بیستمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک ایران
و ششمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۸ تا ۱۰ بهمن ماه۱۳۹۲ - 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[۱و۲] و لعبت طیبی[۳]

[۱]گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
[۲]پژوهشکده اپتیک و فوتونیک، دانشکده تحصیلات تکمیلی در علوم پایه زنجان، زنجان، ایران
[3]Helmerich 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 شده‌است. لیپیدها دسته‌ای از ترکیبات آلی دارای هیدروکربن، شامل اسیدهای چرب، موم، گلیسرول، فسفولیپیدها و کلسترول می‌باشند که تقریبا 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. قرارگرفته‌است.

کلید واژه- 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 Tayebi[3]

[1]Department of physics, University of Zanjan, PO Box 45195-313, Zanjan, Iran
[2]Optics research center, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences, PO Box 45137-66731, Zanjan, Iran
[3]Helmerich 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

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-21]

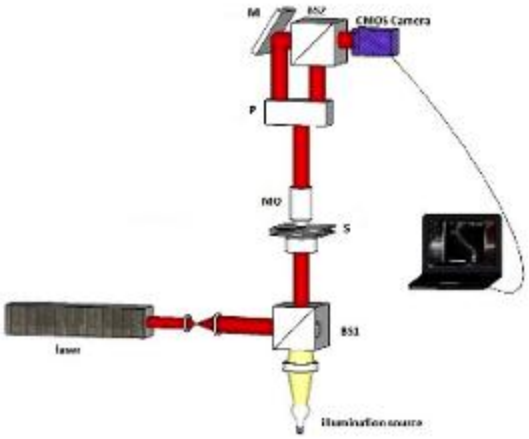
مقدمه

تمام نگاری توسط دنیس‌گابور در سال ۱۹۴۸ مطرح شد [۱]. طبق ایده وی از طرح تداخلی دو موج، که حاوی اطلاعات فازی از جسم است، می‌توان اطلاعات بعد سوم را خارج کرد. در تمام‌نگاری از طرح تداخلی بین نور عبوری از شی و نور مرجع استفاده می‌کنیم. در تمام‌نگاری دیجیتالی، تمام‌نگاشت‌ها با دوربین دیجیتالی ثبت می‌شوند و دیگر نیازی به فرآیندهای شیمیایی سخت و زمان‌بر نیست. یکی از دلایلی که بر اهمیت تمام‌نگاری دیجیتالی می‌افزاید، استفاده از آن در مشاهده و اندازه‌گیری اجسام فازی میکروسکوپی است. با استفاده از میکروسکوپی معمولی، در بزرگنمایی زیاد، عمق کانون محدود می‌شود و بررسی لایه‌های مختلف یک نمونه کار دشواری است. اگر این تصویر، یک تمام‌نگاشت باشد که در یک عکسبرداری منفرد تمام عکس‌های معمولی را که می‌شد با کانونی کردن‌های متوالی در تمام عمق نمونه تهیه کرد بالقوه در بر دارد، این محدودیت رفع می‌شود. تمام نگاری دیجیتالی امکان کانونی کردن در لایه‌های مختلف را با روش‌های عددی امکان‌پذیر می‌کند [۲-۴]. استفاده از چیدمان تمام‌نگاری دیجیتالی در مطالعه‌ی نمونه‌های زیستی، که نسبت به تابش نور مرئی شفاف هستند و تغییر محسوسی در دامنه‌ی موج الکترومغناطیسی عبوری از آن‌ها اتفاق نمی‌افتد، بسیار حائز اهمیت است. چیدمان میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی شامل یک منبع روشنایی، تداخل‌سنج، دوربین و رایانه است. این روش تمام‌نگاری در مورد نمونه‌هایی که در حال تغییرند کارآمد است. غشای لیپیدی هم یک ابزاری نمونه فازی است و هم در مجاورت آب دستخوش تغییر می‌شود که مطالعه در حین تغییر حائز اهمیت است. به دلیل ساختار میکرونی نمونه و نیاز به مطالعه میکروسکوپی آن، میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی مفید و قدرتمند برای چنین مطالعه‌ای به‌نظر می‌آید. لیپیدها ساختار اصلی غشاء سلولی به شمار می‌آیند و در گستره‌ی بزرگی از فرآیندها مانند تقسیم سلولی، ذخیره سازی انرژی و علامت‌دهی حضور دارند. غشاء سلولی از سلول‌های فسفولیپیدی دولایه‌ای تشکیل شده است که از یک سر آب‌دوست که در تماس با مولکول‌های آب قرار می‌گیرد و دنباله‌های هیدروکربنی که با یکدیگر تعامل دارند، تشکیل شده است. در حضور محرک‌های محیطی نظیر آب، ساختارهای استوانه‌ای چندلایه‌ای ایجاد می‌شوند که به این ساختارها، اشکال چربی می‌گویند [۶و۷]. ضخامت این اشکال از ۰/۲ میکرون تا ده‌ها میکرون می‌باشد و طول آنها چندین برابر شعاعشان است. این اشکال استوانه‌ای پس از تماس با مولکول‌های آب، شروع به رشد می‌کنند و پس از مدتی اشکال پیچیده‌ای به خود می‌گیرند. این تیوبهای استوانه‌ای نقش مهمی در اتصالات بین سلولی بر عهده دارند. عوامل متعددی در رشد این اشکال مؤثر است که از جمله آنها می‌توان به تغییرات دما، رطوبت و یا تغییرات فیزیکی و شیمیایی محیط اشاره کرد. در این مقاله به مطالعه تأثیر بخار آب بر رشد تیوب‌های لیپیدی پرداخته می‌شود. همانطورکه گفته شد، با برخورد آب به لیپید اشکال چربی شکل می‌گیرند که این فرآیند بسیار سریع اتفاق می‌افتد؛ زیرا مولکولهای فسفولیپیدی در واکنش به قطبش مولکول‌های آب به سرعت جهت‌گیری کرده و ساختارهای لیپیدی تشکیل می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد طولانی شدن این مدت زمان، شکل‌گیری این اشکال را دچار تغییر می‌کند. مطالعه تصویر سه‌بعدی این اشکال با استفاده از میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی، اطلاعات جامع‌تری بدست می‌دهد.

آماده‌سازی نمونه و بررسی تغییرات حجم اشکال چربی نسبت به زمان

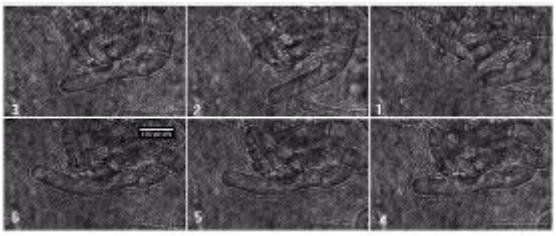
نمونه‌ای که در این مقاله مورد استفاده قرار می‌گیرد POPC است. این ترکیب نوعی فسفولیپید مهم در آزمایشگاه‌های زیستی به شمار می‌رود. قبلا اثر عامل دما در نحوه رشد اشکال چربی در این نمونه انجام گرفته است [۸]. در این مقاله نتایج بررسی اثر رطوبت روی رشد اشکال چربی مورد مطالعه قرار می گیرد. اولین ایده برای انجام 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 کلروفرم با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. قطره‌ای به حجم یک میکرولیتر روی لام قرار می‌گیرد. پس از چند دقیقه کلروفرم تبخیر می‌شود. لام‌های حاوی نمونه درون دسیکاتور که محفظه بخار آب را تشکیل خواهد داد قرار می‌گیرد. به همراه نمونه

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-21]

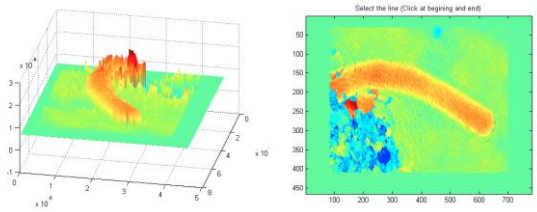


شکل ۱: طرحواره چیدمان میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی

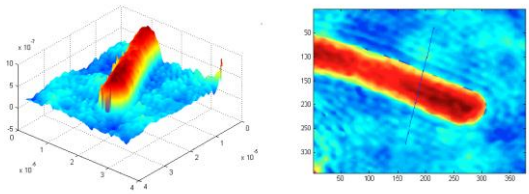
یک ظرف آب برای ایجاد بخار در اطراف نمونه‌ها و همچنین یک دستگاه رطوبت‌سنج و دماسنج برای اطمینان از پایداری شرایط آزمایش داخل دسیکاتور قرار داده می‌شود. دسیکاتور را به وسیله پمپ تا ۶۰۰ میلی‌لیتر جیوه خلاء می‌کنیم تا جوی کامل از بخار آب ایجاد شود. مدت زمان حضور نمونه در جو بخار آب مهم است. دو بازه زمانی 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 میلی لیتر در ساعت از طریق یک رابط وارد سلول حاوی نمونه می‌شود. با برخورد آب و تشکیل ساختارهای لیپیدی 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 کمیت ها دانسته شود دیگری می تواند تعیین شود. برای محاسبه‌ی نحوه رشد و حجم نهایی لیپیدها با فرض یکسان بودن ضریب شکست در تمام طول اشکال تشکیل شده،



شکل۲: مراحل رشد یکی از اشکال چربی در مجاورت آب. رشد بر اساس افزایش شماره هاست.



شکل۳: نمایه دوبعدی و سه‌بعدی از یک شکل چربی نوعی پس از حضور در مجاورت رطوبت به مدت سه ساعت



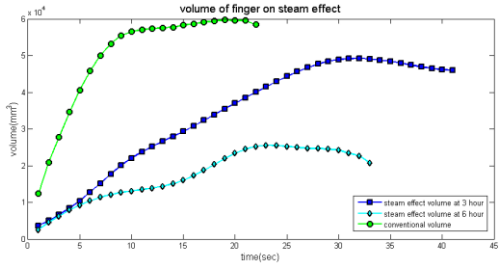
شکل۴: نمایه دوبعدی و سه‌بعدی از یک شکل چربی نوعی پس از حضور در مجاورت رطوبت به مدت شش ساعت.

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

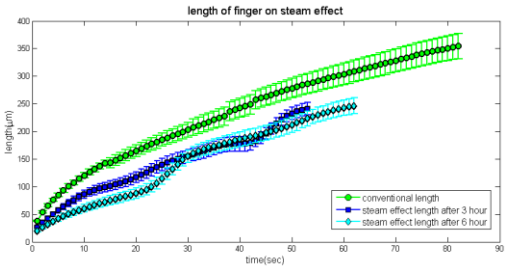
چیدمان و نتایج تجربی

در این چیدمان، مطابق شکل۱ ، هر دو موج مرجع و شیئی از یک جبهه موج بدست می‌آیند. چیدمان بر روی یک میکروسکوپ دوچشمی قرار گرفته است. نور لیزر هلیم-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.

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-21]



شکل ۵: نمودار تغییرات حجم بدست آمده از بازسازی تمام‌نگاشت‌ها؛ سبز: حجم در شرایط معمولی، آبی: اثر سه ساعت حضور در بخار آب، فیروزه‌ای: 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، فیروزه‌ای: اثر شش ساعت حضور در بخار آب.

دو پرتو بر روی صفحه دوربین (CMOS,DCC1545M,Thorlabs) با یکدیگر تداخل می‌کنند و طرح تداخلی آنها، فریزهای تاریک و روشن را بوجود می‌آورد که همان تمام‌نگاشت است. شکل ۲ مراحل رشد یک شکل چربی نوعی را در زمان های مختلف نشان می دهد. در مراحل بازسازی عددی، علاوه بر تمام‌نگاشت شیء، تمام‌نگاشت دیگری که نمونه در آن حضور نداشته باشد، مورد نیاز است. لذا تمام‌نگاشت مرجع نیز تهیه و بازسازی به روش انتشار طیف زاویه‌ای انجام گردید. در روش انتشار طیف زاویه ای انتگرال پراش و انتشار عددی تابع روزنه در صفحه فوریه انجام می گیرد [۵و۸]. 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 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.

نتیجه‌گیری

در این مقاله اثر رطوبت بر نحوه رشد تیوب‌های چندلایه‌ای لیپیدی با استفاده از میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی مطالعه گردید. حضور لیپید در محیط مرطوب در مدت زمان‌های مشخص، موجب کاهش طول نهایی تیوبهای لیپیدی، متناسب با این مدت زمان‌ها می‌شود. این نتیجه با بررسی حجمی ساختارهای لیپیدی از تصاویر بدست آمده از تکنیک تمام‌نگاری دیجیتالی با استفاده از بازسازی به روش انتشار طیف زاویه‌ای حاصل شده‌است.

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. Vashaee, 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. Vashaee, 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.

[Downloaded from opsi.ir on 2025-07-21]