Archive of SID

تصویربرداری سه‌بعدی از سر و دم نمونه‌های قزل‌آلای رنگین کمان توسط میکروسکوپ لایه نوری

کافیان، ح.[۱]؛ احدی اخلاقی، ا.[۲و۱]؛ چهارسوقی، م.[۲و۱]؛ گوهری منش، م.[۳]؛ یزدانی مقدم، ف.[۴و۳]؛ عبدالله‌پور، د.[۲و۱،*]

[۱] دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی در علوم پایه زنجان، زنجان، ایران
[۲] پژوهشکده اپتیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی در علوم پایه زنجان، زنجان، ایران
[۳] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[۴] گروه نوآوری‌های زیستی جانوری، مرکزپژوهشی جانورشناسی کاربردی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
Email: dabdollahpour@iasbs.ac.ir

میکروسکوپی لایه نوری، به‌عنوان یکی از روش‌های جدید و کارآمد تصویربرداری سه‌بعدی غیرتهاجمی، از چند سال پیش به‌شدت موردتوجه‌محققانقرارگرفته است. در این گزارش ضمن معرفی مزایا وکاربردهای این میکروسکوپ، تصاویر سه بعدی ضبط شده از ساختار استخوانی در سر و دم نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمانی نشان داده خواهد شد. با استفاده از این چیدمان موفق به تصویربرداری از نمونه‌های ۲ تا ۳ میلی‌متری با تفکیک‌پذیری عرضی ۱٫۵ μm وطولی ۲٫۹ μm شده‌ایم. با استفاده از تصاویر سه بعدی به دست آمده ساختاری کلی استخوان‌ها در سر و دم ماهی به‌سادگی قابل مشاهده بوده و قادر به تشخیص دو ساختار استخوانی از دو عمق متفاوت هستیم که با میکروسکوپ‌های عادی قابل‌تشخیص نیست.

کلمات کلیدی: میکروسکوپ لایه نوری، تصویربرداری سه بعدی، قزل‌آلای رنگین‌کمان.

مقدمه:

امروزه نیاز هم‌زمان به تفکیک‌پذیری فضایی بالا به‌منظور مشاهده ظریف‌تر ساختارهای زیستی و تفکیک‌پذیری زمانی مطلوب، به دلیل دنبال کردن فرآیندهای زیستی، موجب شده تا کاستی‌های میکروسکوپ‌های نوری موجود بیش‌ازپیش روشن شود. پیشرفت‌های به‌دست‌آمده در میکروسکوپ‌های لایه نوری که تنها اندکی بیش از یک دهه از معرفی آن‌ها می‌گذرد، محققان را بر این باور رسانده است که این ابزارها توانایی‌های موردنیاز را در اختیار زیست پژوهان قرار خواهد داد. میکروسکوپ لایه نوری بر اساس نوردهی صفحه‌ای و ثبت تصاویر دوبعدی مربوط به هر صفحه استوار است. با لایه‌بندی نوری تمام نمونه از طریق روبش آن با صفحه نوریو کنارهم قرار دادن تصاویر دوبعدی ضبط‌شده، تصویر سه‌بعدی نهایی حاصل می‌شود .یکی از اولین به‌کارگیری‌های این میکروسکوپ در تهیه تصاویر سه‌بعدی از نمونه‌های زیستی توسط هویسکین[۷]و همکارانش در سال ۲۰۰۴، با ضبط تصاویری از نمونه‌های درشت مقیاس (میلی‌متری) شامل، مگس سرکه و مداکا[۸] صورت گرفت *[1]* .یکی از کاربردهای شاخص میکروسکوپ لایه نوری امکان تصویربرداری در لحظه است. تصویربرداری سریع از تحرکات سریع سلول‌ها در جنین و ارگانیزم‌های کوچک مانند مهاجرت سلول‌ها، رشد تحول و قلب، جریان خون و توسعه عروق نمونه‌هایی از این مورد هستند. به‌عنوان‌مثالمی‌توان به ضبط تصاویر مربوط به تپش قلب ماهی زیرا با تفکیک‌پذیری بسیار بالا (در این تصاویر گلبول‌های قرمز خون نیز قابل‌مشاهده هستند) اشاره نمود *[2]*. از ویژگی‌های بارز این میکروسکوپ تصویربرداری‌های طولانی‌مدت از نمونه‌های

[7] Huisken

[8] Medaka

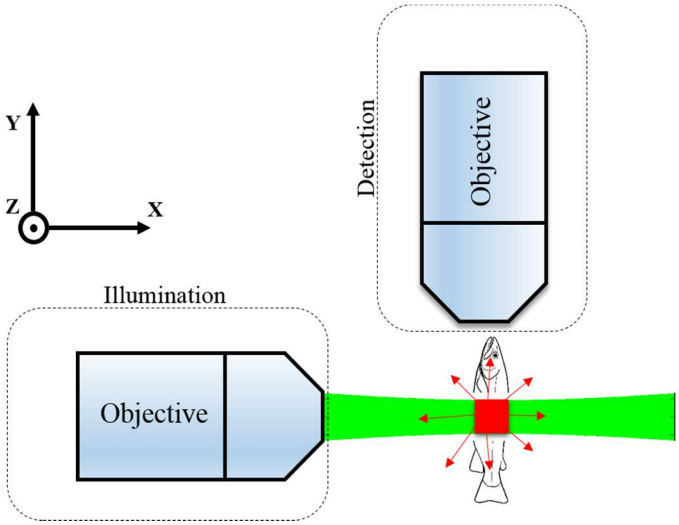
www.SID.ir

Archive of SID

زنده بدون آسیب رساندن به آن‌ها است. استلزر[9] و همکاران تحولات ریشه‌ی گونه‌ای گیاهیو فعل انفعال میان سلول‌های گیاه و میکروب‌های موجود در خاکِ احاطه‌کننده آن را، برای سه تا پنج روز بررسی نمودند *[3]*. در دهه ۸۰ میلادی هنگامی‌که جان سالتون[10] بر روی کرم *C. elegans* مطالعه می‌نمود برای تعقیب کردن تقسیم‌های سلولی درحین رشد، نیازمند بیش از یک سال زمان بود. امروزه بهدلیلسرعت‌بالای تصویربرداری میکروسکوپ‌های لایه نوری این زمان تنها به ۱۴ ساعت کاهش‌یافتهاست *[4]*. قابلیت‌های ویژه این میکروسکوپ امیدواری‌های فراوانی را نزد محققان حوزه علوم اعصاب دردرک نحوه عملکرد مغز ایجاد نموده است. امکان بررسی تمام مغز با تفکیک‌پذیری بسیار بالا، قابلیتی است که ابزارهای کنونی مورداستفاده دارا نیستند. این امر موجب گسترش روزافزون استفاده از این ابزار در این حوزه است. به‌عنوان نمونه محققان موفق شده‌اند با استفاده از میکروسکوپ لایه نوریبیش از ٪۸۰ نورون‌های مغز ماهی زیرا را رصد نموده و هم‌پوشانی بین نواحی مختلف مغز و مسیرهای نورونی را با تفکیک‌پذیری در حدود ۰٫۱ اندازه نورون‌ها مشاهده نمایند *[5-7]*.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌های موردبررسیقرارگرفته توسط میکروسکوپ چیده شده، سر ماهی قزل‌آلا ۵ و ۱۰ روزه و دم ماهی‌های ۲۸ روزه، با حداکثر طول تصویربرداری شده ۳ میلی‌متر هستندکه در تمامی آن‌ها برچسب‌گذاری فلورسانی صورت گرفتهاست. پس از شفاف‌سازی‌های لازم، ستون فقرات نمونه‌ها توسط رنگ‌دانه فلورسانی *Alizarin Red* رنگ‌آمیزی شده است *[8]*.



(شکل۱) چیدمان میکروسکوپ لایه نوری. نوردهی هم‌سو با محور x و لایه نوری تشکیل‌شده در صفحه x-z و هم‌چنین آشکارسازی در امتداد محورyاست. باریکه سبزرنگنشان‌دهنده باریکه لیزر است. ناحیه قرمزرنگ مربوط به تابش فلورسانی بوده و فلش‌های قرمزرنگ نور فلورسانی تابشی است.

شکل ۱ چیدمان مورداستفاده و نحوه قرارگیری نمونه را نشان می‌دهد. ضخامت لایه نوری تشکیل‌شده حدود $10\mu m$ است. عدسی شیئی مورداستفاده در بخش آشکارسازی مشابه با عدسی شیئی نوردهی است. برای جبران کردن شکست نور در اثر عدم هماهنگی میان ضریب شکست ماهی و هوا، نمونه‌ها با *PDMS* و یا روغن احاطه شده‌اند. تفکیک پذیری عرضی حاصل شده در

[9]Stelzer

[10]John Salton

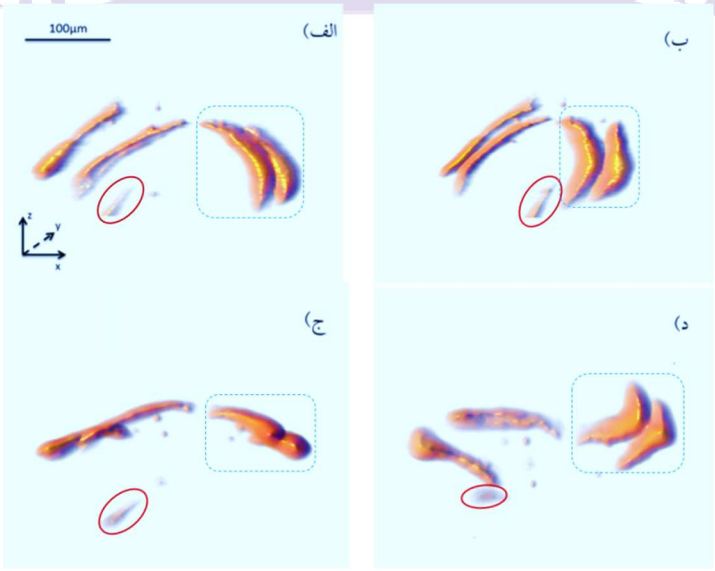
www.SID.ir

Archive of SID

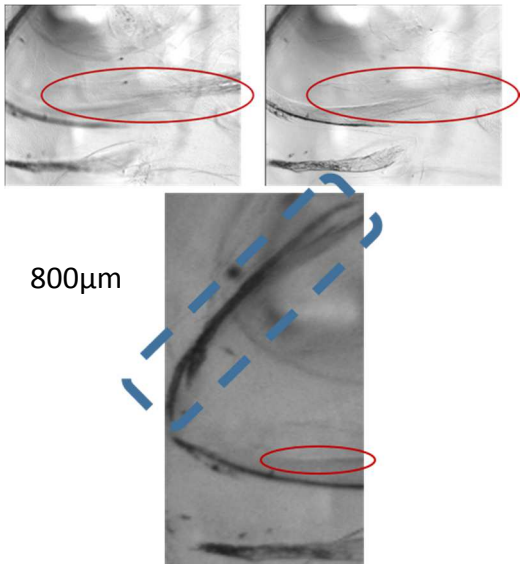
تصاویر حدود μm ۱,۵و تفکیک پذیری طولی در حدود μm ۲,۹ است.

نتایج و بحث:

همان‌طور که پیش‌تر بیان شد نمونه‌های موردبررسی قرارگرفته شامل ماهی‌های ۵، ۱۰ و ۲۸ روزه هستند. شکل ۲ تصاویر سه‌بعدیثبت‌شده از سر ماهی ۵ روزه را از چند زاویه متفاوت نشان می‌دهد.



(شکل۲) تصاویر سه بعدی ثبت شده از سر هاهی ۵ روزه از چند زاویه متفاوت.
الف) صفحه x-z ب) ۴۵۰ درجه چرخش نسبت به محور z
ج) ۴۵۰ درجه چرخش نسبت به محور x د) صفحه x-y

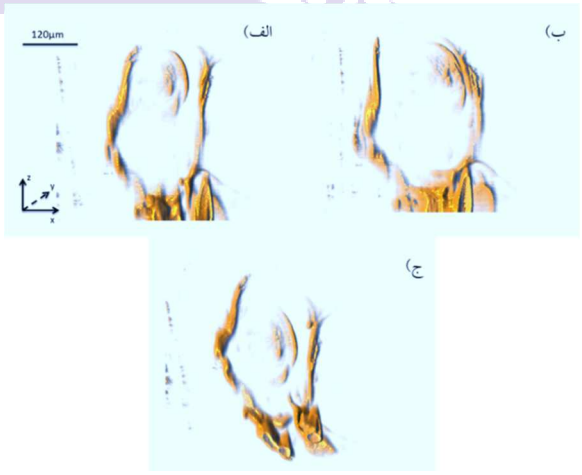


به‌منظور فهم بهتری از مزایای تصاویر گرفته‌شده به کمک این میکروسکوپ و مقایسه آن با میکروسکوپ‌های نوری رایج، در شکل

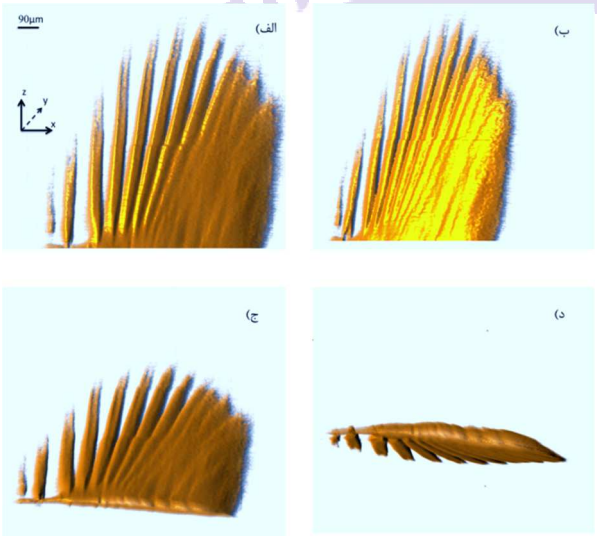
www.SID.ir

Archive of SID

۳ تصویر ضبط‌شده با میکروسکوپ نوری عادی از این نمونه نمایش داده‌شده است.شکل ۲ به‌وضوح حاکی از وجود دواستخوان در دو ناحیه مشخص‌شده با مستطیل آبی و بیضی قرمزرنگ، برروی یکدیگر است. در شکل ۳ این دو ناحیه با همان ترتیب مشخص‌شده در شکل ۲ نمایش داده‌شده‌اند. همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود مشاهده هم‌زمان هر دو استخوان میسر نیستو پی بردن به وجود دو استخوان تنهابا تغییر عمق کانون ممکن است (که با از دست دادن وضوح از عمق یا استخوان دیگر همراه است).



(شکل ۴) تصاویر ضبط‌شده با میکروسکوپ لایه نوری، متعلق به سر ماهی ۱۰ روزه. الف) صفحه x-z ب) ۴۵۰ درجه چرخش نسبت به محور z ج) ۴۵۰ درجه چرخش نسبت به محور x



(شکل ۵) تصاویر ضبط‌شده با میکروسکوپ لایه نوری، متعلق به دم ماهی ۲۸ روزه.الف) صفحه x-z ب) ۴۵۰ درجه چرخش نسبت به محور z ج) ۴۵۰ درجه چرخش نسبت به محور x د) صفحه x-y

شکل ۴ و ۵ به ترتیب تصاویر ضبط‌شده با میکروسکوپ لایه نوری متعلق به سر ماهی ۱۰ روزه و دم ماهی ۲۸ روزه هستند.طول عمق تصاویر ضبط‌شده با این چیدمان به دلیل محدودیت فاصله کارکردعدسی شیئی آشکارسازی در محدوده ۲ تا ۳ میلی‌متر هستند.

نتیجه‌گیری کلی

میکروسکوپ‌های لایه نوری امکان تصویربرداری سه‌بعدی، درلحظه، از نمونه‌های درشت مقیاس با تفکیک‌پذیری فضایی و زمانی بالا بدون آسیب رساندن به نمونه‌ها را، فراهم می‌آورد. این ابزار نسبت به سایر میکروسکوپ‌هایی که قادر به تصویربرداری از عمق می‌باشند دارای سرعت بالاتری است. در این گزارش ضمن معرفی و مقایسه این میکروسکوپ‌ها با شیوه‌های رایج، به‌اختصار نحوه چینش میکروسکوپ لایه نوری ایستا شرحداده شد و تصاویر سه‌بعدیتهیه‌شده از نمونه‌های فلورسانی ماهی قزل‌آلا نشان داده شد. تصاویر سه‌بعدی ضبط‌شده از نمونه‌های میلی‌متری، دارای تفکیک‌پذیری طولی و عرضی میکرونی هستند. تصاویر ضبط‌شده گویای برخی از جزئیاتی چون وجود استخوان‌هابر روی یکدیگر هستندکه این اطلاعات با میکروسکوپ‌های عادی قابل‌تشخیص نیست.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع:

۱. گوهری منش، مونا؛ «مطالعه‌ی سیر تکوین بخش‌های سر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بر اساس شاخص‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی»؛ پایان‌نامه کارشناسی ارشد؛ دانشگاه فردوسی مشهد؛ زمستان ۹۳.

2. *Huisken, Jan., et al.2004.Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy: Science, 305(5686), 1007-1009.*
3. *Mickoleit, Michaela., et al. 20014. High-resolution reconstruction of the beating zebrafish heart: Nature Methods.*
4. *Vermeer, JoopSkeletal., et al. 20014. A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in Arabidopsis. Science, 343(6167), 178-183.*
5. *Wu, Yicong., et al. 2011. Inverted selective plane illumination microscopy (iSPIM) enables coupled cell identity lineaging and neurodevelopmental imaging in Caenorhabditiselegans: Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(43), 17708-17713.*
6. *Vladimirov, Nikita., et al. 2014. Light-sheet functional imaging in fictively behaving zebrafish: Nature Methods.*
7. *Ahrens, Misha., et al. 2013. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy: Nature methods, 10(5), 413-420.*
8. *Keller, Philipp J., et al. 2015. Light-sheet imaging for systems neuroscience: Science, 12(1), 27-29.*

www.SID.ir