

مقایسه عملکرد منابع نوری لیزر، دیود و تنگستن در ساخت میکروسکوپ فلئورسانسی ارزان قیمت و کاربرد میکروسکوپ ساخته شده در تصویربرداری از باکتری

خلاصه

کیومرث زرگوش^۱
علیرضا طیبی^۲

مقدمه: میکروسکوپ فلئورسانسی 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 فلئورسانس و درمان فوتودینامیک دارد. از سویی دیگر میکروسکوپ‌های فلئورسانسی گران قیمت هستند، به همین دلیل هدف اجرای این پروژه مقایسه عملکرد منابع نوری لیزر، دیود و تنگستن در ساخت میکروسکوپ فلئورسانسی ارزان قیمت می‌باشد.

روش بررسی: در این پروژه تحقیقاتی یک دستگاه میکروسکوپ فلئورسانسی ارزان قیمت 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 فلئورسانسی و همچنین بزرگ‌نمایی تصویر به دست آمده مورد مطالعه قرار گرفت. دو عامل رنگ‌ساز فلئورسانسی مختلف (سیکلوای و فلئورسین) برای فعال‌سازی فلئورسانسی 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 به دست آمد. هنگام استفاده از منابع لیزر، تصویر حاصل دارای نشر زمینه قابل توجهی بود که این امر کاربرد آن را جهت تصویربرداری از بافت‌ها محدود می‌کرد. میکروسکوپ فلئورسانسی ساخته شده با موفقیت برای تصویربرداری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر و با کیفیت مطلوب از اپیدرم پیاز فعال شده با ترکیب سیکلوای و توده باکتری استرافیلوکوکوس فعال شده با فلئورسین ایزوسیانات به کار برده شد.

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

واژه‌های کلیدی: میکروسکوپ فلئورسانسی، لیزر، باکتری استافیلوکوکوس، لامپ تنگستن، فلئورسین ایزوسیانات، تصویربرداری، فیلتر تداخلی

۱. استادیار گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۲. دانشجوی دکتری شیمی تجزیه، گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران



شکل ۱: شمای طراحی یوهان پلوم یک میکروسکوپ فلورئورسانسی تجاری

نور نشر شده از منبع فلورئورسانس برانگیختگی به وسیله آینه دورنگ نما منحرف می شود و از طریق عدسی شیئی به نمونه برخورد می کند. آینه های دورنگ نما برای طول موج های کوتاه مانند آینه کامل عمل می کنند ولی برای طول موج های بلندتر شفاف هستند. این پدیده باعث می شود نور فلورئورسانس نمونه از این آینه عبور کند و به چشم یا ابزار تصویربرداری (دوربین) برسد. این میکروسکوپ ها از اجزای زیر تشکیل شده اند:

محفظه لامپ فلورئورسانس که محل قرارگیری منبع مخصوص تصویربرداری فلورئورسانس است و معمولاً از لامپ های بخار جیوه یا زنون استفاده می کند.

محفظه لامپ عبوری که برای تصویربرداری معمولی از نمونه استفاده می شود.

عدسی چشمی که مشاهده مستقیم تصویر را برای شخص ممکن می سازد. صفحه گردان دارای عدسی شیئی، این قسمت شامل چند لنز شیئی با بزرگنمایی های مختلف است، با چرخاندن صفحه لنز موردنظر در راستای پرتوی نور و نمونه قرار می گیرد.

سکوی نمونه و پیچ های تنظیم ارتفاع که برای ثابت نگه داشتن نمونه و همچنین تنظیم ارتفاع برای قرارگیری دقیق نمونه در صفحه کانونی عدسی شیئی مورد استفاده قرار می گیرند.

مجموعه لنزها و دیافراگم ها که برای کنترل شدت پرتوی رسیده به نمونه استفاده می شوند و با تنظیم آن ها روشنایی و وضوح تصاویر قابل کنترل است.

امروزه، در جزئیات ساخت این میکروسکوپ ها نوآوری و متنوع سازی فراوانی مشاهده می شود. جوتامولیا^۶ و همکاران در سال ۲۰۱۵ یک

مقدمه

امروزه، میکروسکوپ فلورئورسانسی^۱ کاربردهای وسیعی در زمینه پزشکی نوین و زیست شناسی سلولی و مولکولی پیدا کرده است. از جمله کاربردهای میکروسکوپ فلورئورسانسی در زمینه پزشکی می توان به شناسایی و تصویربرداری از تومورهای سرطانی در ابعاد کوچک تر از میلی متر [۱، ۲]، 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 سلول های 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 [۸] اشاره کرد. با توجه به اینکه در تصویربرداری میکروسکوپ فلورئورسانسی از نشر نمونه فعال در ناحیه طول موجی زیر قرمز نزدیک^۲ استفاده می شود، بافت زمینه (آب و سایر سلول های غیرهدف) حداقل سیگنال نشری را دارا می باشند به همین دلیل تصویر ایجاد شده در این روش قدرت فوق العاده ای در تشخیص تفاوت بافت های هدف (معمولاً بافت سرطانی) از بافت های سالم را دارا می باشند [۹].

باتوجه به کاربردهای وسیع میکروسکوپ فلورئورسانسی در علم پزشکی نوین دسترسی به چنین ابزار پژوهشی و کاربردی در پیشرفت دانش پزشکی کشور و همچنین اجرای موفق جراحی های مختلف ضروری به نظر می رسد. از طرفی قیمت این دستگاه در حدود ۲ میلیارد ریال است. به همین دلیل بومی سازی تکنولوژی ساخت آن از اهمیت شایانی برخوردار است.

اساس کار میکروسکوپ فلورئورسانسی بر جذب و نشر پرتوهای نور استوار است (شکل ۱). در این دستگاه طول موج مشخصی از پرتوی نوری ناشی از یک منبع نوری پایدار توسط آینه ها و عدسی های متمرکز کننده و آینه های دورنگ نما^۳ بر روی نمونه تابانده می شود. نمونه حاوی گونه فعال فلورئورسانسی است که توانایی جذب پرتوی تابیده شده را دارد و می تواند پس از برانگیخته شدن، پرتوی نوری را که دریافت کرده است، در طول موجی متفاوت (معمولاً طول موج بلندتر) نشر کند. این نور با عبور از قطعات اپتیکی به عدسی چشمی می رسد و تصویری از نمونه هدف را بر مبنای میزان نور نشر شده از نمونه ایجاد می کند. چنین تصویری قابلیت عکس برداری شدن و ذخیره سازی دارد. طراحی میکروسکوپ های فلورئورسانس امروزی براساس طراحی یوهان پلوم^۵ است که در سال ۱۹۶۰ ارائه گردید. شمای ساده ای از مبنای کار این میکروسکوپ ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

۱. Fluorescence microscope

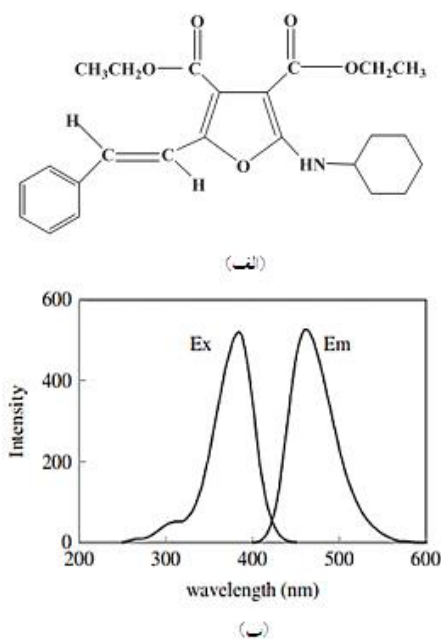
۲. Photodynamic therapy

۳. Near infrared

۴. Dichromatic mirror

۵. Johan Ploem

۶. Jutamulia



شکل ۲: (الف) ساختار ترکیب Cyclo A، (ب) طیف تحریک (ex) و نشر (em) فلئوئورسانس ترکیب cyclo A

نگهداری شد. جهت تهیه محلول مادر از ترکیب فلورسین، مقدار ۰/۰۰۸۰ گرم از آن به طور دقیق توزین شد. سپس در بالن حجمی ۱۰ میلی لیتر در حلال آب به حجم رسید که محلولی با غلظت $2/5 \times 10^{-4}$ مولار به دست آمد. به دلیل پایداری نوری کم، محلول فلئوئورسین به طور روزانه تهیه و در ظرف پوشش دار نگهداری شد.

برای بررسی امکان استفاده از این میکروسکوپ در تصویربرداری از نمونه های حقیقی و بافت های زنده، از روش جذب رنگ دانه FITC به وسیله باکتری و تصویربرداری از کلونی باکتری استفاده شد. در ابتدا باکتری های 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 کلونی های 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 تهیه شده و مطابق دستورالعمل آماده سازی شد. ابتدا مقدار ۳۸ گرم از پودر درون ۱ لیتر آب یون زدایی شده ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه به هم زده شد تا آماس پیدا کند. سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. بعد از رسیدن به دمای ۴۷ درجه، به ۵ میلی لیتر از آن، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول ۱۰ میلی مولار FITC اضافه شد و به ظرف کشت منتقل شد.

میکروسکوپ فلئوئورسانس تک لنز با حس گر CMOS^۷ ساختند. در این زمینه آن ها از یک لنز، یک فیلتر نشری، یک حس گر تصویربرداری و یک سیستم نوردهی بین نمونه و لنز استفاده کردند. این سیستم نوردهی شامل یک هرم با سر تخت بود که به وسیله آن پرتوی نور منبع را به سمت محل نمونه منحرف می کردند. نور از سطح جانبی شیب دار وارد هرم می شد و از سر هرم خارج می گردید و به نمونه می رسید. آن ها توانستند با این سیستم یک میکروسکوپ فلئوئورسانس با منبع برانگیختگی LED^۸ بسازند [۱۰]. در سال ۲۰۰۵ نیز باقی^۹ و پایج^{۱۰} با استفاده از تکثیر کننده های تثبیت شده بر روی تراشه^{۱۱} و آشکارسازهای فوتونی^{۱۲} CCD یک میکروسکوپ فلئوئورسانسی ساختند که قادر به اندازه گیری غلظت ترکیبات فلئوئورسنت در غلظت های بسیار کم بود [۱۱]. در سال ۲۰۱۴ نیز پارازال^{۱۳} و همکاران با حذف اجزای گران قیمت یک میکروسکوپ فلئوئورسانسی به یک الگوی ارزان قیمت برای تولید میکروسکوپ فلئوئورسانسی با کاربرد معین نظیر تصویربرداری مری از نورون ها^{۱۴} دست یافتند [۱۲]. در مقاله حاضر، مراحل ساخت یک دستگاه میکروسکوپ فلئوئورسانسی با قابلیت ثبت تصاویر فلئوئورسانسی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر و با قیمت بسیار کم (حدود ۳۰ میلیون ریال) بر پایه یک میکروسکوپ نوری معمولی گزارش می شود. اثر عوامل ساختاری مختلف بر کیفیت تصویر مورد بحث قرار می گیرد و پارامترهای مختلف، بهینه سازی می شوند و در نهایت، بهترین ساختار میکروسکوپ انتخاب می شود.

روش بررسی

یکی از ترکیبات فعال فلئوئورسانسی برای برچسب زنی بافت های مورد نظر برای تصویربرداری، ترکیب Cyclo A است که با روش ذکر شده در مرجع [۱۳] سنتز شد. شکل ۲ ساختمان ترکیب Cyclo A، طیف تحریک و طیف نشر فلئوئورسانس آن را نشان می دهد.

فلورسین و فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC)^{۱۵} نیز به منظور رنگ دار کردن باکتری ها و بررسی کارایی میکروسکوپ به کار رفتند هر دو ترکیب از شرکت مرک خریداری شدند و دارای خلوص تجزیه ای بودند. جهت تهیه محلول مادر از ترکیب Cyclo A با غلظت $2/5 \times 10^{-4}$ مولار، ابتدا مقدار دقیق ۰/۰۰۲۶ گرم از Cyclo A توزین شد، سپس در بالن ۲۵ mL توسط حلال اتانول به حجم رسانده شد و برای استفاده های 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

۱۶. Gram-positive staphylococcus bacteria

۱۷. Blood Agare

۱۸. Swap

۱۹. Mueller-Hinton agar

جدول ۱: مشخصات LED های استفاده شده در ساخت میکروسکوپ فلوئورسانس

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

جدول ۲: مشخصات لیزر استفاده شده در ساخت میکروسکوپ براساس کاتالوگ لیزر

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

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

یکی از منابع برانگیختگی جدید مورد استفاده در میکروسکوپ‌ها، لامپ‌های LED هستند [۱۴] که به دلیل پهنای باند نشری کم بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. در این پروژه از لامپ‌های LED با طول موج‌های نشری ۳۶۵، ۳۷۰ و ۳۸۰ نانومتر استفاده شد. پهنای طول موج خروجی هر کدام 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 فلوئورسانس انتخاب‌شده از یک لیزر دیود با طول موج خروجی ۴۰۵ نانومتر و شدت ۲۵ میلی‌وات استفاده شد. این لیزر توسط یک منبع تغذیه سوئیچینگ^{۲۱} که به‌وسیله یک آداپتور برق، با خروجی ۱۲ ولت و شدت جریان خروجی ۱ آمپر، تغذیه و روشن می‌شد.

به دلیل در دسترس و ارزان بودن لامپ‌های تنگستن و همچنین طیف نشری در ناحیه 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 طول موج ۴۸۸ نانومتر استفاده شد. یکی از اجزاء مهم میکروسکوپ فلوئورسانس، فیلترهای برانگیختگی و نشری است که امکان مشاهده

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

به‌عنوان یک پایه ساختاری ارزان قیمت جهت ساختن میکروسکوپ فلوئورسانس از میکروسکوپ نوری معمولی مدل Xsz-107bn، ساخت شرکت نینگبو هینوتک^{۲۰} استفاده شد که در شکل ۳ نمای از آن مشاهده می‌شود. این میکروسکوپ دارای ۴ لنز شیئی با بزرگ نمایی‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰ 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



شکل ۳: نمایی از میکروسکوپ استفاده شده در ساخت میکروسکوپ فلوئورسانس

۲۰. Ningbo Hinotek Technology Co

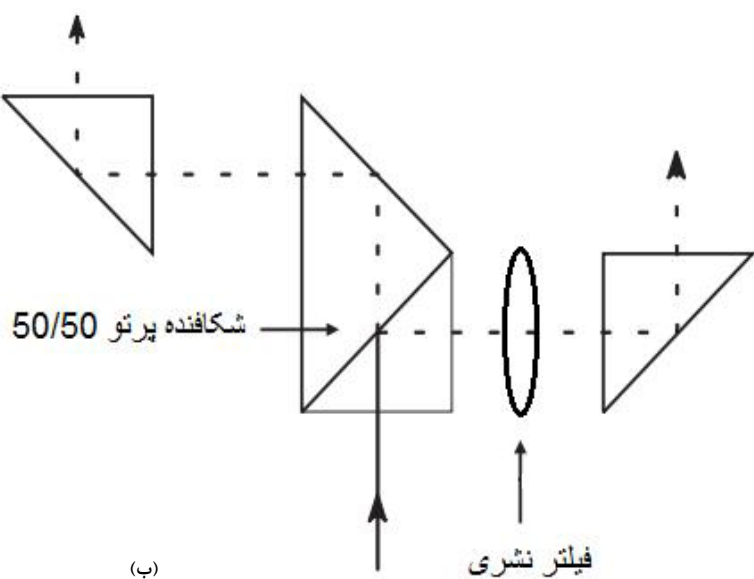
۲۱. Switching Power Supply

یافته‌ها و بحث

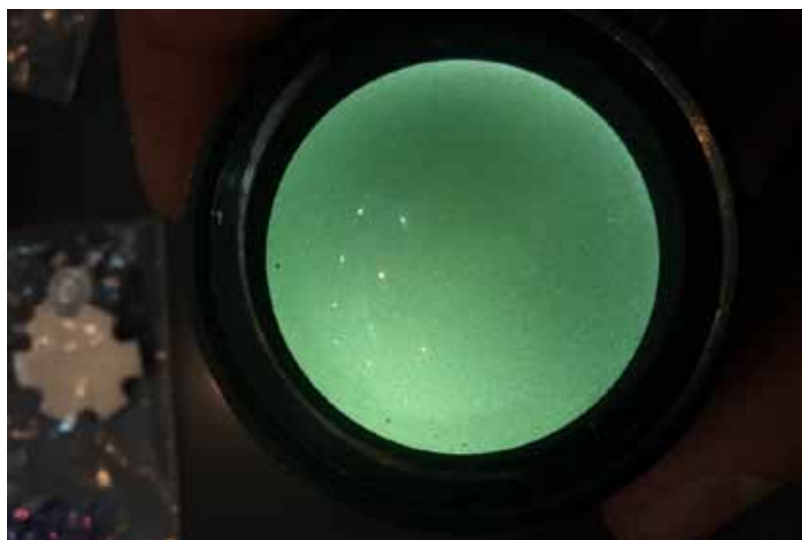
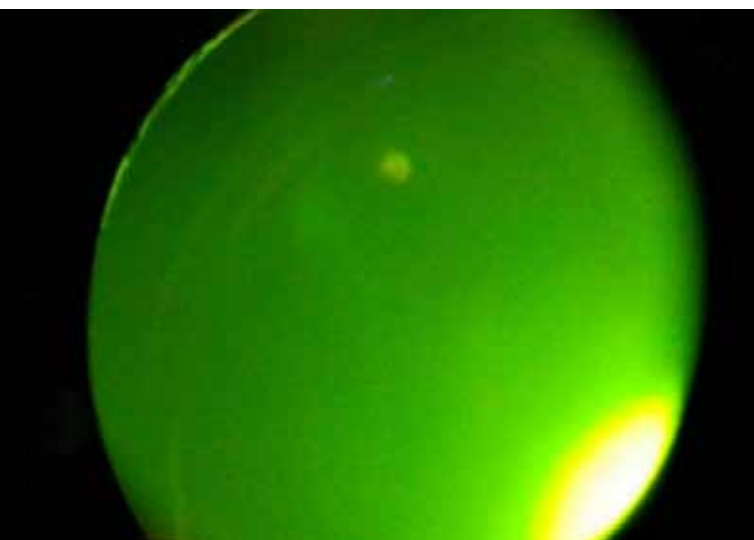
پس از انتخاب بدنه یک میکروسکوپ معمولی جهت ساخت میکروسکوپ فلئوئورسانس، باید تأثیر هریک از عوامل انتخاب‌شده در ساخت میکروسکوپ فلئوئورسانس نظیر منابع نوری لیزری، منابع نوری LED، فیلترهای انتخاب طول موج برانگیختگی، فیلترهای انتخاب طول موج نشری و جایگاه مناسب قطعات انتخاب‌شده بر کیفیت و بزرگی نمایی تصویر مورد مطالعه قرار گیرد. 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 کوچک تر و

گزینشی طول موج‌های ماده فلئوئورسانس را فراهم می‌کند. در این پروژه از فیلترهای تداخلی ساخت شرکت ایلینگ الکترواپتیک^{۲۲} استفاده شد. به‌منظور ثبت تصاویر میکروسکوپ فلئوئورسانسی 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 فاصله مناسب برای تصویربرداری و تعیین فاصله بهینه برای عکس‌برداری با کیفیت مناسب، اپیدرم پياز به‌دلیل سادگی بافت جهت تصویربرداری انتخاب شد.

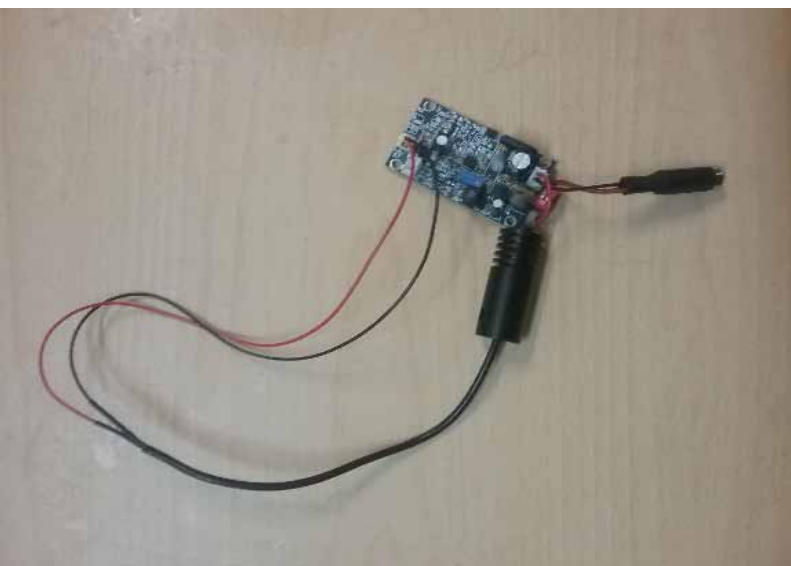
۲۲. Ealing Electro Optics



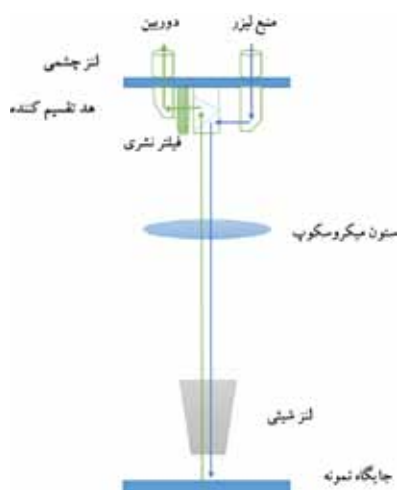
شکل ۴: ساختار هد میکروسکوپ (الف)، مسیر عبور نور منبع از هد (ب)



شکل ۵: تصویر نشر زمینه ناشی از منبع LED ۳۷۰ نانومتر (الف) و منبع LED ۳۶۵ نانومتر (ب)



(الف)



(ب)

شکل ۶: لیزر دیود با توان ۲۵ میلی‌وات و با طول موج نشری ۴۰۵ نانومتر (الف)، جایگاه قرارگیری منبع لیزر در یکی از عدسی‌های چشمی (ب)

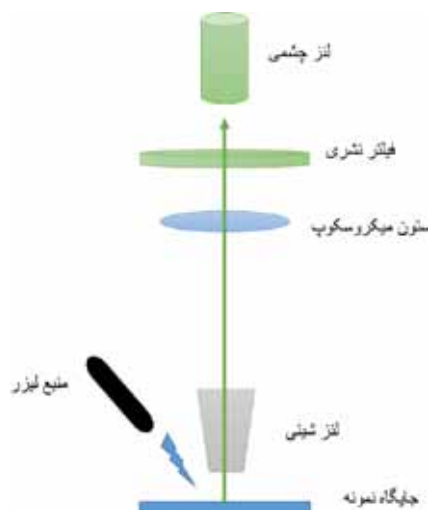
طرح مشاهده می‌شود. به دلیل پهنای باند باریک پرتوی لیزی و همچنین زاویه تابش نسبت به لنز شیئی نیازی به استفاده از فیلتر برانگیختگی نبود. برای کاهش اتلاف پرتوی فلئورسانس در قطعات نوری سر میکروسکوپ، این قسمت از روی دستگاه برداشته شد و لنز و فیلتر به‌طور مستقیم روی ستون منتهی به عدسی شیئی قرار گرفت. در ادامه کار از این چیدمان برای عدسی چشمی و فیلتر استفاده شد. جهت مشاهده عملکرد میکروسکوپ در این حالت، از محلول Cyclo A با غلظت $10^{-4} \times 2/5$ مولار استفاده شد و ۱۰۰ میکرولیتر آن را در ۱ میلی‌لیتر روغن به‌صورت امولسیون درآورده شد تا قطرات ریزی تشکیل دهد و سپس ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام قرار داده شد و زیر میکروسکوپ از آن تصویربرداری شد که نمونه‌ای از تصاویر آن در شکل ۸ مشاهده می‌شود. در تصویربرداری

ستون تقسیم‌کننده مرکزی قرار گیرد. در این صورت در یکی از لنزهای چشمی تصویر نمونه با فیلتر نور در طول موج مشخص دیده می‌شود 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 طول موج‌های ۳۷۰، ۳۸۰ و ۳۶۵ نانومتر بودند این طول موج‌ها توانایی ایجاد برانگیختگی فلئورسانس ترکیب Cyclo A را دارا هستند.

مشکل اصلی ایجاد شده در تصویر حاصل هنگام استفاده از منابع LED (دارای نور UV)، فلئورسانس خودبه‌خودی اجزاء اپتیکی میکروسکوپ بود که دلیل آن جنس لنزهای استفاده شده در آن‌ها است و همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، باعث نشر نور سبز رنگ شدیدی می‌شد و با کاهش طول موج منبع نور (استفاده از LED با طول موج نشری ۳۶۸ نانومتر به جای ۳۸۰ نانومتر) شدت این نشر نیز افزایش می‌یابد و امکان استفاده از این منبع نور را برای ساخت میکروسکوپ فلئورسانسی غیرممکن می‌سازد، زیرا نشر زمینه قوی، سیگنال مربوط به بافت اصلی نمونه را می‌پوشاند. به همین دلیل به عنوان انتخاب دیگر از یک لیزر دیود با توان ۲۵ میلی‌وات و با طول موج ۴۰۵ نانومتر استفاده شد که در شکل ۶ 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 در ۳ موقعیت مختلف وجود داشت که شامل قرارگیری لیزر در لنز چشمی، قرارگیری در جایگاه کندانسور و قرارگیری با زاویه ۴۵ درجه روی جایگاه نمونه. در ابتدا یکی از عدسی‌های چشمی خارج شد و لامپ لیزر به جای آن قرار داده شد. در این حالت لنز چشمی دوم به‌منظور تصویربرداری از پرتوی فلئورسانس حاصل از رنگ‌دانه با فیلتر تداخلی ۴۵۰ نانومتری فیلتر شد. پرتوی لیزر پس از شکسته شدن 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 شکل ۶ نشان داده شده است. نشر فلئورسانس نیز از طریق عدسی جمع‌آوری شده و توسط فیلتر، زمینه آن حذف می‌گردد. بعد از قرارگیری اجزای میکروسکوپ در این حالت، مشاهده شد که سیگنال فلئورسانس بسیار ضعیف است. علت این سیگنال ضعیف، تلف شدن توان نشر فلئورسانس در قسمت تقسیم‌کننده نور در هد میکروسکوپ بود که مانع از رسیدن تمام پرتو به دوربین می‌شد. از طرفی به علت 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 زاویه ۴۵ درجه روی سکوی نمونه قرار گرفت به‌صورتی که باریکه پرتوی خروجی لیزر دقیقاً به محل تصویربرداری لنز شیئی تابیده شود که در شکل ۷ تصویری از این

پیاز آغشته به محلول Cyclo A، روی لام میکروسکوپ قرار داده شد و تصویربرداری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر انجام شد. به دلیل 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 شکل ۹ (ب) مشاهده می‌شود. این مشکل با کاهش ولتاژ منبع تغذیه از بین رفت که در شکل ۹ (ج) تصویر آن دیده می‌شود. ولی همان‌طور که می‌بینید، به دلیل عبور مستقیم پرتو با طول‌موج نزدیک با ناحیه UV و فلئورسانس خودبه‌خودی اجزاء اپتیکی، نشر زمینه به‌صورت سبزرنگ دیده می‌شود که برای تصویربرداری مناسب نیست. اگرچه از نظر 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 مشاهده شد باعث ناهنجاری‌های تصویری و طیف قوی زمینه می‌شد، تصمیم گرفته شد با استفاده از ترکیب فلورسین که دارای طول‌موج ماکزیمم جذبی در ناحیه ۴۹۰ نانومتر و ماکزیمم نشر فلئورسانس در ۵۱۲ نانومتر است، به‌عنوان ترکیب فعال فلئورسانسی استاندارد برای بررسی کارایی میکروسکوپ ساخته‌شده استفاده شود. با توجه به طول‌موج جذبی فلورسین، امکان استفاده از منابع نوری مختلفی مانند لامپ‌های بخار جیوه، لامپ زنون و تنگستن وجود داشت. به دلیل قیمت بالای لامپ‌های زنون و بخار 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 نیمه ارتفاع ۱۰ نانومتر استفاده شد. فیلتر موردنظر زیر کندانسور نور قرار گرفت. همچنین برای فیلتر کردن پرتوی نشری از یک فیلتر بلند گذر ۵۲۰ نانومتر استفاده شد. نمایی از این چیدمان در شکل ۱۰ (الف) مشاهده می‌شود همچنین تصویر میکروسکوپ فلئورسانسی از بخش کوچکی از اپیدرم پیاز که توسط فلئورسین فعال شده است، در شکل ۱۰ (ب) دیده می‌شود. همان‌طوری‌که از شکل پیدا است، نشر زمینه به‌طور کامل محو شده است و اپیدرم فعال‌شده با فلئورسین با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر به وضوح دیده می‌شود.

برای بررسی کارایی 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 داده شدند. سپس روی لام منتقل و به‌وسیله میکروسکوپ از آن‌ها تصویربرداری شد. در شکل ۱۱ (الف)، تصویر نمونه باکتری‌هایی که FITC را جذب کرده‌اند با میکروسکوپ معمولی و در شکل ۱۱ (ب)، تصاویر حاصل از تصویربرداری از همان قسمت از توده باکتری با میکروسکوپ فلئورسانس ساخته‌شده دیده می‌شود. نقاط سبزرنگ حاصل فلئورسانس باکتری‌هایی است که FITC

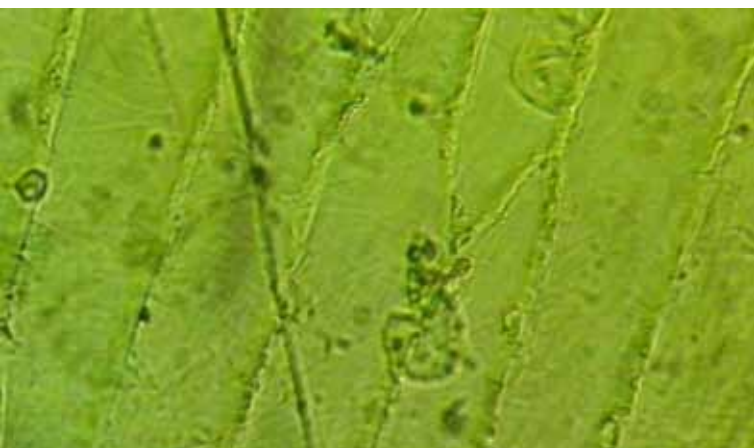


شکل ۷: جایگاه منبع لیزر در زاویه ۴۵ درجه روی سکوی نمونه و موقعیت سایر قطعات اپتیکی میکروسکوپ

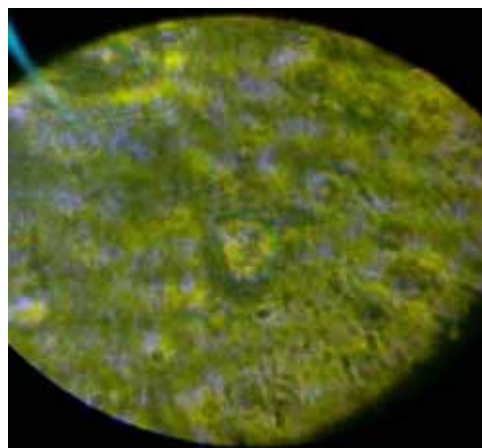
در این حالت از فیلتر نشری باند گذر ۴۵۰ نانومتر استفاده شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با استفاده از این چیدمان اجزاء میکروسکوپ، امکان تصویربرداری از قطرات محلول دارای فلئورسانس با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر به‌خوبی وجود دارد. از طرفی به دلیل زاویه تابش پرتوی لیزر نسبت به آشکارساز، مزاحمت حاصل از رسیدن نور منبع به آشکارساز بسیار کم است. ولی در بزرگ‌نمایی‌های بالاتر به دلیل کاهش فاصله لنز شیئی و نمونه و همچنین به دلیل کاهش ابعاد عدسی آن، امکان رسیدن پرتوی لیزر به نمونه در محل تصویربرداری لنز شیئی وجود ندارد. به همین دلیل جایگاه لیزر برای بزرگ‌نمایی‌های بالاتر باید به گونه‌ای قرار گیرد که امکان رسیدن پرتوی نور به نمونه فراهم باشد. یکی دیگر از جایگاه‌های ممکن برای قراردادن منبع نور لیزر، جایگزین کردن آن با کندانسور نور بود. به این منظور، سیستم کندانسور نور میکروسکوپ معمولی برداشته شد و لیزر در محل آن قرار داده شد شکل ۹ (الف). سپس یک لایه از اپیدرم



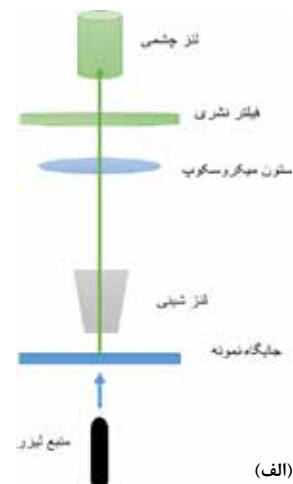
شکل ۸: تصویر میکروسکوپی فلئورسانس امولسیون قطرات بسیار ریز ترکیب Cyclo A در روغن (بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر، منبع لیزر ۴۰۵ نانومتر و فیلتر نشری ۴۵۰ نانومتر)



(ج)



(ب)

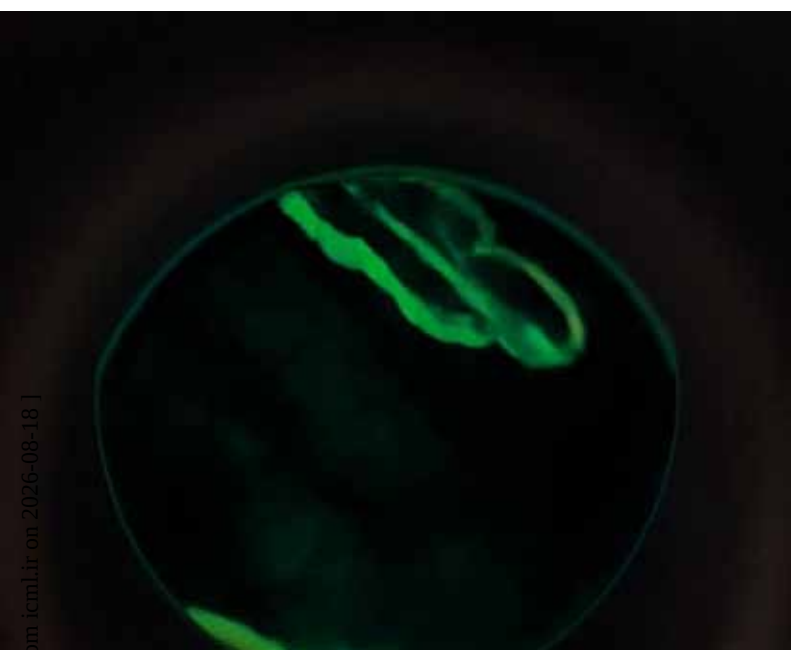


(الف)

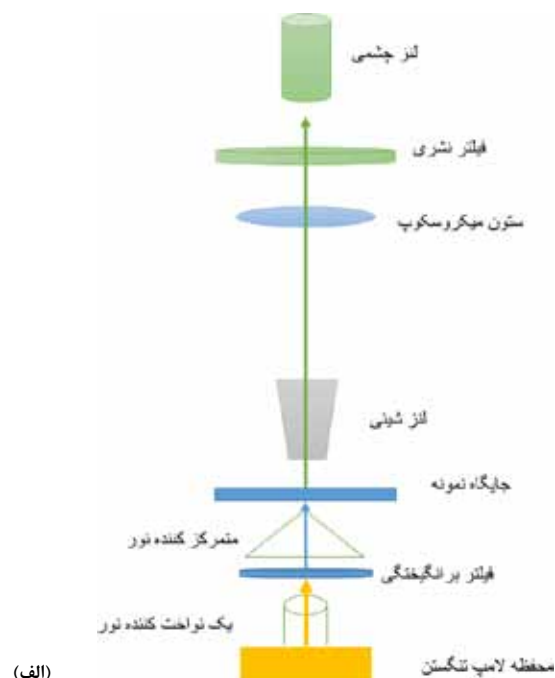
شکل ۹: نمای منبع لیزر در جایگاه کندانسور نور (الف)، ناهنجاری ناشی از فلئوئورسانس اجزای اپتیکی در تصویر میکروسکوپی فلئوئورسانس از اپیدرم پیاز، اصلاح ناهنجاری‌ها با کاهش ولتاژ منبع نور (ج)

ساخته شده پرداخته می‌شود. قیمت تمام شده میکروسکوپ ساخته شده حدود ۳۰ میلیون ریال است که تقریباً ۷۰ برابر ارزان تر از نمونه‌های خارجی است. ناگفته نماند تجاری سازی و افزودن قطعات خاص اپتیکی ممکن است قیمت نهایی را تا حدود ۱۰ میلیون ریال افزایش دهد که هنوز ۲۰ برابر ارزان تر از نمونه‌های خارجی با قابلیت‌های مشابه است. میکروسکوپ‌های خارجی فقط به منابع نوری با طول موج بالای ۴۵۰ نانومتر مجهز هستند و به همین دلیل قابلیت استفاده از مشتقات دارای فلئوئورسانس در طول موج‌های پایین تر را ندارند. در صورتی که با متحرک سازی بخش منبع مشابه آنچه در طراحی این میکروسکوپ بررسی شد،

را جذب کرده‌اند که به وضوح قابل مشاهده‌اند. این مشاهده نشان می‌دهد که میکروسکوپ فلئوئورسانسی ساخته شده توانایی تصویربرداری از بافت زنده را دارد. حداکثر بزرگنمایی تصویر با استفاده از منابع تنگستن و دیود ۴۰۰ برابر است. میکروسکوپ فلئوئورسانسی با استفاده از منابع نوری دیود، لیزر و لامپ تنگستن و همچنین فیلترهای برانگیختگی و فیلترهای نشری ساخته شد. حداکثر بزرگنمایی تصویر میکروسکوپ فلئوئورسانسی ساخته شده ۴۰۰ برابر اندازه واقعی جسم بود. برای دستیابی به بزرگنمایی‌های بالاتر، استفاده از آینه‌های دو رنگ‌نما ضروری است. در طراحی میکروسکوپ‌های بعدی به این موضوع و افزایش قابلیت‌های میکروسکوپ



(ب)



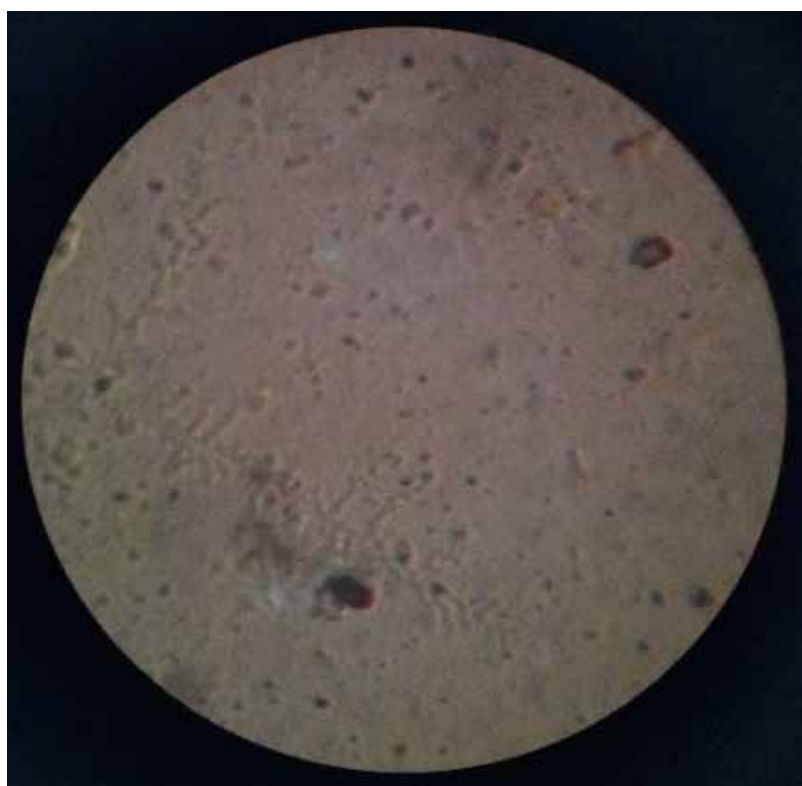
(الف)

شکل ۱۰: موقعیت منبع تنگستن در طراحی میکروسکوپ فلئوئورسانس (الف)، تصویر میکروسکوپ فلئوئورسانسی با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر از اپیدرم پیاز فعال شده با ترکیب فلئوئورسین با استفاده از منبع تنگستن

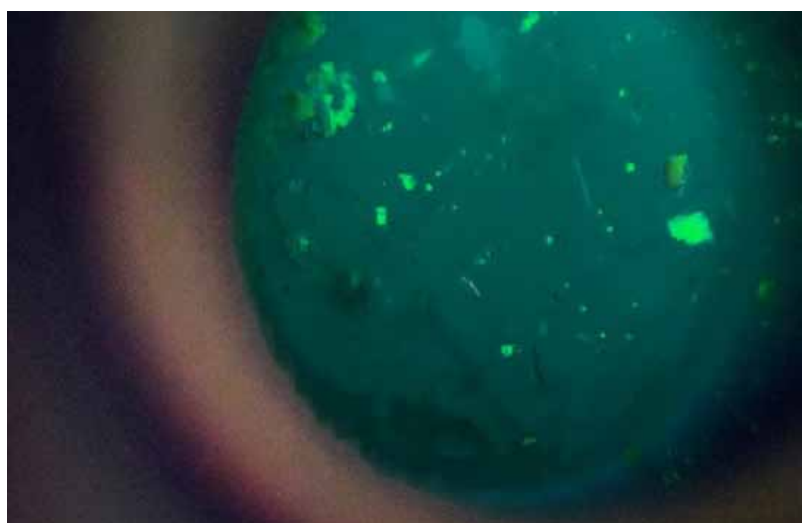
نتیجه گیری

میکروسکوپ فلئوئورسانسی با استفاده از منابع نوری دیود، لیزر و لامپ تنگستن و همچنین فیلترهای برانگیختگی و فیلترهای نشری ساخته شد. حداکثر بزرگ‌نمایی تصویر میکروسکوپ فلئوئورسانسی ساخته شده ۴۰۰ برابر اندازه واقعی جسم بود. برای دستیابی به بزرگ‌نمایی‌های بالاتر، استفاده از آینه‌های دو رنگ‌نما ضروری است. در طراحی میکروسکوپ‌های بعدی به این موضوع و افزایش قابلیت‌های میکروسکوپ ساخته شده پرداخته می‌شود. قیمت تمام‌شده میکروسکوپ ساخته شده حدود ۳۰ میلیون ریال است که تقریباً ۷۰ برابر ارزان‌تر از نمونه‌های خارجی است. ناگفته نماند تجاری‌سازی و افزودن قطعات خاص اپتیکی ممکن است قیمت نهایی را تا حدود ۱۰ میلیون ریال افزایش دهد که هنوز ۲۰ برابر ارزان‌تر از نمونه‌های خارجی با قابلیت‌های مشابه است. میکروسکوپ‌های خارجی فقط به منابع نوری با طول موج بالای ۴۵۰ نانومتر مجهز هستند و به همین دلیل قابلیت استفاده از مشتقات دارای فلئوئورسانس در طول موج‌های پایین‌تر را ندارند. در صورتی که با متحرک‌سازی بخش منبع مشابه آنچه در طراحی این میکروسکوپ بررسی شد، می‌توان از تمام منابع دارای شدت نشر قابل توجه در ناحیه مرئی و فرابنفش نزدیک استفاده کرد. چنین قابلیتی امکان استفاده از انواع مشتقات شیمیایی و بیوشیمیایی که دارای نشر فلئوئورسانس در ناحیه مرئی هستند و واکنش‌پذیری لازم را جهت فعال کردن و برجسب‌زنی گونه‌های مهم زیستی دارند، جهت تصویربرداری فلئوئورسانسی استفاده کرد و نشر فلئوئورسانس آن‌ها را در بافت‌های هدف رصد کرد.

می‌توان از تمام منابع دارای شدت نشر قابل توجه در ناحیه مرئی و فرابنفش نزدیک استفاده کرد. چنین قابلیتی امکان استفاده از انواع مشتقات شیمیایی و بیوشیمیایی که دارای نشر فلئوئورسانس در ناحیه مرئی هستند و واکنش‌پذیری لازم را جهت فعال کردن و برجسب‌زنی گونه‌های مهم زیستی دارند، جهت تصویربرداری فلئوئورسانسی استفاده کرد و نشر فلئوئورسانس آن‌ها را در بافت‌های هدف رصد کرد.



(الف)



(ب)

شکل ۱۱: تصویر میکروسکوپ معمولی از باکتری‌های گرم مثبت (الف) تصویر میکروسکوپ فلئوئورسانسی از باکتری‌های گرم مثبت با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر (ب)

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-Targeting Bifunctional 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.