

# BİYOLOJİDE ULTRAVİYOLE NOKTA IŞINLANDIRMA SİSTEMİ

## U. V. MICROBEAM SYSTEM IN BIOLOGY

Çetin ALGÜNEŞ

İstanbul Üniversitesi, Radyobioloji Kürsüsü

### GİRİŞ

Son yıllara kadar yapılan biyolojik çalışmalar göstermiştir ki, hayat olayları canlıları meydana getiren hücrelerde ve hatta hücrenin çok küçük bir bölgesinde cereyan etmektedir. İşte bu nedenle biyologlar, canlı sistemin bütünü ile yaptıkları çalışmalar yanında, yalnız hücrede ve hücreyi meydana getiren organeller üzerinde değişiklikler yapan fiziksel veya kimyasal metodların gelişmesi için büyük bir hızla çalışmaktadırlar.

Canlı bir sistemin çalışma mekanizmasının ne şekilde işlediğini, hayat faaliyetlerini devam ettiren değişik kısımların ne iş gördüğünü ve bu kısımlar arasındaki ilişkiyi araştırmak için kullanılan en elverişli metod, sistemi fiziksel veya kimyasal yollarla değiştirmek, bu değişmiş hali ile yaptığı işi, normal halinde yaptığı işle karşılaştırmaktır. Bugün için hücrenin çok küçük bir kısmında değişiklik meydana getirmenin yollarından biri, belki de en önemlisi nokta ışınlandırma (Microbeam) metodlarıdır. Bu metod ile tahrip edici ışınlar hücrenin istenilen kısmında birkaç mikron çapında bir bölgede, yani hemen hemen bir noktada toplanabilmektedir. Böylece hücrenin göz önüne alınan bölgesi kısmen veya tamamen tahrip edildikten sonra, hücrede meydana gelen fizyolojik ve morfolojik değişimleri incelemek suretiyle o bölgenin hücre faaliyetindeki görevi anlaşılabilir. Ayrıca bu metodla radyasyonun hücrenin değişik kısımları üzerindeki etkisi de incelenebilir.

Kullanılan radyasyon tipine göre nokta ışınlandırma sistemlerini şu şekilde sınıflayabiliriz :

1. Radyoaktif kaynaklarla.
  - a)  $\alpha$  nokta ışınlandırması.
  - b)  $\beta$  nokta ışınlandırması.
2. X ışınları nokta ışınlandırması.

3. Elektron nokta ışınlandırması.
4. Laser nokta ışınlandırması.
5. Ultraviyole nokta ışınlandırması.

Bu sistemler içinde en gelişmiş olanı ultraviyole (U. V.) nokta ışınlandırma sistemidir. Bu sistem, hücre tarafından absorbe edilebilen dalga boyunda olan U. V. ışığını gayet küçük bir nokta halinde toplayabilecek yetenektedir. U. V. nokta ışınlandırma sisteminin diğer nokta ışınlandırma sistemlerine göre en önemli üstünlüğü, ışınları değişiklik meydana getirilmek istenilen noktada toplayabilmesi ve ışınların asıl etkisinin bu toplanma noktasında meydana gelmesi, hücre içindeki yolları boyunca toplanma noktası dışındaki bölgelerde pek etki yapmamasıdır.

Hücre biyolojisi bakımından önemli dalga boyları 2000-3500 Å° arasındadır ki bu 3,5-6 eV luk foton enerjisine tekabül eder. Bu aralıktaki U. V. ışınının en yüksek enerjisi olan 6 eV bile, ışığı absorplayan <sup>1)</sup> ortamdaki atomları iyonize etmek için gerekli olan enerjiden azdır, yani valans elektronları hariç, atomların sıkı bağlı elektronlarını koparamaz, ancak moleküler yapı tarafından absorplanırlar.

Radyobiolojide özel U. V. absorpsiyon bandları <sup>2)</sup> bilhassa önemlidir. Bunlardan nükleik asitlerin (DNA ve RNA) ve proteinlerin absorpsiyon bandları özel bir yer kaplar. Nükleik asitlerin absorpsiyon bandı nükleik asitteki pürin ve primidin bazlarının absorpsiyon bandıdır ki 2600 Å° dedir. U.V. spektrumunda protein absorpsiyon bandı 2800 Å° bölgesinde bulunur.

Ultraviyole ışığının canlı organizmalara ne şekilde etkidiği konusu, radyasyonun biyolojik ortamdaki etkilerinin düşünüldüğü tarihtenberi araştırılmaktadır. U. V. nin hücreler üzerine etkisi genel olarak iki ayrı metodla incelenebilir :

1. U. V. kaynağından çıkan ışınları, tek tabaka halindeki çok sayıdaki hücreler üzerine düşürmek suretiyle (Geniş hüzme metodu = macrobeam).

2. U. V. ışınını uygun bir sistem yardımıyla küçük noktalar halinde hücrenin belli bir bölgesi üzerinde toplamak suretiyle (Nokta ışınlandırma metodu = microbeam).

Nokta ışınlandırma metodu, geniş hüzme metoduna göre çok daha yenidir. Bu şekildeki bir çalışma ilk defa Chahotin tarafından düşünülmüş, daha sonra

1) Işık absorpsiyonu : Işğın içinden geçtiği ortamda bir ışık fotonunun enerjisinin atom ve moleküller tarafından ısı veya başka bir enerji şekline dönüştürülmesi haline ışğın absorpsiyonu denir. Böylece ortamdaki geçen ışık demeti içindeki ışğınların bir kısmı absorplanırsa, ortamdaki ışık demetinin şiddetinde azalma olur.

2) Absorpsiyon bandı : Ortamdaki atom ve moleküller ancak belli dalga boylu ışğınları absorplayabilir. Eğer dalga boyu belli sınırlar arasında olan bütün ışğınları absorplayabiliyorsa, bu dalga boylu aralığına absorpsiyon bandı denir.

ları geliştirilerek bugün kullanılan sistemlerin esası ortaya konulmuştur (Uretz ve Perry 1957, Bessis ve Nomarski 1960, Dendy 1962, Rustad 1968). Birkaç yıl öncesine kadar U. V. nin hücreler üzerine etkisinin geniş hüzmeye metodu ile incelenmesine ait sonuçlara literatürde rastlamak mümkün idi. Bugün hücrenin her bölgesinin hayat olaylarında belirli görevleri olduğu düşüncesiyle U.V. ışınının etkilerinin incelenmesinde, nokta ışınlandırma metodu tercih edilmektedir.

Burada U.V. nokta ışınlandırma sisteminin esas prensipleri açıklanarak geçirdiği gelişmeler anlatılacaktır.

#### U. V. NOKTA IŞINLANDIRMA SİSTEMİ

U. V. nokta ışınlandırma sisteminde amaç, uygun bir U. V. kaynağından çıkan ışığı, mümkün olduğu kadar bir demet haline getirmek ve bu demeti hedefin küçük bir bölgesinde toplamaktır. Bu amaçları gerçekleştiren U.V. nokta ışınlandırma sisteminin ana hatlarını

- a) Kaynak,
- b) Kolimatör (optik) düzen,
- c) Foküsleyici düzen olarak belirtebiliriz (Şekil : 1).

Kaynak çıkan ışınları dağılmaya engel olacak şekilde tek doğrultuda verecek bir yansıtıcı düzene sahip ve nokta kaynak şeklinde, optik düzen kaynaktan çıkan ışınları dar bir demet haline getirecek ve U.V. dışındaki ışınları yok edecek şekilde, foküsleyici düzen ise optik düzenden elde edilen ışık demetini hedef üzerinde toplayabilecek şekilde, ayrıca objektif yapı ve karakterinde olmalıdır.

Bu düzenlere uygun tipteki bir mikroskop ile U.V. nokta ışınlandırma sistemi tamamlanır.

Sistemlerde kullanılan kaynaklar 100-200 W gücündeki orta basınçlı veya 500-1000 W gücündeki yüksek basınçlı lambalardır. Heterokromatik U. V. ışığı ile çalışanlar alçak güçteki, monokromatik U.V. ışığı ile çalışanlar ise yüksek güçteki lambaları tercih etmektedirler. Bunun en önemli sebebi monokromatik ışık elde etmek için kullanılan monokromatörlerde veya özel filtrelerde ışığın büyük bir kısmının absorpsiyon ve yansıma sebebiyle kaybolmasıdır. 500-1000 W gücündeki lambalar özel bir soğutma düzenine ihtiyaç gösterirler. Dakikada 3-4 litrelik soğuk su (6-14°C) lamba üzerinde devrettirilir. Lambadan çıkan ışığın bir miktarı da burada absorplandığı için, bu suyun özelliği önemlidir. Yaklaşık bir ay kullanıldıktan sonra değiştirilmesi gereken bu suyun içine, bakteri üremesine engel olmak için bir miktar timol kristalinin ilavesi de yukarıda açıklanan sebepten ayrıca lüzumludur. Çıkan ışığı mümkün mertebe toplayabilmek ve sistemin aksi yönüne giden ışıklardan faydalanmak için lambanın arkasında özel bir yansıtıcı ayna bulunur. Ayrıca içinde lambanın soğutulmasında kullanılan suyun döndüğü kılıfın kuartz penceresi de bu su ile birlikte ışığı toplama özelliği gösterir.

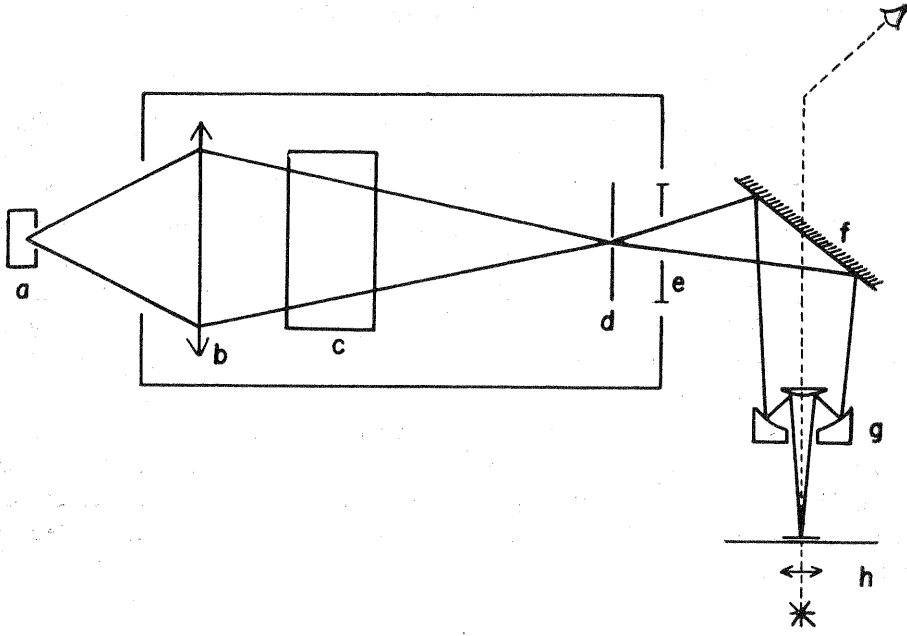
lmıştır (Uretz  
1968). Birkaç yıl  
metodu ile ince-  
nen hücrenin her  
bir U.V. ışımının  
ilmeğektir.  
açıklanarak ge-

. kaynağından  
demeti hedefin  
U.V. nokta ışın-

rultuda verecek  
aynaktan çıkan  
yok edecek şe-  
tini hedef üze-  
olmalıdır.

ışınlandırma sis-

ta basınçlı veya  
yüksek güçteki  
ışığın büyük bir  
mikro-apertürü  
üzerine sadece U.V.  
dalga boylu ışığın  
toplanmasını sağlar.  
Nokta ışınlandırma  
sistemi için asıl  
kaynaktır. Hedef  
üzerine düşen U.V.  
ışının büyüklüğünü  
tayar eder.  
Açıp kapamak  
suretiyle hücre  
üzerine düşen  
radyasyonun zamanı  
ayarlanır.



Şekil 1 : Uretz tipi U.V. nokta ışınlandırma sistemi şeması :

**Kaynak :**

- a. Ultraviyole lambası.

**Kolimatör düzen :**

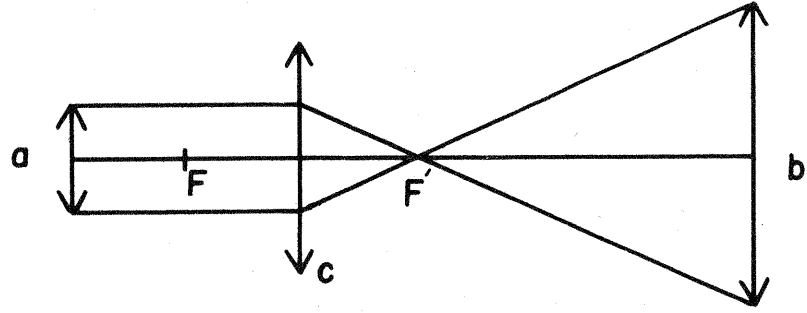
- b. Işığı toplayan kuvarz mercek :  
Bu mercek yardımıyla kaynaktan çıkan ışık demet haline getirilmektedir.
- c. Sıvı filtre :  
Kızılötesi ışığın tamamını, görünür ışığın % 99 unu yok etmek suretiyle mikro-apertür üzerine sadece U.V. dalga boylu ışığın toplanmasını sağlar.
- d. Mikro-apertür :  
Nokta ışınlandırma sistemi için asıl kaynaktır. Hedef üzerine düşen U.V. noktasının büyüklüğünü tayin eder.
- e. Fotoğraf optiratörü :  
Açıp kapamak suretiyle hücre üzerine düşen radyasyonun zamanı ayarlanır.

**Foküsleyici düzen :**

- f. Yansıtıcı ayna (Beam splitter) :  
Kolimatör düzende toplanan U. V. ışımını objektifin içine çevirmek için kullanılır. Işığın yansıdığı yüzey özel surette surlanmıştır.
- g. Refleksiyon objektifi :  
U. V. ışımını nokta şeklinde hücre üzerinde toplar.
- h. Sistemi tamamlayan mikroskopun aydınlatma düzeni (Görünür ışık kaynağı).

Kullanılan lambalar 2000 - 7500 Å° arasında gayet geniş bir spektruma sahiptir. Kolimatör (optik) düzende, ışığın toplanması ile birlikte U.V. dışındaki ışıkların yok edilmesi de düşünülmüştür.

Amaç dışındaki ışıkların yok edilmesi, ya monokromatör ya da filtreler kullanılarak yapılır. Monokromatör, sistem içinde lambanın hemen önüne konmak buradan elde edilen tek dalga boylu ışık toplayıcı kuvartz bir mercek üzerinden düşürülerek demet haline getirilmektedir. Aynı işlem filtre kullanılarak yapıldığında, çoğunluk  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nun saf sudaki uygun karışımından elde edilen bir sıvı filtre tercih edilmektedir (Kasha 1948). Geçen U.V. ışığının % 50 sinin absorbe olduğu 5 cm uzunluğundaki böyle bir filtre ile kırınım bölgesindeki ışığın tamamını, görünür dalga boylu ışığın % 98,5 unu yansıtmak mümkündür. 2400-3500 Å° arasındaki dalga boylu ışığı geçiren bu filtre ile monokromatik bir ışık elde edilmek istendiğinden önüne ayrıca yalnızca U.V. dalga boyunu geçiren bir filtre koymak gerekir. Işıklar filtre ile monokromatik yapılırsa, tam monokromatik olmaz, dar bir dalga boyu bandı haline gelir ve aynı zamanda istenen dalga boyundaki ışıkların bir kısmı da absorplandığından ışık şiddetinde de bir azalma olur. Bu bakımdan monokromatör sistemi tercih edilirler.

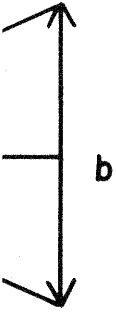


Şekil 2 : a. U. V. noktası, b. mikro-apertür, c. yakınsak mercek.

Kaynaktan çıkan ışıklar uygun odaklı bir kuvartz mercek yardımı ile demet haline getirilip filtreden geçirilerek amaç dışındaki ışıklar yok edildikten sonra bir noktada toplanır. Kolimatör düzende U.V. ışıklarının toplandığı bu noktaya konulan bir diyafram, nokta ışıklandırma sistemi için asıl ışık kaynağıdır ve hedef üzerinde elde etmek istediğimiz U.V. noktasının büyüklüğünü bu diyaframın büyüklüğü tayin eder (Bu diyaframa mikro-apertür denir). Diyaframın ortasında 50, 100 veya 200 mikron çapında delik bulunan ince bakır disk kullanılır (Elektron mikroskopunda kullanılan diyaframlar). U.V. ışıklarını geçen bir objektif, uygun bir düzenle (Hüzme saptırıcı = Beam splitter) bu diyaframın, hücrenin hedef olarak seçilen noktası üzerinde net ve küçültülmüş bir yalini düşürür (yani diyaframdan gelen ışıkları hedef üzerinde toplar).

pektruma sahip-  
. dışındaki ışık-

da filtreler kul-  
nüne konmakta,  
mercek üzerine  
lanılarak yapıl-  
i uygun karışı-  
8). Geçen U.V.  
ir filtre ile kızıl-  
% 98,5 unu yok  
geçiren bu filtre  
rica yalnız belli  
ile monokroma-  
andı haline gelir  
a absorplanaca-  
omatör sistemler



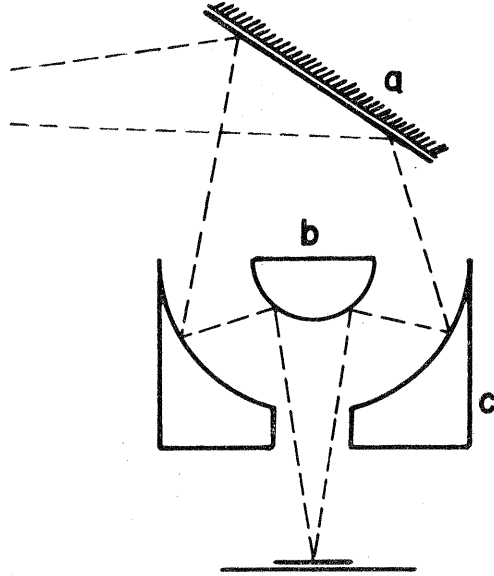
cek.

yardımı ile bir  
yok edildikten  
plandığı bu nok-  
şık kaynağı olur  
iğünü bu diyaf-  
. Diyafram ola-  
ce bakır diskler  
. ışınlarını geçi-  
-litter) bu diyaf-  
-iltülmüş bir ha-  
-plar).

Optik kanunlarından bildiğimize göre, 200  $\mu$  luk bir delik kullanıldığı takdirde objektifin lineer büyütmesi 75 ise, hedef üzerindeki U.V. noktasının büyüklüğü :

$$\frac{200}{75} = 2,7 \mu \text{ olacaktır (Şekil : 2).}$$

Rustad (1968) ın geliştirdiği sistemde böyle çok küçük diyaframlar yerine kolimatör sistemde refleks tipi bir fotoğraf makinesinden faydalanılarak ışık kaynağının, optik olarak yukarıdaki diyafram çapları mertebesinde bir hayali elde edilmekte ve bu hayal nokta ışınlandırma için ışık kaynağı rolü oynamaktadır. Objektif, kaynaktan gelen ışınların toplandığı bu hayalin hemen hemen nokta büyüklüğünde küçültülmüş bir hayalini hedef üzerine düşürmektedir.



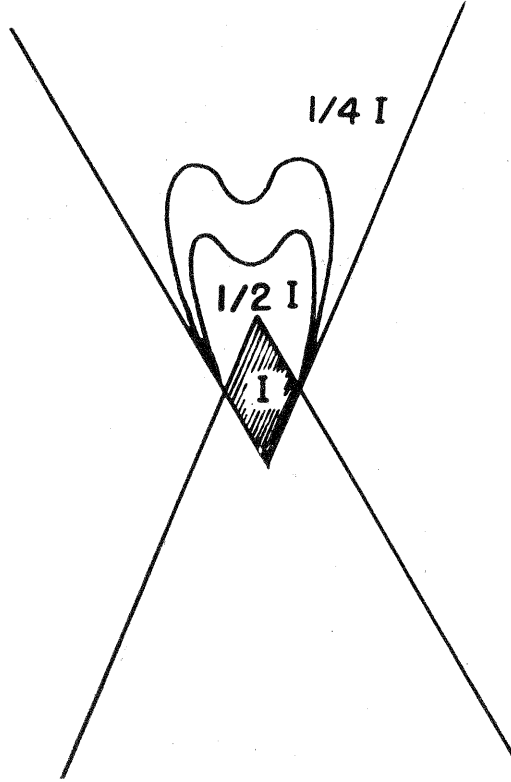
Şekil 3 : Refleksiyon objektifinin şematik gösterilişi :

- Işığı objektife çeviren yansıtıcı ayna.
- Uygun optik sağlayan ayarlı ayna.
- Tek parça halinde dönele simetrik küresel veya parabolik ayna.

Foküsleyici düzenin ana kısmını, kullanılan objektif teşkil eder. U.V. nokta ışınlandırma sistemlerinin planlarının yayımlandığı tarihten itibaren bu sistemle çalışan araştırmacıların büyük bir kısmı refleksiyon objektifi kullanmışlardır (Şekil : 3).

Son yıllarda kullanılmaya başlanan ultrafluar objektif bu alanda önemli bir gelişmedir. Ultrafluar objektif karakter bakımından adi objektif görünüşündedir.

U.V. dalga boyulu ışığa geçirgenliği yüksek maddelerden yapılmaktadır. Netlik derinliğinin büyük olması ve kontrast sağlamada refleksiyon objektifine üstünlük göstermesi sebebiyle son yıllarda U.V. nokta ışınlandırma sistemi ile çalışanlar tarafında tercih edilmiştir <sup>3)</sup>.



Şekil 4 : U. V. noktasının fokus ve fokus dışındaki şiddeti (I ile ışık şiddetinin maksimum değeri gösterilmiştir).

Hücrenin ve hücre içinde ışınlandırılacak bölgenin net görülebilmesi için faz-kontrast düzeni kullanmak mümkündür. U.V. nokta ışınlandırma sisteminin refleksiyon objektifli temel planındaki faz-kontrast düzeni (Uretz 1957), sonraları bazı araştırmacılar tarafından yine refleksiyon objektifli sistemler için geliştirilmiştir (Stephens 1965, Forer 1966).

3) Her iki objektifin U. V. nokta ışınlandırma sistemlerindeki karşılaştırması Hatfield (1970) tarafından yapılmıştır.

## U. V. NOKTASININ HEDEF ÜZERİNE DÜŞÜRÜLMESİNDE GÖZÖNÜNE ALINAN HUSUSLAR

Daha önce de belirtildiği gibi U. V. nokta ışınlandırma sisteminde U. V. ışınının asıl etkisi toplanma noktasında meydana gelir. Hücre içindeki yolları boyunca toplanma noktasının dışındaki bölgelerde pek etkili değildir. Zira noktanın altında ve üstündeki kısımlarda enerji, toplanma noktasındaki enerji değerinin çok altındadır (Şekil : 4). Bu sebepten U. V. ışınının, hücrenin ışınlandırılacak bölgesi üzerinde toplanması gerekir. Aksi halde önceden düşünülen radyasyon dozu (yani enerji) hücre tarafından absorplanmayacak ve dolayısıyla deney doğru sonuç vermeyecektir.

Bilindiği gibi U. V. dalga boyu ışık gözün görme bölgesi dışındadır. Sistemi tamamlayan mikroskobun okülerinden bakan bir göz U. V. noktasının nerede olduğunu göremez. Noktanın görüş alanının neresinde olduğunu tespiti birkaç yolla olmaktadır. Monokromatör ihtiva eden U. V. nokta ışınlandırma sistemlerinde monokromatör, lambanın 5700 A° dalga boyundaki ışığını geçirecek şekilde ayarlanmakta, bu dalga boyu küçük nokta mikroskop tablasına üstündeki kuvarz lamel ile birlikte konmuş ve üst yüzeyi sırlanmış bir lam üzerine düşürülmektedir. Bu nokta yansıtıcı ayna (beam splitter) in ayarlanmasıyla okülerdeki mikrometrik bölüntülerin ortasına alınmaktadır. Bu suretle 5700 A° dalga boyu ışık noktasının mikroskobun görüş alanı içindeki yeri tespit edilmektedir. Monokromatör U. V. bölgesine çevrildiğinde, sistemin geometrisi değiştirilmediği için, U. V. dalga boyundaki nokta gene mikrometrik bölüntülerin ortasındaki yerinde kalmaktadır.

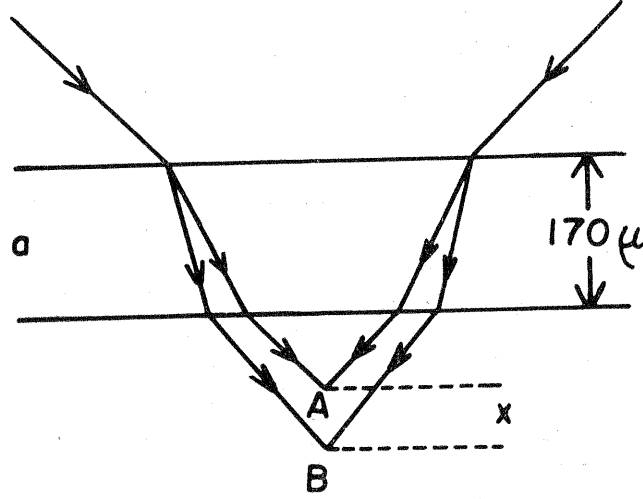
U. V. noktasının tespitinde kullanılan diğer bir metod, sisteme optik bakımdan U. V. dalga boyu ışığın geçtiği düzenin aynı olan bir görünür ışık düzeni ilavesi ile yapılandır (Bessis 1960). Bu suretle görünür ışık kaynağının yardımıyla, U. V. noktasının yerini tespit etmek mümkün olmaktadır. Sıvı filtre ile çalışanlar için noktanın yerini tespit etmek, bu filtrenin 5700 A° de ışının % 1,5-2 sini geçirmesi dolayısıyla daha kolaydır. Okülerden bakan gözün sırlanmış lam üzerindeki U. V. noktasını yeşil bir nokta halinde görmesi mümkün olmaktadır.

Yukarıda açıklanan metodlarla noktanın yerini tespit etmek şiddetin tam olduğu bölgenin (ışığın toplandığı nokta) hücrenin ışınlandırılacak bölgesine düşmesi için yeterli değildir. Zira 5700 A° dalga boyundaki ışığın kuvarz lameldeki kırılmaları farklıdır. Şekil : 5 de görüldüğü gibi yeşil ışık ile U. V. ışığı kuvarz lamelden geçtikten sonra farklı bölgelerde toplanmaktadır. Aralarındaki x mesafesi, objektifin büyütmesine, çalışılan U. V. ışınının dalga boyuna ve kuvarz lamelin kalınlığına bağlıdır. U. V. nokta ışınlandırma sistemi ile çalışan araştırmacılar farklı büyütme objektifleri ve farklı kalınlıktaki kuvarz lamelleri kullandıklarından, yeşil ışık noktası ile U. V. noktası arasındaki x mesafesi



fesinden doğacak hatayı kendi sistemleri için hesaplamak suretiyle ortadan kaldırırlar. Bu x mesafesinin hesaplanmasıyla, mikroapertürün objektife mesafesi, U.V. noktası yeşil ışık noktasının üzerine gelecek şekilde ayarlanır.

Halen, İstanbul Üniversitesi Radyobiyoloji Kürsüsünde üzerinde çalışmakta olduğum U. V. nokta ışınlandırma sistemi hakkındaki bu makaleyi yazmaya beni teşvik eden, yazıldıktan sonra üzerinde gerekli düzeltmeleri yapan sayın hocalarım Prof. Dr. Atıf Şengün ve Doç. Dr. Cemil Karadeniz'e, biyolojik kısımları biyologların daha iyi anlayabileceği şekle getirilmesindeki yardımlarından ötürü Asistan Atilla Özalkan'a teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.



Şekil 5 : a. Kuvartz lamel, A. Yeşil ışık noktası, B. U. V. noktası.

#### SUMMARY

Recent research has indicated that the life processes in the living organism are sustained within the cells, to be more exact within small portion of the cells. Consequently diligent research is being conducted in order to establish the precise physical and chemical methods which effect and alter the cells and the organelles composing the cells. Today, probably one of the most important methods which alters the smallest portion of the cell is the microbeam method. Among the systems available, the U.V. microbeam system is the most developed. The main points of this system may be outlined as follows : The source the optic system localizing the radiation from the source ; and the focus system focusing the U.V. light as a microbeam spot on the cells.

In the following article, the parts composing the U.V. microbeam system will be examined individually, the precise function of each part being examined with special reference to the development imposed on the system with respect to biological purposes.

## BİBLİYOGRAFYA

1. BESSIS, M. and NOMARSKI, G. (1960) : Ultraviolet irradiation of cell organizer with continuous observation by phase-contrast microscopy. - *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **8** (3) : 777 - 791.
2. DENDY, P. P. (1962) : Effect of ultraviolet microbeam irradiation on deoxyribonucleic acid synthesis in cells growing in tissue culture (Doctoral thesis). Cambridge.
3. FORER, A. (1966) : A simple conversion of reflecting lenses into phase-contrast condensers for ultraviolet light irradiations. - *Exp. Cell Res.* **43** : 688-691.
4. HATFIELD, J. M. R. (1970) : The use of microbeam irradiation to investigate the possible role of the nucleolus in controlling DNA synthesis (Doctoral thesis). Cambridge.
5. KASHA, M. (1948) : Transmission filters for the U.V. - *J. Opt. Soc. Amer.* **38** : 929-934.
6. RUSTAD, R. C. (1968) : A simple U.V. microbeam for partial cell irradiation. - *Experientia* **24** (9) : 974 - 975.
7. STEPHENS, R. E. (1965) : Analysis of muscle contraction by ultraviolet microbeam disruption of sarcomere structure. - *J. Cell Biol.* **25** (2/2) : 129-139.
8. URETZ, R. B. and PERRY, R. P. (1957) : Improved ultraviolet microbeam apparatus. - *Rev. Sci. Instr.* **28** (11) : 861 - 866.