



**KIRMIZI KAN HÜCRELERİ YÜZEY MORFOLOJİSİNİN
BELİRLENMESİNDE KULLANILAN
BİYOMEDİKAL ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ:
KANTİTATİF FAZ GÖRÜNTÜLEME, AFM ve SEM**

Esra ERTÜRK

Yüksek Lisans Tezi

Fizik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Tanju GÜREL

**2.Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Özlem KOCAHAN
YILMAZ**

2018

T.C.

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KIRMIZI KAN HÜCRELERİ YÜZEY MORFOLOJİSİNİN BELİRLENMESİNDE
KULLANILAN BİYOMEDİKAL ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ:
KANTİTATİF FAZ GÖRÜNTÜLEME, AFM ve SEM**

Esra ERTÜRK

FİZİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Tanju GÜREL

2.DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Özlem KOCAHAN YILMAZ

TEKİRDAĞ-2018

Her hakkı saklıdır



Bu tez Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından NKUBAP.01.GA.18.148 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Doç. Dr. Tanju GÜREL danışmanlığında ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem KOCAHAN YILMAZ 2. danışmanlığında, Esra ERTÜRK tarafından hazırlanan “**KIRMIZI KAN HÜCRELERİ YÜZEY MORFOLOJİSİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN BİYOMEDİKAL ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ: KANTİTATİF FAZ GÖRÜNTÜLEME, AFM ve SEM**” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Fizik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı	: Prof. Dr. İlker KÜÇÜK	<i>İmza :</i>
Üye	: Doç. Dr. Tanju GÜREL	<i>İmza :</i>
Üye	: Doç. Dr. Beyhan TATAR	<i>İmza :</i>
Üye	: Doç. Dr. Dilek KAZICI	<i>İmza :</i>
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Özlem KOCAHAN YILMAZ	<i>İmza :</i>

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KIRMIZI KAN HÜCRELERİ YÜZEY MORFOLOJİSİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN BİYOMEDİKAL ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ: KANTİTATİF FAZ GÖRÜNTÜLEME, AFM ve SEM

Esra ERTÜRK

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Fizik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Tanju GÜREL

2. Danışman: Dr. Öğrt. Üyesi Özlem KOCAHAN YILMAZ

Bu çalışmanın amacı, kantitatif faz ölçümü, AFM (atomik kuvvet mikroskobu) ve SEM (taramalı elektron mikroskobu) görüntüleme kullanarak kırmızı kan hücrelerinin yüzey morfolojisinin belirlenmesi ve elde edilen sonuçlar ışığında bu biyomedikal ölçüm yöntemlerinin karşılaştırılmasıdır. Optik ölçüm yöntemi olan ızgara yansıtma tekniği ile mikrometre mertebesinde, nanometre hassasiyetinde ölçüm yapabilen beyaz ışık kırınım faz mikroskopisi (BKFM) deney kurulumundan elde edilen verilerin analizinde Fourier dönüşümü kullanılmıştır. Bu sistem ile kırmızı kan hücrelerinin 3D, dinamik (her açıdan gözlenebilen) ve her noktada yüksekliği bilinen profilleri oluşturulmuştur. Ayrıca aynı örnekler için AFM ve SEM ile de görüntüler elde edilmiştir. Sonuç görüntüler üzerinden biyomedikal ölçümlerde sıklıkla kullanılan bu üç yöntemin avantaj ve dezavantajları tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Biyomedikal Görüntüleme, BKFM, AFM, SEM,

2018, 46 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

**BIOMEDICAL MEASUREMENT METHODS USED FOR THE DETERMINATION
OF SURFACE MORPHOLOGY OF RED BLOOD CELLS:
QUANTITATIVE PHASE IMAGING, AFM AND SEM**

Esra ERTÜRK

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Physics

Supervisor: Doç. Dr. Tanju GÜREL

Co-Supervisor: Dr. Öğrt. Üyesi Özlem KOCAHAN YILMAZ

The aim of this study is to compare biomedical measurement techniques used for the determination of the surface profiles of red blood cells which are quantitative phase imaging, AFM (atomic force microscopy) and SEM (scanning electron microscopy). From the fringe projection profilometry, which is an optical measurement technique, with nanometer precision (micrometer range) images were obtained by white light diffraction phase microscopy (WDPM) setup and analyzed by Fourier transform. With this system, obtained results were 3D and dynamic structure. Surface measurements of red blood cells were also imaged with AFM and SEM. The advantages and disadvantages of these three methods, which are frequently used in biomedical measurements, are discussed on the resulting images.

Keywords: Biomedical Imaging, BKFM, AFM, SEM,

2018, 46 pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	iii
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Fourier Dönüşüm Profilometresi.....	4
2.2. Çapraz Optik Eksenler Geometrisi.....	4
2.3. Paralel Optik Eksenli Geometri.....	7
2.4. Fourier Dönüşümü.....	8
2.5. Maksimum Ölçüm Aralığı.....	10
3.MATERYAL ve YÖNTEM	12
3.1. Beyaz Işık Kırınım Faz Mikroskopisi (BKFM).....	12
3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu.....	16
3.2.1. Atomik Kuvvet Mikroskopunun Çalışma Prensipleri.....	16
3.2.2. Resim Çekmek.....	19
3.2.3. Kuvvet-Mesafe Eğrisi.....	20
3.2.4. AFM Ölçüm Teknikleri ve Görüntü Elde Etme Modları.....	21
3.3.Taramalı Elektron Mikroskobu.....	22
3.3.1.Taramalı Elektron Mikroskobu Prensipleri.....	22
3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Kısımları.....	24
3.3.3. Elektron ve örnek arasındaki etkileşim.....	24
4.ARAŞTIRMA BULGULARI	26
4.1. BKFM ile Görüntü Oluşumu.....	26
4.2. Kırmızı Kan Hücrelerinin AFM ve SEM Görüntüleme İçin Hazırlanması.....	35
4.3.Atomik Kuvvet Mikroskobu İle Kan Hücresinin Morfolojisinin İncelenmesi.....	35

4.4. SEM İle Kırmızı Kan Hücresinin İncelenmesi.....	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	42
6.KAYNAKLAR.....	44



ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Çapraz Optik Eksenler Geometrisi.....	5
Şekil 2.2. Paralel Optik Eksen Geometrisinin Şematik Gösterimi.....	7
Şekil 2.3. Sabit bir y değeri için deforme ızgara görüntüsünün uzamsal frekans spektrumları.....	9
Şekil 2.4. $h(x,y) \neq 0$ 'da ızgara deseni.....	9
Şekil 2.5. $h(x,y) = 0$ 'da ızgara deseni.....	9
Şekil 3.1. Beyaz Işık İnterferometresi Düzeneği.....	12
Şekil 3.2. Projektör, kamera ve mikroskoptan oluşan deney düzeneği.....	13
Şekil 3.3. 3D profil ve yer değiştirme ölçümü için kurulan optik mikroskop.....	14
Şekil 3.4. BKFM kurulumu.....	15
Şekil 3.5. (a) İnterferometre kurulumunun şematik gösterimi; (b) Fourier düzlemine geçen görüntünün karakteri ve filtrelenmesi; (c) kullanılan filtrenin genel görünümü.....	15
Şekil 3.6. Atomik Kuvvet Mikroskopu Çalışma Prensibi.....	16
Şekil 3.7. Mikrofabrik silikonlu AFM kantilleri ve uç şekilleri SEM görüntüleri.....	17
Şekil 3.8. Atomik Kuvvet Mikroskopu Şematik Gösterimi.....	18
Şekil 3.9. AFM Örneği İncelerken Görüntüsü.....	18
Şekil 3.10. AFM'nin çalışma prensibini gösteren şematik diyagram.....	19
Şekil 3.11. Kuvvet ve mesafe arasındaki ilişki.....	20
Şekil 3.12. Elektron tabancası, kondenser merceği, örnek, XY bobinleri, ikincil elektron detektörü, geri saçılmış elektron dedektörü, X ışını detektörü gösteren SEM şematik gösterimi.....	22
Şekil 3.13. Bir elektronun bir örneğine çarpmasının olası sonuçları.....	25
Şekil 4.1. BKFM düzeneğinin kurulumu.....	26
Şekil 4.2. Mikroskoptaki görüntünün kırınım ağından geçmesi sonucu oluşan kırınım deseni.....	27
Şekil 4.3. Laboratuvarında hazırlanan filtre.....	28
Şekil 4.4. Ağızdan alınan epitel doku (a) örneğin görüntüsü; (b) referans görüntüsü.....	29

Şekil 4.5. BKFM ölçüm sisteminde görüntülenen epitel hücrenin Fourier dönüşümü yöntemi ile elde edilen faz değerleri; a) 3D profil görünümü;	
b) karşıdan görüntüsü.....	30
Şekil 4.6. BKFM deney kurulumundan elde edilen (a) kırmızı kan hücresi görüntüsü;	
(b) referans görüntüsü.....	31
Şekil 4.7. BKFM ölçüm sisteminde lamel üzerine yayıyalar görüntülenen kan hücresinin Fourier dönüşümü yöntemi ile elde edilen yükseklik değerleri;	
a) 3D profil görünümü; b) karşıdan görüntüsü.....	32
Şekil 4.8. BKFM deney kurulumundan elde edilen iki lamel arasına konulan	
(a) kırmızı kan hücresi görüntüsü; (b) referans görüntüsü.....	33
Şekil 4.9. BKFM ölçüm sisteminde görüntülenen iki lamel arasına sıkıştırılan kan hücresinin Fourier dönüşümü yöntemi ile elde edilen yükseklik değerleri;	
a) 3D profil görünümü; b) karşıdan görüntüsü.....	34
Şekil 4.10. Kırmızı kan hücrelerinin görüntülenmesi için kullanılan AFM.....	36
Şekil 4.11. AFM Görüntüsü.....	36
Şekil 4.12. Bütün olarak AFM'nin şematik gösterimi.....	37
Şekil 4.13. AFM ile elde edilen kırmızı kan hücrelerinin görüntüsü.....	38
Şekil 4.14. Kırmızı kan hücrelerinin görüntülenmesi için kullanılan SEM.....	39
Şekil 4.15. SEM cihazında görüntü oluşumu için parametrelerin ayarlanması.....	39
Şekil 4.16. SEM görüntüsü.....	40
Şekil 4.17. SEM ile elde edilen kırmızı kan hücrelerinin görüntüsü.....	41

KISALTMALAR

BKFM	: Beyaz Işık Faz Kırınım Mikroskopisi
3D	: Üç boyutlu
DCM	: Diferansiyel çapraz çarpanı
CCD	: Yük Bağlısımlı Cihaz
LCD	: Sıvı Kristal Ekran
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
BEI	: Geri saçılmış elektron görüntüsü
SEI	: ikincil elektron görüntüsü
AFM	: Atomik kuvvet mikroskopu
FDP	: Fourier dönüşümü profilometrisi
STM	: Taramalı Tünel Oluşturma Mikroskopu
PSPD	: Pozisyona duyarlı foto diyot
FEG	: Alan Emisyon Tabancası
HRSEM	: Yüksek Çözünürlüklü SEM
CRT	: katot ışın tüpü
PBS	: Fosfat bakır salin
NABİLTEM	: Namık Kemal Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı
LFD	: İkincil elektron detektörü
GSED	: Gaz ikincil elektron detektörü

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını gerçekleştirmemi sağlayan ve tez çalışmalarım sırasında gösterdiği büyük ilgi ve yardımlarından dolayı danışmanlarım Sayın Doç. Dr. Tanju GÜREL ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özlem KOCAHAN YILMAZ'a tez çalışmalarım süresince her konuda yardımcı olan ve çalışmalarımın destek olan Fizik Bölümündeki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma

Çok teşekkür ederim...

Esra ERTÜRK

02/08/2018



GİRİŞ

Bu tez çalışmamın hedefi, farklı görüntüleme teknikleriyle kan hücresinin görüntüsünü elde etmektir. Öncelikle Beyaz Işık Faz Kırınım Mikroskopisi (BKFM)'nin kurulumu yapıldıktan sonra üç boyutlu kan hücresi morfolojisinin çıkarılabilmesi için Fourier Dönüşüm Profilometresi kullanılacaktır. Bu yöntemle mikrometre boyutunda ölçümler gerçekleştirilebilmektedir.

Takeda ve Mutoh 1983 yılında ızgara yansıtma tekniğini kullanarak aldığı Fourier dönüşüm profilometresi ile üç boyutlu (3D) yüzey profilini belirlemişlerdir. Bu metotta oluşturulan ızgara deseni analitik sinyale dönüştürerek faz dağılımı bulunur. Çapraz optik eksen geometrisi yönteminden faydalanarak cismin faz dağılımı yükseklik bilgisine dönüştürülür. Gerçek faz dağılımı için faza, faz düzeltmesi yapılmalıdır (Takeda ve Mutoh, 1983). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla, Fourier dönüşüm profilometrisine yeni filtreler eklenerek daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Nicchiotti 2014, Singh ve Sirkis 1994). Bu konudaki çalışmalar farklı ızgara desenleri oluşturulması ve algoritmaların geliştirilmesi ile ilgili konularda artarak kullanım alanları gelişmiştir (Berryman, Pynsent, ve Cubillo 2003, Kemaio 2007, Quan, Tay ve Shang 1999, Su ve Chen 2001, Vanherzeele, Guillaume, ve Vanlanduit 2005; Chen ve ark. 2007, Skydan, Lalor, ve Burton 2005; Leonardi, Rmiie, ve Lenarcic n.d. 2014).

2001 yılında, mikrometre boyutunda cisimlerin 3D ölçümlerinde LCD projektör ile mikroskoptan oluşan sistem kullanılmıştır (Quan ve ark. 2001). Ayrıca farklı interferometrik kurulumlar denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Leonhardt 2005; Endo, Yasuno, ve Makita 2005; Blunt 2006). Literatürde ızgara yansıtma tekniğini kullanarak daha iyi ölçüm sonuçları almak için beyaz ışık kaynağı kullanılmıştır (Reolon ve ark. 2006). 2006 yılından itibaren Gabriel Popescu bu konuda çalışmalar yapmıştır. Kırmızı kan hücresi ile nano ölçekli yapıların yüzey profillerini incelemiştir (Popescu 2008, 2011, Popescu ve ark. 2006). Işık, ışın bölücü kullanılarak ikiye ayrılmış sonra birleştirilmiş ve elde edilen ızgara desenine ait görüntüler kaydedilmiştir. Bilgisayara aktarılıp analizleri yapılmıştır (Thian ve ark. 2007).

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda analiz birimlerinde ve deney düzeneklerinde yapılan değişikliklerle sonuçların daha iyi olması için çalışılmıştır. Mercekler, kamera, ışık kaynağı, yansıtıcı, ışın bölücü ve geçirgen aynaların kullanım durumuna ve kullanım şekline göre farklı deney düzenekleri denemiştir (Li, Su, ve Chen 2010, Pham ve ark. 2011, Xue ve

ark. 2011, Yaqoob ve ark. 2011; Shi ve ark. 2013). Ayrıca interferometrik kurulum ile pek çok çalışma yapılmıştır (Dong ve Lu 2012, Xia, Pan, ve Zhang 2014). Aynı yıllarda, BKFM (Beyaz Işık Kırınım Faz Mikroskopi) adı verilen ölçüm sistemi kullanarak kırmızı kan hücrelerinin kantitatif faz ölçümü gerçekleştirilmiştir (Pham ve ark., 2011; Pham ve ark. 2013; Bhaduri ve ark. 2014; Yaqoob ve ark. 2011). Bu kurulum ile cisim ve referans için kaydedilen birer görüntüden mikrometre ölçeğinde bir cismin yüzeyinin morfolojisi kantitatif olarak belirlenebilmektedir. L. Thomas 2015’li yıllarda Mach- Zehnder interferometresiyle faz hesaplanması üzerine yaptığı çalışmalarda ışık ışının, kırılma indisi değişen ortamda yayılması ve yayılırken kat ettiği çapraz yolun uzunluğuna bağlı ve orantılı faz kazanmasını kullanmıştır (Thomas ve ark. 2015). Bu yıllarda, interferometrik olmayan görüntü çözümleri ve eğimi yüksek olan yüzeylerin çözümleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır de (Groot 2015, Sharma M.K ve ark. 2015).

Izgara yansıtma tekniği ile yüzey morfolojisi ölçüm yöntemi CCD, görüntü oluşturma birimi ve görüntü analiz birimlerinden oluşur (Gorghi ve Rastogi 2010). Örneğin üzerinde ızgara deseni ile görüntüsü oluşturulur. Cismin yüksekliğinden dolayı ızgara deseninde eğilmeler meydana gelir. Bu görüntünün bir satırı dalga denklemi ile tanımlanabilir. Dalga denkleminin fazı, ızgara desenindeki eğriliklere karşılık gelir. İntegral dönüşümler ile bu görüntüden faz hesaplamak mümkündür. Analiz birimi bu işlevi yerine getirir. (Su ve Chen 2001; Kocahan 2008). Analiz edilen görüntüden elde edilen faz bilgisi yüksekliğe dönüştürülerek cismin yüzey morfolojisi oluşturulur (Takeda ve Mutoh 1983).

BKFM ölçüm sistemi inverted mikroskop, CCD kamera ve Mach-Zehnder interferometreden oluşur (Pham ve ark. 2013). Izgara deseni deney kurulumunda oluşturulur ve elde edilen interferogram CCD kamera ile kaydedilir. Analiz işlemleri yapılarak örneğin faz bilgisi elde edilir

Bu çalışmada öncelikle mikrometre boyutundaki cisimler için mikroskop, CCD kamera ve Mach-Zehnder benzeri interferometreden oluşan BKFM ölçüm sistemi kullanılacaktır. Alınan görüntülerin Fourier Dönüşümü ile analizi yapılarak faz bilgisine ulaşılabilecektir.

Manfred Von Ardenne 1937’de yüksek çözünürlüğe sahip gerçek anlamda taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope - SEM) icat etmiştir. SEM cihazının çalışma prensibi şöyle açıklanabilir: incelenecek örnek SEM ünitesine yerleştirilip sistemin vakumlama işlemi başlatılır ve bu işlem tamamlandığında örneğin özelliklerine göre voltaj değeri ayarlamaları yapılır, cihaz gerilimi yüksek değerlere çıkarılır. Örnek ile elde edilen

elektron demeti etkileşimi sonucunda monitörde görüntü oluşur. Örnek tutucu X, Y, Z yönlerinde hareket ettirilerek incelenecek bölge tespit edilir. İstenilen büyütme için odaklama ve netleştirme ayarları yapılır. Örnek üzerinde geri saçılmış elektron görüntüsü (BEI), ikincil elektron görüntüsü (SEI), X-ışınları görüntüleri elde edilir. Görüntü kayıtları alınır. EDS ünitesi kullanılarak yapılabilecek analizler (nokta, seçilmiş alan ve çizgi analizleri) örnek üzerinde gösterilir.

1986 yılında Binning, Gerber ve Quate ilk atomik kuvvet mikroskopunu (AFM) geliştirdiler. AFM esnek yapıda olan bir manivela ve gözle görülemeyecek kadar küçük olan sivri uçtan oluşur. Uç örnek yüzeyine yeterince yaklaşıncaya yüzeyle aralarındaki kuvvetler manivelanın bükülmesine sebep olur. Bükülme manivela ucundan detektöre yansıtılan lazer ışını ile ölçülür. Bükülme kuvvetle orantılı olduğundan, bükülme ölçüldüğünde kuvvette ölçülmüş olur. Manivela yüzeyi tararken yüzeydeki tepe ve çukurlukları algılar. Uç yüksekliği sabit olursa yüzeye zarar verebilir. Bu yüzden X ve Y yönlerinde hareketle tarama yapılırken, Z yönünde hareketle yükseklik ayarlanır. Bükülmeler bilgisayara kaydedildiği zaman yüzeyin topoğrafyası da çıkarılmış olur.

Bu çalışma 6 bölümden oluşmaktadır. Giriş bölümünde konunun kısaca anlatımından sonra, ikinci bölüm de çalışmada faydalanılacak Fourier dönüşümü ile ilgili kuramsal temeller verilmiştir. BKFM ölçüm sisteminin kurulumu ve görüntü oluşumu, AFM görüntü hazırlığı ve oluşumu ve SEM görüntü hazırlığı ve oluşumu üçüncü bölümde anlatılmıştır. Dördüncü bölümde deney kurulumları ve hazırlıkları açıklanarak, görüntü elde etmek için yapılan çalışmalar anlatılmıştır. Bulgular ve çalışmanın sonuçları beşinci bölümde ve yararlanılan kaynaklarda altıncı bölümde verilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Fourier Dönüşüm Profilometresi

Izgara deseninden faz dağılımının bulunmasında pek çok teknik kullanılmıştır. Fourier dönüşümü profilometrisi (FDP) adı verilen ve bilgisayar ile otomatik ölçüm için daha iyi bir yöntem olan bu teknik diğer, ölçümlerdeki hantal gereksinimlere ihtiyaç duymamaktadır. Adını matematikçi Joseph Fourier'den almıştır. Takeda ve Mutoh matematiksel işlemler kullanarak üç boyutlu profil belirleme işlemini ilk olarak kullanmışlardır (Takeda ve Mutoh 1983). Başlangıçta bilgisayar işlemi yerine insan gözlemi tarafından saçak analizi için geliştirilen bir Moire tekniği ile ölçme kullanılmaktaydı. FDP yöntemi, Moire tekniğinden çok daha yüksek bir hassasiyete sahip olması açısından avantajlıdır (Moore ve Truax,1979).

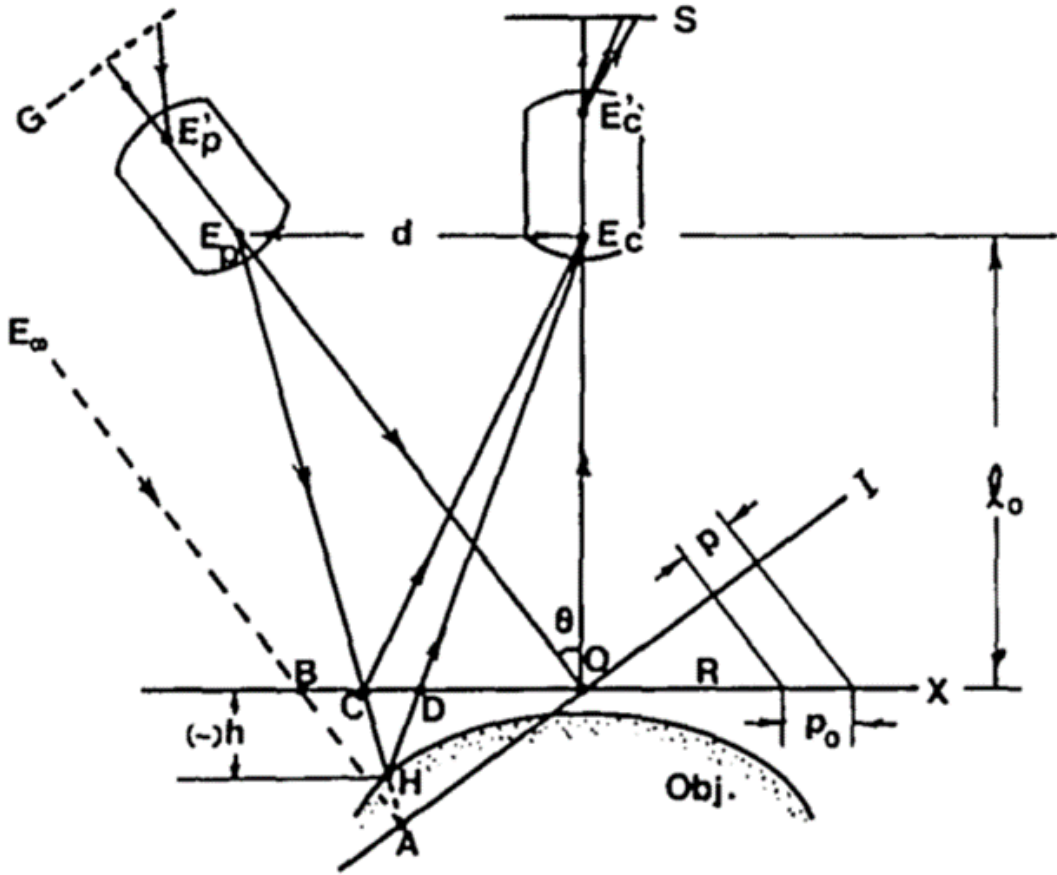
FDP çapraz optik eksenler geometrisinde, bir projektörün ve bir kameranın optik eksenleri aynı düzlemde bulunur ve nesnenin merkezine yakın bir noktada kesişir. Bu geometrinin oluşturulması kolaydır, çünkü bir ızgarayı ve bir görüntü algılayıcıyı sırasıyla projektörün ve kameranın optik eksenlerine yerleştirebilirsiniz, ancak yalnızca optik telesentrik olduğunda düzlemsel desenler verir. Paralel optik eksenler geometrisinde, bir projektörün ve bir kameranın optik eksenleri aynı düzlemde bulunur ve paraleldir. Bu geometri düzlemsel konturlar verir ancak ızgaranın görüntünün gözlem kamera alanı içinde oluşturulmasını sağlamak için ızgaranın, projektörün optik ekseninden çok uzakta olması gerekmektedir. Bu iki optik geometri seçeneği de mevcuttur FDP'de ve buna ek olarak FDP çapraz-optik eksenler geometrisinde düzlem dışı desen sorununu çözebilir (Takeda ve Mutoh 1983).

Yeni filtreler, renkli ızgara deseni kullanımı ile ilerleyen yıllarda çalışmalar devam etmiş ve daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (Berryman, ve ark. 2003, Kemaio 2007, Quan, Tay, ve Shang 1999, Su ve Chen 2001;Chen ve ark 2007.;Skydan ve ark.2005).

2.2. Çapraz Optik Eksenler Geometrisi

Şekil 2.1, projeksiyonun optik eksenleri E_p E'_p , kameranın optik eksenleri E_c E'_c ile normal olan hayali bir düzlem olan R referans düzlemi üzerindeki 0 noktasındaki çakışır ve nesnenin yüksekliği $h(x,y)$ ölçülür. Izgara deseninin çizgileri R düzlemine normaldir ve eşlenik görüntüsü (periyot p ile) projektör merceği tarafından oluşturulur; E_p , ve E'_p , sırasıyla, projeksiyon merceğinin giriş ve çıkış merkezlerini belirtir. Giriş ve çıkış E_c ve E'_c noktalarındaki kamera merceği, referans düzlemi R, görüntü düzlemi S'dir. E_p ve E_c üzerindeki görüntüler R düzlemi ile aynı mesafede (ℓ_0 kadar) bulunur. Düzlem R düz ve düzgün bir

düzlem olduğunda, $h(x,y)=0$ ve E sonsuz (telesentrik bir projektör için E ile gösterildiği gibi) ise, düzlem yüzeyinde yansıyan ve E noktası boyunca izlenen ızgaralı görüntü, düzenli bir ızgara modelidir (Takeda,1982).



Şekil 2.1. Çapraz Optik Eksenler Geometrisi (Takeda ve Mutoh,1983)

Fourier serisi aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$G_t(x, y) = \sum_{-\infty}^{+\infty} A_n \exp(2\pi i n f_0 x) \quad (2.1)$$

$$F_0 = 1/P_0 = \cos\theta / p \quad (2.2)$$

F_0 gözlenen ızgaralı görüntünün temel frekansdır ve P_0 ızgara genişliğidir. X ekseninde olduğu gibi seçilir ve y ekseninde şekil düzlemine normaldir. E_p , sonlu uzaklığa sahipse, görüntü düzleminde, $h(x, y) = 0$ için bile x ile artan bir aralıkta deforme olmuş ızgara görüntüsünü gözlemlenir ve x ekseninde bir kayma oluşur (Takeda ve Mutoh,1983). $h(x,y) = 0$ için deforme ızgara görüntüsü

$$g_0(x, y) = \sum_{-\infty}^{\infty} A_n \exp\{2\pi i n f_0 [x + S_0(x)]\} \quad (2.3)$$

şeklinde yazılabilir. Burada $s_0(x) = BC$, x'in bir fonksiyonudur ve şekildeki gibi olduğunda C, B'nin sağındayken pozitif bir işareti vardır. (2.3) denklemini faz modülasyonlu sinyal olarak:

$$g_0(x, y) = \sum_{-\infty}^{\infty} A_n \exp\{i[2\pi n f_0 x + n\varphi_0(x)]\} \quad (2.4)$$

$$\varphi_0(x) = 2\pi f_0 s_0(x) = 2\pi f_0 \overline{BC} \quad (2.5)$$

ifade edebiliriz.

Çapraz optik eksen geometrisi, Moire topografyasında kullanıldığında, kaynaklanan $\varphi_0(x)$ faz kaymasından ancak projektör sonsuza yerleştirilirse söz edilmez. Bu, telesentrik optik eksen geometrisinin moire topoğrafyasına uygulanması kolay bir yapıya sahip olmasına rağmen büyük bir kısıtlama getirmiştir. FDP'de, bu başlangıç faz modülasyonu otomatik olarak düzeltilir.

Cismin yüksekliği $h(x,y)$ sıfırdan farklı ise, temel ışını E_p , A - H noktasında nesne yüzeyine vurur ve H noktası, E_c boyunca gözlemlendiğinde R düzlemi üzerinde bir D noktası olarak görülür. Dolayısıyla, genel bir nesne için ızgara deseni,

$$g(x, y) = r(x, y) \sum_{n=-\infty}^{\infty} A_n \exp\{2\pi i n f_0 [x + s(x, y)]\} \quad (2.6)$$

veya

$$g(x, y) = r(x, y) \sum_{n=-\infty}^{\infty} A_n \exp\{i[2\pi n f_0 x + n\varphi(x, y)]\} \quad (2.7)$$

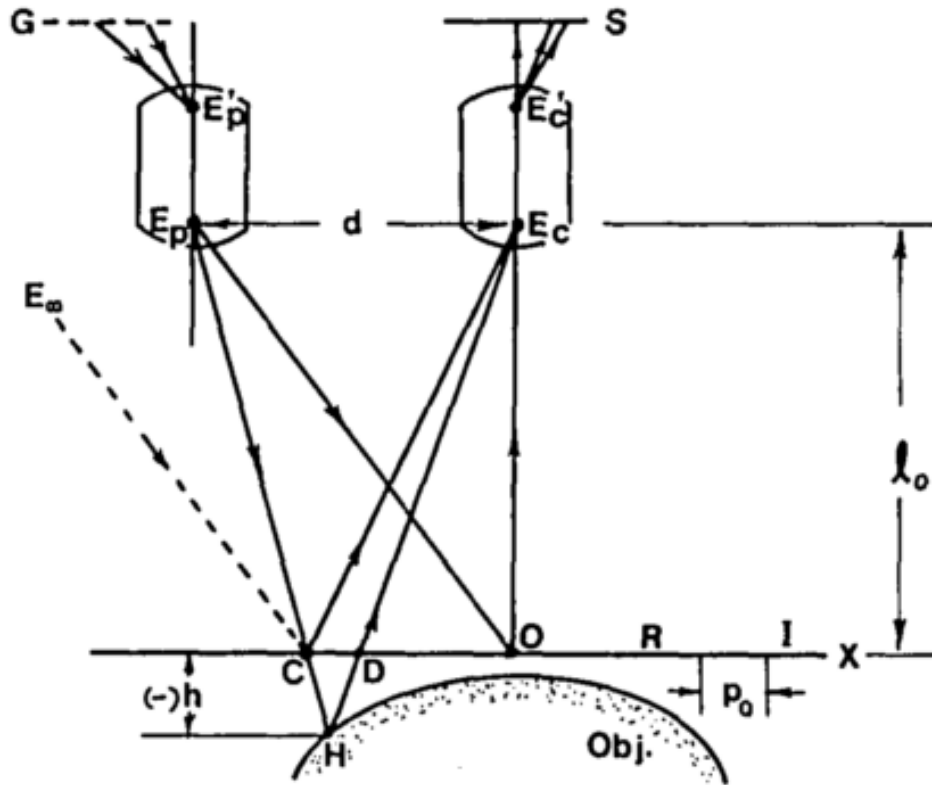
şeklinde ifade edilir. $r(x,y)$ nesne yüzeyinde yansımanın düzensiz dağılımıdır,

$$\varphi(x, y) = 2\pi f_0 s(x, y) = 2\pi f_0 \overline{BD} \quad (2.8)$$

ise iki boyutlu faz dağılımıdır.

2.3. Paralel Optik Eksenli Geometri

Şekil 2.2'de paralel optik eksenli geometri gösterilmektedir. Projektör merceği $E_P E_P'$ ve kamera lensi $E_C E_C'$ paraleldir ve referans düzlemi R'ye normaldir.



Şekil 2.2. Paralel Optik Eksen Geometrisinin Şematik Gösterimi (Takeda ve Mutoh,1983)

Izgaranın G birleşim görüntüsü R düzleminde ve Şekil 2.1'deki üç nokta A, B ve C Şekil 2.2'deki C noktasında birleştirilmiştir. Dolayısıyla, $h(x,y)=0$ düzleminde yansıtılan izgaranın görüntüsünü görüş alanına dahil etmesi için izgaranın projektör lensinin optik ekseninden çok uzakta olması gerektiği için optik kurulum kullanışlı değildir.

2.4. Fourier Dönüşümü

Denklem 2.7'de verilen deforme olmuş ızgaralı görüntü hem faz hem de genlikte modüle edilen mekansal taşıyıcı frekansları ile çoklu sinyaller olarak yorumlanabilir. Faz ölçülecek 3D şekil hakkında bilgi taşıdığından, problem nesne yüzeyindeki düzgün olmayan yansıma sebebiyle istenmeyen genlik değişimi $r(x,y)$ 'den ayrı olarak fazın nasıl elde edileceğidir. Deforme olmuş ızgara deseni aşağıdaki gibi yeniden yazılabilir:

$$g(x, y) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} q_n(x, y) \exp(2\pi i n f_0 x) \quad (2.9)$$

$$q_n(x, y) = A_n r(x, y) \exp[in\varphi(x, y)] \quad (2.10)$$

Bir FFT algoritması kullanılarak, y değeri sabit alınarak x değişkeni yönünde denklem (2.10)'un 1 boyutlu Fourier dönüşümü alınır,

$$G(f, y) = \int_{-\infty}^{+\infty} r(x, y) \left[\sum_{n=-\infty}^{+\infty} A_n \exp(-i2\pi x(f - n f_0) + in\varphi(x, y)) \right] dx \quad (2.11)$$

elde edilir. Bu denklem

$$G(f, y) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} Q_n(f - n f_0, y) \quad (2.12)$$

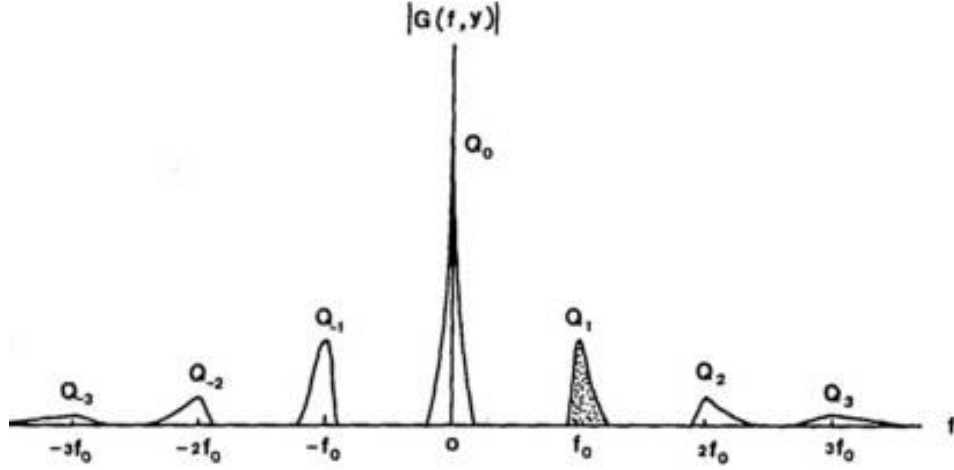
şeklinde ifade edilebilir.

$G(f,y)$ ve $Q_n(f,y)$ 'nin sırasıyla $g(x,y)$ ve $q_n(x,y)$ 'nin 1 boyutlu Fourier dönüşümleridir. Sadece x değişkenine ve diğerlerine göre hesaplanır, değişken y sabit bir parametre olarak kabul edilir. Çoğu durumda, $r(x,y)$, ızgara deseninin frekansına göre çok yavaş değiştiğinden, tüm spektrum $Q_n(f_n, f_0, y)$, taşıyıcı frekansı ile birbirinden ayrılmaktadır. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi, sadece ilk frekans bileşeni $Q_1(f_1, f_0, y)$ seçilip karmaşık bir sinyal elde etmek için ters Fourier dönüşümünü hesaplanırsa,

$$\widehat{g(x, y)} = q_1(x, y) \exp(2\pi i f_0 x) \quad (2.13)$$

$$= A_1 r(x, y) \exp\{i[2\pi f_0 x + \varphi(x, y)]\} \quad (2.14)$$

elde edilir.



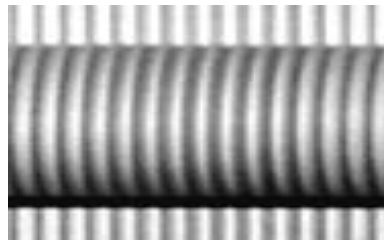
Şekil2.3. Deformasyona uğramış ızgara deseninin bir satırının frekans gösterimi (Takeda ve Mutoh,1983).

$h(x,y)$ yüksekliğinin sıfır olduğu durum için işlemleri tekrardan yaptığımızda denklem (2.14);

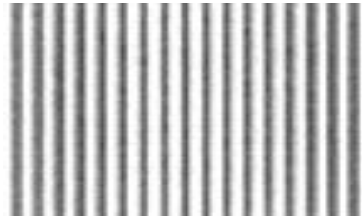
$$\widehat{g}_0(x, y) = A_1 \exp\{i[2\pi f_0 x + \varphi_0(x)]\} \quad (2.15)$$

şeklinde yazılabilir.

Şekil 2.4’de $h(x,y)$ yüksekliğinin sıfırdan farklı olduğu durumda ızgara deseninin görüntüsünü gösterilmiştir. Şekil2.5’deki ise $h(x,y)$ ’nin sıfır olduğu durumda ızgara deseni görüntüsüdür.



Şekil 2.4. Yüksekliği sıfırdan farklı olan ızgara deseni



Şekil 2.5. Yüksekliği sıfır olan ızgara deseni

Denklem (2.15)'in kompleks eşleniği ile denklem (2.14)'ün çarpımından,

$$\hat{g}(x, y)\widehat{g}_0^*(x, y) = |A_1|^2 r(x, y) \exp\{i[\Delta\varphi(x, y)]\} \quad (2.16)$$

elde edilir. Burada faz farkı $\Delta\varphi(x, y) = \varphi(x, y) - \varphi_0(x) = 2\pi f_0(\overline{BD} - \overline{BC}) = 2\pi f_0(\overline{CD})$

$$\Delta\varphi(x, y) = \tan^{-1} \left[\frac{Im(\hat{g}(x, y)\widehat{g}_0^*(x, y))}{Re(\hat{g}(x, y)\widehat{g}_0^*(x, y))} \right] \quad (2.17)$$

şeklinde hesaplanabilir.

Bilgisayar tarafından yapılan faz hesaplaması $-\pi$ ile π arasında değişen temel değerler verdiği için, faz dağılımı bu aralıkta alınmıştır ve sonuç olarak 2π 'den fazla varyasyonlar için 2π faz sıçramaları ile süreksizliklere sahiptir. Bu süreksizlikler π ile $-\pi$ arasında değişen faz atlamaına göre 2π ekleyerek veya çıkararak kolayca düzeltilebilir veya tam tersi yapılabilir. 2 fazlı bir faz dağılımı, y bölümleri için aynı işlemin tekrarlanmasıyla elde edilebilir. Bu işleme faz düzeltme adı verilir (Takeda ve Mutoh 1983).

2.5. Maksimum Ölçüm Aralığı

FDP, temel frekans bileşeninin sadece tek bir spektrumunu seçmek için filtrelemeye dayandığından, bu frekansı diğer tüm spektrumlardan ayırmak gerekir. Bu koşul, FDP tarafından ölçülebilen maksimum aralığı sınırlar. Denklem (2.7)'de $r(x, y)$ 'nin f_0 'dan daha yavaş değiştiğine dikkat edilirse, n . spektrum bileşeni için anlık bir FM sinyali frekansına benzer bir yerel uzamsal frekans f_n tanımlanır:

$$f_n = \frac{1}{2\pi} \cdot \partial/\partial x [2\pi n f_0 x + n\varphi(x, y)] \quad (2.18)$$

$$= n f_0 + \frac{n}{2\pi} \cdot \partial\varphi(x, y)/\partial x \quad (2.19)$$

Temel spektrumun diğer tüm spektrumlardan ayrılması için, gerekli olan;

$$(f_1)_{\max} < (f_n)_{\min} \quad (n=2, 3, \dots) \quad (2.20)$$

$$f_b < (f_1)_{\min} \quad (2.21)$$

Burada f_b , $(f_n)_{\max}$ ve $(f_n)_{\min}$ $n=1, 2$ ve 3 için Şek.2.5'de gösterilmiştir. Denklem (2.19)'u denklem (2.20) ve denklem (2.21)'de yerine yazarak aşağıdaki eşitlikler elde edilir.

$$f_0 + \frac{1}{2\pi} \cdot \left(\frac{\partial\varphi}{\partial x}\right)_{\max} < n f_0 + \frac{n}{2\pi} \left(\frac{\partial\varphi}{\partial x}\right)_{\min} \quad (n=2, 3, \dots) \quad (2.22)$$

$$f_b < f_0 + \frac{1}{2\pi} \left(\frac{\partial\varphi}{\partial x}\right)_{\min} \quad (2.23)$$

Daha güvenilir ve pratik durum aşağıdaki gibi elde edilebilir.

$$f_0 + \frac{1}{2\pi} \left| \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right|_{max} < n f_0 - \frac{n}{2\pi} \left| \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right|_{max} \quad (n=2,3,\dots) \quad (2.24)$$

$$f_b < f_0 - \frac{1}{2\pi} \left| \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right|_{max} \quad (2.25)$$

Burada; $|(\partial \varphi)/\partial x|_{maks}$ 'nin maksimum mutlak değeri $|[(\partial \varphi)/\partial x]_{maks}|$ ve $|[(\partial \varphi)/\partial x]_{min}|$ 'in değerlerinden daha büyüktür. Denklem (2.24) ve denklem (2.25)'ten aşağıdaki denklemler elde edilir.

$$\left| \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right|_{max} < (n - 1/n + 1) \cdot 2\pi f_0, \quad (n=2,3,\dots) \quad (2.26)$$

$$\left| \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right|_{max} < 2\pi(f_0 - f_b) \quad (2.27)$$

Çoğu durumda, f_b , $f_0/2$ 'den çok daha küçük ve $(n - 1)/(n + 1)$ n ile monoton olarak arttığından, sınır $n = 2$ için denklem (2.26) düzenlenir:

$$\left| \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right|_{max} < 2\pi f_0/3 \quad (2.28)$$

Maksimum ölçüm aralığı ele alındığında, $\varphi(x,y)$ 'nin $\varphi_0(x)$ 'den çok daha büyük olduğu düşünülerek aşağıdaki eşitlik yazılabilir:

$$\varphi(x, y) = \Delta \varphi(x, y) = (-2\pi f_0 d/l_0)h(x, y) \quad (2.29)$$

Burada $l_0 \gg h(x,y)$ alınmıştır. Denklem (2.29) denklem (2.28)'de yerine yazıldığında sonuç olarak aşağıdaki denklem elde edilir.

$$\left| \frac{\partial h(x,y)}{\partial x} \right|_{max} < 1/3 \cdot (l_0/d) \quad (2.30)$$

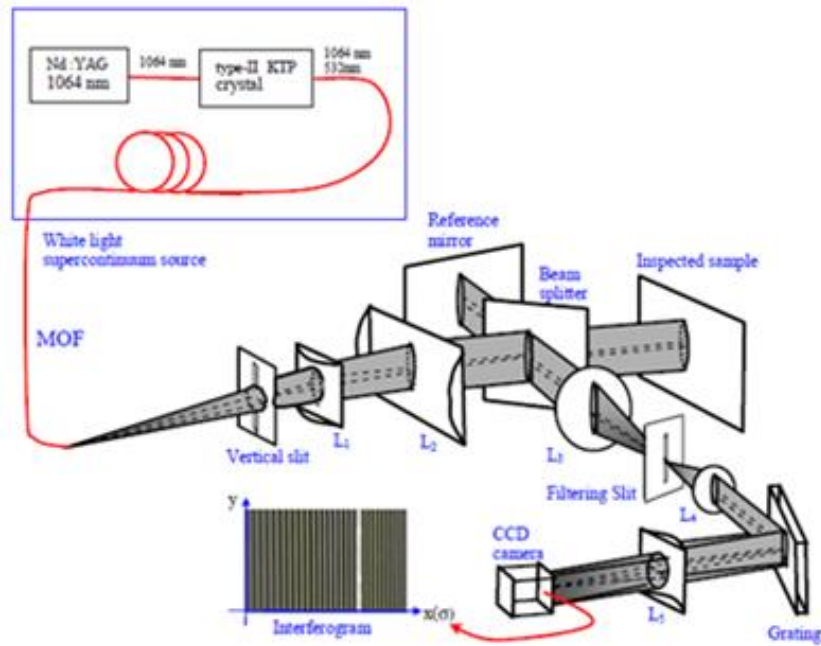
Bu durum, maksimum ölçüm aralığının, yükseklik dağılımı $h(x, y)$ 'nin kendisi ile sınırlı olmamakta, fakat onun ızgarası ile normal doğrultudaki türevi tarafından sınırlandırılmamaktadır. Maksimum ölçüm aralığı, fazın aşırı modüle edilmesini önlemek için l_0/d büyüklüğünde bir geometri kullanılarak genişletilebilir. Bu, Moire topografisinde saçak hassasiyetinin azaltılmasına karşılık gelir, ancak FDP, çoğu uygulama için, 2π 'den çok daha düşük bir faz dağılımını tespit edebildiğinden, yeterli bir duyarlılığa sahiptir (Takeda ve Mutoh1983).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Beyaz Işık Faz Kırınım Mikroskopisi (BKFM)

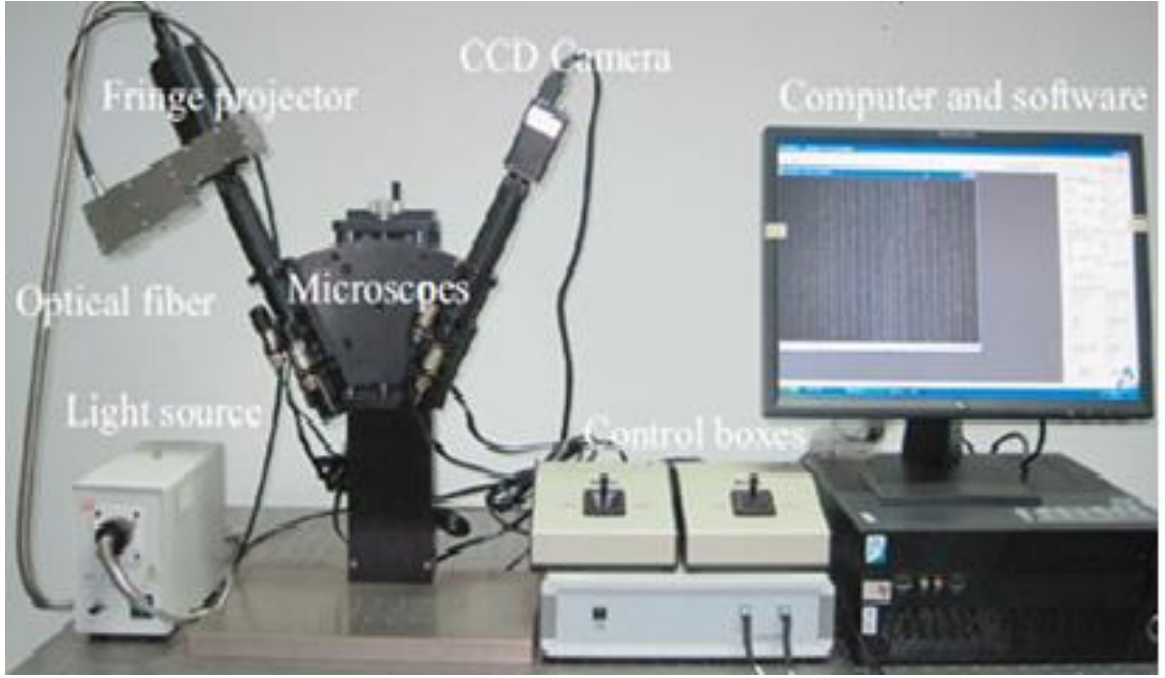
Beyaz Işık Kırınım Faz Mikroskopisi, Mach Zehnder İnterferometresi, kamera ve mikroskoptan oluşan bir sistemdir. Bu teknikte cisimle temas olmadan ızgara yansıtma tekniği ile mikrometre boyutunda ölçümler yapılabilmektedir. Farklı kurulumlar ya da ışık kaynakları ile ızgara deseni oluşturulabilmektedir. Bunun sonucunda karşımıza pek çok interferometre çeşidi çıkmaktadır. Fourier interferometresi (Endove ve ark.,2005), iki ışın interferometresi (Leonhardt ve ark.,2005), beyaz ışık interferometresi (Blunt 2006). Günümüzdeki interferometrelerin temelini Michelson İnterferometresi oluşturmaktadır. Çift merceklili interferometrelerden şu anda yüksek ayırma gücüne sahip beş merceğin birleşmesinden oluşan interferometrelere geçilmiştir. Yapılan ölçümlerin kalitesini arttırmak için farklı deney düzenekleri oluşturulmuştur.

Beyaz Işık İnterferometresinin Michelson İnterferometresinden farkı özel bir beyaz ışık kaynağı kullanılmasıdır. Şekil 3.1’de beyaz ışık interferometresinin düzeniği verilmiştir.



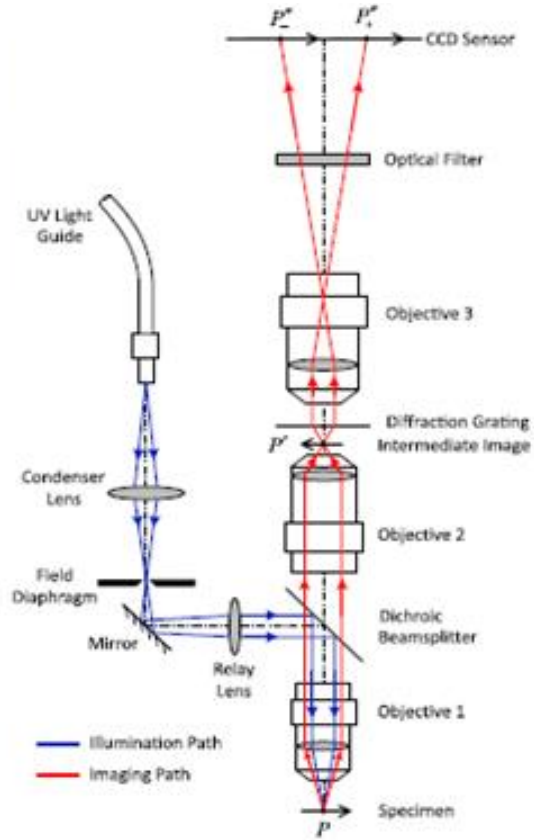
Şekil 3.1.Beyaz Işık İnterferometresi Düzenegi (Reolon ve ark.2006)

Şekil 3.2'deki gibi başka bir deney düzeneği ile mikrometre boyutunda ölçümler yapılmıştır. Düzenek projektör, CCD kamera ve mikroskoptan oluşmaktadır.



Şekil 3.2. Mikrometre boyutunda cisimlerin yüzey ölçümü için kurulan projeksiyon ve mikroskoptan oluşan deney düzeneği (Shi ve ark.2013)

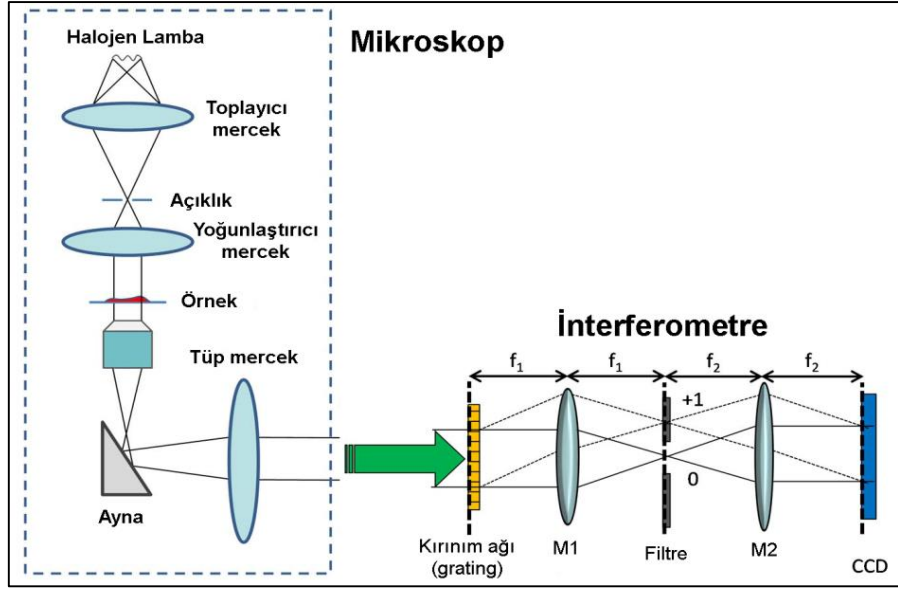
Şekilde 3.3'deki deney düzeneğine interferometrik kurulumla ve lens kullanarak mikrometre boyutunda ölçümler yapmak mümkündür (Xia ve ark.2014, Dong ve Lu 2012, Zwemer ve ark. 2006).



Şekil 3.3. Mikrometre boyutunda cisimlerin yüzey ölçümü için kurulan optik mikroskop (Xia ve ark. 2014)

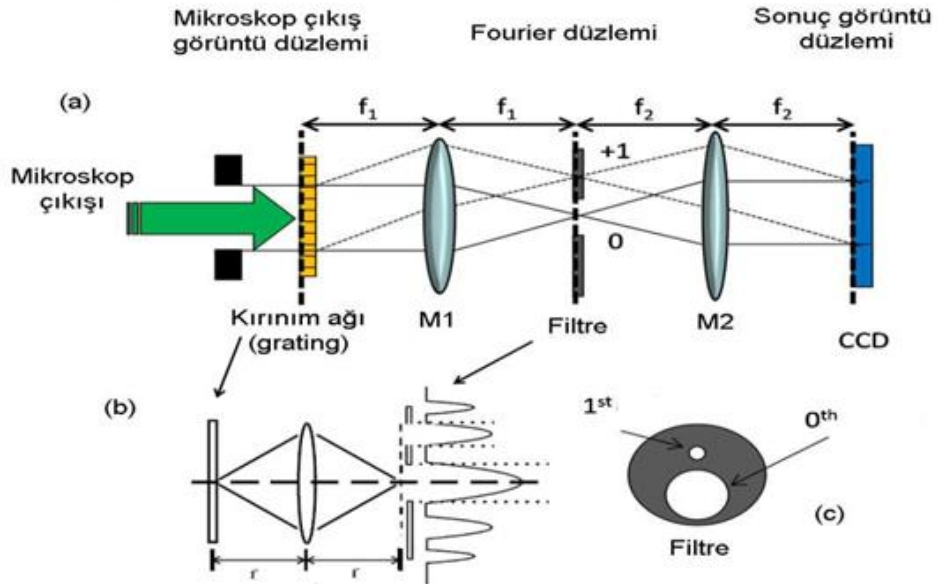
BKFM ölçüm sistemi kan hücrelerinin yüzey morfolojisinin belirlenmesi için tasarlanmıştır (Bhaduri ve ark. 2012, Pham ve ark. 2013). Durağan örnekler olmasa bile yeterince hızlı bir kamera ile alınacak bir örnek bir de referans görüntüsü ile kantitatif faz ölçümü BKFM ile mümkün olmaktadır

Mikrometre boyutundaki cismin 3D profilini oluşturabilmek için ilk olarak örneğin üzerine ızgara desenini yansıtmak ya da referans bir görüntü oluşturmak gerekir. BKFM (Pham ve ark. 2013) ölçüm sisteminde inverted mikroskop, Mach-Zehnder benzeri bir interferometre ve CCD kamera kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Beyaz ışık kırınım faz mikroskobisi şematik gösterimi (Pham ve ark. 2013)

Bu sistemde kullanılan interferometre şekil 3.5’de gösterilmektedir. Kırınım ağından geçen görüntü M1 merceğinde odaklanarak filtre üzerine düşürülür. Merkez ve +1 ya da -1 görüntü filtreden geçirilir. Filtreden geçen iki görüntü M2 merceğine gelir. Sonra da CCD kamera üzerinde çakıştırılır ve böylelikle girişim deseni yani interferogram oluşur. Oluşturulan cisim ve referans interferogramı, Fourier dönüşümü ile analiz edilerek cismin 3D profili elde edilir.



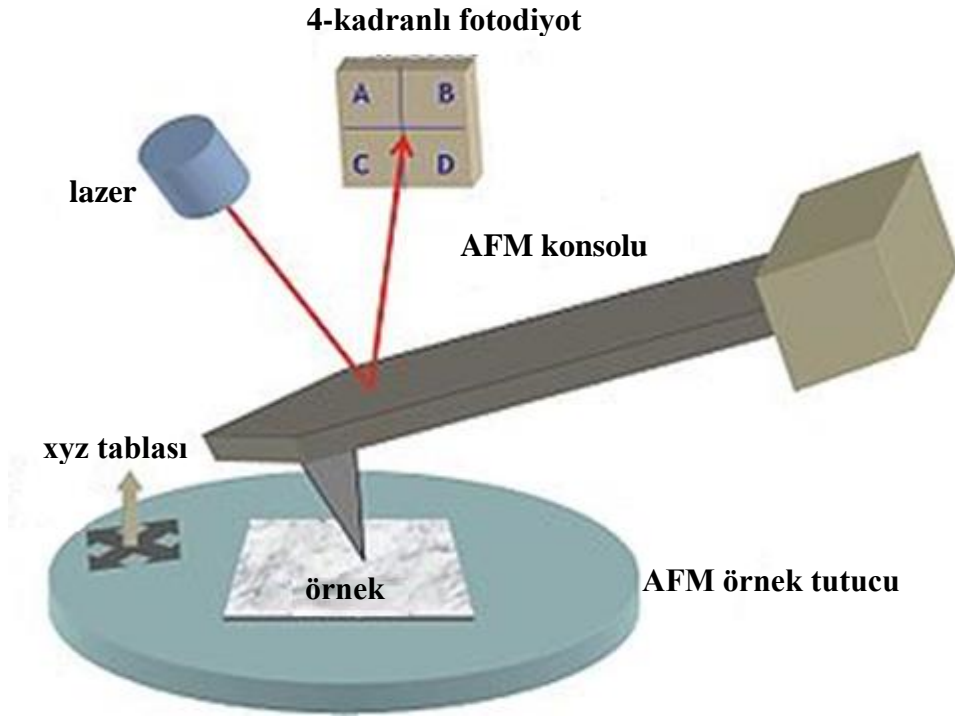
Şekil 3.5. (a) Mach Zehnder iterferometresinin kurulumu; (b) kırınım sonucu elde edilen görüntülerin filtrelenmesi; (c) filtrelemede kullanılan dairesel açıklık (Kocahan ve ark, 2017)

3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu

Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscope - AFM), örnek yüzeyinin bir topografik görüntüsünün, bir uç ve bir örnek yüzeyi arasındaki etkileşimlere dayanarak elde edilen tarama mikroskobudur. Normal bir optik mikroskoptan 1000 kat daha iyi görüntü elde edilmesini sağlar. AFM Gerd Binnig ve arkadaşları tarafından icat edildi. 1986'da IBM Zürih'e bağlı olarak, 1981'de sunulan STM (Taramalı Tünel Oluşturma Mikroskobu) iletken örneklerle bağliken, AFM aynı zamanda iletken olmayan örneklerin kullanılmasına da izin vermektedir. 1986 yılında yaptıkları çalışmalardan ötürü Fizik dalında Nobel Ödülü'ne layık görüldü. AFM, 1989 yılında ilk kez ticarileşmiştir.

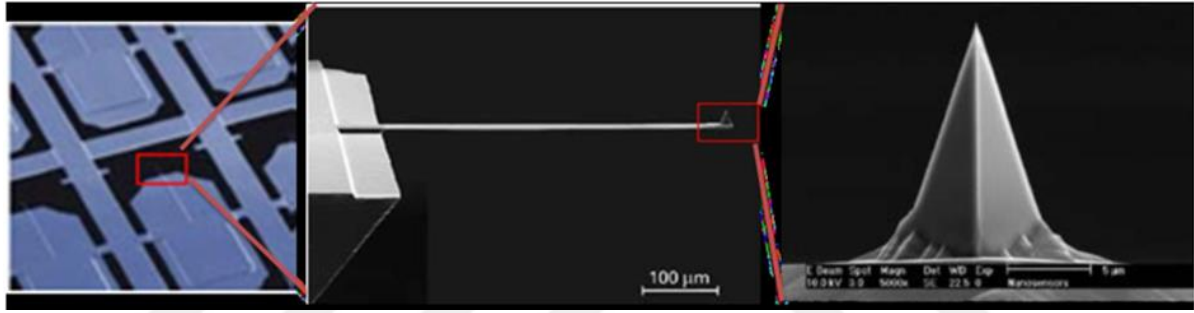
3.2.1. Atomik Kuvvet Mikroskopunun Çalışma Prensipi

Şekil 3.6'da görüldüğü gibi tipik bir AFM, serbest uça bir küçük uçlu (prob), bir lazer, bir 4-kadranlı fotodiyot ve bir tarayıcı içeren bir konsoldan oluşur. AFM pek çok amaç için kullanılabilen bir araçtır ve nano ölçekte yapılan ölçümler tercih edilir. 3D yüzey profillerinin ölçümü dışında pek çok yüzey ölçümünü de yapabilmektedir. Sulu ortamdaki canlı hücrelerini görüntüleyebilir. Kuvvet ve yer değiştirme ölçülebilir. Yükseklik-çözünürlük verileri angstrom ölçekte iken atomik çözünürlükte örnek üretebilmektedir



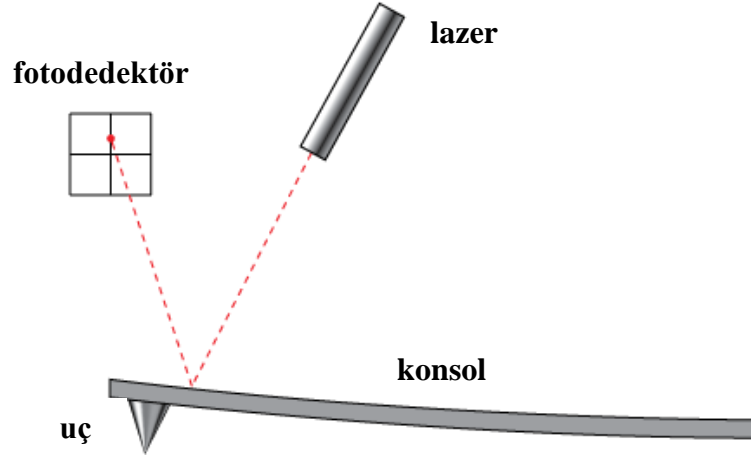
Şekil 3.6. Atomik Kuvvet Mikroskobu Çalışma Prensipi (www.doitpoms.ac.uk)

AFM'de örneğin yüzeyini tararken çubuk ve ucunda çok ince iğneden oluşan düzenek kullanılır. Yüzeğe iğne gereken miktarda yaklaştığında, yüzey iğne arası çekim kuvvetleri ile çubuk yüzeye doğru sapar. İğne yüzeye yaklaştıkça itme kuvveti artar ve çubuğun yüzeyden dışarı sapmasına sebep olur. Yapılan çalışmaya göre kullanılan iğne değiştirilebilir. Genellikle Silikon (Si) veya Si_3N_4 iğne ve çubuktan oluşan düzeneğin yapımında kullanılır. Uçta olan iğnenin kalınlığı genellikle 0.2 ile 10 nanometre arasındadır. Şekil 3.7'de AFM kantil ve uçlarının SEM görüntüleri görülmektedir (Wilson A.R. ve ark. 2006).



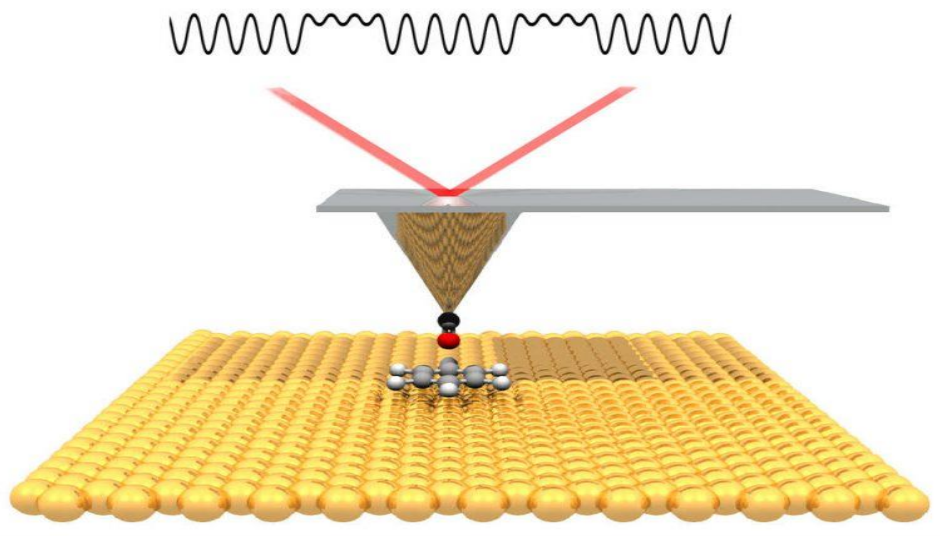
Şekil 3.7. Mikrofabrik silikonlu AFM kantilleri ve uç şekilleri SEM görüntüleri

Şekil 3.8'de gösterildiği gibi lazer ışını ile yüzeye yaklaştıkça veya yüzeyden uzaklaştıkça çubukta sapmalar görülür. Lazer ışını düzenekteki çubuk üzerinden yansır. Eğer yansıyan ışın açısında değişme olduysa çubuk hareket eder. Değişikliklerin tespitinde kullanılan foto diyot konuma duyarlıdır (Position sensitive photo diode, PSPD). Lazer ışınında olan sapmalar ile örnek yüzeyindeki girinti ve çıkıntılar nano ölçekte kaydedilir. Işındaki sapmalar ile yüzeyin konum bilgileri kaydedilmiş olur. Kabartmalı haritalara benzemektedir. Kabartmalı haritalardaki gibi konum yükseklik farklılıklarından örneğin nano yüzey haritası elde edilir (Wilson A.R. ve ark. 2006 ve Clementa.ve ark.2008).



Şekil 3.8. Atomik Kuvvet Mikroskopi Şematik Gösterimi

Şekil 3.9’da gösterildiği gibi itme-çekme kuvvetlerinden oluşan topografik harita oluşumu verilmiştir. Konsolun serbest ucuna tutturulan uç, yüzeye çok yakın geldiğinde, uç ve örnek yüzeyi arasındaki etkileşimler nedeniyle, konsolun negatif veya pozitif bir bükülmesine neden olarak, çekici ve itici kuvvetler ortaya çıkar. Bu eğilme, bir lazer ışınının yardımıyla tespit edilir. Uç örnek boyunca ilerledikçe, örneğin yüzey özelliklerine (örneğin topografya) göre yukarı ve aşağı hareket eder. Bu dalgalanmalar, uç ve örnek arasındaki etkileşimler (elektrostatik, manyetik, kılcal, Van der Waals) ile elde edilir. Ucun yer değiştirmesi ölçülür ve topografik bir görüntü elde edilir (Wilson A.R. ve ark. 2006 ve Clementa.ve ark.2008).

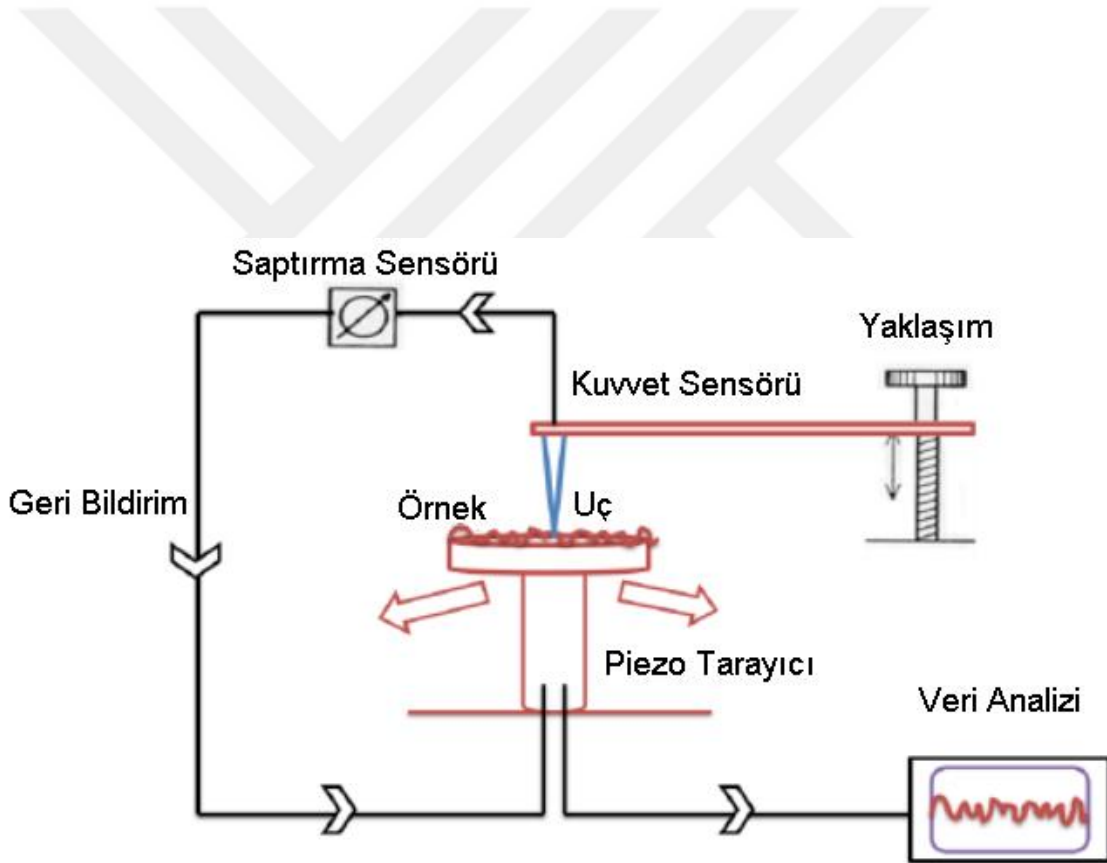


Şekil 3.9. AFM Örneği İncelirken Görüntüsü(www.bilimfili.com)

3.2.2. Resim Çekmek

Genel olarak AFM probunun hareketi yerine örnek piezoelektrik bir materyalle x, y, z yönünde hareket ettirilir. Piezoelektrik malzemeler (piezokristaller), bir voltaj uygulandığında büyüyeabilen veya daralabilen seramik malzemelerdir. Bu şekilde, x, y, z yönlerinde çok hassas hareketler mümkün olabilir (Pozisyon nanometre çözünürlükte kontrol edilebilir)

Bir lazer ışını, konsolun arkasına odaklanmıştır. 4 kadrant fotodiyot dedektörüne geri yansıtılabilir. Bu pozisyon duyarlı fotodiyot yardımı ile konsolun bükülmesi tam olarak ölçülebilir. Konsol ucu, numune ile uç arasındaki atomik kuvvet farklılıklarına göre sarp ve böylece detektör, sapmayı ölçer (Şekil 3.10). Oluşturulan görüntü, örnek yüzeyinin topografik bir örneğidir (Wilson A.R. ve ark. 2006 ve Clementa.ve ark.2008).

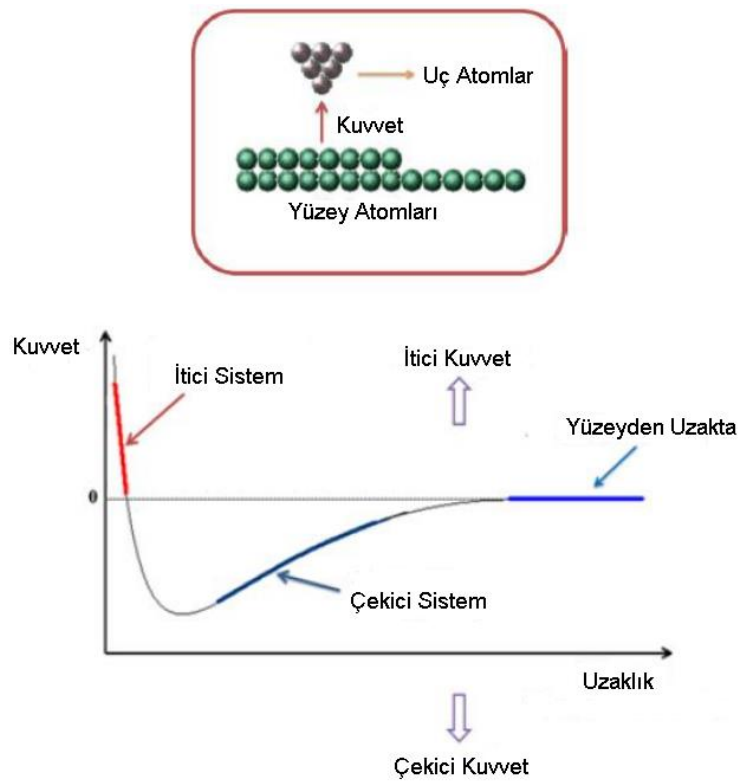


Şekil 3.10. AFM'nin çalışma prensibini gösteren şematik diyagram

3.2.3. Kuvvet-Mesafe Eğrisi

Ucu, örneğin yüzeyine yaklaştığında, van der Waals kuvvetleri çekmeye neden olur. Temassız bölgede, sonda ve yüzey arasındaki mesafe onlarca yüz Angstrom civarındadır. Bununla birlikte, mesafe kimyasal bağın uzunluğu kadar kısa olduğu için, yani birkaç angstromun itici colombik kuvvetleri baskın hale gelir. Temas bölgesinde, toplam Van der Waals kuvvetleri, pozitif çekirdekler ve elektron kabuklarının üst üste gelmesi (Pauli İlkesi) arasındaki etkileşim nedeniyle pozitifdir (itme kuvveti) (Wilson A.R. ve ark. 2006 ve Clementa.ve ark.2008). Kuvvet ve mesafe arasındaki ilişki Şekil 3.11'de gösterilmiştir.

AFM, katı-hal fiziği, polimer kimyası, yarı-iletken teknolojisi moleküler biyoloji, mühendislik, yüzey kimyası, hücre biyolojisi tıp gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Katı-hal fiziğinde AFM, örnek yüzeyindeki atomların tanımlanması, atom ve atoma komşu olan atomların etkileşimlerin incelemede ve atom manipülasyonu ile olan atomik düzenlemelerden oluşan fiziksel özelliklerdeki değişimleri incelenmesini kapsar. Hücresel biyolojide de ise AFM, hücrelerin sertliğine bakılarak kanser hücre ile normal hücreyi ayırabilme ve bir hücre ile komşu hücrelerinin etkileşimleri inceleyebilir. İletken çubuğun malzemesi ile elektrik potansiyellerine bakılabilir. Daha da gelişmiş sistemlerde, elektrik iletkenliği ölçümünde, alt yüzeyi taşımada iğne üzerinden akım iletilebilir.



Şekil 3.11. Kuvvet ve mesafe arasındaki ilişki (Şahin R. 2009).

3.2.4. AFM Ölçüm Teknikleri ve Görüntü Elde Etme Modları

AFM’de, yüzey özelliklerinin ölçümünü almak, yüzeyin topografyasını görmek, görüntü oluşturmak için bazı teknikler kullanılmaktadır. Mod adı verilen bu tekniklerin her birinde farklı yöntem kullanılmaktadır.

Temas modu AFM ile görüntü almada en basit mod temas modudur. Bu modda manavelanın ucu örneğe dokundurularak örnek X,Y yönlerinde hareket ettirilerek taranır. Tarama boyunca örnek yüzeyindeki yükseklik farkı centilevere gelen ışığın yansımaları değiştirir. Uç ile yüzey arasında temas olduğunda atomlar birbirine yaklaşık 10^{-9} N büyüklüğünde itme kuvveti uygulamaktadır. Bu değer sabitlenir. Değerde azalma olursa iğne boşluğa gelmiş demektir. Uç sabitlenen değere gelene kadar yüzeye yaklaşır. Eğer yükseklik artarsa uç yüzeyden uzaklaşmaya çalışır. Aynı şekilde yükseklik olan yerlerde kuvvet artacağı için tip uzaklaşmaya çalışır. Uçun gerekenden fazla kuvvet uygulaması atomların birbirine olan etkisini arttıracığından iğneye zarar verecektir. Yalıtkan ve yarı iletken malzemelerde ise elektrostatik şarj oluşmaktadır. Bu da hiçbir maddenin aslında tamamen temas halinde olmadığını gösterir (Arkaz H. 2017).

Temasız modda uç örneğe 50 ile $150A^0$ arası yaklaşır. Bu yakınlıkta uç ile örnek arasındaki Van der Waals kuvvetleri hesaplanarak tarama gerçekleştirilir. Tarama sırasında rezonans frekans veya yükseklik sabitlenir. Temaslı moddakine göre kuvvet düşük olduğundan çözünürlükte düşüktür. Alınan ölçümlerde, örnek ve uca zarar vermediğinden biyolojik örneklerde tercih edilir (Arkaz H. 2017).

AFM’de tıklatma modu en kullanışlı moddur. Diğer modlardaki zorlukları aşmış ve elde edilen görüntü topografyası yüksek çözünürlüktedir. Piezo hareketi ile Centileverin piezo hareketiyle saniyede 50.000 ile 500.000 arasında yüksek frekansla salınımını sağlar. Yüzeye yavaşça dokunacak kadar yaklaşarak tarama işlemi gerçekleştirilir. Yüzeye dokunduğunda ya da veya etkileşim olduğunda, salınım enerji değişiminden farklılık gösterir. Salınım farkı kaydedilerek bize yüzeye ilgili bilgi verir. Bu teknik kırılman ve yumuşak örnekler için idealdir (Arkaz H. 2017).

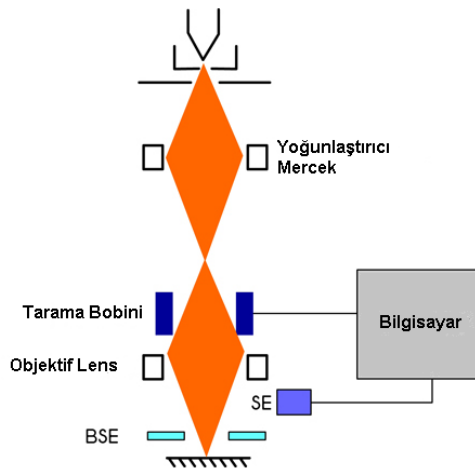
3.3.Taramalı Elektron Mikroskobu

3.3.1.Taramalı Elektron Mikroskopu Prensibi

Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) görüntünün elde edilmesi, yüksek gerilim ile hızlandırılan elektron demetinin örnek yüzeyinde taratılmasında örnekteki atomlar ve elektron arasındaki etkinin algılayıcı ile toplanıp sinyal güçlendiriciden geçtikten sonra katot ışını tüpünün ekranına aktarmakla olur. Sinyaller dijitale çevrilip monitöre aktarılabilir. SEM ayırım gücü, görüntü ile analizi birleştirmesi ve odak derinliği gibi özelliklere sahiptir. Kullanımının kolay olması, fiyatının uygun olması, geniş aralıkta bilgi sağlamasından dolayı kullanışlıdır (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007).

SEM örneği 100.000'den fazla kez büyütebilen çok güçlü bir mikroskop olduğundan lif kesitleri, kaplanmış yüzeylerin karakterizasyonunda, bütün mikro, nano ölçekteki katı malzemelerin analizinde kullanılır. Optik mikroskoplar sadece 1000 kez büyütme yeteneğine sahiptir ve ışığın kırınımı çözünürlüğü sınırlar. Görünür ışığın dalga boyu 400 - 700 nm arasındadır. Bu nedenle, daha küçük boyutlu nesnelere veya bazı özelliklere görünür ışık kullanılarak görülemez (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007).

Dalga-parçacık ikiliğine göre, tüm materyaller dalga ve parçacık özellikleri sergiler. Yüksek hızlarda hareket eden bir elektron, dikkat çeken dalga özellikleri sergiler. Özellikle, çok kısa dalga boyuna sahip bir dalga gibi davranır. Böylelikle, böyle bir dalganın kırınım çözünürlüğü çok iyi olacaktır. Bu SEM ilkesidir. Bir SEM'in basitleştirilmiş bir şeması şekil 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.12. Elektron tabancası, kondenser mercek, örnek, XY bobinleri, ikincil elektron detektörü, geri saçılmış elektron dedektörü, X ışını detektörü gösteren SEM şematik gösterimi (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007)

SEM, Manfred Von Ardenne liderliğinde 1930 yıllarında geliştirilmiştir. 1935 yılında Max Knoll ilk SEM'i üretmiştir. Pek çok alanda kullanımını mevcuttur. Isının farklı olduğu durumlarda metallerin dayanıklılığı belirlemede, tıpta doku ve hücre kültürlerinin incelenmesinde, kriminal uygulamalarda saç, iplik gibi delilleri incelemeye biyolojide bitki ve hayvan dokularının incelenmesinde, tekstilde kumaşların analizi ve liflerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Ticari olarak 1965'de ilk kez kullanılmıştır (Palucka T. 2002).

SEM, bir elektron tabancası (elektron kaynağıdır), elektron ışınının boyutunu kontrol etmek için bir elektron yoğunlaştırıcı mercekle, elektron ışını kontrollü bir şekilde hareket ettirmek için bir XY defekt bobini ve detektörlerden oluşur. "ikincil elektron detektörü" olarak adlandırılan bir elektron detektörü mevcuttur. Genellikle modern SEM'lerin çoğunda geri saçılan elektron detektörü ve x-ışını detektörleri bulunur (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007).

Elektron demetindeki elektronlar ile örnekteki atomların yaptığı elastik olmayan çarpışmayla oluşan ikincil elektronlardır. İkincil elektronlar örnek yüzeyin yaklaşık olarak 10 nm'lik derinliğinde meydana gelirler. İkincil elektronların enerjileri maksimum 50 eV kadardır. Foto çoğaltıcı tüp ile toplanıp, örneğe ait tarama sinyali konumu ile ilişkilendirilerek yüzeyin görüntüsü elde edilir (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007).

Bir diğer elektron grubu ise geri saçılma elektronlarıdır Yüzeye varan elektron demeti ve geri saçılma elektronları yaklaşık olarak 1800° açı saçılırlar. Bu elektronlar 300nm kadar yüzey derinliğinden gelen yüksek enerjiye sahip elektronlardır. Yüksek enerjili olduklarından fotoçoğaltıcı tüp ile tespit edilemezler. Katihal detektörleri ile tespit edilmektedirler. Bu Detektöre gelen elektronlar indükledikleri elektrik akım şiddetine bağlı olarak verir. Atom numarasına büyük olan atomundan saçılan elektronların enerjisi atom numarası küçük olandan daha yüksektir (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007).

Gelen elektron demeti ve örnek yüzeyin yaptığı diğer etkileşme yaklaşık 1000 nm derinlikte ve enerjileri de keV seviyesinde olan X ışınlarının çıktığı duruma aittir. Yüzeye çarpan elektron, örneğin atomunun iç yörüngesinden bir tane elektron kopmasına neden olur. Enerjide dengeyi sağlamak için üst yörüngesindeki elektron bu seviyeye geçiş yapar ve geçerken de ortama X ışını yayar Bu X ışınına karakteristik X ışını denir. Bu X ışını örneğin 10 mm² çapında Si (Li) detektörle algılanır, sinyal yükselticiye, sonra çok kanallı analizöre son olarak da SEM bilgisayarına gönderilir. Karakteristik X ışını incelenen malzemenin SEM'de nitel ile nicel cinsinden tespitini sağlar (<http://www.taek.gov.tr>).

3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskopu Kısımları

Elektron tabancası elektronları yayan bir tungsten filamentli olabilir. Daha pahalı elektron tabancaları, lantan heksaborat (LaB6) kullanır. Bunlar için, sıcak filament, görüntü için kullanılan termiyonik emisyon ile elektron üretir. Çok yüksek büyütme için Alan Emisyon Tabancası (FEG) adı verilen farklı bir elektron kaynağı kullanılır. FEG ile SEM genellikle Yüksek Çözünürlüklü SEM (HRSEM) olarak adlandırılır. Bu tipte, kaynak akım tarafından ısıtılmaz; bunun yerine, elektronları çok keskin bir tungsten kristali veya zirkonyum oksit olan kaynaktan elde etmek için bir elektrik alanı kullanılır. Elektronlar 1 ila 40 keV arasında bir enerjiye sahip olacaklardır (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007).

Tüm elektronlar negatif yüklüdür ve dolayısıyla bir ışındaki elektronlar birbirini itecektir. Bu ışın çapını artıracak ve görüntünün çözünürlüğünü olumsuz yönde etkileyecektir. Bu nedenle, elektrik bobinleri, ışını 5 nm veya daha az bir çapa sıkıştırmak için kullanılan bobinlere yoğunlaştırıcı mercekle bobinleri denir (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007).

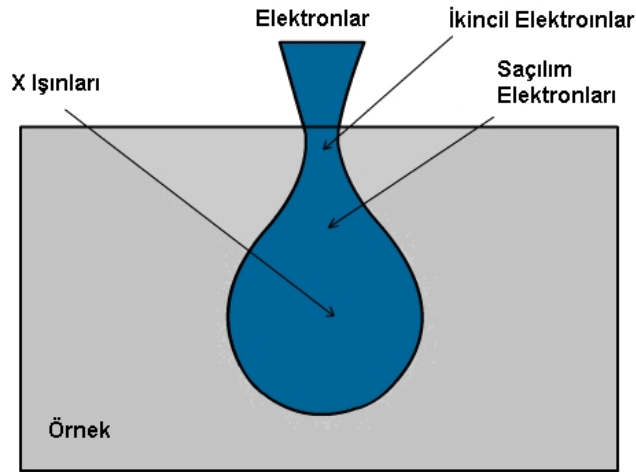
SEM ve optik mikroskoplar arasında kullanılan teknikler açısından birçok fark vardır. Bir elektron ışını optik mikroskopta ışık ile aynı şekilde kullanılmamıştır. Işık mikroskobu, tüm örnek (veya ilgi bölgesi) aynı anda yanar. SEM'de, kiriş ile sadece bir küçük nokta yanar. Daha sonra ışın, 'rasterleme' adı verilen bir işlemle küçük adımlarla (genellikle nm cinsinden) taşınır. Bu bir katot ışın tüpünde (CRT) hareketli elektron ışına benzer. Uygun elektrik alanı uygulayarak, kiriş X ve Y yönünde "yürüyüş" yapılabilir. Tüm örnek elektron ışını taranarak analiz edilir. Bu nedenle sisteme taramalı elektron mikroskobu denir. Elektron demetini hareket ettirmek için kullanılan bobinlere sapma bobinleri denir (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007).

3.3.3. Elektron ve örnek arasındaki etkileşim

Şekil 3.13'de görüldüğü gibi elektron ışını örneğe düştüğünde, atomlarla etkileşime girer ve güçlü elastik saçılma nedeniyle elektron yavaşlar. Atomlar enerjiyi emecek ve iyonlaşacak. Örnek atomlardan gelen elektronların bir kısmı serbest bırakılacaktır. Bunlara "ikincil elektronlar" denir. Genellikle elektron tabancasının birincil elektronlarına kıyasla daha düşük enerjiye (<50 eV) sahiptirler.

Elektron ışını yüzeye düştüğünde elektronlar dağılır ve ışın çapı artar. Bu nedenle, başlangıçta bir koni gibi yayılır ve yüzeyin altındaki alan da incelenir. Işın enerjisi, örneğin içinde daha derine inerken azalır. Üretilen ikincil elektronların sayısı da azalır.

Ayrıca, yüzeydeki elektronlar kolayca kaçar ve detektöre ulaşır. Alttan gelen elektronlar (oluk), yüzeye çıkmadan önce diğer atomlar tarafından yakalanabilir. Bu nedenle, oluktan sadece daha az ikincil elektronlar detektöre gelir. Genel olarak, detektördeki ikincil elektronlar yüzeyin üstünde üretilir. Elektron-numune etkileşimi sonucunda ikincil elektronlar, geri saçılmış elektronlar ve X Işınları açığa çıkabilir (Goldstein, J.ve ark. 2003 ve Zhou W.ve ark. 2007).



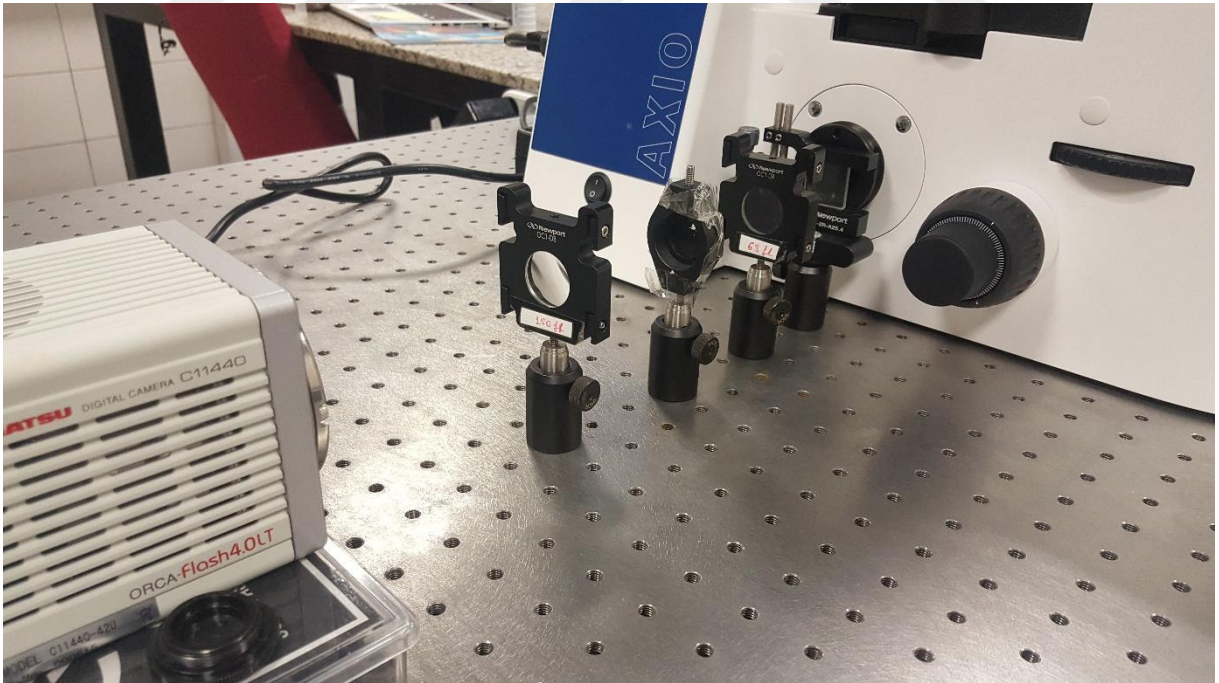
Şekil 3.13. Bir elektronun bir örneğine çarpmasının olası sonuçları

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada üç farklı ölçüm sistemiyle kırmızı kan hücreleri yüzey morfolojisi incelenmiştir. Öncelikle BKFM sistemi kurulmuş ve çalışmada kullanılan örneğin Fourier dönüşümüyle 3D yüzey bilgisi hesaplanmıştır. Daha sonra AFM ve SEM ile örneğin görüntüsünü almak için gereken hazırlıklar yapıp görüntü elde edilmiştir.

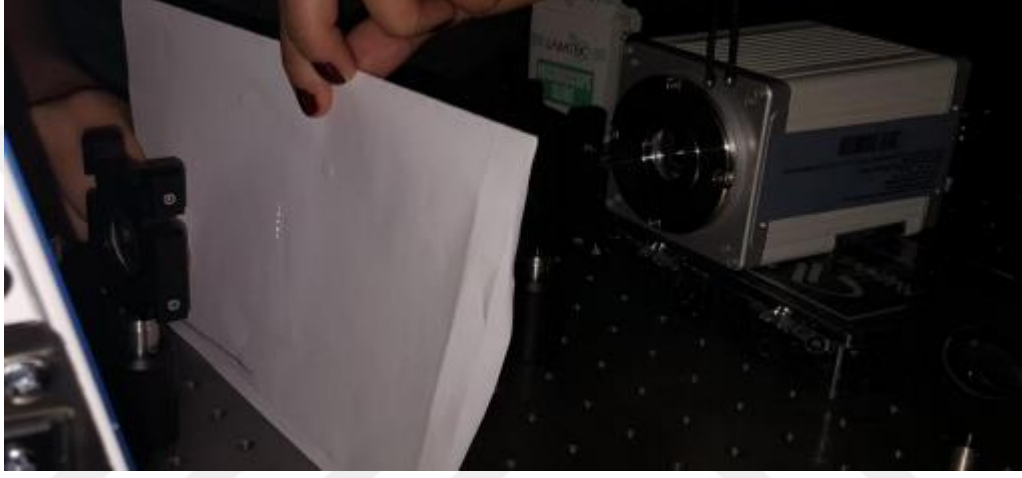
4.1. BKFM ile Görüntü Oluşumu

Kırmızı kan hücrelerinin kantitatif faz ölçümünü gerçekleştirmek için öncelikle örneğin ve referansın interferogramı oluşturulmalıdır. Bunun için, BKFM (Pham ve ark. 2013, Bhaduri ve ark.2014) ölçüm sisteminde halojen ışığa sahip Axio Observer A1, Zeiss inverted mikroskop ve Hamamatsu ORCA Flash CCD kamera kullanılmıştır. Şekil 4.1.' de BKFM düzeneği verilmiştir.



Şekil 4.1. BKFM düzeneğinin kurulumu

İlk olarak, kan örneğinden kaliteli bir görüntü almak için mikroskop odaklanarak ayarlamaları yapılmıştır. Kullanılacak örneğe göre objektif değiştirilebilir. Bu tez çalışmasında kırmızı kan hücrelerinin görüntülenmesi için 40X objektif tercih edilmiştir. Görüntüde oluşabilecek gürültüyü arttırabileceğinden mikroskoptaki beyaz ışık düşük seviyede olması tercih edilmiştir. İverted mikroskopta odaklanarak ayarlanan görüntü ilk olarak 110 çizgi/mm bulunan geçirgen bir kırınım ağına (grating) ulaşır. Burada oluşan kırınım deseni 63 mm odak uzaklığına sahip yakınsak M1 merceği ile odaklanır (Şekil 4.2).

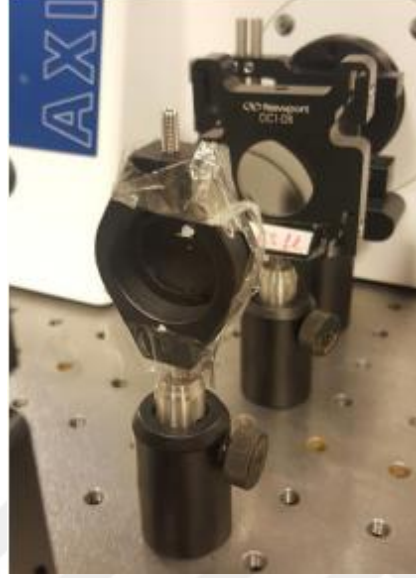


Şekil 4.2. Mikroskoptaki görüntünün kırınım ağından geçmesi sonucu oluşan kırınım deseni

Kırınım deseninde oluşan görüntünün beş tane bileşeni vardır. Oluşturulan görüntüler M1 merceği üzerinden filtreye (pinhole) düşürülür. 0. ve +1 veya -1. bileşen görüntüler filtreden geçirilerek 150mm odak uzaklığına sahip M2 ikinci merceğe düşürülür. Diğer bileşenlerin görüntülerin kamera üzerine düşmemesi sağlanır. Filtreleme işlemi çok önemlidir. Şekil 4.3.'deki filtre laboratuvarında hazırlanmıştır. 0.seviyede referans ışın için kullanılan açıklık $200\mu\text{m}$ yarıçapında ve dairesel şekildedir. ± 1 .seviyedeki ışının tamamen geçmesi için dikdörtgen şeklinde $5 \times 2 \text{mm}^2$ boyutunda açıklık yapılmıştır.

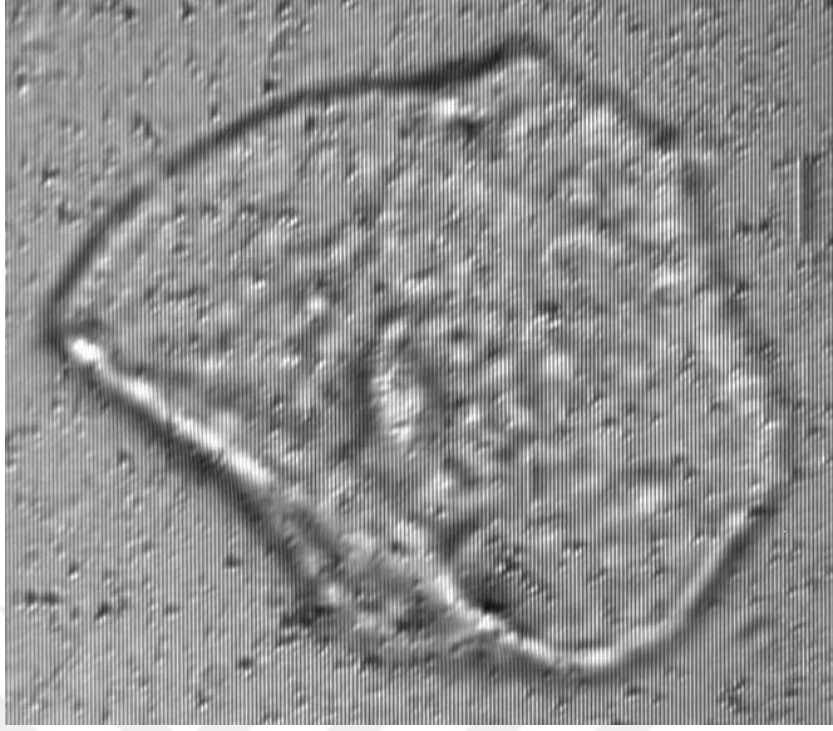
Filtreden geçen 0. ve ± 1 . bileşenler odak uzaklığı M2 merceği (yakınsak) kullanılarak CCD kamerada üst üste bindirilir ve interferogram (girişim deseni) meydana getirilir. Girişim deseni örnek üzerinde eğrilmeler oluşturduğundan yükseklik bilgisini taşımaktadır. Izgara deseninde oluşan eğrilmeler faza yani yüksekliğe karşılık gelir. Görüntü dalga denklemi

şeklinde yazılabilen optik sinyaldir. Bu interferogramdan Fourier dönüşümüyle 3D yüzey bilgisi hesaplanabilir.



Şekil 4.3. Laboratuvarda hazırlanan filtre

BKFM deney düzeneğinde iki farklı hücre için görüntüleme denenmiştir. İlk deneme epitel doku örneğinde de yapılmıştır. Çubuk yardımıyla alınan doku örneği lamel üzerinde yayılarak mikroskop odaklanır böylece interferometreden geçerek ve CCD üzerinde çakıştırılarak interferogram görüntü elde edilir (Şekil 4.4). Epitel doku görüntüsü ve bunun için alınan referans görüntüye Fourier dönüşümü uygulanarak her piksel için faz değerleri hesaplanmıştır. $\varphi_R(x,y)$ referans görüntünün ve $\varphi_O(x,y)$ cismin görüntüsünün faz değerlerinde süreksizlikler oluşmaktadır. Bu faz değerlerindeki süreksizlikleri düzeltmek için de faz düzeltme işlemi uygulanarak örnek cisim için bulunan faz dağılımı bilgisi $\varphi(x,y) = \varphi_O(x,y) - \varphi_R(x,y)$ cismin ve referans görüntünün faz dağılımlarının farkının alınmasıyla toplam faz dağılımı hesaplanmıştır ve Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.

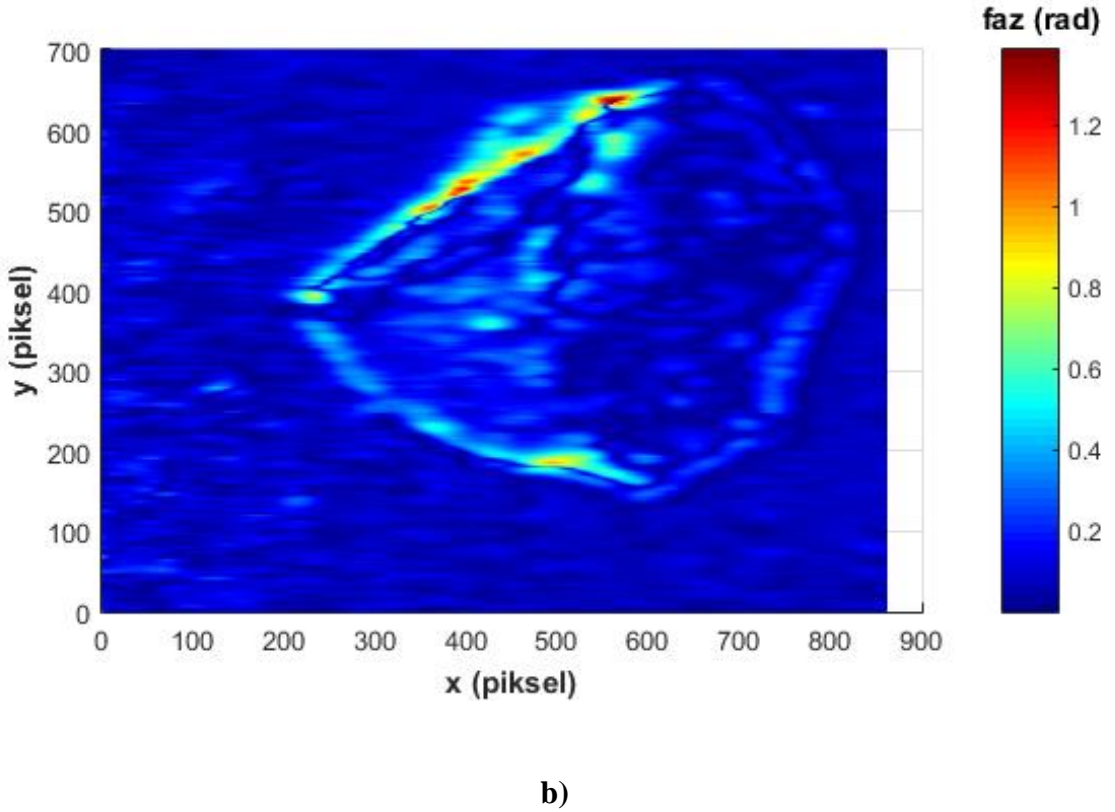
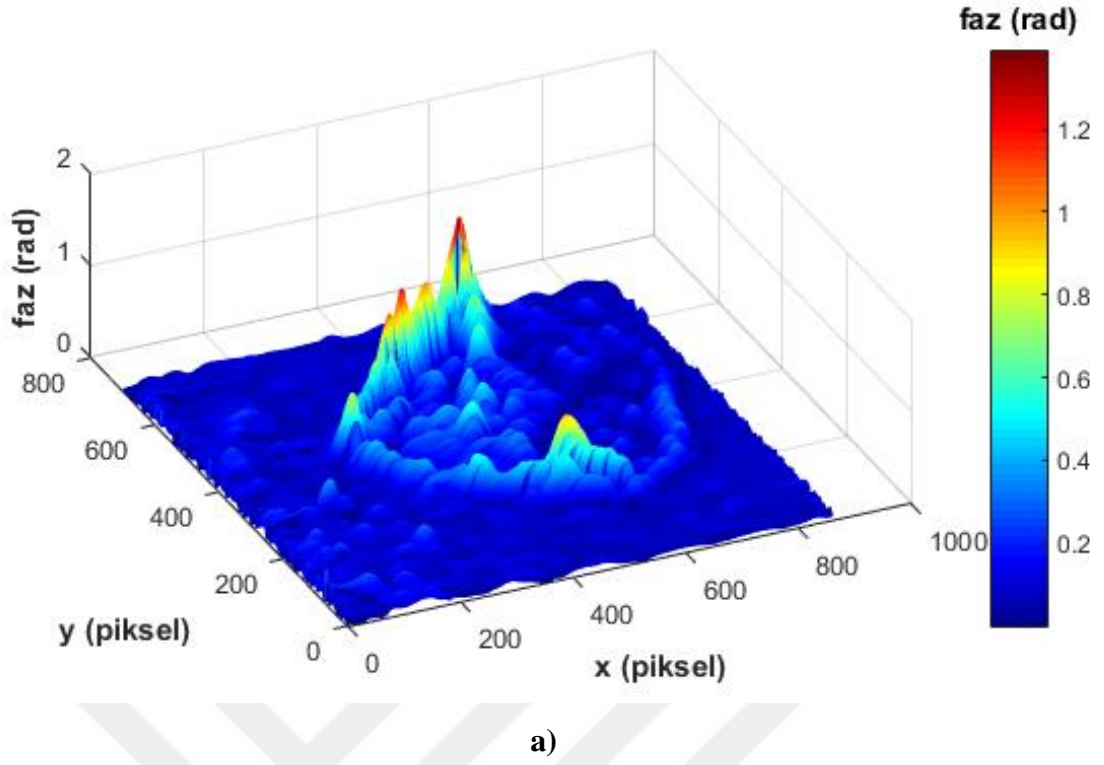


a)



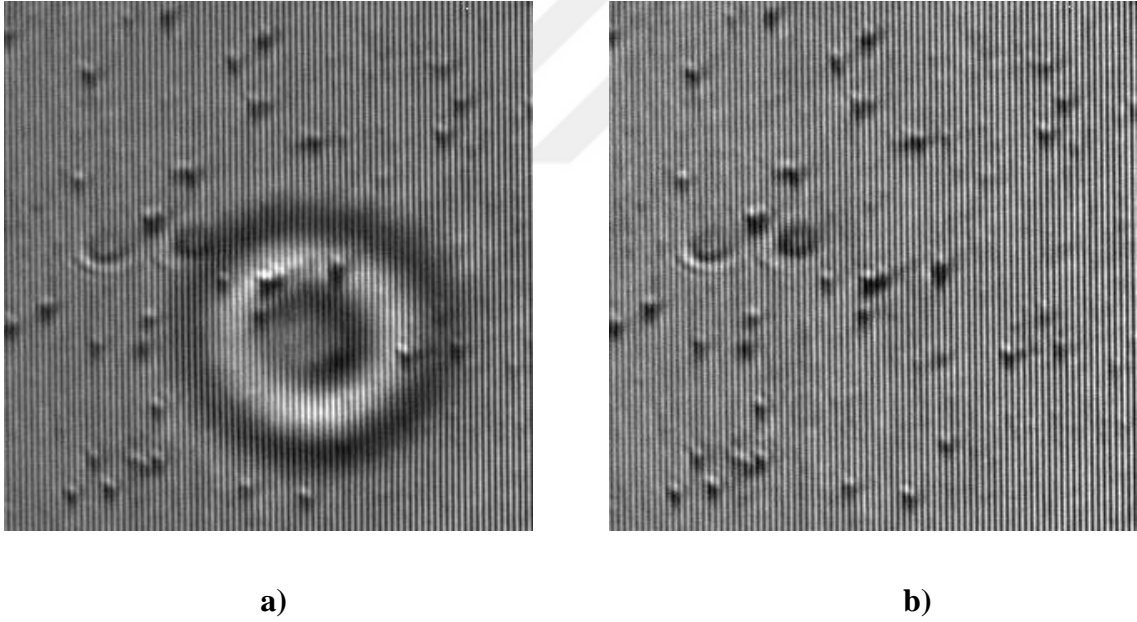
b)

Şekil 4.4. Ağızdan alınan epitel doku (a) örneğin görüntüsü; (b) referans görüntüsü

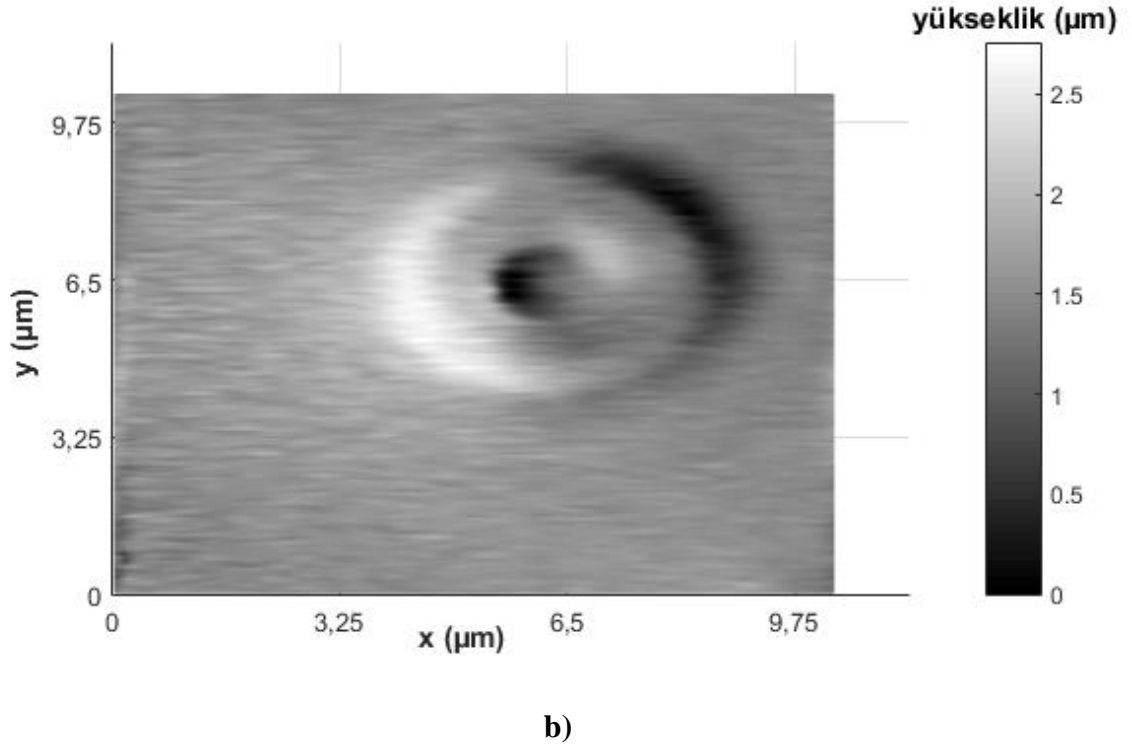
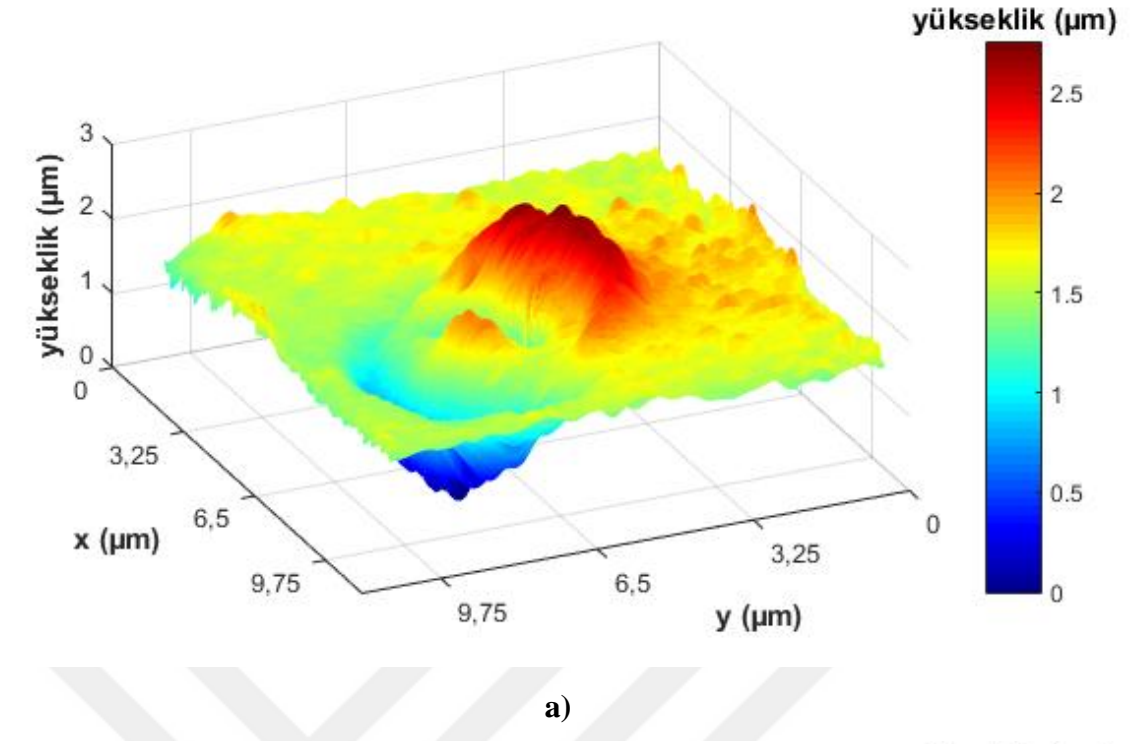


Şekil 4.5. BKFM ölçüm sisteminde görüntülenen epitel hücrenin Fourier dönüşümü yöntemi ile elde edilen faz değerleri; a) 3D profil görünümü; b) karşıdan görüntüsü

BKFM kurulumu yapılarak incelenen diğerk örnek kırmızı kan hücresidir. Parmaktan alınana kan örneğinin iyi bir görüntüsü elde edilmek üzere mikroskop ayarlanmıştır. Buradan elde edilen görüntü Şekil 4.6.' da gösterilmiştir. Yukarıda açıklandığı gibi Fourier dönüşümü uygulanarak faz dağılımı hesaplanmış ve yüksekliğe çevrilmiştir (Popescu vd. 2006) Bu çevirme işleminde dalgaboyu, mikroskobun halojen lambasının orta dalgaboyu olan 600 nm olarak alınmıştır. Kullanılan Hamamatsu ORCA Flash CMOS kameranın teknik detayları, kullanılan objektif 40X ve interferometrede kullanılan merceklerin sağladığı toplam büyütme göz önüne alınarak kaydedilen ham görüntünün bir pikselinin büyüklüğü 0,0683x0,0683 μm hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar ile kırmızı kan hücresi için elde edilen profil Şekil 4.7.'deki gibidir.



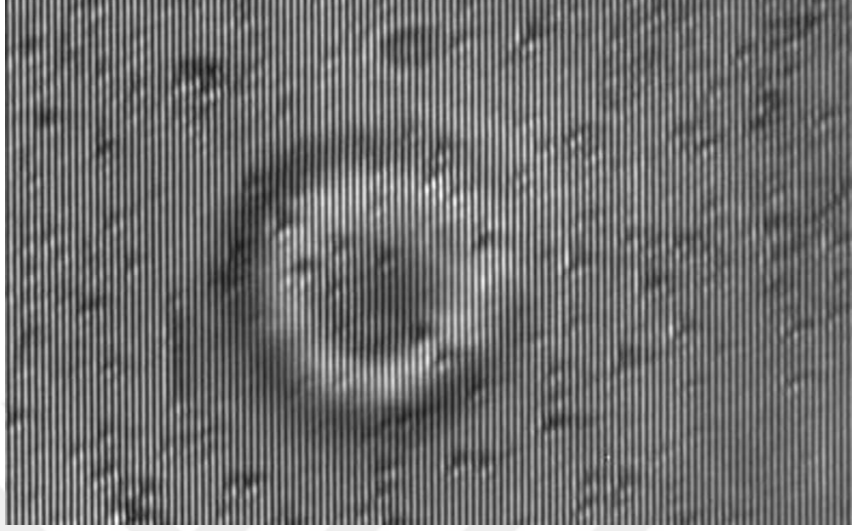
Şekil 4.6. Lamel üzerine yayılan taze kan örneğinden elde edilen (a) kırmızı kan hücresi görüntüsü; (b) referans görüntüsü



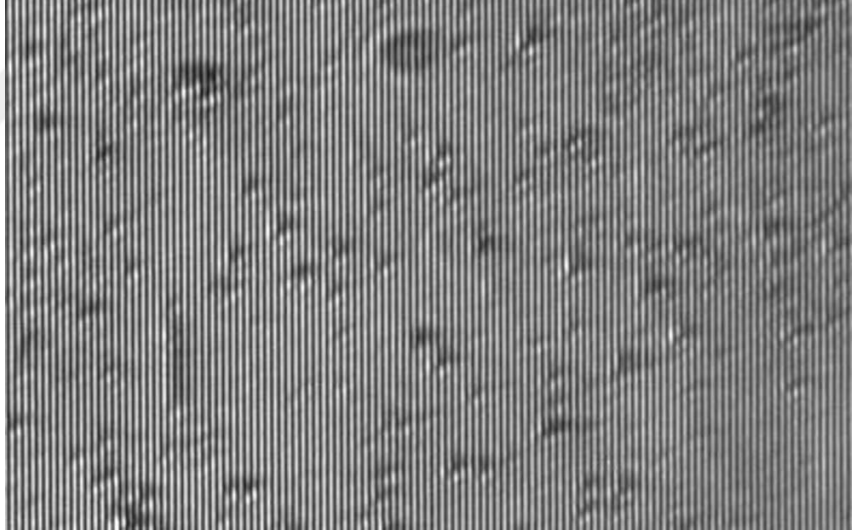
Şekil 4.7. BKFM ölçüm sisteminde lamel üzerine yayılarak görüntülenen kan hücresinin Fourier dönüşümü yöntemi ile elde edilen yükseklik değerleri; a) 3D profil görünümü; b) karşıdan görüntüsü

Burada kan hücresinin alt kısımlarında sarkmalar görülmektedir. Bu sarkmalar kan hücrelerinin içinde olduğu plazmadan kaynaklanmaktadır. Kan hücreleri plazmada eğik durduğu için yapılan analiz sonuçlarında da eğimli bulunmuştur. Bu yüzden hücrenin tümünü

net bir şekilde gözleyebilmek için kan örneği iki lamel arasına sıkıştırılarak da ölçüm alınmıştır. Buradan elde edilen sonuç bütün kan hücresinin plazma içine gömülü olduğu halidir. Kan hücresinin interferogramı Şekil 4.8’de ve hesaplanan tam profili Şekil 4.9’daki gibidir.

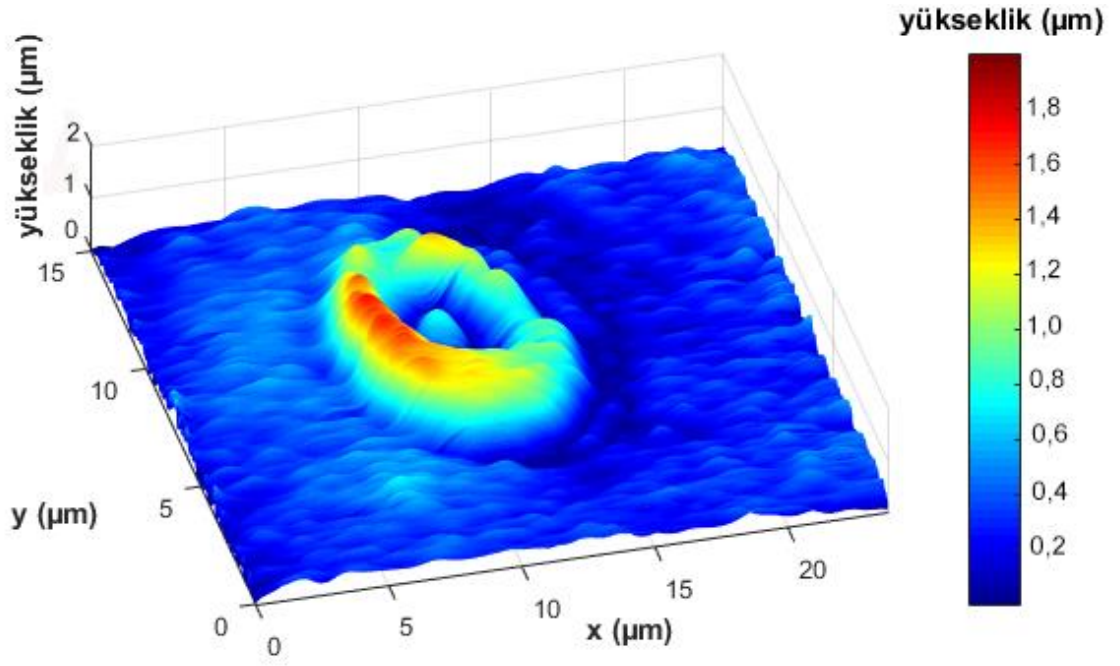


a)

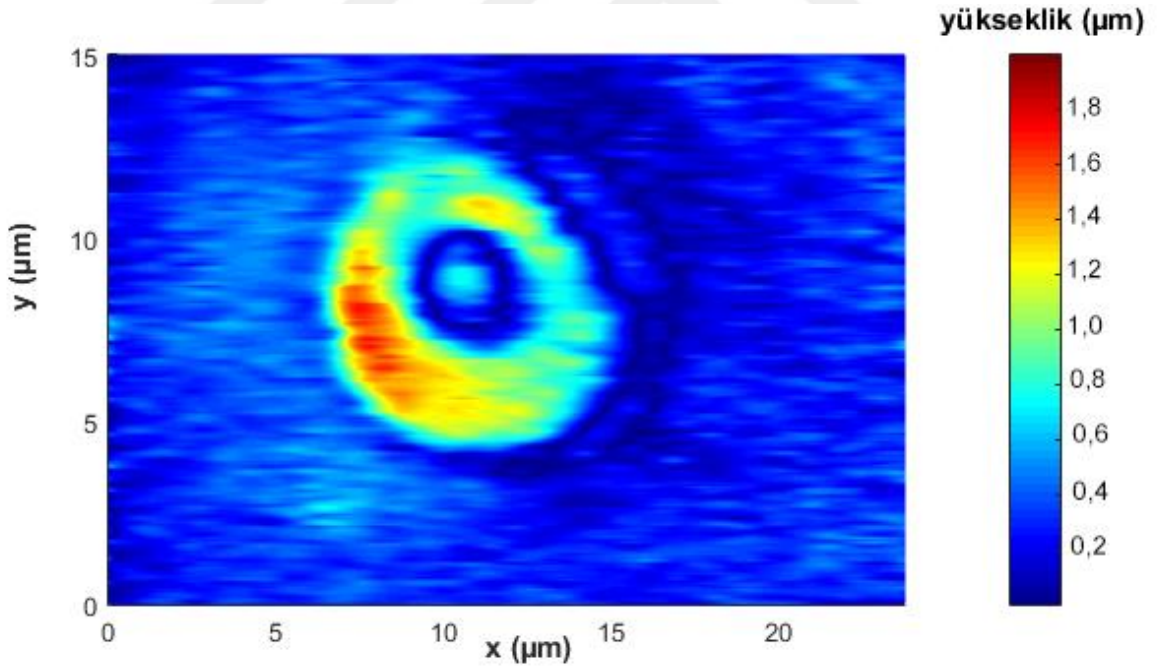


b)

Şekil 4.8. Lamel arasına sıkıştırılarak oluşturulan örnekten alınan (a) kırmızı kan hücresi görüntüsü; (b) referans görüntüsü.



a)



b)

Şekil 4.9. İki lamel arasında sıkıştırılan kan hücresinin Fourier dönüşümü yöntemi ile elde edilen yükseklik değerleri; a) 3D profil görünümü; b) karşıdan görüntüsü

4.2. Kırmızı Kan Hücrelerinin AFM ve SEM Görüntüleme İçin Hazırlanması

AFM ve SEM ile kan hücrelerinin görüntülenmesi için bir ön hazırlık yapılmalıdır. Bu bölümde örnek hazırlığı açıklanmıştır. İlk olarak enjektör heparinize edilmelidir, yani enjektör heparin solisyonu ile yıkanmalıdır. Heparin kuvvetli asidik olduğundan enjektörde fazlaysa ph değerini düşürecektir. Bu yüzden ph değeri 7 olarak ayarladı. Lamlar da fosfat bakır salin (PBS) ile fosfat tamponlu tuz ile iki defa yıkanarak işlem için hazırlandı. Froti yayma ile lama damlatılan tek damla kan 45° 'lik açıyla hızlı ve tek hareketle yayılır. Yaymanın kalın olmaması ve kan hücrelerinin tek tek görülebilmesi için bu gereklidir. Preparat havada kurutuldu ve PBS ile yapışmayan kırmızı kan hücrelerinin gitmesi için 2 defa yıkanarak süzölmeye bırakıldı. 0,2 molar sodyum cacodylate ve %2,5 glutar aldehit ile oluşan çözelti içinde 2 saat bekletildi. 0,2Molar sodyum cacodylate tamponla 3 defa yıkanarak kalan hücrelerin yapıştırılması sağlandı. Böylece hazırlanan kan örneği buzdolabında sodyum cacodylate içinde birkaç ay muhafaza edilebilir.

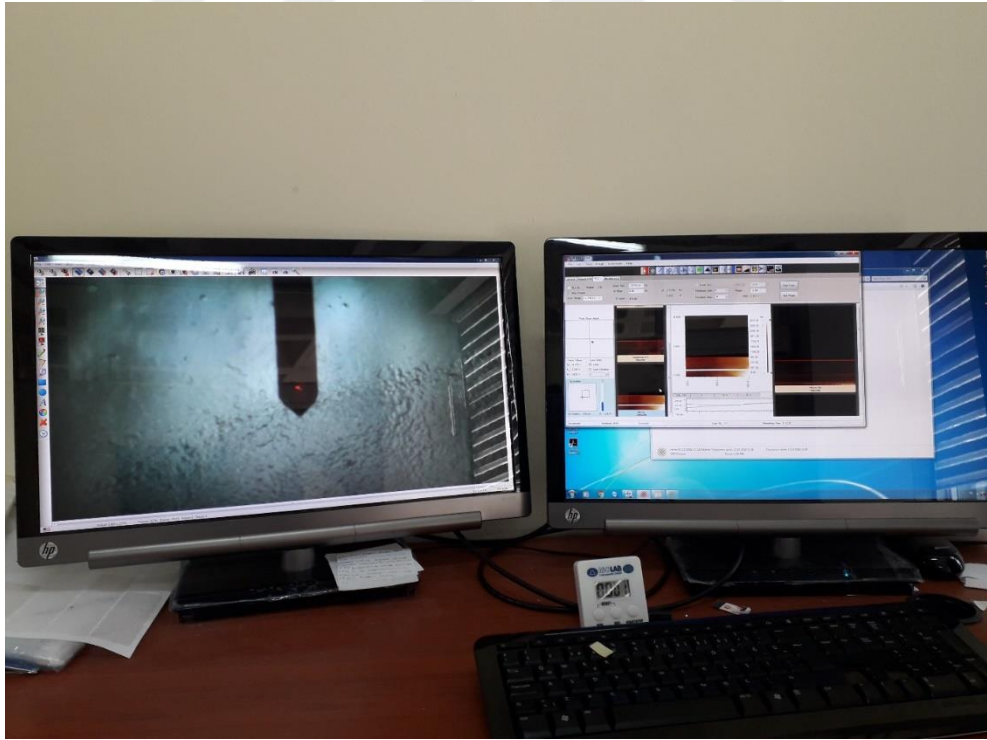
4.3. Atomik Kuvvet Mikroskopi İle Kan Hücresinin Morfolojisinin İncelenmesi

Yukarıda açıklanan yöntem ile hazırlanan kan örnekleri Şekil 4.10'daki Nano Magnetics Instruments AFM PLUS + ile Namık Kemal Üniversitesi Merkezi Laboratuvarında (NABİLTEM) görüntülenmiştir. Bu AFM cihazı, XY Tarayıcı: Motorize 50 mm hareket, 50 nm çözünürlük, Z-tarayıcı: Motorize 50 mm hareket, 250 nm çözünürlük özelliklerine sahiptir. Optik mikroskobun görüş alanı 1.25 mm -0.25 mm'dir. Temaslı mod ve vurma modu bulunmaktadır.

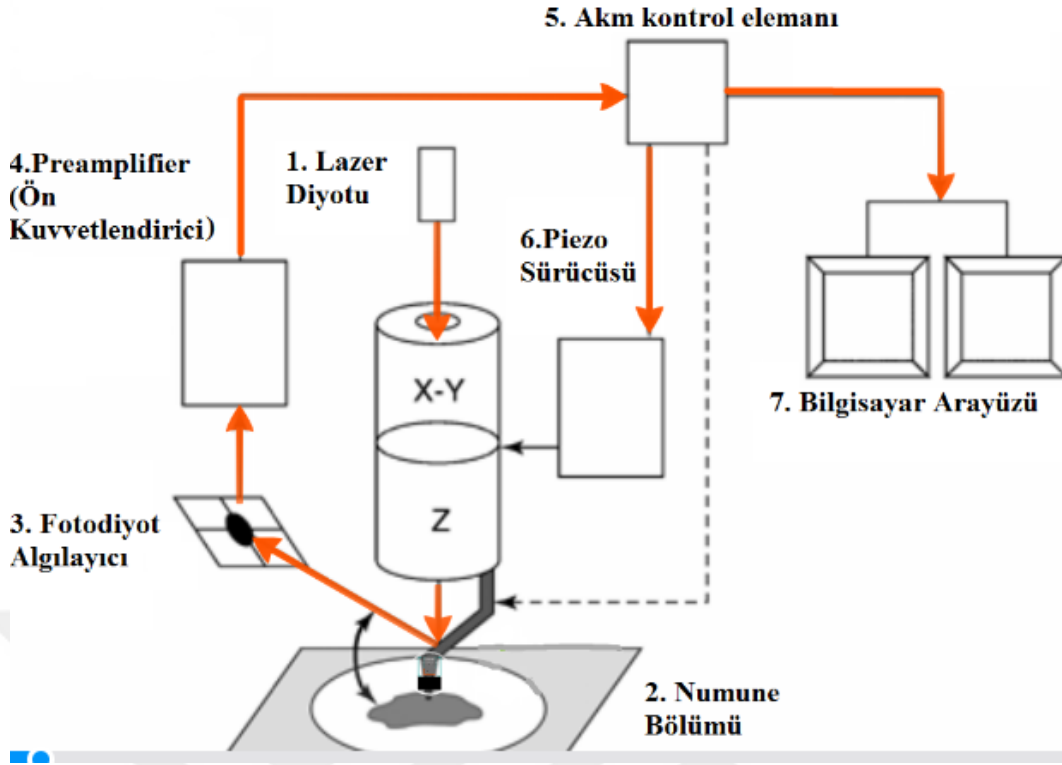
Optik kamera açıldı. Cantileverin görüntüsünü Şekil 4.11'deki gibi ekranda görüldü. Çift taraflı bandın üstüne hazırlanan örnek tam ortaya gelecek şekilde yapıştırıldı. Kan hücresi örneği AFM kafasına konuldu. Sallanma payını belirlemek için genlik değeri verildi. Centilever'in iyi olup olmadığına bakmak için tanımlandı.



Şekil 4.10. Kırmızı kan hücrelerinin görüntülenmesi için kullanılan AFM.



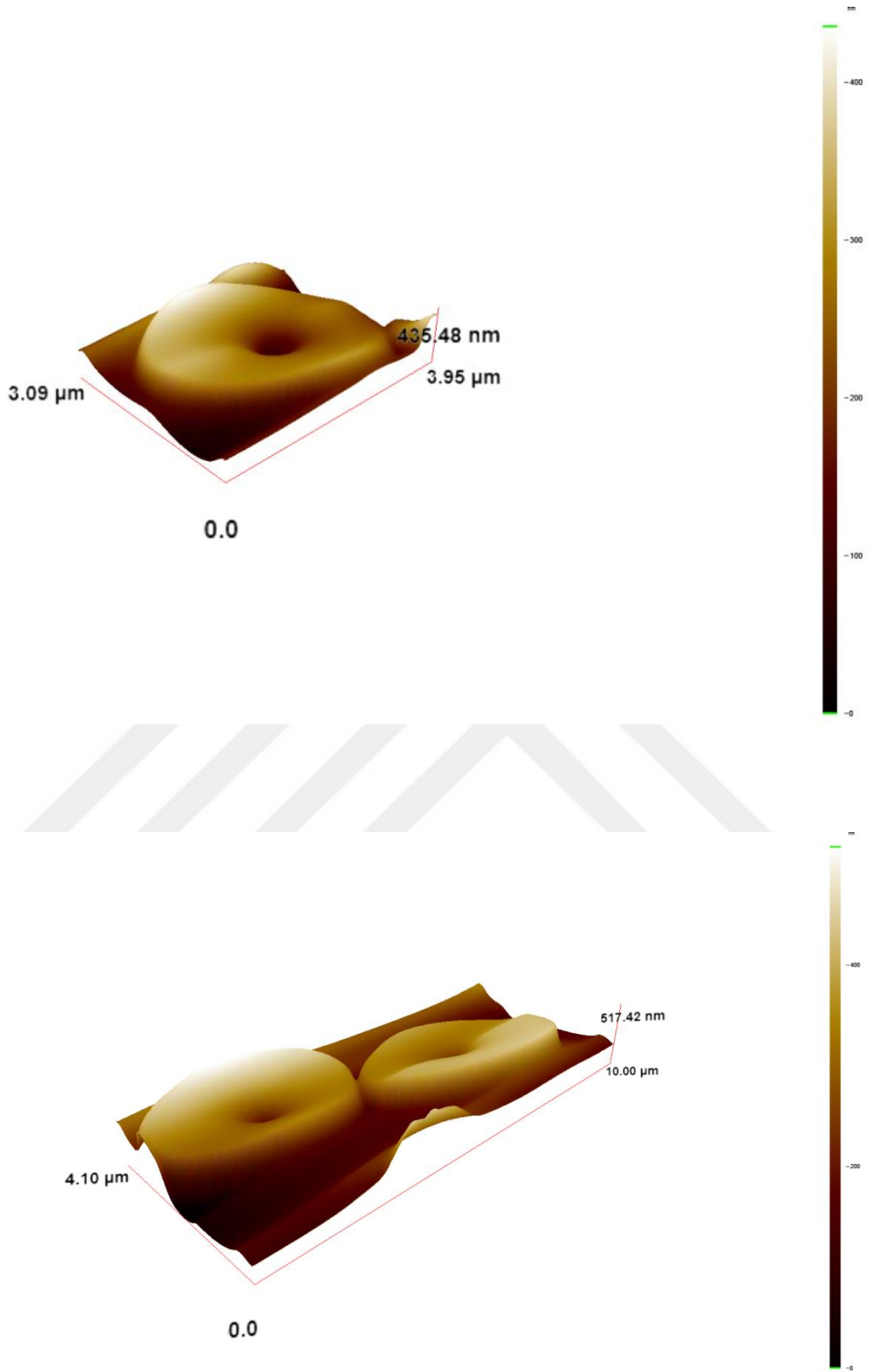
Şekil 4.11. AFM Görüntüsü



Şekil 4.12. Bütün olarak AFM'nin şematik gösterimi (Prezi.com.atomik kuvvet mikroskopi)

Monitörden bakarak z yönünde hareket ettirerek yüksekliği, x ve y yönlerinde hareket ettirerek cismin konum ayarlaması yapıldı. Bu işlem yapılırken iğne ucu örneğe denk getirmek için önce kaba ayarda sonra ince ayarda ayarlama yapıldı. Yüzeye çarpmaması için yüzeye yaklaşıncı ince ayara geçildi Yükseklik değeri (Amplitude) 2,4V değerinden düşmeye başladı. Yaklaşınca slow moduna geçildi ve değer 1,2V gösterdiğinde yüzeyde olduğunu gösterir. Bu işlem otomatik olarak da yapılmaktadır ama işlem süresi uzundur. Ne kadar alan taranacak, hızı belirlendi ve tarama süresi yaklaşık 20 dakika sürdü.

Örnek konulduktan sonra AFM'de meydana gelenleri sıralayacak olursak (Şekil 4.12); ışık cantilevere çarptı; sivri uçlu iğne örneğe doğru hareketlendi; ışık cantileverden foto diyota yansıdı. Işık kuvvetlendiricide güçlendirilerek kontrol elemanına gönderilir. Işık kontrol elemanına, kontrol elemanı da bilgiyi bilgisayara ve sensöre aktarır. Sensör meydana gelen sapmayı elektriksel çıktıya çevirir. Böylece elde edilen veriler bilgisayarda görüntülenmiştir. Şekil 4.13'de AFM'den elde edilen kırmızı kan hücresinin görüntüsü görülmektedir.



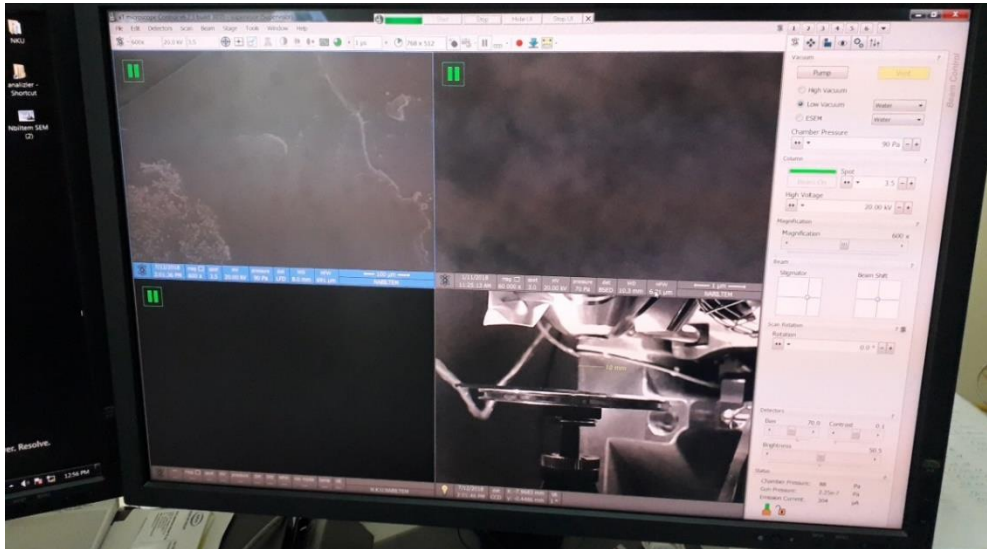
Şekil 4.13. AFM ile elde edilen kırmızı kan hücrelerinin görüntüsü

4.4. SEM İle Kırmızı Kan Hücresinin İncelenmesi

Kan hücrelerinin görüntüsünün alındığı Şekil 4.14'deki SEM'nin cihazının markası FEİ, cihazın modeli QUANTA FEG 250'dir. Cihazda bulunan detektörler, Everhardt Thornley ETD (ikincil elektron detektörü), STEM Detektörü, EDS Detektörü, Geniş Alan Düşük Vakum ikincil elektron detektörü (LFD), Gaz ikincil elektron detektörü (GSED) Ayrıca sulu örnekler için WETSTEM kiti bulunmaktadır. Şekil 4.15'de SEM cihazında görüntü oluşumu için parametreler görülmektedir. ([http://merkezlab.nku.edu.tr/atomik kuvvet mikroskopu](http://merkezlab.nku.edu.tr/atomik_kuvvet_mikroskopu)).



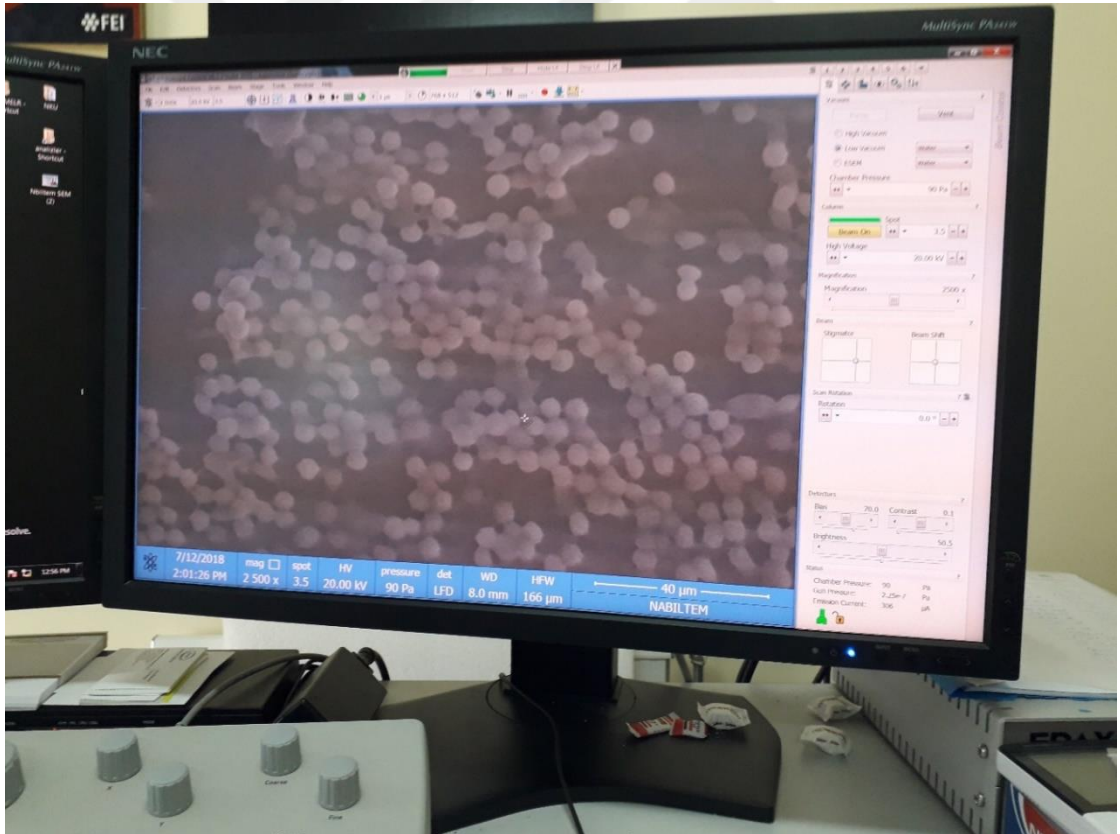
Şekil 4.14. Kırmızı kan hücrelerinin görüntülenmesi için kullanılan SEM



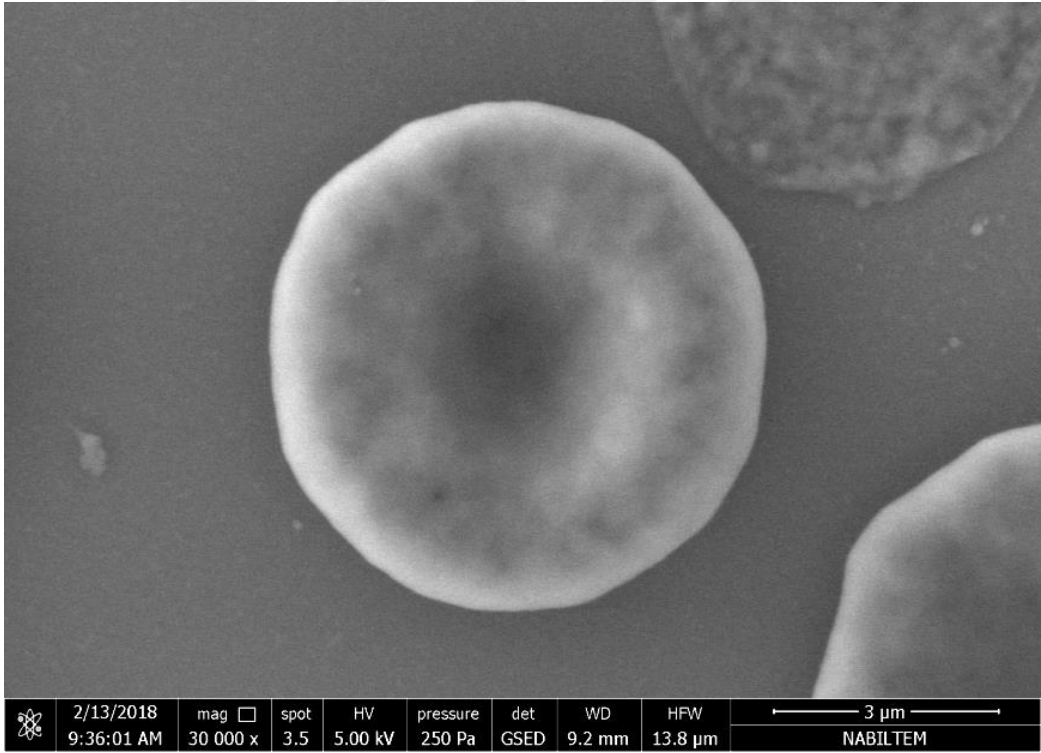
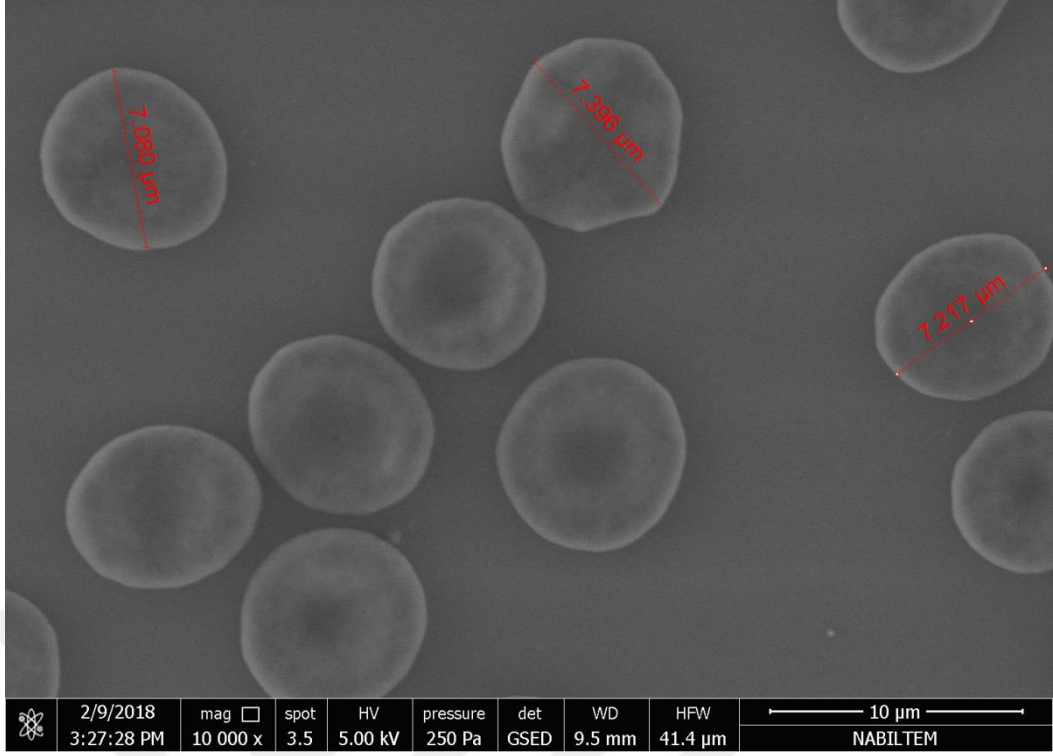
Şekil 4.15. SEM cihazında görüntü oluşumu için parametrelerin ayarlanması

Çift taraflı bandın üstüne yukarıda açıklanan yöntem ile hazırlanan kan örneği sput üzerine yapıştırıldı. SEM cihazının hazne kısmına yerleştirip vakumlandı. Şekil 4.15’de üst kısımda görüldüğü gibi, elektron tabancasının olduğu bölüm sürekli vakumlu halde olduğundan her zaman yeşil renktedir. Bu şekilde ölçüm için gerekli parametrelerin ayarlanması gösterilmektedir. Örneğin iletken olup olmamasına bağlı olarak uygun mod ayarlandı. Esem, high, low şeklindeki üç moddan high mod seçildi. Örneğin elektron demetinin çıktığı yere olan yani elektron kolonuna mesafesi (yaklaşık 10nm) belirlendi. Örneğe bağlı olarak basıncı 90Pa olarak ayarlandı. Spot gönderilen elektron demetinin çapı 1-7 arası bir değer seçildi ve yatay mesafe ayarlandı. Verilen değer düşüktüçe çözünürlüğü artmaktadır.

Uygun görüntü monitörden taratıldı (Şekil 4.16). Örnek için ideal olan büyüklüğe getirildi. Örneğimiz için büyütme 500x olarak ayarlandı. Farklı büyütmelerde görüntüler alınıp kaydedildi. Kaydedilen görüntüler Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.16. SEM görüntüsü



Şekil 4.17. SEM ile elde edilen kırmızı kan hücrelerinin görüntüsü

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, farklı ölçüm sistemleriyle kırmızı kan hücresi ve epitel dokunun görüntüleri elde edildi. Öncelikli, bu tez çalışmasında kırmızı kan hücresinin görüntüsünü elde etmek için interferometre, CCD kamera ve mikroskop kullanılarak BKFM sistemi kurulmuştur. Örneklerin interferogramları elde edilmiştir ve bu görüntülerden faz hesaplamak için Fourier Dönüşümü kullanılmış ve 3D profil oluşturulmuştur.

Sonraki aşamada Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılarak kan hücresinin görüntüsü alınmıştır. Örnek yüzeyinin topografik görüntüsü, bir uç ve bir örnek yüzeyi arasındaki etkileşimlere dayanarak elde eden tarama mikroskobudur. İletken olmayan örneklerde de kullanılması, normal bir optik mikroskoptan çok daha (1000 kat) iyi çözünürlükte görüntü vermesi, sulu ortamdaki canlı hücreleri görüntüleyebilmesi avantajlarıdır. Hem iletken hem yalıtkan malzemeler, hem sert hem de yumuşak malzemeler mikro ve nano boyutta morfolojileri incelenebilmektedir. Ancak örneğin bir ön hazırlık işlemine tabi tutulması gerekir ve görüntünün alınması yavaştır. Elde edilen görüntünün çözünürlüğünün Z yönünde hassasiyeti düşüktür. AFM ile yapılan ölçümlere bakıldığında, incelenen kırmızı kan hücrelerinin boyut bilgileri BKFM ve SEM ile ulaşılan bilgilerden kısmen farklıdır. Ölçümün gerçekleştirildiği Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Merkez Laboratuvarı NABİLTEM ile yapılan görüşmelerde AFM’de kalibrasyon ile ilgili bir problem olduğu anlaşılmış ancak bu problem düzeltilememiştir.

Son olarak kırmızı kan hücresi için NABİLTEM’de bulunan SEM ölçüm cihazıyla iki boyutlu görüntü elde edilebilmiştir. Yatay koordinatta hücre genişliği ölçekle verilmiştir Bu kalitatif (göreceli) bir ölçümdür. Kullanılan kan hücresinin yıkanmış olması önemlidir. İncelenebilecek örnek çeşidi oldukça geniştir. Örneklerin yüzey yapılarını incelemede ve element analizinde kullanılır. Elektrik ve manyetik alanların görüntüsü de elde edilebilir. Örneğin ön hazırlığa tabi tutulması şarttır. SEM’de görüntünün elde edilmesi odaklanmış elektron demetinin örnek yüzeyini taramasıyla elde edilir. Ayırım gücü, görüntü, analizleri birleştirme ve odak derinliği özelliklerinden bu tür çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak ölçüm sırasında örneğe temas ederek zarar vermektedir. Şekil 3.17’de SEM ile alınan kan hücresi örneğinin görüntüsü verilmiştir. SEM ile yapılan ölçümler sonunda kırmızı kan hücresi yaklaşık $7 \mu m$ çapındadır. SEM ve BKFM’den elde edilen sonuçları karşılaştırdığımızda ölçüm hassasiyetinin birbirine yakın olduğu görülmüştür. Örnekle temas

etmemesi ve sonuçları 3D gösterebilmesi BKFM deney düzeneğinin üstün yönlerini göstermektedir.

Bu çalışmada önerilen BKFM deney düzeneği ile elde edilen görüntülerden Fourier dönüşümü ile faz hesaplanması ve oluşturulan 3D profiller her yönden izlenebilen, her noktada yüksekliği hesaplanabilen kantitatif sonuçlar elde edilmesiyle, tezin amacına ulaşılmıştır. AFM ve SEM görüntüleriyle sonuçlar denetlenmiştir. Bu ölçüm yönteminin biomedikal ve endüstri gibi alanlarda kullanımı bulunmaktadır. Kan hücresi morfolojisinin belirlenmesi, üretimi yapılan ince filmlerin yüzeylerinin analiz edilmesi ve üretiminin kaliteli olması hedeflerinde kullanışlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.



6.KAYNAKLAR

- Arkaz H. 2017. Atomik Kuvvet Mikroskobu İle Yüzey Topografi Görüntüsü Oluşturma. Erciyes Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Malzeme Bilimi Ve Mühendisliği Bölümü Malzeme Üretim Ve Karakterizasyon Laboratuvarı Dersi Laboratuvar Uygulamaları
- Berryman, Fiona, Paul Pynsent, and James Cubillo. 2003. A Theoretical Comparison of Three Fringe Analysis Methods for Determining the Three-Dimensional Shape of an Object in the Presence of Noise. *Optics and Lasers in Engineering*, 39(1):35–50
- Bhaduri, Basanta et al. 2014. Diffraction Phase Microscopy: Principles and Applications in Materials and Life Sciences. *Advances in Optics and Photonics*, 6(1):57
- Blunt, Roy T. 2006. White Light Interferometry – a Production Worthy Technique for Measuring Surface Roughness on Semiconductor Wafers. CS MANTECH Conference, 44(0):59–62
- Chen, Wenjing, Peng Bu, Suzhen Zheng, and Xianyu Su. 2007. Study on Fourier Transforms Profilometry Based on Bi-Color Projecting. *Optics & Laser Technology*, 39(4):821–27.
- Clementa A.V. Gloystein K. Frangis N. 2008. Principles of Atomic Force Microscopy (AFM), Physics of Advanced Materials Winter School
- Dong, Jing-tao and Rong-sheng Lu. 2012. A Five-Point Stencil Based Algorithm Used for Phase Shifting Low-Coherence Interference Microscopy. *Optics and Lasers in Engineering*, 50(3):502–11.
- Endo, Takashi, Yoshiaki Yasuno, and Shuichi Makita. 2005. Profilometry with Line-Field Fourier-Domain Interferometry. *Optics Express*, 13(3):1800–1802
- Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L., Michael, J.R. 2003. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Springer.
- Gorthi, Sai Siva and Pramod Rastogi. 2010. Fringe Projection Techniques: Whither We Are? *Optics and Lasers in Engineering*, 48(2):133–40.
- Groot, Peter De. 2015. “Principles of Interference Microscopy for the Measurement of Surface Topography. *Advances in Optics and Photonics*,7(1): 1–65
- Kemao, Qian. 2007. Two-Dimensional Windowed Fourier Transform for Fringe Pattern Analysis: Principles, Applications and Implementations.” *Optics and Lasers in Engineering* 45(2):304–17
- Kocahan O. Tiryaki E., Durmuş Ç., Elmas M. N., Coşkun E., Özder S. 2017. Quantitative Phase Imaging of Red Blood Cell by Diffraction Phase Microscopy. *Computing and Electromagnetics International Workshop*, 8–9:21. İspanya.
- Kocahan, Özlem. 2008. İntegral Dönüşümler Kullanılarak Cisimlerin Profillerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.

- Leonardi, M., A. Rmiie, and J. Lenarcic. n.d. A System for Measurement and Visualisation of Human Back Shape for Estimation of 3D Deformities. Proceedings of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Region 8 International Conference IEEE:95–97
- Leonhardt, K. 2005. Optical Topometry of Surfaces with Locally Changing Materials, Layers and Contaminations Part 2: Fringe Projection Topometry. *Journal of Modern Optics*, 52(10):1367–84. Retrieved July 1, 2014
- Li, Sikun, Xianyu Su, and Wenjing Chen. 2010. Wavelet Ridge Techniques in Optical Fringe Pattern Analysis. *Journal of the Optical Society of America A*, 27(6):1245–54
- Moore D.T. Truax B.E. 1979. Phase-locked moiré fringe analysis for automated contouring of diffuse surfaces. *Applied Optics*, 18(1):95-96
- Nicchiotti, G. 2014. A System for 3D Reconstruction and VRML Conversion for Virtual Museums Applications. IEEE 13th International Conference on Digital Signal Processing, 1:421–24
- Palucka T. 2002. Overview of Electron Microscopy. http://authors.library.caltech.edu/5456/1/hrst.mit.edu/hrs/materials/public/ElectronMicroscope/EM_HistOverview.htm (01.04.2018)
- Pham, Hoa et al. 2011. Off-Axis Quantitative Phase Imaging Processing Using CUDA: Toward Real-Time Applications. *Biomedical Optics Express*, 2(7):1781
- Pham, Hoa V, Christopher Edwards, Lynford L. Goddard, and Gabriel Popescu. 2013. Fast Phase Reconstruction in White Light Diffraction Phase Microscopy. *Applied Optics*, 52(1):A97-101
- Quan, C., C. Tay, and H. Shang. 1999. Fringe Projection Technique for the 3-D Shape Measurement of a Hydroformed Shell. *Journal of Materials Processing Technology*, 89–90:88–91.
- Quan, C., X. Y. He, C. F. Wang, C. J. Tay, and H. M. Shang. 2001. Shape Measurement of Small Objects Using LCD Fringe Projection with Phase Shifting. *Optics Communications*, 189(1–3):21–29. Retrieved July 11, 2014
- Reolon, D., M. Jacquot, I. Verrier, G. Brun, and C. Veillas. 2006. Broadband Supercontinuum Interferometer for High-Resolution Profilometry. *Optics Express* 14(1):128–37
- Sharma M.K., Gaur C. Senthilkumaran P. Khare K.2015. Imaging Using Spiral-Phase Diversity. *Applied Optics* ,54(13):3979-3985
- Shi, Hongjian, Hongwei Ji, Guobiao Yang, and Xiaoyuan He. 2013. Shape and Deformation Measurement System by Combining Fringe Projection and Digital Image Correlation. *Optics and Lasers in Engineering*, 51(1):47–53.
- Singh, H. and J. S. Sirkis. 1994. Direct Extraction of Phase Gradients from Fourier-Transform and Phase-Step Fringe Patterns. *Applied Optics*, 33(22):5016–20.
- Skydan, Oleksandr a., Michael J. Lalor, and David R. Burton. 2005. Using Coloured Structured Light in 3-D Surface Measurement. *Optics and Lasers in Engineering*, 43(7):801–14.

- Su, Xianyu and Wenjing Chen. 2001. Fourier Transform Profilometry. *Optics and Lasers in Engineering*, 35(5):263–84.
- Su, Xianyu and Wenjing Chen. 2001. Fourier Transform Profilometry:: a review. *Optics and Lasers in Engineering*, 35(5):263.
- Şahin R. 2009. Çoklu Frekanslı Atomik Kuvvet Mikroskobu Ve Uygulamaları. Y.Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Takeda, M. and K. Mutoh. 1983. Fourier Transform Profilometry for the Automatic Measurement of 3-D Object Shapes. *Applied Optics*, 22(24):3977
- Thian, S. C. H. et al. 2007. Dimensional Measurement of 3D Microstruture Based on White Light Interferometer. *Journal of Physics: Conference Series*, 48:1435–46.
- Thomas L. Ivan S.J. et al. 2015. Phase-Sharing Using a Mach – Zehnder Interferometer. *Applied Optics*, 54(4):699.
- University of Cambridge (2018). www.doitpoms.ac.uk (06.05.2018)
- Vanherzeele, J., Patrick Guillaume, and Steve Vanlanduit. 2005. Fourier Fringe Processing Using a Regressive Fourier-Transform Technique. *Optics and Lasers in Engineering*, 43(6):645–58.
- Wilson R. A. and. Bullen H.A. 2006. Atomic Force Microscopy (AFM). Department of Chemistry, Northern Kentucky University
- Xia, Shuman, Zhipeng Pan, and Jingwen Zhang. 2014. Optical Microscope for Three-Dimensional Surface Displacement and Shape Measurements at the Microscale. *Optics Letters*, 39(14):4267
- Xue, Liang, Jiancheng Lai, Shouyu Wang, and Zhenhua Li. 2011. “Single-Shot Slightly-off-Axis Interferometry Based Hilbert Phase Microscopy of Red Blood Cells. *Biomedical Optics Express*, 2(4):987
- Yaqoob, Zahid et al. 2011. Single-Shot Full-Field Reflection Phase Microscopy. *Optics Express*, 19(8):7587–95.
- Zhou W. Wang, Z. L. 2007. *Scanning Microscopy for Nanotechnology*, Springer.
- Zwemer, D. a., G. Petriccione, and R. Curry. 2006. Thermally-Induced Warpage Measurement on Small Packages by a Microscopic Fringe Projection System. *Thermal and Thermomechanical Proceedings 10th Intersociety Conference on Phenomena in Electronics Systems*, 953:60

ÖZGEÇMİŞ

Esra ERTÜRK 23.03.1977 yılında Aydın'da doğdu. İlkokulu Aydın Zafer İlkokulunda, ortaokulu Gazi paşa Ortaokulunda ve liseyi Denizli Lisesinde tamamlamıştır. 1995 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik bölümünde lisans eğitimine başlamıştır. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim dalında Yüksek Lisans öğrenimini tamamlamıştır.

