



بیست و پنجمین کنفرانس اپتیک و  
فوتونیک ایران و یازدهمین کنفرانس  
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،  
دانشگاه شیراز،  
شیراز، ایران.  
۱۳۹۷ بهمن ۹-۱۱



## تصویربرداری از گلبول‌های خونی با استفاده از میکروسکوپی غیرخطی تولید هماهنگ سوم

حسین حسینی، مهدی مزدور دشتابی، محمد دلجور، رضا مسعودی

[h.hosseini.sbu@gmail.com](mailto:h.hosseini.sbu@gmail.com), [m\\_dashtabi@sbu.ac.ir](mailto:m_dashtabi@sbu.ac.ir), [mohammad.deljour@gmail.com](mailto:mohammad.deljour@gmail.com), [r-massudi@sbu.ac.ir](mailto:r-massudi@sbu.ac.ir)

چکیده - ابداع لیزرهای فمتوثانیه، شدت مورد نیاز برای فرایندهای غیرخطی همچون تولید هماهنگ سوم را فراهم ساخت که موجب رفع برخی از چالش‌های میکروسکوپی مانند تصویربرداری از نمونه‌های ضخیم و با پراکندگی بالا شد. در این مقاله، از یک منبع نوری فمتوثانیه جهت ساخت میکروسکوپ غیرخطی بر پایه تولید هماهنگ سوم استفاده و مزایای این روش بررسی شده است. همچنین با تصویربرداری از گلبول‌های خونی، تصویربرداری بدون برچسب از نمونه‌های زیستی با استفاده از میکروسکوپ غیرخطی تولید هماهنگ سوم، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

میکروسکوپ غیرخطی، میکروسکوپ تولید هماهنگ سوم، میکروسکوپ جاروب نقطه‌ای

## Imaging of blood cells using nonlinear microscopy of third harmonic generation

Hossein Hosseini, Mahdi Mozdoor Dashtabi, Mohammad Deljour, Reza Massudi

**Abstract-** The invention of femtosecond lasers provided the intensity required for nonlinear processes, such as third harmonic generation which eliminates some of the microscopic challenges, such as imaging thick and high dispersion specimens. In this paper, use of a femtosecond optical source for the construction of a nonlinear microscope based on third harmonic generation, and study the advantages of this method. Also by imaging blood cells, label free imaging of biological specimens using a third-harmonic generation nonlinear microscope are evaluated.

**Keywords:** non-linear microscope, third harmonic generation microscope, laser scanning microscope.

## مقدمه

در سال ۱۸۷۳ ارنست آبه، با فرمول بندی تئوری یافته‌های پیشین در حوزه میکروسکوپی، میکروسکوپی نوین را پایه‌گذاری کرد. اما میکروسکوپ‌های مرسوم برای تصویربرداری از نمونه‌های ضخیم، مناسب نبودند. با اختراع میکروسکوپ هم‌کانون توسط مینسکی در سال ۱۹۵۷ و همچنین میکروسکوپ هم‌کانون جاروب لیزری در سال ۱۹۶۱ گام مهمی در راستای، افزایش توان تفکیک و عمق تصویربرداری برداشته شد [۱]. روند پیشرفت میکروسکوپ‌ها در این سال‌ها ادامه یافت و در سال ۱۹۹۰، نخستین میکروسکوپ غیرخطی که بر اساس فرایند غیرخطی جذب دوفوتونی بود توسط دنک ساخته شد [۲]. در این میکروسکوپ به دلیل جذب غیرخطی، عمق نفوذ و توان تفکیک نسبت به میکروسکوپی خطی افزایش یافت [۳، ۴]. همچنین در این میکروسکوپ‌ها از طول‌موج‌های بزرگ‌تر، در حدود فروسرخ که پراکندگی نمونه‌های زیستی در آن پایین‌تر است، استفاده می‌شد. در نتیجه امکان تصویربرداری از نمونه‌های با پراکندگی بالا فراهم گردید. لذا استفاده از فرایندهای غیرخطی در میکروسکوپی، یکی از مشکلات مهم پیش روی میکروسکوپی را برطرف کرد. به همین دلیل در این مقاله به بررسی چیدمان میکروسکوپ غیرخطی تولید هماهنگ سوم و تصویربرداری از گلبول‌های خونی خواهیم پرداخت.

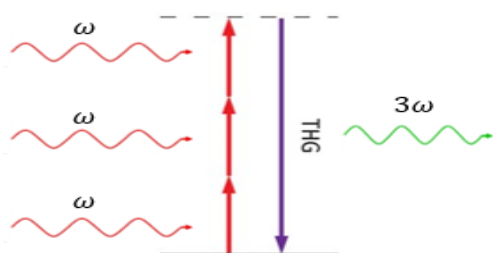
## تئوری

### ۱- غیر خطی

اپتیک غیرخطی در واقع بررسی و مطالعه برهمکنش نور و ماده، در حالتی است که قطبش و میدان رابطه غیرخطی باهم دارند. برای درک بهتر این مطلب وابستگی قطبش یک ماده به میدان اعمالی بررسی شده است. وابستگی قطبش به میدان به صورت زیر بیان می‌شود:

$$\vec{p}(t) = \epsilon_0 \chi^{(1)} \vec{E} + \epsilon_0 \chi^{(2)} \vec{E}^2 + \epsilon_0 \chi^{(3)} \vec{E}^3 + \dots \quad (1)$$

که جملات به ترتیب پاسخ خطی، پاسخ غیرخطی مرتبه دوم و سوم می‌باشند [۵]. در فرایند غیرخطی مرتبه سوم سه فوتون با فرکانس  $\omega$  جذب و یک فوتون با فرکانس  $3\omega$  تولید می‌شود (شکل ۱). فرایندهای تولید هماهنگ پارامتریک هستند به عبارت دیگر در این فرایندها حالت کوانتومی پایه و نهایی یکسان بوده و هیچ انرژی در برهمکنش نور و ماده به ماده منتقل نمی‌شود در نتیجه ماده گرم نخواهد شد [۵]. به همین



شکل ۱: شمای فرایند غیرخطی مرتبه ۳

دلیل فرایندهای غیرخطی تولید هماهنگ (همچون تولید هماهنگ سوم) برای تصویربرداری از نمونه‌های زنده زیستی مناسب هستند. از دیگر ویژگی‌های فرایند تولید هماهنگ سوم عدم وجود سیگنال در محیط همگن به دلیل جابجایی فاز گوی می‌باشد. دلیل این پدیده تداخل ویرانگر سیگنال تولیدی قبل و بعد از کانون بوده که به اندازه  $\pi$  اختلاف فاز دارند و موجب از بین رفتن سیگنال تولیدی خواهد شد [۶]. اما در نقاطی همچون مرز دو محیط که تقارن شکسته می‌شود، سیگنال قابل توجهی تولید شده که این ویژگی میکروسکوپی هماهنگ سوم را برای تصویربرداری از نمونه‌های شفاف و همچنین آشکارسازی مرزها در نمونه (برای مثال تعیین گرانولسیته گلبول‌ها) مناسب کرده است [۷].

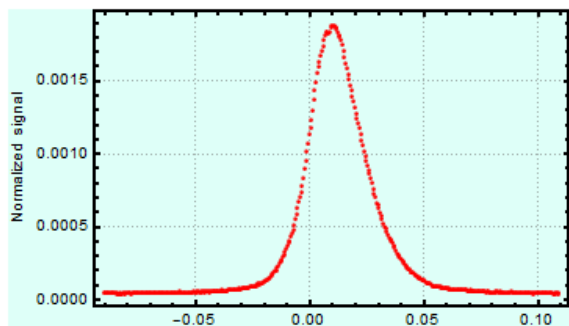
### ۲- میکروسکوپی

به طور کلی میکروسکوپ‌ها به دو دسته‌ی میدان گسترده و جاروب نقطه‌ای دسته‌بندی می‌شوند. در میکروسکوپ‌های میدان گسترده کل نمونه، همزمان روشن و سرعت تصویربرداری آنی می‌باشد. در این میکروسکوپ‌ها به دلیل اینکه کل نمونه همزمان روشن می‌شود، نور بخش‌های دیگر با نور صفحه کانون مخلوط شده و باعث کاهش نسبت سیگنال به زمینه و توان

نهایی تشکیل می‌گردد. به منظور جاروب نقطه لیزری روی نمونه جهت تشکیل تصویر، نمونه به روی یک پایه XYZ قرار گرفته است. عدسی شیئی دوم به همراه عدسی چشمی، تشکیل یک میکروسکوپ میدان‌گسترده می‌دهد که با استفاده از آن می‌توان محل مناسب نمونه را پیدا کرد. در این چیدمان از دستگاه تقویت‌کننده قفل‌شونده به همراه چاپر اپتیکی به عنوان سیستم حذف نویز استفاده شده است. به دلیل ضعیف بودن سیگنال هماهنگ سوم، از آشکار ساز PMT استفاده شده که از حساسیت بالایی برخوردار است. نورهای محیطی موجب بالا رفتن سطح نویز و همچنین آسیب به آشکارساز می‌شوند. برای جلوگیری از این مشکل، چیدمان در داخل محفظه تاریک قرار داده شده است.

### نتایج تجربی

سیگنال هماهنگ سوم ثبت شده در فصل مشترک شیشه-هوا در شکل ۳ نشان داده شده که از جاروب یک لام میکروسکوپ در راستای محوری به دست آمده است.



شکل ۳: سیگنال تجربی میکروسکوپی تولید هماهنگ سوم مرسوم از فصل مشترک شیشه-هوا

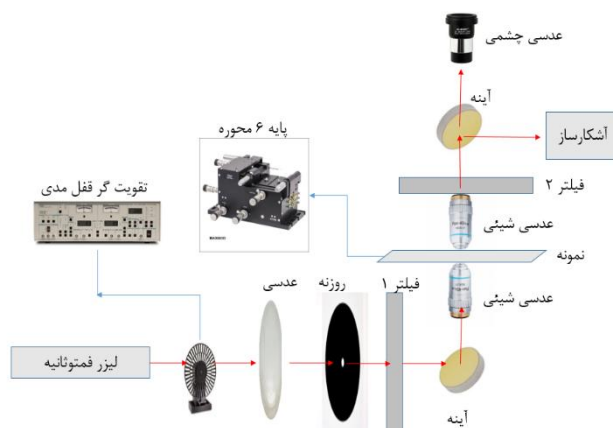
همانطور که در شکل قابل مشاهده است زمانی که سطح لام به صفحه کانون می‌رسد بیشترین سیگنال هماهنگ سوم تولید می‌شود. همچنین هر چه سطح فصل مشترک، از صفحه کانون دور می‌شود تولید هماهنگ سوم کاهش یافته و در نهایت به صفر میل می‌کند.

از آنجایی که بیشترین شدت در صفحه کانون رخ می‌دهد می‌توان با استفاده از شکل ۳ مکان صفحه کانون را با دقت میکرومتری تعیین کرد.

تفکیک می‌گردد. دسته دوم میکروسکوپ‌های جاروب نقطه‌ای هستند که در آن‌ها نمونه به صورت نقطه به نقطه روشن و سیگنال جمع‌آوری شده از آن ثبت می‌گردد. در این میکروسکوپ‌ها اصولاً از روش هم‌کانون استفاده می‌شود که این موضوع موجب افزایش توان تفکیک و نسبت سیگنال به زمینه می‌گردد. استفاده از منابع نوری فمتوثانیه و تلفیق اپتیک غیرخطی با میکروسکوپی جاروب نقطه‌ای لیزری منجر به میکروسکوپ غیرخطی جاروب نقطه‌ای لیزری می‌شود. در این میکروسکوپ‌ها به دلیل جذب غیرخطی، حجم کانونی کمتر از حد پراش، قابل دستیابی می‌باشد که موجب بهبود توان تفکیک و عمق تصویربرداری می‌گردد [۸، ۹].

### چیدمان تجربی

چیدمان تجربی میکروسکوپ غیرخطی تولید هماهنگ سوم در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: چیدمان تجربی میکروسکوپ غیرخطی جاروب نقطه‌ای

در این چیدمان از لیزر تمام فیبری قفل مدی با پالس ۱۲۰ فمتوثانیه و طول موج مرکزی ۱۵۷۰ نانومتر به عنوان منبع نوری استفاده شده است. باریکه لیزری پس از عبور از فیلتر شماره ۱ و حذف طول موج‌های ناخواسته ناشی از محیط بهره، توسط آینه ۴۵ درجه وارد عدسی شیئی با بزرگنمایی ۴۰ شده و به شدت روی نمونه کانونی می‌شود. سپس سیگنال هماهنگ سوم تولیدی توسط یک عدسی شیئی دیگر جمع‌آوری و با عبور از فیلتر شماره ۲ و حذف طول موج منبع لیزری، به سمت آشکارساز هدایت شده و با پردازش سیگنال دریافتی توسط نرم افزار Lab View تصویر

شدت سیگنال هماهنگ سوم حاصل از گلبول سفید بیشتر از گلبول قرمز می‌باشد که به دلیل مرزهای ناشی از گرانشیته گلبول سفید و تفاوت پذیرفتاری مرتبه سوم گلبول سفید و قرمز می‌باشد. این ویژگی به منظور تصویربرداری غیر مخرب و بدون برچسب از نمونه‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین تصویر ثبت شده نشان می‌دهد این چیدمان جهت تصویربرداری از نمونه‌های شفاف (همچون گلبول سفید) که میکروسکوپ‌های مرسوم در تصویربرداری از آنها دچار مشکل هستند، مناسب می‌باشد.

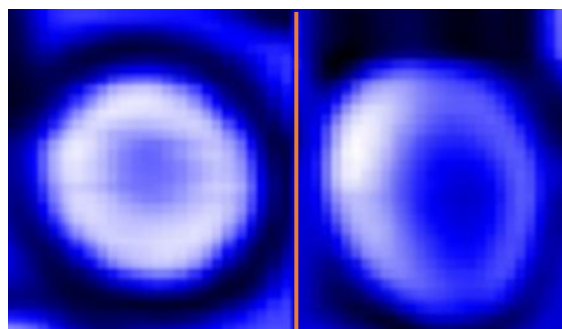
### نتیجه‌گیری

تصویربرداری هماهنگ سوم از گلبول‌های خونی انجام شده است. این تصویربرداری تمایز خوبی بین گلبول‌های خونی نشان می‌دهد و برای تصویربرداری بدون رنگ‌آمیزی گلبول‌های خونی مناسب است. شدت ثبت شده از گلبول‌های مختلف متفاوت است. گلبول‌های سفید به دلیل گرانشیته بالا دارای شدت سیگنال قوی تری هستند. با توجه به تصویر ثبت شده از گلبول سفید این میکروسکوپ برای تصویر برداری از نمونه‌های شفاف مناسب می‌باشد.

### مراجع

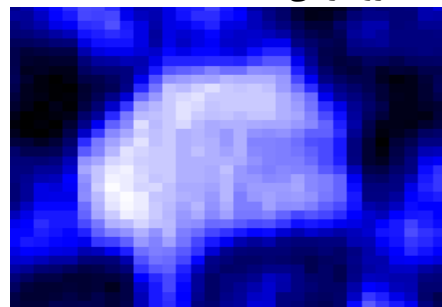
1. Minsky, M., *Microscopy Apparatus*. U.S. Patent #3013467, 1957.
2. W. Denk, J.S., and W. Webb, Science, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," 1990. . vol. 248, no. 4951, pp. 73-76.
3. P. J. Campagnola, M.-d.W., A. Lewis, and L. M. Loew, "High-Resolution Nonlinear Optical Imaging of Live Cells by Second Harmonic Generation," Biophysical Journal, 1999. , vol. 77, no. 6, pp. 3341-3349.
4. Denk, F.H.a.W., "New developments in multiphoton microscopy," Current Opinion in Neurobiology, 2002. vol. 12, no. 5, pp. 593-601.
5. Robert.W.Boyd., "Nonlinear Optics". p. 2.
6. G. T. Boyd, Y.R.S., and T. W. Hansch, and 1986., "Continuous-Wave 2nd-Harmonic Generation as a Surface Microprobe," Optics Letters, vol. 11, no. 2, pp. 97-99.
7. Tsang, T.Y.F., , "Optical third-harmonic generation at interfaces," Physical Review A, 1995. vol. 52, no. 5, pp. 4116-4125.
8. al., J.S.e., "Characterization of femtosecond pulses focused with high numerical aperture optics using interferometric surface-third-harmonic generation," Opt. Commun. 147, 153-156 (1998).
9. Squier, E.E.H.a.J.A., "Advances in multiphoton microscopy technology," Nat. Photonics 7, 93-101 (2013).

به منظور بررسی و راستی‌آزمایی عملکرد میکروسکوپی هماهنگ سوم ابتدا از یک گلبول قرمز به هر دو روش میکروسکوپی غیر خطی هماهنگ سوم و میکروسکوپ خطی جاروب نقطه‌ای تصویربرداری شده است. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است تصویر گلبول قرمز خون به خوبی ثبت شده و شکل کلی گلبول به همراه تقعر آن قابل مشاهده می‌باشد که نشان از عملکرد مناسب میکروسکوپ غیرخطی تولید هماهنگ سوم دارد.



شکل ۴: تصویر میکروسکوپ غیرخطی هماهنگ سوم از گلبول قرمز خون (راست) تصویر میکروسکوپ خطی جاروب نقطه‌ای با استفاده از لیزر هلیوم نئون (چپ)

این تصویر از آرایه‌ای ۵۰\*۵۰ پیکسلی، در گام‌های ۲۰۰ نانومتری تشکیل شده است که میدان دید آن ۱۰\*۱۰ میکرومتر می‌باشد. با توجه به اینکه صفحه کانون روی گلبول قرار دارد بیشترین سیگنال هماهنگ سوم تولیدی مربوط به لبه گلبول می‌باشد و متناسب با فاصله از صفحه کانون، سیگنال افت می‌کند. برای بررسی توان تمایز ساختاری میکروسکوپ، از یک گلبول سفید احاطه شده توسط چند گلبول قرمز تصویربرداری شد که در شکل ۵ نشان داده شده است. این تصویر از آرایه‌ای ۴۰\*۴۰ پیکسلی، در گام‌های ۵۰۰ نانومتری تشکیل شده است که میدان دید آن ۲۰\*۲۰ میکرومتر می‌باشد.



شکل ۵: تصویر میکروسکوپ غیرخطی هماهنگ سوم از گلبول سفید به همراه گلبول قرمز خون