لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۶، دورهٔ ۱۴، شمارهٔ ۴، صفحات: ۱۱-۲ .

مقاله پژوهشی

مقایسهٔ عملکرد منابع نوری لیزر، دیود و تنگستن در ساخت میکروسکوپ فلوئورسانسی ارزان‌قیمت و کاربرد میکروسکوپ ساخته‌شده در تصویربرداری از باکتری

کیومرث زرگوش [۱]
علیرضا طبیبی [۲]

خلاصه

مقدمه: میکروسکوپ فلوئورسانسی کاربردهای گسترده‌ای در زمینه‌های متنوع پزشکی نظیر تصویربرداری از تومورها در اندازه‌های کوچک‌تر از میلی‌متر، تشخیص انتخابی سلول‌های سرطانی، انجام جراحی‌های دقیق هدایت‌شده با میکروسکوپ فلوئورسانس و درمان فوتودینامیک دارد. از سویی‌دیگر میکروسکوپ‌های فلوئورسانسی گران‌قیمت هستند، به‌همین‌دلیل هدف اجرای این پروژه مقایسهٔ عملکرد منابع نوری لیزر، دیود و تنگستن در ساخت میکروسکوپ فلوئورسانسی ارزان‌قیمت می‌باشد.

روش بررسی: در این پروژهٔ تحقیقاتی یک دستگاه میکروسکوپ فلوئورسانسی ارزان‌قیمت با استفاده از منابع نوری مختلف نظیر لیزر (۴۰۵ نانومتر)، دیودها(۳۶۵،۳۷۰ و ۳۸۰ نانومتر) و لامپ تنگستن(۳۰ وات) و فیلترهای تداخلی مختلف(۴۵۰،۴۹۰ و ۵۲۰ نانومتر) ساخته شد. تأثیر منابع نوری، فیلترهای تداخلی و موقعیت آن‌ها بر کیفیت تصویر فلوئورسانسی و همچنین بزرگ‌نمایی تصویر به‌دست‌آمده مورد مطالعه قرار گرفت. دو عامل رنگ‌ساز فلوئورسانسی مختلف (سیکلوای و فلوئورسین) برای فعال‌سازی فلوئورسانسی بافت‌های هدف تصویربرداری، مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: بهترین تصاویر و بالاترین بزرگ‌نمایی(۴۰۰ برابر) با استفاده از منبع نوری تنگستن و فیلتر تداخلی نشری ۵۲۰ نانومتر به‌دست آمد. هنگام استفاده از منابع لیزر، تصویر حاصل دارای نشر زمینهٔ قابل توجهی بود که این امر کاربرد آن را جهت تصویربرداری از بافت‌ها محدود می‌کرد. میکروسکوپ فلوئورسانسی ساخته‌شده با موفقیت برای تصویربرداری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر و با کیفیت مطلوب از اپیدرم پیاز فعال‌شده با ترکیب سیکلو ای و تودهٔ باکتری استرافیلوکوکوس فعال‌شده با فلوئورسین ایزوسیانات به‌کار برده‌شد.

نتیجه‌گیری: میکروسکوپ فلوئورسانی ساخته شده توانایی تصویربرداری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر را دارا است. میکروسکوپ ساخته‌شده حداقل ۲۰ برابر ارزان‌تر از میکروسکوپ‌های خارجی با قابلیت و کارآیی مشابه است.

واژه‌های کلیدی: میکروسکوپ فلوئورسانسی، لیزر، باکتری استافیلوکوکوس، لامپ تنگستن، فلوئورسین ایزوسیانات، تصویربرداری، فیلتر تداخلی

۱. *استادیار گروه شیمی تجزیه، دانشکدهٔ شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران*

۲. *دانشجوی دکتری شیمی تجزیه، گروه شیمی تجزیه، دانشکدهٔ شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران*

نویسندهٔ مسئول: کیومرث زرگوش، تلفن: ۰۳۱۳۳۹۱۳۲۸۷
پست الکترونیک: **kiomarszargoosh@cc.iut.ac.ir**

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-14]

مقدمه

امروزه، میکروسکوپ فلوئورسانسی[1] کاربردهای وسیعی در زمینهٔ پزشکی نوین و زیست‌شناسی سلولی و مولکولی پیدا کرده است. ازجمله کاربردهای میکروسکوپ فلوئورسانسی در زمینهٔ پزشکی می‌توان به شناسایی و تصویربرداری از تومورهای سرطانی در ابعاد کوچک‌تر از میلی‌متر[۲و۱]، تشخیص بافت سالم از بافت سرطانی در هنگام جراحی جهت کاهش آسیب به بافت سالم[۳]، تشخیص مکانیسم عمل داروهای ضدسرطانی و تخمین میزان مؤثر بودن دارو در روند درمان بیماری[۴]، تشخیص سلول مرده از سلول‌های زنده[۵]، تشخیص مکانیسم و ردیابی مسیر ورود داروها به درون سلول[۶]، بررسی و تعیین pH برخی اجزای درون سلولی[۷] و درمان فوتودینامیک[2][۸] اشاره کرد. با توجه به اینکه در تصویربرداری میکروسکوپ فلوئورسانسی از نشر نمونهٔ فعال در ناحیهٔ طول‌موجی زیر قرمز نزدیک[3] استفاده می‌شود، بافت زمینه (آب و سایر سلول‌های غیرهدف) حداقل سیگنال نشری را دارا می‌باشند به‌همین‌دلیل تصویر ایجادشده در این روش قدرت فوق‌العاده‌ای در تشخیص تفاوت بافت‌های هدف (معمولاً بافت سرطانی) از بافت‌های سالم را دارا می‌باشند[۹]. باتوجه به کاربردهای وسیع میکروسکوپ فلوئورسانسی در علم پزشکی نوین دسترسی به چنین ابزار پژوهشی و کاربردی در پیشرفت دانش پزشکی کشور و همچنین اجرای موفق جراحی‌های مختلف ضروری به‌نظر می‌رسد. ازطرفی قیمت این دستگاه در حدود ۲ میلیارد ریال است. به‌همین‌دلیل بومی‌سازی تکنولوژی ساخت آن از اهمیت شایانی برخورداراست.

اساس کار میکروسکوپ فلوئورسانسی بر جذب و نشر پرتوهای نور استوار است (شکل۱). در این دستگاه طول‌موج مشخصی از پرتوی نوری ناشی از یک منبع نوری پایدار توسط آینه‌ها و عدسی‌های متمرکزکننده و آیینه‌های دورنگ‌نما[4] برروی نمونه تابانده می‌شود. نمونه حاوی گونهٔ فعال فلوئورسانسی است که توانایی جذب پرتوی تابیده‌شده را دارد و می‌تواند پس از برانگیخته شدن، پرتوی نوری را که دریافت کرده است، در طول‌موجی متفاوت (معمولاً طول‌موج بلندتر) نشر کند. این نور با عبور از قطعات اوپتیکی به عدسی چشمی می‌رسد و تصویری از نمونهٔ هدف را برمبنای میزان نور نشرشده از نمونه ایجاد می‌کند. چنین تصویری قابلیت عکس‌برداری شدن و ذخیره‌سازی دارد. طراحی میکروسکوپ‌های فلوئورسانس امروزی براساس طراحی یوهان‌پلوم[5] است که در سال ۱۹۶۰ ارائه گردید. شمای ساده‌ای از مبنای کار این میکروسکوپ‌ها در شکل۱ نشان داده شده است.

۱. Fluorescence microscope
۲. Photodynamic therapy
۳. Near infrared
۴. Dichromatic mirror
۵. Johan Ploem

شکل۱: شمای طراحی یوهان‌پلوم یک میکروسکوپ فلوئورسانسی تجاری

نور نشرشده از منبع فلورئورسانس برانگیختگی به‌وسیلهٔ آینهٔ دورنگ‌نما منحرف می‌شود و از طریق عدسی شیئی به نمونه برخورد می‌کند. آینه‌های دورنگ‌نما برای طول‌موج‌های کوتاه مانند آینهٔ کامل عمل می‌کنند ولی برای طول‌موج‌های بلندتر شفاف هستند. این پدیده باعث می‌شود نور فلورئوسانس نمونه از این آینه عبور کند و به چشم یا ابزار تصویربرداری (دوربین) برسد. این میکروسکوپ‌ها از اجزای زیر تشکیل شده اند:

محفظهٔ لامپ فلوئورسانس که محل قرارگیری منبع مخصوص تصویربرداری فلوئورسانس است و معمولاً از لامپ‌های بخار جیوه یا زنون استفاده می‌کند.

محفظهٔ لامپ عبوری که برای تصویربرداری معمولی از نمونه استفاده می‌شود.

عدسی چشمی که مشاهدهٔ مستقیم تصویر را برای شخص ممکن می‌سازد.

صفحهٔ گردان دارای عدسی شیئی، این قسمت شامل چند لنز شیئی با بزرگ‌نمایی‌های مختلف است، با چرخاندن صفحه لنز موردنظر در راستای پرتوی نور و نمونه قرار می‌گیرد.

سکوی نمونه و پیچ‌های تنظیم ارتفاع که برای ثابت نگه‌داشتن نمونه و همچنین تنظیم ارتفاع برای قرارگیری دقیق نمونه در صفحهٔ کانونی عدسی شیئی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

مجموعهٔ لنزها و دیافراگم‌ها که برای کنترل شدت پرتوی رسیده به نمونه استفاده می‌شوند و با تنظیم آن‌ها روشنایی و وضوح تصاویر قابل کنترل است.

امروزه، در جزئیات ساخت این میکروسکوپ‌ها نوآوری و متنوع‌سازی فراوانی مشاهده می‌شود. جوتامولیا[6] و همکاران در سال ۲۰۱۵ یک

۶. Jutamulia

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-14]

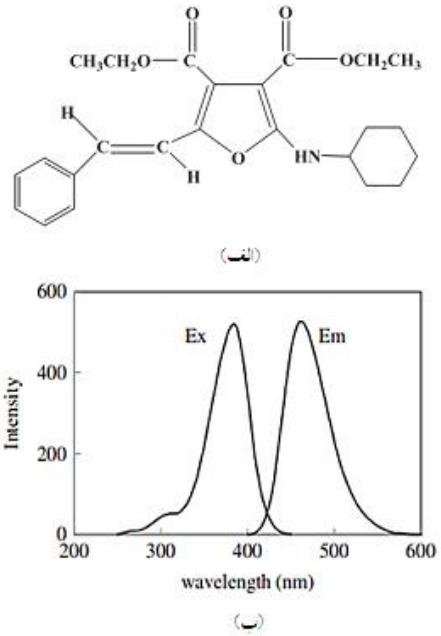
میکروسکوپ فلوئورسانس تک‌لنز با حس‌گر CMOS[۷] ساختند. در این زمینه آن‌ها از یک لنز، یک فیلتر نشری، یک حس‌گر تصویربرداری و یک سیستم نوردهی بین نمونه و لنز استفاده کردند. این سیستم نوردهی شامل یک هرم با سر تخت بود که به‌وسیلهٔ آن پرتوی نور منبع را به سمت محل نمونه منحرف می‌کردند. نور از سطح جانبی شیب‌دار وارد هرم می‌شد و از سر هرم خارج می‌گردید و به نمونه می‌رسید.آن‌ها توانستند با این سیستم یک میکروسکوپ فلوئورسانس با منبع برانگیختگی LED[۸] بسازند[۱۰]. در سال ۲۰۰۵ نیز باق[۹] و پایج[۱۰] با استفاده از تکثیرکننده‌های تثبیت شده برروی تراشه[۱۱] و آشکارسازهای فوتونی CCD[۱۲] یک میکروسکوپ فلوئورسانسی ساختند که قادر به اندازه‌گیری غلظت ترکیبات فلوئورسنت در غلظت‌های بسیار کم بود[۱۱]. در سال ۲۰۱۴ نیز پارازال[۱۳] و همکاران با حذف اجزای گران‌قیمت یک میکروسکوپ فلوئورسانسی به یک الگوی ارزان‌قیمت برای تولید میکروسکوپ فلوئورسانسی با کاربرد معین نظیر تصویربرداری مریی از نورون‌ها[۱۴] دست یافتند[۱۲]. در مقالهٔ حاضر، مراحل ساخت یک دستگاه میکروسکوپ فلوئورسانسی با قابلیت ثبت تصاویر فلوئورسانسی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر و با قیمت بسیارکم (حدود ۳۰ میلیون ریال) بر پایهٔ یک میکروسکوپ نوری معمولی گزارش می‌شود. اثر عوامل ساختاری مختلف بر کیفیت تصویر مورد بحث قرار می‌گیرد و کاربرد آن برای ثبت تصاویر بافت‌های حقیقی مورد مطالعه قرار می‌گیرد. پارامترهای مختلف، بهینه‌سازی می‌شوند و درنهایت، بهترین ساختار میکروسکوپ انتخاب می‌شود.

روش بررسی

یکی از ترکیبات فعال فلوئورسانسی برای برچسب‌زنی بافت‌های مورد نظر برای تصویربرداری، ترکیب Cyclo A است که با روش ذکرشده در مرجع[۱۳] سنتز شد. شکل ۲ ساختمان ترکیب Cyclo A، طیف تحریک و طیف نشر فلوئورسانس آن را نشان می‌دهد.

فلورسین و فلورسین‌ایزوتیوسیانات (FITC)[۱۵] نیز به‌منظور رنگ دارکردن باکتری‌ها و بررسی کارآیی میکروسکوپ به‌کار رفتند هر دو ترکیب از شرکت مرک خریداری شدند و دارای خلوص تجزیه‌ای بودند. جهت تهیهٔ محلول مادر از ترکیب Cyclo A با غلظت $۲/۵\times۱۰^{-۴}$ مولار، ابتدا مقدار دقیق ۰/۰۰۲۶ گرم از Cyclo A توزین شد، سپس در بالن ۲۵ mL توسط حلال اتانول به حجم رسانده‌شد و برای استفاده‌های بعدی

۷. Complementary metaloxide semiconductor
۸. Light-emitting diode
۹. Bagh
۱۰. Paige
۱۱. On-chip multiplier
۱۲. CCD photomultiplier
۱۳. Parrazal
۱۴. Neuron visualized recording
۱۵. Fluorescein Isothiocyanate



شکل۲: (الف) ساختار ترکیب Cyclo A، (ب) طیف تحریک(ex) و نشر (em) فلوئورسانس ترکیب cyclo A

نگهداری شد. جهت تهیهٔ محلول مادر از ترکیب فلورسین، مقدار ۰/۰۰۸۰ گرم از آن به‌طور دقیق توزین شد. سپس در بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتر در حلال آب به حجم رسید که محلولی با غلظت $۲/۵\times۱۰^{-۳}$ مولار به‌دست آمد. به‌دلیل پایداری نوری کم، محلول فلوئورسین به‌طور روزانه تهیه و در ظرف پوشش‌دارنگهداری شد.

برای بررسی امکان استفاده از این میکروسکوپ در تصویربرداری از نمونه‌های حقیقی و بافت‌های زنده، از روش جذب رنگ‌دانه FITC به‌وسیلهٔ باکتری و تصویربرداری از کلونی باکتری استفاده شد. در ابتدا باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوک[۱۶] درون محیط کشت خون-آگار[۱۷] که شامل کلرید سدیم آگار و ۵ درصد خون بود، کشت داده شدند. پس از ۱۲ ساعت که کلونی‌های باکتری تشکیل شدند، به کمک سوآپ[۱۸] پنبه دار به محیط کشت مولر هینتون آگار[۱۹] دارای FITC منتقل شدند. این محیط کشت از شرکت ATD ANTEC تهیه‌شده و مطابق دستورالعمل آماده‌سازی شد. ابتدا مقدار ۳۸ گرم از پودر درون ۱ لیتر آب یون‌زدایی شده ریخته‌شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌هم زده شد تا آماس پیدا کند. سپس در دمای ۱۲۱ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. بعد از رسیدن به دمای ۴۷ درجه، به ۵ میلی‌لیتر از آن، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول ۱۰ میلی‌مولار FITC اضافه شد و به ظرف کشت منتقل شد.

۱۶. Gram-positive staphylococcus bacteria
۱۷. Blood Agare
۱۸. Swap
۱۹. Mueller-Hinton agar

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-14]

بعد از رشد باکتری‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت، به کمک سوآپ پنبه‌دار روی لام شیشه‌ای مخصوص میکروسکوپ منتقل شدند و تصویربرداری انجام شد.

به‌عنوان یک پایهٔ ساختاری ارزان‌قیمت جهت ساختن میکروسکوپ فلوئورسانس از میکروسکوپ نوری معمولی مدل Xsz-107bn، ساخت شرکت نینگبوهینوتک[۲۰] استفاده شد که در شکل ۳ نمایی از آن مشاهده می‌شود. این میکروسکوپ دارای ۴ لنز شیئی با بزرگ نمایی‌های ۴۰،۲۰،۱۰ و ۱۰۰ برابر است. در قسمت چشمی این نوع میکروسکوپ، یک هد دوچشمی با دو لنز با بزرگ‌نمایی ۱۰ برابر قرار دارد که با کمک یک سیستم منشوری امکان مشاهده با هر دو چشم را فراهم می‌کند. منبع نور معمولی مورد استفاده در این میکروسکوپ، یک لامپ تنگستن ۳۰ وات است که به‌طور مستقیم توسط برق شهری روشن

شکل۳: نمایی از میکروسکوپ استفاده‌شده در ساخت میکروسکوپ فلوئورسانس

۲۰. Ningbo Hinotek Technology Co

جدول۱: مشخصات LED های استفاده‌شده در ساخت میکروسکوپ فلوئورسانس

ردیف	مشخصات	۳۶۵ نانومتر	۳۷۰ نانومتر	۳۸۰ نانومتر
۱	توان مصرفی(W)	۳	۳	۳
۲	ولتاژ (V)	۳/۴ تا ۳/۶	۳/۳ تا ۳/۶	۳/۰ تا ۳/۳
۳	حداکثر جریان(mA)	۷۰۰	۷۰۰	۷۰۰
۴	شدت نور (Lm)	۰/۸ تا ۰/۷	۱/۵ تا ۱	۲ تا ۱/۵
۵	اندازهٔ چیپ (mil)	۴۵	۴۵	۴۵
۶	برند	Epileds تایوان	Epileds تایوان	Epileds تایوان

جدول۲: مشخصات لیزر استفاده‌شده در ساخت میکروسکوپ براساس کاتالوگ لیزر

مشخصات	مقدار
طول‌موج	۴۰۵nm
توان خروجی	۲۵mW
کلاس لیزر	IIIB
ضخامت پرتو در دیافراگم	۲/۵ mm
ولتاژ کاری	۳/۰ v
جریان کاری	۵۰۰ mA

می‌شود. این میکروسکوپ دارای یک جمع‌کنندهٔ نوری در قسمت پایین دستگاه است که روی محفظهٔ لامپ قرار دارد و نور را به سمت کندانسور هدایت می‌کند و باعث یکنواخت شدن نور منبع می‌گردد.

یکی از منابع برانگیختگی جدید مورداستفاده در میکروسکوپ‌ها، لامپ‌های LED هستند[۱۴] که به‌دلیل پهنای باند نشری کم بسیار مورد توجه پژوهشگران قرارگرفته‌اند. در این پروژه از لامپ‌های LED با طول‌موج‌های نشری ۳۶۵، ۳۷۰ و ۳۸۰ نانومتر استفاده شد. پهنای طول‌موج خروجی هرکدام از این لامپ‌ها، مطابق کاتالوگ محصول، ۵ نانومتر بود. مشخصات کلی آن‌ها به‌طور خلاصه در جدول ۱ آورده شده است.

یکی دیگر از منابع نوری که برای میکروسکوپ‌های فلوئورسانس استفاده می‌شود، منابع لیزر است[۱۹-۱۵]. در این پروژه با توجه به گونه‌های فعال فلوئوررسانس انتخاب‌شده از یک لیزر دیود با طول‌موج خروجی ۴۰۵ نانومتر و شدت ۲۵ میلی‌وات استفاده شد. این لیزر توسط یک منبع تغذیهٔ سویچینگ[۲۱] که به‌وسیلهٔ یک آداپتور برق، با خروجی ۱۲ ولت و شدت جریان خروجی ۱ آمپر، تغذیه و روشن می‌شد.

به‌دلیل دردسترس و ارزان بودن لامپ‌های تنگستن و همچنین طیف نشری در ناحیهٔ ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر، لامپ‌های تنگستن منابع خوبی برای بررسی طیف‌های فلوئورسانس در این منطقه‌اند. از لامپ تنگستن ۳۰ وات موجود روی میکروسکوپ نوری برای برانگیخته کردن فلورسین در طول‌موج ۴۸۸ نانومتر استفاده شد. یکی از اجزاء مهم میکروسکوپ فلوئورسانس، فیلترهای برانگیختگی و نشری است که امکان مشاهدهٔ

۲۱. Switching Power Supply

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-14]

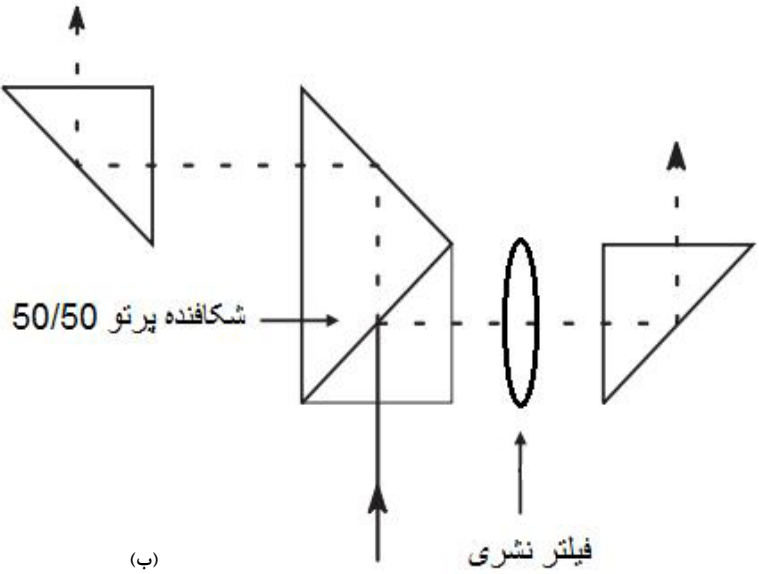
گزینشی طول‌موج‌های مادهٔ فلوئورسانس را فراهم می‌کند. در این پروژه از فیلترهای تداخلی ساخت شرکت ایلینگ الکترواپتیک[۲۲] استفاده شد. به‌منظور ثبت تصاویر میکروسکوپ فلوئورسانسی نمونه از یک گوشی تلفن همراه با دوربین ۵ مگاپیکسل استفاده شد. با قرار دادن لنز دوربین در مقابل عدسی چشمی و تنظیم تصویر، عکس‌برداری صورت گرفت. به‌منظور بررسی میزان فاصلهٔ مناسب برای تصویربرداری و تعیین فاصلهٔ بهینه برای عکس‌برداری با کیفیت مناسب، اپیدرم پیاز به‌دلیل سادگی بافت جهت تصویربرداری انتخاب شد.

۲۲. Ealing Electro Optics

یافته‌ها و بحث

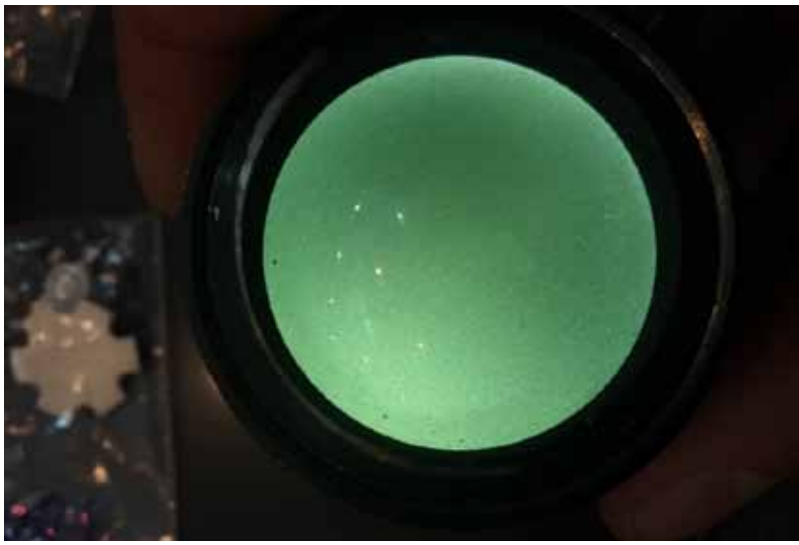
پس از انتخاب بدنه یک میکروسکوپ معمولی جهت ساخت میکروسکوپ فلوئورسانس، باید تأثیر هریک از عوامل انتخاب‌شده در ساخت میکروسکوپ فلوئورسانس نظیر منابع نوری لیزری، منابع نوری LED، فیلترهای انتخاب طول‌موج برانگیختگی، فیلترهای انتخاب طول موج نشری و جایگاه مناسب قطعات انتخاب‌شده بر کیفیت و بزرگ نمایی تصویر مورد مطالعه قرارگیرد. با توجه به سیستم تقسیم نور در قسمت هد میکروسکوپ که باعث تولید تصویر در هر دو لنز چشمی می‌شد، تصمیم گرفته شد فیلتر نشری در قسمت بین منشور کوچک‌تر و

(الف)

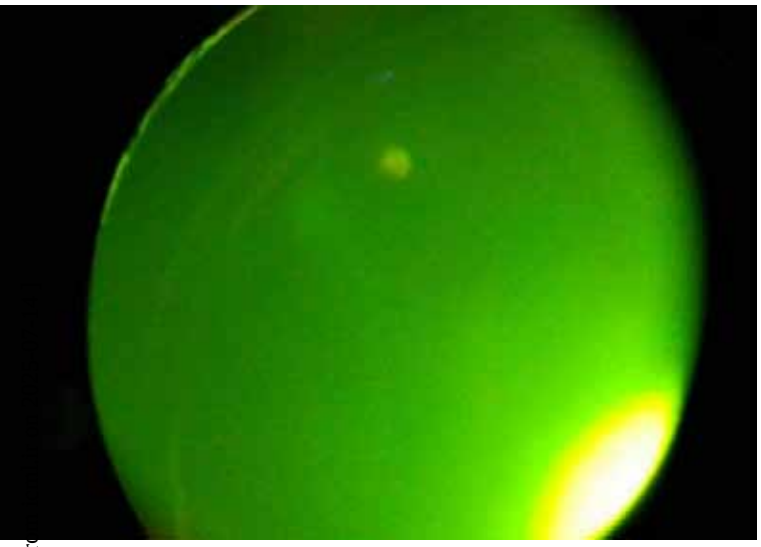


(ب)

شکل۴: ساختار هد میکروسکوپ (الف)، مسیر عبور نور منبع از هد (ب)



(الف)



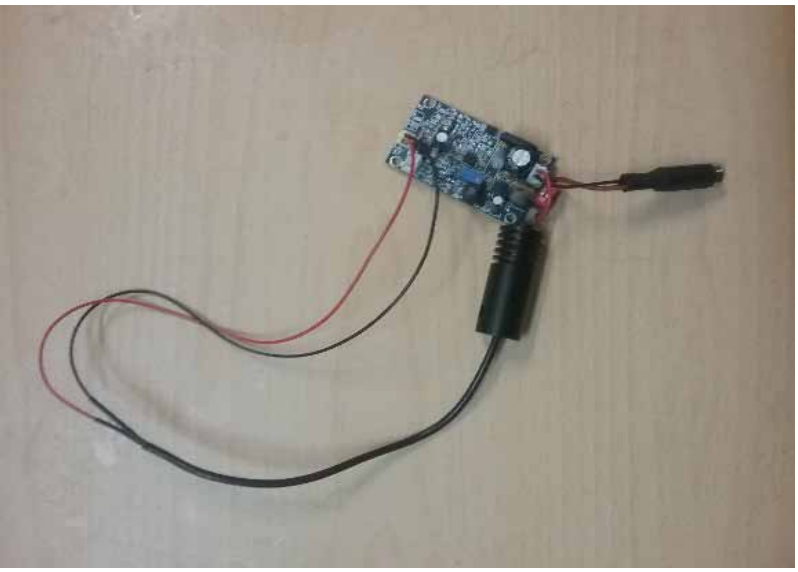
(ب)

شکل۵: تصویر نشر زمینهٔ ناشی از منبع LED ۳۷۰ نانومتر (الف) و منبع LED ۳۶۵ نانومتر (ب)

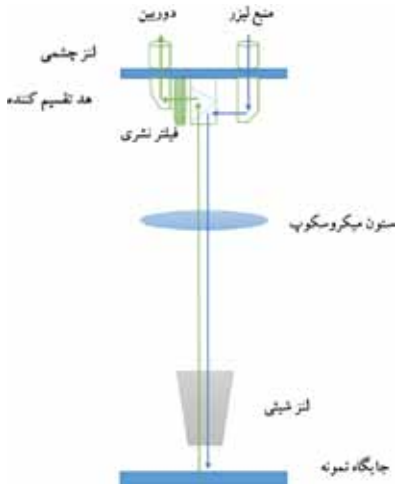
[Downloaded fr

ستون تقسیم‌کنندهٔ مرکزی قرار گیرد. در این صورت در یکی از لنزهای چشمی تصویر نمونه با فیلتر نور در طول‌موج مشخص دیده‌می‌شود و در لنز چشمی سمت دیگر تصویر فیلتر نشده دیده می‌شود. ساختار هد میکروسکوپ، جایگاه فیلتر نشری و مسیر عبور نور در شکل ۴ نشان داده شده است. برای جاسازی فیلتر نشری، قسمت هد میکروسکوپ به‌طور کامل باز شد و فیلتر در جایگاه خود قرار گرفت. اولین منابع نور مورد استفاده نیز منابع LED با طول‌موج‌های ۳۷۰، ۳۸۰ و۳۶۵ نانومتر بودند این طول‌موج‌ها توانایی ایجاد برانگیختگی فلوئورسانس ترکیب Cyclo A را دارا هستند.

مشکل اصلی ایجادشده در تصویر حاصل هنگام استفاده از منابع LED (دارای نورUV)، فلوئورسانس خودبه‌خودی اجزاء اپتیکی میکروسکوپ بود که دلیل آن جنس لنزهای استفاده‌شده در آن‌ها است وهمان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، باعث نشر نور سبز رنگ شدیدی می‌شد و با کاهش طول‌موج منبع نور (استفاده از LED با طول‌موج نشری ۳۶۸ نانومتر به‌جای ۳۸۰ نانومتر) شدت این نشر نیز افزایش می‌یابد و امکان استفاده از این منبع نور را برای ساخت میکروسکوپ فلوئورسانسی غیرممکن می‌سازد، زیرا نشر زمینهٔ قوی، سیگنال مربوط به بافت اصلی نمونه را می‌پوشاند. به‌همین‌دلیل به‌عنوان انتخاب دیگر از یک لیزر دیود با توان ۲۵ میلی‌وات و با طول‌موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد که در شکل۶ ساختار این منبع، مدار اتصال آن به برق و جایگاه آن در ساختار میکروسکوپ مشاهده می‌شود. با توجه به ساختمان میکروسکوپ، امکان قرارگیری این منبع نور در۳ موقعیت مختلف وجود داشت که شامل قرارگیری لیزر در لنز چشمی، قرارگیری در جایگاه کندانسور و قرارگیری با زاویهٔ ۴۵ درجه روی جایگاه نمونه. در ابتدا یکی از عدسی‌های چشمی خارج شد و لامپ لیزر به‌جای آن قرار داده شد. در این حالت لنز چشمی دوم به‌منظور تصویربرداری از پرتوی فلوئورسانس حاصل‌از رنگ‌دانه با فیلتر تداخلی ۴۵۰ نانومتری فیلتر شد. پرتوی لیزر پس از شکسته‌شدن در قسمت هد میکروسکوپ، وارد مجموعه لنزهای عدسی شیئی می‌شود و دقیقاً در محل تصویربرداری از نمونه متمرکز می‌شود. طرحی از این چیدمان را در شکل۶ نشان‌داده‌شده‌است. نشر فلوئورسانس نیز از طریق عدسی جمع‌آوری‌شده و توسط فیلتر، زمینهٔ آن حذف می‌گردد. بعد از قرارگیری اجزای میکروسکوپ در این حالت، مشاهده شد که سیگنال فلوئورسانس بسیار ضعیف است. علت این سیگنال ضعیف، تلف شدن توان نشر فلوئورسانس در قسمت تقسیم‌کنندهٔ نور در هد میکروسکوپ بود که مانع از رسیدن تمام پرتو به دوربین می‌شد. ازطرفی به‌علت اینکه فیلترهای باند گذر باعث کاهش حدود ۵۰ درصد از شدت نور می‌شوند، با این چیدمان امکان تصویربرداری با وضوح قابل قبول وجود نداشت. به همین دلیل جایگاه منبع لیزر تغییر داده شد و با زاویهٔ ۴۵ درجه روی سکوی نمونه قرار گرفت به‌صورتی‌که باریکهٔ پرتوی خروجی لیزر دقیقاً به محل تصویربرداری لنز شیئی تابیده شود که در شکل۷ تصویری از این



(الف)

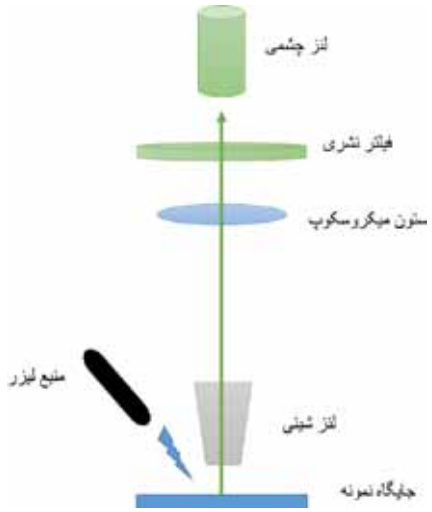


(ب)

شکل۶: لیزر دیود با توان ۲۵ میلی‌وات و با طول‌موج نشری ۴۰۵ نانومتر(الف)، جایگاه قرارگیری منبع لیزر در یکی از عدسی‌های چشمی(ب)

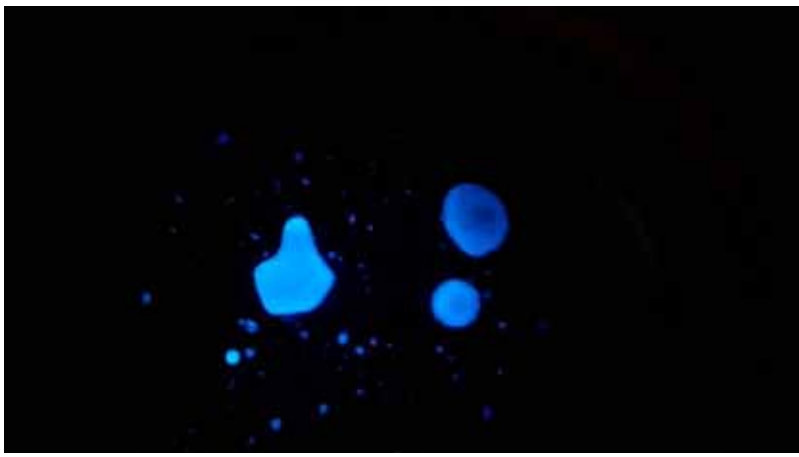
طرح مشاهده می‌شود. به‌دلیل پهنای باند باریک پرتوی لیزی و همچنین زاویهٔ تابش نسبت به لنز شیئی نیازی به استفاده از فیلتر برانگیختگی نبود. برای کاهش اتلاف پرتوی فلوئورسانس در قطعات نوری سر میکروسکوپ، این قسمت از روی دستگاه برداشته شد و لنز و فیلتر به‌طور مستقیم روی ستون منتهی به عدسی شیئی قرار گرفت. در ادامهٔ کار از این چیدمان برای عدسی چشمی و فیلتر استفاده شد. جهت مشاهدهٔ عملکرد میکروسکوپ در این حالت، از محلول Cyclo A با غلظت $۲/۵\times۱۰^{-۴}$ مولار استفاده شد و ۱۰۰ میکرولیتر آن را در۱میلی‌لیتر روغن به‌صورت امولسیون درآورده‌شد تا قطرات ریزی تشکیل دهد و سپس۱۰میکرولیتر از آن روی لام قرار داده‌شد و زیر میکروسکوپ از آن تصویربرداری شد که نمونه‌ای از تصاویر آن در شکل۸ مشاهده می‌شود. در تصویربرداری

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-14]



شکل۷: جایگاه منبع لیزر در زاویهٔ ۴۵ درجه روی سکوی نمونه و موقعیت سایر قطعات اوپتیکی میکروسکوپ

در این حالت از فیلتر نشری باند گذر ۴۵۰ نانومتر استفاده شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با استفاده از این چیدمان اجزاء میکروسکوپ، امکان تصویربرداری از قطرات محلول دارای فلوئورسانس با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر به‌خوبی وجود دارد. ازطرفی به‌دلیل زاویهٔ تابش پرتوی لیزر نسبت به آشکارساز، مزاحمت حاصل‌از رسیدن نور منبع به آشکارساز بسیار کم است. ولی در بزرگ‌نمایی‌های بالاتر به‌دلیل کاهش فاصلهٔ لنز شیئی و نمونه و همچنین به‌دلیل کاهش ابعاد عدسی آن، امکان رسیدن پرتوی لیزر به نمونه در محل تصویربرداری لنز شیئی وجود ندارد. به‌همین‌دلیل جایگاه لیزر برای بزرگ‌نمایی‌های بالاتر باید به گونه‌ای قرار گیرد که امکان رسیدن پرتوی نور به نمونه فراهم باشد. یکی‌دیگر از جایگاه‌های ممکن برای قراردادن منبع نور لیزر، جایگزین‌کردن آن با کندانسور نور بود. به این منظور، سیستم کندانسور نور میکروسکوپ معمولی برداشته شد و لیزر در محل آن قرارداده‌شد شکل۹ (الف). سپس یک لایه از اپیدرم

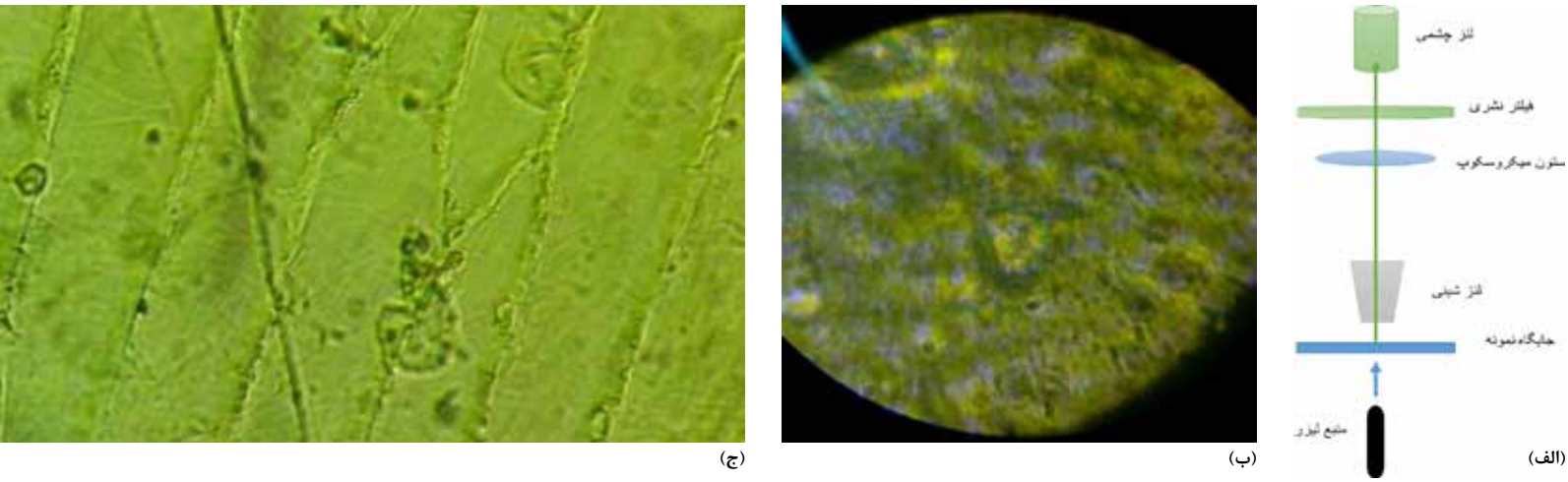


شکل۸: تصویر میکرووسکوپی فلوئورسانس امولسیون قطرات بسیار ریزترکیب Cyclo A در روغن (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر، منبع لیزر ۴۰۵ نانومتر و فیلتر نشری ۴۵۰ نانومتر)

پیاز آغشته به محلول Cyclo A، روی لام میکروسکوپ قرارداده‌شد و تصویربرداری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر انجام شد. به‌دلیل شدت بالای لیزر، در برخی از نقاط ناهنجاری‌های نوری ناشی از عبور پرتو منبع از فیلتر ۴۵۰ نانومتر دیده می‌شد که نمونه‌هایی از آن در شکل۹ (ب) مشاهده می‌شود. این مشکل با کاهش ولتاژ منبع تغذیه از بین رفت که در شکل۹ (ج) تصویر آن دیده‌می‌شود. ولی همان‌طور که می‌بینید، به‌دلیل عبور مستقیم پرتو با طول‌موج نزدیک با ناحیهٔ UV و فلوئورسانس خودبه خودی اجزاء اپتیکی، نشر زمینه به‌صورت سبزرنگ دیده می‌شود که برای تصویربرداری مناسب نیست. اگرچه ازنظر بزرگ‌نمایی و شفافیت تصویر توانایی تشخیص ساختار میکروسکوپی اپیدرم پیاز به‌خوبی وجود دارد. با توجه به اینکه برانگیخته‌کردن ترکیب Cyclo A نیاز به منبع با تابش فرابنفش یا نزدیک به فرابنفش داشت و همان‌طوری‌که مشاهده‌شد باعث ناهنجاری‌های تصویری و طیف قوی زمینه می‌شد، تصمیم گرفته‌شد با استفاده از ترکیب فلورسین که دارای طول‌موج ماکزیمم جذبی در ناحیهٔ ۴۹۰ نانومتر و ماکزیمم نشر فلوئورسانس در۵۱۲ نانومتر است، به‌عنوان ترکیب فعال فلوئورسانسی استاندارد برای بررسی کارآیی میکروسکوپ ساخته‌شده استفاده شود. با توجه به طول‌موج جذبی فلورسین، امکان استفاده از منابع نوری مختلفی مانند لامپ‌های بخارِ جیوه، لامپ زنون و تنگستن وجود داشت. به‌دلیل قیمت بالای لامپ‌های زنون و بخارِ جیوه، لامپ تنگستن برای برانگیخته‌کردن فلورسین انتخاب شد. با این منظور، نیاز به یک فیلتر برای محدود کردن طول‌موج‌های لامپ تنگستن و جداسازی طول‌موج موردنظر برای برانگیختگی فلورسین بود که از یک فیلتر باند گذر با طول‌موج ماکزیمم عبور در ۴۸۸ نانومتر و پهنای باند در نیمهٔ ارتفاع ۱۰ نانومتر استفاده شد. فیلتر موردنظر زیر کندانسور نور قرار گرفت. همچنین برای فیلترکردن پرتوی نشری از یک فیلتر بلند گذر ۵۲۰ نانومتر استفاده شد. نمایی از این چیدمان در شکل۱۰(الف) مشاهده می‌شود همچنین تصویر میکروسکوپ فلوئورسانسی از بخش کوچکی از اپیدرم پیاز که توسط فلوئورسین فعال شده است، در شکل۱۰(ب) دیده می‌شود. همان‌طوری‌که از شکل پیدا است، نشر زمینه به‌طورکامل محو شده است و اپیدرم فعال‌شده با فلوئورسین با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر به وضوح دیده می‌شود.

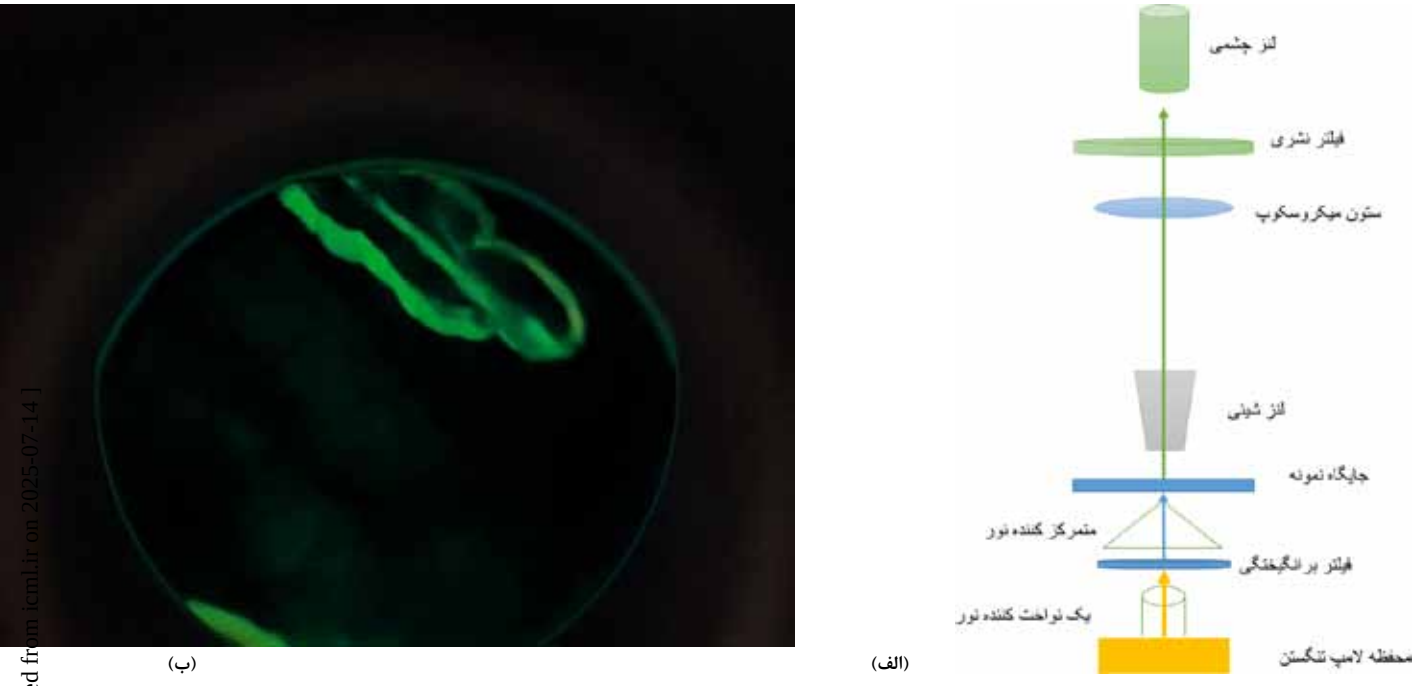
برای بررسی کارآیی میکروسکوپ در تصویربرداری از نمونه‌های حقیقی و بافت‌های زنده، رنگ‌آمیزی باکتری‌ها با FITC مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور باکتری‌های گرم‌مثبت در محیط کشت دارای فلورسین‌ایزوتیوسیانات کشت داده‌شدند. سپس روی لام منتقل و به‌وسیلهٔ میکروسکوپ از آن‌ها تصویربرداری شد. در شکل۱۱(الف)، تصویر نمونهٔ باکتری‌هایی که FITC را جذب کرده‌اند با میکروسکوپ معمولی و در شکل شکل۱۱(ب)، تصاویر حاصل‌از تصویربرداری از همان قسمت از تودهٔ باکتری با میکروسکوپ فلوئورسانس ساخته‌شده دیده‌می شود. نقاط سبزرنگ حاصل فلوئورسانس باکتری‌هایی است که FITC

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-14]



شکل۹: نمای منبع لیزر در جایگاه کندانسور نور (الف)، ناهنجاری ناشی‌از فلوئورسانس اجزای اوپتیکی در تصویر میکروسکوپی فلوئورسانس از اپیدرم پیاز، اصلاح ناهنجاری‌ها با کاهش ولتاژ منبع نور(ج)

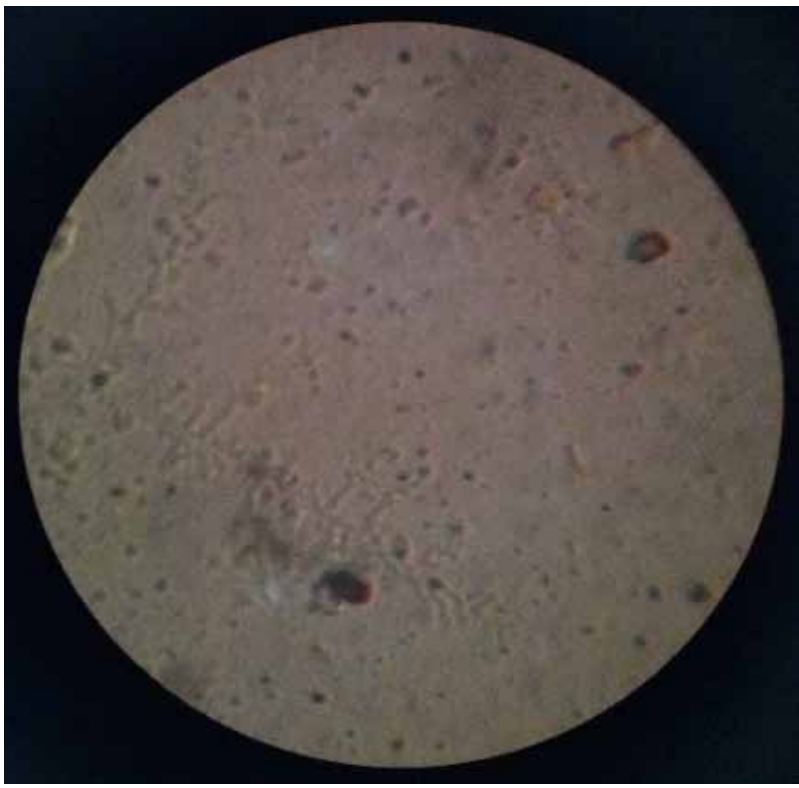
را جذب کرده‌اند که به‌وضوح قابل‌مشاهده‌اند. این مشاهده نشان می دهد که میکروسکوپ فلوئورسانسی ساخته‌شده توانایی تصویربرداری از بافت زنده را دارد. حداکثر بزرگ‌نمایی تصویر بااستفاده‌از منابع تنگستن و دیود۴۰۰ برابر است.میکروسکوپ فلوئورسانسی بااستفاده‌از منابع نوری دیود، لیزر و لامپ تنگستن و همچنین فیلترهای برانگیختگی و فیلترهای نشری ساخته‌شد. حداکثر بزرگ‌نمایی تصویر میکروسکوپ فلوئورسانسی ساخته‌شده ۴۰۰ برابر اندازهٔ واقعی جسم بود. برای دستیابی به بزرگ‌نمایی های بالاتر، استفاده‌از آیینه های دو رنگ‌نما ضروری است. در طراحی میکروسکوپ‌های بعدی به این موضوع و افزایش قابلیت‌های میکروسکوپ ساخته‌شده پرداخته‌می‌شود. قیمت تمام‌شدهٔ میکروسکوپ ساخته‌شده حدود۳۰میلیون ریال است که تقریباً ۷۰ برابر ارزان‌تر از نمونه‌های خارجی است. ناگفته نماند تجاری‌سازی و افزودن قطعات خاص اوپتیکی ممکن است قیمت نهایی را تا حدود۱۰ میلیون ریال افزایش دهد که هنوز۲۰ برابر ارزان‌تر از نمونه‌های خارجی با قابلیت‌های مشابه است. میکروسکوپ‌های خارجی فقط به منابع نوری با طول‌موج بالای ۴۵۰ نانومتر مجهز هستند و به‌همین‌دلیل قابلیت استفاده از مشتقات دارای فلوئورسانس در طول‌موج‌های پایین‌تر را ندارند. درصورتی‌که با متحرک سازی بخش منبع مشابه آنچه در طراحی این میکروسکوپ بررسی شد،



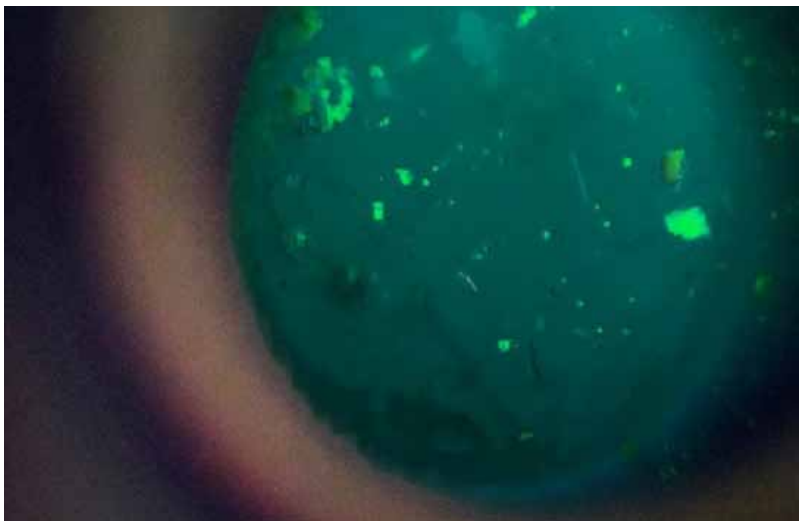
شکل۱۰: موقعیت منبع تنگستن در طراحی میکروسکوپ فلوئورسانس(الف)، تصویر میکروسکوپ فلوئورسانسی با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر از اپیدرم پیاز فعال‌شده با ترکیب فلوئورسین با استفاده از منبع تنگستن

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-14]

می‌تـوان از تمام منابع دارای شـدت نشـر قابل توجـه در ناحیهٔ مرئی و فرابنفـش نزدیک اسـتفاده کرد. چنیـن قابلیتی امکان اسـتفاده از انواع مشـتقات شیمیایی و بیوشیمیایی که دارای نشـر فلوئورسانس در ناحیهٔ مرئی هستند و واکنش‌پذیری لازم را جهت فعال‌کردن و برچسب‌زنی گونه های مهم زیستی دارند، جهت تصویربرداری فلوئورسانسی استفاده کرد و نشر فلوئورسانس آن‌ها را در بافت‌های هدف رصد کرد.



(الف)



(ب)

شـکل۱۱: تصویر میکروسکوپ معمولی از باکتری‌های گرم مثبت(الف) تصویر میکروسکوپ فلوئورسانسی از باکتری‌های گرم مثبت با بزرگ‌نمایی۴۰۰ برابر(ب)

نتیجه‌گیری

میکروسـکوپ فلوئورسانسـی بااسـتفاده‌از منابع نوری دیـود، لیزر و لامپ تنگسـتن و همچنین فیلترهای برانگیختگی و فیلترهای نشـری ساخته‌شـد. حداکثر بزرگ‌نمایی تصویر میکروسـکوپ فلوئورسانسـی ساخته‌شـده۴۰۰ برابر اندازهٔ واقعی جسم بود. برای دستیابی به بزرگ نمایی‌های بالاتر، اسـتفاده‌از آیینه های دو رنگ‌نما ضروری اسـت. در طراحـی میکروسـکوپ‌های بعدی به ایـن موضوع و افزایـش قابلیت هـای میکروسـکوپ ساخته‌شـده پرداخته‌می‌شـود. قیمت تمام‌شـدهٔ میکروسـکوپ ساخته‌شـده حدود۳۰میلیون ریال اسـت که تقریباً ۷۰ برابر ارزان‌تر از نمونه‌های خارجی اسـت. ناگفته نماند تجاری‌سـازی و افزودن قطعات خاص اوپتیکی ممکن اسـت قیمت نهایی را تا حدود۱۰ میلیـون ریال افزایـش دهد که هنـوز۲۰ برابر ارزان‌تـر از نمونه‌های خارجی با قابلیت‌های مشـابه اسـت. میکروسـکوپ‌های خارجی فقط بـه منابـع نوری بـا طول‌موج بـالای ۴۵۰ نانومتر مجهز هسـتند و به همین‌دلیل قابلیت اسـتفاده از مشـتقات دارای فلوئورسـانس در طول موج‌های پایین‌تر را ندارند. درصورتی‌که با متحرک‌سـازی بخش منبع مشـابه آنچه در طراحی این میکروسکوپ بررسی شد، می‌توان از تمام منابع دارای شـدت نشـر قابل توجه در ناحیهٔ مرئی و فرابنفش نزدیک اسـتفاده کرد. چنین قابلیتی امکان استفاده از انواع مشتقات شیمیایی و بیوشـیمیایی که دارای نشـر فلوئورسـانس در ناحیهٔ مرئی هستند و واکنش‌پذیـری لازم را جهت فعال‌کردن و برچسـب‌زنی گونه‌های مهم زیسـتی دارند، جهت تصویربرداری فلوئورسانسـی استفاده کرد و نشر فلوئورسـانس آن‌ها را در بافت‌های هدف رصد کرد.

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-14]

References:

1. Kobayashi H, Choyke PL, Target. Cancer-Cell-Specific Activatable Fluorescence Imaging Probes: Rational Design and in Vivo. Applications. Acc Chem Res 2011; 44(2): 83-90.

2. Hama Y, Urano Y, Koyama Y, Kamiya M, Bernardo M, Paik RS. A Target Cell Specific Activatable Fluorescence Probe for In vivo Molecular Imaging of Cancer Based on a Self-Quenched Avidin-Rhodamine Conjugate. Cancer Res 2007; 67(6): 2791-9.

3. Kelderhouse LE, Chelvam V, Wayua C, Mahalingam S, Poh S, Kularatne SA. Development of Tumor-Targeted Near Infrared Probes for Fluorescence Guided Surgery. Bioconjugate Chem 2013; 24(6): 1075-80.

4. Park J, Lee HY, Cho M-H, Park SB. Development of a Cy3-Labeled Glucose Bioprobe and Its Application in Bioimaging and Screening for Anticancer Agents. Angew Chem Int Ed 2007; 46: 2018-22.

5. Urano Y, Asanuma D, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Kamiya M. Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH activatable fluorescence probes. Nat Med 2009; 15: 104-09.

6. Lowe AR, Siegel JJ, Kalab P, Siu M, Weis K, Liphardt JT. Selectivity mechanism of the nuclear pore complex characterized by single cargo tracking. Nature 2010; 467: 600- 4.

7. Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. Chem Rev 2010; 110: 2620-40.

8. Ranyuk E, Cauchon N, Klarskov K, Guérin B, van Lier JE. Phthalocyanine–Peptide Conjugates: Receptor-TargetingBifunctional Agents for Imaging and Photodynamic Therapy. J Med Chem 2013; 56: 1520-34.

9. Mérian J, Gravier J, Navarro F, Texier I. Fluorescent Nanoprobes Dedicated to in Vivo Imaging: From Preclinical Validations to Clinical Translation. Molecules 2012; 17: 5564-91.

10. Jutamulia S, Gadjali H. Compact one-lens fluorescence microscope using CMOS image sensor. Proc SPIE 9444, International Seminar on Photonics, Optics, and Its Applications; 2014 Jan, doi:10.1117/12.2075073

11. Bagh S, Paige MF. Construction and application of a single-molecule fluorescence microscope. Can J Chem 2005; 83(5): 435-42.

12. Beltran-Parrazal L, Morgado-Valle C, Serrano RE, Manzo J, Vergara JL. Design and construction of a modular low-cost epifluorescence upright microscope for neuron visualized recording and fluorescence detection. J Neurosci methods 2014; 225: 57-64.

13. Asghari S, Qandalee. A facile one-pot synthesis of amino furans using trans cinnamaldehyde in the presence of nucleophilic isocyanides Acta Chim Slov 2007; 54: 638-40.

14. Anthony RM, Kolk AH J, Kuijper S, Klatser. PR.Light emitting diodes for auramine O fluorescence microscopic screening of Mycobacterium tuberculosis [Technical Note]. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10: 1060-2.

15. Ploem JS. Laser scanning fluorescence Microscopy. Appl Opt 1987; 26: 3226-31.

16. Nozue S, Mukuno¬¬ A, Tsuda Y, Shiina T, Terazima M, Kumazaki S. Characterization of thylakoid membrane in a heterocystous cyanobacterium and green alga with dual-detector fluorescence lifetime imaging microscopy with a systematic change of incident laser power. Biochim Biophys Acta 2016; 1857: 46–59.

17. Yuan B, Wang X, Tang C, Li X, Yu G. In situ observation of the growth of biofouling layer in osmotic membrane bioreactors by multiple fluorescence labeling and confocal laser scanning microscopy. Water Res 2015; 75: 188-200.

18. Niu C, Wang L, Wang Z, Xu Y, Hu Y, Peng Q. Laser irradiated fluorescent perfluorocarbon microparticles in 2-D and 3-D breast cancer cell models. Sci Rep 2017; 7: 43408.

19. Chen Y, Tan X, Sun Q, Chen Q, Wang W, Fan X. Laser-emission imaging of nuclear biomarkers for high-contrast cancer screening and immunodiagnosis. Nature Biomed Engin 2017; 1: 724–35.

[Downloaded from icml.ir on 2025-07-14]