لیزرپزشکی؛ ۱۳۹۲، دورهٔ ۱۰، شمارهٔ ۱، صفحات: ۲۰ - ۱۳.

مقاله پژوهشی

بهبود توان تفکیک تصاویرچندبینابی توموگرافی فلورسنت مولکولی با استفاده از الگوریتمunmixingخطی

پروین میرزاقوامی[۱]
مرجانه حجازی[۲و۴]
بهادر مکی‌آبادی[۳]
محسن ابراهیمی[۱]

[۱]کارشناسی ارشد، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲]دانشیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳]استادیار، گروه فیزیک و مهندسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴]کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی، بیمارستان امام خمینی(ره)، تهران، ایران

نویسندهٔ مسئول: مرجانه حجازی ، تلفن ۰۹۱۲۴۸۴۱۳۳۹
پست الکترونیک: mhejazi@sina.tums.ac.ir

خلاصه

مقدمه: یکی از انواع تصویربرداری‌های ملکولی، روش برش‌نگاری فلورسنت ملکولی است که در آن، نمونه در زوایای مختلف تحت تابش پرتوی لیزر قرار می‌گیرد و پس از تحریک، مبادرت به تابش پرتوی فلورسنت می‌نماید. در این شیوهٔ تصویربرداری نوری مکان تجمع مادهٔ فلورسنت در بافت باتوجه به شدت فلورسنت رسیده به سطح نمونه تعیین می‌شود. بررسی چندین فرآیند زیستی نیازی ضروری در کاربردهای پزشکی و بیولوژیکی است. برای انجام این قبیل بررسی‌ها برای نشاندار کردن اجزای مورد نظر از مواد فلورسنت مختلف استفاده می‌شود و تصویربرداری به‌روش چندبینابی انجام می‌شود. اما، به‌دلیل هم‌پوشانی بیناب تابشی مواد فلورسنت، تفکیک اجزای نشاندارشده ازهم میسر نیست. برای ایجاد بهبود در تفکیک اجزا از الگوریتم‌های ریاضی موسوم به unmixing خطی استفاده می‌شود. بنابراین هدف این مقاله پیاده‌سازی یک الگوریتم unmixing مبتنی بر روش فاکتورگیری ماتریسی غیرمنفی(NMF) در تصاویر برش‌نگاری فلورسنت است.

روش بررسی: این مطالعه به‌طور مجزا در دو بخش شبیه‌سازی و آزمایشگاهی اجرا شد. درهر دوبخش، شدت فلورسنت رسیده به سطح نمونه حاوی دو مادهٔ فلورسنت مختلف در پروجکشن‌های متعدد در چند طول موج به‌دست آمد سپس الگوریتم unmixing برروی تصاویر پروجکشن اعمال شد. برای تعیین صحت عملکرد الگوریتم، تصاویر پروجکشن از هریک‌از دو مادهٔ فلورسنت ایجاد شد و به‌عنوان دادهٔ مرجع برای مقایسه با تصاویر حاصل از اعمال الگوریتم درنظر گرفته شد. ارزیابی کمّی با محاسبهٔ ضریب همبستگی و جذر میانگین مربع اختلاف(RMSE) انجام شد سپس داده‌های حاصل اعمال الگوریتم مورد بازسازی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند تصاویر حاصل از اعمال الگوریتم با تصاویر مرجع مربوطه بیش از ۹۷ درصد همبستگی داشتند. بین جذر میانگین مربع اختلاف تصاویر حاصل از اعمال الگوریتم با تصاویر مرجع مرتبط و غیرمرتبط تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (P.value<۰/۰۰۱) که نشان‌دهندهٔ صحت عملکرد الگوریتم بود.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مقاله الگوریتم unmixing مبتنی بر روش NMF برای جداسازی سهم نسبی دو فلوروفور درتصاویر پروجکشن نوشته شد. صحت این الگوریتم با آزمون همبستگی و t_test بررسی و تأیید شد. نتایج بازسازی با استفاده از داده‌های حاصل از الگوریتم نشان می‌دهد با این روش می‌توان توزیع هریک از فلوروفورها را به‌طور جداگانه به‌دست آورد.

واژه‌های کلیدی: unmixing خطی، روش فاکتورگیری ماتریسی غیرمنفی، تصویربرداری چندبینابی، روش برش‌نگاری فلورسنت

مقدمه

برش‌نگاری فلورسنت مولکولی به‌عنوان یک روش غیر تهاجمی برای مشاهدهٔ فرآیندها در اندازهٔ سلولی و زیرسلولی به‌کار می‌رود. این روش به‌طور گسترده‌ای در تصویربرداری از حیوانات کوچک، تصویربرداری از گره‌های لنفاوی درحین جراحی، تشخیص بیماری‌های پوستی، بررسی عملکرد داخلی ارگان‌هایی مانند بافت پستان و مغز و شناخت توالی ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد[۱].

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

در برش‌نگاری فلورسنت مولکولی (FMT)، بافت توسط نانوذرات فلورسنت نشاندار می‌شود. سپس نمونهٔ تحت آزمایش توسط لیزر درخشان می‌شود، فلورسنت تحریک و شروع به تابش می‌کند. شدت پرتوی فلورسنت رسیده به سطح بافت با چرخش۳۶۰ درجهٔ آشکارساز حول محور مرکزی نمونه ثبت می‌گردد. بااستفاده از این روش تصویربرداری می‌توان اطلاعاتی درمورد نحوهٔ توزیع مواد فلورسنت در نمونه به‌دست آورد. البته نتایج بازسازی در این تصویربرداری به‌دلیل میزان بالای پراکندگی نور در بافت و محیط‌های دارای توان تفکیک مکانی محدود است[۲و۳]. اما در بسیاری از کاربردهای بیولوژیکی و پزشکی لازم است چندین هدف به‌طور همزمان بررسی شوند که به‌عنوان نمونه می‌توان به مطالعهٔ ایمونولوژیکی جمعیت‌های مختلف سلول‌هایT و انتقال ژن به بافت معیوب در درمان سرطان اشاره کرد[۴و۵]. در این موارد چندین مادهٔ فلورسنت به‌طور همزمان جهت نشاندارکردن بافت و رده‌های سلولی به‌کار می‌روند و تصویربرداری به‌روش چندبینابی انجام می‌شود تا مشاهدهٔ جزئیات با جداسازی سیگنال تابشی فلوروفور مورد نظر با استفاده از فیلترهای مناسب میسر گردد[۶]. اما به‌دلیل هم‌پوشانی بیناب تابشی مواد فلورسنت، تفکیک اجزای نشان‌دارشده تنها با استفاده فیلترهای تداخلی از هم میسر نیست. روش معمول برای تفکیک فلوروفورها در میکروسکوپ فلورسانس الگوریتم unmixing خطی براساس اطلاعات طیفی است[۷و۸]. در این روش شدت ثبت‌شده در هر پیکسل به‌صورت ترکیب خطی بیناب تابشی مواد فلورسنت موجود در نمونه درنظر گرفته می‌شود سپس سهم هر مادهٔ فلورسنت با معکوس‌سازی ماتریس بینابی به‌دست می‌آید. درسال۲۰۰۹، خانم Simatiraki و همکاران از این روش unmixing خطی برای جداسازی فلوروفورها در تصویربرداری توموگرافی فلورسنت با مد عبوری استفاده کردند[۹] اما روش‌های تصویربرداری فلورسنت3D با اعمال روش unmixing بااستفاده از طیف‌های فلورسنت به نتایج صحیحی منجر نمی‌شود زیرا به‌دلیل وابستگی ضریب جذب محیط به طول موج، طیف هریک از مواد فلورسنت تضعیفی متفاوت از دیگر فلورسنت‌ها متحمل خواهد شد که این تفاوت در میزان تضعیف به طول موج تابشی فلورسنت و میزان هم‌پوشانی طیف تابشی آن ماده با طیف جذبی محیط انتشار برمی‌گردد[۹].

همچنین در تصویربرداری‌هایin vivo استفادهٔ روش جداسازی براساس اطلاعات طیفی مرجع با خطا مواجه است زیرا شکل طیفی مواد فلورسنت تحت تأثیر خصوصیات شیمیایی محیط تغییر می‌کند[۱۰]. برای رفع این مشکل در سال۲۰۱۱، زاخاراکیس و همکاران با استفاده از یک اسپکترومتر، بیناب تابشی مواد فلورسنت را همزمان با انجام تصویربرداری ثبت کردند و با استفاده از بیناب‌های تابشی ثبت‌شده از مواد فلورسنت در داخل نمونه، روش unmixing در تصویربرداری فلورسنت توموگرافی را در مد بازتابشی برای جداسازی توزیع دو فلوروفور متفاوت واقع در عمق۳ میلی‌متر به‌کار بردند[۱۱]. عدم مزیت این روش را می‌توان در نیاز به امکانات سخت‌افزاری بیشتر دانست. ازاین‌رو استفاده از روش‌های جداسازی منابع کور در تصویربرداری‌های فلورسنت مطرح می‌شود. روش‌های مختلفی برای حل مسئلهٔ unmixing مبتنی بر جداسازی منابع کور وجود دارد که در هریک از آن‌ها قیدهای خاصی برای تخمین اجزا درنظر گرفته می‌شود و به‌عنوان مثال‌هایی از این قیدها می‌توان به مستقل بودن، تعامد، تنک بودن و غیرمنفی‌بودن اشاره کرد که از میان آن‌ها غیرمنفی‌بودن از اهمیت خاصی برخوردار است زیرا داده‌های فیزیکی درصورت مثبت‌بودن دارای مفهوم هستند. روش فاکتورگیری ماتریس (NMF) یکی از روش‌های جداسازی منابع کور است که در آن قید غیرمنفی‌بودن درنظر گرفته می‌شود. روش فاکتورگیری ماتریسی (NMF) برای جداسازی سیگنال‌های فلورسنت در تصاویر میکروسکوپی فلورسانس به‌کار برده‌شده است[۱۰و۱۲]. در این زمینه در سال ۲۰۱۰، خانم Montcuquet و همکاران در تصویربرداری در مد بازتابشی برای جداسازی بیناب‌ها و حذف تابش اتوفلورسانس از الگوریتم(NMF)به‌عنوان یک روش جداسازی منابع کور استفاده کردند[۱۳]. درسال۲۰۱۳، آقای پو و همکاران از روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCA) به‌عنوان یکی از روش‌های مبتنی‌بر جداسازی منابع کور برای تفکیک دو غلظت مختلف ICG در تصاویر توموگرافی فلورسنت استفاده کردند. دراین روش ابتدا بازسازی تصاویر در طول موج‌های مختلف انجام شد سپس با اعمال PCA برروی تصاویر بازسازی‌شده توزیع مربوط به هریک از غلظت‌ها به‌صورت جداگانه به‌دست آمد[۱۴]. دراین روش به‌دلیل انجام‌شدن بازسازی در طول موج‌های مختلف حجم محاسبات بسیار بالاست. فرض اساسی در این روش تعامد و غیر همبسته بودن سیگنال‌ها می‌باشد. درحالی‌که فرض اساسی در روش(NMF)غیرمنفی‌بودن مقادیر می‌باشد که مطابقت بیشتری با شرایط واقعی دارد. مطالعات نشان می‌دهد انجام unmixing به‌روش فاکتورگیری ماتریسی غیرمنفی تاکنون در تصویربرداری برش‌نگاری فلورسنت ملکولی چندبینابی برای جداسازی توزیع فلوروفورهای مختلف به‌کار نرفته است. هدف ما در این مطالعه تفکیک توزیع ۳بعدی دو فلوروفور مختلف با اعمال روش(NMF)

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

برروی تصاویر پروجکشن چندبینابی است.

روش بررسی

این مطالعه به‌طور مجزا در دو بخش شبیه‌سازی و آزمایشگاهی اجرا گردید. در هر دو بخش، شدت فلورسنت رسیده به سطح نمونه حاوی دو مادهٔ فلورسنت مختلف در پروجکشن‌های متعدد در گستره‌های طول موجی مختلف به‌دست آمد و سپس تصاویر چندبینابی به‌دست‌آمده به‌عنوان ورودی الگوریتم مذکور قرار گرفتند.

روش شبیه‌سازی

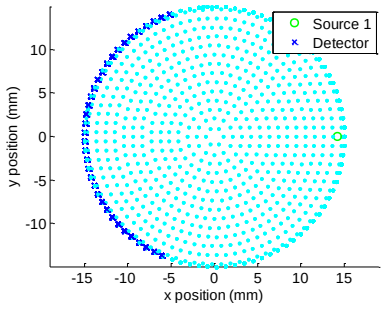
برای شبیه‌سازی تصاویر پروجکشن باید شدت رسیده به سطح محاسبه شود که انجام این محاسبه با حل مدل فوروارد محقق می‌شود. در تصویربرداری فلورسنت، مدل فوروارد شامل حل دو معادلهٔ مشتق جزیی است که یک معادله چگونگی انتشار پرتوی لیزر در طول موج تحریک λ_{exc} و معادلهٔ دیگر چگونگی انتشار پرتو از هر پروب فلورسنت در طول موج تابش λ_m را توصیف می‌نماید[۱۵].

$$\nabla\cdot D_x(r)\nabla\Phi_x(r) - \mu_{ax}(r)\,\Phi_x(r) = -Q_0(r) \quad (۱)$$

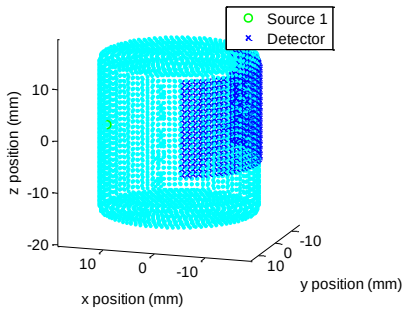
$$\nabla\cdot D_m(r)\nabla\cdot\Phi_m(r) - \mu_{am}(r)\Phi_m(r) = -\Phi_x(r)\,\eta\mu_{af}(r) \quad (۲)$$

این دو معادله از طریق $\Phi_x(r)\,\eta\mu_{af}(r)$ که تبدیل پرتوی لیزر به پرتوی فلورسنت را نشان می‌دهد، به‌هم کوپل شده‌اند. در معادلات فوق $D_{x,m}$ ضریب دیفیوژن، $\mu_{x,m}$ ضریب جذب محیط، η بازده کوانتومی، μ_{af} ضریب جذب فلورسانس و $\Phi_{x,m}$ شدت پرتوی رسیده به سطح در طول موج تحریکی و تابشی می‌باشد. در حل دو معادله شرط مرزی رابین درنظر گرفته می‌شود[۱۵].

برای انجام مدل فوروارد ابتدا فانتوم با ایجاد یک مش استوانه‌ای مدل‌سازی شد. مش مورد نظر به‌صورت استوانه‌ای و با تعیین شعاع (R) ۱۵ میلی‌متر و ارتفاع(h) ۴۰میلی‌متر و تعیین فواصل بین گره‌ها۱/۰۵میلی‌متر ایجاد شد. برای مدل‌سازی مواد فلورسنت، دو ناحیه با خصوصیات اپتیکی متفاوت از زمینه در داخل مش درنظر گرفته‌شد. این نواحی به‌صورت کره‌هایی با شعاع۲ میلی‌متر ایجاد شدند. تعیین ویژگی اپتیکی این نواحی باتوجه به دو مادهٔ فلورسنت635 alexa و 680alexa انجام شد. شبیه‌سازی تصاویر پروجکشن چندبینابی مستلزم اجرای مدل فوروارد در طول موج‌های مختلف است. ازاین‌رو تمام پارامترهای اپتیکی به‌کاررفته در معادلات باید در طول موج‌های مورد نظر به‌دست آورده‌شود. مقادیر ضرایب جذب و پراکندگی کاهش‌یافته در طول موج تحریک و طول موج‌های تابشی مورد نظر برای مدل استوانه‌ای باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده از تحقیقات سرازی و همکاران در زمینهٔ اندازه‌گیری کلینیکی ضرایب جذب و پراکندگی بافت تعیین گردید[۱۶]. مواد فلورسنت با غلظت1μM و طول موج لیزر۶۰۰ نانومتر درنظر گرفته شدند. به‌این‌ترتیب مقدار ضریب خاموشی ε فلوروفورها باتوجه به منحنی ضریب خاموشی فلوروفور و طول موج لیزر تعیین گردید. ضریب جذب فلورسانس هریک از فلوروفورها از رابطهٔ $\mu(C(r),\lambda_e)_{af} = 2.303\varepsilon(C(r),\lambda_e)\,C(r)$ به‌دست آمد. بازده کوانتومی نیز در طول موج‌های تابشی۶۷۰ نانومتر و۷۱۰ نانومتر برای هریک از فلوروفورها با توجه طیفی آن‌ها به‌دست آمد. سامانهٔ تصویربرداری به‌کاررفته در این مطالعه قابلیت چرخش حول نمونه را دارد و منبع لیزر می‌تواند نمونه را در زوایای مختلف تحت تابش قرار دهد. به‌همین‌دلیل در مدل‌سازی مکان منبع لیزر در۱۲موقعیت با فواصل زاویه‌ای۳۰ درجه درنظر گرفته‌شد. باتوجه به اینکه در سامانهٔ تصویربرداری دوربین همواره مقابل لیزر قرار گرفته‌است، آرایه‌ای از آشکارسازها در یک میدان دید۱۴۰درجه‌ای درمقابل هر منبع لیزر ایجاد شد. موقعیت نسبی لیزر و آشکارسازها در یکی از زوایا در شکل۱و۲ نشان داده شده است.



شکل۱: نمای ۲دوبُعدی از موقعیت نسبی لیزر و آشکارساز در یک پروجکشن



شکل۲: نمای ۳بُعدی از موقعیت نسبی لیزر و آشکارساز در یک پروجکشن

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

پس‌از مدل‌سازی نمونه، سامانهٔ تصویربرداری و ایجاد فایل‌های مربوطه، مدل فوروارد با حل معادلهٔ دیفیوژن توسط برنامهٔ NIRFAST به‌روش المان محدود اجرا شد و با استفادهٔ داده‌های فوروارد مربوط به هر موقعیت زاویه‌ای لیزر، تصاویر پروجکشن به‌دست آمدند.

برای بازسازی توزیع هر پروب فلورسنت به‌طور تفکیک‌شده، الگوریتم‌هایunmixing برروی تصاویر پروجکشن چندبینابی اعمال شد. این مرحله برای هر زاویهٔ پروجکشن به‌طور مستقل انجام شد. برای تبدیل تصاویر پروجکشن چندبینابی به ورودی این الگوریتم‌ها، تصویر پروجکشن به‌دست‌آمده در هر طول موج به‌صورت یک بردار ستونی $m_{\lambda i}$ درمی‌آید و در یک ستون از ماتریس M قرار می‌گیرد، این ماتریس به‌عنوان ورودی الگوریتم NMF قرار گرفت. به‌طورکلی در الگوریتمNMF ماتریس غیرمنفی M در تکرارهای به‌روزشونده به دو ماتریس غیرمنفی A و S تجزیه می‌شود:

$$M \approx AS \qquad (۳)$$

که در معادلهٔ فوق، ماتریس پایهٔ A با ابعاد $n \times r$ و S ماتریس ضرایب ترکیب با ابعاد $r \times m$ است. در آغاز الگوریتم، مقادیر رندوم برای ماتریس‌های S و A درنظر گرفته‌می‌شود. مقدار r باتوجه به تعداد فلوروفورها برابر۲ درنظر گرفته‌شد. در این الگوریتم برای تخمین دو ماتریس درنظرگرفتن یک معیار شباهت برای سنجش اختلاف بین ماتریس اولیهٔ M و ماتریس تقریبی M* که پس از انجام تجزیه از حاصل‌ضرب ماتریس A و S به‌دست می‌آید، ضروری است. پرکاربردترین معیار شباهت فاصلهٔ اقلیدسی است که برای سنجش دقت از آن استفاده شد. الگوریتمNMF براساس روش‌های مختلفی وجود دارد که در این مطالعه از دوروش استفاده شده است.

در روش Multiplicative Update ابتدا هردو ماتریس (SوA) به ورودی‌های رندوم ایجاد می‌شوند و سپس در هربار اجرای حلقهٔ تکرار الگوریتم با روابط ضرب‌شوندهٔ ارائه‌شده توسط لی و سونگ به‌روزرسانی می‌شوند[۱۷].

در روشNMF مبتنی‌بر حداقل مربعات متناوب (NMF_ALS) هر تکرار شامل دو مرحله است که در هر مرحله یک مسئلهٔ حداقل مربعات وجود دارد[۱۸].

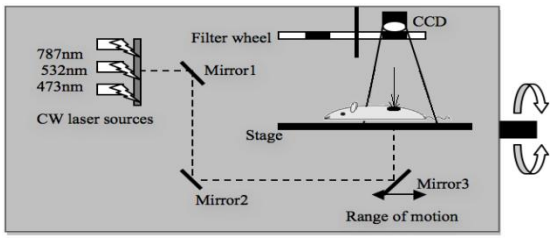
$$S \leftarrow \arg\min \|M - AS\|_F^2 \qquad S \geq 0$$

$$A \leftarrow \arg\min \|M - AS\|_F^2 \qquad A \geq 0 \qquad (۴)$$

در مرحلهٔ هر تکرار الگوریتم، مسئلهٔ حداقل مربعات برای به‌دست‌آوردن یکی از ماتریس‌ها (SیاA) با ثابت نگه‌داشتن ماتریس دیگر حل می‌شود. الگوریتم‌هایNMF مبتنی‌بر دو روش ALS و Multiplicative Update در محیط MATLAB نوشته و اجرا شدند. پس‌از اجرای الگوریتم، برای به‌دست‌آوردن توزیع ۳ بُعدی هرکدام از مواد فلورسنت، تصاویر پروجکشن unmixed مربوط به مادهٔ مورد نظر باید به‌صورت ورودی برنامه بازسازی نرم‌افزار NIRFAST تبدیل شود. برای انجام این تبدیل برنامه‌ای در محیط MATLAB نوشته‌شد. بازسازی ازطریق یک پروسهٔ تکرارشونده اجرا می‌شود که در هر تکرار درضمن تغییر ویژگی اپتیکی هر وکسل، مدل فوروارد محاسبه‌شده (Φ^c) و با داده‌های اندازه‌گیری‌شده (Φ^M) که همان داده‌های ورودی برنامه هستند، مقایسه می‌شود. بهینه‌کردن مقادیر ویژگی اپتیکی با به‌حداقل‌رساندن اختلاف بین مدل فوروارد به‌دست‌آمده و داده‌های اصلی انجام می‌شود.

روش آزمایشگاهی

در این قسمت ابتدا فانتوم معادل بافت ساخته‌شد[۱۹]. در این فانتوم دو مادهٔ فلورسنت در فاصلهٔ ۱۴میلی‌متر ازهم قرارداده‌شد و سپس در داخل نگهدارندهٔ مورد نظر قرار گرفت سپس دو لولهٔ مویین حاوی فلورسین و رداmین درفاصلهٔ ۱۴میلی‌متر ازهم در داخل فانتوم قرارداده‌شد و تصویربرداری با استفاده از فیلترهای میان‌گذر با پیک عبوری ۵۶۰ نانومتر، ۵۹۰ نانومتر و ۶۵۰ نانومتر در زوایای مختلف پروجکشن با گام‌های۳۰ درجه انجام گرفت. تصویر شماتیک سامانهٔ تصویربرداری در شکل ۳ مشاهده می‌شود.



شکل۳: تصویر شماتیکی از سیستم تصویربرداری توموگرافی فلورسنت مولکولی

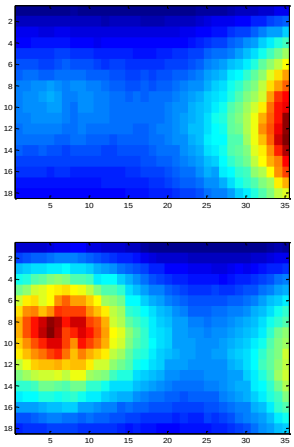
الگوریتم‌های unmixing برروی تصاویر چندبینابی اعمال شد. این مرحله برای هر زاویهٔ پروجکشن به‌طور مستقل و جداگانه انجام شد. پس‌از اجرای الگوریتم‌های جداسازی برروی تصاویر ثبت‌شده توسط دوربین CCD، تصویر مربوط به شدت هر مادهٔ فلورسنت به‌صورت جداگانه به‌دست می‌آید. برای به‌دست‌آوردن

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

توزیع ۳بعدی هرکدام از مواد فلورسنت، تصاویر پروجکشن unmixed مربوط به مادهٔ مورد نظر باید به‌صورت ورودی برنامهٔ بازسازی نرم‌افزار NIRFAST تبدیل شود. به‌این‌منظور ابتدا یک مدل استوانه‌ای مش‌بندی‌شده با همان ابعاد نمونهٔ مورد تصویربرداری ایجاد شد. ازآن‌جایی‌که CCD مجموعه‌ای از فوتودتکتورها است، موقعیت‌های مشخصی روی سطح CCD به‌عنوان مکان آشکارسازها انتخاب شدند و باتوجه به تصویر پرتوی لیزر در صفحهٔ CCD مکان لیزر در سمت مقابل روی سطح مش درنظر گرفته شد. مقادیر به‌دست‌آمده پس‌از unmixing برروی صفحهٔ آشکارساز ایجادشده تصویر گشت. این مراحل برای تمام زوایای تصویربرداری اجرا شد که برای اجرا برنامه‌ای در محیط MATLAB نوشته شد. درپایان، تصاویر جداسازی‌شده بااستفاده از برنامهٔ NIRFAST مورد بازسازی قرارگرفتند.

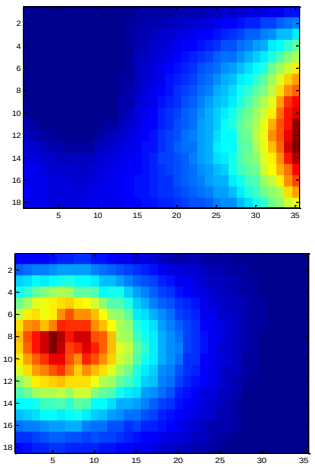
یافته‌ها

مدل فوروارد برای اندازه‌گیری شار فوتونی رسیده به سطح در طول موج‌های مورد نظر انجام شد و سپس داده‌های به‌دست‌آمده با توجه به ابعاد صفحهٔ آشکارساز تعریف‌شده روی سطح مش به تصاویر پروجکشن تبدیل شدند. در شکل۴ تصاویر پروجکشن در۲ طول موج ذکرشده در زاویهٔ صفردرجه نشان داده شده است:



شکل۴: تصاویر پروجکشن شبیه‌سازی‌شده در زاویهٔ صفردرجه در طول موج ۶۷۰ و ۷۱۰ نانومتر

تصاویر حاصل از اعمال الگوریتم جداسازی در این زاویه در شکل ۵ نشان داده شده است:



شکل۵: تصاویرunmixed حاصل از اعمال الگوریتم NMF_ALS در زاویهٔ صفردرجه

پس از شبیه‌سازی تصاویر چندبینابی، الگوریتم‌های جداسازی ذکرشده برروی آن‌ها اعمال شد. برای بررسی صحت عملکرد الگوریتم‌ها ابتدا تصاویر پروجکشن درحالتی‌که فقط یکی از منابع فلورسنت در داخل مش واقع است، شبیه‌سازی شد. به‌عنوان دادهٔ مرجع برای مقایسه با تصاویر حاصل‌از اعمال الگوریتم درنظر گرفته‌شد. به‌این‌ترتیب با دراختیارداشتن تصویر هریک از منابع فلورسنت به‌صورت جداگانه، معیاری برای انجام بررسی به‌دست آمد. بررسی عملکرد هر الگوریتم برای هر منبع فلورسنت با مقایسهٔ تصویر اصلی آن و تصاویر حاصل‌از اعمال آن الگوریتم انجام شد. برای هریک از منابع، بررسی با محاسبهٔ جذر میانگین مربع اختلاف، نسبت بیشینهٔ سیگنال به نویز و ضریب همبستگی بین تصویر اصلی و تصویر حاصل از الگوریتم جداسازی مرتبط به آن منبع (R_1,$PSNR_1$,$RMSE_1$) و مقایسه با همین پارامترها بین تصویر اصلی و تصویر غیرمرتبط حاصل‌از الگوریتم جداسازی (R_2,$PSNR_2$,$RMSE_2$) انجام شد. برای انجام ارزیابی، هر الگوریتم ۸ بار اجرا شد و به‌دلیل قابل اغماض بودن مقادیر انحراف معیار، فقط مقادیر میانگین مربوط به زاویهٔ صفردرجه در جداول زیر آورده شده است.

جدول۱: نتایج مقایسهٔ کمّی الگوریتم‌ها در جداسازی منبع فلورسنت اول در زاویهٔ صفردرجه

R_2	R_1	$PSNR_2$	$PSNR_1$	$RMSE_2$	$RMSE_1$	الگوریتم
۰/۲۵	۰/۸۷	۶۱/۶۷	۶۹/۰۹	۰/۲۱۰	۰/۰۸۹	NMF(Multiplicative)
۰/۰۵	۰/۹۸	۵۸/۵۳	۷۳/۶۰	۰/۲۹۱	۰/۰۵۳	NMF_ALS

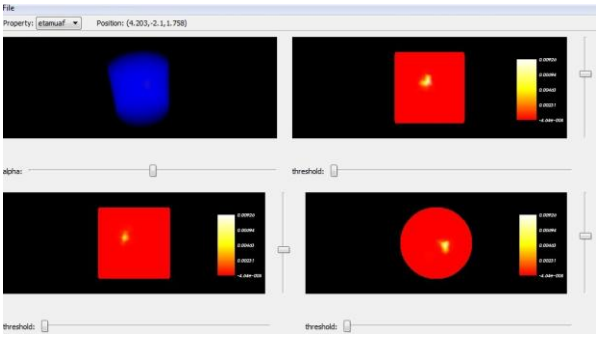
[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

در زاویهٔ صفردرجه با توجه به مقادیرR1 برای هر۲ الگوریتم تصویر منبع فلورسنت اول همبستگی بالایی با تصویر اول حاصل‌از اعمال الگوریتم‌ها وجود دارد و میزان اختلاف با تصویر اول حاصل‌از الگوریتم‌ها(باتوجه به مقادیر $PSNR_1$ و $RMSE_1$) درمقایسه با میزان اختلاف با تصویر دوم حاصل‌از الگوریتم(باتوجه به مقادیر $PSNR_2$ و $RMSE_2$) به‌طور معنی‌داری کمتر است. این مقادیر نشان می‌دهند منبع فلورسنت اول فقط در تصویر اول حاصل‌از الگوریتم وجود دارد و جداسازی انجام شده است. با مقایسهٔ این مقادیر در۲ الگوریتم عملکرد بهتر الگوریتم‌های NMF_ALS مشهود است.

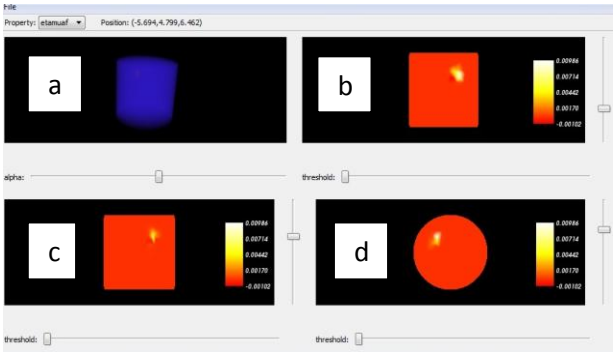
جدول۲: نتایج مقایسهٔ کمّی الگوریتم‌ها در جداسازی منبع فلورسنت دوم در زاویهٔ صفردرجه

الگوریتم	$RMSE_1$	$RMSE_2$	$PSNR_1$	$PSNR_2$	R_1	R_2
NMF(Multiplicative)	۰/۳۰۷	۰/۲۳۱	۵۸/۳۶	۶۰/۸۳	۰/۱۴	۰/۴۰
NMF_ALS	۰/۴۱۰	۰/۰۲۶	۵۵/۸۵	۷۹/۶۲	۰/۳۰	۰/۹۹

در زاویهٔ صفردرجه باتوجه به مقادیر R_2 برای هر۲ الگوریتم تصویر منبع فلورسنت دوم همبستگی بالایی با تصویر دوم حاصل‌از اعمال الگوریتم‌ها وجود دارد و میزان اختلاف با تصویر دوم حاصل از الگوریتم‌ها (باتوجه به مقادیر $PSNR_2$ و$RMSE_2$) درمقایسه با میزان اختلاف با تصویر اول حاصل‌از الگوریتم (باتوجه به مقادیر $PSNR_1$ و $RMSE_1$) کمتر است. این مقادیر نشان‌می‌دهند منبع فلورسنت دوم فقط در تصویر دوم حاصل‌از الگوریتم وجود دارد و جداسازی انجام شده است. با مقایسهٔ این مقادیر در۲ الگوریتم عملکرد بهتر الگوریتم‌هایNMF_ALS مشهود است. پس‌از انجام جداسازی براساس الگوریتم NMF_ALS برای تمام زوایای پروجکشن، برنامهٔ بازسازی نرم‌افزار NIRFAST برروی هر دودستهٔ تصاویر حاصل‌از اجرای الگوریتم (تصاویرunmixed اول و تصاویرunmixed دوم) به‌طور جداگانه اجرا شد. نتایج بازسازی در شکل۵ و۶ مشاهده می‌شود:

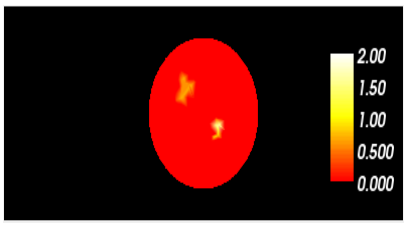


شکل۶: بازسازی تصاویرunmixed اول

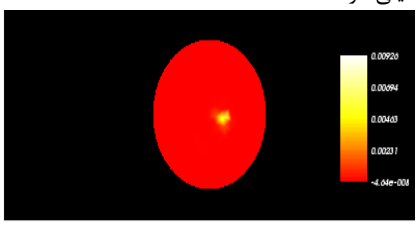


شکل۷: بازسازی تصاویر unmixedدوم، در قسمتa نتیجهٔ بازسازی به‌صورت حجمی و در قسمت‌هایb و c و d به‌ترتیب سطح مقطع‌های این حجم درراستایx وy و z مشاهده می‌شود.

مقایسهٔ مکان منابع فلورسنت در مدل استوانه‌ای و مکان آن‌ها در نتایج حاصل‌از بازسازی هریک از داده‌های unmixed در یک سطح مقطع یکسان دقت بالای روش جداسازیNMF_ALS را برای تصاویر توموگرافی فلورسنت نشان می‌دهد.

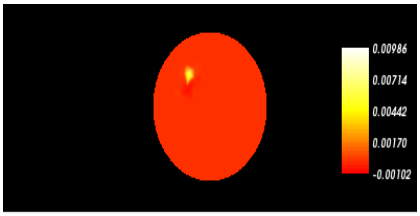


شکل۸: سطح مقطعی از مدل استوانه‌ای شامل دو منبع فلورسنت در z=۳/۸ میلی‌متر



شکل۹۱: سطح مقطع تصویر بازسازی‌شده از داده‌های unmixed اول در z=۳/۸ میلی‌متر

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]



شک۲: .سطح مقطع تصویر بازسازی‌شده از داده‌های unmixed دوم در z=۳/۸ میلی‌متر

بحث و نتیجه‌گیری

در این مقاله الگوریتم‌های unmixing مبتنی‌بر روش NMF برای جداسازی سهم نسبی دو منبع فلورسنت در تصاویر پروجکشن جهت تفکیک توزیع سه‌بُعدی آن‌ها نوشته شد. این روش علی‌رغم ارائهٔ نتایج مطلوب در جداسازی فلوروفورها در تصاویر میکروسکوپی و بازتابشی فلورسانس تاکنون درمورد تصاویر توموگرافی فلورسنت به‌کار گرفته نشده است. استفاده از روش‌های جداسازی بینابی درمورد تصاویر توموگرافی، امکان بررسی همزمان چندین هدف را مهیا می‌کند و استفاده از این روش‌ها می‌تواند مشکل توان تفکیک مکانی نامناسب در نتایج حاصل‌از بازسازی را برطرف نماید. صحت عملکرد هر دو الگوریتم NMF با آزمون همبستگی و t_test بررسی و تأیید شد. اما با مقایسهٔ دو الگوریتم تصاویر جداسازی‌شده توسط الگوریتم مبتنی‌بر حداقل مربعات متناوب (NMF_ALS) همبستگی بیشتری (بیش از ۹۶ درصد در تمام پروجکشن‌ها) با تصاویر مرجع دارند. درحالی‌که مقدار ضریب همبستگی برای الگوریتم مبتنی‌بر قوانین به‌روزرسانی ضرب‌شونده بین ۴۰ درصد تا ۸۸ درصد داشتند. همچنین باتوجه به داده‌های به‌دست‌آمده برای پارامترهای $PSNR_1$ و $PSNR_2$ و مقادیر P.value استفاده از الگوریتم مبتنی‌بر حداقل مربعات متناوب به‌طور قابل توجهی به نتایج بهتری در مقایسه با الگوریتم دیگر منجر شده است. این نتیجه می‌تواند به این علت باشد که در الگوریتم مبتنی‌بر قوانین به‌روزرسانی ضرب‌شونده اگر مقادیر تصادفی که درابتدا درنظر گرفته شدند به‌طور مناسبی انتخاب نشده باشند، تا پایان تکرارهای الگوریتم، مقادیر ماتریس‌ها در یک مسیر نادرست، که ناشی از انتخاب نادرست مقادیر اولیه است، به‌روزرسانی می‌شوند. به‌عنوان مثال اگر در ماتریس‌های آغازین عناصری با مقادیر صفر وجود داشته باشد، این عناصر تا پایان صفر باقی خواهند ماند و این قفل‌شدگی روی عناصر صفر یکی از دلایل ایجاد مشکل است. در مقایسه با این الگوریتم، الگوریتم مبتنی‌بر حداقل مربعات متناوب از انعطاف‌پذیری بالاتری برخوردار است که در آن امکان تغییر مسیر در فرآیند تکرار وجود دارد[۱۸]. از دیگر مزیت‌های روش حداقل مربعات متناوب می‌توان به سرعت بالاتر اجرای آن اشاره کرد. لازم‌به‌ذکر است روش تحلیل مؤلفه‌های اصلی(PCA) که اخیراً برای مورد به‌کار برده شده است[۱۴] را در این مطالعه نیز مورد ارزیابی قرار دادیم، اما باتوجه به اینکه در مطالعهٔ ما اعمال الگوریتم‌های جداسازی پیش از انجام بازسازی انجام می‌گرفت، این روش همانند روش‌های (NMF) برروی تصاویر پروجکشن اجرا شد و به‌طور مشابه مورد ارزیابی قرارگرفت. اما طبق نتایج به‌دست‌آمده باتوجه به مقادیر PSNR و ضریب همبستگی با تصاویر مرجع اصلی، روش (NMF_ALS) درمقایسه با روش (PCA) عملکرد بهتری داشت. به‌طوری‌که میزان ضریب همبستگی بین تصاویر unmixed با تصاویر مرجع مربوطه ۸۸ درصد و ۹۳ درصد به‌دست آمد که درمقایسه با همین پارامترها در روش (NMF_ALS) کمتر بود (۹۸ درصد و۹۹ درصد). اختلاف بین $PSNR_1$ و $PSNR_2$ در روش (PCA) نیز به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای (درحدود۱۵دسی‌بل) نسبت‌به روش (NMF_ALS) کمتر بود. ازاین‌رو می‌توان الگوریتم مبتنی‌بر حداقل مربعات متناوب (NMF_ALS) را روش مناسب‌تری برای جداسازی منابع فلورسنت در تصاویر پروجکشن دانست. نتایج حاصل از بازسازی در مقالهٔ مذکور با نتایج حاصل از بازسازی در این مطالعه به‌طور شهودی قابل مقایسه است. همچنین به‌عنوان یک مزیت این روش می‌توان به این نکته اشاره کرد که با به‌کاربردن الگوریتم جداسازی پیش از انجام بازسازی، نیازی به اجرای بازسازی تصویرکه پروسه‌ای زمان‌بر است، در طول موج‌های مختلف نمی‌باشد. نتایج بازسازی بااستفاده از داده‌های حاصل ازاین الگوریتم نشان دادند با انجام بازسازی روی تصاویر جداسازی‌شدهٔ حاصل از اعمال این الگوریتم، می‌توان موقعیت و توزیع هریک از فلوروفورها را به‌طور جداگانه به‌دست آورد.

References

1. Paulsen, K.D, Jiang H. Spatially varying optical property reconstruction using a finite element diffusion equation approximation. Medical Physics, 1995; 22: 691.
2. Li, M, Zhang Y, Bai J. In vivo diffuse optical tomography and fluorescence

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]

molecular tomography. Journal of Healthcare Engineering, 2010; 1(3): 477-507.
3. Zavattini G. A hyperspectral fluorescence system for ۳D in vivo optical imaging. Physics in medicine and biology, 2006; 51(8)): 2029.
4. Zacharakis G. Volumetric tomography of fluorescent proteins through small animals in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005; 1029510: 18252-7.
5. Germain R.N. Dynamic imaging of the immune system: progress, pitfalls and promise. Nature Reviews Immunology, 2006; 6(7): 497-507.
6. Pawley JB, Masters BR. Handbook of biological confocal microscopy. Journal of Biomedical Optics, 2008; 13(2): 9902.
7. Zimmermann T, Rietdorf J, Pepperkok R. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. FEBS letters, 2003; 546(1): 87-92.
8. Papadakis A. A novel spectral microscope system: application in quantitative pathology. Biomedical Engineering, IEEE Transactionson, 2003; 50(2): 207-17.
9. Simantiraki M. Multispectral unmixing of fluorescence molecular tomography data. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2009; 2(4): 353-64.
10. Neher RA. Blind source separation techniquesfor the decomposition of multiply labeled fluorescence images. Biophysical journal, 2009; 96(90: 3791-800.
11. Zacharakis, G. Spectroscopic detection improves multi-color quantification in fluorescence tomography. Biomedical optics express, 2011; 2(3): 431-9.
12. Munoz-Barrutia A. Blind spectral unmixing of M-FISH images by non-negative matrix factorization. in Engineering in Medicine and Biology Society, 2007. EMBS 2007. 29th Annual International Conference of the IEEE. 2007. IEEE.
13. Montcuquet AS. Nonnegative matrix factorization: a blind spectra separation method for in vivo fluorescent optical imaging. Journal of biomedical optics, 2010; 15(5): 056009.
14. Pu H. Separating structures of different fluorophore concentrations by principal component analysis on multispectral excitation-resolved fluorescence tomography images. Biomedical optics express, 2013; 4(10): 1829-45.
15. Davis SC. Image-guided diffuse optical fluorescence tomography implemented with Laplacian-type regularization. Opt. Express, 2007; 15(7): 4066-82.
16. Cerussi AE. Sources of absorption and scattering contrast for near-infrared optical mammography. Academic radiology, 2001; 8(3): 211-8.
17. Seung D, Lee L. Algorithms for non-negative matrix factorization. Advances in neural information processing systems, 2001; 13: 556-62.
18. Berry MW. Algorithms and applications for approximate nonnegative matrix factorization.Computational Statistics & Data Analysis, 2007; 52(1): 155-73.
19. Hejazi M. Improving th e accuracy of a solid spherical source.2010.

[Downloaded from icml.ir on 2026-11-03]