

# Fonksiyonel hücre görüntüleme teknikleri

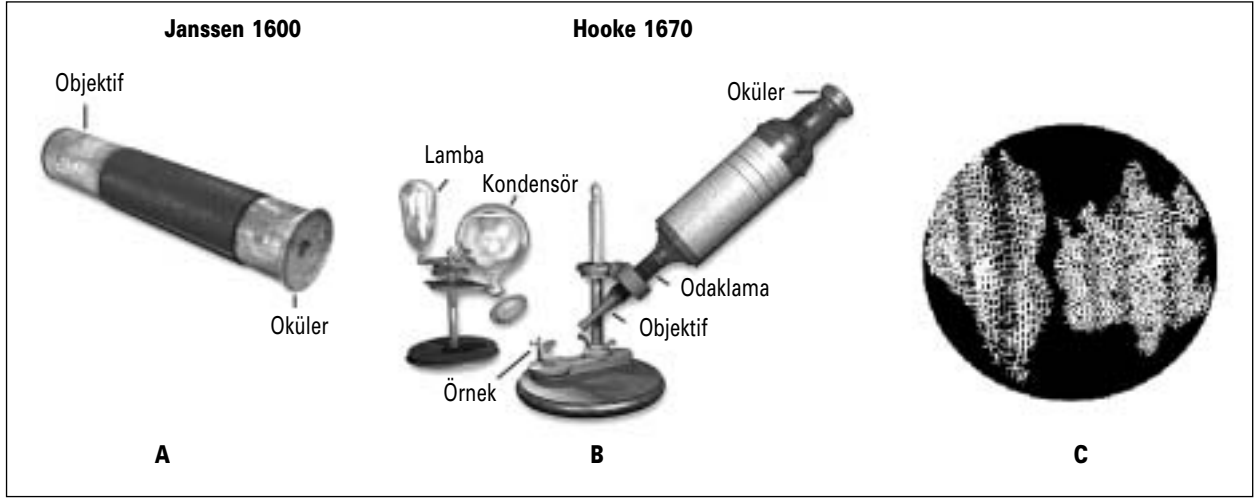
Nuhan Puralı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Prof. Dr., Hacettepe Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Biyofizik  
Anabilim Dalı, Ankara

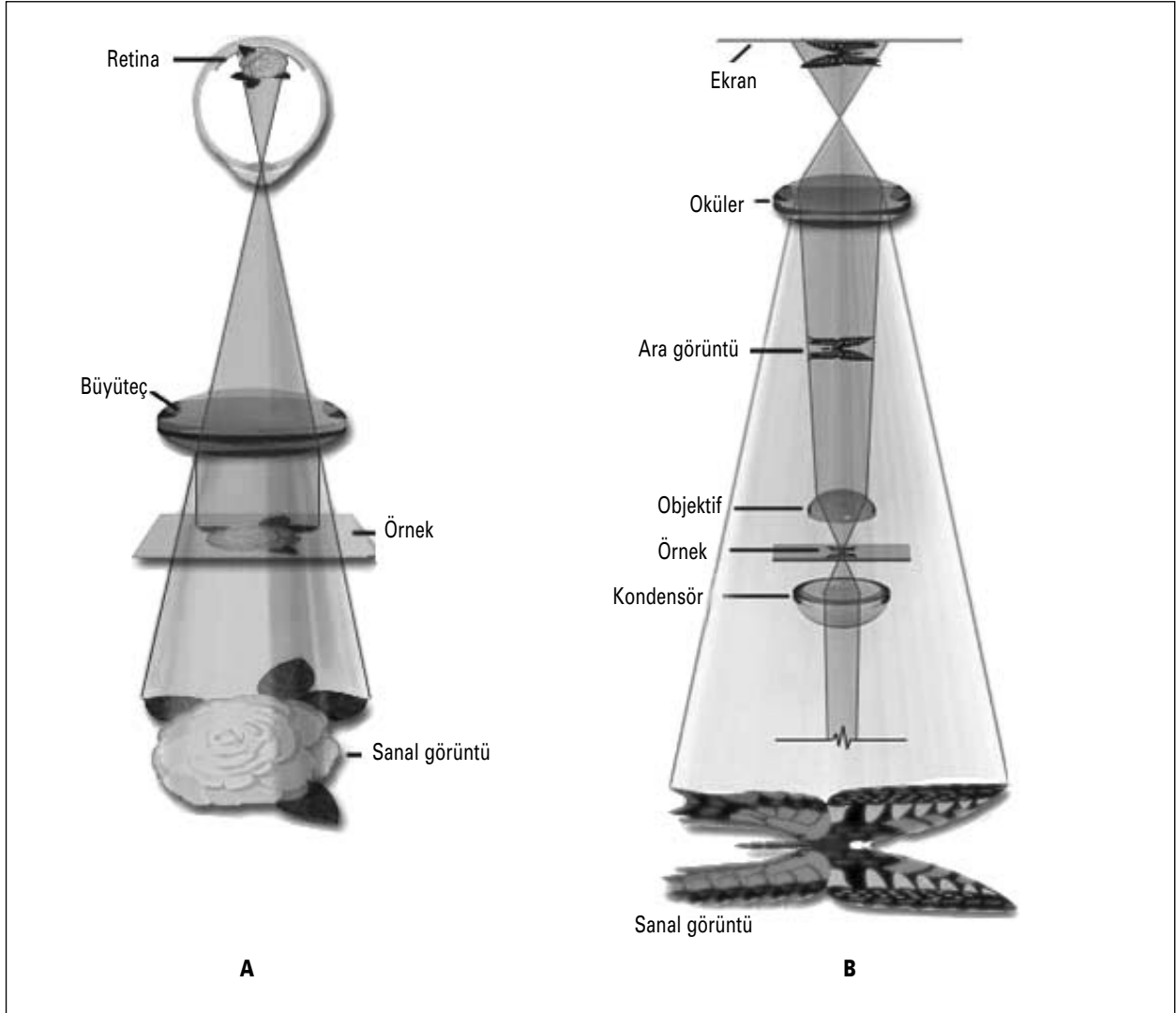
**T**emel tıp bilimleri ve biyolojide sistem, organ ve doku fonksiyonu hakkında bugün eriştiğimiz bilgi düzeyinin temeli, fonksiyonel birim olan hücre ve yapıları hakkındaki bilgilerimiz nedeniyledir. Bu nedenle bilim insanları tarih boyunca, gözle göremedikleri bu mikro evrendeki yapıları görünür hale getirip, deneysel bilgiler toplayabilmek için farklı büyütme araçları, mikroskoplar üretme çabasında olmuşlardır. Her ne kadar Janssen'in 16. yüzyılda ürettiği bileşik mikroskop ilk olsa da, tarihte bu girişimlerin başlangıcı Hooke'un çalışmaları olarak kabul edilir. Hooke Şekil 1'de gösterildiği üzere, bir boru içine yerleştirdiği merceği ve oküleri, bir yağ lambası (ışık kaynağı) ve su dolu küre (kondensör) yardımıyla, ince kesilmiş şişe mantarı dilimleri üzerine odaklayarak gördüğü yapıyı çizdi. Mantar diliminin delikli yapısını tanımlamak üzere Hooke ilk defa hücre terimini kullandı. Hooke'un mikroskobu ile bugünkü modern mikroskopların arasında görüntü itibariyle çok büyük farklar olmasına rağmen görüntülemenin temel prensibini oluşturan fizik kanunları aynıdır. Bugün laboratuvarlarda görüntüleme maksadıyla en sık ışık, elektron demeti ve ultrases kullanan mikroskoplardan yararlanılmaktadır. Ultrases mikroskopları kısıtlı olarak kullanılmaktadır, elektron mikroskopi tekniği ise ancak fikse edilmiş metal kaplanmış hücrelere (dokulara) uygulanabildiğinden, bu makalenin kalan kısmında canlı hücrelere uygulanabilen ışık mikroskopi tekniklerine yer verilmiştir [1-4].

Beyaz ışık, elektromanyetik dalga spektrumun gözümüzün görebildiği 400-800 nm arasındaki kısmına karşılık gelmektedir. Görünebilir spektrumdan daha küçük dalga boyundaki ışık ışını ultraviyole, daha büyük dalga boyundaki ise infra-red spektrumunda yer alır. Farklı maksatlarla tüm bu dalga spektrumlarının seçilmiş bir bandı veya tek dalga boyuna sahip ışık ışınları kullanılmaktadır.

Büyütmenin en bilinen aracı büyüteçtir. Burada objeden yansıyan paralel ışık ışınları lensten geçerek odak noktasına kırılır ve retinada görüntü oluşur. Görüntünün boyu lensin arkasında oluşan büyütülmüş sanal görüntüye ait olduğundan büyütme gerçekleşmiş olur (Şekil 2A). Mikroskoptaki fizik prensipler özünde büyüteçtekine benzemekle birlikte bazı farklar arz eder. Mikroskopta ambient ışık yerine belli bir ışık kaynağı kullanılır. Aydınlatma ışığı bir kondensör (yoğunlaştırıcı) lens yardımıyla numuneye odaklanır. Numuneden geçen ışık ışınları (transmitted light) objektif lens tarafından birinci defa büyütülür. Oluşan görüntü paralel ışık demetleri halinde mikroskop tüpünden okülere ulaştıktan sonra ikinci büyütme-ye uğrar, odağa kırılan ışık demetleri gözlem planında final görüntüyü oluşturur (Şekil 2B). Oluşan görüntü aslında iki kez büyütülmüş sanal görüntüye ait olduğundan numunenin yeterince büyük bir görüntüsünü gözlemek mümkündür. Bu yöntemle numunenin  $\approx 1,000$  kez büyütülmüş görüntülerini elde etmek mümkündür. Klasik ışık mikroskobu ile şiddet kontrastı, faz kontrastı, modülasyon kontrastı, interferans kontrastı yöntemleri ile örneğin farklı vasıflarını ön plana çıkartan görüntülerini elde etmek mümkündür. Bilinen parlak alan mikroskopisi ile,



Şekil 1. Janssen'in 16. yüzyıl başlarında ürettiği bileşik mikroskop (A), Hooke'un mikroskobu (B) ve mantar dokusu gözlemine ait el çizimi (C).

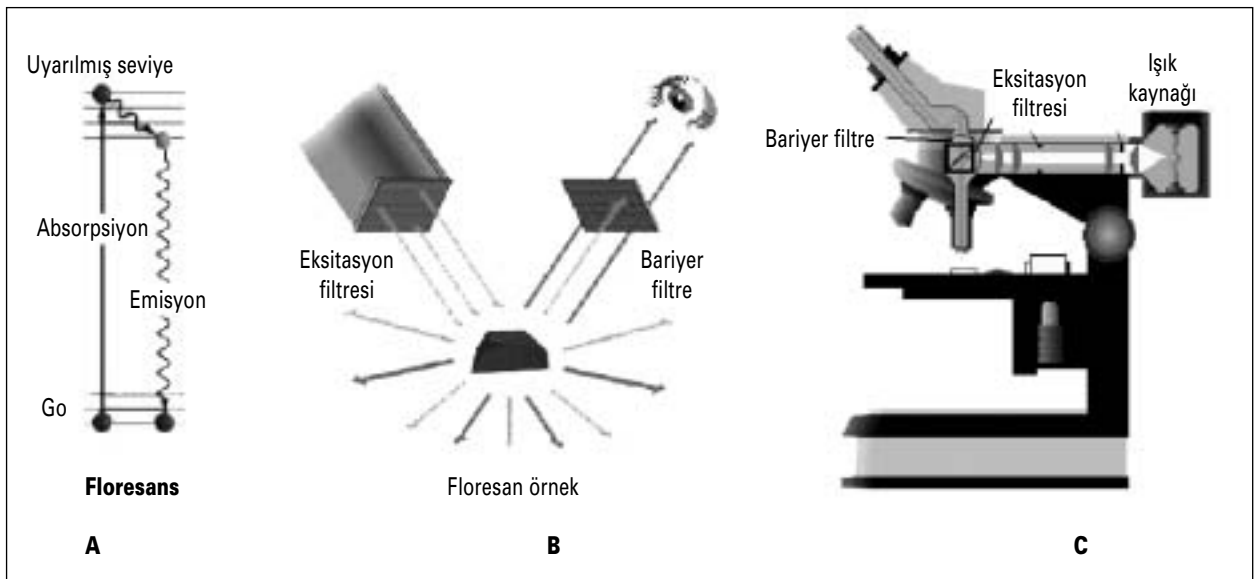


Şekil 2. Bir büyüteç lenste (A) ve mikroskopta (B) büyütme olayının şematik gösterimi.

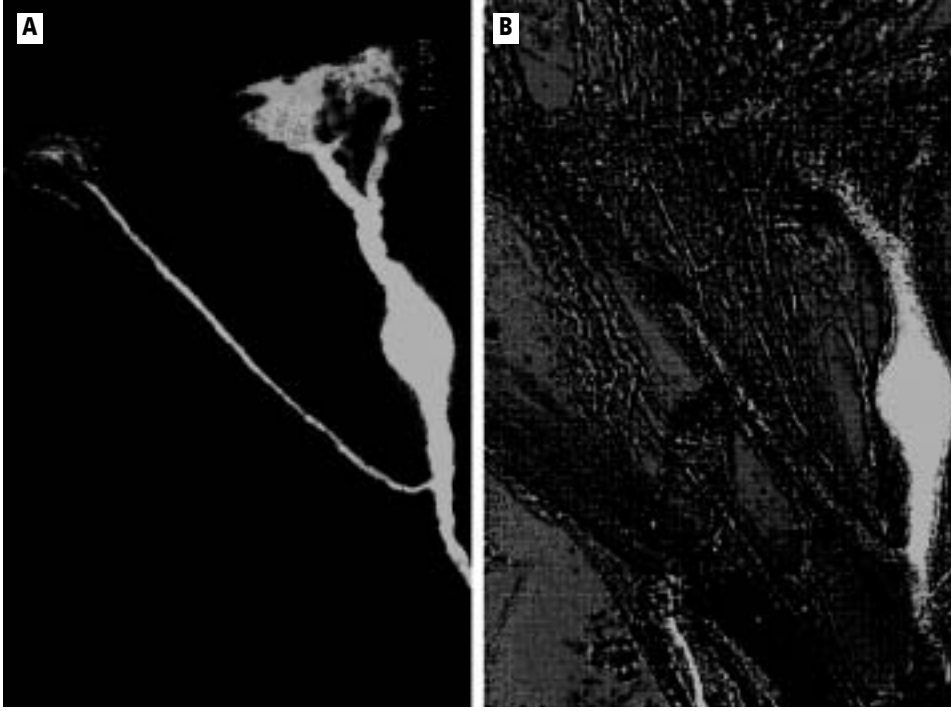
numunenin görme alanına giren kısmının ışığı geçirme özelliklerinden yararlanır. Bu yöntemle numunenin bir kısmına ait spesifik görüntüleme elde etmek mümkün değildir.

Numuneden spesifik görüntü veya sinyal almak için floresan mikroskopi yöntemi geliştirilmiştir. Floresan prensip temel seviyedeki (ground state) bir elektronun eksternal enerji ile uyarılarak bir üst seviyeye yükseltilmesi ve bu seviyede labil olan elektronun tekrar temel seviyeye dönerken spesifik bir dalga boyunda ışımaya yapması şeklinde özetlenebilir (Şekil 3A). Eğer uyarı enerjisi bir ışık kaynağıysa buna uyarı (excitation) ışığı, geri dönüşte yayılan ışığa da emisyon (emission) denir. Bazı moleküllerin floresan vasıfları daha etkindir, belli bir dalga boyunda uyarıldığında stabil olarak başka bir dalga boyunda orantılı bir ışımaya yaparlar, bunlara da floresan madde veya florofoz denir. Floresan prensibin mikroskopideki uygulaması Şekil 3B ve 3C'de gösterildiği gibidir. Burada ışık kaynağından optik filtreler yardımıyla uyarı ışığı süzülerek numuneye yönlendirilir, numunenin çıkarttığı emisyon bariyer filtreden geçirilerek uyarı ışığından arındırılır ve göze (veya fotoğraf makinesine) düşürülerek görüntülenir. Bu sayede numunenin kendi yaydığı spesifik floresan emisyon görüntülenmektedir. Eğer, numunenin belli bir kısmının floresan olarak işaretlendiğini düşünürsek sadece bu kısımlar spesifik olarak işaretlenecektir. Resim 1'de bir mikroelektrotla floresan boya doldurulmuş bir nörona ait görüntü gösterilmiştir. Bu sayede nöronun ince dendritleri en ince ayrıntılarına kadar görüntülenebilirken, diğer yapılar elimine edilmiştir. Görüldüğü gibi floresan mikroskopi en temel olarak spesifik yapıların morfolojisinin araştırılmasında kullanılmaktadır [1].

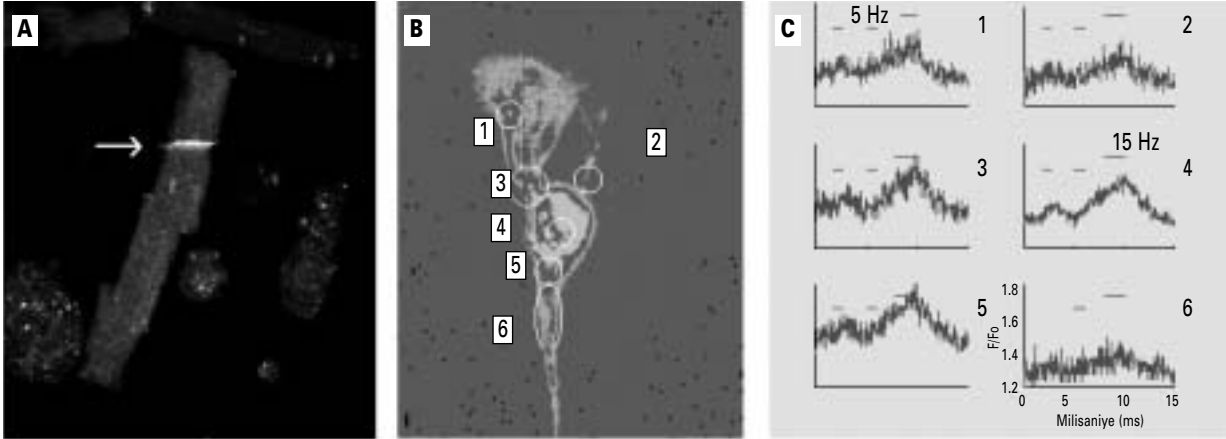
Ancak bazı floresan boyaların yaydığı emisyon, ortamdaki değişikliklerden etkilenmektedir. Örneğin, kalsiyum, sodyum, potasyum ve pH değişiklikleri spesifik florofozun yaydığı emisyonu etkiler. Bu sayede uygun floresan boya seçilerek hücre içi iyon konsantrasyonu değişiklikleri gerçek zamanlı tespit edilebilir. Ancak fotoğrafçılık işlemi ile bu sinyalleri takip etmek mümkün değildir. Bu yüzden fotoğraf makinelerinin yerine foton sayıcı cihazlar, foto-diod kullanılmaktadır. Bir foto-diodda elektrik potansiyeli altında labil hale getirilen katot bulunur ve buraya düşen her foton bir grup elektronu kopartıp uçurarak anotta bir akım oluşturur. Anod akım foton sayısı ile orantılı olduğundan floresan emisyonun kuantitasyonu mümkün olur. Uygulanan voltaj değiştirilerek foto-diodun hassasiyeti ayarlanabilir. Fotometri denen bu yöntem basit ve ucuz bir yöntemdir, ancak görme alanının tamamından alınan sinyalin tümünü tek okuma halinde verir, dolayısıyla XY ve Z ekseninde bir çözünürlükten bahsetmek mümkün değildir. Bu sıkıntıya çözüm bulmak için CCD kameralar kullanılarak imaging tekniği geliştirilmiştir. Bu teknikte mikroskopta oluşan görüntü her pikselinde bir foton sayıcı-kaydedicisi bulunan bir plakanın üzerine düşürülür. Bu sayede birim zamanda her pikseldeki sayaca düşen foton sayısı ayrı ayrı kaydedilir ve bir voltaj sinyali olarak okunarak dijital veri haline dönüştürülür. Daha sonra bu veriden, numunenin XY planındaki görüntüsü dijital olarak oluşturulur. Böylece floresan sinyaldeki topografik değişiklikler takip edilebilir [3]. Örneğin kalsiyum konsantrasyonunun miyositte nasıl yayıldığı, nöronda belli bölgelerin, örneğin; dendrit uçlarında konsantrasyonun daha fazla mı değiştiği gibi, topografik çözünürlük gerektiren problemlere direkt çözümler



Şekil 3. Floresansın temel fizik kuramı (A), uygulaması ile ilgili şematik gösterim (B) ve epi-floresan mikroskop (C).



**Resim 1.** Floresan boya ile doldurulmuş bir nöronun floresan mikroskopi ile alınan görüntüsü (A), bu resimle preparatın tümüne ait interferans kontrastı (DIC) görüntüsünün toplamı (B).



**Resim 2.** Fluo-3 yüklenmiş bir kalp kası hücrede kasılma ile seyreden kalsiyum dalgasının yayılımı (A), SBFİ yüklenmiş bir sensör nöronunda 5 ve 15 Hz'lik aksiyon potansiyeli trenleri ile intraselüler sodyum konsantrasyonundaki değişimin bölgelere göre dağılımı (B, C).

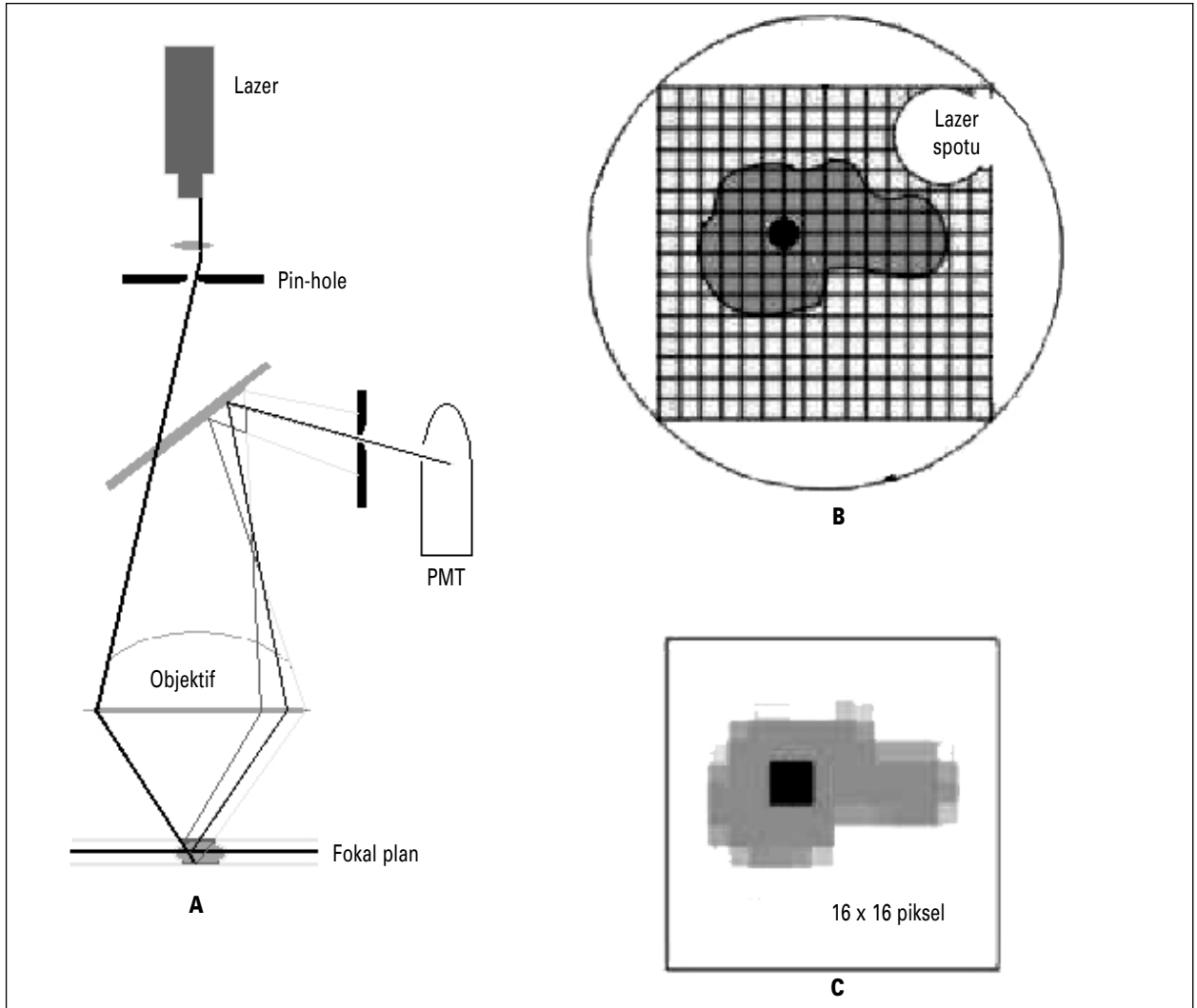
bulunabilir (Resim 2A). Resim 2B'de sodyuma hassas bir boya ile doldurulmuş bir nöron hücre gövdesine yerleştirilmiş bir elektrotla uyarılmış ve oluşan hücre içi sodyum iyonu değişiklikleri farklı alanlarda takip edilmiştir.

Maksimum değişiklik hücre gövdesinde saptandığından buranın en çok sodyum kanalı içerdiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu tür yöntemlerin bir diğer uygulama alanı ise potansiyele hassas boyaların kullanıldığı araştırmalardır. Nöronal membran potansiyeli membran içine yerleşik floresan boyanın emisyonunu etkiler. Bu sayede nöral aktivite artışı emisyon artışı ile korele olduğundan membran potansiyeli değişiklikleri saptana-

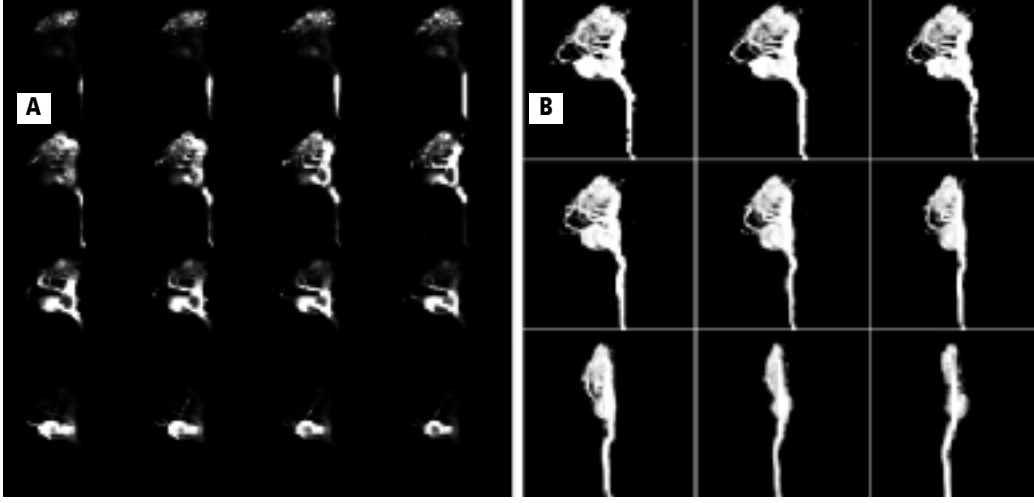
bilir. Bu yöntem hızlı foton sayıcılar (diod-array) kullanılarak beyin kesitlerinde nöral aktivitenin topografik takibinde kullanılmaktadır [3]. Ancak voltaj boyaları diğerlerine göre daha kısıtlı (100 mV için maksimum %20) emisyon değişiklikleri verdiklerinden uygulaması en zor olanlardır. Imaging tipi yöntemle XY planında çözünürlük sağlansa da Z ekseninde herhangi bir çözünürlükten bahsetmek mümkün değildir. Z eksenini kontrol etmek için modülasyon kontrastı gibi bazı ışık mikroskopi teknikleri geliştirilmiş olsa da bunlar tamamen illüzyonlara dayanmaktadır. Gerçek anlamda Z ekseninin kontrolü ancak konfokal mikroskopi tekniğiyle mümkün olmuştur [2].

Şekil 4A'da şematik olarak gösterildiği üzere, konfokal mikroskopta ince bir lazer ışını objektif üzerinden floresan işaretli numunenin üzerine düşürülür. Bu ışın numuneyi geçer ve yolu boyunca var olan floroforları uyarır. Tüm bu yapılar emisyon yayar. Odak planındaki yapıdan yayılan emisyon dikroik aynadan yansıyıp bir ışık geçirmez plaka üzerindeki küçük delik (pin-hole) içinden geçip foton çarpıcı-sayıcıya (photomultiplier) ulaşır voltaj sinyali olarak saklanır. Buna karşın odak planının altındaki ve üstündeki yapılardan kaynaklanan emisyon küçük deliğin altına ve üstüne geleceğinden sayaca ulaşamaz ve kaydedilemez. Bu yöntemle tüm katmanlar uyarılmasına rağmen sadece odak planından kaynaklanan emisyon süzülüp kaydedilmiş olur. Görme alanı piksellere ayrılır, lazer ışığı her pikseli sırasıyla yönlendirilmek suretiyle bu işlem tekrarlanarak tüm görme alanı taranır. Böylece fokal planın tümünden kaynaklanan emisyon sinyali potansiyel sin-

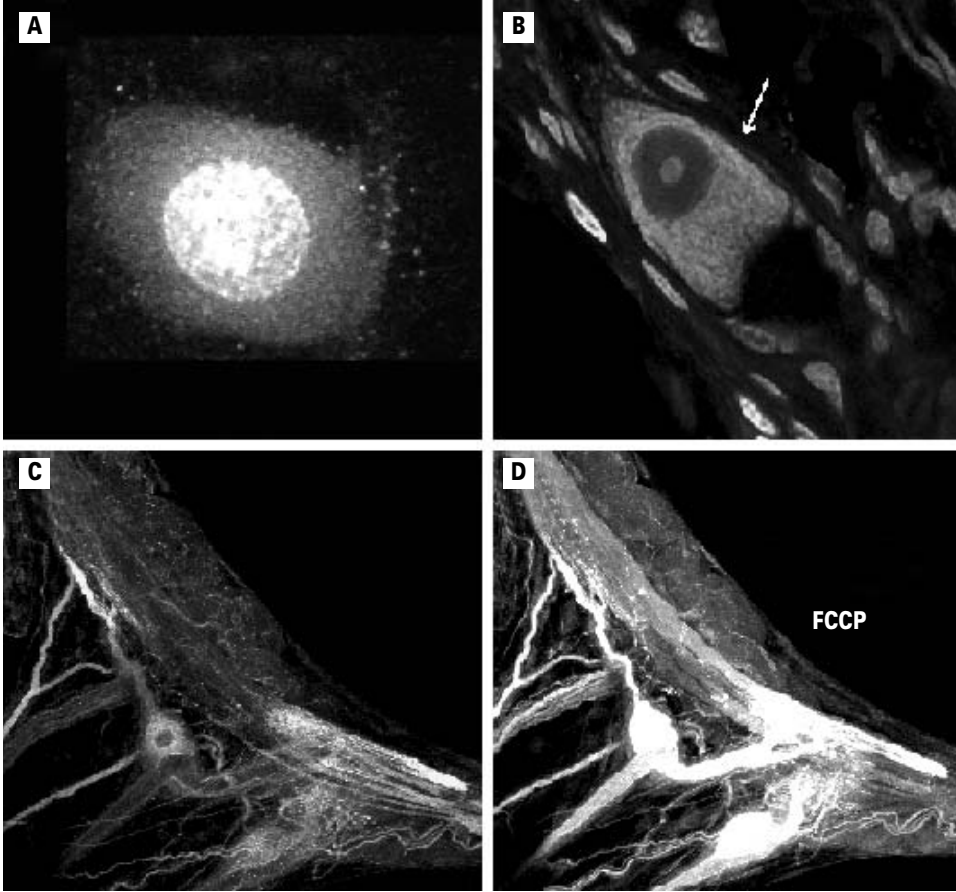
yaline dönüştürülmüş olur (Şekil 4B,4C). Bilgisayar yardımıyla bu kayıtlardan fokal planın görüntüsü dijital olarak oluşturulur. Mikroskop (objektif), cismin Z ekseninde belli aralıklarla farklı seviyelere odaklanır. Her seviyeye ait fokal düzlem görüntülenerek resim takımı oluşturulur. Bunlar, numunenin gerçek optik kesitleridir. Fizik bir manipülasyon kullanıldığından numune kesilip hasara uğratılmamıştır. Bu yöntemle alınabilecek kesit aralığı (bu objektife bağlıdır) 1 µm veya daha küçük olabilir. Klasik yöntemlerle karşılaştırıldığında oldukça iyi bir değerdir. Ayrıca, canlı hücrelere uygulanabilir olması tamamen bir üstünlük teşkil eder. Bu şekilde alınmış Z-görüntü kesitlerinden dijital algoritmalar kullanarak, cismin projeksiyon ve (dichotic) stereo görüntülerini ve açısız dönüşüm resimlerini hesaplamak mümkün olur (Resim 3). Ayrıca, noninvaziv olan bu yöntemle bir canlı hücreden optik kesit aldığınızda, uygun planı bulursak hücre içi yapıları gözleme



Şekil 4. Konfokal prensibin şematik gösterimi (A), görme alanının pikselasyonu (B), fokal planın dijital görüntüsü (C).



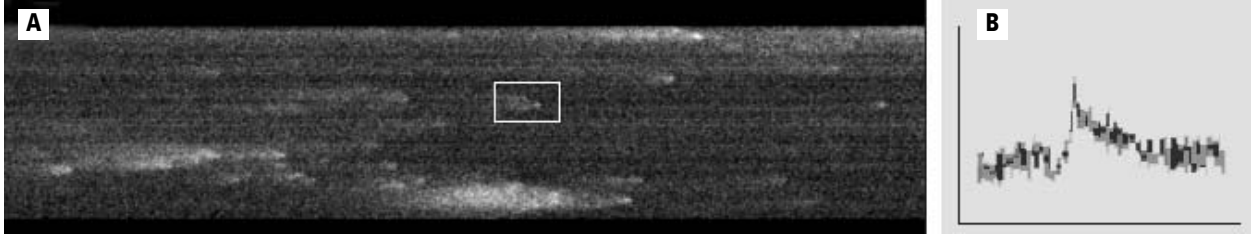
**Resim 3.** Bir nöron dan yapılan Z-ekseni kesitleri (A) ve bunlardan hesaplanmış nöronun rotasyonel projeksiyon görüntüleri (B).



**Resim 4.** Bir nöron çekirdeği (A), kaba endoplazmik retikulum (B), Mitokondri kütlesi işaretlenmiş canlı bir sinir kas preparatı (C, perinükleer ve terminal dendrit bölgesindeki yoğun kitleyi fark edin) ve aynı preparatın uncoupler FCCP muamelesinden sonraki yoğun sitoplazmik boyanması (D). C ve D'yi karşılaştırarak quenching (bastırma) etkisini fark edin.

imkanımız olur. Örneğin; hücre çekirdeği, mitokondri, vakuol, endoplazmik retikulum gibi yapılar morfolojik ve fonksiyonel olarak görüntülenebilir (Resim 4). Ayrıca, yukarıda bahsedilen floresan tekniklerin tamamı konfokal mikroskop ile uygulanabilir. Z-görüntü takımı alındıktan sonra görüntülenen yapının morfolojik ölçümleri hesaplanabilir. Bu sayede, hücre veya kısımlarının hacmini, yüzey alanını en kesin bir biçimde hesap-

lamak mümkündür. Bu bilgiler örneğin uyarılabilir bir hücrenin yapı fonksiyon ilişkisinin belirlenmesi için çok önemlidir. Konfokal teknikle hacim kontrolü mümkün olduğundan canlı bir hücrenin istenen bir bölgesinden kayıt yapılabilir. Yani hücre (veya organel) içinde XYZ eksenlerinde tanımlanmış kısıtlı bir hacim içinde numunenin kalsiyum değişimi kaydedilebilir. Resim 5'te miyosit içine bir bölge hedeflenerek line-



**Resim 5.** Kalp kası hücresinde kalsiyum sparkları (A). A'da kare içindeki sparkın zamana göre değişimi (B).

scan modunda endoplazmik retikulumundan salınan kuantal kalsiyum transienleri kaydedilmiştir.

Konfokal mikroskopü hücre araştırmaları için ideal bir araştırma yöntemidir. Ancak doku parçalarında kullanımı nispeten kısıtlıdır. Uyarı ışığının derindeki hücreye penetrasyonu ve floresan emisyonun dokuda yayılımı zor olduğundan yüksek enerji kullanılması gerekir. Yüksek enerji doku ve hücreye zarar vereceğinden canlı yapılarda uygun değildir. Bu sorunları aşmak için multi-foton tekniğı geliştirilmiştir. Bu yöntemin bilinen konfokal teknikten farkı özel bir lazer kullanılmasıdır. "Power Spread Function (PSF)" dağılımına göre odak noktasının parlaklığı karanlık kısma göre  $10^5$  kez daha fazladır. Dolayısıyla iki PSF çarpılması sağlanarak mikroskop konfokal hale getirilebilir. Yeterince parlak bir ışık kaynağı bir noktaya odaklandığında bir ya da iki fotonu hemen eşzamanlı olarak aynı noktada buluşturabilir. Bu örnekten yola çıkarak floroforun spesifik uyarılma dalga boyunun iki katı uzunluktaki lazer ışığı kullanılmak suretiyle iki fotonun hemen eşzamanlı ulaşması sağlanırsa fokal plandaki floroforlar spesifik olarak uyarılabilirler. Bu yöntemle uyarılma ışığı daha az enerjili olacağından yüksek enerji sadece odak noktasında oluşacak, bu sayede doku penetrasyonu daha etkili olurken doku hasarı azaltılacaktır. Ayrıca, uyarılma sadece fokal planla sınırlı olduğundan pin hole kullanımı gerekmeyecektir. Bu vasıfları nedeniyle multi-foton tekniğı doku parçalarından yapılacak ölçümler için ideal bir yöntemdir. Ancak konfokal metoduna oranla elde edilen görüntülerin çözünürlüğü daha kötüdür, her amaca uygun florofor bulmak zordur, kullanılan lazerler ve kontrol sistemleri çok daha pahalıdır [2,3].

Sonuç olarak; günümüz laboratuvarlarında optik yöntemler kullanarak hücre yapı ve fonksiyonu hakkında canlı hücrelerde invaziv olmayan araştırmalar yapmak ve fizyolojik cevapları kaydetmek mümkündür. Bu tür tekniklerin kullanıldığı metotlar genel olarak opto-fizyoloji terimi adı altında toplanmaktadır.

Bu makalede verilen şekil ve resimlerin tamamı anabilim dalımızda kurulu hücresel elektro-fizyoloji ve opto-fizyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Diyagramatik gösterimler farklı kaynaklardan altta yatan fizik kavramları vurgulamak amacıyla aslına uygun olarak yeniden üretilmiştir [4]. Anabilim dalımızda verilmekte olan lisans üstü derste bu makalede verilen kavramsal içerik ötesinde, ölçme ve analiz yöntemleri de verilmekte, öğrencilere uygulama imkanları sağlanmaktadır. Ayrıca, bu kapsamda 2004 yılı güz döneminde uluslararası katılımlı bir eğitim kursu düzenlenecektir.

#### Kaynaklar

1. Herman B. Fluorescence microscopy. New York, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1998.
2. Paddock S. Confocal microscopy (methods in molecular biology Volume 122). Humana Press, 1998.
3. Murphy DB. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. John Wiley and Sons, Inc., 2001.
4. www.fsu.edu