresel hataları 1 renk için düzelten objektiflerdir. Büyütme oranı olarak 40X lik bir objektif seçilmiştir ve objektif sonsuz düzeltilmelidir.



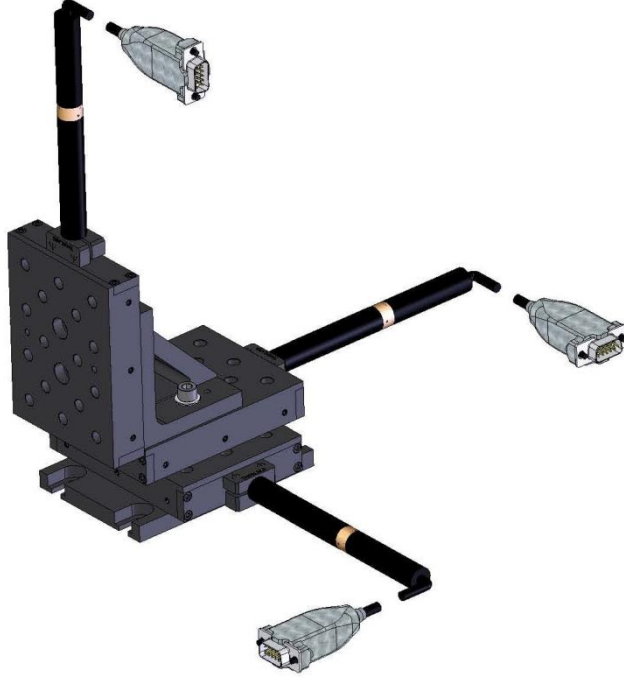
Şekil 5.1 Tasarımda kullanılan Olympus 40X Plan-Akromat Sonsuz düzeltmeli mikroskop objektifi [42].

5.2.2. Tarama eksenleri

Tarama sistemi için Thorlabs firmasından alınmış olan PT1-Z6 model numaralı 3 eksenli hareket sistemi kullanılmıştır. Eksenlerin özellikleri Tablo 5.1 de verilmiştir.

Tablo 5.1: Tasarımda kullanılan hareket sisteminin özellikleri[42].

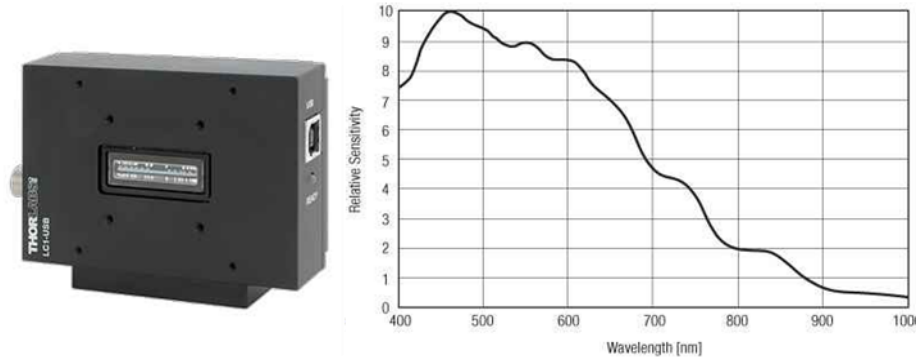
Hareket Sınırı	25mm
Minimum Hareket	50nm
Encoder	12288/vida adımı
Boşluk	<8 μ m
Hız	50-425 μ m
Motor Türü	12V DC Servo
Eksenel Yük Kapasitesi	45N



Şekil 5.2: Tasarımda kullanılan hareket eksenleri [42].

5.2.3. CCD kamera

Tasarımda USB bağlantısı ile beslenen, piksel boyutları $7 \times 200 \mu\text{m}$, spektral aralığı 350nm-1000nm ve saniyede 190 taramaya kadar tarama hızına sahip CCD kamera kullanılmıştır. CCD kamera Thorlabs firmasına aittir.



Şekil 5.3: Tasarımda kullanılan CCD kamera ve spektral bant [42].

5.2.4. Spektrometre

Tasarlanan ve gerçekleştirilen LTKM cihazında 104T158 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında LATARUM' da tasarlanan ve gerçekleştirilen spektrometre kullanılmıştır.

5.2.5. Optik elemanlar

Cihazın tasarımda optik eleman ihtiyacı yüksek değildir. Bunlar Tablo 5.2 de üretici firmaları ve özellikleri ile verilmiştir.

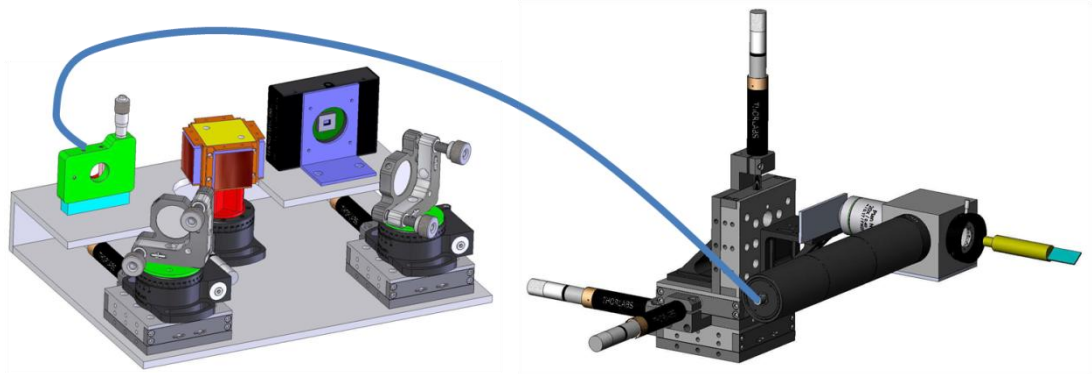
Tablo 5.2: Tasarımda kullanılan optik elemanları gösterir tablo

Optik Eleman	Özellik	Üretici Firma
Mercek	200mm odak uzaklığı	Newport
Demet Bölücü	%8 Yansıma,%92 Geçirme	Thorlabs
Pinhole	10-50-100µm açıklıklı	Thorlabs
Fiber Kablo	UV-VIS	Ocean Optics

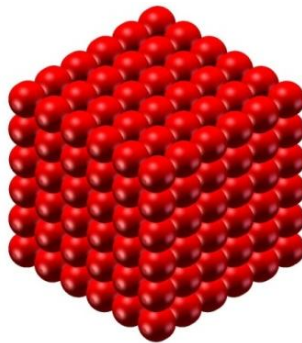
5.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Dizaynı ve Görüntü Oluşturulması

Tasarlanan LTKM' de numune hareketi esasına dayanan tarama sistemi kullanılmıştır. Yarı iletken diyot lazerden çıkan 532 nm dalga boylu ışık, öncelikle odak noktasında istenilen spot çapını yakalamak için iristen geçirilerek küçültülür ve sonra dikroik filtreden geçerek objektife girer. 40X büyütme özelliği olan sonsuz düzeltmeli objektif özellikle lazer ışığının odaklanması ve objektifin odak noktasından toplanan ışıkların paralelleştirilmesinde kullanılır. Lazer ışığı objektif tarafından numune üzerinde 1-5µm spot çapına odaklanır. Doğru hücrel yapının gözlenmesi ve doğru flüoresans ışımının olması için, gönderilen lazer ışığına uygun flüoresans boya ile boyanan hücreden flüoresans ışıma gerçekleşir. Bu boyalar Tablo 4.2 de diğer tüm boyalar ile birlikte verilmiştir. Örnekten yayılan flüoresans ışıklar objektif tarafından toplanarak paralelleştirilir. Flüoresans ışıkların dalga boyları lazerinde dalga boyundan daha büyük olacağından objektif öncesi kullanılan dikroik filtreden yansıyacaktır. Dikroik filtreden yansıyan flüoresans ışıklar odak uzaklığı 200mm olan bir mercek ile açıklığı değiştirilebilen pinhole üzerine odaklanır. LSCM

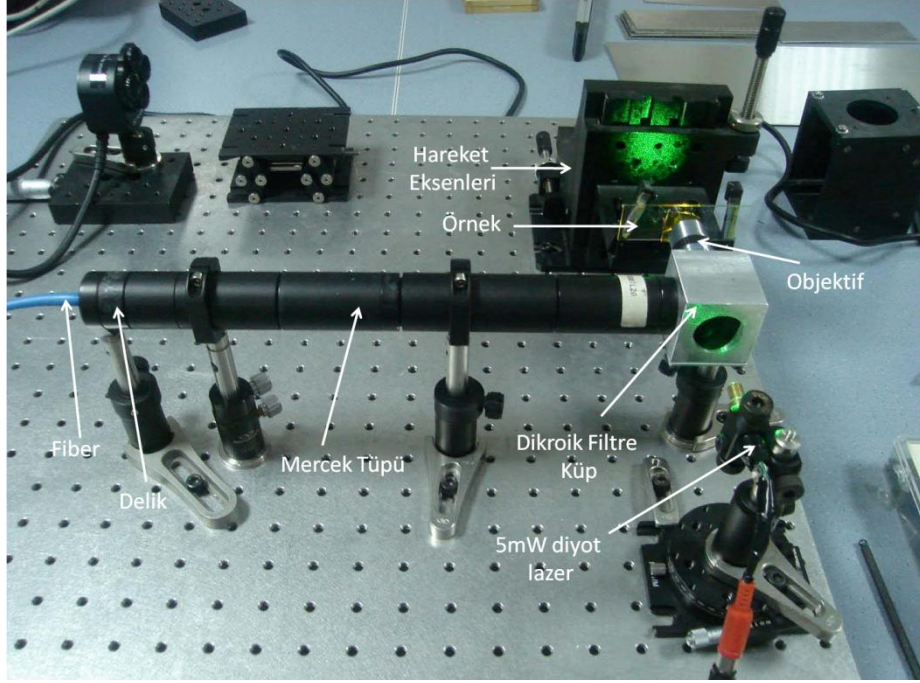
tasarımlarında pinhole kullanılması, objektifin odak noktasından toplayacağı ışıklarla beraber diğer katmanlardan da gelecek olan ışıkları engellemektir. Sadece objektifin odak noktasında gelen ışıklar pinhole den geçer ve geçen ışıklar pinhole ün hemen arkasında bulunan fiber kablo aracılığıyla spektrometreye taşınır. Fiberden gelen flüoresans ışıklar spektrometrede dalga boylarına ayrılır ve saniyede 190 tarama yapabilen kamera üzerine düşürülür. Alınan ışıklar CCD de fotoelektrik olaya bağlı olarak elektrik sinyallerine dönüştürülür ve bu sinyaller bilgisayar yazılımına aktarılır. Bu işlemler numunenin her x-y-z konumuna göre tekrarlanır. Tarama işlemi 3 eksenli elektronik hareket sistemleri ile sağlanır. Elde edilen bu sinyaller, odak noktasından görüntü alındığı noktada ki konuma ve spektrometrenin vereceği dalga boyları ve bunları şiddetlerine bağlı olarak, yazılan programda öncelikle 2 boyutlu bir kare matrisin ve aynı zamanda 3 boyutlu bir küp matrisin birim elemanlarına yerleştirilir. Böylece 2 ve 3 boyutlu görüntüler, renklere ve renk şiddetlerine bağlı olarak oluşturulmuş olur (Şekil 5.4, 5.6, 5.7, 5.8).



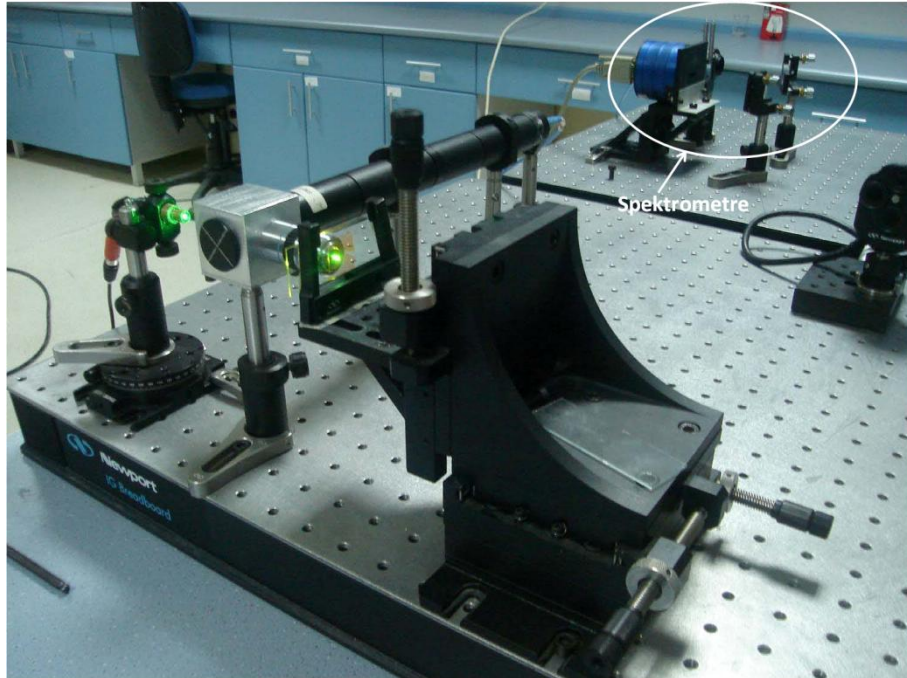
Şekil 5.4: Tasarlanan Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop



Şekil 5.6: Tasarlanan cihazın 3 boyutlu oluşturacağı görüntülerin bir örneği örnek



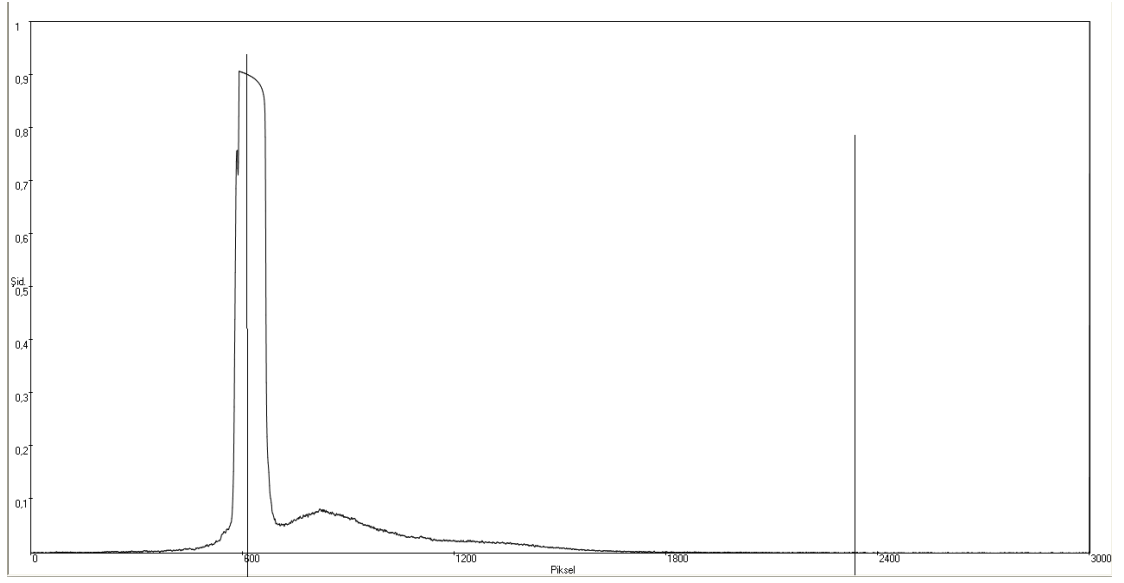
Şekil 5.7: LATARUM' da tasarlanan konfokal mikroskoptan bir görüntü



Şekil 5.8: LATARUM' da tasarlanan konfokal mikroskoptan bir görüntü

5.4. Tasarılan Cihazın Mevcut Cihazlara Göre Üstünlükleri

Yüksek Lisans Tezi için tasarlanan Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopun mevcut cihazlara göre avantajları şöyledir. Mevcut teknolojide foton çoğaltıcılar kullanılır. Bu optik cihazlar arka plan gürültüsünün oldukça düşük olması ve gelen optik sinyalin oldukça düşük olması sebebiyle güçlendirme amaçlı da kullanılır ancak bu cihazlar tek bir dalga boyunu detekte etmekte olduklarından, renkli bir görüntü oluşturulması istendiğinde lazer kaynağı kadar foton çoğaltıcı kullanılması gerekir. Foton çoğaltıcılara istenmeyen renklerin girmesini engellemek için foton çoğaltıcı sayısından daha fazla dikroik filtre kullanılması gerekir. Bunlar maliyetleri arttırır. Ayrıca daha etkin bir renk ayrıştırması için her detektörden önce kullanılması tavsiye edilen kırınım ızgaraları da maliyeti daha da arttırır. Tasarımda kullanılan spektrometre istenilen dalga boyu ayrıştırmasını sorunsuz bir şekilde gerçekleştirmektedir. Her dalga boyu CCD kamera üzerinde farklı bir piksele düştüğü için de, incelenecek örnekten yayılan farklı dalga boyları şiddetlerine bağlı olarak kusursuz bir şekilde detekte edilebilir. Böylece birden çok foton toplayıcının yapacağı işi, tek bir CCD kamera ile yapmak mümkün olacaktır. LATARUM' da yapılan ilk testlerde cihaz dalga boyu ayrıştırmasını kusursuz bir şekilde yerine getirmiş ve şiddet farkları gözlenmiştir. Bu da tasarlanan cihazın ilk deneylerinin başarılı olduğunu göstermektedir. Şekil 5.9 ilk deneylerden alınan spektrumu göstermektedir. Şiddetin maksimum olduğu pik, 532nm dalga boylu lazere aittir. Yanında beliren bant ise ilk aşamada dalga boyu kaymasının gözlenmesi için kullanılan boyar maddenin spektrumudur. Dolayısıyla şiddeti çok düşüktür. Doğru flüoresans boyalar ise soğurdukları dalga boylarının yaklaşık olarak %95 i oranında şiddetler flüoresans ışına yapmaktadırlar.



Şekil 5.9: Tasarlanan mikroskobun ilk deneylerinden alınan spektrum verileri

BÖLÜM 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının amacı temel olarak Hücrelerin İncelenmesi İçin Lazer Taramalı Konfokal Mikroskopu dizayn etmektir. Buna ek olarak birçok yüzey incelemesi ve biyolojik ve tıbbi araştırmada da kullanılabilir. İlk deneyler sonucunda görülmüştür ki cihaz beklendiği şekilde çalışmaktadır. Tasarım cihazın üretimi de göz önüne alınıp maliyet hesaplamaları ve mevcut teknolojiye göre avantajlar gözetilerek yapılmıştır, bu sayede günümüz araştırma laboratuvarlar ve hastanelerinde mevcut teknolojinin yüksek maliyeti sebebiyle kullanılmayan bu değerli cihaz artık kullanabileceklerdir. Böylece daha düşük maliyetli, optik ve elektronik açıdan eşdeğer bir cihaz ortaya çıkmıştır.

Gelecekte bu cihazı daha donanımlı hale getirmek için çalışmalar devam edecektir. Ayrıca objektif öncesi kullanılan dikroik filtre yerine %8 yansıtma ve %92 geçirme özellikli demet bölücü kullanılarak cihaz daha verimli hale getirilmesi düşünülmektedir. Şu görülmüştür ki dikroik filtreler mevcut lazer ışığını gerektiği şekilde filtrelememektedir ve objektife tümüyle girmesi istenen lazer ışığının bir kısmı bu filtreden yansımaktadır dolayısıyla tam verim elde edememek gibi bir sorun doğabilir. Buna karşın kullanılması planlanan yukarıda bahsi geçen demet bölücüler daha verimli bir çalışma sağlayacaktır. Dikroik filtreler yine tasarımda kullanılacaktır ancak kullanım amaçları daha farklı olacaktır. Ayrıca cihazın tasarımından spektrometrenin de kaldırılması düşünülmektedir. Böylece maliyet bir miktar daha düşürülecektir. Ayrıca daha farklı incelemelerde kullanılan flüoresans boyalara uygun lazer sistemleri de tasarıma dâhil edilerek daha zengin bir görüntü oluşturulması düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Candan L., “Lazerle malzeme işleme ve plazma oluşturma sistemlerinin otomasyonu” Yüksek Lisans Tezi, *Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmit, 3-6, 2008

[2] Träger, F., “Handbook of Lasers and Optics”, *Springer*, 584-590, 2007

[3] Colin E Webb Julian D C Jones “Handbook of Laser Technology and Applications”, Volume I: Principles, *Heriot-Watt University Institute of Physics Publishing Bristol and Philadelphia*, 1-59, 2004

[4] Silfast, W., T., “Laser Fundamentals”, First Edition, *Cambridge University*, 1-4, 82-190,290-304, 1996

[5] Paschotta, R., RP Photonics Encyclopedia of Lazer Physics and Technology [online], http://www.rp-photonics.com/beam_divergence.html, (**Ziyaret Tarihi: 16.04.09**)

[6] Hecht, E., “OPTICS”, 4th International Edition, *Adelphi University*, 313-331,472, 2002

[7] Reuters haber ajansı [online], <http://www.reuters.com/article/scienceNews/idUSN0734345320080207>, (**Ziyaret Tarihi: 18.05.2009**)

[8] Sung Kyun Kwan Üniversitesi Kimya bölümü laboratuvar cihazları [online], <http://chem.skku.ac.kr/~skkim/reseach-facility.htm>, (**Ziyaret Tarihi: 19.05.2009**)

[9] Fizik Diyarı [online], <http://www.fizikdiyarı.com/Link/atom.html>, (**Ziyaret Tarihi: 19.05.2009**)

[10] Akkan C. K., Babur S., Kacar E., Akman E., “Optical Calculations and General Information For Laser Scanning Confocal Microscopy”, *4th International Student Conference of the Balkan Physical Union*, 2006

[11] Mikroskop Yapısının Tanıtılması [online] http://egitek.meb.gov.tr/dersdesmer/son_deney/deneyler/deney01.htm, (**Ziyaret Tarihi: 27.01.09**)

[12] Edmund Optics Teknik Destek [online] <http://www.edmundoptics.com/techSupport/DisplayArticle.cfm?articleid=244>, (**Ziyaret Tarihi: 27.01.09**)

[13] Bilgidenizi internet sitesi [online], <http://www.bilgidenizi.net/fizik/10736-mikroskop-merceklerde-goruntu-olusmasi.html>, (**Ziyaret Tarihi: 18.04.2009**)

[14] Nightlase technologies, Innovative Solutions for Today [online], <http://www.nightlase.com.au/education/optics/Images/lens.gif>, (**Ziyaret Tarihi: 19.04.09**)

[15] Edmund Optics Tüp Lens Aksesuarları [online], <http://www.edmundoptics.com/onlinecatalog/displayproduct.cfm?productID=2230>, (**Ziyaret Tarihi: 19.04.09**)

[16] Nikon, the source for microscopy education [online], <http://www.microscopyu.com/articles/optics/cfintro.html>, (**Ziyaret Tarihi: 19.04.09**)

[17] Olympus Resource Center Mikroskop objektifi özellikleri ve tanımları [online], <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/specifications.html>, (**Ziyaret Tarihi:19.04.09**)

[18] Hopkins, R. E., Hanau, R., “Microscope Optics”, Military Standardiation Handbook: Optical Design, MIL-HDBK 141, *U.S. Defence Supply Agency, Washington*, DC, 1962

[19] Olympus Resource Center Köhler Aydınlatma Simulasyonu [online], <http://www.olympusmicro.com/primer/java/kohler/condenseraperture/index.html>, (**Ziyaret Tarihi: 19.04.09**)

[20] Akkan Ç. K., “Kocaeli Üniversitesi öğrencisi Çağrı Kaan AKKAN’ın Yüksek Lisans Seminer Sınavı Sunusu”, *Lazer Teknolojileri Araştırma Uygulama Merkezi*, 2008

[21] Olympus America Mikroskoplar [online], <http://www.olympusamerica.com/>, (**Ziyaret Tarihi: 07.05.2009**)

[22] Olympus mikroskop eğitimi [online], <http://www.olympusmicro.com>, (**Ziyaret Tarihi: 07.05.2009**)

[23] Fizik alanında ki nobel ödülleri [online], http://nobelprize.org/educational_games/physics/microscopes/phase/index.html, (**Ziyaret Tarihi: 24.04.09**)

[24] Özmen Medikal Mühendislik LTD, Konfokal mikroskoplar [online], <http://www.ozmenmedikal.com/dinamik/53/resimler/21697.jpg>, (**Ziyaret Tarihi: 22.04.2009**)

[25] Online fizik, elektron mikroskobu [online], <http://www.onlinefizik.com/content/view/836/176/>, (**Ziyaret Tarihi: 22.04.2009**)

[26] Olympus Near Field Scanning Optical Microscopy [online], <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/nearfield/nearfieldintro.html>, (**Ziyaret Tarihi: 27.01.09**)

[27] NIST Physics Laboratory Optical Technology Division, Near Field Scanning Optical Microscopy [online], <http://physics.nist.gov/Divisions/Div844/facilities/nsom/nsom.html>, (**Ziyaret Tarihi: 27.01.09**)

[28] Nanonics Imaging LTD. Near Field Scanning Optical Microscopy [online], <http://www.nanonics.co.il/imgtemp/NSOM100%20between%20objectives.jpg>, (**Ziyaret Tarihi: 27.01.09**)

[29] Akkan, C., K., Genc, B., Akman, E., Kacar, E., Demir, A., “Information About Laser Scanning Confocal Microscopy and Development of a 10X Magnifier Objective”, *Fifth International Student Conference of the Balkan Physical Union Oral Presentation*, 2007

[30] Claxton, N., S., Fellers, T., J., Davidson, M., W., "Laser Scanning Confocal Microscopy", *Olympus Corporation*, 2004-2007.

[31] Pawley, J., B., "Handbook of Biological Confocal Microscopy" 3th edition, *Springer*, 1-5, 145-152, 119-120, 2006

[32] Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M., Heinz, H., "Confocal Laser Scanning Microscopy Principles" *Microscopy from Carl Zeiss*, 6,15, 2003

[33] Sheppard, C., J., R., Shotton, D., M., "Confocal Laser Scanning Microscopy", microscopy handbook 38, *Taylor & Francis Group*, 1-33, (2006)

[34] CVI optics color process filter, <http://www.cvilaser.com/Catalog/Pages/Template2.aspx?pcid=227&filter=0>, (**Ziyaret Tarihi: 07.05.2009**)

[35] Andor Technology, Microscopy [online], <http://www.andor.com/learn/microscopy/>, (**Ziyaret Tarihi: 27.01.09**)

[36] Taylor, J., R., Zafaritos, C., "Fizik ve Mühendislikte Modern Fizik", **Güven Kitap Yayımları**, 74-75, 1996

[37] Olympus FluoView Resource Center Theory of Confocal Microscopy [online], <http://www.olympusfluoview.com/theory/index.html>, (**Ziyaret Tarihi: 23.01.08**)

[38] Uğur Optik Makine San. Tic. Ltd. Şti, Görüntü kusurları [online], <http://www.uguroptik.com/tr-icerik-statik-750.html>, (**Ziyaret Tarihi: 26.04.09**)

[39] Photographic Optics [online], <http://toothwalker.org/optics/distortion.html>, (**Ziyaret Tarihi: 26.04.09**)

[40] Felber, P., "Charge-Coupled Devices", *Illinois Institute of Technology*, 2002

[41] Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Grubu [online], <http://www.tubitak.gov.tr/>, (**Ziyaret Tarihi: 16.12.2007**)

[42] Thorlabs Inc., products [online], <http://www.thorlabs.com/>, (**Ziyaret Tarihi: 29.04.09**)

KİŞİSEL YAYINLAR

1. Akkan, C. K., Babur, S., Kacar, E., Akman, E., “Optical Calculations and General Information For Laser Scanning Confocal Microscopy”, *Balkan Fizik Topluluğu Uluslar Arası Öğrenci Konferansı*, Bodrum, 2006
2. Akkan, C. K., Genc, B., Akman, E., Kacar, E., Demir, A., “Development of A 10x magnifier laser scanning confocal microscopy objective”, *Balkan Fizik Topluluğu Uluslar Arası Öğrenci Konferansı*, Bodrum, 2007
3. Akkan, C. K., Akman, E., Kacar, E., Demir, A., “Lazer taramalı eş odaklı mikroskop için objektif tasarımı” *9. Ulusal Optik, Elektro-optik ve Fotonik Çalıştayı*, ASELSAN A.Ş. MGEO Tesisleri, Ankara, 2007
4. Akkan, C. K., Demir, P., Mutlu, M., Akman, E., Kacar, E., Demir, A., “Drilling process of ceramic using nanosecond Nd:YAG laser” *Balkan Physical Letters*, BPL, 16, 161083, 2009
5. Akkan, C. K., “Lazer Teknolojilerin Araştırma ve Uygulama Merkezinde Üretilmekte Olan Optik Cihazlar”, *10. Ulusal Optik, Elektro-optik ve Fotonik Çalıştayı*, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, 2008
6. Mutlu, M., Kacar, E., Akman, E., Akkan, C. K., Demir, P., Demir, A. “Nd:YAG lazer kullanarak Seramik Malzemenin Delinmesine Dalga boyunun Etkisi”, *JLMN* (Revizyonda)

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğrenim ve İngilizce öğrenimini İstanbul'da bitirdi. Orta ve lise öğrenimini Kocaeli'nde tamamladı. 2003 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'ne girdi ve 2007 yılında bölüm birinciliğiyle mezun oldu. 2007 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisansa başladı. 2009 yılında Almanya'da bulunan Leibniz Institut für Neue Materialien Enstitüsünde davetli bilim adamı olarak çalışmaya başladı ve halen devam etmektedir.