

Исследования люминесценции и структуры тканей глаза при механических нагрузках

Бубнова И.А.

д.м.н., ведущий научный сотрудник¹

Семчишен В. А.

к.ф-м.н., ведущий научный сотрудник²

Свиридов А. П.

д.ф-м.н., ведущий научный сотрудник²

Хайдуков Е. В.

к.ф-м.н., старший научный сотрудник²

Новиков И. А.

старший научный сотрудник¹

Петров С. Ю.

к.м.н., ведущий научный сотрудник¹

Пахомова Н. А.

аспирант¹

Волжанин А. В.

ординатор¹

¹ФГБНУ «НИИ глазных болезней», 119021, Российская Федерация, Москва, Россолимо ул., 11 А,Б

²Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, 142190, г. Троицк, г. Москва, ул. Пионерская 2.

Прозрачность финансовой деятельности: Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-29-03843.

Ответственный автор – Петров Сергей Юрьевич, E-mail: glaucomatosis@gmail.com

Аннотация

Цель. Исследовать спектральные состояния поляризации люминесценции фиброзных оболочек глаза *ex vivo* при возбуждении линейно поляризованным светом как функции внутриглазного давления. Исследовать изменения структуры коллагенового матрикса роговицы и склеры глаза при механических нагрузках с помощью конфокального микроскопа и генерации второй гармоники. Оценить корреляции механических и структурных изменений тканей с поляризацией люминесценции.

Методы. В экспериментах были использованы глаза кроликов. Глазное яблоко фиксировалось в специальном держателе, снабженном системой установки и поддержания интраокулярного давления. Спектры фотолюминесценции глаз регистрировались с помощью спектрофотометра Flurolog-3 фирмы Jobin-Yvon при возбуждении линейно поляризованным излучением He-Cd лазера с длиной волны 325 нм. На входе в спектрофотометр устанавливалась призма Глана. Для исследований коллагенового матрикса роговицы глаза использовали лазерный сканирующий микроскоп LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Германия). Для анализа оптических изображений был применен одномерный Вейвлет-анализ – математический аппарат, применяющийся для обработки сигналов различной природы и структур.

Результаты. Люминесценция роговицы глаза, возбуждаемая на глазном яблоке линейно поляризованным излучением, является частично поляризованной, причем интегральная интенсивность спектра люминесценции зависит от интраокулярного давления. Степень поляризации люминесценции является спектрально зависимой, она может иметь линейный или параболический вид с минимумом вблизи максимума спектра люминесценции. Вид спектра степени поляризации зависит от положения

возбуждающего луча на роговице глаза, что может быть связано с паразитной люминесценцией других тканей глаза, таких как радужка, стекловидное тело, хрусталик. Спектр степени поляризации чувствителен к интраокулярному давлению. Сколько-нибудь значительного изменения структуры коллагенового матрикса роговицы глаза при изменении интраокулярного давления с помощью визуального исследования лазерной сканирующей микроскопией выявить не удалось. Одномерный Вейвлет-анализ для анализа оптических изображений позволяет выявить спектры неоднородностей оптических структур с повышением интраокулярного давления до 23, 45 и 76 мм рт.ст.

Заключение. Люминесценция роговицы глаза, возбуждаемая на глазном яблоке линейно поляризованным излучением, является частично поляризованной, причем интегральная интенсивность спектра люминесценции зависит от интраокулярного давления. С помощью лазерной сканирующей микроскопии значимых изменений структуры коллагенового матрикса роговицы глаза при изменении интраокулярного давления выявить не удалось. Одномерный вейвлет-анализ для анализа оптических изображений позволяет выявить спектры неоднородностей оптических структур с повышением интраокулярного давления до 23, 45 и 76 мм рт.ст.

Ключевые слова: роговица, склера, фиброзная оболочка глаза, люминесценция, поляризация, фотоупругость, коллаген, лазерная сканирующая микроскопия, вейвлет-анализ.

Фиброзная оболочка глаза, состоящая из склеры и роговицы, выполняет свои биологические функции благодаря специфической организации волокон коллагена, эластина и протеогликанов, определяющей механические и оптические свойства этих тканей. Исследования взаимосвязи механических напряжений в склере и роговице глаза с их оптическими параметрами представляют значительный фундаментальный и практический интерес для офтальмологии [1,3,4]. Они направлены, прежде всего, на разработку новых подходов к бесконтактной диагностике состояния глаза оптическими методами [2,6]. Так, распределение интенсивности, состояние поляризации отраженного зондирующего света или спектры фотолюминесценции, индуцируемые в локальных областях тканей глаза, можно экспериментально измерить как функцию внутриглазного давления. Если обратная функция стабильна от образца к образцу, то измеряемые значения перечисленных оптических параметров должны с определенностью указывать на значение внутриглазного давления. Например, известно, что роговица человеческого глаза обладает двулучепреломлением и, соответственно, свойством фотоупругости – изменением параметров, характеризующих двулучепреломление, при механической нагрузке [10,11, 14]. В линейно упругих материалах, к которым можно отнести и роговицу глаза, оптические эффекты однозначно связаны с механическими напряжениями и с вызванными ими деформациями [7]. К возможным измеряемым параметрам можно отнести пространственное распределение интенсивности излучения второй гармоники фемтосекундного лазера, генерируемой пучками коллагеновых волокон биотканей [12]. Это позволяет визуализировать внутреннюю микроструктуру коллагенсодержащих тканей, в частности, тканей глаза [13]. В работе Аветисова С.Э (2013) показано, что фотолюминесценция роговицы глаза, возбуждаемая поляризованным излучением ртутной лампы, является частично поляризованной, причем степень поляризации зависит от механических напряжений в роговице [9]. Настоящая работа направлена на исследование спектров возбуждения и спектров фотолюминесценции роговицы и склеры глаза поляризованным излучением и выявление оптимальных условий, при которых возможен контроль внутриглазного давления оптическими методами.

Ранее в ходе наших исследований [8] были получены новые данные о спектрах люминесценции и спектрах возбуждения тканей глаза, необходимые для проведения исследований и разработок аппаратуры в области бесконтактной неинвазивной диагностики структурных нарушений тканей глаза. В частности, показано, что доля линейно поляризованного света в фотолюминесценции тканей глаза при возбуждении линейно поляризованным светом на длине волны 450 нм находится в пределах 20-30%.

В данной работе были поставлены следующие цели:

1. Исследовать спектральные состояния поляризации люминесценции фиброзных оболочек глаза *ex vivo* при возбуждении линейно поляризованным светом как функции внутриглазного давления.
2. Исследовать изменения структуры коллагенового матрикса роговицы и склеры глаза при механических нагрузках с помощью конфокального микроскопа и генерации второй гармоники.
3. Оценить корреляции механических и структурных изменений тканей с поляризацией люминесценции.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы глаза кроликов. Свежие глазные яблоки кролика были изъяты и использовались в пределах 10 часов после энуклеации. Глаза транспортировались в холодильнике при температуре не выше 4°C. Перед проведением измерений глаза выдерживались при комнатной температуре для нагрева до 18-20°C. Глазное яблоко фиксировалось в специальном держателе, снабженном системой установки и поддержания интраокулярного давления. Фотография устройства приводится на Рисунке 1. Роговица вместе с глазным яблоком прижималась давлением посредством мембраны, расположенной на дне устройства, к шайбе (диафрагме) с круглым или овальным отверстием. Устройство позволяло контролировать и поддерживать требуемое давление под мембраной во время облучения и проведения измерений. Давление можно было создавать с помощью ручного насоса, нагнетающего воздух под мембрану, или с помощью столба воды заданной высоты, которая заполняла пространство под мембраной. В последнем случае держатель глаза соединялся гибким силиконовым шлангом (внутренний диаметр 3 мм) с сосудом, содержащим воду. Сосуд крепился с помощью штатива на заданной высоте. Применение столба воды давало более стабильные значения интраокулярного давления, по сравнению с использованием воздушного насоса. Поэтому в этой работе мы использовали столб воды. Для справки: столб воды высотой 100 см создает давление, эквивалентное давлению ртутного столба высотой 7,6 см или 76 мм. Внутриглазное давление традиционно измеряется в мм рт.ст. В

данной работе внутриглазное давление варьировали в пределах от 10 до 60 мм рт.ст. Точность установки давления составляла примерно ± 1 мм рт.ст., что в основном связано с размерами глазного яблока.

Рис. 1. Держатель глаза кролика с устройством для контроля интраокулярного давления.

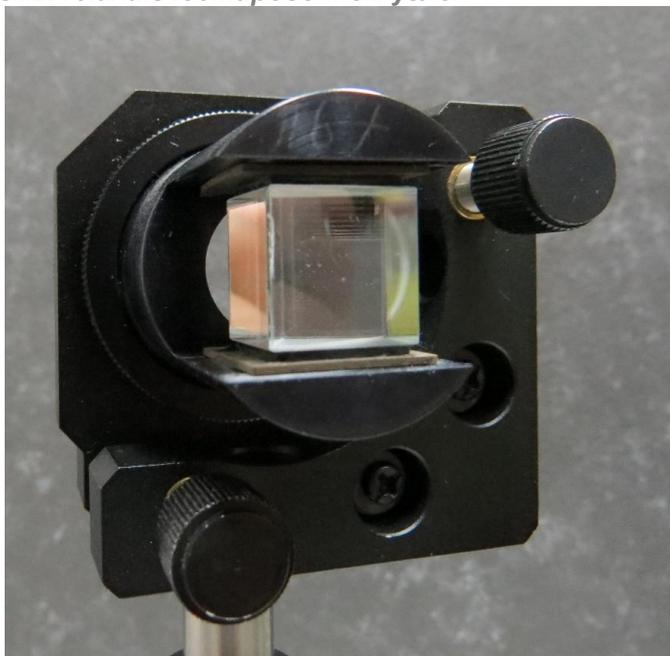


Спектры фотолюминесценции глаз регистрировались с помощью спектрофотометра Flurolog-3 фирмы Jobin-Yvon при возбуждении линейно поляризованным излучением He-Cd лазера с длиной волны 325 нм. На входе в спектрофотометр устанавливалась призма Глана, которая в широком диапазоне длин волн является поляризационным фильтром, то есть, она пропускает лишь свет, вектор электрического поля которого коллинеарен оптической оси фильтра. В нашем случае вектор электрического поля лазерного излучения был параллелен горизонтальной плоскости.

Степень дискриминации видимого неполяризованного света двумя ортогонально ориентированными поляризационными призмами Глана составляла не менее 103. Лазер излучал непрерывно с мощностью около 10 мВт. Оптическая ось призмы Глана ориентировалась либо параллельно (ко-ориентация) либо перпендикулярно (кросс-ориентация) вектору поляризации излучения лазера He-Cd лазера. В последнем случае происходила полное затемнение луча при визуальном наблюдении. Излучение лазера направлялось на роговицу глаза тремя разными способами. В первом случае, свет лазера лишь касался вершины роговицы, имеющей сфероидную форму. Во втором случае он попадал в середину роговицы, вследствие чего часть света лазера могла преломиться внутрь глазного яблока и вызвать свечение находящихся там тканей. В третьем случае

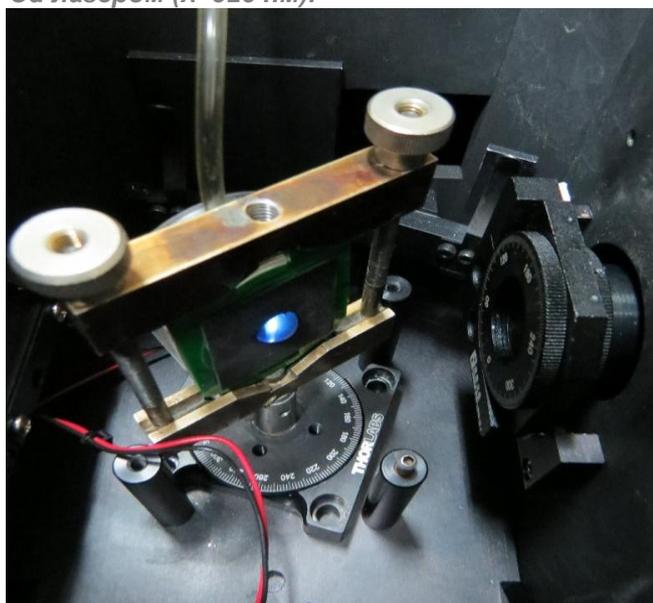
излучение лазера попадало на периферийную область роговицы глаза, а преломленная компонента поглощалась радужкой.

Рис. 2. Общий вид призмы Глана в юстировочном узле.



На Рисунке 3 приведен вид измерительного отсека спектрометра с держателем глаза при освещении образца излучением He-Cd лазера. В приведенном на рисунке случае голубое свечение образца связано с фотолюминесценцией тканей глаза, расположенных внутри глазного яблока, таких как стекловидное тело, хрусталик. В ходе эксперимента роговица глаза периодически смачивалась. В то же время контрольный эксперимент показал, что спектр фактически не зависит от смачивания.

Рис. 3. Вид измерительного отсека спектрофотометра с держателем глаза кролика при освещении образца He-Cd лазером ($\lambda=325$ нм).

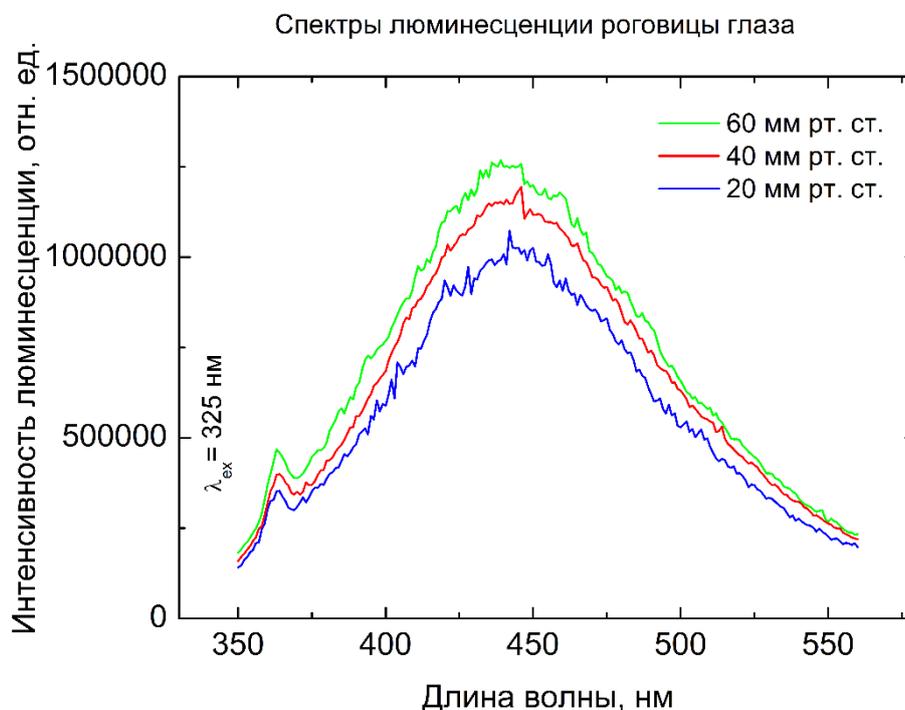


Результаты и обсуждение

Спектральные исследования состояний поляризации люминесценции

На Рисунке 4 изображены спектры фотолюминесценции глаза кролика *in vitro* при возбуждении линейно поляризованным светом на длине волны 325 нм, измеренные через поляризационный фильтр при параллельной (ко-) ориентации оптической оси фильтра по отношению к вектору поляризации возбуждающего света. Интраокулярное давление варьировалось от 60 мм рт.ст. до 20 мм рт.ст. Видно, что интегральная интенсивность спектра монотонно падает при уменьшении интраокулярного давления. Влияние интраокулярного давления на интенсивность спектра в данном случае мы связываем с изменением двулучепреломления роговицы глаза и изменением состояния поляризации люминесцентного света. В данной работе мы ограничиваемся лишь констатацией этого факта, детальное исследование механизма требует привлечения значительных ресурсов и выходит за ее рамки.

Рис. 4. Спектры люминесценции роговицы глаза кролика, индуцируемые линейно поляризованным излучением на длине волны 325 нм, измеренные через поляризационный фильтр при параллельной ориентации по отношению к вектору поляризации возбуждающего излучения, как функция интраокулярного давления.



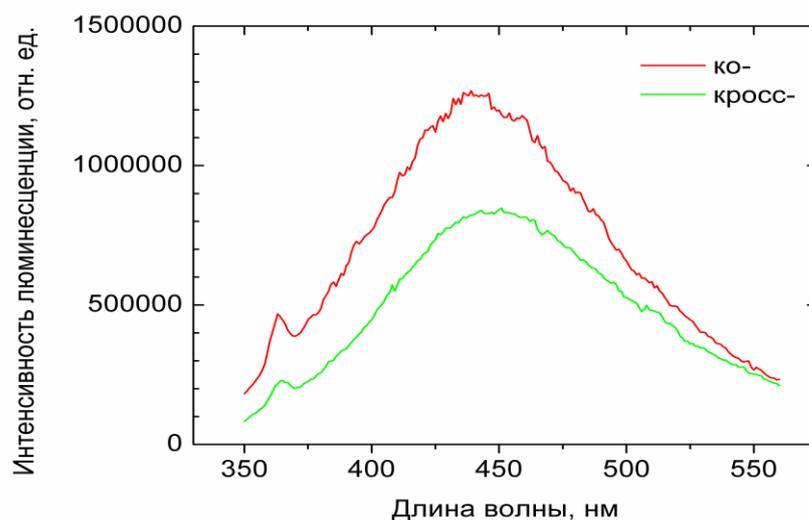
На Рисунке 5 изображены спектры фотолюминесценции глаза *in vitro* при возбуждении линейно поляризованным светом на длине волны 325 нм, измеренные через поляризационный фильтр при параллельной (ко-) и перпендикулярной (кросс-) ориентациях оптической оси фильтра по отношению к вектору поляризации возбуждающего света.

Интраокулярное давление в данном случае составляло 60 мм рт.ст. Из Рисунка 5 видно, что фотолюминесценция роговицы глаза является отчетливо поляризованной. При возбуждении на длине волны 325 нм максимум люминесцентного сигнала находится вблизи 450 нм. Аналогичные измерения были проведены и для других интраокулярных давлений. Из ко- и кросс-поляризованных спектров этих измерений были построены зависимости выражения:

$$D = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad (1),$$

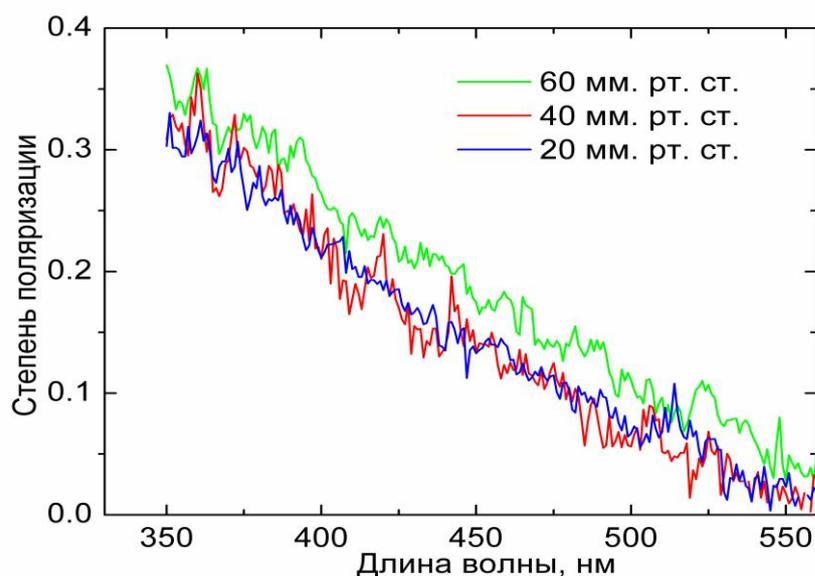
где I_{\parallel} и I_{\perp} интенсивности фотолюминесценции для параллельной и перпендикулярной ориентации оптической оси поляризационного фильтра по отношению к вектору поляризации возбуждающего фильтра. Это выражение во многих литературных источниках называют степенью поляризации, хотя, строго говоря, в нем пренебрегается циркулярно-поляризованной компонентой. У нас нет оснований ожидать возникновения сколько-нибудь значительной интенсивности света с циркулярной поляризацией при фотолюминесценции роговицы глаза или при двулучепреломлении в ней света. Однако, в принципе, такой вопрос может возникнуть, как эффект второго порядка. Тем не менее, в дальнейшем величину D мы будем называть «степенью поляризации».

*Рис. 5. Спектры фотолюминесценции роговицы глаза кролика *in vitro* при возбуждении линейно поляризованным светом на длине волны 325 нм, измеренные через поляризационный фильтр при параллельной (ко-) и перпендикулярной (кросс-) ориентациях оптической оси фильтра по отношению к вектору поляризации возбуждающего света. Интраокулярное давление 60 мм рт.ст.*



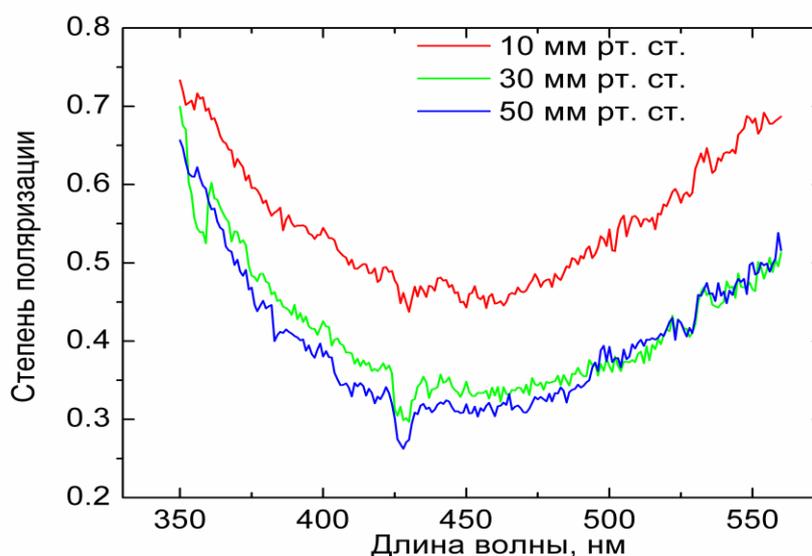
На Рисунке 6 приведены спектры степени поляризации фотолюминесценции роговицы глаза при возбуждении лазерным лучом He-Cd лазера, когда луч касается вершины роговицы. В этом случае степень поляризации фактически линейно уменьшается с ростом длины волны от примерно 0,35 фактически до 0. При этом для всех давлений наклон зависимости от длины волны примерно один и тот же.

Рис. 6. Степень поляризации фотолюминесценции роговицы глаза кролика при возбуждении поляризованным светом на длине волны 325 нм для различных значений интраокулярного давления (указаны на графике). Лазерный луч направлен на вершину роговицы по касательной.



Существенно другой вид спектр степени поляризации имеет, когда лазерный луч нацелен на середину роговицы или на его периферию и частично проникает вглубь глазного яблока. На Рисунке 7 представлены спектры степени поляризации люминесценции роговицы глаза для различных интраокулярных давлений, когда возбуждающий лазерный луч направлен на периферическую часть роговицы. При этом он частично экранируется радужкой глаза. В данном случае зависимость степени поляризации от длины волны имеет вид положительной параболы. Изменения степени поляризации происходят в пределах примерно от 0,8 до 0,3 и зависят от интраокулярного давления. В данном случае значительный рост степени поляризации произошел при переходе от давления 30 мм рт. ст. до давления 10 мм рт.ст.

Рис. 7. Степень поляризации фотолюминесценции роговицы глаза кролика при возбуждении поляризованным светом на длине волны 325 нм для различных значений интраокулярного давления (указаны на графике). Лазерный луч направлен на периферию роговицы глаза и частично попадает на радужку.



Таким образом, проведенные исследования показали, что люминесценция роговицы глаза, возбуждаемая на глазном яблоке линейно поляризованным излучением, является частично поляризованной, причем интегральная интенсивность спектра люминесценции зависит от интраокулярного давления. Степень поляризации люминесценции является спектрально зависимой, она может иметь линейный или параболический вид с минимумом вблизи максимума спектра люминесценции. Вид спектра степени поляризации зависит от положения возбуждающего луча на роговице глаза, что может быть связано с паразитной люминесценцией других тканей глаза, таких как радужка, стекловидное тело, хрусталик. Спектр степени поляризации чувствителен к интраокулярному давлению. В дальнейшем необходимо разработать мобильную оптическую схему, способную локализовать область возбуждения и сбора излучения люминесценции роговицы глаза, с тем, чтобы избавиться от паразитной люминесценции других близлежащих тканей.

Исследование с помощью конфокального микроскопа и генерации второй гармоники

Для исследований коллагенового матрикса роговицы глаза использовали лазерный сканирующий микроскоп LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Германия). Общий вид прибора и образца показан на Рисунке 8. Эксперименты проводили на роговицах глаза кролика *in vitro* без выделения от глазного яблока. Глазное яблоко подготавливали по описанной в

предыдущем разделе схеме. Интраокулярное давление создавали с помощью столба физиологического раствора (0,9% NaCl), высота которого доходила до 100 см.

Рис. 8. Лазерный сканирующий микроскоп LSM-710-NLO и образец глаза кролика с иглой в зрительном нерве, помещенный в специальную кювету.



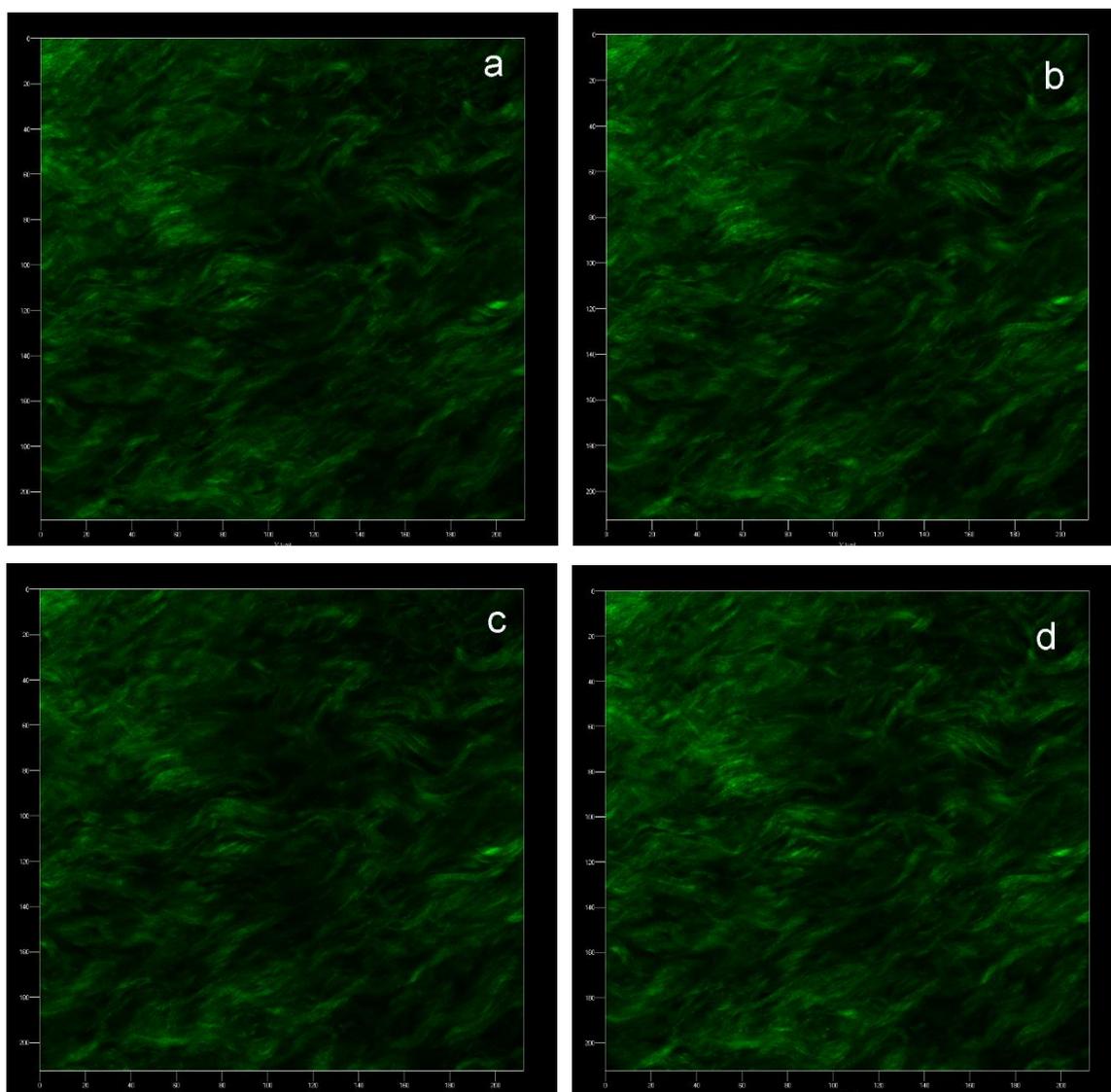
При этом использовали стандартную капельницу, иглу которой заменяли инъекционной иглой с уменьшенным диаметром. Эту иглу через зрительный нерв вводили внутрь глазного яблока. Роговицу глаза прижимали к крышке специальной кюветы, имеющей прозрачное окно из стекла толщиной 170 мкм. Это позволяло фиксировать положение исследуемой области роговицы, что важно при длительных микроскопических исследованиях. Микроскоп LSM-710-NLO снабжен конфокальной оптической и сканирующей механической системами. Оптическая система локализует область, в которой происходит возбуждение фотолюминесценции до микронных размеров, зависящих от увеличения и числовой апертуры объектива микроскопа, а сканирующая механическая система автоматически перемещает образец. С помощью специальной программы строят трехмерные изображения интенсивности люминесценции, отражающие структурные особенности биологических тканей.

Излучение фемтосекундного лазера с длиной волны 780 нм фокусировалось в определенной точке образца биоткани. При этом лишь коллагеновые волокна биоткани способны генерировать излучение удвоенной частоты (вторая гармоника). Кроме излучения второй гармоники возможна люминесценция, связанная с поглощением

одновременно нескольких квантов света. Эти типы излучений хорошо различаются прибором и в принципе они дополняют друг друга.

На Рисунке 9 приведены полученные нами двумерные изображения выбранной области роговицы глаза кролика для различных интраокулярных давлений: 10, 23, 45, 76 мм рт.ст. Стабильность приведенной картины контролировалась в течение 20 минут при давлении 76 мм рт.ст. (рисунки не приводятся). Эти и другие исследования показали, что сколь угодно значительного изменения структуры коллагенового матрикса роговицы глаза при изменении интраокулярного давления визуально определить с помощью данного метода невозможно.

Рис. 9. Микроскопические изображения интенсивности генерации второй гармоники (390 нм) коллагеновыми волокнами роговицы глаза, отличающиеся интраокулярным давлением: соответственно для рисунков a, b, c, d - 10, 23, 45, 76 мм рт. ст. Размер рассматриваемой области 210×210 мкм.



В общей сложности мы изучали структуры коллагенового матрикса на 4 глазных яблоках кроликов и провели всяких раз соответствующие исследования для 4÷5 различных интраокулярных давлений. Для более тщательного анализа изменений мы провели математический анализ полученных изображений. Использовали два подхода: Вейвлет-анализ и Фурье-анализ.

Анализ изображений коллагенового матрикса роговицы глаза

Вейвлет-анализ. Для анализа оптических изображений был применен одномерный вейвлет-анализ – математический аппарат, получивший широкое развитие в конце 20 века и с успехом применяющийся для обработки сигналов различной природы и структур. Вейвлет-преобразование состоит в разложении исследуемой функции в ряд по базису, сконструированному посредством масштабных изменений и переносов вдоль оси времени t одного базового вейвлета $\psi(t)$:

$$W = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \cdot \psi_{ab}^*(t) dt, \quad (2)$$

где $\psi_{ab}(t) = |a|^{-1/2} \psi\left(\frac{t-b}{a}\right)$,

a – масштабный коэффициент,

b – параметр сдвига,

* – комплексное сопряжение.

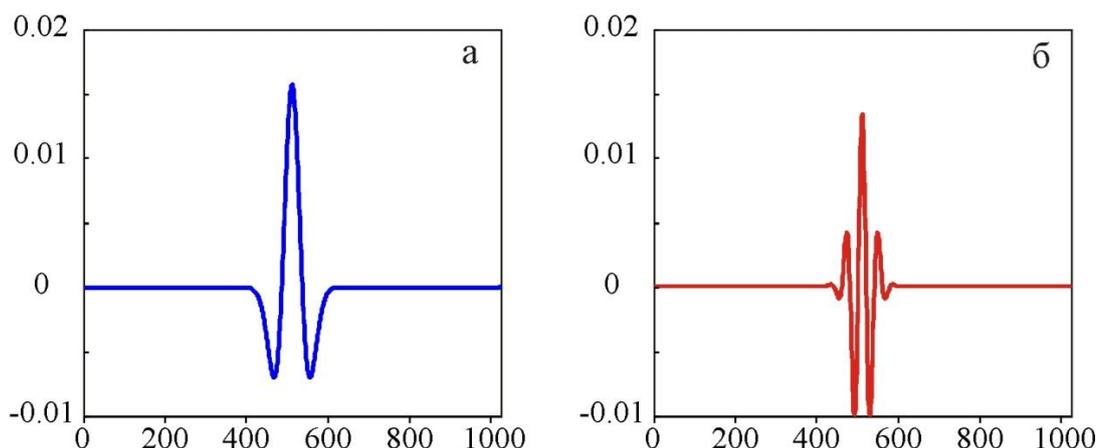
В качестве базовых вейвлетов могут использоваться любые функции, удовлетворяющие всего двум условиям: среднее значение по всему интервалу t равно нулю и сама функция должна быстро убывать вне небольшого интервала Δt .

В результате такого разложения вместо одномерного первоначального ряда получается двумерный массив, который содержит комбинированную информацию об анализирующем вейвлете и анализируемом процессе. Чрезвычайно полезным для анализа является представление полученного массива в виде вейвлетограммы – двумерного изображения вейвлет-преобразования (ИВП). При этом одна ось a характеризует частотные особенности сигнала, вторая ось b – временные, а цвет или интенсивность каждой точки ИВП a_0, b_0 показывает амплитуду свертки $f(t)$ со сдвинутым на b_0 и растянутым в a_0 раз базовым вейвлетом $\psi(t)$. Поскольку Фурье-преобразование вейвлета масштаба a_0 сконцентрировано вокруг определенной частоты ω_0 , а свертка функций по известной теореме о свертке эквивалентна их перемножению в частотной области, уровень $a_0 = const$ покажет эволюцию во времени частотных компонент исходного ряда близких к ω_0 . При перемасштабировании площадь анализирующей ячейки на частотно-временной плоскости остается постоянной, а форма прямоугольника меняется

оптимальным образом. Благодаря этому вейвлеты хорошо локализируют низкочастотные особенности процесса в частотной области, а высокочастотные – во времени.

С физической точки зрения вейвлет-преобразование (2) подобно пропусканию исходного временного ряда через систему полосовых фильтров, имеющих одинаковое отношение полосы пропускаемых частот к центральной частоте, то есть одинаковую добротность.

Рис. 10. МНАТ-вейвлет (а), Morlet-вейвлет (б).



Для построения вейвлетограмм использовался широко применяемый МНАТ-вейвлет (Mexican HAT) или «сомбреро» – вторая производная функции Гаусса (Рисунок 10):

$$\psi = (t^2 - 1) \cdot \exp\left(-\frac{t^2}{2}\right). \quad (3)$$

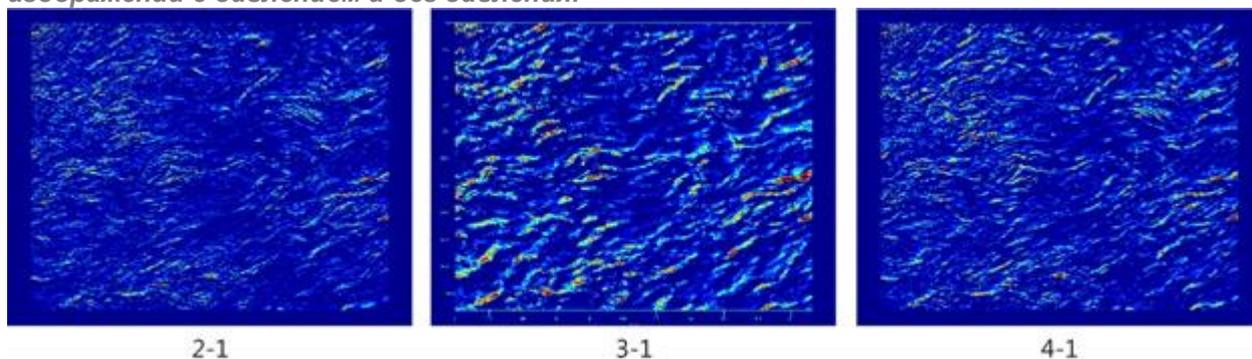
МНАТ-вейвлет имеет узкий энергетический спектр и два равных нулю момента (нулевой и первый). Этот вейвлет хорошо приспособлен для анализа сложных сигналов и структур.

Результатом вейвлет-преобразования одномерного ряда $f(t)$ является двумерный массив амплитуд вейвлет-преобразования – значений коэффициентов $W(a,b)$. Распределение этих значений в пространстве (a,b) дает информацию об эволюции относительного вклада компонент разного масштаба во времени. Например, результатом одномерного непрерывного вейвлет-преобразования пакета Wavelab.800 является матрица размером $m \times N(\log_2 m - 5)$, где m – число отчетов в исходном ряду, N – так называемое «число голосов». Каждая строка полученной матрицы описывает изменение во времени компоненты исходного ряда со своим периодом T , который зависит от характеристик применяемого вейвлета и его параметров. Для вейвлета МНАТ: $T = \pi T_0 2^{-A/N-1,5}$ и для вейвлета Морле: $T = (\pi T_0 / k_0) 2^{-A/N-1}$, где T_0 – длина исходного ряда.

Для анализа периодичности структур удобно использовать обобщенный спектр, который получается путем усреднения вейвлетограмм по оси расстояний (времен). Такая кривая подобно обычному спектру показывает наличие наиболее характерных периодов.

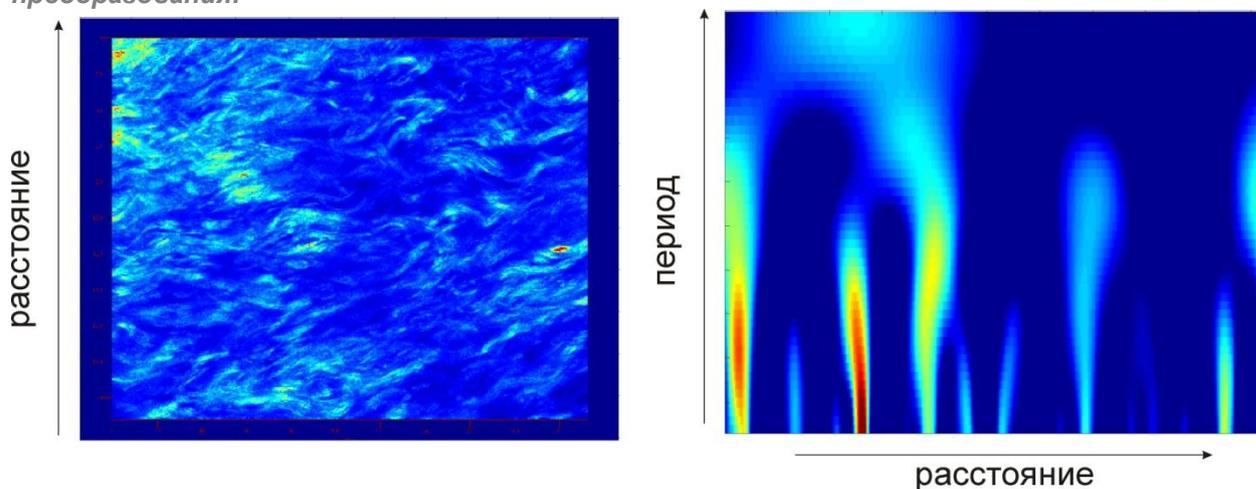
Результаты вейвлет-анализа. На Рисунке 11 показана трансформация изображений интенсивности второй гармоники при повышении давления. Для выявления особенностей изменения оптической плотности производилось вычитание из интенсивностей пикселей с давлением, нормированных на суммарную интенсивность, нормированных интенсивностей соответствующих пикселей при минимальном давлении. (10 мм рт.ст.). Анализ проводили для всех изображений, показанных на Рисунке 9, а также для двух изображений, соответствующих давлению 76 мм рт. ст. при удержании образца в течение 10 и 20 минут. Изображения пронумерованы от 1 до 4 в порядке возрастания интраокулярного давления, к ним еще добавлены номера 5 и 6, соответствующие 10 и 20 минутам удержания. Видно, что максимальное изменение произошло при вычитании изображения 1 из изображения 3, которое соответствует давлению 45 мм рт.ст. Дальнейшее повышение давления привело к некоторой нивелировке эффекта.

Рис. 11. Трансформация изменений изображений генерации второй гармоники при повышении давления. Каждая картинка получена путем вычета нормированных изображений с давлением и без давления.



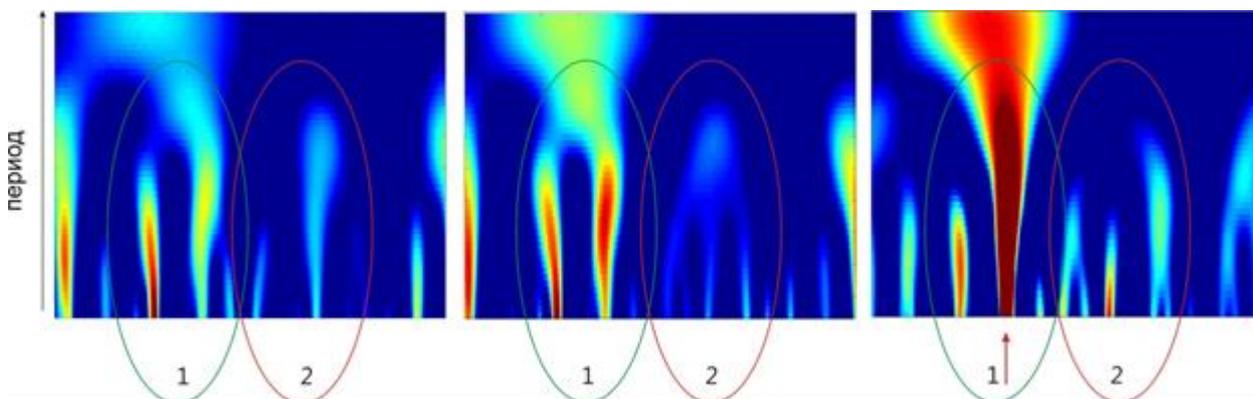
На Рисунке 12 показано изображение генерации второй гармоники и соответствующая ему вейвлетограмма. Видно, что левая часть вейвлетограммы имеет «древовидный» вид, характерный для связанных структур различных масштабов, а правая – «травовидный».

Рис. 12. Изображение роговицы давления и результат одномерного вейвлет-преобразования.



На Рисунке 13 показана трансформация вейвлетограмм при переходе 1→5→6, где эллипсами отмечены наиболее характерные области. Видно, что при переходе 1→5 структуры, отмеченные эллипсом 1 сохраняют «древовидность», в то время, как при переходе 5→6 в этом месте наблюдается переход структур «древовидная» → «травовидная». В это же время структуры, отмеченные эллипсом 2, во время этих переходов испытывают совершенно другое изменение. При переходе 1→5 структуры, отмеченные эллипсом 2 из «травовидной» переходят в «древовидную», а при переходе 5→6 «древовидная» структура распадается.

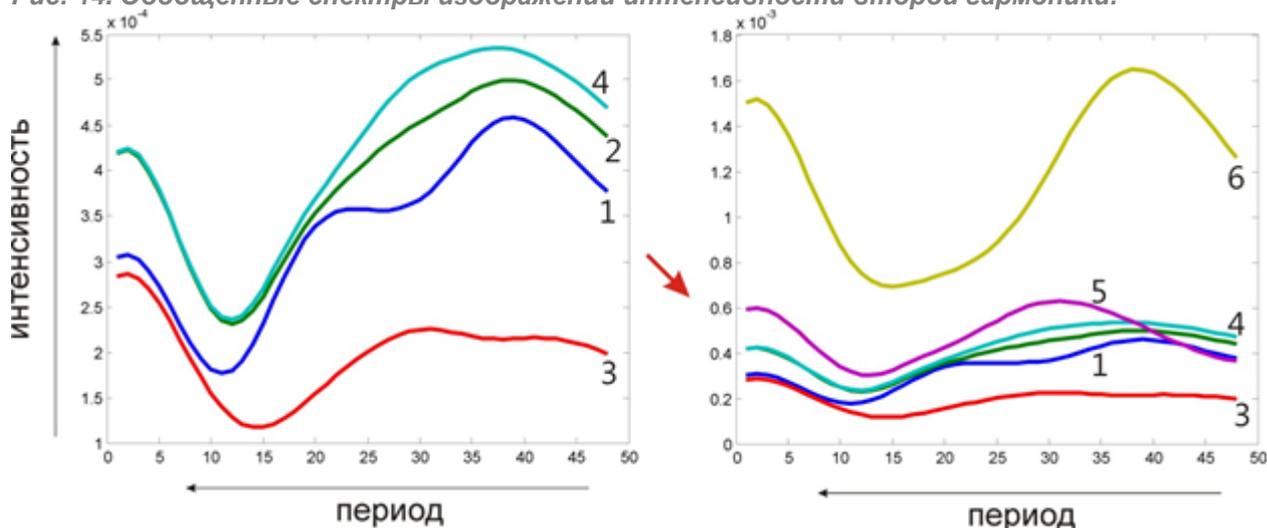
Рис. 13. Трансформация вейвлетограмм 1 →5→6. Эллипсами отмечены характерные области.



На Рисунке 14. представлены обобщенные спектры неоднородностей оптических структур, полученные путем усреднения соответствующих вейвлетограмм. Видно, что на исходном изображении (кривая 1) наблюдается два локальных максимума в области малых и средних периодов. С повышением интраокулярного давления до 23 мм рт.ст. (кривая 2) эти максимумы сливаются в один, который расположен в области малых периодов. При дальнейшем повышении давления до 45 мм рт.ст. (кривая 3) интенсивность неоднородностей в области малых и средних периодов резко снижается. При повышении давления до 76 мм рт.ст. (кривая 4) интенсивность неоднородностей увеличивается, превышая значения для других кривых.

Из Рисунка 14б видно, что при переходе 1→5 начинают выделяться максимумы в области средних и больших периодов. При переходе 5→6 интенсивность неоднородностей значительно возрастает во всем исследуемом диапазоне. Здесь отчетливо выделяются два локальных максимума в области малых и больших периодов.

Рис. 14. Обобщенные спектры изображений интенсивности второй гармоники.



Заключение

Люминесценция роговицы глаза, возбуждаемая на глазном яблоке линейно поляризованным излучением, является частично поляризованной, причем интегральная интенсивность спектра люминесценции зависит от интраокулярного давления. С помощью лазерной сканирующей микроскопии значимых изменений структуры коллагенового матрикса роговицы глаза при изменении интраокулярного давления выявить не удалось. Одномерный вейвлет-анализ для анализа оптических изображений позволяет выявить спектры неоднородностей оптических структур с повышением интраокулярного давления до 23, 45 и 76 мм рт.ст.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку работы (грант 15-29-03843).

Литература

1. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Завалишин Н.Н., Ненюков А.К. Экспериментальное исследование механических характеристик роговицы и прилегающих участков склеры. *Офтальмологический журнал* 1988; (4): 233-237.
2. Аветисов С.Э., Мамиконян В.Р., Казарян Э.Э., Шмелева-Демир О.А., и др. Результаты клинической оценки нового скринингового метода определения индивидуальной нормы внутриглазного давления. *Вестник офтальмологии* 2010; 126 (2): 5-7

3. Аветисов С.Э., Полунин Г.С., Шеремет Н.Л., Муранов К.О., et al. Поиск шапероноподобных антикатарактальных препаратов – антиагрегантов кристаллинов хрусталика глаза. Сообщение 3. Возможности динамического наблюдения за процессами катарактогенеза на "продолжительной" модели УФ-индуцированной катаракты у крыс. *Вестник офтальмологии* 2008; 124 (2): 3-7.
4. Арутюнян Л.Л., Еричев В.П., Филиппова О.М., Акопян А.И. Вязкоэластические свойства роговицы при первичной открытоугольной глаукоме. *Глаукома* 2007; (1): 62-65.
5. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков. М.: Наука; 1965. 232 с.
6. Еремина М.В., Еричев В.П., Якубова Л.В. Влияние центральной толщины роговицы на уровень внутриглазного давления в норме и при глаукоме. *Глаукома* 2006; (4): 78-83.
7. Семчишен А.В., Семчишен В.А. Измерения фотоупругости роговицы глаза. Астигматизм и аномалии внутренних напряжений роговицы. *Альманах клинической медицины* 2008; 17 (2): 128-132.
8. Бубнова И.А., Семчишен В.А., Свиридов А.П., Хайдуков Е.В., Новиков И.А., Петров С.Ю., Пахомова Н.А., Волжанин А.В. Спектрально-поляризационные свойства фотолюминесценции фиброзных оболочек глаза. *Медицина* 2016; (3): 190-200.
9. Avetisov S.E., Bubnova I.A., Novikov I.A., Antonov A.A., et al. Experimental study on the mechanical strain of corneal collagen. *Journal of biomechanics* 2013; 46 (10): 1648-1654.
10. Duan L., Yamanari M., Yasuno Y. Automated phase retardation oriented segmentation of chorio-scleral interface by polarization sensitive optical coherence tomography. *Optics express* 2012; 20 (3): 3353-3366.
11. Nagase S., Yamanari M., Tanaka R., Yasui T., et al. Anisotropic alteration of scleral birefringence to uniaxial mechanical strain. *PLoS one* 2013; 8 (3): e58716
12. Roth S., Freund I. Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon. *Biopolymers* 1981; 20 (6): 1271-1290.
13. Tan H.Y., Teng S.W., Lo W., Lin W.C., et al. Characterizing the thermally induced structural changes to intact porcine eye, part 1: second harmonic generation imaging of cornea stroma. *Journal of biomedical optics* 2005; 10 (5): 054019.
14. Yamanari M., Nagase S., Fukuda S., Ishii K., et al. Scleral birefringence as measured by polarization-sensitive optical coherence tomography and ocular biometric parameters of human eyes in vivo. *Biomedical optics express* 2014; 5 (5): 1391-1402.

Studies of luminescence and structure of the eye tissues under mechanical stresses

Bubnova I. A.

Med.Sc.D., leading research associate¹

Semchishen V. A.

Ph.D., leading research associate²

Sviridov A. P.

Ph.D., leading research associate²

Khaydukov E. V.

senior research associate²

Novikov I. A.
senior research associate¹

Petrov S. Yu.
Ph.D., leading research associate¹

Pakhomova N. A.
postgraduate student¹

Volzhanin A. V.
resident¹

¹*Scientific Research Institute of Eye Diseases, 11 A,B, Rossolimo St., Moscow, Russian Federation, 119021*

²*Institute of Photonic Technologies of Federal Research Centre "Crystallography and Photonics" of Russian Academy of Sciences, 2 Pionerskaya str., Troitsk, Moscow, Russian Federation, 142190*

Abstract

Aim. To study the spectral states of polarization of the luminescence of the fibrous membranes of the eye ex vivo stimulated by linearly polarized light as a function of intraocular pressure. To study the changes in the structure of the collagen matrix of the cornea and sclera of the eye under mechanical stresses with the help of a confocal microscope and generation of a second harmonic. To evaluate the correlation of mechanical and structural changes in tissues with the polarization of luminescence.

Methods. In the experiments, rabbit eyes were used. The eyeball was fixed in a special holder, equipped with a system for setting and maintaining intraocular pressure. The photoluminescence spectra of the eyes were recorded with the help of the Jobin-Yvon Fluorolog-3 spectrophotometer under excitation by linearly polarized radiation of a He-Cd laser with a wavelength of 325 nm. At the entrance to the spectrophotometer, Glan's prism was installed. A laser scanning microscope LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Germany) was used to study the collagen matrix of the eye cornea. For the analysis of optical images, a one-dimensional wavelet analysis was used, a mathematical apparatus used to process signals of various nature and structures.

Results. Luminescence of the eye cornea, excited on the eyeball by linearly polarized radiation, is partially polarized, and the integrated intensity of the luminescence spectrum depends on the intraocular pressure. The degree of polarization of the luminescence is spectrally dependent, it can have a linear or parabolic form with a minimum near the maximum of the luminescence spectrum. The form of the spectrum of the degree of polarization depends on the position of the stimulating ray on the cornea of the eye, which may be due to parasitic luminescence of other eye tissues, such as the iris, vitreous, lens. The spectrum of the degree of polarization is sensitive to intraocular pressure. Any significant change in the structure of the collagen matrix of the cornea with intraocular pressure changes by visual examination with laser scanning microscopy could not be detected. One-dimensional wavelet analysis for the analysis of optical images makes it possible to reveal spectra of inhomogeneities in optical structures with an increase in intraocular pressure to 23, 45 and 76 mm Hg.

Conclusion. Luminescence of the eye cornea, excited on the eyeball by linearly polarized radiation, is partially polarized, and the integrated intensity of the luminescence spectrum depends on the intraocular pressure. With the help of laser scanning microscopy any significant changes in the structure of the collagen matrix of the cornea with the change in intraocular pressure could not be detected. One-dimensional wavelet analysis of optical images makes it possible to reveal spectra of inhomogeneities in optical structures with an increase in intraocular pressure to 23, 45 and 76 mm Hg.

Key words: cornea, sclera, eye fibrous tunic, luminescence, polarization, elasto-optic effect, collagen, laser scanning microscopy, wavelet analysis.

References

1. Avetisov, S. E., V. R. Mamikonyan, N. N. Zavalishin, and A. K. Nenyukov. "Eksperimental'noe issledovanie mekhanicheskikh harakteristik rogovicy i prilgayushchih uchastkov sklery [Experimental study of the mechanical characteristics of the cornea and adjacent areas of the sclera]." *Oftal'mologicheskij zhurnal*, no. 4 (1988): 233-37.
2. Avetisov, S. E., V. R. Mamikonyan, E. E. Kazaryan, and O. A. Shmeleva-Demir. "Rezul'taty klinicheskoy ocenki novogo skringovogo metoda opredeleniya individual'noj normy vnutriglaznogo davleniya [Results of clinical evaluation of a new screening method for determining the individual norm of intraocular pressure]." *Vestnik oftal'mologii*. 126, no. 2 (2010): 5-7.
3. Avetisov, S. E., G. S. Polunin, N. L. Sheremet, and K. O. Muranov. "Poisk shaperonopodobnyh antikataraktal'nyh preparatov - antiagregantov kristallinov hrustalika glaza. Soobshchenie 3. Vozmozhnosti dinamicheskogo nablyudeniya za processami kataraktogeneza na "prolongirovannoj" modeli uf-inducirovannoj katarakty u krys [Search for chaperon-like anticataract drugs, the antiaggregants of lens crystalline. Report 3. Possibilities of dynamic observation of cataractogenesis processes on the "prolonged" model of UV-induced cataract in rats]." *Vestnik oftal'mologii*. 124, no. 2 (2008): 3-7.
4. Arutyunyan, L. L., V. P. Elichev, O. M. Filippova, and A. I. Akopyan. "Vyazkoehlasticheskie svojstva rogovicy pri pervichnoj otkrytougol'noj glaukome [Viscoelastic properties of the cornea in primary open-angle glaucoma]." *Glaukoma*, no. 1 (2007): 62-65.
5. Vladimirov, Yu A. *Fotohimiya i lyuminescenciya belkov. [Photochemistry and luminescence of proteins]*. Moskva: Nauka, 1965.
6. Eremina, M. V., V. P. Yerichev, and L. V. Yakubova. "Vliyanie central'noj tolshchiny rogovicy na uroven' vnutriglaznogo davleniya v norme i pri glaukome [Effect of the central thickness of the cornea on the level of intraocular pressure in normal eye and with glaucoma]." *Glaukoma*, no. 4 (2006): 78-83.
7. Semchishen, A. V., and V. A. Semchishen. "Izmereniya fotouprugosti rogovicy glaza. Astigmatizm i anomalii vnutrennih napryazhenij rogovicy [Measurements of the photoelasticity of the cornea of the eye. Astigmatism and abnormalities of internal corneal stresses]." *Al'manah klinicheskoy mediciny*. 17, no. 2 (2008): 128-32.
8. Bubnova, I. A., V. A. Semchishen, A. P. Sviridov, E. V. Hajdukov, I. A. Novikov, S. Yu Petrov, N. A. Pahomova, and A. V. Volzhanin. "Spektral'no-polyarizacionnye svojstva fotolyuminescencii fibroznyh obolochek glaza [Spectral-polarization properties of photoluminescence of fibrous membranes of the eye]." *Medicina.*, no. 3 (2016): 190-200. <http://www.fsmj.ru/015255.html>.
9. Avetisov, S. E., I. A. Bubnova, I. A. Novikov, and A. A. Antonov. "Experimental study on the mechanical strain of corneal collagen." *Journal of biomechanics* 46, no. 10 (2013): 1648-654.
10. Duan, L., M. Yamanari, and Y. Yasuno. "Automated phase retardation oriented segmentation of chorio-scleral interface by polarization sensitive optical coherence tomography ." *Optics express* 20, no. 3 (2012): 3353-366.
11. Nagase, S., M. Yamanari, R. Tanaka, and T. Yasui. "Anisotropic alteration of scleral birefringence to uniaxial mechanical strain." *PloS one* 8, no. 3 (2013): E58716.
12. Roth, S., and I. Freund. "Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon ." *Biopolymers* 20, no. 6 (1981): 1271-290.
13. Tan, H. Y., S. W. Teng, W. Lo, and W. C. Lin. "Characterizing the thermally induced structural changes to intact porcine eye, part 1: second harmonic generation imaging of cornea stroma." *Journal of biomedical optics* 10, no. 5 (2005): 054019.

14. Yamanari, M., S. Nagase, S. Fukuda, and K. Ishii. "Scleral birefringence as measured by polarization-sensitive optical coherence tomography and ocular biometric parameters of human eyes in vivo." *Biomedical optics expres* 5, no. 5 (2014): 1391-402.