



بیستمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران
و ششمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۸ تا ۱۰ بهمن ماه ۱۳۹۲ - دانشگاه صنعتی شیراز



مطالعه تأثیر رطوبت در رشد تیوبهای چند لایه‌ای لیپیدی با استفاده از میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی

رعنا موسویانی^۱، نرگس فتحی^۱، علی‌رضا مرادی^{۱،۲} و لعبت طیبی^۳

^۱گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

^۲پژوهشکده اپتیک و فوتونیک، دانشکده تحصیلات تکمیلی در علوم پایه زنجان، زنجان، ایران

^۳Helmerich Advanced Technology Research Center, School of Material Science and Engineering, Oklahoma State University, Tulsa, OK 74106, USA

چکیده - میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی، با ساز و کاری ساده اطلاعات سه بعدی از نمونه‌های تحت بررسی به دست می‌دهد و روشی بسیار مؤثر و کارا برای تصویرگیری از ساختارهای زیستی است. در این مقاله از این روش برای مطالعه تأثیر بخار آب بر رشد تیوبهای چند لایه‌ای لیپیدی استفاده شده است. لیپیدها دسته‌ای از ترکیبات آلی دارای هیدروکربن، شامل اسیدهای چرب، موم، گلیسرول، فسفولیپیدها و کلسترول می‌باشند که تقریباً در همه ساختارها و اندامهای موجودات زنده یافت می‌شوند و بخش اصلی غشا سلول را تشکیل می‌دهند. لیپیدها در آب ساختارهای چندلایه‌ای به وجود می‌آورند، که بسته به عواملی مانند رطوبت و دما نرخ رشد و کیفیت این ساختارها متفاوت خواهد بود. بررسی عامل رطوبت بر چگونگی رشد این ساختارها با تکنیک تمام‌نگاری دیجیتالی در این مقاله انجام گردیده است. قرار گرفته است.

کلیدواژه - تمام‌نگاری دیجیتالی، تیوبهای چندلایه‌ای لیپیدی، فسفولیپیدها، میکروسکوپی سه بعدی

Study of the effect of humidity on dynamics of myelin figure structure using digital holographic microscopy

Rana Mousaviani,¹ Narges Fathi,¹ Ali-Reza Moradi,^{1,2} and Lobat Tayebi³

¹Department of physics, University of Zanjan, PO Box 45195-313, Zanjan, Iran

²Optics research center, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences, PO Box 45137-66731, Zanjan, Iran

³Helmerich Advanced Technology Research Center, School of Material Science and Engineering, Oklahoma State University, Tulsa, OK 74106, USA

Abstract- In this paper we study the effect of humidity on dynamics of myelin figure structure by the use of digital holographic microscopy (DHM) technique. Lipids are a class of organic compounds that are found in many biological structures and constitute the main part of cell membrane. In presence of excess water multilamellar structures may be formed in phospholipid membranes. The growth and dynamics of such structures depend on various factors such as humidity and temperature of the medium. The experimental results of the effect of humidity on the myelin figure dynamics are shown and discussed in this paper.

Keywords: Digital holographic microscopy, myelin figure structure, phospholipids, 3D microscopy

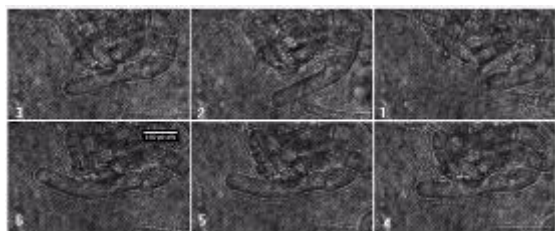
مقدمه

تمام نگاری توسط دنیس گابور در سال ۱۹۴۸ مطرح شد [۱]. طبق ایده وی از طرح تداخلی دو موج، که حاوی اطلاعات فازی از جسم است، می توان اطلاعات بعد سوم را خارج کرد. در تمام نگاری از طرح تداخلی بین نور عبوری از شی و نور مرجع استفاده می کنیم. در تمام نگاری دیجیتالی، تمام نگاشت ها با دوربین دیجیتالی ثبت می شوند و دیگر نیازی به فرآیندهای شیمیایی سخت و زمان بر نیست. یکی از دلایلی که بر اهمیت تمام نگاری دیجیتالی می افزاید، استفاده از آن در مشاهده و اندازه گیری اجسام فازی میکروسکوپی است. با استفاده از میکروسکوپی معمولی، در بزرگنمایی زیاد، عمق کانون محدود می شود و بررسی لایه های مختلف یک نمونه کار دشواری است. اگر این تصویر، یک تمام نگاشت باشد که در یک عکسبرداری منفرد تمام عکس های معمولی را که می شد با کانونی کردن های متوالی در تمام عمق نمونه تهیه کرد بالقوه در بر دارد، این محدودیت رفع می شود. تمام نگاری دیجیتالی امکان کانونی کردن در لایه های مختلف را با روش های عددی امکان پذیر می کند [۲-۴]. استفاده از چیدمان تمام نگاری دیجیتالی در مطالعه ی نمونه های زیستی، که نسبت به تابش نور مرئی شفاف هستند و تغییر محسوسی در دامنه ی موج الکترومغناطیسی عبوری از آن ها اتفاق نمی افتد، بسیار حائز اهمیت است. چیدمان میکروسکوپی تمام نگاری دیجیتالی شامل یک منبع روشنایی، تداخل سنج، دوربین و رایانه است. این روش تمام نگاری در مورد نمونه هایی که در حال تغییرند کارآمد است. غشای لیپیدی هم یک ابزاری نمونه فازی است و هم در مجاورت آب دستخوش تغییر می شود که مطالعه در حین تغییر حائز اهمیت است. به دلیل ساختار میکرونی نمونه و نیاز به مطالعه میکروسکوپی آن، میکروسکوپی تمام نگاری دیجیتالی مفید و قدرتمند برای چنین مطالعه ای به نظر می آید. لیپیدها ساختار اصلی غشاء سلولی به شمار می آیند و در گستره ی بزرگی از فرآیندها مانند تقسیم سلولی، ذخیره سازی انرژی و علامت دهی حضور دارند. غشاء سلولی از سلول های فسفولیپیدی دولایه ای تشکیل شده است که از یک سر آب دوست که در تماس با مولکول های آب قرار می گیرد و دنباله های هیدروکربنی که با یکدیگر تعامل

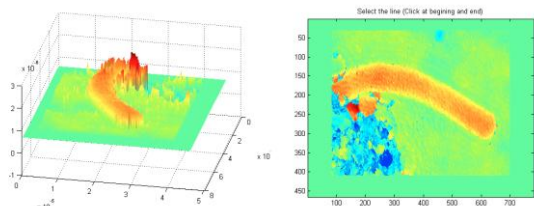
دارند، تشکیل شده است. در حضور محرک های محیطی نظیر آب، ساختارهای استوانه ای چندلایه ای ایجاد می شوند که به این ساختارها، اشکال چربی می گویند [۷و۶]. ضخامت این اشکال از ۰/۲ میکرون تا ده ها میکرون می باشد و طول آنها چندین برابر شعاعشان است. این اشکال استوانه ای پس از تماس با مولکول های آب، شروع به رشد می کنند و پس از مدتی اشکال پیچیده ای به خود می گیرند. این تیوب های استوانه ای نقش مهمی در اتصالات بین سلولی بر عهده دارند. عوامل متعددی در رشد این اشکال مؤثر است که از جمله آنها می توان به تغییرات دما، رطوبت و یا تغییرات فیزیکی و شیمیایی محیط اشاره کرد. در این مقاله به مطالعه تأثیر بخار آب بر رشد تیوب های لیپیدی پرداخته می شود. همانطور که گفته شد، با برخورد آب به لیپید اشکال چربی شکل می گیرند که این فرآیند بسیار سریع اتفاق می افتد؛ زیرا مولکول های فسفولیپیدی در واکنش به قطبش مولکول های آب به سرعت جهت گیری کرده و ساختارهای لیپیدی تشکیل می شوند. بنابراین به نظر می رسد طولانی شدن این مدت زمان، شکل گیری این اشکال را دچار تغییر می کند. مطالعه تصویر سه بعدی این اشکال با استفاده از میکروسکوپی تمام نگاری دیجیتالی، اطلاعات جامع تری بدست می دهد.

آماده سازی نمونه و بررسی تغییرات حجم اشکال چربی نسبت به زمان

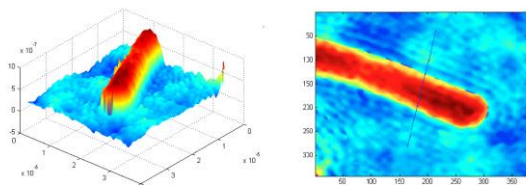
نمونه ای که در این مقاله مورد استفاده قرار می گیرد POPC است. این ترکیب نوعی فسفولیپید مهم در آزمایشگاه های زیستی به شمار می رود. قبلا اثر عامل دما در نحوه رشد اشکال چربی در این نمونه انجام گرفته است [۸]. در این مقاله نتایج بررسی اثر رطوبت روی رشد اشکال چربی مورد مطالعه قرار می گیرد. اولین ایده برای انجام این مطالعه قرار دادن آن در جوی از بخار آب است. بدین وسیله نمونه به صورت غیر مستقیم در مجاورت مولکول های آب قرار می گیرد. در این مرحله محلولی از لیپید در کلروفورم با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. قطره ای به حجم یک میکرولیتر روی لام قرار می گیرد. پس از چند دقیقه کلروفورم تبخیر می شود. لام های حاوی نمونه درون دسیکاتور که محفظه بخار آب را تشکیل خواهد داد قرار می گیرد. به همراه نمونه



شکل ۲: مراحل رشد یکی از اشکال چربی در مجاورت آب. رشد بر اساس افزایش شماره هاست.



شکل ۳: نمایه دوبعدی و سه‌بعدی از یک شکل چربی نوعی پس از حضور در مجاورت رطوبت به مدت سه ساعت

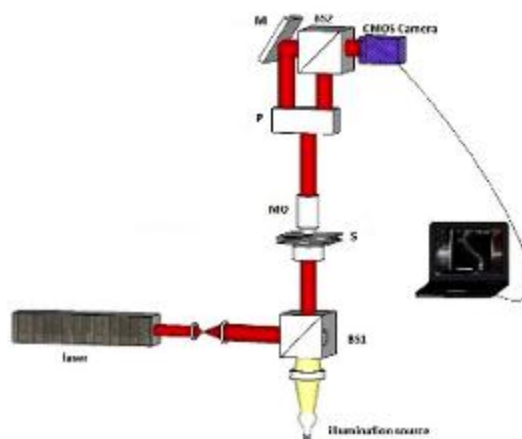


شکل ۴: نمایه دوبعدی و سه‌بعدی از یک شکل چربی نوعی پس از حضور در مجاورت رطوبت به مدت شش ساعت.

ضخامت را محاسبه می‌کنیم و سپس با داشتن ناحیه‌ی اشغال شده توسط لایپید حجم رشد یافته را بدست می‌آوریم. این حجم معیاری در مقایسه با روش‌های معمول بررسی قابل اطمینان‌تر است.

چیدمان و نتایج تجربی

در این چیدمان، مطابق شکل ۱، هر دو موج مرجع و شیئی از یک جبهه موج بدست می‌آیند. چیدمان بر روی یک میکروسکوپ دوچشمی قرار گرفته است. نور لیزر هلیوم-نئون (طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر) از طریق باریکه‌شکن BS1 داخل میکروسکوپ هدایت شده و پس از عبور از چگالنده C، نمونه S، و عدسی شیئی میکروسکوپ MO توسط یک منشور P به دو پرتو تقسیم شده است که هر دو حاوی اطلاعات یکسان از نمونه هستند. از باریکه‌شکن BS2 در مسیر یکی از پرتوها و از آینه‌ی M با زاویه قابل تنظیم در مسیر پرتوی دیگر که آن را روی باریکه‌شکن BS2 می‌فرستد، استفاده شده است.



شکل ۱: طرحواره چیدمان میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی

یک ظرف آب برای ایجاد بخار در اطراف نمونه‌ها و همچنین یک دستگاه رطوبت‌سنج و دماسنج برای اطمینان از پایداری شرایط آزمایش داخل دسیکاتور قرار داده می‌شود. دسیکاتور را به وسیله پمپ تا ۶۰۰ میلی‌لیتر جیوه خلاء می‌کنیم تا جوی کامل از بخار آب ایجاد شود. مدت زمان حضور نمونه در جو بخار آب مهم است. دو بازه زمانی سه و شش ساعت در نظر گرفتیم. پس از گذشت این مدت نمونه را از دسیکاتور خارج کرده، لام میکروسکوپی روی آن قرار داده و مطالعه میکروسکوپی تمام‌نگاری را انجام دادیم. همزمان با تصویربرداری، آب دیونیزه بوسیله میکروپمپ با نرخ ۱۰ میلی‌لیتر در ساعت از طریق یک رابط وارد سلول حاوی نمونه می‌شود. با برخورد آب و تشکیل ساختارهای لیبیدی تمام‌نگاشت‌های دیجیتالی توسط دوربین CCD ثبت می‌گردد. تمام‌نگاری دیجیتالی قادر می‌سازد تا تغییرات راه نوری هنگام عبور از نمونه سنجیده شود. اگر در ضریب شکست یا ضخامت یک ناحیه از نمونه تغییری باشد، اختلاف راه نوری ایجاد می‌شود، وقتی نور از یک نمونه همگن که ضریب شکستی متفاوت با محیط اطراف دارد رد می‌شود، سرعت آن تغییر میکند و بسته به اینکه ضریب شکست بیشتر یا کمتر از اطراف باشد فاز آن عوض می‌شود. اختلاف فاز حاصل شده متناسب با تغییر طول راه نوری مطابق است با

$$\Delta\phi = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)\Delta n \Delta l$$

که Δn تغییر ضریب شکست و Δl تغییر ضخامت است. اگر هر کدام از این کمیت‌ها دانسته شود دیگری می‌تواند تعیین شود. برای محاسبه‌ی نحوه رشد و حجم نهایی لیبیدها با فرض یکسان بودن ضریب شکست در تمام طول اشکال تشکیل شده،

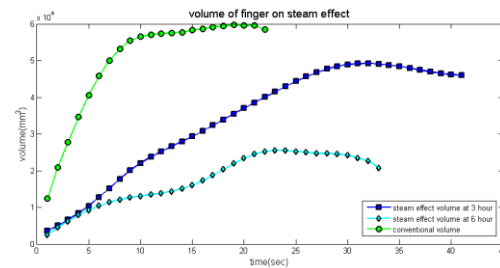
رشد متوقف می شود. همچنین می توان تغییرات طول اشکال را به عنوان معیار رشد در نظر گرفت. شکل ۶ نمودار تغییرات طول در زمان برای میزان رطوبت مختلف را که از روی حجم و سطح مقطع میانگین اشکال چربی حاصل شده اند نشان می دهد. نتایج این نمودار با نتایج تغییرات حجم در توافق است.

نتیجه گیری

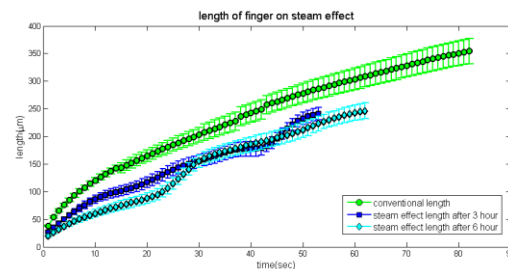
در این مقاله اثر رطوبت بر نحوه رشد تیوب های چندلایه ای لیپیدی با استفاده از میکروسکوپی تمام نگاری دیجیتال مطالعه گردید. حضور لیپید در محیط مرطوب در مدت زمان های مشخص، موجب کاهش طول نهایی تیوب های لیپیدی، متناسب با این مدت زمان ها می شود. این نتیجه با بررسی حجمی ساختارهای لیپیدی از تصاویر بدست آمده از تکنیک تمام نگاری دیجیتال با استفاده از بازسازی به روش انتشار طیف زاویه ای حاصل شده است.

مراجع

[1] D. Gabor, "A new microscopic principle," Nature 161, 777-778 (1948).
 [2] B. Javidi, I. Moon, S. Yeom, and E. Carapezza, "Three-dimensional imaging and recognition of microorganism using single-exposure on-line (SEOL) digital holography," Opt. Exp., Vol. 13, No. 12, pp. 4492-4506, 2005.
 [3] U. Schnars and W. Juptner, "Digital recording and numerical reconstruction of holograms," Meas. Sci. Technol., Vol. 13, pp. R85-R101, 2002.
 [4] M. K. Kim, "Principles and techniques of digital holographic microscopy," SPIE Reviews, Vol. 1, pp. 018005-1-018005-50, 2010.
 [5] A. Anand, Vani K. Chhaniwal, and B. Javidi, "Real-time digital holographic microscopy for phase contrast 3D imaging of dynamic phenomena," J. Dis. Tech., Vol. 6, No. 10, pp. 500-505, 2010.
 [6] L. Tayebi, M. Mozafari, D. Vashae, and A. N. Parikh, "Structural configuration of myelin figures using fluorescence microscopy," Int. J. Photoenergy, Vol. 2012, 685617, 2012.
 [7] C. D. Santangelo and P. Pincus, "Coiling instabilities of multilamellar tubes," Phys. Rev. E, Vol. 66, 061501, 2002.
 [8] N. Fathi, A. R. Moradi, M. Habibi, D. Vashae, and L. Tayebi, "Digital holographic microscopy of the myelin figure structural dynamics and the effect of thermal gradient," Biomed. Opt. Exp., Vol. 4, No. 6, pp. 950-975, 2013.



شکل ۵: نمودار تغییرات حجم بدست آمده از بازسازی تمام نگاشت ها؛ سبز: حجم در شرایط معمولی، آبی: اثر سه ساعت حضور در بخار آب، فیروزه ای: اثر شش ساعت حضور در بخار آب.



شکل ۴: نمودار مدت زمان تأثیر بخار آب بر طول لیپید؛ سبز: طول در شرایط معمولی، آبی: اثر سه ساعت حضور در بخار آب، فیروزه ای: اثر شش ساعت حضور در بخار آب.

دو پرتو بر روی صفحه دوربین (CMOS, DCC1545M, Thorlabs) با یکدیگر تداخل می کنند و طرح تداخلی آنها، فریزهای تاریک و روشن را به وجود می آورد که همان تمام نگاشت است. شکل ۲ مراحل رشد یک شکل چربی نوعی را در زمان های مختلف نشان می دهد. در مراحل بازسازی عددی، علاوه بر تمام نگاشت شیء، تمام نگاشت دیگری که نمونه در آن حضور نداشته باشد، مورد نیاز است. لذا تمام نگاشت مرجع نیز تهیه و بازسازی به روش انتشار طیف زاویه ای انجام گردید. در روش انتشار طیف زاویه ای انتگرال پراش و انتشار عددی تابع روزه در صفحه فوریه انجام می گیرد [۸ و ۵]. شکل ۳ و شکل ۴ تصاویر بازسازی شده دو بعدی و سه بعدی از شکل چربی را به ترتیب پس از سه ساعت و شش ساعت مجاورت با رطوبت بالا نشان می دهند. میزان تغییرات حجمی شکل چربی در طول زمان به عنوان معیار رشد برای اشکال مختلف محاسبه می شود. شکل ۵ نمودار تغییرات حجم بدست آمده از تمام نگاشت ها برای شرایط مختلف میزان رطوبت را نشان می دهد. نتایج نشان می دهند افزایش میزان رطوبت موجب کاهش رشد اشکال می شود ولی پس از زمان طولانی تری