



مقایسه تکنیک‌های میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم حساس به قطبش برای مطالعه بافت‌های زیستی

مهدی علی‌زاده و مسعود قطبی

گروه فیزیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج

پست الکترونیکی: m.ghotbi@uok.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۴/۰۲؛ دریافت نسخه نهایی: ۱۳۹۹/۰۷/۲۷)

چکیده

اخیراً تکنیک میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم حساس به قطبش (pSHG) به دلیل داشتن مزایایی همچون تفکیک‌پذیری ذاتی بالا، ایجاد تباين ذاتی، عدم آسیب‌رسانی به نمونه و قابلیت عکس‌برداری از عمق‌های زیاد در نمونه به ابزار توانمندی برای مطالعه و بررسی ساختارهای زیستی فاقد مرکز تقارن تبدیل شده است. یکی از معایب تکنیک pSHG این است که فرایند عکس‌برداری در آن، برای مطالعه بافت‌های زنده و یا بررسی دینامیک بافت به اندازه کافی سریع نیست و این موضوع امکان مطالعه بافت‌های زنده را با محدودیت‌هایی مواجه می‌کند. خوشبختانه اخیراً تکنیک میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم حساس به قطبش تک‌اسکن (SS-pSHG) به عنوان جایگزین سریعی برای تکنیک pSHG معرفی شده است. در این مقاله نتایج حاصل از تکنیک‌های میکروسکوپی pSHG و SS-pSHG در راستای عبوری روی نمونه‌های استخراج شده نشاسته، قرنیۀ انسان و زردپی حیوان به صورت پیکسل به پیکسل با هم مقایسه شده‌اند. با وجود این که نمونه‌های استفاده شده در این پژوهش زنده نیستند، همخوانی نتایج نویدبخش پتانسیل بالای تکنیک‌های تولید هماهنگ دوم حساس به قطبش برای مطالعه نمونه‌های زیستی بدون آسیب‌رسانی به آنها است، که این امر به ویژه در حالتی که نمونه‌های مورد مطالعه موجودات زنده باشند، اهمیت بالایی دارد.

واژه‌های کلیدی: بافت، تصویر برداری زیستی و پزشکی، تولید هماهنگ دوم، قطبش، میکروسکوپی غیر خطی

۱. مقدمه

به دلیل استفاده از پالس‌های فوق کوتاه لیزری در محدوده فرسرخ نزدیک و عدم نیاز به اعمال برچسب‌های خارجی [۱-۳] با توجه به این که قطبش (جهت‌گیری میدان الکتریکی) سیگنال SHG تولید شده به خوبی تعریف شده است، این ویژگی علاوه بر ایجاد امکان عکس‌برداری، دستیابی به برخی از اطلاعات ساختاری مربوط به نمونه را نیز ممکن می‌سازد.

اخیراً میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم (SHG) به عنوان یکی از تکنیک‌های تصویربرداری اپتیکی کاملاً غیر مخرب و با تفکیک‌پذیری بالا پتانسیل خوبی را برای مطالعه بافت‌های زنده از خود نشان داده است. دلایل این امر عبارتند از تفکیک‌پذیری ذاتی محوری بالا، آسیب‌رسانی نوری پایین، نفوذ عمیق به بافت

کاربردهای کلینیکی است. اخیراً یک مقایسه کمی بین نتایج حاصل از میکروسکوپی pSHG و SS-pSHG انجام شده است که نشان می‌دهد تکنیک SS-pSHG قادر است همان نتایجی را که تکنیک pSHG از نمونه نشاسته استخراج می‌کند در زمانی بسیار کمتری به دست آورد [۱۱].

در این مقاله نتایج حاصل از تکنیک‌های میکروسکوپی pSHG و SS-pSHG به روش پیکسل به پیکسل با هم مقایسه شده‌اند. برای انجام این مقایسه از نمونه‌های نشاسته، تاندون حیوانی و قرنیۀ انسانی استفاده شده است. برای این منظور راستای سمت‌گیری رشته‌های تولید کننده هماهنگ دوم موجود در نمونه‌های مورد بررسی در هر پیکسل با هم مقایسه شده‌اند. نتایج به دست آمده همخوانی بسیار خوبی را بین اطلاعات استخراج شده توسط دو تکنیک نشان می‌دهد. این مقایسه نشان می‌دهد که هرچند دقت نتایج حاصل از تکنیک pSHG بیشتر است، ولی در مواردی که عکس‌برداری سریع از نمونه مورد نیاز است و یا نمونه مورد بررسی زنده است تکنیک SS-pSHG می‌تواند جایگزین بسیار خوبی برای تکنیک pSHG باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۱.۲. مدل بیوفیزیکی

نتایج ارائه شده در این مقاله با استفاده از دو مدل بیوفیزیکی متفاوت برای تکنیک‌های میکروسکوپی pSHG و SS-pSHG به دست آمده‌اند. از آنجایی که این دو مدل بیوفیزیکی در مقالات متعددی [۳، ۶، ۱۱ و ۱۳-۱۷] تکامل یافته‌اند. در اینجا به طور مختصر به مرور آنها می‌پردازیم:

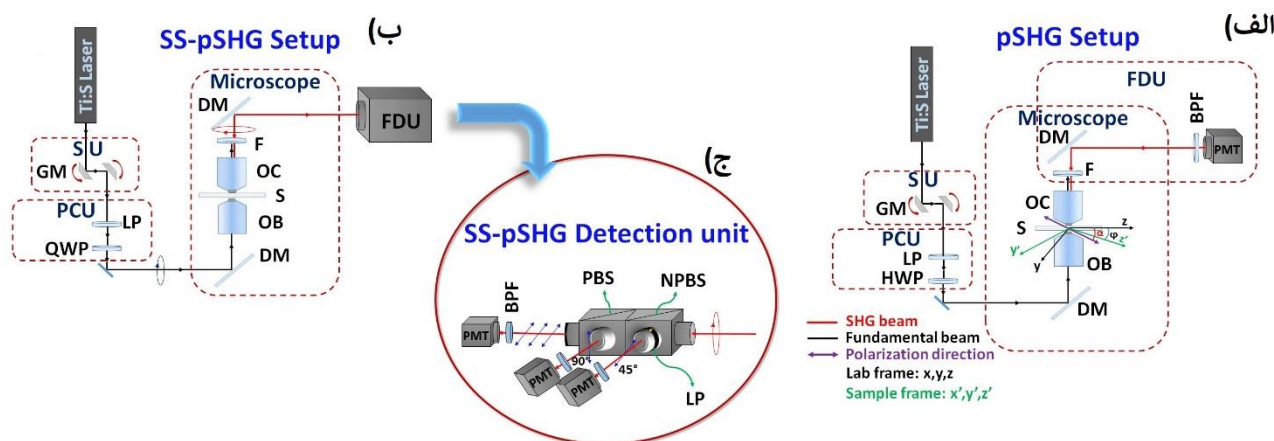
۱.۱.۲.۱. پاسخ نمونه به قطبش خطی (مدل pSHG)

مدل بیوفیزیکی مربوط به تکنیک pSHG، شدت سیگنال SHG عبوری تولید شده توسط یک مجموعه مولکول با تقارن استوانه‌ای و با سمت‌گیری زاویه‌ای ϕ نسبت به چارچوب آزمایشگاه را که با نوری فرودی با قطبش خطی در راستای α تحریک می‌شوند (شکل ۱. الف) به صورت زیر پیش‌بینی

میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم حساس به قطبش (pSHG) برای بررسی مولکول‌های زیستی فاقد مرکز تقارن مانند کلاژن، نشاسته و سلولوز، ساختار زیستی میکروتوبول و نیز ماهیچه به کار گرفته شده است [۳-۷]. نشاسته و کلاژن به دلیل قابلیت تولید هماهنگ دوم با بهره‌ی بالا از مناسب‌ترین نمونه‌های زیستی برای مطالعه با استفاده از میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم هستند. یکی از بافت‌های انسانی مناسب برای مطالعه با این تکنیک نیز بافت قرنیۀ چشم است که از کلاژن تشکیل شده است. اخیراً روشی برای تشخیص نقاط تلاقی رشته‌های کلاژن موجود در قرنیۀ‌های انسانی با استفاده از عکس‌های pSHG ارائه شده است [۸].

برای تولید تصاویر pSHG معمولاً یک استراتژی پیچیده به کار گرفته می‌شود، زیرا برای این منظور باید نمونه را با استفاده از نور قطبیده خطی در زاویه‌های قطبش مختلف تحریک کرد. سپس پاسخ نمونه به نورهای قطبیده خطی در راستاهای مختلف را تحلیل کرد. در تکنیک میکروسکوپی pSHG مورد بحث در این مقاله، به منظور جاروب کردن تمام زوایای قطبش ممکن، از ۹ قطبش خطی در زوایای بین 0° تا 180° (با گام‌های 20°) استفاده شده است که تمام فرایندها برای تولید هر عکس pSHG حدوداً $1/5$ دقیقه به طول می‌کشد [۶، ۷ و ۹-۱۱]. این امر به این معنی است که نمونه مورد مطالعه باید در طی فرایند تصویربرداری برای مدت $1/5$ دقیقه بدون تغییر بماند که در مورد مطالعه نمونه‌های زنده و یا بررسی تغییرات سریع بافت، محدودیت‌هایی را ایجاد می‌کند.

تکنیک میکروسکوپی تولید هماهنگ دوم حساس به قطبش تک اسکن (SS-pSHG) یک تکنیک میکروسکوپی سریع است که برای استخراج اطلاعات ساختاری مولکول‌های تولید کننده هماهنگ دوم موجود در نمونه پیشنهاد شده است [۱۲]. در این تکنیک برای این که نمونه فقط یک بار اسکن شود، به جای ۹ بار تاباندن نور لیزر با قطبش خطی در راستاهای مختلف و ثبت تصویر برای هر راستا، از یک باریکه فرودی با قطبش دایروی استفاده می‌شود. این تکنیک نویدبخش پیدایش روشی سریع و غیر آسیب‌رسان برای تصویربرداری از بافت‌های زنده و



شکل ۱. چیدمان آزمایش. (الف) چیدمان آزمایش pSHG. راستای انتشار منطبق بر محور X و X' است و رشته تولید کننده سیگنال SHG در راستای محور Z قرار دارد که با محور Z چارچوب آزمایشگاه زاویه ϕ می‌سازد. زاویه قطبش خطی نور فرودی نسبت به محور Z چارچوب آزمایشگاه α است. (ب) چیدمان آزمایش SS-pSHG و (ج) بخش آشکارسازی چیدمان SS-pSHG.

دادن سه تحلیلگر در سه زاویه مختلف است. شدت اندازه‌گیری شده بعد از یک تحلیلگر در راستای زاویه α از معادله زیر به دست می‌آید [۱۱ و ۱۲]:

$$I_{\alpha}^{\omega} \propto E_{\omega}^2 \left(\sin^2(\varphi - \alpha) + \frac{1}{r} \left(\frac{d_{rr}}{d_{10}} - 1 \right) \cos^2(\varphi - \alpha) \right), \quad (4)$$

برای سادگی، مقادیر α به ترتیب برابر با 0° ، 45° و 90° قرار داده شده و شدت‌های معادل I_{α}^{ω} ، I_{45}^{ω} و I_{90}^{ω} محاسبه می‌شوند. با کمی محاسبات ریاضی می‌توان به روش تحلیلی راستای محور اصلی بیضی یا همان زاویه سمت‌گیری رشته‌های تولید کننده SHG در نمونه را به صورت زیر محاسبه کرد [۱۱ و ۱۲]:

$$\varphi = \frac{1}{r} \tan^{-1} \left\{ \frac{2I_{45}^{\omega} - I_{0}^{\omega} - I_{90}^{\omega}}{I_{0}^{\omega} - I_{90}^{\omega}} \right\}, \quad (5)$$

۲.۲ چیدمان آزمایش

برای مقایسه پیکسل به پیکسل عکس‌های حاصل از دو تکنیک میکروسکوپی pSHG و SS-pSHG آزمایشی طراحی شد که بتوان بدون تغییر یا حرکت دادن نمونه هر دو آزمایش را اجرا کرد. در واقع چیدمان‌های آزمایش مربوط به این دو تکنیک بر روی یک میکروسکوپ نصب شد به طوری که بتوان تنها با تغییر چند عنصر اپتیکی و ظرف مدت چند دقیقه تکنیک

می‌کند [۶، ۸ و ۱۱]:

$$I_{SHG}(\varphi, \alpha) = a_0 + a_r \cos^2(\varphi - \alpha) + a_f \cos^2(\varphi - \alpha), \quad (1)$$

که a_0 ، a_r و a_f ضرایبی هستند که با استفاده از الگوریتم تبدیل فوریه تعیین می‌شوند. تبدیل فوریه رابطه فوق به صورت زیر است:

$$i(\Omega) = a_0 \delta(\Omega) + a_r \exp(i r \varphi) \delta(\Omega - 1) + a_f \exp(i r \varphi) \delta(\Omega - 2) + c.c., \quad (2)$$

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

$$\varphi = \arg [a_r \exp(i r \varphi)] / r, \quad (3)$$

۲.۱.۲ پاسخ نمونه به قطبش دایروی (مدل SS-pSHG)

مدل بیوفیزیکی SS-pSHG نیز مانند بخش قبل فرض می‌کند که مجموعه مولکول‌های تولید کننده هماهنگ دوم موجود در نمونه، تقارن استوانه‌ای دارند و با چارچوب آزمایشگاه زاویه ϕ می‌سازند. در صورتی که این مولکول‌ها توسط باریکه‌ای با قطبش دایروی تحریک شوند سیگنال هماهنگ دوم تولید شده یک قطبش بیضوی خواهد داشت (شکل ۱. ب). ساده‌ترین راه برای تحلیل بیضی قطبش و استخراج زاویه سمت‌گیری ϕ قرار

در این آزمایش‌ها طول‌موج مرکزی لیزر به 850 نانومتر تغییر داده شد. سپس برای ساختن قطبش دایروی مناسب بعد از قطبشگر خطی، به جای تیغه نیم موج قبلی یک تیغه ربع موج در زاویه مناسب قرار داده شد. پس از این که قطبش دایروی باریکه تأیید شد، باریکه توسط همان عدسی‌های شیئی روی نمونه متمرکز و سیگنال‌های عبوری جمع‌آوری شدند.

باریکه‌های SHG تولید شده عبوری که قطبش بیضوی دارند توسط یک بخش آشکار سازی نشان داده شده در شکل ۱. ج جمع‌آوری شدند. پس از فیلتر کردن سیگنال فرودی، سیگنال SHG تولید شده پس از بازتاب از یک آینه دوفام به داخل بخش آشکارسازی هدایت شد. در داخل این بخش باریکه ابتدا توسط یک شکافنده پرتو $50:50$ (NPBS) به دو قسمت تقسیم شد که نصف آن پس از عبور از یک تحلیلگر در زاویه 45° و سپس یک فیلتر وارد آشکارساز PMT شد و نصف دیگر آن به شکافنده پرتو دوم (PBS) تابیده و به دو قسمت تقسیم شد. این دو باریکه نیز از دو تحلیلگر در زاویه‌های 0° و 90° عبور و پس از گذشتن از دو فیلتر مناسب به دو آشکارساز دیگر رسیدند. سیگنال SHG تولید شده در سه زاویه قطبش مختلف 0° ، 45° و 90° اندازه‌گیری شد. برای کاهش تأثیرات نوفه روی داده‌های حاصل، این آزمایش ۵ بار تکرار و در نهایت از داده‌ها میانگین‌گیری به عمل آمد. زمان تصویربرداری برای یک عکس 512×512 با این تکنیک تقریباً $7/5$ ثانیه است. در تمام آزمایش‌ها توان باریکه فرودی در حدی نگه داشته شد که به نمونه آسیبی نرسد. توان باریکه لیزری در آزمایش‌ها در محل نمونه‌های نشاسته و کلاژن در حد 35 میلی‌وات و در محل نمونه قرنیه در حد $37/6$ میلی‌وات نگه داشته شد. برای اندازه‌گیری توان از آشکارساز مدل PM121D محصول شرکت ذورلبز^۱ استفاده شد. همچنین بر اساس محاسبات تئوری تفکیک‌پذیری عرضی میکروسکوپ pSHG تقریباً $21/0 \mu$ و برای میکروسکوپ SS-pSHG تقریباً $22/0 \mu$ است. تفکیک‌پذیری محوری نیز به ترتیب برابر $29/0 \mu$ و $3/0 \mu$ است [۱۸].

میکروسکوپی را از pSHG به SS-pSHG و یا برعکس تغییر داد. شکل ۱ چیدمان‌های مربوط به این دو آزمایش را نشان می‌دهد. پس از آماده شدن نمونه و نصب کردن آن روی میکروسکوپ، ابتدا از چیدمانی مشابه با شکل ۱. الف برای تکنیک میکروسکوپی pSHG استفاده شد. پالس‌های فوق کوتاه لیزری با دوره زمانی 160 فمتوثانیه در طول موج 810 نانومتر و با نرخ تکرار 76 مگاهرتز توسط لیزر Ti:Sapphire تولید شده و به دو آینه گالوانومتری می‌تابند و پس از عبور از یک قطبشگر خطی و یک تیغه نیم‌موج، قطبش خطی مناسب را گرفته و توسط یک عدسی شیئی غوطه‌ور در روغن با گشودگی زاویه‌ای $1/4$ و بزرگ‌نمایی 60 برابر روی نمونه متمرکز شدند. یک عدسی شیئی دیگر با همان ویژگی‌ها برای جمع‌آوری سیگنال‌های SHG تولید شده توسط نمونه در راستای عبوری پس از استفاده شد. سیگنال SHG تولید شده در راستای عبوری پس از جمع‌آوری توسط عدسی شیئی از یک شکافنده پرتو، یک فیلتر BG39، یک فیلتر با FWHM معادل 15 نانومتر به مرکزیت 406 نانومتر عبور و به یک آشکارساز شدت (PMT) رسیده و سپس برای پردازش نهایی در کامپیوتر ذخیره شدند.

پس از تکمیل فرایند عکس‌برداری برای یک قطبش خطی مشخص و ذخیره عکس‌ها، زاویه قطبش نور فرودی با چرخاندن تیغه نیم موج توسط یک موتور چرخان به اندازه 20° چرخانده شده و آزمایش تکرار شد. این عمل برای 9 قطبش مختلف تکرار شد تا تمام زاویه‌های قطبش خطی ممکن بین 0° تا 180° درجه در بازه‌های 20° پوشش داده شوند. برای افزایش دقت، این آزمایش برای هر قطبش خطی چهار بار تکرار شد. زمان مورد نیاز برای انجام هر آزمایش pSHG تقریباً $1/5$ دقیقه بود. لازم به ذکر است که برای هدایت چیدمان اپتیکی و کنترل خودکار و دقیق حرکت عنصرهای موجود در چیدمان آزمایش از یک برنامه رابط LabView استفاده شد.

پس از ذخیره کردن نتایج آزمایش pSHG، سریعاً تغییرات مناسب اعمال شد و چیدمان آزمایش به چیدمان آزمایش SS-pSHG (شکل ۱. ب) تغییر داده شد. از همان لیزر قبلی به عنوان چشمه تولید پالس‌های فوق کوتاه لیزری استفاده شد، اما

۱. Thorlabs

۳.۲. نمونه‌ها

نشاسته پلی ساکارید اصلی در گیاهان سبز است که به شکل دانه یکی از درخشان‌ترین مبدل‌های SHG طبیعی است [۱۹]. نشاسته از دو نوع مولکول آمیلوز و آمیلوپکتین تشکیل شده است. لایه‌های کریستالی شامل شاخه‌های کوتاه آمیلوپکتین است که در ناحیهٔ کانونی نور لیزر قویا همراستا شده‌اند و بنابراین یک پاسخ غیر خطی مرتبه دوم قوی تولید می‌کنند و این امر نشاسته را به یکی از درخشان‌ترین مبدل‌های SHG طبیعی تبدیل می‌کند [۲۰-۲۲]. قبلاً نشان داده شده است که چشمه‌های تولید هماهنگ دوم در نشاسته آمیلوپکتین^۱‌هایی هستند که شاخه‌هایشان به صورت شعاعی در دانه نشاسته توزیع شده‌اند و این شاخه‌ها از مرکز تا سطح بیرونی دانه نشاسته ادامه دارند [۵، ۱۰ و ۲۳]. نمونه نشاسته استفاده شده در این پژوهش نشاسته گندم است که محصول شرکت سیگما-آلدریج^۱ است. برای آماده کردن نمونه جهت آزمایش‌های SHG حساس به قطبش، تعدادی دانه نشاسته روی یک تیغه پلاستیکی شفاف (با ضخامت بین ۰/۱۳ تا ۰/۱۶ میلی‌متر) قرار داده شد و سپس یک قطره آب مقطر روی آن چکانده شد. برای محافظت از نمونه، یک پوشش پلاستیکی (یک تیغه پلاستیکی دیگر از همان جنس و ابعاد) روی آن قرار داده و چسبانده شد. لازم به ذکر است که تیغه‌های پلاستیکی محصولات استاندارد هستند که به گونه‌ای انتخاب می‌شوند که در نتایج آزمایش اختلالی ایجاد نکنند. تیغه‌های پلاستیکی استفاده شده در این پژوهش از شرکت دلتا لب^۲ تهیه شده‌اند.

کلاژن یک پروتئین خارج از سلول است که مولفه رشته‌ای اصلی قرنیه، زردپی، پوست، استخوان، غضروف و دندان است. کلاژن می‌تواند به آسانی با تکنیک‌های میکروسکوپی SHG مختلف تصویربرداری شود. قرنیه عمدتاً از لایه^۶‌هایی از رشته‌های کلاژن نوع I تشکیل شده است، هرچند کلاژن نوع VI و پروتئوگلیکان نیز در این ساختار یافت می‌شود [۲۴]. هر تغییری در ساختار رشته‌های کلاژن موجود در قرنیه، ناشی از

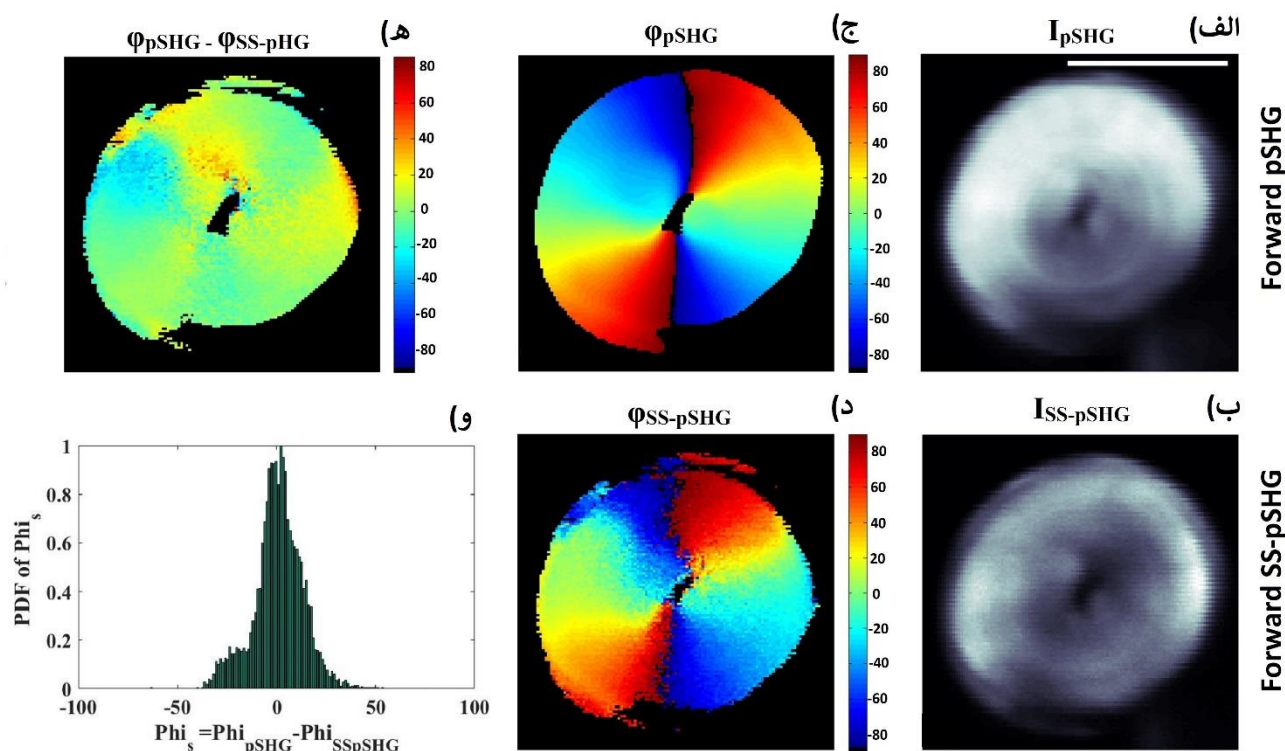
بیماری یا تومور، می‌تواند خصوصیات فیزیکی و اپتیکی آن را تغییر دهد و منجر به کاهش دید شود [۲۵]. کلاژن در بافت زردپی نرم و انعطاف‌پذیر است در صورتی که در بافت قرنیه سخت و شفاف است. نمونه کلاژن مورد استفاده در اینجا کلاژن زردپی گاو است که از شرکت سیگما-آلدریج خریداری شده است. رشته‌های کلاژن هنگام خریداری خشک شده‌اند. برای تصویربرداری، برشی از زردپی که حاوی رشته‌های کلاژن است پس از قرار گرفتن روی یک تیغه شفاف و چکاندن چند قطره آب مقطر و قرار دادن یک تیغه دیگر روی آن آماده عکس‌برداری شد. نمونه قرنیه نیز در یک چنبره دست‌ساز که حاوی مقداری محلول دکستران ۱۵٪ است قرار داده شد. پس از قرار دادن نمونه بین دو پوشش پلاستیکی شفاف (با ضخامت بین ۰/۱۳ تا ۰/۱۶ میلی‌متر) به طوری که سطح قرنیه موازی سطح صفحه تصویربرداری میکروسکوپ باشد روی میکروسکوپ قرار داده شد. لازم به ذکر است که نمونه‌های قرنیه که در این پژوهش استفاده شدند مطابق با اظهارنامه هلسینکی برای تحقیق روی بافت‌های انسانی به دست آمدند و پروتکل تجربی توسط کمیته اخلاق محلی (کلینیک بارسلونا، بیمارستان یونیورسیتاری، بارسلونا، اسپانیا) تأیید شد. میانگین سن اهدا کنندگان ۵۸/۳±۱۲/۱ سال بود. قرنیه‌های بیمار (دارای بیماری قوز قرنیه) از بیمارانی که در مؤسسه اپتومولوژی در دانشگاه فلورانس ایتالیا تحت کراتوپلاستی نافذ بودند، به دست آمد. قرنیه‌ها بلافاصله بعد از عمل جراحی در یک محلول گلو تارآلدئید ۲/۵٪ غوطه‌ور و در دمای ۴°C به آزمایشگاه میکروسکوپی در مؤسسه تحقیقات فوتونیک ICFO در بارسلونا انتقال داده شد.

۳. نتایج آزمایش‌ها

در این بخش عکس‌های شدت و نیز زاویه سمت‌گیری رشته‌های تولید کننده هماهنگ دوم داخل نمونه، ϕ ، حاصل از دو مجموعه داده که از راستای عبوری تکنیک‌های pSHG و

۱. Sigma-Aldrich

۲. Deltalab



شکل ۲. مقایسه نتایج حاصل از میکروسکوپی‌های pSHG و SS-pSHG بر روی نمونه نشاسته. (الف) شدت SHG عبوری میانگین حاصل از ۹ عکس شدت مربوط به نه باریکه قطبیده خطی، (ب) شدت SHG عبوری میانگین حاصل از تنظیم تحلیگر در سه راستای 0° ، 45° و 90° ، (ج) مقادیر ϕ محاسبه شده از داده‌های حاصل از آزمایش pSHG، (د) مقادیر ϕ محاسبه شده از داده‌های حاصل از آزمایش SS-pSHG، (ه) تفاصل پیکسل به پیکسل نتایج $\phi_s = \phi_{pSHG} - \phi_{SS-pSHG}$. (و) تابع توزیع (PDF) مقادیر بهنجار شده ϕ_s . خط مقیاس معادل ۵ میکرومتر است و زمان مورد نیاز برای انجام یک آزمایش pSHG برای یک قاب 512×512 پیکسل حدوداً $1/5$ دقیقه و برای آزمایش SS-pSHG همان قاب حدوداً $7/5$ ثانیه است.

نشاسته نمایش می‌دهد. شکل ۲. الف شدت SHG عبوری میانگین را که از اعمال ۹ قطبش خطی مختلف روی نمونه حاصل شده است نشان می‌دهد. برای یک قاب 512×512 پیکسلی در نهایت داده‌های حاصل یک ماتریس $9 \times 512 \times 512$ را تشکیل می‌دهند که با محاسبه تبدیل فوریه روی بعد سوم ماتریس و استفاده از رابطه (۳) می‌توان مقادیر زاویه سمت‌گیری رشته‌های تولید کننده هماهنگ دوم، ϕ ، در هر پیکسل را محاسبه کرد. شکل ۲. ب نیز شدت SHG عبوری میانگین را برای همان قاب از عکس نشان می‌دهد ولی در این مورد نمونه با یک قطبش دایروی تحریک شده و میانگین‌گیری روی سه عکس شدتی که از تغییر زاویه تحلیگر (قطبشگر

SS-pSHG به دست آمده‌اند با هم مقایسه شده‌اند. برای این منظور ابتدا داده‌های حاصل از نمونه نشاسته، سپس نمونه زردپی و در نهایت نمونه قرنیه انسانی با هم مقایسه شده‌اند. برای محاسبه ϕ در تکنیک pSHG از رابطه (۳) و در تکنیک SS-pSHG از رابطه (۴) استفاده شده است. در این آزمایش‌ها ابتدا تکنیک pSHG با استفاده از چیدمانی شبیه به شکل ۱. الف انجام گرفته است و سپس با اعمال تغییرات مناسب سریعاً چیدمان آزمایش به چیدمانی شبیه به شکل ۱. ب تغییر کرده و آزمایش SS-pSHG انجام شده است.

شکل ۲ نتایج حاصل از مقایسه مقادیر ϕ حاصل از تکنیک‌های pSHG عبوری و SS-pSHG عبوری را برای نمونه

نوفه موجود در نتایج نهایی اثرگذار است.

برای انجام یک مقایسه کمی، تفاضل پیکسل به پیکسل مقادیر شکل‌های ۲. ج و ۲. د از رابطه زیر محاسبه شده است:

$$\varphi_s = \varphi_{pSHG} - \varphi_{SS-pSHG} \quad (6)$$

نتایج این تفاضل در شکل ۲. ه نمایش داده شده‌اند. یکنواختی رنگ در این شکل نشان دهنده این است که در اکثر پیکسل‌های تصویر، مقدار φ_s تقریباً برابر با 0° است. برای تفسیر بهتر این نتیجه، هیستوگرام مقادیر φ_s در شکل ۲. و رسم شده است. وجود یک قله بلند در هیستوگرام مقادیر بهنجار شده φ_s با FWHM معادل 19° نشان می‌دهد که در ۶۶٪ از پیکسل‌های موجود در تصویر $|\varphi_s| \leq 9/5^\circ$ است. یکنواختی در رنگ سبز که نماینده زاویه 0° در شکل ۲. ه است و نیز وجود یک قله بلند در هیستوگرام مقادیر φ_s در شکل ۲. و تأییدی بر همخوانی نتایج حاصل از تکنیک‌های pSHG و SS-pSHG عبوری در مطالعه نمونه نشاسته است.

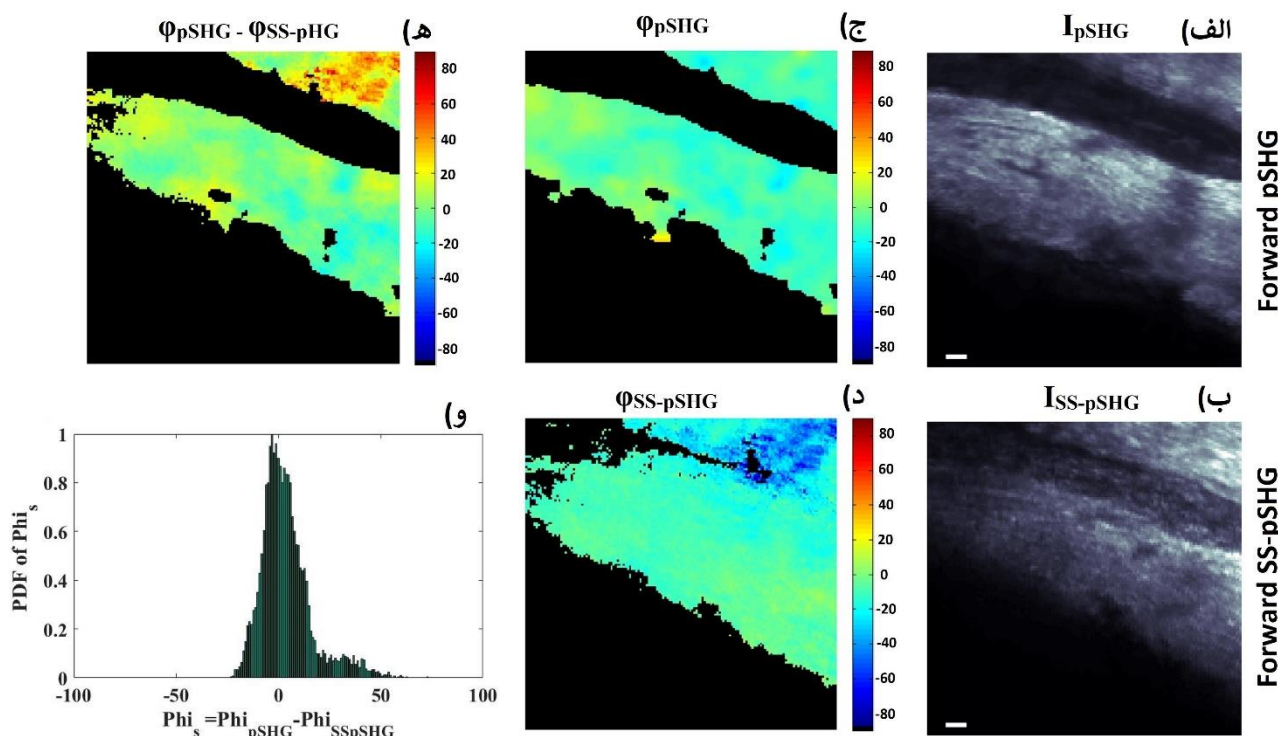
در ادامه، مقایسه فوق روی نمونه زردپی انجام شده است. شکل ۳ نتایج این مقایسه را نشان می‌دهد. مانند آنچه برای نشاسته داشتیم، شکل‌های ۳. الف و ب شدت‌های SHG عبوری میانگین را به ترتیب برای داده‌های حاصل از تکنیک‌های میکروسکوپی pSHG و SS-pSHG روی نمونه زردپی نشان می‌دهند. پس از محاسبه زوایای ϕ برای این دو مجموعه داده، شکل‌های ۳. ج و د حاصل شده‌اند. در اینجا نیز برای یک مقایسه کمی تفاضل پیکسل به پیکسل مقادیر ϕ شکل‌های ۳. ج و د و همچنین هیستوگرام آنها به ترتیب در شکل‌های ۳. ه و ۳. د رسم شده‌اند. باز هم یک قله بلند در هیستوگرام مقادیر بهنجار شده ϕ_s با FWHM تقریباً 15° مشاهده می‌شود که مرکز آن روی 0° قرار دارد. وجود این قله و همچنین رنگ یکنواخت پیکسل‌های موجود در شکل ۳. ه تأییدی بر همخوانی نتایج حاصل از میکروسکوپی‌های pSHG و SS-pSHG برای نمونه زردپی است.

در ادامه برای تحقیق امکان استفاده از میکروسکوپی SS-pSHG روی نمونه قرنیه، نتایج حاصل از تکنیک‌های pSHG و SS-pSHG روی نمونه قرنیه با هم مقایسه شده‌اند.

خطی در قسمت آشکارسازی تکنیک (SS-pSHG) و به ازای زوایای 0° ، 45° و 90° به دست آمده‌اند، صورت گرفته است. یک مقایسه بصری ساده همخوانی بین دو تکنیک pSHG و SS-pSHG برای تصویربرداری از نمونه نشاسته را به خوبی نشان می‌دهد.

برای یک مقایسه کمی، مقادیر زاویه سمت‌گیری ϕ در هر پیکسل برای داده‌های شکل ۱. الف و ۱. ب و به ترتیب با استفاده از روابط (۳) و (۵) محاسبه شده و نتایج حاصل در شکل‌های ۲. ج و ۲. د نشان داده شده‌اند. در این تصاویر هر رنگ نماینده یک زاویه بین -90° و $+90^\circ$ است (به نوار رنگی کنار عکس‌ها مراجعه شود). در تمام عکس‌ها سعی شده است که محور افقی به عنوان یکی از محورهای چارچوب آزمایشگاه و متناظر با زاویه صفر درجه تنظیم شود). برای حذف نوفه‌های موجود در تصویر، یک ماسک بر اساس نرخ سیگنال به نوفه (SNR) تولید شد [۶]. نقاط حذف شده توسط این ماسک به رنگ سیاه در تصاویر نمایان شده‌اند.

همان طور که در بخش ۳.۲ ذکر شد رشته‌های تولید کننده هماهنگ دوم در داخل نشاسته توزیع شعاعی دارند. در هر دو شکل ۲. ج و ۲. د توزیع شعاعی رشته‌های آمیلوپکتین در نمونه به خوبی مشهود است. تنها نکته‌ای که باید به آن دقت کرد این است که نتایج حاصل از میکروسکوپی SS-pSHG نوفه و خطای بیشتری نسبت به نتایج حاصل از میکروسکوپی pSHG دارند. این موضوع از این واقعیت ناشی می‌شود که عکس‌های pSHG از ۹ عکس حاصل از قطبش‌های خطی در راستاهای مختلف محاسبه می‌شوند. این بدین معناست که در این آزمایش‌ها نمونه ۹ بار اسکن می‌شود. علاوه بر این، همانطور که قبلاً ذکر شد، برای افزایش دقت نتایج، این آزمایش‌ها را معمولاً ۴ بار تکرار می‌کنیم. در آزمایش‌های SS-pSHG سه عکس حاصل نتیجه‌ای از تنها یک اسکن از نمونه هستند. حتی با این که آزمایش ۵ بار تکرار می‌شود، باز هم زمان روشن‌سازی هر پیکسل در تکنیک SS-pSHG ۷ برابر کمتر از این زمان در تکنیک pSHG است. به بیان دیگر، این کاهش در تعداد دفعات اسکن نمونه با باریکه لیزری روی میزان



شکل ۳. مقایسه نتایج حاصل از میکروسکوپی‌های pSHG و SS-pSHG بر روی نمونه زردپی. (الف) شدت عبوری میانگین حاصل از ۹ باریکه قطبیده خطی، (ب) شدت SS-pSHG عبوری میانگین حاصل از زوایای 0° ، 45° و 90° ، (ج) مقادیر ϕ محاسبه شده از آزمایش pSHG، (د) مقادیر ϕ محاسبه شده از آزمایش SS-pSHG، (ه) مقادیر ϕ_s و (و) تابع توزیع مقادیر بهنجار شده ϕ_s . خط مقیاس معادل ۵ میکرومتر است و زمان مورد نیاز برای انجام یک آزمایش pSHG برای یک قاب 512×512 پیکسل حدوداً ۱/۵ دقیقه و برای آزمایش SS-pSHG برای همان قاب حدوداً ۷/۵ ثانیه است.

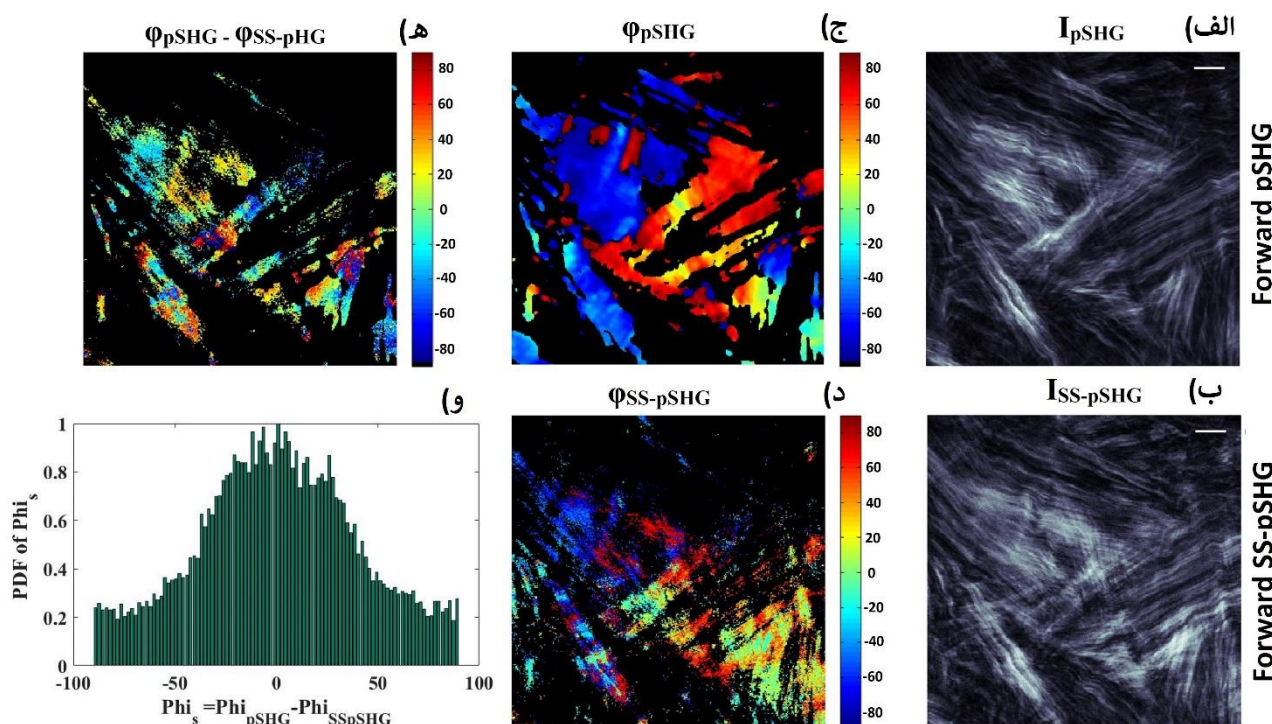
تکنیک SS-pSHG گاهی از مرتبه نوفه‌های موجود در محیط هستند. مقادیر تفاضل ϕ_s و نیز هیستوگرام این مقادیر نیز در شکل‌های ۴. ه و و نمایش داده شده‌اند. در این حالت FWHM قله نمودار هیستوگرام مربوط به مقادیر بهنجار شده ϕ_s تقریباً 62° است.

۴. نتیجه‌گیری و بحث

در این مقاله نتایج حاصل از تکنیک‌های تصویربرداری میکروسکوپی pSHG و SS-pSHG بر روی سه نمونه نشاسته، زردپی و قرنیه با هم مقایسه شده‌اند. برای دستیابی به یک برآورد کمی از همخوانی نتایج دو تکنیک، مقادیر زاویه سم‌گیری ϕ در پیکسل‌های متناظر با هم مقایسه شده‌اند. برای

شکل ۴ نتایج این مقایسه را نشان می‌دهد. همچون موارد قبل، شکل‌های ۴. الف و ب به ترتیب شدت‌های عبوری میانگین را برای تکنیک‌های pSHG و SS-pSHG نمایش می‌دهند. همخوانی بین عکس‌های شدت در این حالت کاملاً واضح است.

مقادیر ϕ متناظر با داده‌های شکل‌های ۴. الف و ب به ترتیب در شکل‌های ۴. ج و د نمایش داده شده‌اند. کاملاً واضح است که نوفه نقش مهمی را در نتایج حاصل از میکروسکوپی SS-pSHG بازی می‌کند. این موضوع خود را در شکل ۴. د به خوبی نشان می‌دهد به طوری که در این عکس تعداد پیکسل بیشتری توسط ماسک SNR به عنوان نوفه شناخته شده و فیلتر شده‌اند. دلیل این موضوع این است که سیگنال‌های حاصل از



شکل ۴. مقایسه نتایج حاصل از میکروسکوپی‌های pSHG و SS-pSHG بر روی نمونه قرینه در عمق ۱۰۴ میکرومتر. (الف) شدت pSHG عبوری میانگین حاصل از ۹ باریکه قطبیده خطی، (ب) شدت SS-pSHG عبوری میانگین حاصل از زوایای 0° ، 45° و 90° ، (ج) مقادیر ϕ محاسبه شده از آزمایش pSHG، (د) مقادیر ϕ محاسبه شده از آزمایش SS-pSHG، (ه) مقادیر ϕ_s و (و) تابع توزیع مقادیر بهنجار شده ϕ_s . خط مقیاس معادل ۵ میکرومتر است و زمان مورد نیاز برای انجام یک آزمایش pSHG برای یک قاب 512×512 پیکسل حدوداً $1/5$ دقیقه و برای آزمایش SS-pSHG برای همان قاب حدوداً $7/5$ ثانیه است.

هیستوگرام مقادیر بهنجار شده ϕ_s یک قله بلند با FWHM معادل 19° به مرکزیت 0° دارد که حاکی از همخوانی خوب نتایج حاصل از دو تکنیک است. علاوه بر این، با دقت در عکس‌های مربوط به زاویه ϕ توزیع شعاعی رشته‌های تولید کننده SHG در نمونه نشاسته برای نتایج حاصل از هر دو تکنیک کاملاً مشهود است. در مورد نمونه زردپی نیز چنین مقایسه‌ای صورت گرفته است که هیستوگرام مقادیر بهنجار شده ϕ_s یک قله بلند به مرکزیت 0° و با FWHM معادل 15° دارد. نتایج حاصل از تکنیک‌های میکروسکوپی pSHG و SS-pSHG برای نمونه زردپی همخوانی بهتری را به همراه دارد. دلیل این امر این است که رشته‌های کلاژن تولید کننده SHG داخل نمونه

انجام این موضوع آزمایشی طراحی شده است که بتوان از یک قاب ثابت نمونه با استفاده از هر دو تکنیک عکس‌برداری کرد. چیدمان هردو آزمایش روی یک میکروسکوپ سوار شده است به طوری که بتوان در مدت زمان چند دقیقه و تنها با تغییر چند عنصر اپتیکی ساده از تکنیک میکروسکوپی pSHG به SS-pSHG و یا برعکس تغییر داده شود.

برای هر نمونه عکس‌های شدت و نیز مقادیر ϕ به دست آمده کنار هم قرار داده شده و با هم مقایسه شده است. سپس در هر پیکسل تفاضل مقادیر ϕ (ϕ_s) به دست آمده توسط دو تکنیک با هم مقایسه شده است. در مورد نمونه نشاسته، مقادیر ϕ_s در تمام پیکسل‌ها مقادیری نزدیک به صفر دارد. همچنین

تولید کننده هماهنگ دوم در یک بافت بیشتر باشد سیگنال SHG تولید شده توسط نمونه بیشتر است و در نتیجه سیگنال کمتر تحت تأثیر نوفه قرار می‌گیرد [۳۰ و ۳۱]. در مورد نمونه قرنیه، FWHM قله موجود در هیستوگرام مقادیر بهنجار شده ϕ_s حاصل از دو تکنیک بزرگ‌تر و معادل 62° درجه است. این قله پهن حاکی از تأثیرات نوفه بر نتایج حاصل برای نمونه قرنیه است.

منابع ایجاد نوفه در آزمایش‌های pSHG عبارتند از: ناهمسانگردی نمونه، اعوجاج قطبش در اثر اعمال مؤلفه محوری به قطبش به وسیله عدسی شیئی با گشودگی زاویه‌ای زیاد، انحراف از هم‌ترازی اپتیکی، عدم تعیین دقیق قطبش خطی، پراکندگی اشباع، پاشندگی، ابیراهی اپتیکی و کوچک بودن نسبت سیگنال به نوفه (SNR). علاوه بر این موارد، دوشکستی و جذب در بعضی نمونه‌های زیستی نیز می‌توانند باعث بروز خطا در محاسبات شوند [۶، ۹ و ۲۶-۲۹]. همان طور که قبلاً ذکر شد داده‌های حاصل از آزمایش SS-pSHG نسبت به داده‌های به دست آمده از آزمایش pSHG متحمل نوفه بیشتری می‌شوند. علاوه بر منابع نوفه‌ای که تکنیک pSHG را تحت تأثیر قرار می‌دهند، محدود شدن تعداد عکس‌ها از چندین عکس به یک عکس، دقت اندازه‌گیری را کاهش می‌دهد و به چشمه جدیدی برای پیدایش نوفه تبدیل می‌شود. علاوه بر این، قبلاً در مقالات گزارش شده است که هرچه چگالی رشته‌های

تولید کننده هماهنگ دوم در یک بافت بیشتر باشد سیگنال SHG تولید شده توسط نمونه بیشتر است و در نتیجه سیگنال کمتر تحت تأثیر نوفه قرار می‌گیرد [۳۰ و ۳۱]. در مورد نمونه قرنیه، FWHM قله موجود در هیستوگرام مقادیر بهنجار شده ϕ_s حاصل از دو تکنیک بزرگ‌تر و معادل 62° درجه است. این قله پهن حاکی از تأثیرات نوفه بر نتایج حاصل برای نمونه قرنیه است.

منابع ایجاد نوفه در آزمایش‌های pSHG عبارتند از: ناهمسانگردی نمونه، اعوجاج قطبش در اثر اعمال مؤلفه محوری به قطبش به وسیله عدسی شیئی با گشودگی زاویه‌ای زیاد، انحراف از هم‌ترازی اپتیکی، عدم تعیین دقیق قطبش خطی، پراکندگی اشباع، پاشندگی، ابیراهی اپتیکی و کوچک بودن نسبت سیگنال به نوفه (SNR). علاوه بر این موارد، دوشکستی و جذب در بعضی نمونه‌های زیستی نیز می‌توانند باعث بروز خطا در محاسبات شوند [۶، ۹ و ۲۶-۲۹]. همان طور که قبلاً ذکر شد داده‌های حاصل از آزمایش SS-pSHG نسبت به داده‌های به دست آمده از آزمایش pSHG متحمل نوفه بیشتری می‌شوند. علاوه بر منابع نوفه‌ای که تکنیک pSHG را تحت تأثیر قرار می‌دهند، محدود شدن تعداد عکس‌ها از چندین عکس به یک عکس، دقت اندازه‌گیری را کاهش می‌دهد و به چشمه جدیدی برای پیدایش نوفه تبدیل می‌شود. علاوه بر این، قبلاً در مقالات گزارش شده است که هرچه چگالی رشته‌های

۵. سپاس‌گزاری

نویسندگان مایلند از زحمات آقای پروفیسور پابلو لوزا آلوارز و آقای دکتر دیوید مرینو که در انجام بخش تجربی این پژوهش در مؤسسه تحقیقات فوتونیک ICFO، بارسلونا، اسپانیا ایشان را یاری داده‌اند، تشکر کنند.

مراجع

1. W R Zipfel, R M Williams, and W W Webb, *Nature Biotechnology* **2**, 1(2003) 1369.
2. S W Chu, S Y Chen, G W Chern, T H. Tsai, Y C Chen, B L Lin, and C K Sun, *Biophysical journal* **86** (2004) 3914.
3. S Psilodimitrakopoulos, S I Santos, I Amat-Roldan, A K Thayil, D Artigas, and P Loza-Alvarez, *Journal of biomedical optics* **14** (2008) 014001.
4. S V Plotnikov, A C Millard, P J Campagnola, and W A. Mohler, *Biophysical Journal* **90** (2006) 693.
5. S Psilodimitrakopoulos, I Amat-Roldan, P Loza-Alvarez, and D Artigas, *Biomedical Optics Express* **3** (2012) 2681.
6. I Amat-Roldan, S Psilodimitrakopoulos, P Loza-Alvarez, and D Artigas, *Optics express* **18** (2010) 17209.
7. S Psilodimitrakopoulos, V Petegnief, N de Vera, O Hernandez, D Artigas, A M Planas, and P Loza-Alvarez, *Biophysical Journal* **104** (2013) 968.
8. M Alizadeh, D Merino, G Lombardo, M Lombardo, R Mencucci, M Ghotbi, and P Loza-Alvarez, *Biomedical Optics Express* **10** (2019) 3875.
9. M Lombardo, D Merino, P Loza-Alvarez, and G Lombardo, *Biomedical Optics Express* **6** (2015) 2803.
10. S Psilodimitrakopoulos, I Amat-Roldan, P Loza-Alvarez, and D Artigas, *Journal of Optics* **12** (2010) 084007.
11. M Alizadeh, M Ghotbi, P Loza-Alvarez, and D Merino, *Methods and Protocols* **2** (2019) 49.
12. S Psilodimitrakopoulos, P Loza-Alvarez, and D Artigas, *Biomedical optics express* **5** (2014) 4362.

22. R Cisek, L Spencer, N Prent, D Zigmantas, G S Espie, and V Barzda, *Photosynthesis Research* **102** (2009) 111.
23. Z Y Zhuo, C S Liao, C H Huang, J Y Yu, Y Y Tzeng, W Lo, C Y Dong, H C Chui, Y C Huang, and H M Lai, *Journal of Structural Biology* **171** (2010) 88.
24. K M Meek and C Knupp, *Progress in Retinal and Eye Research* **49** (2015) 1.
25. D M Maurice, *The Journal of Physiology* **136** (1957) 263.
26. S Brasselet, *Adv. Opt. Photon.* **3** (2011) 205.
27. J M Bueno, E J Gualda, and P Artal, *J Biomed. Opt.* **15** (2010) 066004.
28. G J Van Blokland and S C Verhelst, *J. Opt. Soc. Am. A* **4** (1987) 82.
29. O del Barco and J M Bueno, *J. Biomed. Opt.* **17** (2012) 045005.
30. M Strupler, A M Pena, M Hernest, P L Tharaux, J L Martin, E Beaurepaire, and M C Schanne-Klein, *Opt. Express* **15** (2007) 4054.
31. M Yildirim, K P Quinn, J B Kobler, S M Zeitels, I Georgakoudi, and A Ben-Yakar, *Scanning* **38** (2016) 684.
13. X Chen, O Nadiarynkh, S Plotnikov, and P J Campagnola, *Nature Protocols* **7** (2012) 654.
14. N Mazumder, J Qiu, M R Foreman, C M Romero, P Török, and F J Kao, *Biomedical Optics Express* **4** (2013) 538.
15. F Tiaho, G Recher, and D Rouède, *Optics express* **15** (2007) 12286.
16. S Psilodimitrakopoulos, D Artigas, G Soria, I Amat-Roldan, A M Planas, and P Loza-Alvarez, *Optics express* **17** (2009) 10168.
17. S Psilodimitrakopoulos, V Petegnief, G Soria, I Amat-Roldan, D Artigas, A M Planas, and P Loza-Alvarez, *Optics express* **17** (2009) 14418.
18. F S Pavone, P J Campagnola, and P J Campagnola, *Second Harmonic Generation Imaging*, CRC Press, (2016).
19. S W Chu, I H Chen, T M Liu, C K Sun, S P Lee, B L Lin, P C Cheng, M X Kuo, D J Lin, and H L Liu, *J Microsc* **208** (2002) 190.
20. G Cox, N Moreno, and J Feijó, *Journal of Biomedical Optics* **10** (2005) 024013.
21. G Mizutani, Y Sonoda, H Sano, M Sakamoto, T Takahashi, and S Ushioda, *Journal of Luminescence* **87-89** (2000) 824.