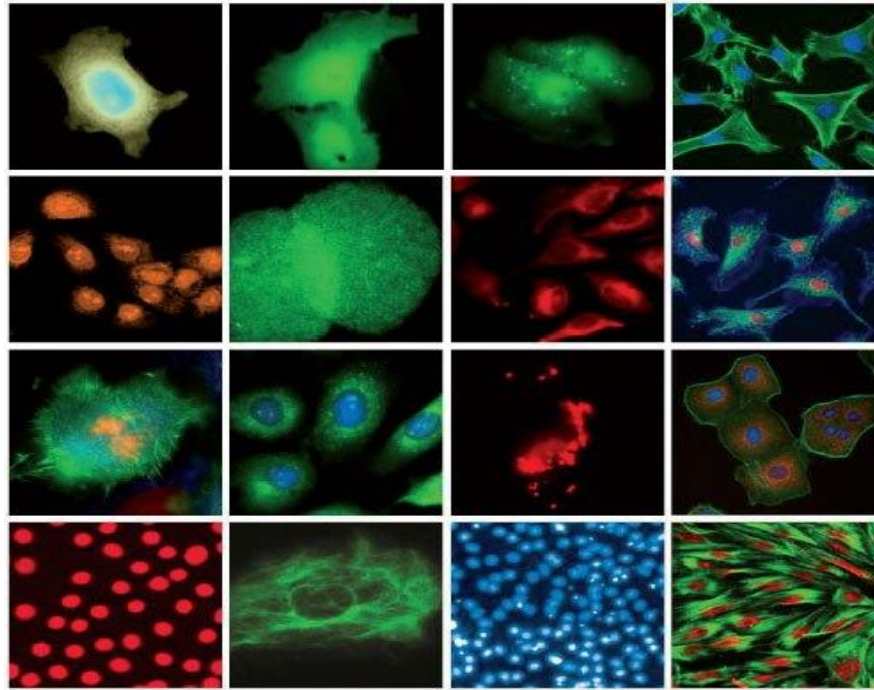


FLORESAN MIKROSKOBU



Prof. Dr. Ferah BUDAK

Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji AD.

İÇERİK

- Floresan nedir?
- Eksitasyon ve emisyon
- Floresan mikroskobi prensipleri
- Floresan mikroskop çeşitleri
- İmmünofloresan Yöntemler
- Floresan mikroskoplar nasıl kullanılır?

Uygulama Alanları

- Floresan görüntüleme, ışık mikroskopunun çözünürlük sınırının ötesinde molekülleri görselleştirir
- Klinik tanıda ;
 - İmmünoloji
 - Patoloji
 - Mikrobiyoloji
 - Sitogenetik
- Çeşitli araştırma alanlarında
 - Jeoloji
 - Metalürji
 - Çevre mühendisliği

Floresan mikroskop ile neler yapabiliriz ?

- Spesifik proteinlerin lokalizasyonu belirlenebilir
- Organların, hücrelerin ve hücre içi yapıların şeklini belirlenebilir
- Proteinlerin dinamiği incelenebilir
- Proteinlerin etkileşimleri veya protein konformasyonu incelenebilir
- İyon yoğunluğu incelenebilir

Floresan prensipleri



Sir George G. Stokes

- 19 yüzyıl
- Fluorspar minerali →
uv ışıkla aydınlatıldığında,
- "Floresan" 1852 yılında

Floresan Mikroskopunun Keşfi

- 20. yüzyılın başları
 - August Köhler
 - Carl Reichert
 - Heinrich Lehmann
- Bakteri, hayvan ve bitki dokularındaki otofloresansı gözlemlemek için kullanıldı

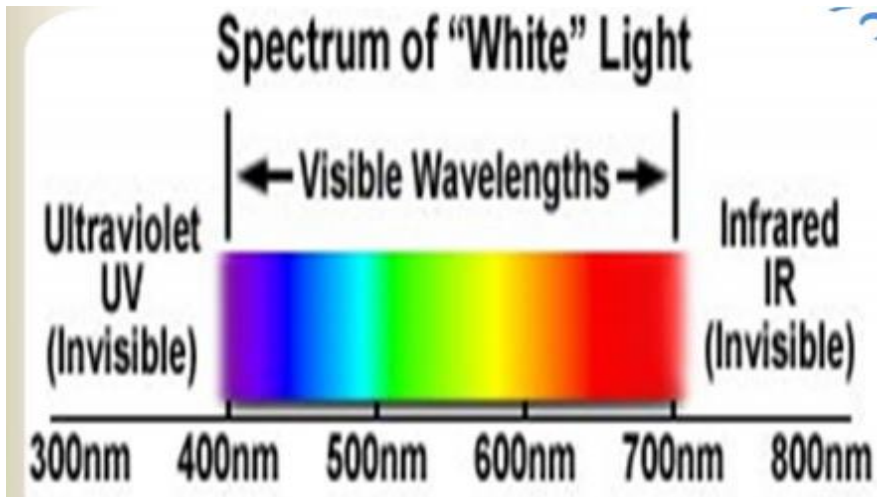


August Köhler
(1866-1948)

Işık Mikroskobu ile Floresan Mikroskobu Arasındaki Farklar

Işık Mikroskobu

- Bir örneğin büyütülmüş bir görüntüsünü aydınlatmak ve üretmek için görünür ışığı kullanır(400-700 nanometre)

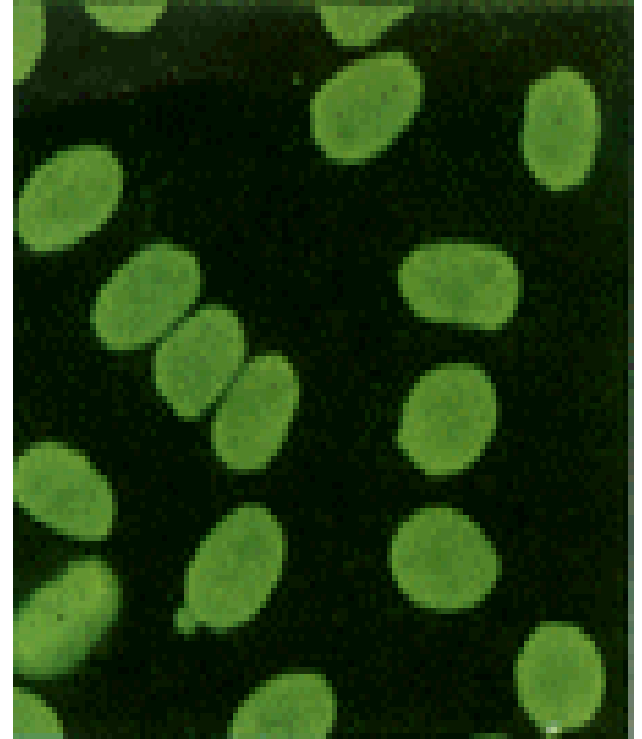


Floresan Mikroskobu

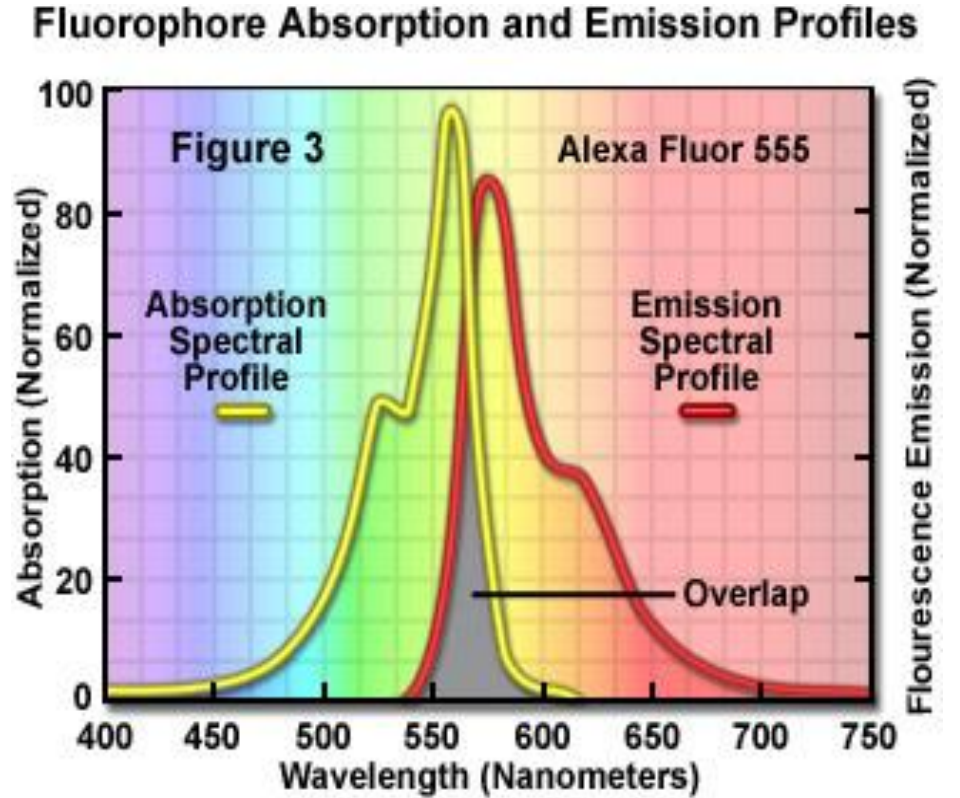
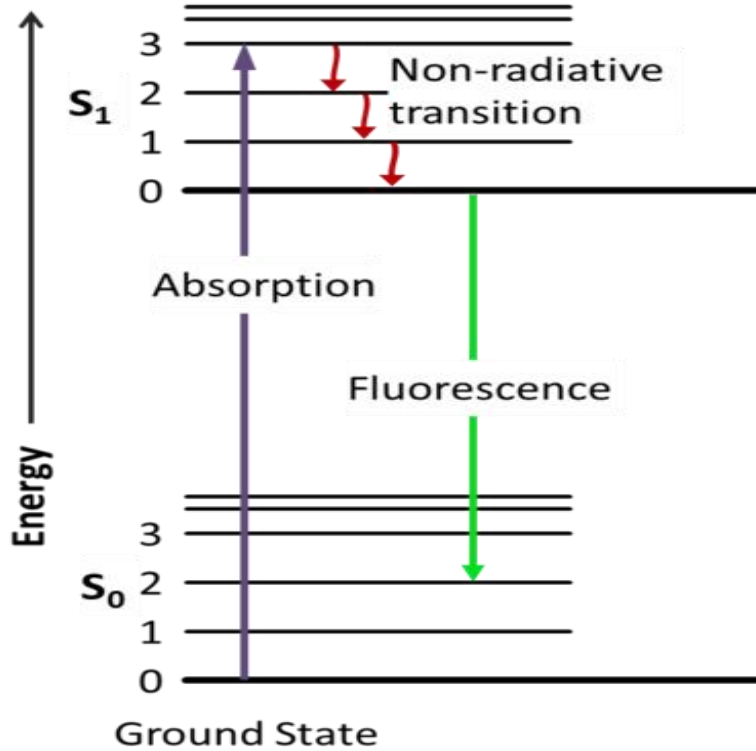
- Örnekte bulunan floresan maddelerini uyaran daha yüksek yoğunlukta ışık kaynağı kullanır
- Floresan maddeler, orijinal ışık kaynağı yerine, daha büyütülmüş görüntü üreten daha düşük enerjili ışığı daha uzun dalga boyuna dönüştürürler.

Floresan nedir?

- Bir maddenin başka bir ışııkla uyarıldığında ürettiğı ışıık
- "Soğuk ışıık"
- Akkor ampul gibi sıcak bir kaynaktan gelmez



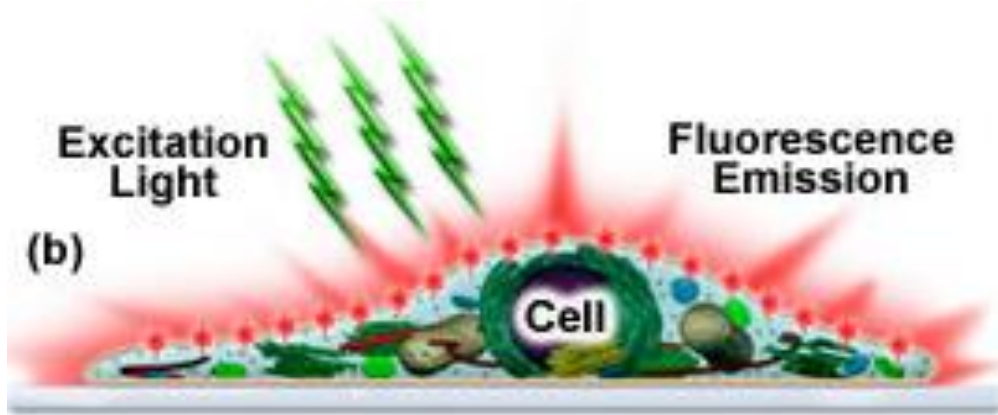
Floresan nedir?



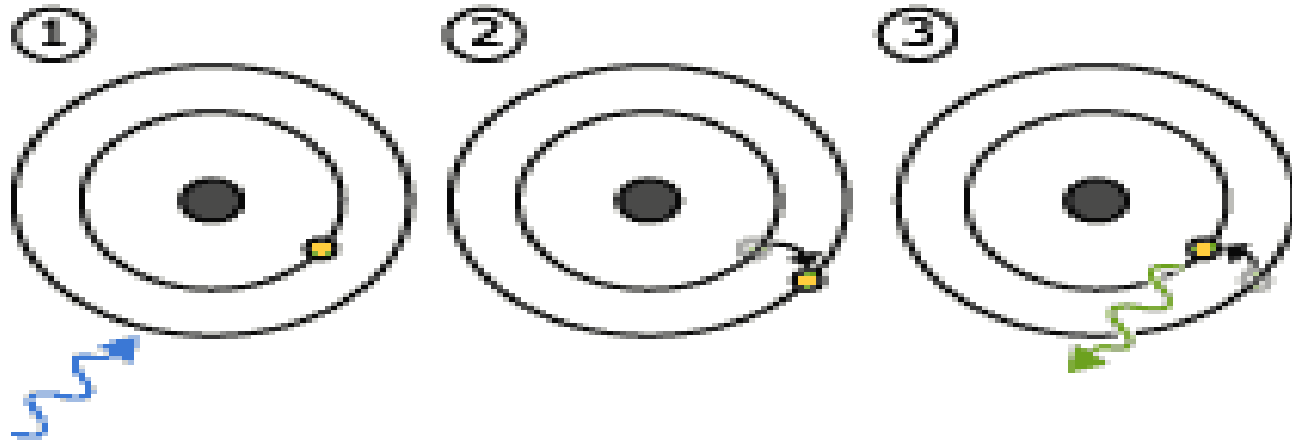
- Bazı maddeler kısa dalga boyunda ışıkla aktive edildiklerinde , ışık enerjisini absorbe ederler ve bunu uzun dalga boyunda görünür ışık olarak yayarlar

Floresan Nedir?

- Cisimlerin kendilerine gelen ışınları ve bu ışınlardakinden farklı dalga boylarında yansıtma olayına floresan
- Uyarı enerjisi bir ışık kaynağıysa buna uyarı (excitation) ışığı
- Geri dönüşte yayılan ışığa da emisyon (emission)



Floresan nedir?



**Excitation
Energy**

*Electron is
kicked up to
higher energy
state*

($\sim 10^{-4} - 10^{-8}$ saniye)

**Fluorescence
Emission**

*Electron is
dropped down to
lower energy
state*

Floresan Boyalar

- Florofor  Floresan boyalar
- Belirli bir dalga boyunda (genellikle UV) eksitasyon ışığını emen ve kısa bir gecikmeden sonra daha uzun bir dalga boyunda ışık yayan moleküllerdir
- Emilim ve emisyon arasındaki gecikme, genellikle nanosaniye düzeyinde önemsiz ($\sim 10^{-4}$ - 10^{-8} saniye)
- Daha sonra emisyon ışığı, floroforların yerini göstermek için uyarma ışığından filtrelenebilir

Floresan Boyalar

- Fluorescein isothiocyanate (FITC)
- Alexa Fluor
- Akridin orange
- Propidium Iodide
- Texas Red
- Coumarin
- Allophycocyanine
- Green fluorescent protein

Floresan Mikroskop Nedir ?

- Çoğu hücresel bileşen renksizdir ve mikroskop altında net bir şekilde ayırt edilemez
- Işık mikroskop ile görülemeyen yapıları değerlendirmede

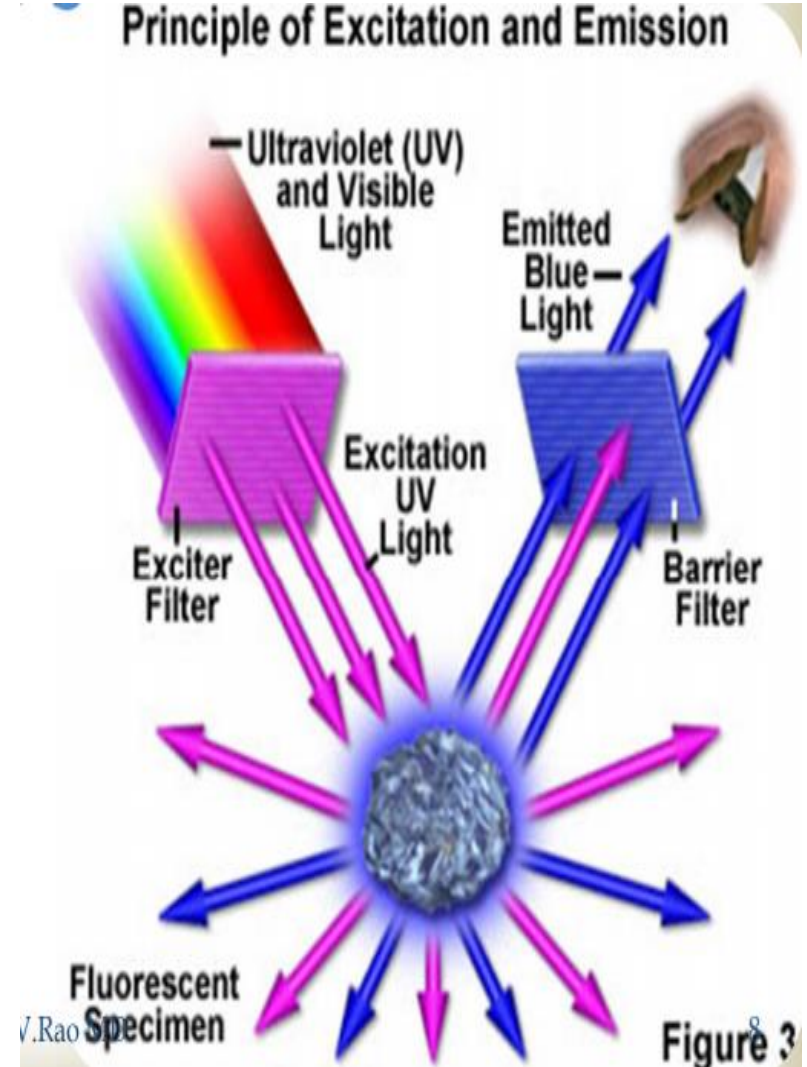


Floresan Mikroskop Nedir ?

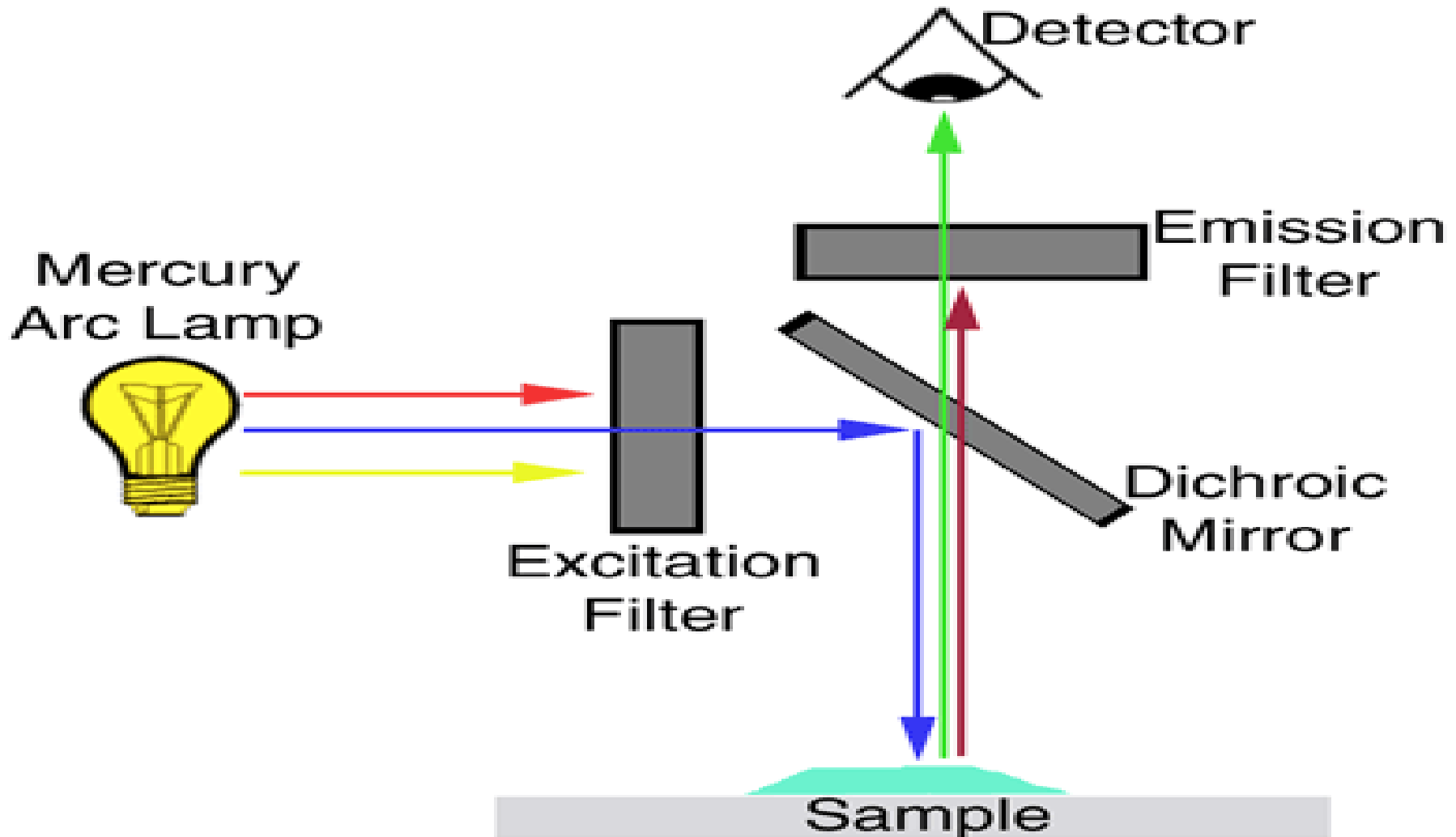
- Işık mikroskopunda, numuneler dıştan, alttan veya üstten aydınlanır ve karanlık nesneler ışıklı arka planda görülür
- Floresan mikroskopide, numuneler iç ışıkla kendiliğinden aydınlanır
- Parlak nesneler koyu renkli bir arka plana karşı canlı renkte
- Floresan mikroskobu  çok hassas ve spesifik
- Temel öncelik  belirli komponentleri floresan boyalarla boyamak

Floresan Mikroskopunun Prensipleri

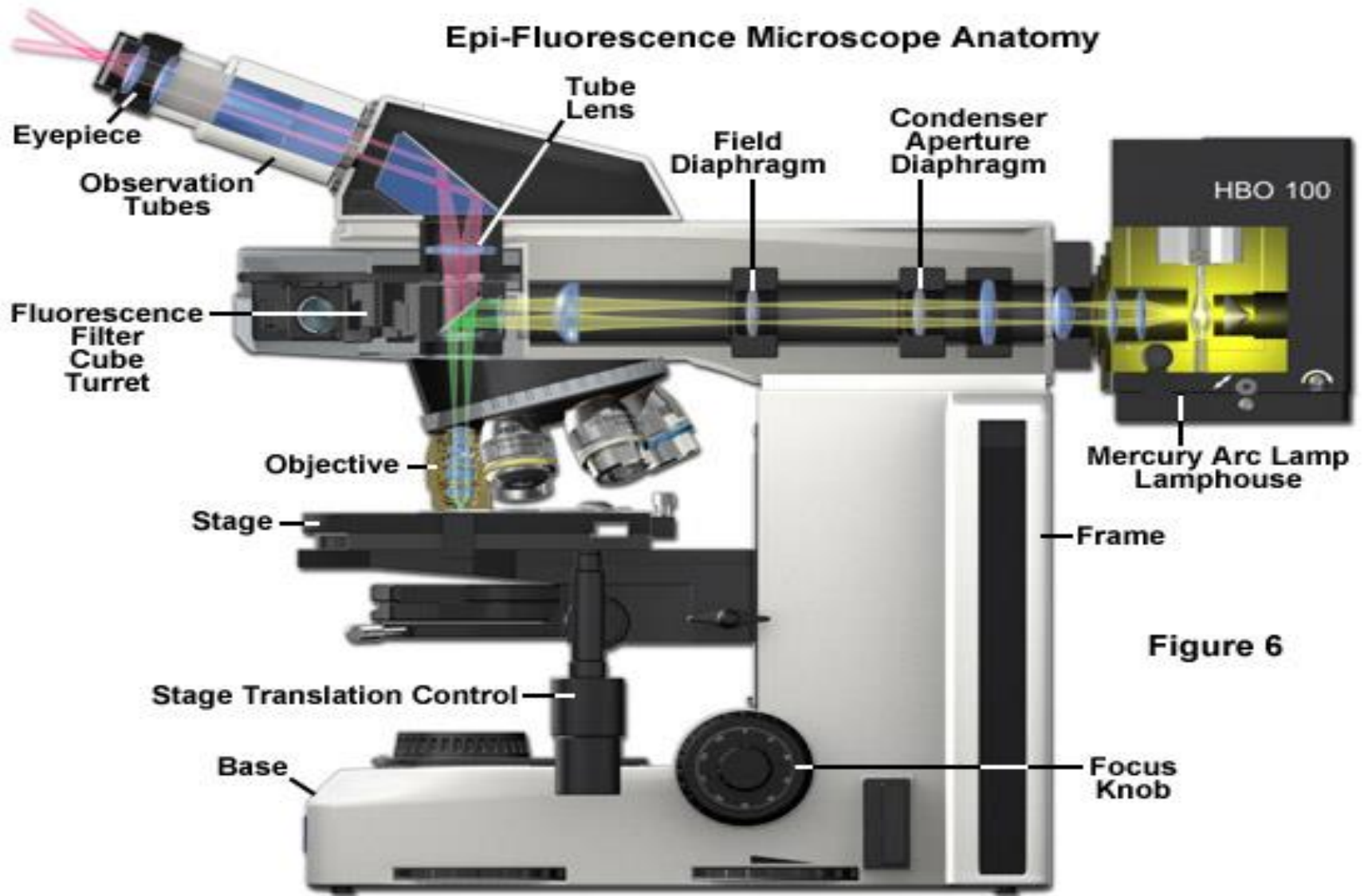
- Numuneyi aydınlatmak için çok daha yüksek yoğunlukta ışık kullanır
- Bu ışık örnekte bulunan floresan maddeleri uyarıp daha uzun bir dalga boyundan ışık yayar
- Üretilen görüntü, orijinal olarak örnek aydınlatmak ve uyarmak için kullanılan ışığa değil, ikinci ışık kaynağına veya floresan türünün emisyon dalga boyuna dayanır



Floresan Mikroskopunun Prensipleri



Floresan Mikroskopu



Floresan Işık Kaynakları

Arc-Discharge Fluorescence Lamps



Mercury HBO

Figure 5



Xenon XBO

Genellikle ultraviyole (360nm) ya da mavi ışık (400 nm)

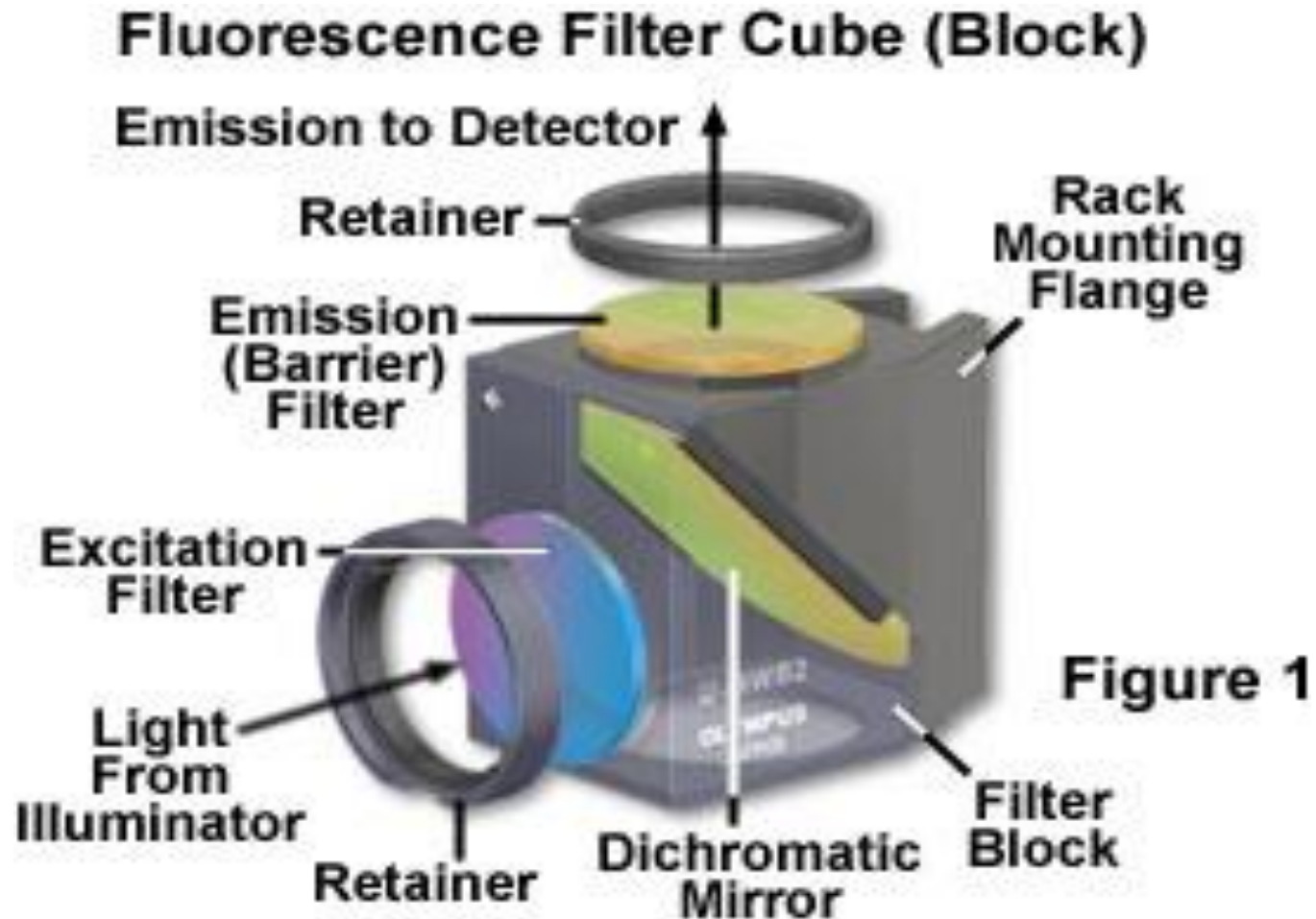
Civa buharlı lambalar, xenon gaz lambaları

Son yıllarda argon iyon ve argon-kripton (iyon) lazerler

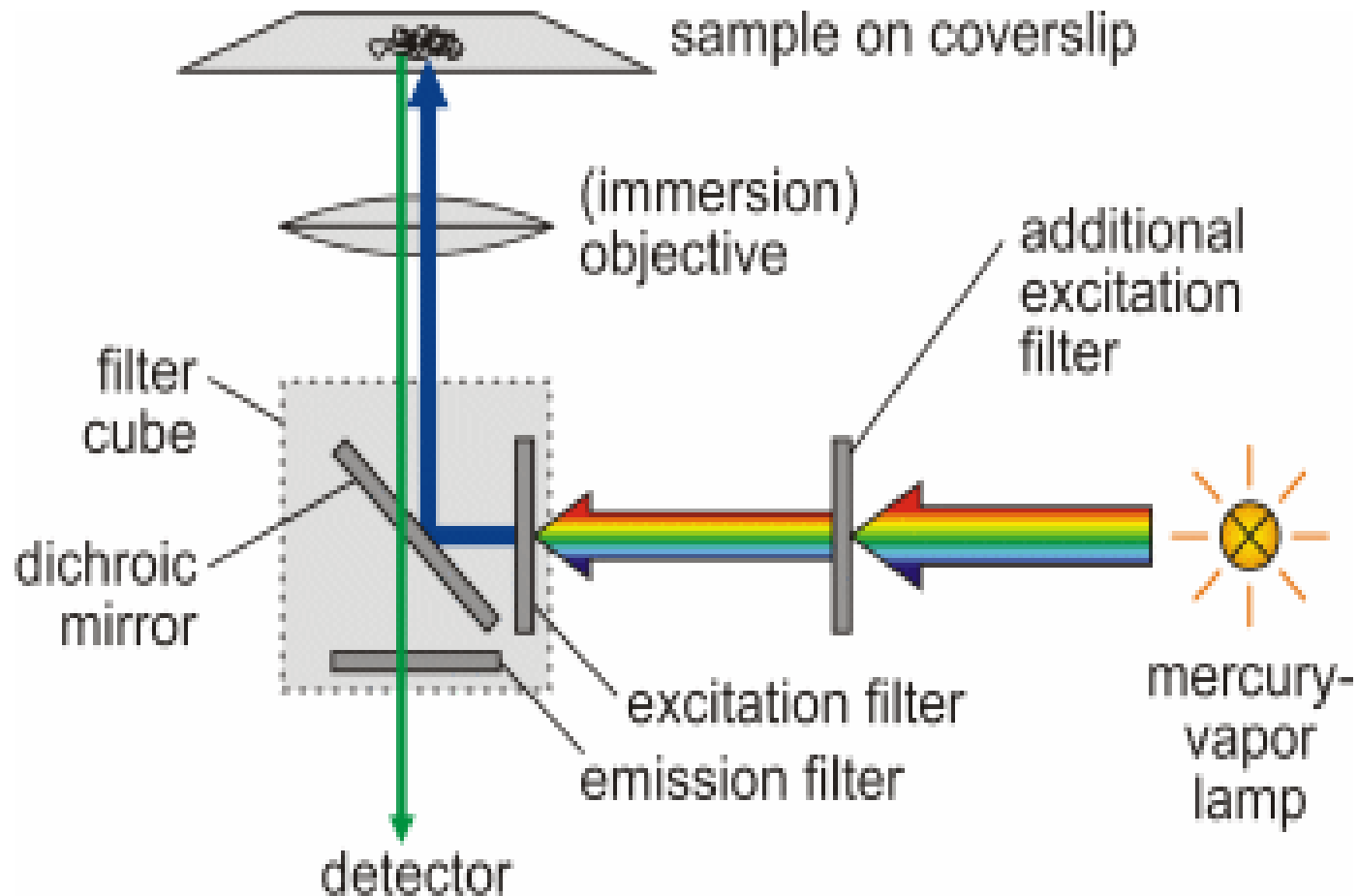
Filtreler

- Fluoresan mikroskopta kullanılan optik filtreler
 - Eksitasyon (uyarı) filtresi
 - Bariyer/ Emisyon filtresi
 - Dikroik ayna

Floresan Filtre Kübü



Floresan Filtre Kübü

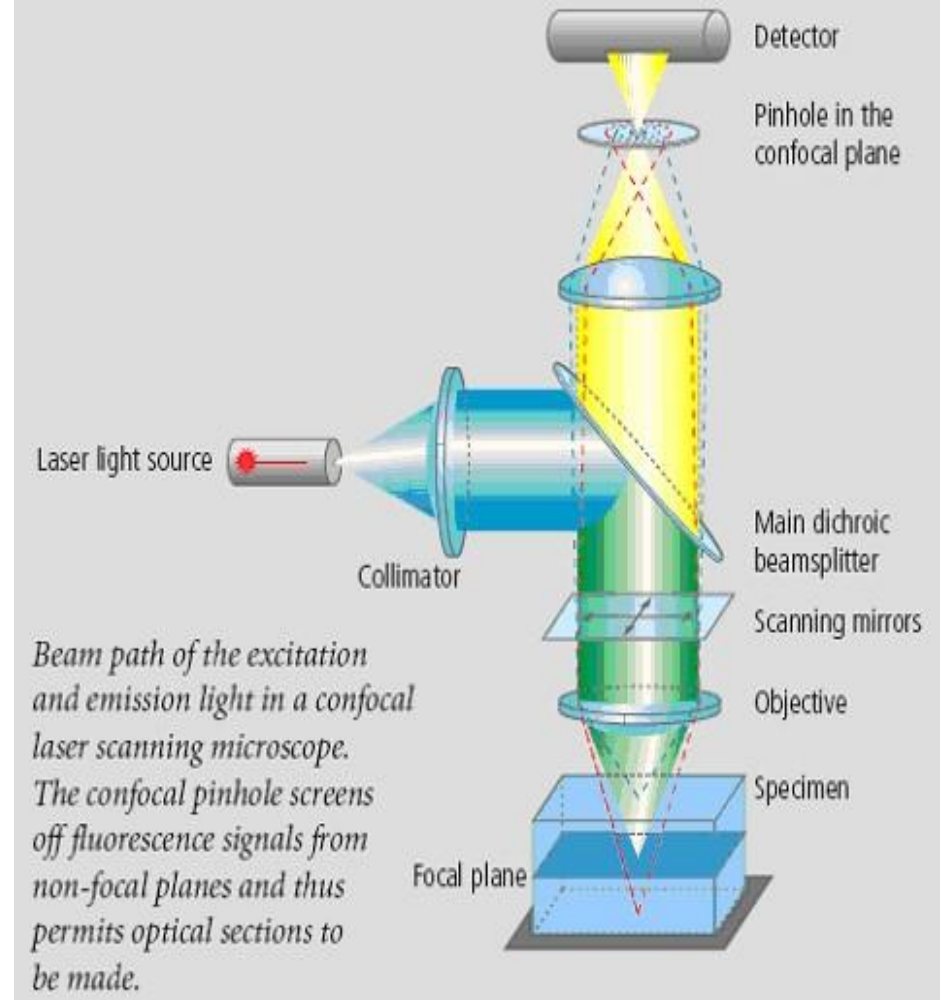


Floresan Mikroskop Çeşitleri

- Konfokal mikroskobi
- Süper rezolüsyon mikroskobi
- Light Sheet Floresan Mikroskobi vb.

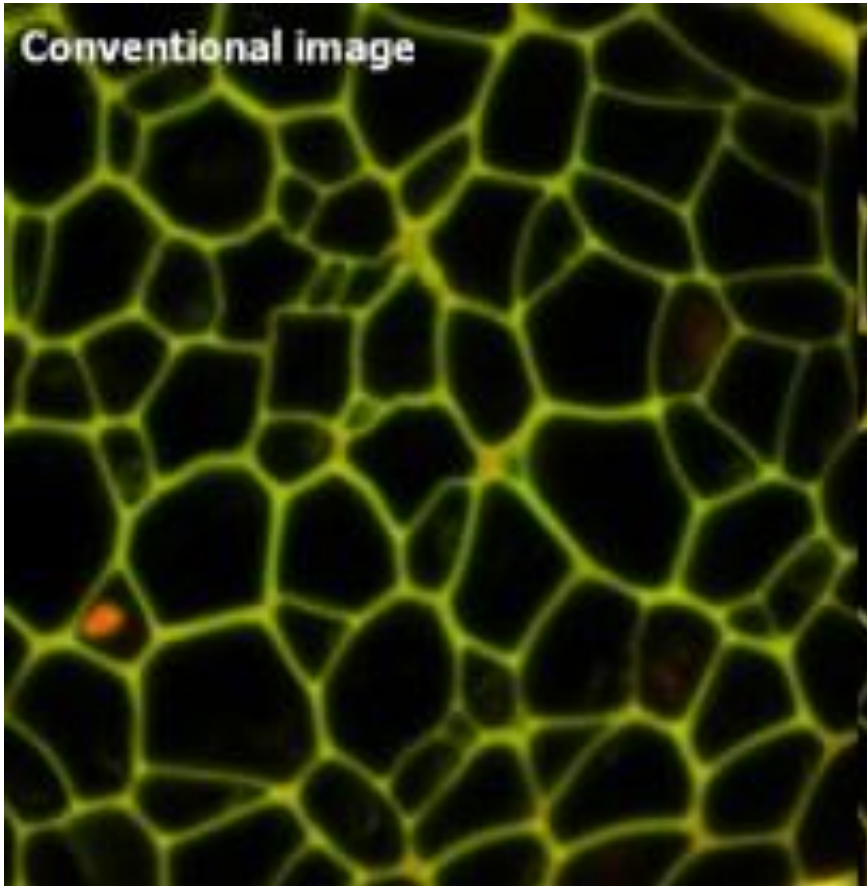
Konfokal Mikroskobi

- Floresan mikroskop görüntüsünün iyileştirilmesi → konfokal mikroskop
- Aradaki fark ; ışık kaynağı cıva lambası yerine lazer kullanımı
- Tarayıcı aynalarıyla iletilen lazer ışını numuneyi uyarır ve numune floresans sinyalini tek noktadan ve tek çizgiden floresan ışığını emisyonu ugratır
- Canlı hücrelerdeki yapısal ve moleküler dinamiklerin çalışılmasında

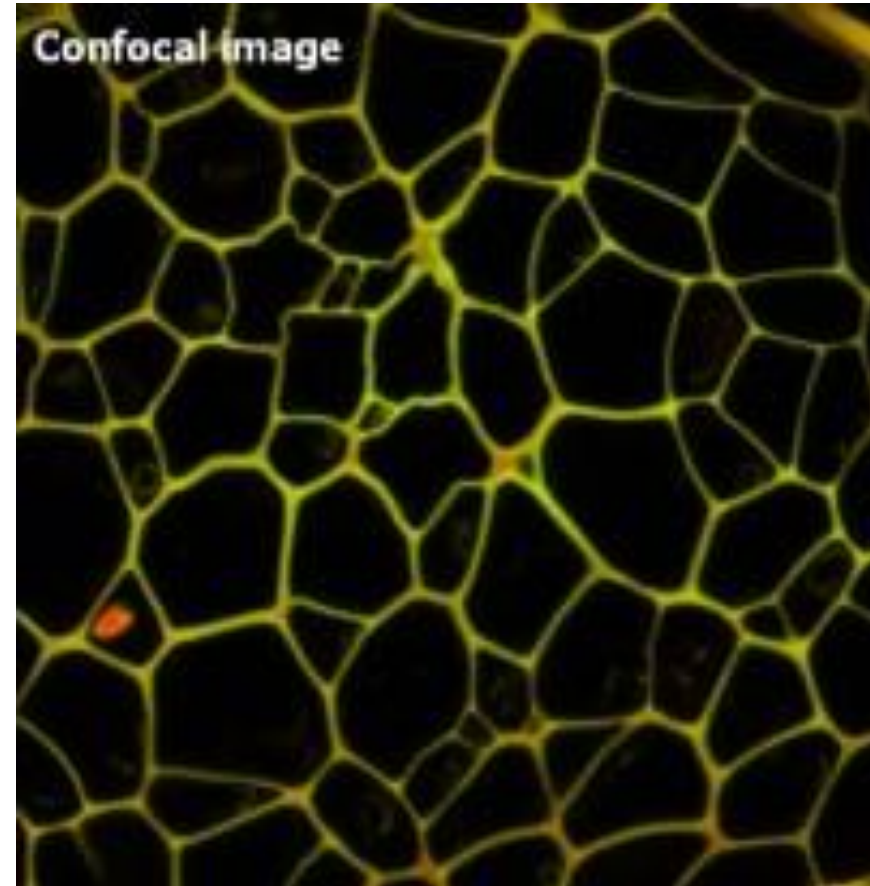


Görüntü Farklılıkları

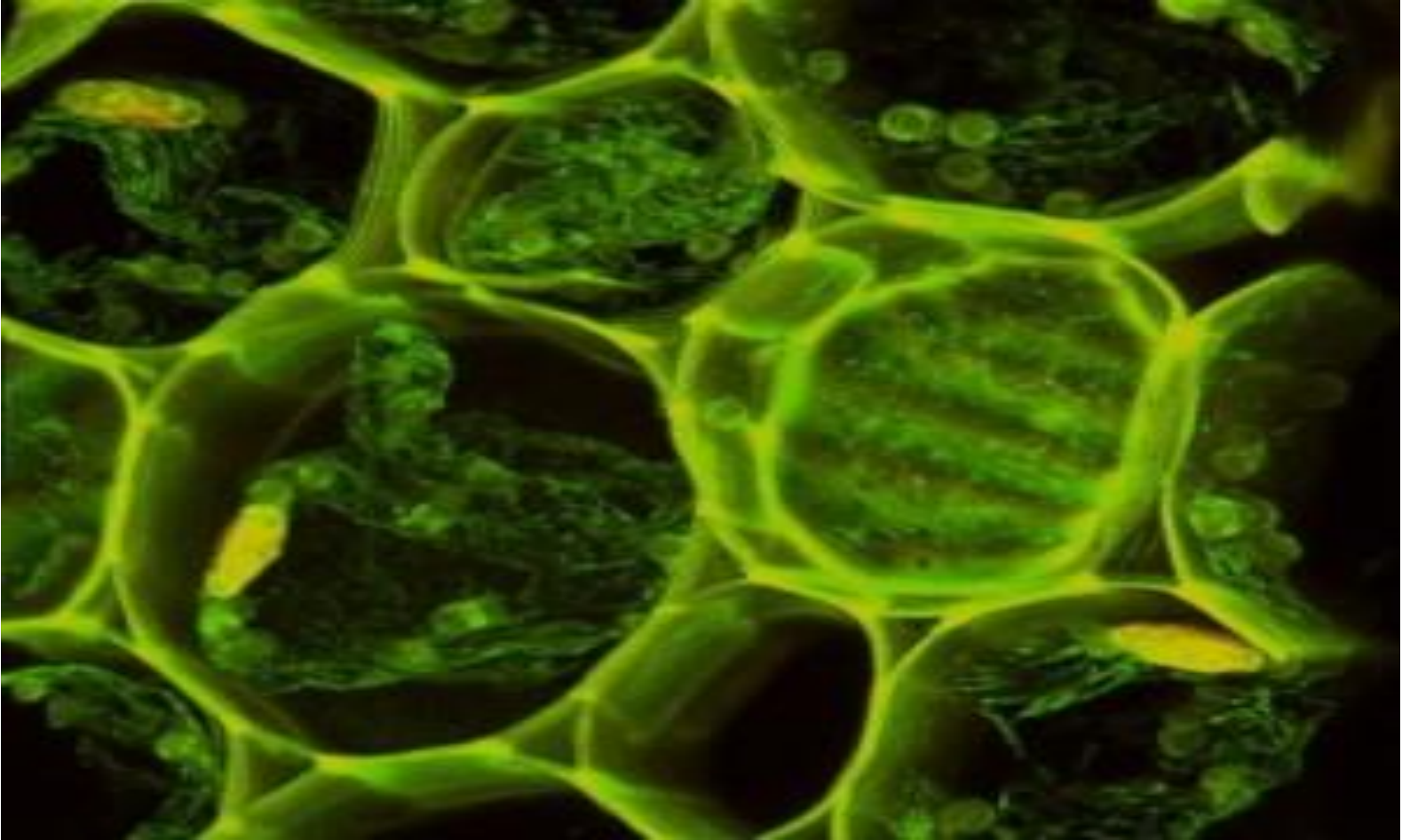
Konvansiyonel Floresan Mikroskobi



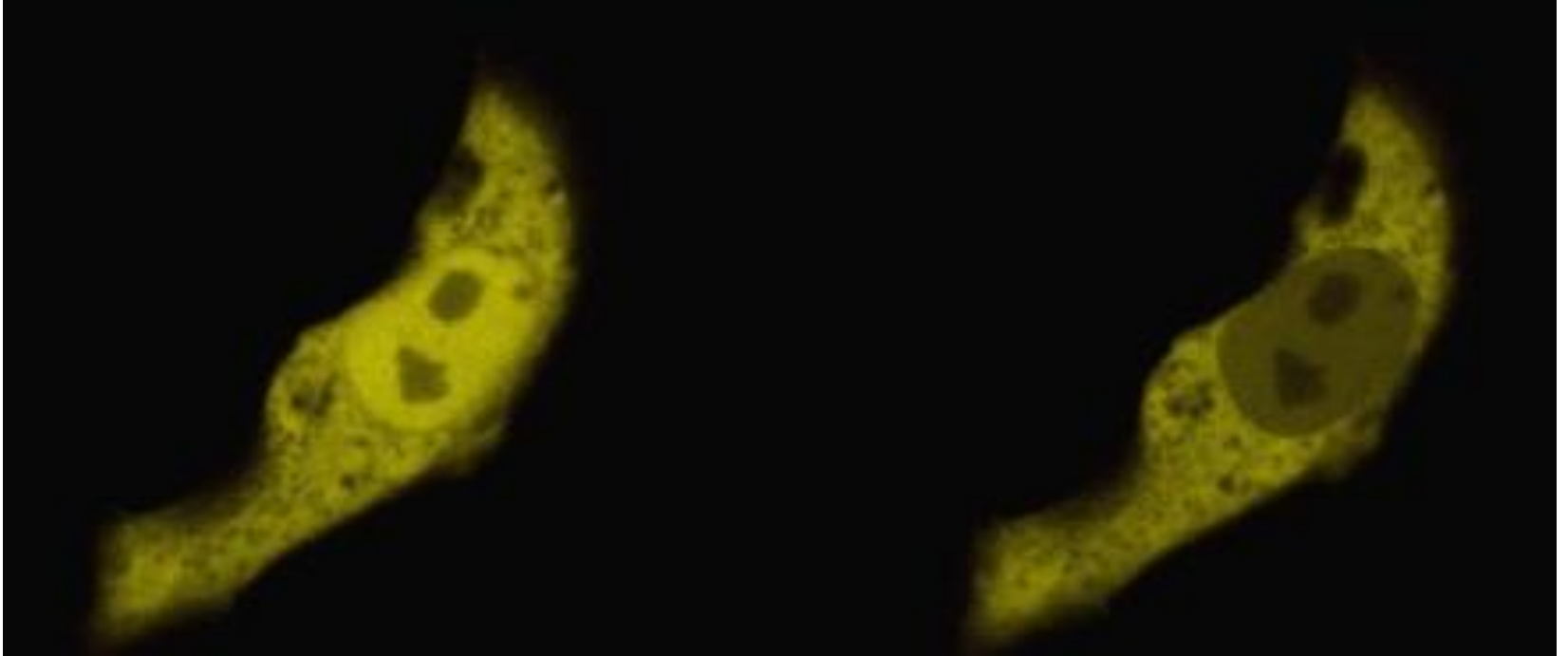
Konfokal Mikroskobi



Konfokal mikroskopi ile üç boyutlu görüntü



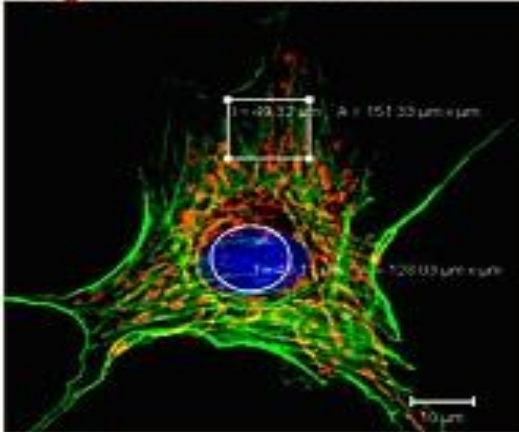
Konfokal Mikroskopi (Foto-Maniplasyon)



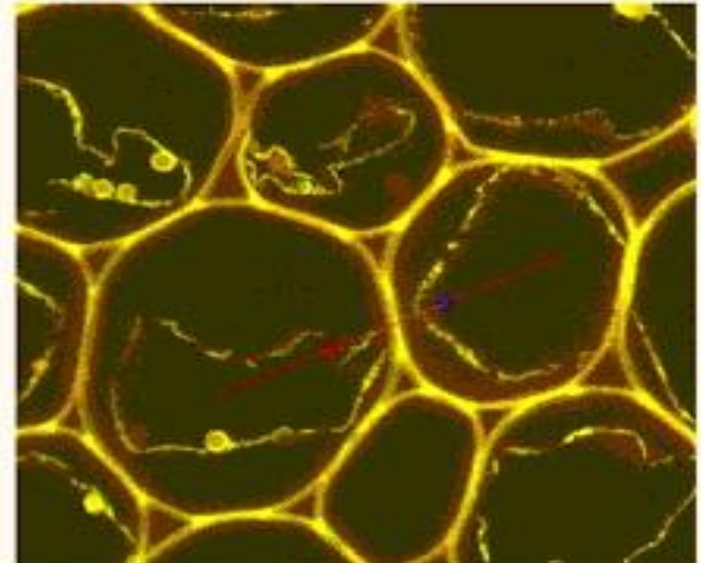
- Foto-stimölasyon programı aracılığıyla, time lapse (zaman atlamalı) bir görüntü yığını (kümesi) oluşturulabilir
- Stimölasyondan önce ve sonra yoğunluk değişiklikleri analiz edilebilir

Konfokal Mikroskobi

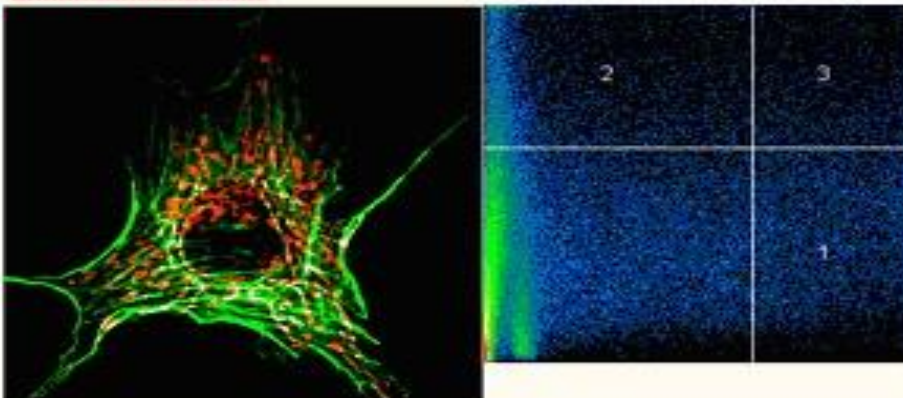
Region measurement



Profile

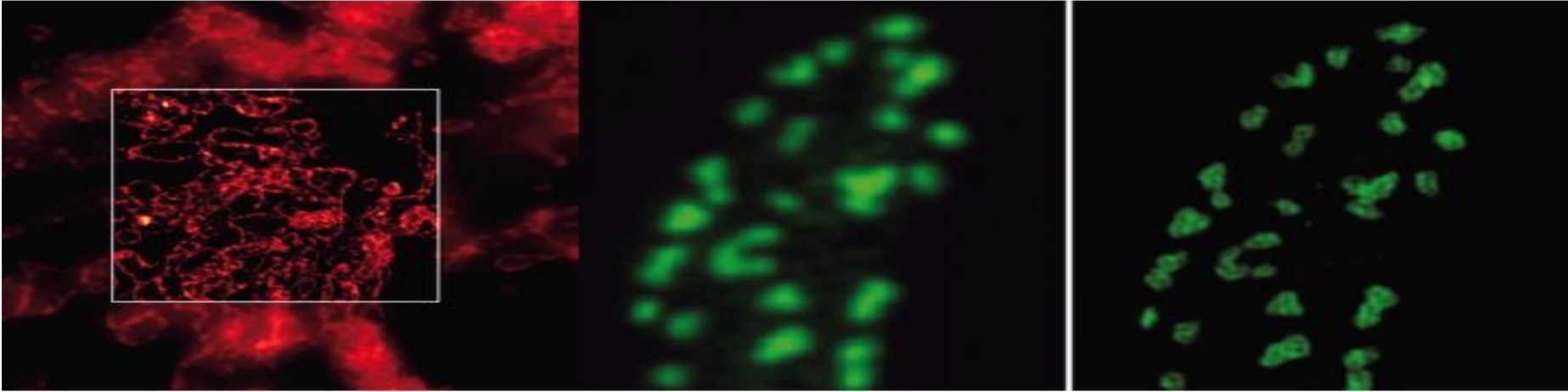
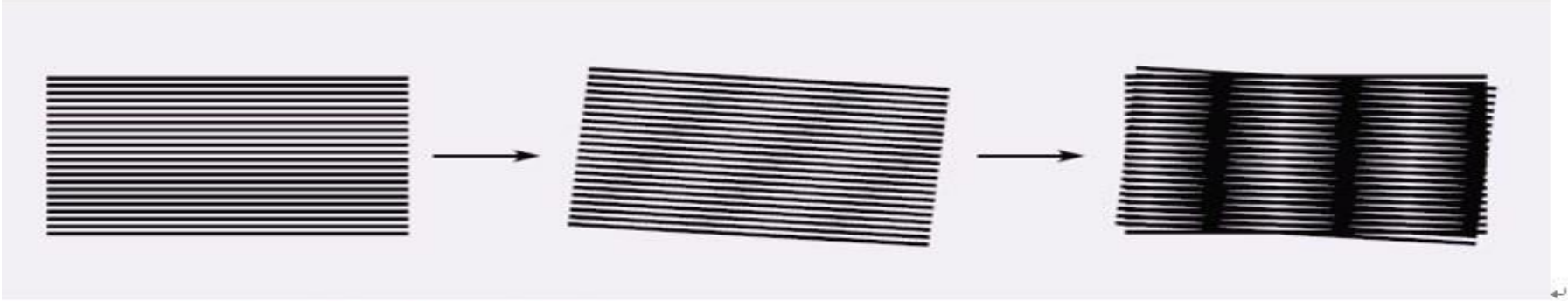


Colocalization



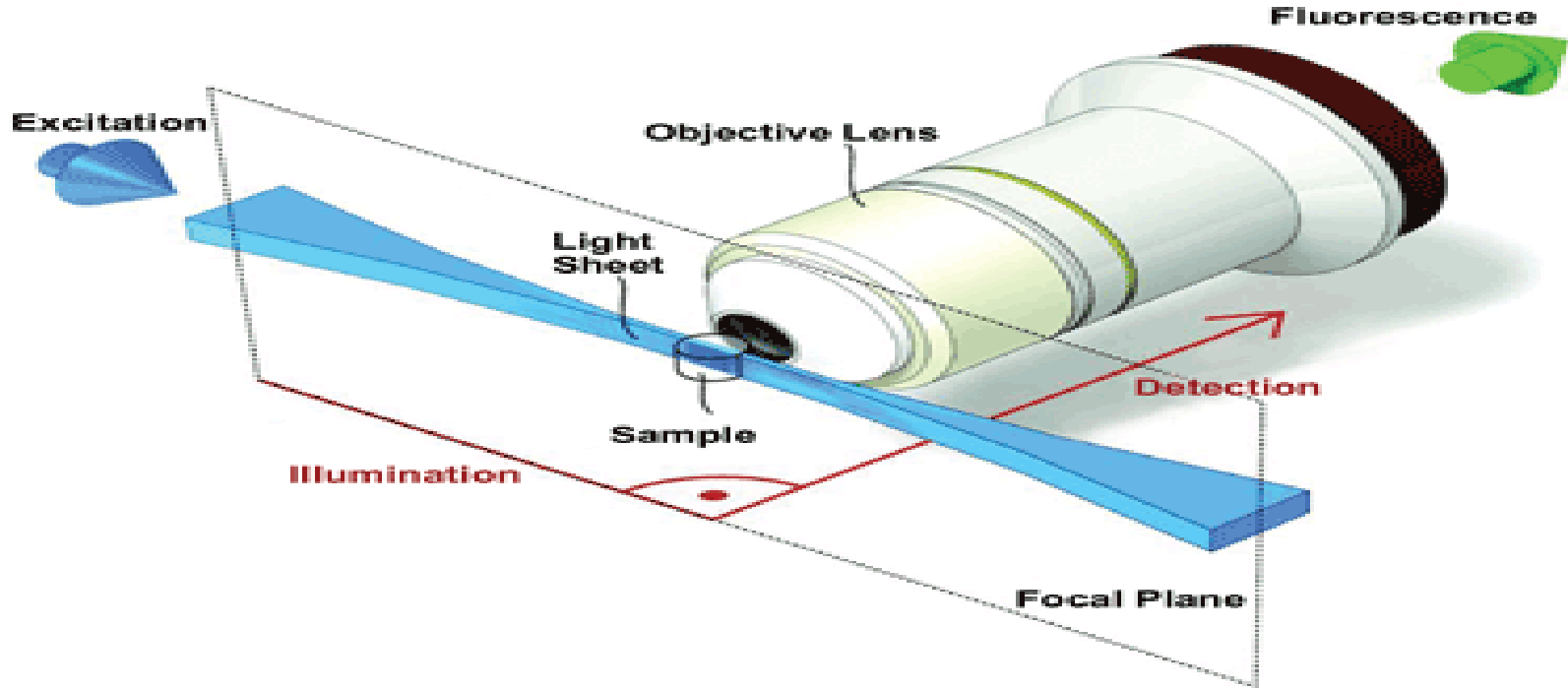
Yazılım ile belirli analizler; alan, eşik alanı, yoğunluk, histogram, profil, kolokalizasyon, FRAP, FRET vb yapılabilir

Süper Çözünürlüklü (Rezolüsyon) Mikroskop



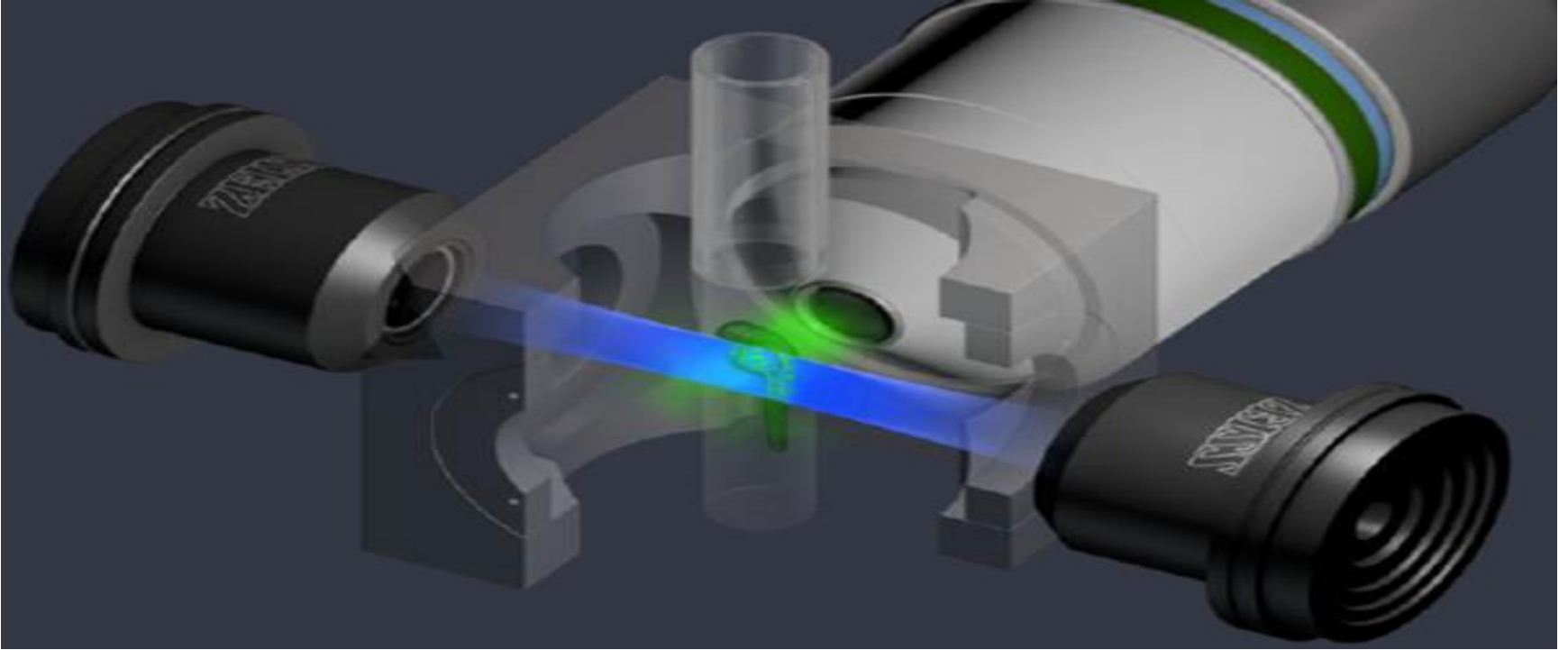
Süper çözünürlüklü görüntüleme teknikleri,
Mikroskop eksitasyon/emisyon yollarının modifikasyonu
Bilgisayar destekli görüntü analizleri

Light Sheet Floresan Mikroskobi



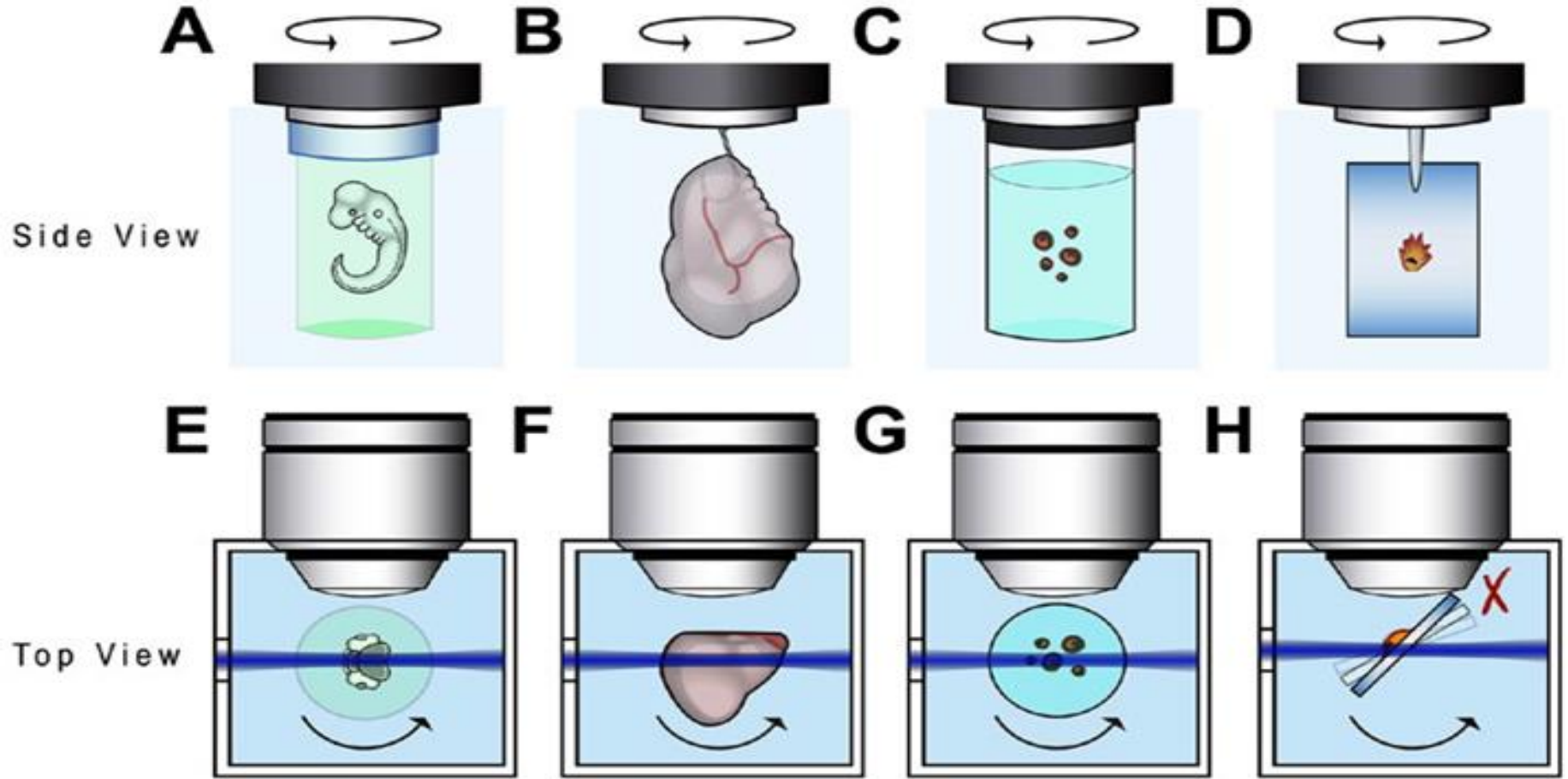
- Dokuları gözlemlemek ve optik olarak kesit alabilmek için bir ışık düzlemi kullanan bir mikroskop
- Şeffaf dokuları ve bütün haldeki organizmaları derinlemesine görüntüleme
- Zararsız bir mikrotom işlevi görüyor
- Fototoksisite en az

Light Sheet Floresan Mikroskobi



- Yatay bir uygulamadır örnek, yerçekimi eksenini boyunca asılmıştır
- Numune, bir numune tutucusuna yukarıdan takılır ve sıklıkla bir sıvı dolu bölme monte edilir
- Farklı yönlerde görüntü kaydetmesine olanak tanır

Light Sheet Floresan Mikroskobi Uygulamaları



- a) Sert jele gömülmüş b) Objektif önüne tutulmuş ve yerleştirilmiş
c) Taşıyıcı içine yerleştirilmiş
d) Slayt üzerine yerleştirilmiş 45 °C açıyla konumlandırılmıştır

Floresan Mikroskopu

- Dokulardaki ve serumlardaki antijen ve antikorların gösteriminde
- İmmünofloresan Yöntemler
 - Direkt İmmünofloresan Yöntemi
 - İndirekt İmmünofloresan Yöntemi

Direkt İmmünofloresan Yöntemi

- Klinik örnekte antijen tespiti yapılır
- Örnek kalitesi ne kadar iyi ise (uygun yerde, uygun zamanda, uygun miktarda hücre içerecek şekilde) yöntemin duyarlılığı o kadar yükselir

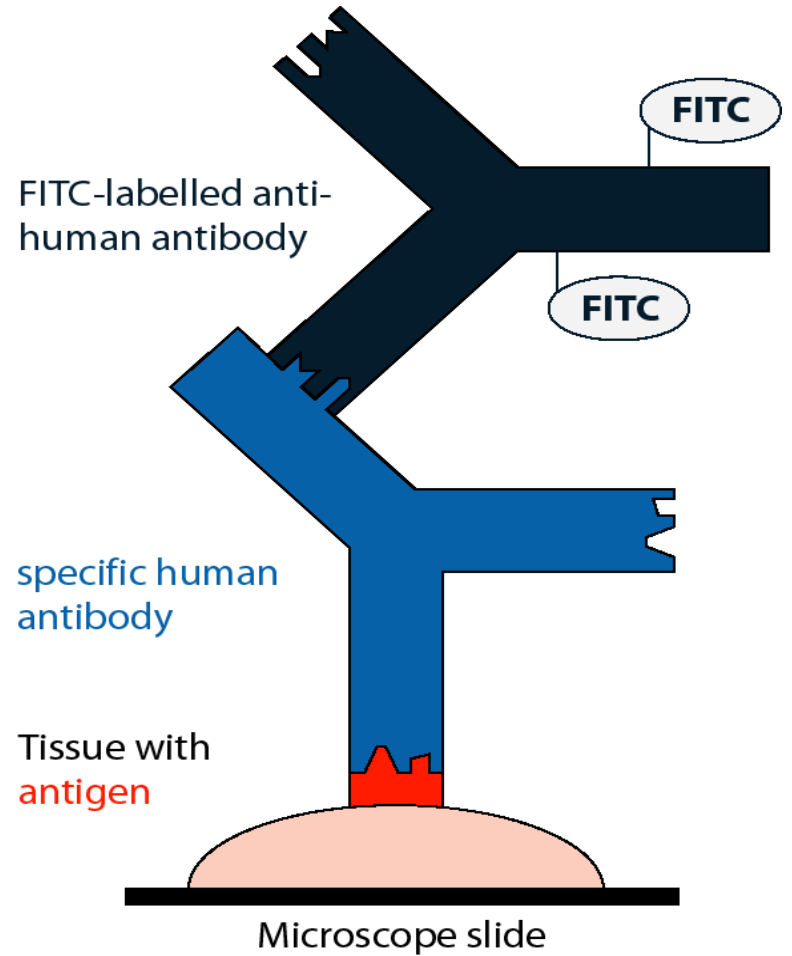
Direkt İmmünofloresan Yöntemi

- Alınan örnek lam üzerine yayılır ve metil alkol ya da aseton ile tespit edilir
- Daha sonra üzerine FITC ile işaretli özgül antikor (konjugat) eklenir
- 30 dak 37°C'de inkübe edilir
- Bu süre sonunda preparat üzerindeki boya dökülür, fosfatlı tampon (PBS) ile yıkanır ve gliserol (mounting medium) damlatılarak lamel ile kapatılır
- Floresan mikroskopta 10X ya da 40X objektif ile incelenir

İndirekt İmmünofloresan Yöntemi

- Hasta serumunda antikor tespiti yapılır
- Burada kullanılan lamlar, üzerine istenilen antiijenlerin (bakteri süspansiyonu, virüsle enfekte hücre, doku kesiti, vb) fikse edilmesiyle hazırlanır
- Hasta serumu örnekleri bu lamlar üzerindeki özel alanlara damlatılır ve inkübe edilir
- Fosfatlı tampon (PBS) ile yıkama işleminden sonra FITC işaretli anti-insan antikor (konjugat) eklenir
- Tekrar inkübasyon ve yıkama işlemleri yapılır
- Preparatın kuruması beklenmeden gliserol damlatılarak lamelle kapatılır ve incelenir

İndirekt İmmünofloresan



Floresan Mikroskop Nasıl Kullanılır?

- Örnekler floresan molekülleri ile işaretlenir



1. Adım

- Mikroskop ışığı açılır
- Işığın açıldığı zaman kaydedilir
- Floresan ışık cıva bazlı olduğu için ışığın açığa çıkması ve ışığın kullanımı için bir süre beklenir



2. Adım

- Mikroskopun sağ tarafında oküler ve objektifler arasında bulunan geğiş düğmesini bulun
- Bu anahtar, objektif merceklerine cıva ışığının geğişini kontrol eder



3. Adım

- Değerlendirilecek lam, kiskaçlar açılarak lam taşıyıcı tablasına konur
- Kiskaçlar yavaşça bırakılarak lamın tabla üzerinde sabitlenmesi sağlanır



4. Adım

- Kullanılacak olan objektif, objektif taşıyıcı ünitesinin çevrilmesiyle değerlendirilecek olan lamın üzerine getirilir



5. Adım

- Binoküler olan mikroskopun okülerlerini yüz yapısına göre ayarlayarak değerlendirmeye başlayabilirsiniz



6. Adım

- Değerlendirme esnasında görüntü netliğini sağlayabilmek için mikroskobun her iki tarafında bulunan mikro ve makro vidaları kullanınız



7. Adım

- Değerlendirdiğiniz lam üzerinde farklı alanlara bakabilmek için tablanın altında bulunan hareket vidalarını kullanarak, lamınızı dört yöne hareket ettirebilirsiniz



8. Adım

- Bitirince ışığı kapatın ve zamanı kaydedin
- Işığı tekrar açmadan önce 30 dakika beklemeniz gerekli



Otoimmün Hastalıkların Serojik Tanısı

- Konağın kendi antijenlerine yanıtırsızlık halinin (self tolerans bozulması) ve kendi antijenlerine karşı hücrese ve /veya humoral immün yanıt oluşturmalarına "otoimmünite"
- Bu olay sonucu meydana gelen doku zedelenmesi v.b gibi patolojilerle seyreden klinik hastalıklara da "otoimmün hastalıklar (OIH) denir

Otoimmün Hastalıklar

1. Organa özgül
2. Organa özgül olmayan

Otoimmün Hastalıklar

1. Organa özgül otoimmün hastalıklar

Belirli bir organ/dokunun antijenlerine karşı immün yanıt oluşur

- Hashimoto tiroidi, Graves hastalığı: Tiroid
- Pernisiyöz anemi: Mide
- Myastenia gravis: İskelet veya kalp kasları
- Tip I Diabetes mellitus: Pankreas
- Addison Hastalığı: Adrenal bezler
- Goodpasture hastalığı: Böbrek

Otoimmün Hastalıklar

2. Organa özgül olmayan (sistemik) otoimmün hastalıklar

Bir çok organ/dokunun (böbrek, deri, eklemler, kas, akciğer, kalp, gastrointestinal sistem, sinir sistemi antijenlerine karşı immün yanıt oluşur

- Romatoid artrit (RA)
- Sistemik lupus eritematosus (SLE)
- Karışık Bağ Dokusu Hastalığı (MCTD)
- Skleroderma
- Sjögren sendromu

Otoantikörler

- Organa özgül ya da özgül olmayan otoimmün hastalıklar sırasında çok sayıda otoantikör oluşur
- Bu otoantikörler IgG sınıfındadır
- Otoantikörler klinik immünolojide "marker" olarak kullanılır
- Otoantikör saptanmasında en sık kullanılan yöntemlerden birisi immünofloresan'dır

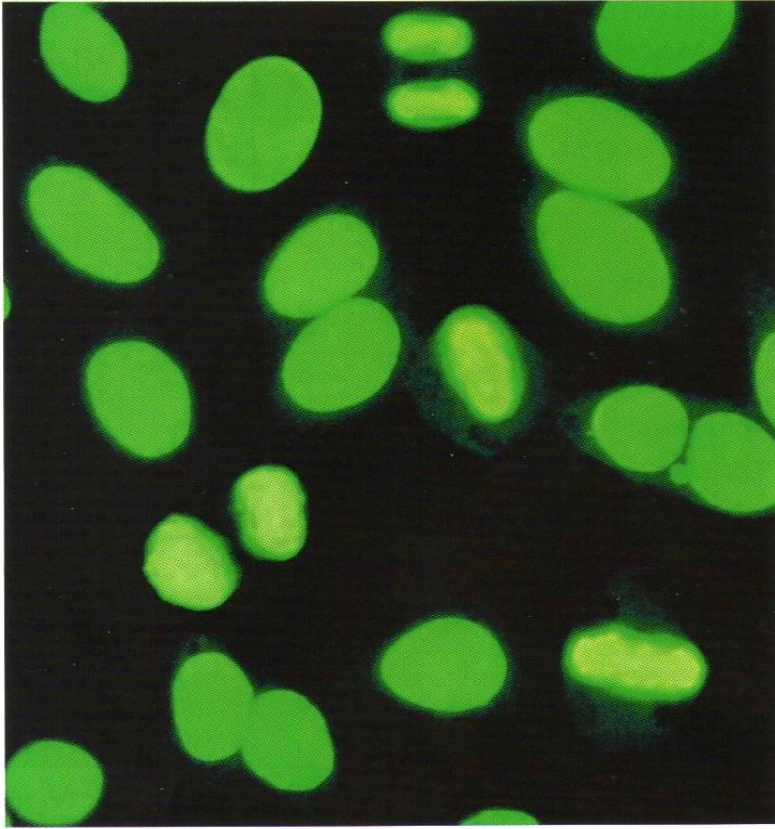
Otoantikörler

- Hücre yapılarına karşı
 - Anti-nükleer antikor (ANA)
 - Anti-mitokondriyal antikor (AMA)
 - Anti-DNA antikoru
 - Anti-sitoplazmik antikorlar
- Hücre yüzey reseptörlerine karşı
 - Tiroid stimüle edici hormon (TSH)
 - Reseptör antikorları
 - Asetil kolin reseptör antikorları
 - İnsülin reseptör antikorları

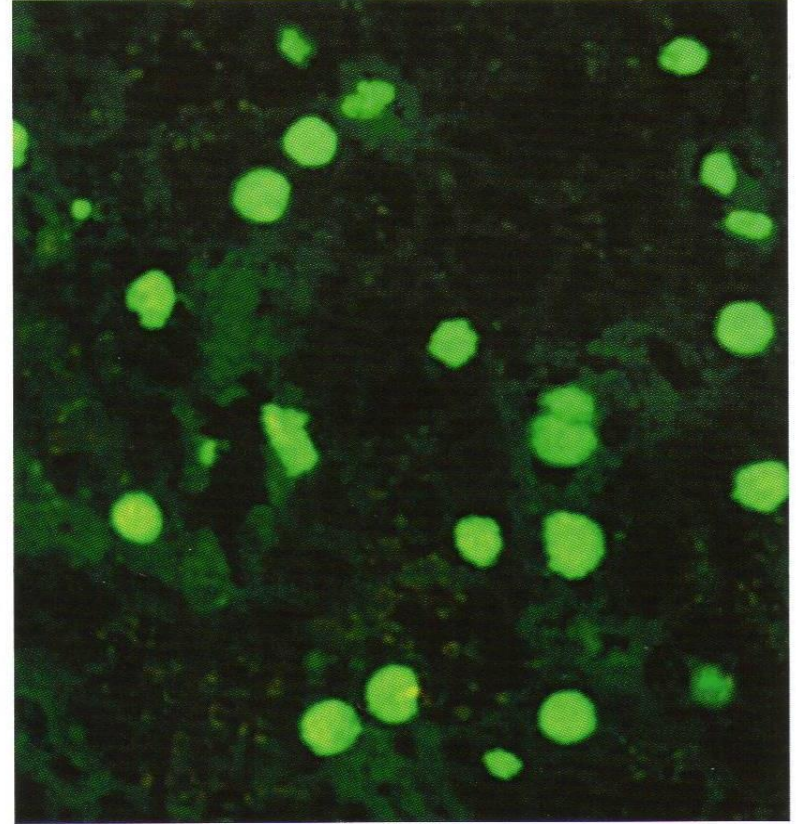
Otoantikörler

- Hormonlara karşı
 - İntrinsik faktör antikörleri
 - Tiroid hormon antikörleri
- Doku antijenlerine karşı
 - Anti düz kas antikörleri (ASMA)
 - Anti-mide paryetal hücre antikörleri (APA)
 - Anti-mikrozomal antikörler (LKM)

Homojen Boyanma (ANA)

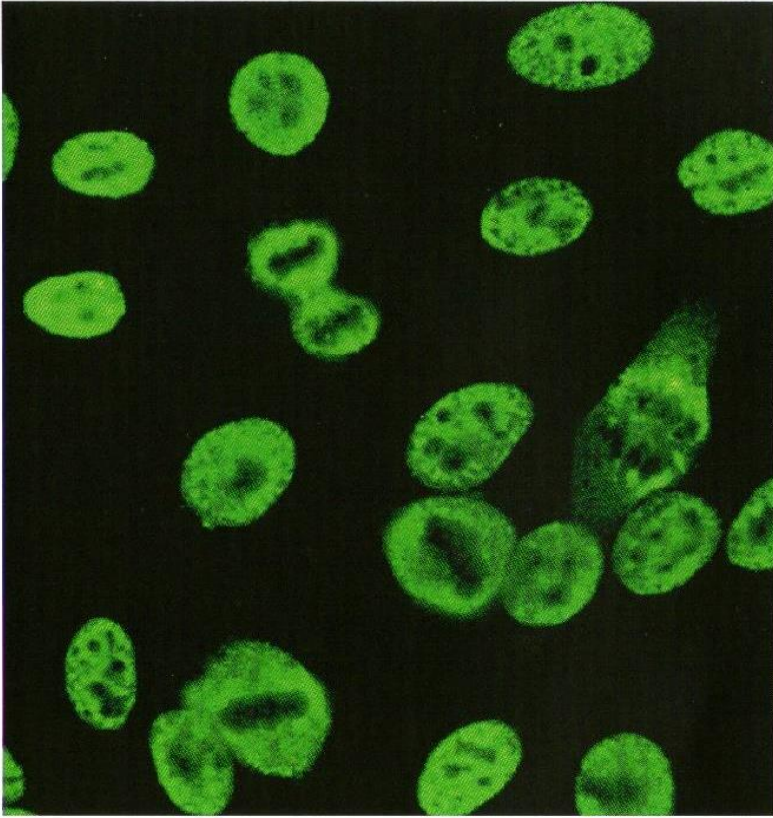


Hep-2 Hücresi

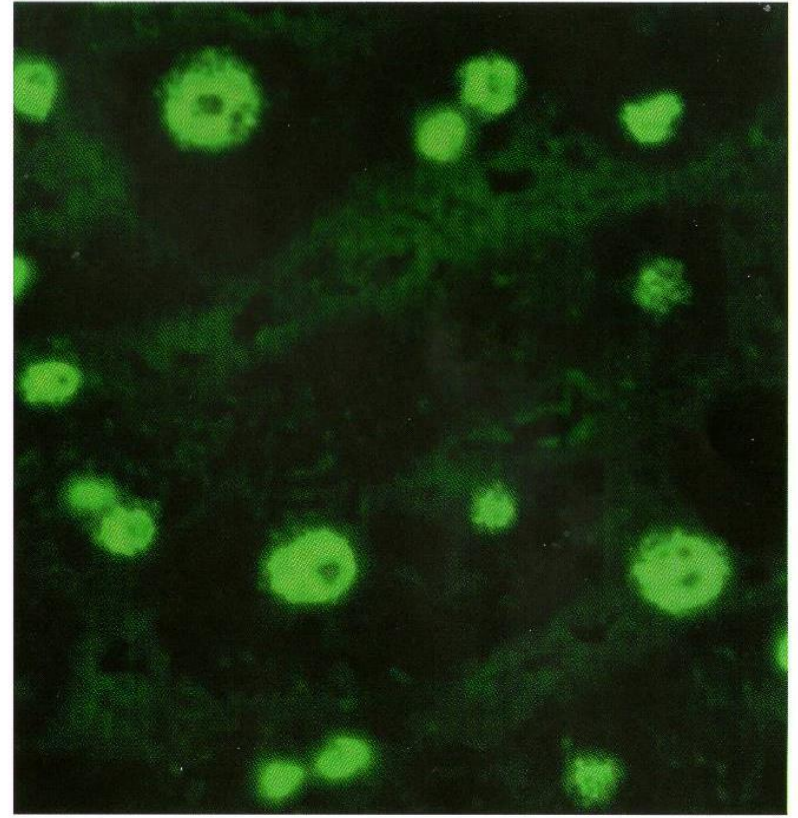


Maymun Karaciğeri

Granüler Boyanma (ANA)

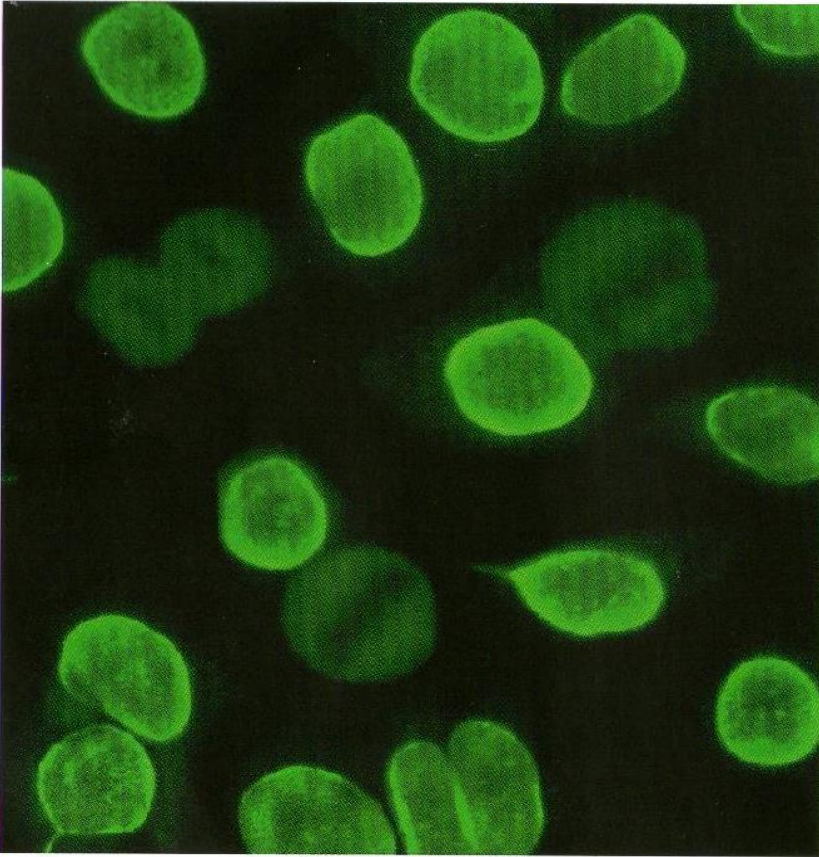


Hep-2 Hücresi

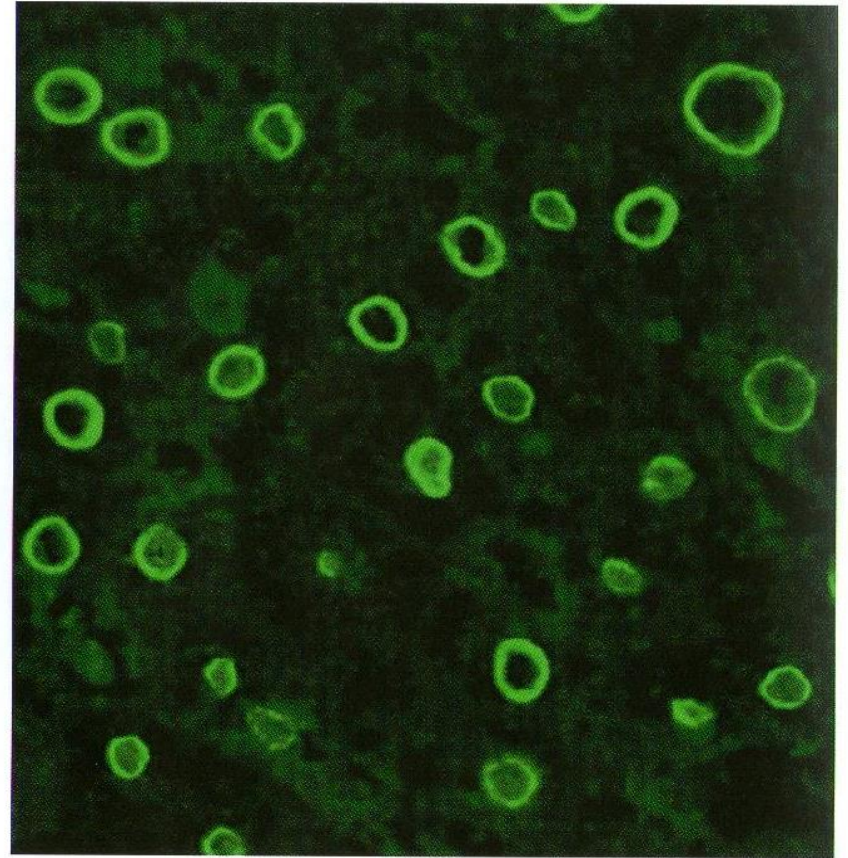


Maymun Karaciğeri

Periferal Boyanma (ANA) (Anti n kleer Membran Ab)

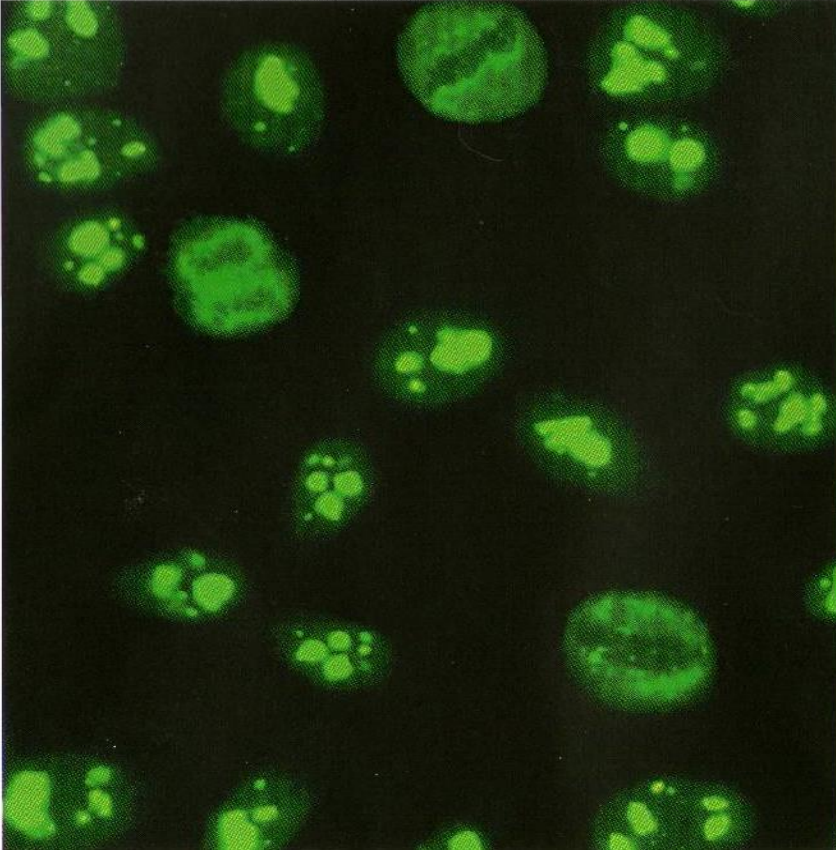


Hep-2 Hücreleri

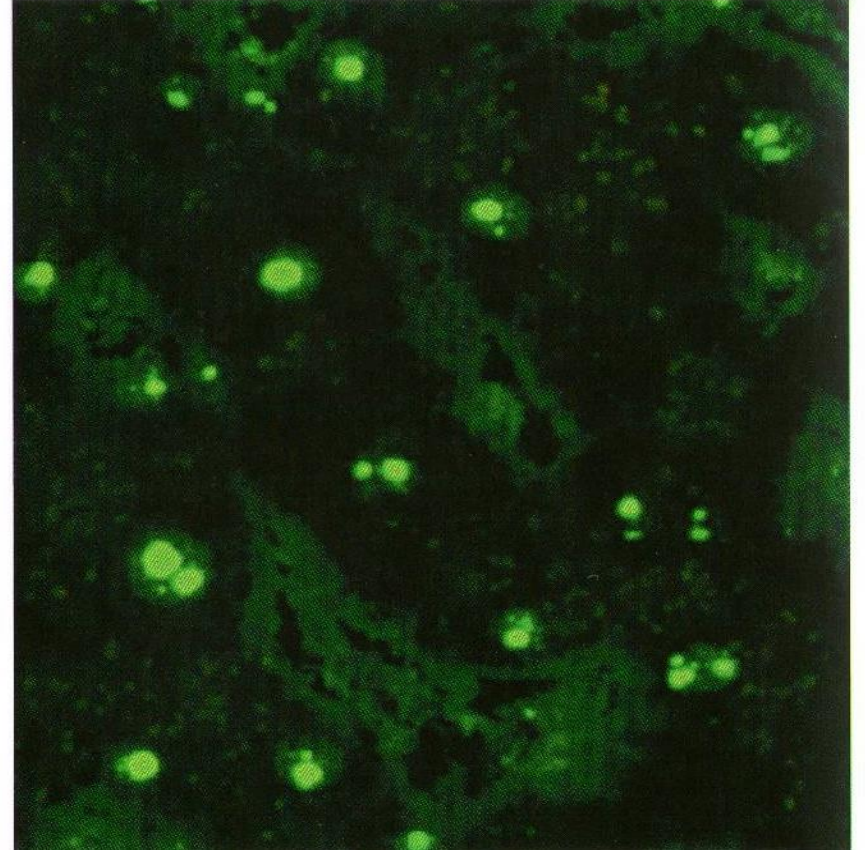


Maymun Karaciğeri

Nükleolar boyanma (ANA)

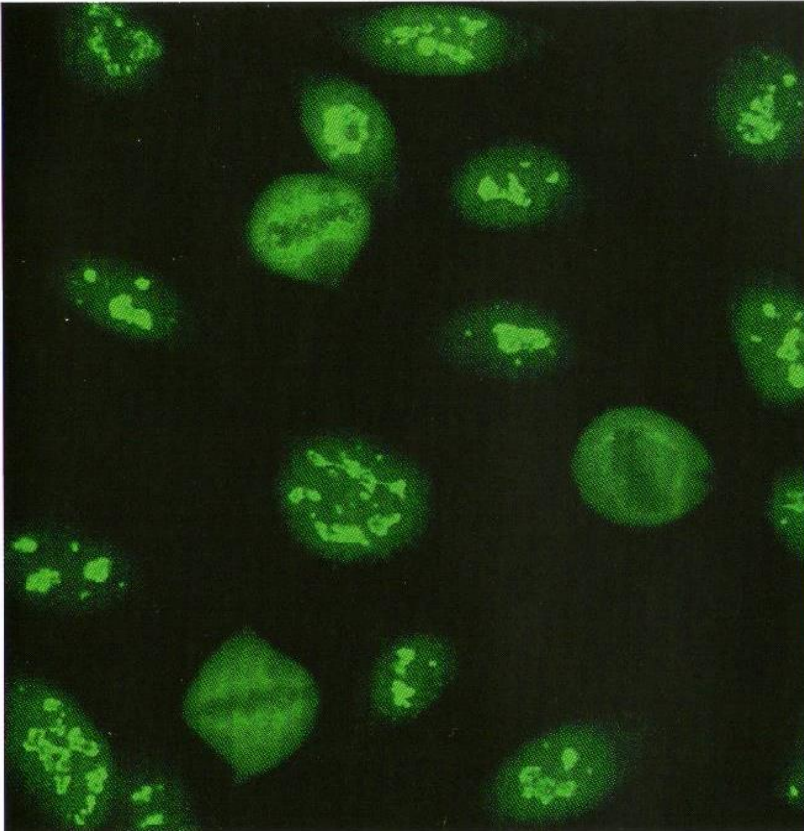


Hep-2 Hücreleri

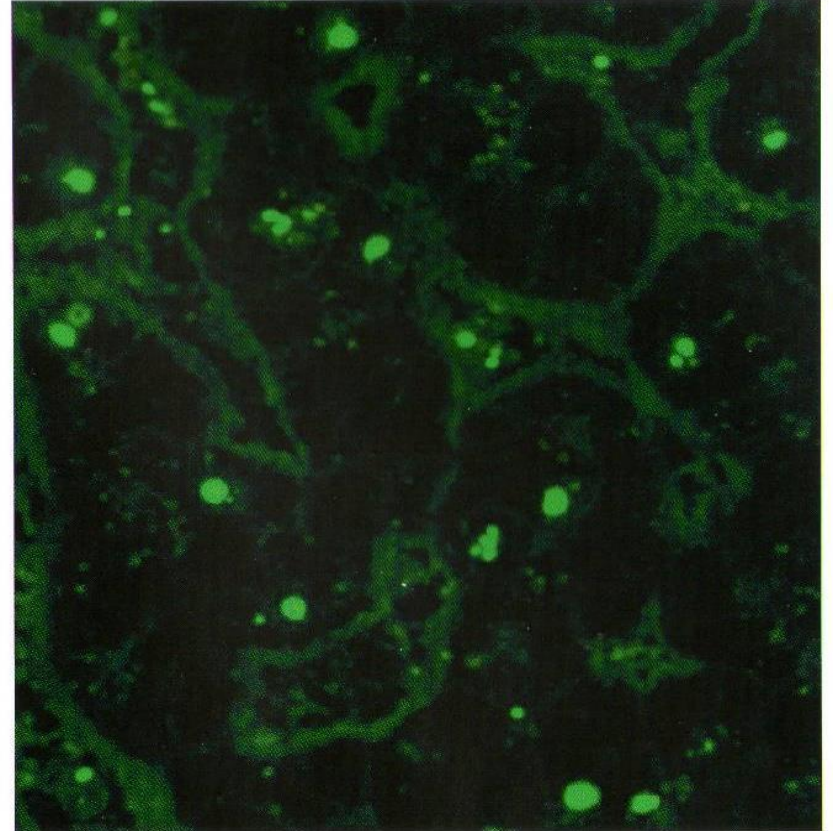


Maymun Karaciğeri

Nükleolar boyanma (ANA) RNA polimeraz-1

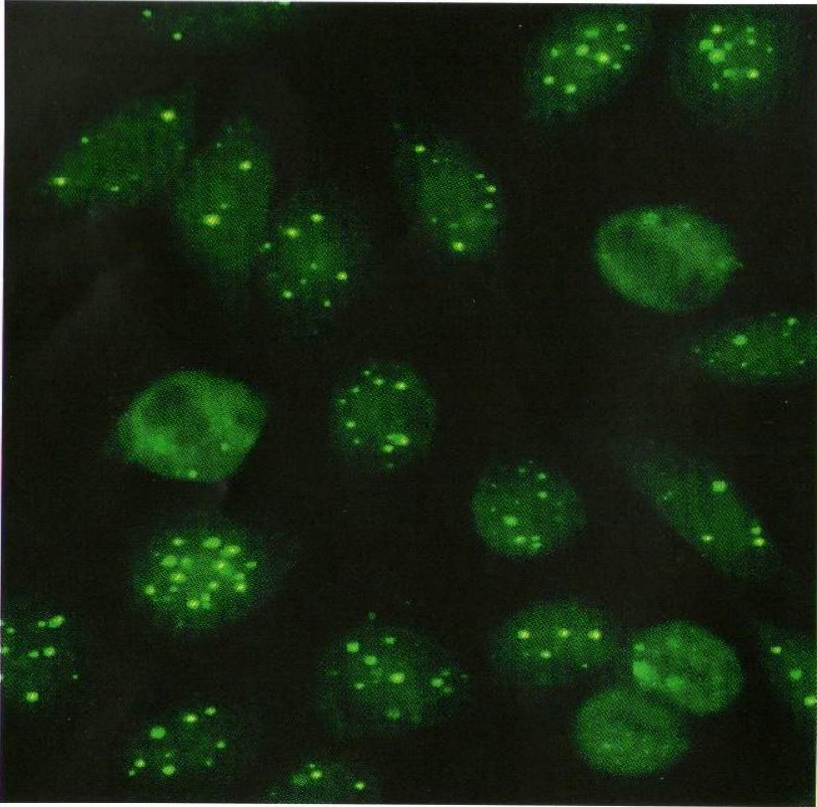


Hep-2 Hücreleri

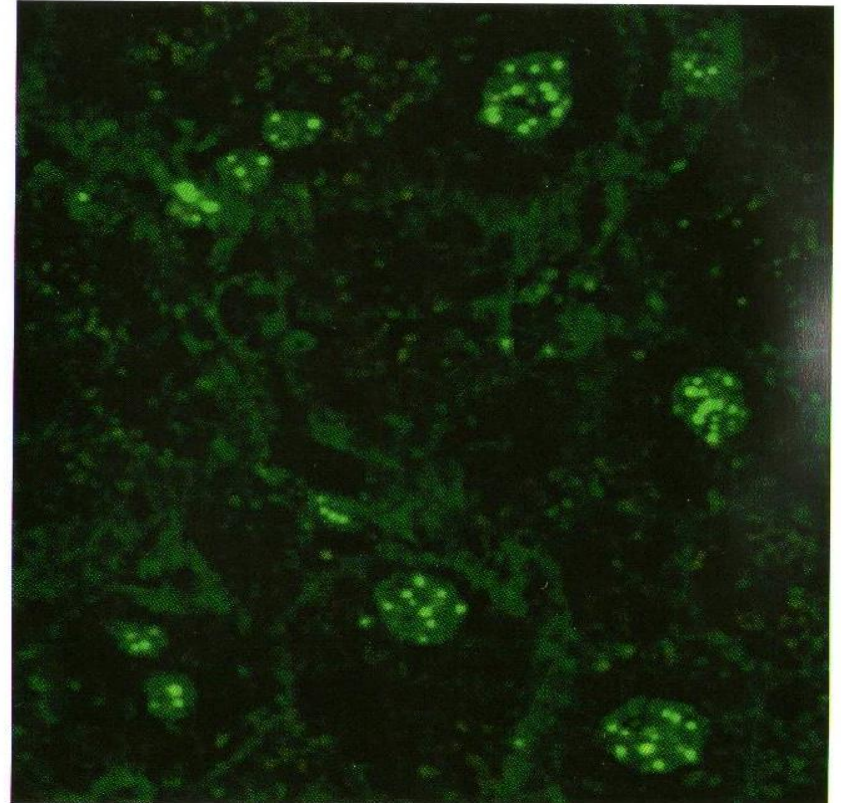


Maymun Karaciğeri

Nükleer dots (ANA)



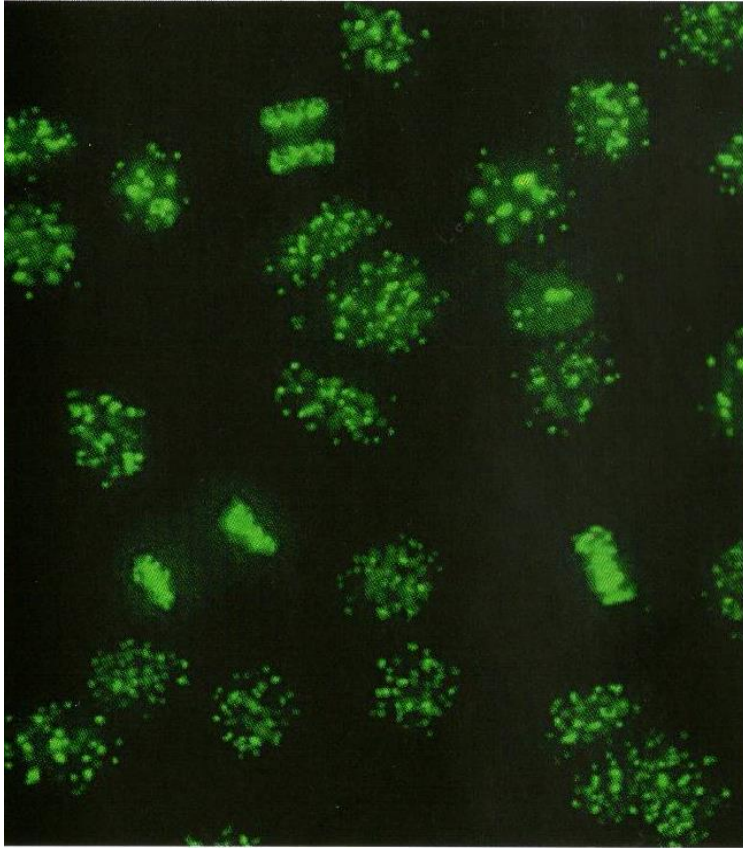
Hep-2 Hücreleri



Maymun Karaciğeri

Nükleer dots (ANA)

Anti Sentromer Antikor

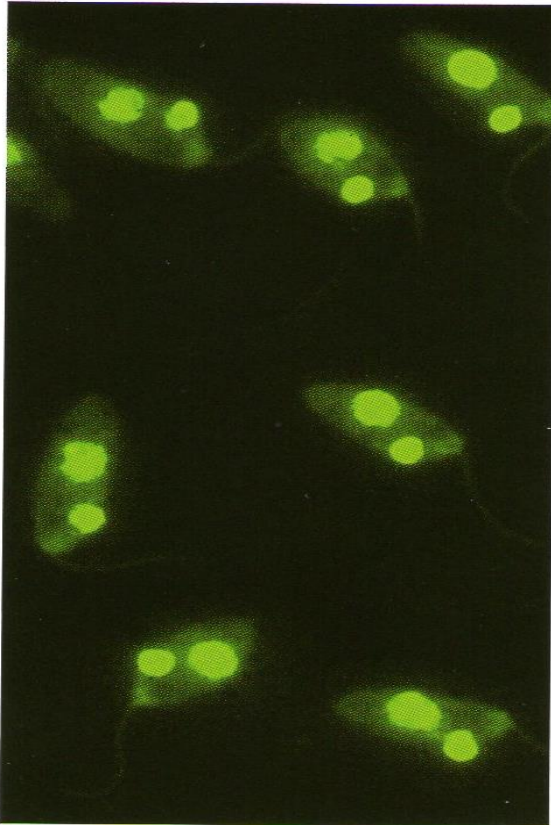


Hep-2 Hücreleri

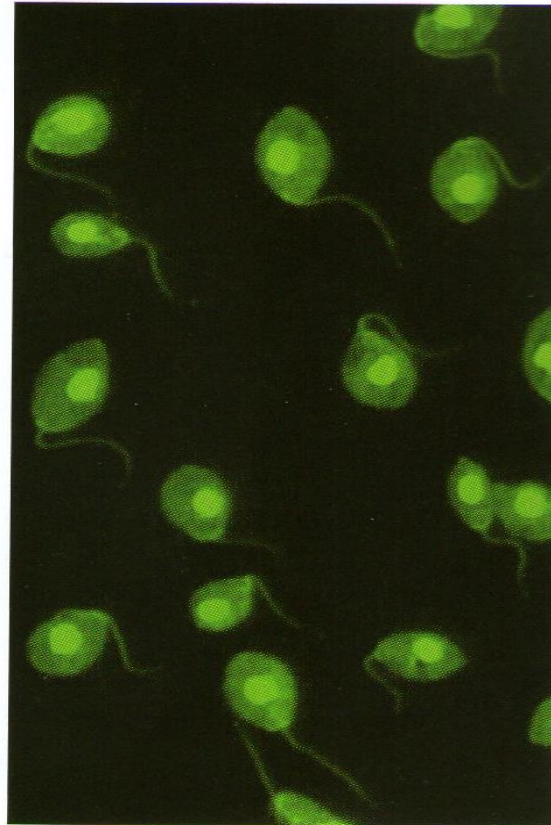


Maymun Karaciğeri

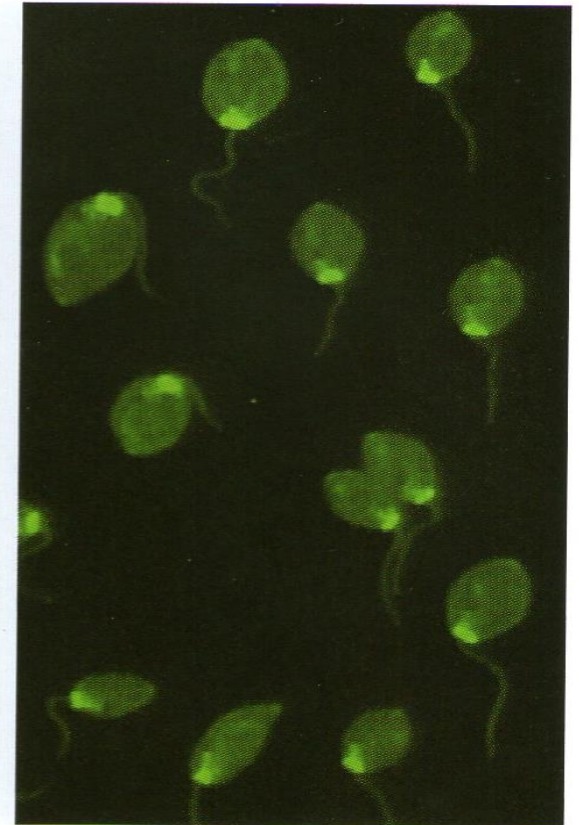
Anti DNA Antikoru



**Anti-dsDNA positive
(kinetoplast)**

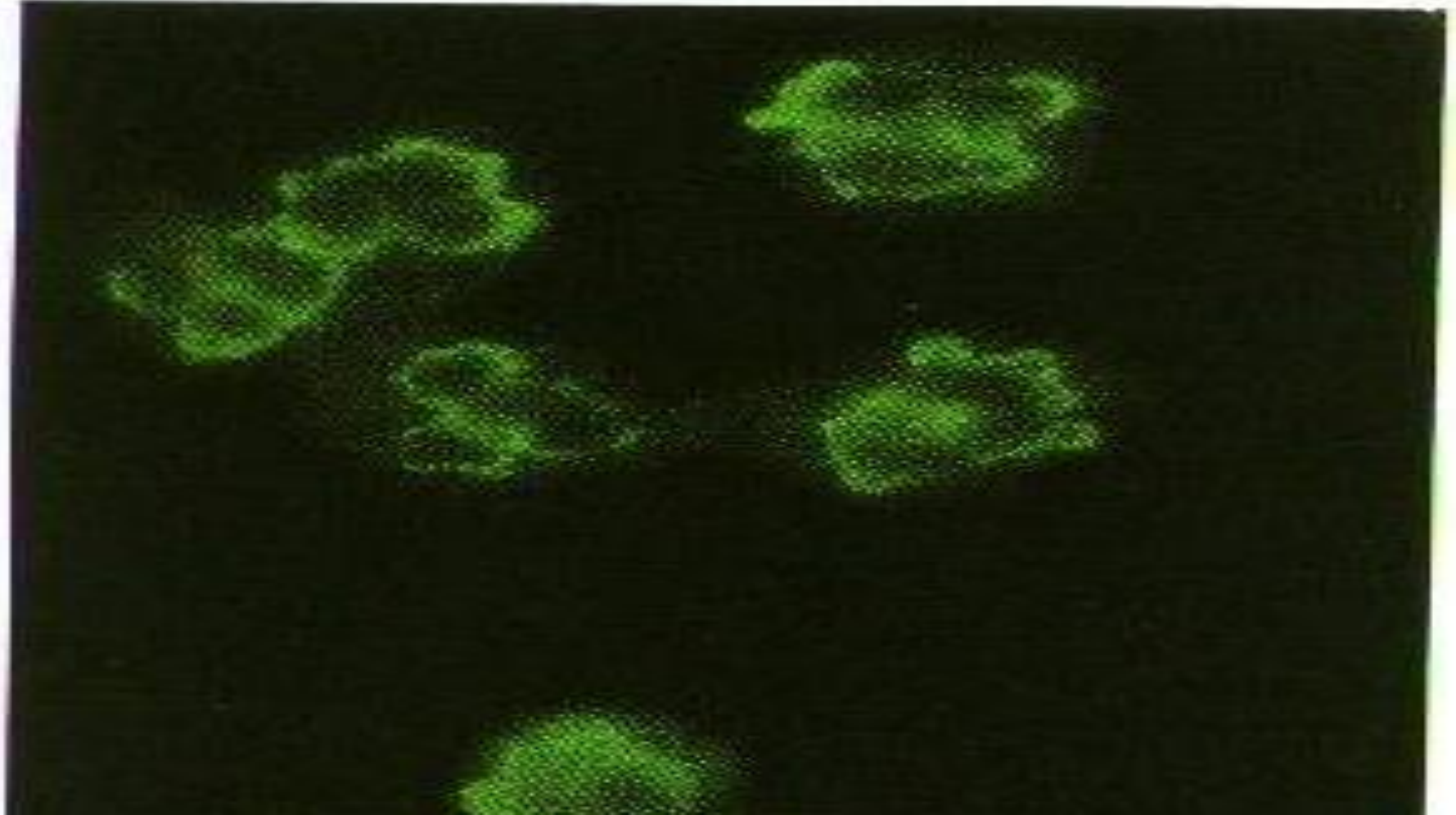


**Anti-dsDNA negative
(cell nucleus)**

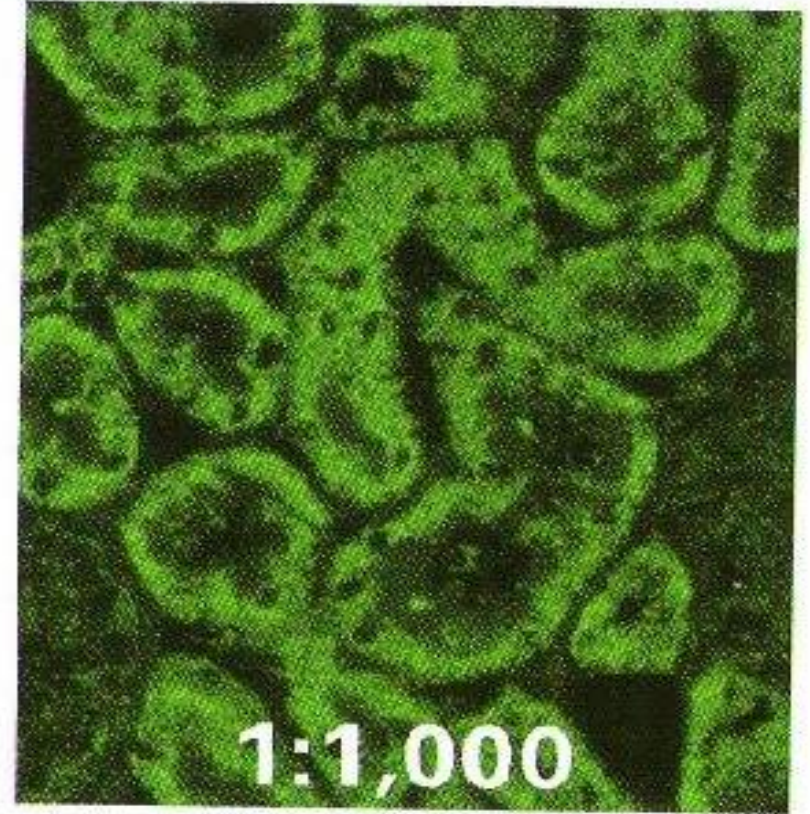
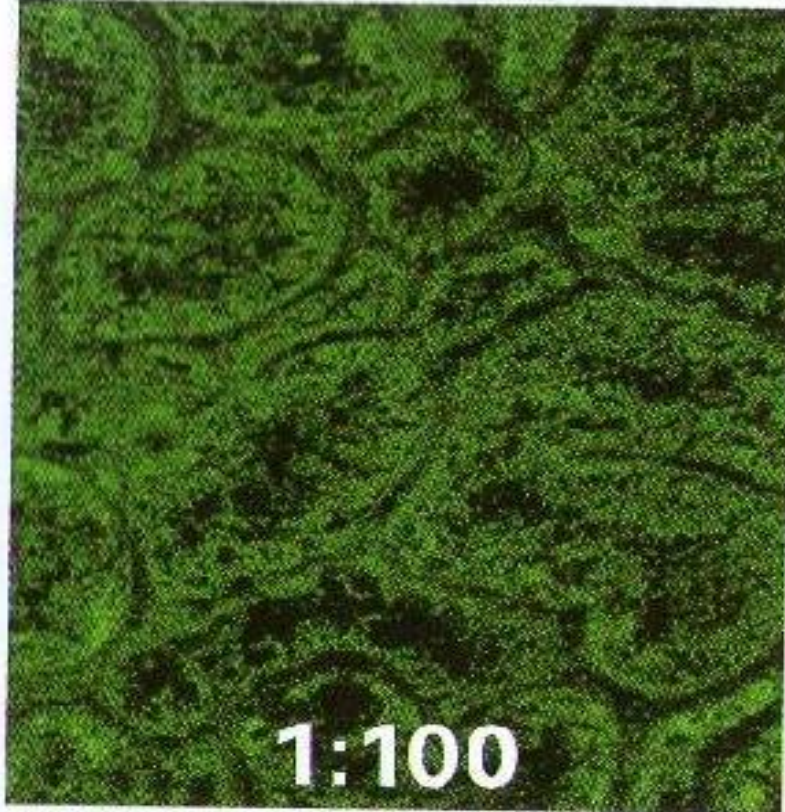


**Anti-dsDNA negative
(basal body)**

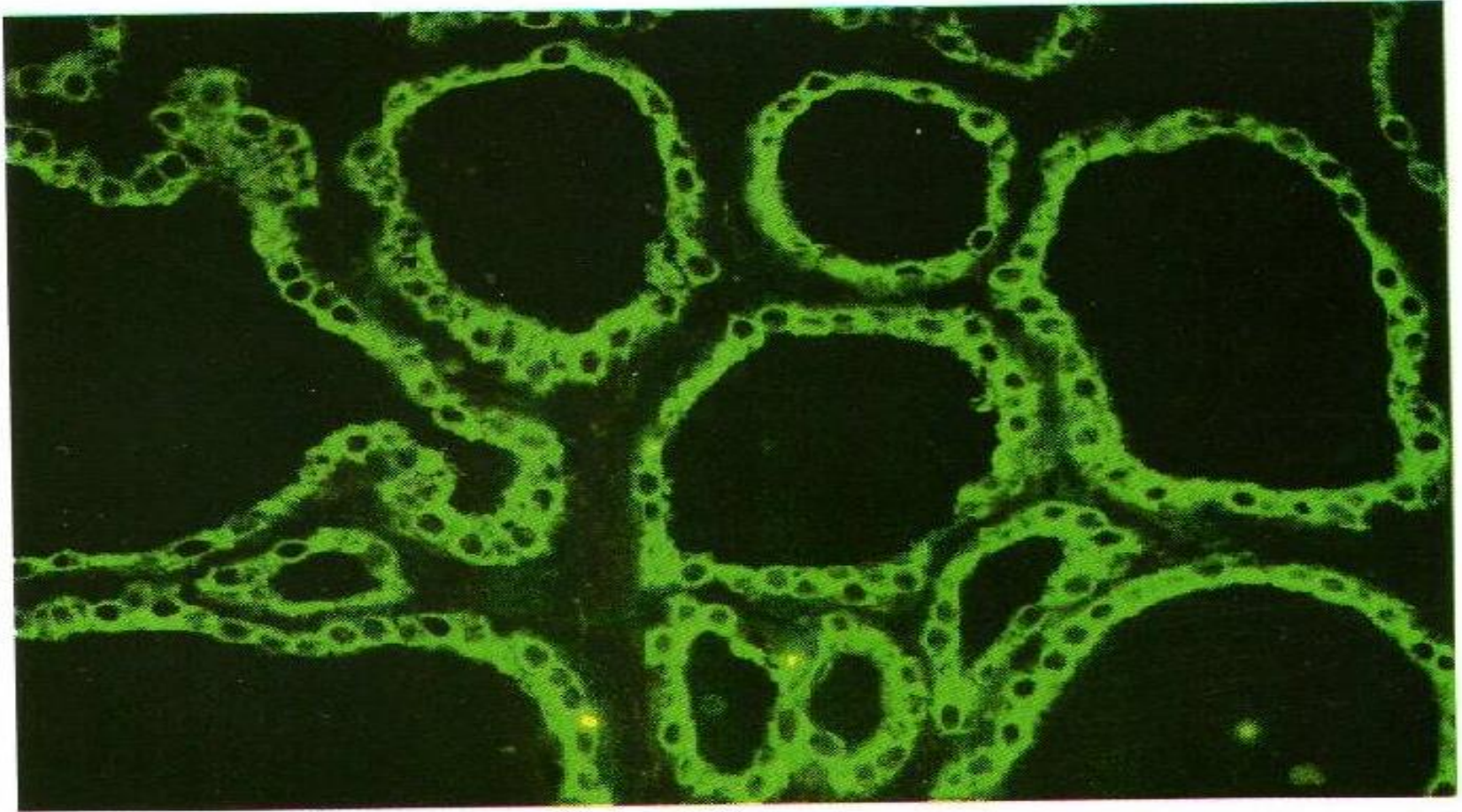
Anti Nötrofil Sitoplazmik Antikor (ANCA)



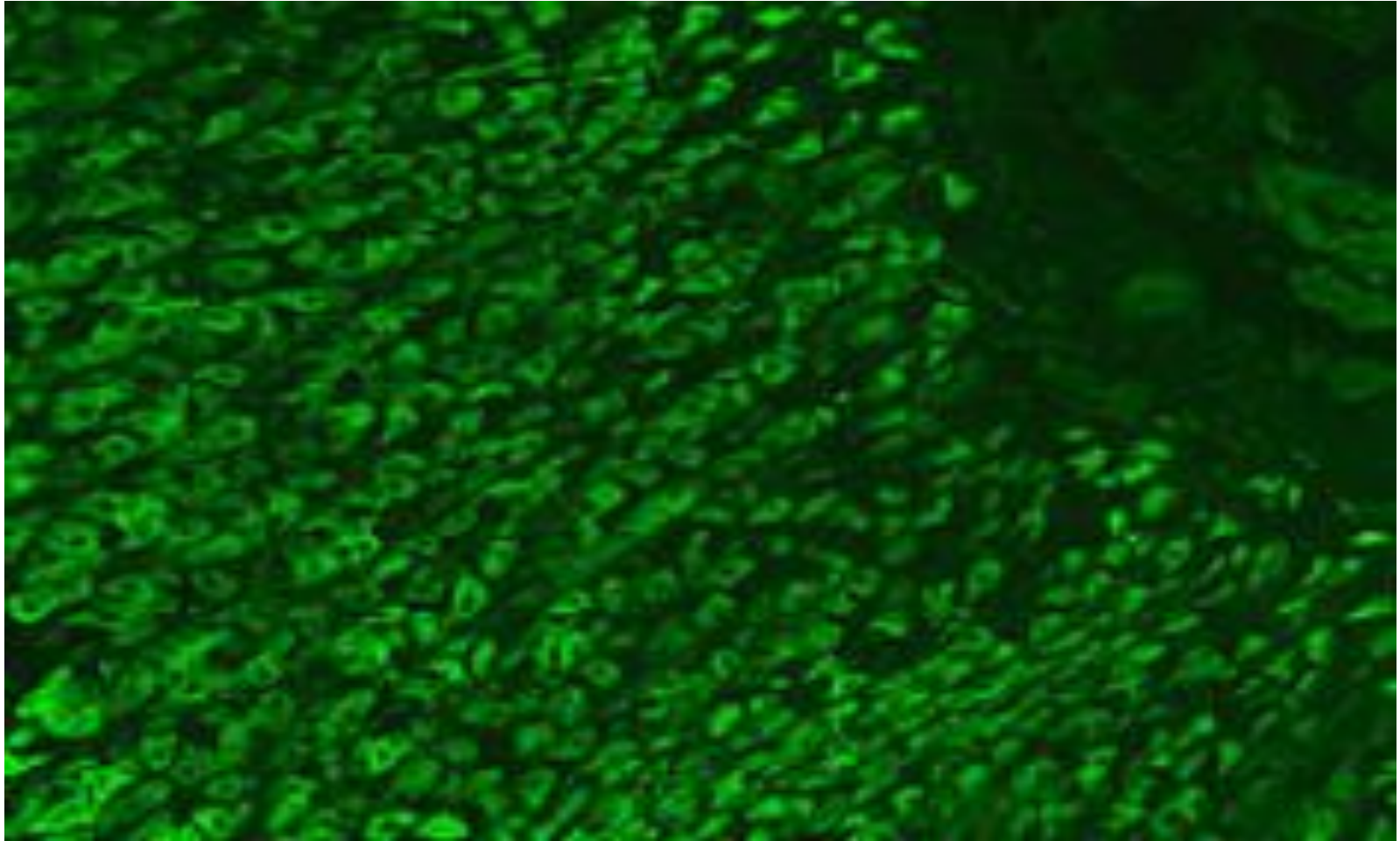
Böbrek dokusunda Anti-Mitokondriyal Antikor (AMA) Boyanması

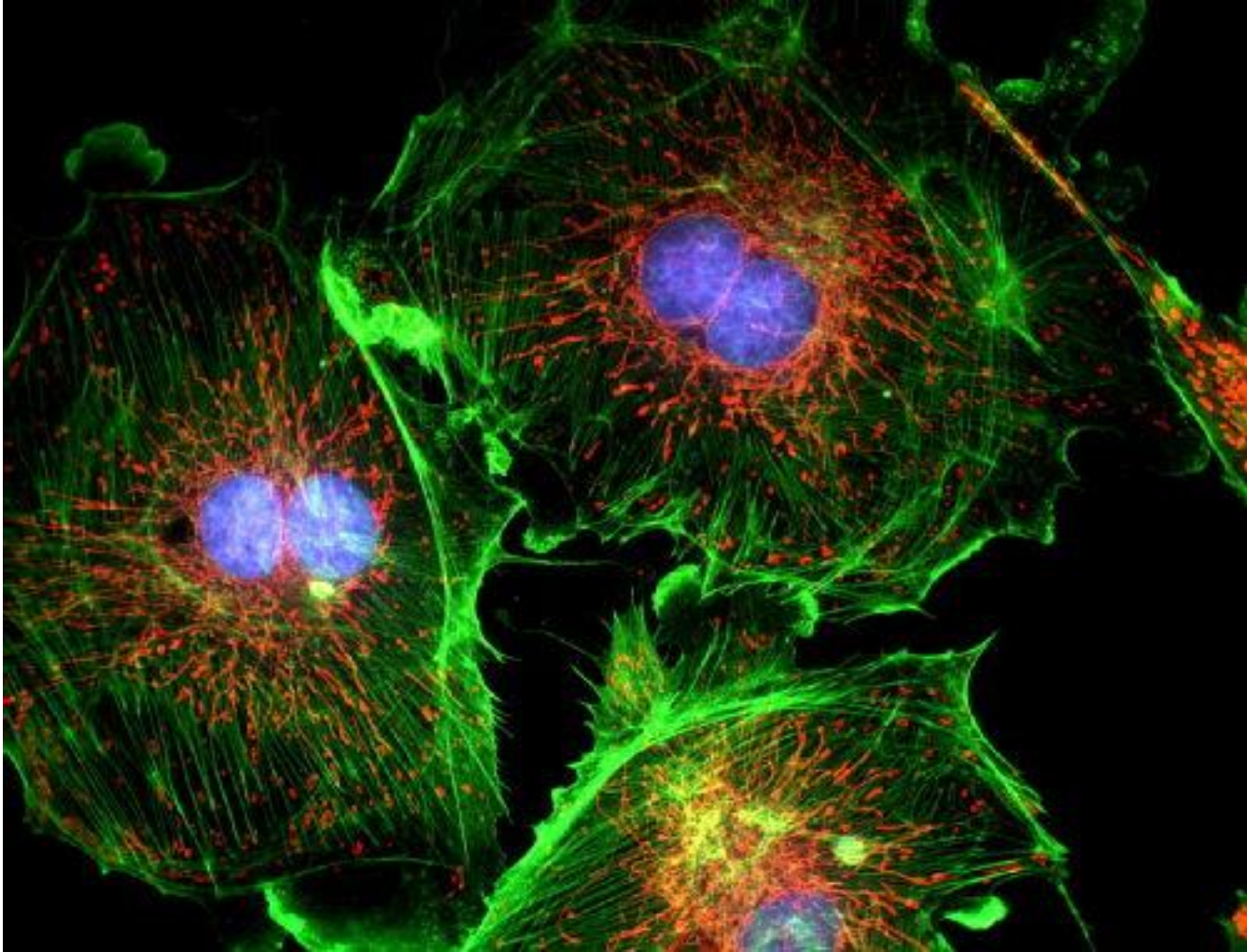


Tiroid Antikorları



Anti Pariyetal Antikor





TEŞEKKÜRLER

