بیست و چهارمین کنفرانس اپتیک و فوتونیک و
دهمین کنفرانس مهندسی و فناوری فوتونیک ایران
۱۰ الی ۱۲ بهمن ۹۶ - دانشگاه شهرکرد
24th Iranian Conference on Optics and Photonics (ICOP 2018) and
9th Iranian Conference on Photonics Engineering and Technology (ICPET 2018)
Jan 30 - Feb 1 , 2018 - Shahrekord University

ردیابی سه‌بعدی اسپرم گاوی با میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی

نگار عزیزی[۱]، اکرم نجفلو[۱]، محمد اولین‌چهارسوقی[۲،۱]، رسول کوثر[۳] ، رضا معصومی[۴] ، احسان احدی‌اخلاقی[۲،۱]
[۱]دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی ۴۵۱۹۵-۶۶۷۳۱
[۲]مرکز پژوهشی اپتیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان کد پستی ۴۵۱۹۵-۶۶۷۳۱
[۳] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان کد پستی ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱
[۴] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان کد پستی ۴۵۳۷۱-۳۸۷۹۱

چکیده - دستیابی به مشخصه‌های دینامیکی ذرات در حوزه‌های فیزیک زیستی و فیزیک مواد نرم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مقاله روشی تجربی برای ردیابی سه‌بعدی اسپرم گاوی به‌عنوان یک نمونه زیستی متحرک با استفاده از میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی ارائه شده است. اساس این کار بر پایه‌ی پردازش تصویر و هم‌چنین بهره‌گیری از اطلاعات بازیابی شده از طریق ثبت تمام‌نگاشت است. میکروسکوپ تمام‌نگاری دیجیتالی پیاده سازی شده دارای اندازه پیکسل معادل با ۱۷۵ نانومتر و توان‌تفکیک بهتر از ۲٫۱۹ میکرومتر است. با استفاده از این میکروسکوپ مسیر حرکت سه‌بعدی نمونه‌ها در فضا و زمان تعیین و میانگین سرعت حرکت نمونه‌ها ۱۲۷٫۵۱ میکرومتر بر ثانیه اندازه‌گیری شد.

کلید واژه- اسپرم، تحرک‌پذیری، ردیابی سه‌بعدی، میکروسکوپی تمام‌نگار دیجیتالی.

Three-dimensional tracking of bovine sperm by digital holographic microscopy

Negar Azizi[1], Akram Najaflou[1], Mohammad A. Charsooghi[1,2],
Rasoul Kowsar[3], Reza Masoumi[4], Ehsan A. Akhlaghi[1,2]

[1]Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan, 45137-66731, Iran
[2]Optics Research Center, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan, 45137-66731, Iran
[3]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran
[4]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, 45371-38791, Iran

Abstract- Finding dynamical characteristics of particles has an especial importance in the area of soft and biological physics. This work introduces an experimental method to track bovine sperm in three dimension as movable bio particles by applying digital holographic microscopy. The work is based on applying image-processing methods and using the obtained information from the hologram record. Pixel

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

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-03]

size and Resolution of this microscope measured 175 nanometer and better than 2.19 micrometer respectively. We found the coordinates of the particles in three dimension. The average speed of the samples measured 127.51 micrometer per second.

Keywords: 3D Particle Tracking, Digital Holographic Microscopy, Motility, Sperm.

۱- مقدمه

تکنیک ردیابی ذرات، امکان دستیابی به مشخصات دینامیکی آن‌ها را با دقت قابل ملاحظه‌ای در بازه‌های فضایی میکرومتری و حتی نانومتری فراهم می‌کند. از این رو در حوزه‌هایی چون، فیزیک زیستی و فیزیک مواد نرم برای مطالعه مواردی از قبیل فرآیند انتقال در سلول‌ها و باکتری‌ها و برهمکنش بین ذرات کلوئیدی مورد توجه قرار گرفته است. ردیابی ذره در صفحه نسبتا ساده است. متداول‌ترین روش برای ردیابی دو بعدی، پیدا کردن مرکز شدت ذره برای هر تصویر از فیلم‌های ویدیوئی است [۱]. اما میکروسکوپ‌های رایج قادر به مشخص کردن مسیر حرکت سه‌بعدی ذره در طول زمان نیستند. در صورتی که دستیابی به اطلاعات دقیق از موقعیت ذره و نزدیک‌تر شدن هرچه بیشتر به آن چه در واقعیت و در طی فرآیندهای زیستی رخ می‌دهد، مستلزم پیدا کردن راه حلی برای ردیابی سه‌بعدی ذرات میکرونی است. طی دو دهه اخیر روش‌های مختلفی برای حل مشکلات مرتبط با سنجش موقعیت ذره در عمق پیشنهاد شده است، که تمام‌نگاری دیجیتالی و ردیابی ذرات فلورسانی از جمله روش‌های سرآمد در این زمینه هستند [۲و۳]. سلامت باروری در گونه مذکر، چه در انسان‌ها و چه در حیوانات یک زمینه‌ی تحقیقاتی مهم در مطالعات زیستی است. همچنین تلقیح مصنوعی یک کار مهم در گسترش گله‌ای با ارزش اصلاحی بالا است. وقتی که دام‌ها به این شیوه آبستن می‌شوند، از جهات بسیاری به آینده‌ی گله و اقتصاد حاصل از آن کمک می‌شود. هرچند تلقیح مصنوعی هزینه‌ای به مراتب کمتر نسبت به تلقیح طبیعی دارد، اما در نتیجه بهتر و در آینده مقرون به صرفه تر است. بنابراین ردیابی سه‌بعدی و تعیین الگوی حرکتی اسپرم‌های گاوی برای تعیین مناسب‌ترین الگو به منظور افزایش احتمال باروری در گاوهای ماده، هدف این مقاله است. از این‌رو ریخت‌شناسی، میزان تحرک‌پذیری و غلظت سلول‌های اسپرم در یک واحد حجم مشخص، پارامترهای تعیین‌کننده‌ای در دستیابی به این مهم هستند. روش تمام‌نگاری دیجیتالی یک روش به روز و جذاب در این حوزه است. تصویربرداری تمام-نگاری دیجیتال از سلول‌های زنده در حوزه‌ی زیست‌پزشکی به سرعت در حال پیشرفت است [۶].

تمام‌نگاری دیجیتالی به دو روش روی محور و خارج محور انجام می‌گیرد. در روش روی محور، دو باریکه شئ و مرجع در یک راستا با هم تداخل می‌کنند و طرح تداخلی حاصل روی صفحه آشکارساز ثبت می‌شود. اما در روش خارج از محور، دو باریکه شئ و مرجع به‌صورت زاویه‌دار با هم تداخل می‌کنند. در این مقاله از روش میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی روی محور برای ردیابی سه‌بعدی اسپرم‌های گاوی و محاسبه‌ی پارامترهای حرکتی آن‌ها استفاده شده است.

۲- مبانی نظری

میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی یک روش غیرتماسی، غیرمخرب و پرکاربرد برای تصویربرداری سه‌بعدی است. این روش شامل دو مرحله ثبت و بازسازی است. ابتدا طرح تداخلی ناشی از نور مربوط به جسم و مرجع که حاوی اطلاعات دامنه‌ای و فازی آن است به‌صورت تمام‌نگاشت ثبت می‌شود. تمام‌نگاشت به‌عنوان تصویر دیجیتال در کامپیوتر ذخیره می‌شود. و سپس با استفاده از روش‌های عددی، اطلاعات بعد سوم استخراج می-شود. در این مرحله به یک ساختار سه‌بعدی از شئ با استفاده از تمام‌نگاشت دو بعدی آن روی پرده (دوربین) دست می‌یابیم. به عبارتی دیگر جبهه موج شئ را بازسازی می‌کنیم. یکی از روش‌های بازسازی عددی، رهیافت انتشار طیف زاویه‌ای است. که در این مقاله نیز از این روش استفاده شده است. در این روش به صورت عددی فرض می‌شود که یک موج مرجع $U(x,y,0)$ تمام‌نگاشت را روشن کرده و موج پراشیده از آن با استفاده از تبدیل فوریه به جبهه موج‌های تخت تشکیل‌دهنده آن تجزیه می‌شود و با رابطه زیر بیان می‌شود:

$$A_0(f_x,f_y,0) = \int_{-\infty}^{\infty}\int U(x,y,0)\exp[-i2\pi(f_x x+f_y y)]dxdy \quad (۱)$$

که f_x و f_y فرکانس‌های فضایی در امتداد محورهای x و y هستند. پس مطابق با رابطه (۲) هر جبهه موج تخت به صورت عددی به اندازه d_z در فضا منتشر می‌شود. سپس با فیلتر مناسب مرتبه‌های اضافی حذف می‌شوند و با اعمال تبدیل فوریه معکوس، موج پراشیده شده در فاصله d_z از تمام‌نگاشت تشکیل می‌شود[۴].

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

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-03]

$$U(x,y,d_z) = F^{-1}\,filt[FU(x,y,d_z)] \times \exp[ik\sqrt{1-\lambda^2 f_x^2-\lambda^2 f_y^2}\,d_z] \quad (۲)$$

توزیع شدت و فاز موج ناشی از جسم به ترتیب از روابط (۳) و (۴) به‌دست می‌آیند:

$$I(x,y,d_z) = \left|U(x,y,d_z)\right|^2 \quad (۳)$$

$$\varphi(x,y,d_z) = \arctan\frac{\mathrm{Im}[U(x,y,d_z)]}{\mathrm{Re}[U(x,y,d_z)]} \quad (۴)$$

به این ترتیب، شدت و فاز نمونه در فاصله d_z برای هر تصویر محاسبه می‌شوند. با بررسی تباین شدت برای تصاویر به‌دست آمده در گام‌های d_z متفاوت و نسبت دادن عمق مربوط به بیشینه تباین به حالت فوکوس، محل ذره تعیین می‌شود. برای محاسبه تباین شدت از روابط (۵) و (۶) استفاده می‌شود:

$$C_0 = \frac{I_{\mathrm{Max}}(x,y,d_z) - I_{\mathrm{Min}}(x,y,d_z)}{I_{\mathrm{Max}}(x,y,d_z) + I_{\mathrm{Min}}(x,y,d_z)} \quad (۵)$$

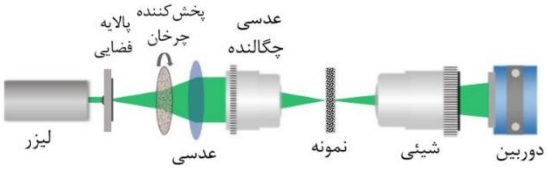
$$C = \frac{C_0}{d_{\mathrm{Min}}} \quad (۶)$$

که $I_{\mathrm{Max}}(x,y,d_z)$ و $I_{\mathrm{Min}}(x,y,d_z)$ به ترتیب شدت بیشینه و شدت کمینه برای هر تصویر و همچنین d_{Min} نیز فاصله کمینه بین شدت بیشینه و شدت کمینه بر حسب پیکسل در هر تصویر است. به این ترتیب d_z محل بیشینه تباین برای هر تصویر را به‌دست می‌دهد، که عمق نمونه یا همان بعد سوم خواهد بود.

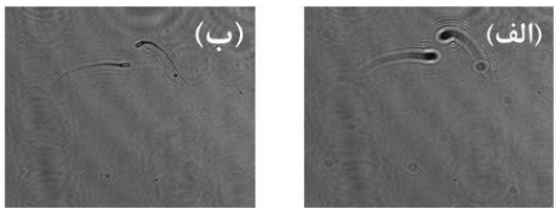
۳- شرح آزمایش و نتایج تجربی

۳-۱- چیدمان آزمایش

در این پژوهش از هندسه تمام‌نگاری روی محور استفاده شده است. شکل ۱ طرح کلی چیدمان میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی را نمایش می‌دهد. باریکه‌ی نور همدوس لیزر ($\lambda = 532\ \mathrm{nm}, 10\ \mathrm{mW}$) پس از عبور از پالایه‌ی فضایی به‌صورت واگرا از یک پخش‌کننده چرخان عبور می‌کند و در ادامه وارد یک عدسی شده و به‌صورت موازی از آن خارج می‌شود. سپس نور موازی وارد یک عدسی چگالنده شده و پس از خروج از آن سطح نمونه را روشن می‌کند. نمونه مورد بررسی درون محفظه‌ای متشکل از یک لام و لامل قرار داردکه با استفاده از چسب دو طرفه تهیه شده است. محفظه حاوی نمونه بر روری دستگاه گرم‌کن الکتریکی با قابلیت تنظیم دمای نمونه در ۳۸ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. باریکه پراکنده شده از نمونه و باریکه مرجع بعد از عبور از عدسی شیئ (NA=0.25, 10x) با هم تداخل کرده و طرح تداخلی حاصل بر روی صفحه‌ی مشاهده (Thorlabs, DCC 1545M) ثبت و برای تحلیل به رایانه منتقل می‌شود. استفاده از پخش‌کننده چرخان و در نتیجه کاهش همدوسی نور فرودی از ایجاد بسیاری از تداخل-های ناخواسته جلوگیری کرده و منجر به ثبت تمام‌نگاشت‌هایی با کیفیت بهتر می‌شود. شکل ۲(الف) تصویر یک تمام‌نگاشت ثبت شده نوعی را در حالت قبل از انتشار و شکل ۲(ب) همان تصویر را در حالت بعد از انتشار نمایش می‌دهد.



شکل ۲: طرح کلی چیدمان میکروسکوپی تمام‌نگاری دیجیتالی.



شکل ۳: تمام‌نگاشت‌های ثبت شده از اسپرم‌های گاوی: (الف) قبل از انتشار عددی و (ب) بعد از انتشار عددی.

۳-۲- آماده سازی نمونه

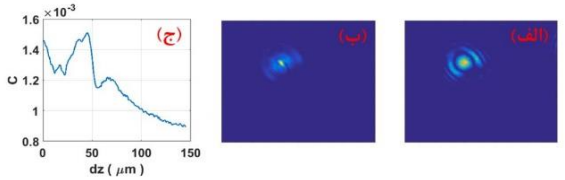
در این مرحله، باید اسپرم‌های گاوی منجمد، طی فرآیندی، یخ-زدایی، رقیق و برای تصویربرداری در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد آماده می‌شدند. ابتدا، برای این منظور حجم نهایی رقیق‌کننده ۱۰۰ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل بشر ریخته شد و سپس ۳٫۶۳۴ گرم تریس و ۱٫۹۹ گرم اسید سیتریک به آن اضافه و بر روی هات پلیت استیرر قرار داده شد تا به خوبی حل شوند. پس از آن ۰٫۵ گرم فروکتوز هم اضافه و حجم نهایی با اضافه کردن مجدد آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر افزایش داده شد. سپس پایوت حاوی اسپرم‌های فریز شده که در تانک ازت در دمای ۱۹۶- درجه‌ی سانتیگراد قرار داشتند توسط حمام بن‌ماری یخزدایی و با استفاده از رقیق‌کننده به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد. در ادامه مقداری از آن به داخل محفظه‌ای مخصوص در محل نمونه قرار گرفته بر گرم‌کن الکتریکی در چیدمان آزمایش تزریق شد.

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

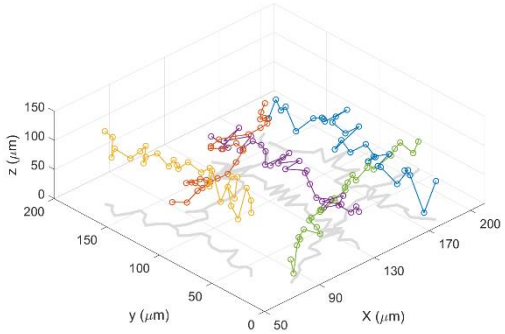
[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-03]

۳-۳- نتایج تجربی

با تحلیل تمامنگاشت‌های ثبت شده، تصاویر فوکوس از آن‌ها به‌دست آمد که با استفاده از روش‌های پردازش تصویر مکان دو بعدی و با معین بودن میزان انتشار برای رسیدن به تصویر فوکوس، مکان نمونه‌ها در عمق نیز به دست آمد. که بر اساس آن‌ها دینامیک حرکتی ذرات و مسیر حرکت اسپرم‌های گاوی تعیین شد. شکل ۳ فرآیند تحلیل تمامنگاشت را نشان می‌دهد. به‌طوری که شکل ۳(الف) نشان‌دهنده نمونه در حالت غیر فوکوس و قبل از انتشار عددی،شکل ۳(ب) نشان‌دهنده نمونه در حالت فوکوس و بعد از انتشار عددی است و شکل ۳(ج) نمودار تباین شدت بر حسب گام‌های انتشار را نمایش می‌دهد که تعیین‌کننده عمق نمونه در حالت بیشینه تباین شدت است. شکل ۴ نیز به عنوان نمونه، مسیر حرکت پنج اسپرم را برای غلظت ۱۲۵۰ اسپرم بر میکرولیتر در سه‌بعد نمایش می‌دهد.



شکل ۳: فرآیند تحلیل تمامنگاشت: (الف) نمونه در حالت غیر فوکوس و قبل از انتشارعددی، (ب) نمونه در حالت فوکوس و بعد از انتشار عددی، (ج) نمودار تباین شدت بر حسب گام‌های انتشار.



شکل ۴: مسیر حرکت سه‌بعدی مربوط به پنج اسپرم متفاوت.

۴- نتیجه‌گیری

در این مقاله روشی مبتنی بر میکروسکوپی تمامنگاری دیجیتالی برای ردیابی سه‌بعدی اسپرم‌های گاوی ارائه شد. که با استفاده از میکروسکوپی تمامنگاری دیجیتالی روی محور و با بهره‌گیری از منبع نور همدوس این امکان را فراهم می‌کند که مسیر سه-بعدی اسپرم‌های گاوی تعیین شوند. در جدول ۱ پارامترهای حرکتی میانگین اندازه‌گیری شده برای نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش آمده است که به ترتیب از چپ به راست عبارتند از: سرعت در مسیرهای واقعی (Curviline ar Velocity)، سرعت در مسیر مستقیم (Straight line Velocity)، سرعت میانگین (Avrage pass Velocity)، درصد خطی بودن حرکت (Linearity)، درصد مستقیم الخط بودن حرکت (Straightn ess) و میزان تحرک اسپرم‌ها (Wobble) [۷]. این روش قادر به اندازه‌گیری پارامترهایی مثل، تحرک‌پذیری، سرعت و ضریب پخش در شرایط مختلف خواهد بود که در آینده به آن‌ها خواهیم پرداخت.

جدول ۱: انواع پارامترهای حرکتی میانگین اسپرم‌های گاوی .

VCL ($\frac{\mu m}{s}$)	VSL ($\frac{\mu m}{s}$)	VAP ($\frac{\mu m}{s}$)	LIM (%)	STR (%)	WOB (%)
۲۶۹٫۱۵	۷۹٫۹۴	۱۲۷٫۵۱	۲۹٫۷	۶۲٫۶۹	۴۷٫۳۷

مراجع

[1] M. J. Saxton and K. Jacobson. "*Sinqle-particle tracking: applications to membrane dynamics*" Annual review of biophysics and biomolecular structure, 1997.

[2] Lee, Sang-Hyuk, et al. "*Characterizing and tracking single colloidal particles with video holographic microscopy*" Optics Express, 2007.

[3] Speidel, Michael, et al. "*Three-dimensional tracking of fluorescent nanoparticles with subnanometer precision by use of off-focus imaging*" Optics Letters, 2003.

[4] T-C. Poon, J-P. Liu. "*Introduction to modern digital holography: with MATLAB*" Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York, 2014.

[5] P. Taghilou, B. Rostami, et al. "Effects of supplementation of the Tris-egg yolk extender with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on frozen-thawed ram semen characteristics" Small Ruminant Research, 2017.

[6] G. Di Caprio, M. A. Ferrara, et al. "*Holographic imaging of unlabelled sperm cells for semen analysis: a review*" Journal of biophotonics, 2015.

[7] Mortimer, Sharon. T. "*CASA-practical aspect*" Journal of andrology, 2000.

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

[Downloaded from www.opsi.ir on 2026-11-03]