بیست و ششمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و دوازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه خوارزمی،
تهران، ایران.
۱۵-۱۶ بهمن ۱۳۹۸

تشخیص نقاط تلاقی فیبرهای کلاژن در عمق‌های مختلف بافت قرنیه انسان با استفاده از میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم حساس به قطبش

مهدی علی‌زاده، مسعود قطبی

گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

Alizadehmehdi65@gmail.com, M.Ghotbi@uok.ac.ir

چکیده – اخیرا میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم حساس به قطبش (pSHG) به ابزاری توانمند برای مطالعه بافت قرنیه انسان تبدیل شده ا ست. نتایج حا صل از این تکنیک میکرو سکوپی در نقاطی که دو فیبر کلاژن غیر همرا ستا با هم تلاقی می‌کنند باعث گمراهی می‌شـوند. شـناسـایی و حذف این نقاط باعث بهبود و افزایش قابلیت اطمینان نتایج آزمایش می‌شـود. در این مقاله تغییرات نتایج حاصل از میکروسکوپی pSHG نسبت به عمق در نقاط تلاقی فیبرهای کلاژن موجود در قرنیه بررسی شده است. نتایج تایید می‌کند که تکنیک ارائه شده نقاط تلاقی فیبرهای کلاژن را در عمق‌های مختلف قرنیه به درستی شناسایی و حذف می‌کند.

کلید واژه- تصویربرداری زیستی و پزشکی، تولید هماهنگ دوم، قرنیه، قطبش، میکروسکوپی غیرخطی.

Identifying crossing collagen fibers in different depths of human cornea tissue using pSHG microscopy

Mehdi Alizadeh, Masood Ghotbi

Department of Physics, University of Kurdistan, Pasdaran St., 66177-15177, Sanandaj (Iran)

Abstract- Recently, polarization sensitive second harmonic generation (pSHG) microscopy has become a powerful tool for studying the human cornea tissue. The obtained results by pSHG may be misleading in the crossing points of two different collagen fiber bundles. The results can be improved and become more reliable by detecting and filtering out the crossing points. In this article, the possible changes in the results of pSHG microscopy **with** respect to the depth of the crossing points have been investigated. The results show that the proposed technique is able to identify and filter out the crossing points of the collagen fibers in different depths of the cornea.

Keywords: Cornea, Medical and biological imaging, Nonlinear Microscopy, Polarization, Second harmonic generation.

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2026-11-19]

مقدمه

قرنیه قسمت شفاف جلوی کره چشم است که بخش داخلی چشم را از محیط خارج جدا می‌کند. قرنیه عمدتا از لایه-هایی از فیبرهای کلاژن نوع I تشکیل شده است ولی کلاژن نوع VI و پروتئوگلیکان نیز در این ساختار یافت می‌شود [۱]. تغییر در ساختار قرنیه می‌تواند خصوصیات فیزیکی و اپتیکی آن را تغییر دهد و منجر به کاهش دید شود.

ساختار مولکولی کلاژن موجود در قرنیه‌ی انسان توسط تکنیک‌های میکروسکوپی مختلفی مانند X-Ray و SEM به طور دقیق تحلیل شده است. متاسفانه برای استفاده از این تکنیک‌ها باید بافت را از بدن جدا کرد. اخیرا میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم (SHG) به یکی از رایج-ترین تکنیک‌ها برای مطالعه قرنیه تبدیل شده است [۲و۳]. وجود فیبرهای کلاژن موجود در قرنیه آن را به یک نمونه ایده‌آل برای میکروسکوپی SHG تبدیل می‌کند. میکروسکوپی SHG به بافت قرنیه آسیب نمی‌رساند. همچنین، حساسیت سیگنال SHG به قطبش نور فرودی باعث به وجود آمدن تکنیک میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم حساس به قطبش (pSHG) شده است که قادر است اطلاعات ساختاری مفیدی از مولکول‌های تولید کننده‌ی هماهنگ دوم در نمونه را فراهم کند. اخیرا شناسایی نقاط تلاقی فیبرهای کلاژن موجود در قرنیه‌های انسانی با استفاده از میکروسکوپی pSHG در یک عمق ثابت انجام شده است [۳]. پارامترهای مختلف مربوط به فیبرهای کلاژن در بافت قرنیه نسبت به عمق تغییر می‌کنند. در این مقاله ابتدا تغییرات زاویه سمت‌گیری و پارامتر تشخیص نقاط تلاقی دو فیبر کلاژن غیر همراستا در سایر عمق‌ها در نواحی مجاور نقطه‌ی تلاقی دو فیبر در قرنیه شبیه‌سازی شده است. سپس توانایی تشخیص نقاط تلاقی دو فیبر کلاژن در هنگام پیشروی در عمق قرنیه توسط داده‌های حاصل از آزمایش بررسی و تایید شده است.

مواد و روش‌ها

مدل بیوفیزیکی استفاده شده در این مطالعه شدت سیگنال SHG عبوری تولید شده توسط یک مجموعه‌ی مولکولی با تقارن استوانه‌ای و با سمتگیری زاویه‌ای φ نسبت به چارچوب آزمایشگاه که با نوری فرودی با قطبش خطی در راستای α تحریک می‌شوند را به صورت زیر پیش‌بینی می-کند[۳]:

$$I_{SHG}(\varphi.\alpha) = a_0 + a_2 cos2(\varphi-\alpha) + a_4 cos4(\varphi-\alpha) \quad (۱)$$

که a_0، a_2 و a_4 ضرایبی هستند که با استفاده از الگوریتم تبدیل فوریه تعیین می‌شوند. تبدیل فوریه رابطه فوق بصورت زیر است:

$$i(\Omega) = a_0\delta(0) + a_2 \exp(i2\varphi)\,\delta(1-\Omega) + a_4 \exp(i4\varphi)\,\delta(2-\Omega) + \text{c.c.} \quad (۲)$$

که Ω تبدیل فوریه α و c.c. معرف مزدوج مختلط است. زاویه سمت‌گیری فیبرهای کلاژن نسبت به چارچوب آزمایشگاه، φ، را می‌توان با محاسبه آرگومان جمله دوم و یا سوم رابطه (۲) به صورت زیر محاسبه کرد:

$$\varphi = \arg[a_2 \exp(i2\varphi)]/2 \quad (۳)$$

$$\varphi' = \arg[a_4 \exp(i4\varphi)]/4 \quad (۴)$$

قبلا گزارش شده است که می‌توان با محاسبه تفاضل نتایج بدست آمده از روابط (۳) و (۴) نقاط تلاقی فیبرهای کلاژن موجود در بافت قرنیه را در هر پیکسل تشخیص داد [۳]:

$$\Delta\varphi = \varphi - \varphi' \quad (۵)$$

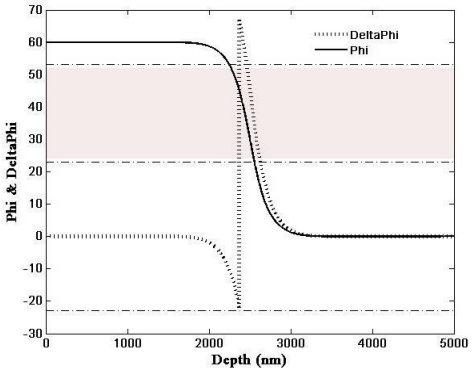
و هر پیکسلی که دارای $22.92° < |\Delta\varphi| < 53.11°$ باشد به عنوان نقطه تلاقی فیبرهای کلاژن در نظر گرفته می‌شود.

برای شبیه‌سازی مساله فرض می‌کنیم که یک پالس گاوسی با دوره‌ی زمانی با FWHM معادل ۳۰۰ نانومتر به فضای تماس دو فیبر کلاژن در راستاهای ۰° و ۶۰° وارد می‌شود.

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2026-11-19]

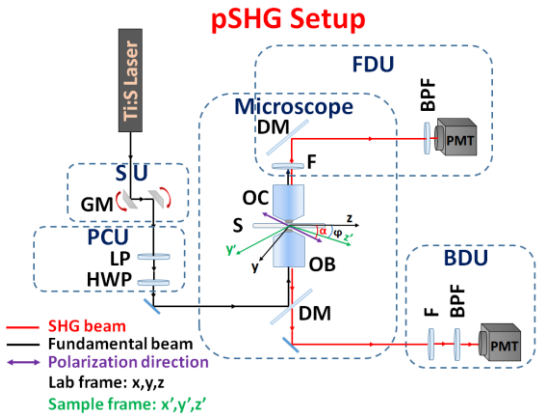
در عمق‌های مختلف این فضا شدت سیگنال SHG با استفاده از رابطه (۱) برای ۹ قطبش خطی از ۰° تا ۱۸۰° و نیز تبدیل فوریه آن محاسبه شده است. سپس با استفاده از روابط (۳) تا (۵) مقادیر φ و Δφ در عمق‌های مختلف محاسبه و در شکل (۱) نتایج نسبت به عمق رسم شده‌اند.



شکل ۱: شبیه‌سازی عبور پالس گاوسی با پهنای ۳۰۰ نانومتر از نقاط تماس دو فیبر کلاژن با سمت‌گیری‌های زاویه‌ای ۶۰° و ۰°. خط کامل φ و نقطه چین Δφ را نشان می‌دهد.

شکل (۱) نشان می‌دهد که تا زمانی که پالس گاوسی تماما داخل فیبر اول قرار دارد میکروسکوپی pSHG نتیجه‌ی درستی را برای φ نشان می‌دهد. این موضوع برای فیبر دوم نیز صادق است؛ یعنی زمانی که پالس گاوسی از سطح تماس دو فیبر عبور می‌کند و کاملا در فیبر دوم قرار می‌گیرد باز هم میکروسکوپی pSHG مقادیر φ و Δφ را به درستی محاسبه می‌کند. اما در عمق‌هایی از نمونه که پالس گاوسی هر دو فیبر را بطور همزمان روشن می‌کند و سیگنال SHG ترکیبی از سیگنال‌های تولید شده توسط هر دو فیبر است (مثلا عمق ۲۵۰۰ نانومتر) نتایج حاصل با نتایج هیچ یک از فیبرها مطابقت ندارد. در این عمق مقدار Δφ وارد بازه $22.92° < \Delta\varphi < 53.11°$ می‌شود. این بازه یکی از بازه‌های مربوط به نقاط تلاقی فیبرهاست که در شکل (۱) با رنگ ارغوانی نشان داده شده است.

شکل (۲) چیدمان مربوط به آزمایش pSHG را نشان می‌دهد. چشمه‌ی لیزری که یک لیزر Ti:Sapphire است پالس های فوق کوتاه با دوره زمانی ۱۶۰ فمتوثانیه در طول موج ۸۱۰ نانومتر با نرخ تکرار ۷۶ مگاهرتز تولید می‌کند. این پالس‌ها پس از بازتاب از دو آینه گالوانومتری (GM) و عبور از یک قطبشگر خطی (LP) و یک تیغه نیم‌موج (HWP) توسط یک عدسی شیئی (OB) غوطه‌ور در آب با گشودگی زاویه‌ای ۱/۰۵ و بزرگنمایی ۲۵ برابر روی نمونه‌ی قرنیه متمرکز می‌شوند. پس از فیلتر کردن (F و BPF) باریکه فرودی، سیگنال SHG تولید شده به آشکارساز (PMT) می‌رسد. این آزمایش برای ۹ راستای قطبش خطی α (از ۰ تا ۱۸۰° در گام های ۲۰°) تکرار شده و داده‌ها برای پردازش نهایی ذخیره شده‌اند.



شکل ۲: چیدمان آزمایش.

نتایج

برای بررسی تجربی موضوع آزمایشی طراحی شد تا بتوانیم از عمق‌های مختلف بافت قرنیه به صورت پیوسته تصویربرداری کنیم. ابتدا کانون عدسی شیئی در سطح قرنیه قرار داده شد و ۹ عکس ۵۰۰×۵۰۰ پیکسل برای ۹ قطبش خطی مختلف گرفته شد. سپس باریکه لیزر را در عمق ۲ میکرومتری بافت متمرکز کرده و دوباره عکسبرداری انجام شد. به همین روال تا عمق ۶۰ میکرومتری بافت ۳۰ مجموعه از عکس‌های بافت قرنیه تهیه شد. شکل (۳) نتایج حاصل از آزمایش را نشان می‌دهد.

شکل (۳) a شدت میانگین سیگنال SHG حاصل از نه قطبش خطی اعمالی به بافت قرنیه در عمق ۵۴ میکرون را

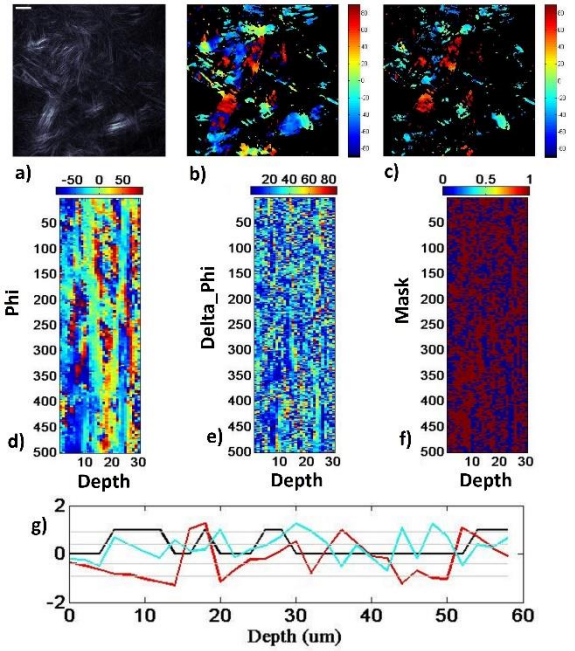
این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2026-11-19]

نشان می‌دهد. مقادیر φ متناظر با هر پیکسل در شکل (۳) b قابل مشاهده است. پس از حذف نقاط تلاقی، شکل (۳) c حاصل می‌شود. همانطور که در بالا اشاره شد تعداد ۳۰ تصویر مشابه شکل (۳) b در عمق‌های مختلف قرنیه و به فاصله ۲ میکرون گرفته شد. تعداد ۵۰۰ پیکسل ردیف ۵۵ام از ۳۰ تصویر φ گرفته شده در عمق‌های مختلف انتخاب و در شکل (۳) d نشان داده شده است. تغییرات φ نسبت به عمق در هر پیکسل قابل مشاهده است. شکل (۳) e مقادیر Δφ را برای همان پیکسل‌ها نشان می‌دهد. شکل‌های (۳) d و e نشان می‌دهند که وقتی در حین پیشروی در عمق مقدار φ متحمل تغییر شدیدی می‌شود مقدار Δφ در بازه‌های متناظر با نقاط تلاقی قرار می‌گیرد. این نقاط توسط یک ماسک فیلتر شده‌اندکه در شکل (۳) f قابل مشاهده است. برای بررسی بهتر این موضوع روی یک پیکسل دلخواه (ردیف ۵۵ و ستون ۳۰۸) تمرکز شده و مقادیر φ (نمودار قرمزرنگ)، Δφ (نمودار فیروزه‌ای) و ماسک نسبت به عمق در شکل (۳) g رسم شده‌اند. نتایج نشان می‌دهد که در عمق‌هایی که مقدار φ تغییر زیادی را متحمل می‌شود، مقدار Δφ در بازه مربوط به فیبرهای متقاطع قرار می‌گیرد و پیکسل مربوطه توسط ماسک فیلتر می‌شود.

نتیجه گیری

در این مقاله ابتدا با شبیه‌سازی برهمکنش یک پالس گاوسی با دو فیبر کلاژن فرضی که زاویه بین آن‌ها 60° است تاثیر نقاط تلاقی فیبرهای کلاژن موجود در قرینه روی نتایج حاصل از میکروسکوپی pSHG در عمق‌های مختلف ناحیه‌ی اطراف نقطه تلاقی دو فیبر بررسی شد. نتایج این شبیه‌سازی نشان داد که وقتی زاویه φ در حین پیشروی در عمق قرنیه تغییر محسوسی را متحمل می‌شود، مقدار Δφ در بازه‌ی متناظر با مقادیر مربوط به فیبرهای متقاطع قرار می‌گیرد. سپس از بافت قرنیه در عمق‌های مختلف به صورت پیوسته تصویربرداری شد و تغییرات پارامترهای مورد نظر نسبت به عمق بررسی شد. نتایج همخوانی خوبی با نتایج حاصل از شبیه‌سازی دارد و تایید می‌کند که تکنیک مورد نظر تلاقی فیبرهای کلاژن را در حین پیشروی در عمق بافت به درستی تشخیص می‌دهد.



شکل ۳: نتایج حاصل از آزمایش. خط مقیاس ۱۰ میکرون است.

سپاسگزاری

نویسندگان مایلند از آقای پروفسور Pablo Loza Alvarez و آقای دکتر David Merino جهت در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی برای انجام بخش تجربی این پژوهش در کشور اسپانیا تشکر نمایند.

مرجع‌ها

[1] K. M. Meek and C. Knupp, "Corneal structure and transparency," Progress in Retinal and Eye Research 49, 1–16 (2015).

[2] M. Lombardo, D. Merino, P. Loza-Alvarez, and G. Lombardo, "Translational label-free nonlinear imaging biomarkers to classify the human corneal microstructure," Biomedical Optics Express 6, 2803 (2015).

[3] M. Alizadeh, D. Merino, G. Lombardo, M. Lombardo, R. Mencucci, M. Ghotbi, and P. Loza-Alvarez, "Identifying crossing collagen fibers in human corneal tissues using pSHG images," Biomedical Optics Express 10, 3875 (2019).

این مقاله درصورتی دارای اعتبار است که در سایت www.opsi.ir قابل دسترسی باشد.

[Downloaded from opsi.ir on 2026-11-19]