

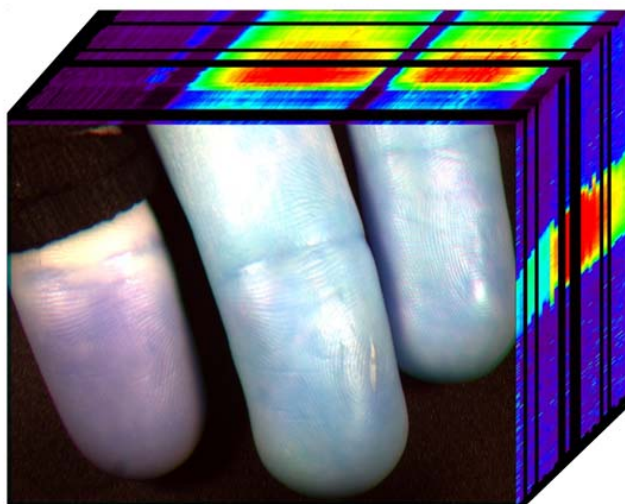


ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

In Vivo φασματική χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης

ΓΑΛΑΡΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
Α.Μ:2002030038



Επιτροπή διπλωματικής εργασίας

Μπάλας Κώστας (επιβλέπων)

Μπούχερ Ματτίας

Καλαϊτζάκης Κωνσταντίνος

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου Κώστα Μπάλα, που με εμπιστεύτηκε να αναλάβω την διπλωματική αυτή εργασία με θέμα : << In Vivo φασματική χαρτογράφηση οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης>>, η καθοδήγηση του οποίου ήταν πολύτιμη καθ'όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στους υποψήφιους διδάκτορες, Παπουτσόγλου Γεώργιο και Τσάπρα Αθανάσιο, όπως επίσης και στο μεταπτυχιακό φοιτητή Επιτρόπου Γεώργιο για τη πολύτιμη βοήθεια τους και τις χρήσιμες συμβουλές τους σε κάθε στάδιο της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου με τους οποίους είχαμε άψογη συνεργασία.

Ακόμα, θέλω να εκφράσω την εκτίμησή μου στους καθηγητές Καλαϊτζάκη Κώστα και Μπούχερ Ματτίας, για την συμμετοχή τους στην επιτροπή αξιολόγησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την υποστηρίξη της καθ'όλη τη διάρκεια της φοιτητικής μου σταδιοδρομίας.

Περίληψη

Στόχος της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η *in vivo* χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης, ώστε να κάνουμε εφικτή την ανίχνευση και ενδεχομένως τη θεραπεία παθήσεων και ανωμαλιών του δέρματος (π.χ. καρκινικοί όγκοι, δερματοπάθειες κ.α.). Διότι σε αυτές παρουσιάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης λόγω ελειπούς οξυγόνωσης σε σχέση με τις υγιείς περιοχές. Στην πρώτη φάση της εργασίας έγινε μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων των ιστών και της αιμοσφαιρίνης τόσο στην οξυγονωμένη όσο και στη μη οξυγονωμένη μορφή της.

Στη συνέχεια για την επίτευξη του στόχου μας διεξάγαμε ορισμένα πειράματα με τη χρήση της τεχνολογίας υπερφασματικής απεικόνισης (κάμερα MuSIS) λαμβάνοντας εικόνες από τα 420 έως τα 1000nm (φασματικοί κύβοι). Αρχικά διακόψαμε τη κυκλοφορία του αίματος σε δάχτυλα χεριών (δείκτη, μέσο, παράμεσο), ώστε να κάνουμε μια προσομοίωση καταστάσεων όπου δεν οξυγονώνονται σωστά περιοχές του σωματός μας. Επίσης λάβαμε κύβους από κηλίδες αρτηριακού (περισσότερο οξυγονωμένο) και φλεβικού (λιγότερο οξυγονωμένο) αίματος, ώστε να πάρουμε τα φάσματα ανάκλασης της oxy και deoxy αιμοσφαιρίνης, που ήταν πιο ακριβή σε αυτή τη περίπτωση. Ο λόγος είναι ότι στα δάχτυλα είχαμε απορρόφηση ακτινοβολίας και από άλλες χρωμοφόρες όπως από τη μελανίνη, από το δερματικό ιστό και από άλλους παράγοντες, με αποτέλεσμα να χάνουμε κάποια πληροφορία από το ανακλώμενο φως.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε τους αλγορίθμους ποσοτικού προσδιορισμού χρωμοφόρων των: Feather, Ferguson-Pell, Hajizadeh και Shimada για την ανίχνευση της oxy και deoxy Hb και το προσδιορισμό των ορίων οξυγόνωσης στα δάχτυλα. Ωστόσο με αυτούς τους αλγορίθμους δεν καταλήξαμε σε ακριβή αποτελέσματα.

Τέλος εκτελώντας τεχνικές ταξινόμησης (Spectral Angle Mapper και Spectral Information Divergence), στα αποκτηθέντα φάσματα και εξετάζοντας τις ελάχιστες μπάντες που απαιτούνται για το υπερφασματικό σύστημα απεικόνισης πήραμε τους καλύτερους δυνατούς χρωματικούς χάρτες, με τους οποίους κατέστη εφικτή η χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης, που ήταν και ο βασικός στόχος της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης κάναμε αξιολόγηση της όλης πειραματικής διαδικασίας τρέχοντας τους αλγορίθμους και για τα δάχτυλα 2 εθελοντών έχοντας τα ίδια φάσματα αναφοράς και καταλήξαμε σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	8
Κεφάλαιο 1: Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και ύλης και αρχές φασματοσκοπίας.....	10
1.1 Ιστολογία και οπτικές ιδιότητες του Δέρματος.....	10
1.2 Χρωμοφόρες του δέρματος.....	11
1.3 Απορρόφηση.....	12
1.4 Beer-Lambert law.....	13
1.5 Ανάκλαση.....	14
1.6 Σκέδαση.....	15
1.7 Φασματοσκοπία.....	17
1.8 Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.....	17
1.9 Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.....	18
Κεφάλαιο 2: Βασική αρχή λειτουργίας Pulse Oximeter και Αλγόριθμοι Ποσοτικού Διαχωρισμού Χρωμοφόρων.....	20
2.1 Αιμοσφαιρίνη.....	20
2.2 Ρόλος της αιμοσφαιρίνης σε ασθένειες & σημασία oxy-deoxy mapping.....	22
2.3 Θεωρητικό υπόβαθρο της Oximetry.....	23
2.3.1 Εισαγωγή στην Oximetry.....	23
2.3.2 Βασική Αρχή της Pulse Oximetry.....	24
2.4 Είδη Pulse Oximeter.....	25
2.4.1 Transmittance Pulse Oximeter.....	25
2.4.2 Reflection pulse oximetry.....	27
2.5 Υπολογισμός του κορεσμένου οξυγόνου στο αίμα (SaO ₂).....	27
2.6 Αλγόριθμοι Ποσοτικού Προσδιορισμού Χρωμοφόρων.....	29
2.6.1 Feather.....	30
2.6.2 Ferguson-Pell.....	31
2.6.3 Hajizadeh.....	31
2.6.4 Shimada-Yamada.....	31
Κεφάλαιο 3 : Υπερφασματική Απεικόνιση και Αλγόριθμοι Ταξινόμησης.....	33
3.1 Φασματική απεικόνιση.....	33
3.1.2 Υπερφασματική απεικόνιση.....	35
3.2 Επεξεργασία υπερφασματικών δεδομένων.....	37
3.2.1 Προεπεξεργασία δεδομένων.....	37
3.2.2 Image Classification.....	38
3.3 Αλγόριθμοι φασματικής ταξινόμησης.....	40
3.3.1 Spectral Angle Mapper (SAM).....	40
3.3.2 Spectral Information Divergence (SID).....	42
Κεφάλαιο 4: Τεχνολογίες ανίχνευσης Hb και εφαρμογές.....	43
4.1 Τεχνολογίες για την χαρτογράφηση Oxy-Deoxy Hemoglobin.....	43
4.1.1 <i>Functional near-infrared optical imaging: Utility and limitations in human brain mapping</i>	43
4.1.2 <i>Mapping tissue oxygenation in the beating heart with near-infrared spectroscopic imaging</i>	45
4.1.3 <i>Visualization of cutaneous hemoglobin oxygenation and skin hydration using near-infrared spectroscopic imaging</i>	47

4.1.4 <i>In vivo</i> measurement of parameters of dosimetric importance during interstitial photodynamic therapy of thick tumors	49
4.1.5 Diffuse optics in breast cancer: detecting tumors in pre-menopausal women and monitoring neoadjuvant chemotherapy.....	50
4.1.6 Near infrared point and imaging spectroscopy for burn depth assessment.....	52
4.1.7 <i>In Vivo</i> Monitoring of Cutaneous Edema.....	52
4.1.8 The Use of Medical Hyperspectral Technology to Evaluate Microcirculatory Changes in Diabetic Foot Ulcers and Predict Clinical Outcomes	54
4.1.9 Oxygen Saturation in Optic Nerve Head Structures by Hyperspectral Image Analysis	55
4.1.10 Visible Reflectance Hyperspectral Imaging: Characterization of a Noninvasive, <i>in Vivo</i> System For Determining Tissue Perfusion	57
4.2 Μειονεκτήματα και Πλεονεκτήματα των μεθόδων	58
Κεφάλαιο 5: Πειραματική διαδικασία και αποτελέσματα	59
5.1 Στάδια Εργασίας.....	59
5.1.2 Σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης (MuSIS)	60
1 ^ο Στάδιο	62
2 ^ο Στάδιο	64
3 ^ο Στάδιο	72
4 ^ο Στάδιο	75
5 ^ο Στάδιο	84
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	93
1 ^ο Στάδιο	93
2 ^ο Στάδιο	96
4 ^ο Στάδιο	104
5 ^ο Στάδιο	107

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1. 1: Οπτικές διεργασίες σε ένα τυπικό ανθρώπινο δερματικό ιστό.....	10
Εικόνα 1. 2: Φάσμα απορρόφησης χρωμοφόρων	12
Εικόνα 1. 3 Απορρόφηση και Εκπομπή φωτονίου.....	13
Εικόνα 1. 4: Διάγραμμα απορρόφησης Beer–Lambert μίας ακτίνας φωτός καθώς διανύει απόσταση l σε μέσο.....	14
Εικόνα 1. 5: Παραδείγματα ανάκλασης σε λεία επιφάνεια.....	15
Εικόνα 1. 6: Παράδειγμα σκέδασης ακτίνων σε μη λεία επιφάνεια	16
Εικόνα 1. 7: Παράδειγμα σκέδασης ακτίνων	17
Εικόνα 1. 8: Φαινόμενα που συμβαίνουν με τη πρόσπτωση μια ακτίνας φωτός σε μία επιφάνεια	17
Εικόνα 1. 9: Ηλεκτρομαγνητικό κύμα	18
Εικόνα 1. 10: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.....	19
Εικόνα 2. 1: Μόριο αιμοσφαιρίνης	20
Εικόνα 2. 2: Πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδεδεμένες με μόρια O ₂	21
Εικόνα 2. 3: Είδη Pulse Oximetry	23
Εικόνα 2. 4: Αρχή Λειτουργίας TPO	26
Εικόνα 2. 5: Εφαρμογές TPO.....	26
Εικόνα 2. 6: Αρχή λειτουργίας RPO	27
Εικόνα 2. 7: Ιστόγραμμα τιμών SpO ₂	29
Εικόνα 3. 1: Αρχή φασματοσκοπίας	34
Εικόνα 3. 2: Παρουσίαση της υπερφασματικής απεικόνισης.....	35
Εικόνα 3. 3: Hyperspectral vs Multispectral	36
Εικόνα 3. 4: Βήματα από την απόκτηση του φασματικού κύβου έως την απεικόνιση ουσιώδους πληροφορίας.....	37
Εικόνα 3. 5: Βήματα Supervised & Unsupervised classification.....	39
Εικόνα 3. 6: Βήματα της Supervised classification	40
Εικόνα 3. 7: Δυσδιάστατο παράδειγμα του Spectral Angle Mapper (SAM).....	41
Εικόνα 4. 1: (Α) Φασματική απεικόνιση της καρδιάς σε όλες τις καταστάσεις Β) Η αναλογία oxy-deoxy (Hb+Mb) σε όλες τις καταστάσεις.....	46
Εικόνα 4. 2: Εικόνες κατά τη διάρκεια της διακοπής του αίματος στο βραχίονα (Α) και μετά τη διακοπή (Β)	47
Εικόνα 4. 3: Εικόνες από ραχιαίο τμήμα ενός ποντικού πριν την αφαίρεση του, αμέσως μετά την αφαίρεση καθώς και μια ώρα αφότου αφαιρέθηκε.....	48
Εικόνα 4. 4: Στοίβα φασματικών εικόνων απο ραχιαίο τμήμα ποντικού και το φάσμα ανάκλασης από ένα συγκεκριμένο pixel σε κάθε εικόνα.....	48
Εικόνα 4. 5: Σχεδιάγραμμα συστήματος που χρησιμοποιήθηκε.....	49
Εικόνα 4. 6: Μεταβολές στη περιεκτικότητα σε Hb για 7 θεραπείες	50
Εικόνα 4. 7: (a) Περιοχές μέτρησης, (b) Διάχυση φωτονίων.....	51
Εικόνα 4. 8: : Διαφορές στους μέσους όρους των φασμάτων απορρόφησης καρκινικών και υγιών περιοχών του μαστού	51
Εικόνα 4. 9: NIRS εικόνες εγκαυμάτων.....	52
Εικόνα 4. 10: Edema & Erythema reaction.....	53
Εικόνα 4. 11: Apparent erythema and edema intensities depend on histamine dose.....	54
Εικόνα 4. 12: Υπερφασματική εικόνα έλκους σε πόδι ασθενούς και διάγραμμα τιμών HT	55
Εικόνα 4. 13: Χρωματικοί χάρτες ONH και γραφική απεικόνιση του αλγορίθμου εύρεσης του δείκτη κορεσμού.....	56

Εικόνα 4. 14: Υπερφασματικός κύβος δεμένου και ελεύθερου χεριού και διάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας	57
Εικόνα 5. 1: Εικόνες από κάμερα MuSIS	630
Εικόνα 5. 2: Φασματικός κύβος για το δείκτη ενώ είναι δεμένο για 6min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS.....	643
Εικόνα 5. 3: Μέσοι όροι ανάκλασης για περιοχές δαχτύλων οξυγονωμένης και μη Hb.....	66
Εικόνα 5. 4: Δείκτης IOX Παράμεσου δεμένου μετά απο 1 και 6 min	700
Εικόνα 5. 5: Δείκτης IOX δείκτη δεμένου μετά απο 1 και 6 min	71
Εικόνα 5. 6: Δείκτης IOX Μέσου δεμένου μετά απο 1 και 6 min	71
Εικόνα 5. 7: Δείκτης DC ₅₂₀₋₅₈₀	731
Εικόνα 5. 8: Φασματικός κύβος για τις κηλίδες αρτηριακού και φλεβικού αίματος , κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS	74
Εικόνα 5. 9: Μέσοι όροι φασμάτων ανάκλασης για αρτηριακό και φβλεβικό αίμα, σε λευκό και μαύρο φόντο	75
Εικόνα 5. 10: Υπερφασματικός κύβος	765
Εικόνα 5. 11: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων και στα 3 δάχτυλα	76
Εικόνα 5. 12: Εικόνες από την εφαρμογή του SAM αλγορίθμου στον ελεύθερο δείκτη	77
Εικόνα 5. 13: Εικόνες από την εφαρμογή του SAM αλγορίθμου στο δεμένο για 1min δείκτη...78	
Εικόνα 5. 14: Εικόνες από την εφαρμογή του SAM αλγορίθμου στο δεμένο για 6min δείκτη	78
Εικόνα 5. 15: Εικόνες από την εφαρμογή του SID αλγορίθμου στον ελεύθερο δείκτη	79
Εικόνα 5.1 6: Εικόνες από την εφαρμογή του SID αλγορίθμου στο δεμένο για 1min δείκτη ...79	
Εικόνα 5. 17: Εικόνες από την εφαρμογή του SID αλγορίθμου στο δεμένο για 6min δείκτη	81
Εικόνα 5. 18: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων στις κηλίδες αίματος	82
Εικόνα 5. 19: Χρωματικοί χάρτες με PCA και χωρίς	83
Εικόνα 5. 20: Συνδιασμοί μπαντών με PCA	83
Εικόνα 5. 21: Φασματικός κύβος για το δείκτη του Εθελοντή 1 ενώ είναι δεμένο για 6min,..... κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS	86
Εικόνα 5. 22: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων στα δάχτυλα 3 διαφορετικών ατόμων,..... που είναι δεμένα για 1min (λευκό χρώμα), με φάσματα αναφοράς από το δικό μου δείκτη	87
Εικόνα 5. 23: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων στα δάχτυλα 3 διαφορετικών ατόμων,..... που είναι δεμένα για 3min (πράσινο χρώμα), με φάσματα αναφοράς από το δικό μου δείκτη...87	
Εικόνα 5. 24: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων στα δάχτυλα 3 διαφορετικών ατόμων,..... που είναι δεμένα για 6min (μπλε χρώμα), με φάσματα αναφοράς από το δικό μου δείκτη	87

Εισαγωγή

Σκοπός της διπλωματικής μου εργασίας ήταν η *in vivo* υπερφασματική χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης. Η αιμοσφαιρίνη είναι κύριο συστατικό του αίματος και παρουσιάζεται σε δύο μορφές (oxy και deoxy Hb) και ο κύριος ρόλος της είναι η μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς, καθώς και η απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα από αυτούς.

Η μελέτη ωστόσο της συγκέντρωσης της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης στο αίμα είναι μείζονος σημασίας για τη παρακολούθηση της καρδιοαναπνευστικής κατάστασης ασθενών στη φάση της θεραπείας ή κατά τη διάρκεια του χειρουργείου, καθώς και για την ανίχνευση ασθενειών και ανωμαλιών του δέρματος, καθώς σε αυτές παρουσιάζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης, λόγω του ότι δεν οξυγονώνονται σωστά.

Κατά συνέπεια η σύγκριση της αναλογίας oxy-deoxy Hb ανάμεσα σε υγιείς και μη περιοχές του δέρματος, μας δίνει πολλές πληροφορίες που συνεισφέρουν στην έγκαιρη διάγνωση ακόμα και τη θεραπεία των όποιων παθήσεων. Για τους παραπάνω λόγους έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια πάρα πολλές προσπάθειες και έρευνες για τη καλύτερη δυνατή χαρτογράφηση της αιμοσφαιρίνης και εφευρέθηκαν συσκευές (π.χ. pulse oximeter) που υπολογίζουν την αναλογία oxy-deoxy Hb στο αίμα και ήδη χρησιμοποιούνται εδώ και αρκετά χρόνια με επιτυχία.

Όλες οι μέθοδοι και οι έρευνες που έγιναν στο πεδίο αυτό στηρίζονται σε απεικονιστικά συστήματα, όπως η φασματική απεικόνιση και εκμεταλλεύονται τη φύση του φωτός και φαινόμενα όπως η απορρόφηση, η εκπομπή και η σκέδαση. Η φασματική απεικόνιση αναλύει τα μικροσκοπικά και μακροσκοπικά δείγματα στα διάφορα μήκη κύματος, επιτρέποντας υψηλής ανάλυσης φάσμα (ένταση ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος) να αποκτηθεί σε κάθε pixel της εικόνας.

Εμείς στη παρούσα διπλωματική εργασία θελήσαμε να εκμεταλλευτούμε τις δυνατότητες που προσφέρει η υπερφασματική απεικόνιση για την χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης. Η υπερφασματική απεικόνιση χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών και με αυτή συλλέγουμε και επεξεργαζόμαστε πληροφορίες από ολοκληρω το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Οι υπερφασματικοί αισθητήρες συλλέγουν δεδομένα εικόνων έως και σε εκατοντάδες στενές φασματικές ζώνες με φασματική ανάλυση της τάξης των 10 nm ή

και μικρότερη με αποτέλεσμα να παράγουν ένα πλήρες, συνεχές φάσμα για κάθε pixel της εικόνας.

Χρησιμοποιώντας λοιπόν το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS που είχαμε διαθέσιμο στο Εργαστήριο Οπτοηλεκτρονικής του Πολυτεχνείου Κρήτης διεξάγαμε ορισμένα πειράματα, τα αποτελέσματα των οποίων μας επέτρεψαν να κάνουμε χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης.

Αναλυτικότερα, στη συνέχεια του κειμένου ακολουθούν τα εξής:

Κεφάλαιο 1: Περιγράφουμε τους τρόπους αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τους ιστούς, που αποτελούν τις βασικές φυσικές αρχές στις οποίες στηρίζονται όλες οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήσαμε.

Κεφάλαιο 2: Εξηγούμε τη σημασία χαρτογράφησης της oxy-deoxy αιμοσφαιρίνης και περιγράφουμε την αρχή λειτουργίας του pulse oximeter, καθώς και αλγορίθμους ποσοτικού προσδιορισμού χρωμοφώρων.

Κεφάλαιο 3: Παρουσιάζουμε τις γενικές έννοιες της υπερφασματικής απεικόνισης και της ταξινόμησης υπερφασματικών δεδομένων, ενώ αναλύουμε και τους αλγορίθμους ταξινόμησης φασμάτων ανάκλασης που εφαρμόζουμε για την ανίχνευση και την χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης.

Κεφάλαιο 4: Παρουσιάζουμε τεχνολογίες χαρτογράφησης oxy-deoxy Hb καθώς και εφαρμογές όπου αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί.

Κεφάλαιο 5: Περιγράφουμε την πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε, αναλύουμε το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS που χρησιμοποιήσαμε στην έρευνα μας, καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων.

Κεφάλαιο 6: Συνοψίζουμε τα συμπεράσματα που προέκυψαν κατά την διάρκεια της έρευνάς μας και κάνουμε προτάσεις για μελλοντική επέκταση της δουλειάς μας.

Παράρτημα: Εκθέτουμε κύβους που λάβαμε από δάχτυλα με τη κάμερα MuSIS, πίνακες με δείκτες που προέκυψαν με την εφαρμογή αλγορίθμων ποσοτικού προσδιορισμού χρωμοφώρων και εικόνες χρωματικών χαρτών που προέκυψαν από διάφορες διαδικασίες που περιγράφονται αναλυτικά στα διάφορα στάδια του Κεφαλαίου 5.

Κεφάλαιο 1: Αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και ύλης και αρχές φασματοσκοπίας

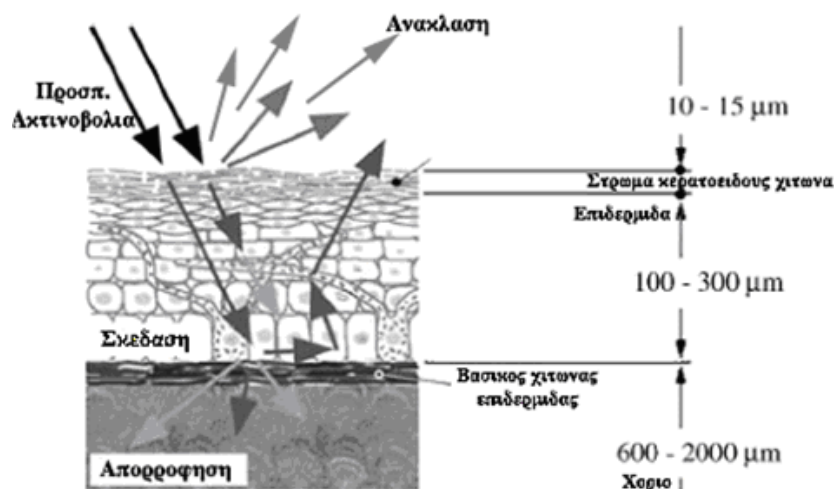
1.1 Ιστολογία και οπτικές ιδιότητες του Δέρματος

Οι οπτικές ιδιότητες του ανθρώπινου δέρματος έχουν γίνει το αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνών. Το ενδιαφέρον για την οπτική συμπεριφορά του δέρματος πηγάζει από το γεγονός ότι πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την φυσιολογία, μορφολογία και σύνθεση του δέρματος μπορούν να παρθούν με έναν μη επεμβατικό τρόπο και σε πραγματικό χρόνο, με την χρήση μιας οπτικής μεθόδου ανάλυσης.

Το δέρμα αποτελεί τον εξωτερικό ιστό του σώματος και το μεγαλύτερο όργανο, όσον αφορά το βάρος του και την επιφάνειά του. Είναι ένα ανομοιογενές, πολυστρωματικό, με διαφορετικές οπτικές ιδιότητες και λειτουργίες όργανο και αποτελείται από:

- την επιδερμίδα (epidermis)
- το χόριο (dermis)
- και το υπόδερμα (subcutaneous tissue)

Όταν μια δέσμη φωτός πλησιάσει την επιφάνεια του δέρματος, ένα μικρό ποσοστό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ανακλάται λόγω της διαφοράς που υπάρχει μεταξύ του δείκτη διάθλασης του αέρα και της κεράτινης στοιβάδας, με αποτέλεσμα η σκεδαζόμενη ακτινοβολία να μπορεί να καταγραφεί και να παρέχει πληροφορίες για το εσωτερικό του ιστού.



Εικόνα 1. 1: Οπτικές διεργασίες σε ένα τυπικό ανθρώπινο δερματικό ιστό

Επίσης:

- Στο υπεριώδες, η απορρόφηση αυξάνεται στα χαμηλά μήκη κύματος εξαιτίας της πρωτεΐνης, του DNA και άλλων μορίων.
- Στο υπέρυθρο, η απορρόφηση αυξάνεται στα υψηλά μήκη κύματος εξαιτίας του νερού που είναι βασικό συστατικό όλων των ιστών.
- Από το ερυθρό στο υπέρυθρο (NIR), η απορρόφηση είναι ελάχιστη. Αυτή η περιοχή καλείται διαγνωστικό και θεραπευτικό παράθυρο.[24]

1.2 Χρωμοφόρες του δέρματος

Ένα από τα κυριότερα χρωμοφόρα στοιχεία του δέρματος στην επιδερμίδα είναι η μελανίνη. Η μελανίνη είναι ένα βιολογικό πολυμερές που έχει ως αρχικό συστατικό του την τυροσίνη. Σε κάθε άτομο η απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας που επικρατεί στην επιδερμίδα, οφείλεται στην απορρόφηση της από τη μελανίνη. Το ακριβές φάσμα της μελανίνης και η χημική δομή της μελανίνης στους ανθρώπους είναι άγνωστα και για αυτό δεν μπορεί να μελετηθεί ή να αναπαραχθεί. Γενικά έχει βρεθεί ότι το φάσμα απορρόφησης αυτού του χρωμοφόρου επιδεικνύει μια πτωτική μονοτονική συμπεριφορά στη ορατή περιοχή του φάσματος, σε σχέση με το μήκος κύματος, ενώ το φάσμα ανάκλασης στην ίδια φασματική περιοχή έχει μονοτονικά ανοδική τάση με μέγιστο στην περιοχή του υπεριώδους.

Το καροτένιο είναι ένα από τα χρωμοφόρα του επόμενου στρώματος του δέρματος, του χορίου, αλλά επίσης μπορεί να βρεθεί και στο αίμα. Είναι ένας ακόρεστος υδρογονάνθρακας, ο οποίος βρίσκεται ως χρωμοφόρο σε πολλά φυτά, ιδιαίτερα τα καρότα, τις γλυκοπατάτες και λαχανικά με πολλά φύλλα και για αυτό και η παρουσία του στους ανθρώπινους οργανισμούς εξαρτάται από τη διατροφή τους. Απορροφά κυρίως γύρω από τα 480 nm, με χαμηλή επίδραση στην χροιά και χρώμα του δέρματος.

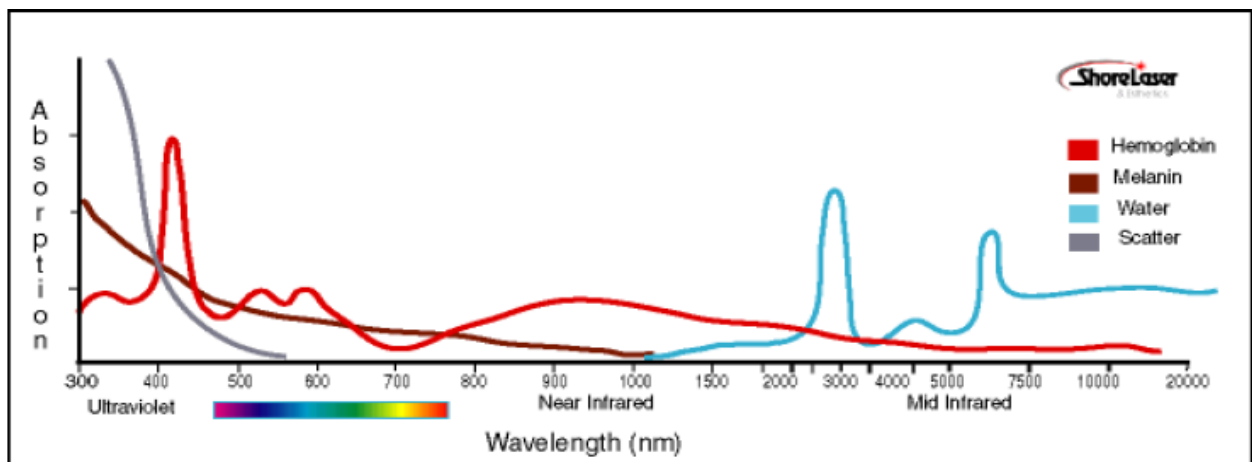
Το κολαγόνο είναι μια ινώδης πρωτεΐνη και βρίσκεται στο χορίο. Οι ίνες του είναι η κύρια πηγή σκέδασης της ακτινοβολίας του φωτός σε αυτό το στρώμα. Παρόλο, που έχουν γίνει εντατικές αναλύσεις για τα αποτελέσματα σκέδασης του κολλαγόνου, δεν υπάρχει αναφορά για την επίδρασή της στο φάσμα ανάκλασης του δέρματος.

Το χορίο διασχίζεται αρκετά πυκνά από αιμοφόρα αγγεία, τα οποία περιέχουν αιμοσφαιρίνη Hb. Η αιμοσφαιρίνη βρίσκεται στο μικροαγγειακό δίκτυο του χορίου, τυπικά 50-500 μm κάτω

από την επιφάνεια του δέρματος. Είναι μια πρωτεΐνη, που περιέχεται στα ερυθροκύτταρα σε ποσοστό 95% σε σχέση με το ξηρό βάρος τους. Είναι υπεύθυνη για την κόκκινη απόχρωση του δέρματος. Η αιμοσφαιρίνη δένεται πολύ εύκολα με το οξυγόνο και αυτό την κάνει το ιδανικό ‘μεταφορικό’ για τη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς. Έχουμε δύο τύπους αιμοσφαιρίνης: την οξυγονωμένη και τη μη οξυγονωμένη που έχουν διαφορετικά φάσματα απορρόφησης.

Δυο άλλα χρωμοφόρα που προέρχονται από το αίμα βρίσκονται επίσης στο χορίο και είναι η bilirubin και η β -carotene. Συνεισφέρουν στην κιτρινωπή χροιά του δέρματος. Η β -carotene μπορεί επίσης να βρεθεί και στην επιδερμίδα και ειδικά στο κερατοειδή χιτώνα [stratum corneum].

Η κερατίνη είναι μια ινώδης πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στην επιδερμίδα. Διαμορφώνεται μέσα στα keratinocytes, κατά την διάρκεια της διαδικασίας κερατίνωσης [keratinisation]. Οι ίνες της προκαλούν σκέδαση φωτός, αλλά είναι τόσο λεπτές ώστε δεν έχουν αποφασιστική επίδραση στην ανάκλαση του φωτός.



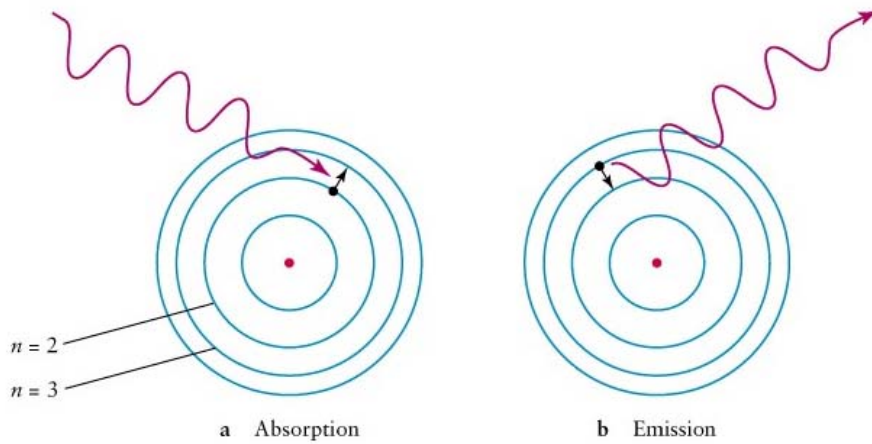
Εικόνα 1. 2: Φάσμα απορρόφησης χρωμοφόρων

1.3 Απορρόφηση

Απορρόφηση ορίζεται η διεργασία κατά την οποία η ύλη μπορεί να απορροφήσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και να μετατρέψει την ενέργεια ενός φωτονίου σε εσωτερική ενέργεια. Η ενεργειακή μετατροπή περιγράφεται σαν την μετάβαση ή την διέγερση από ένα χαμηλό ενεργειακό επίπεδο σε ένα υψηλότερο. Ο τύπος της διέγερσης εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Τα ηλεκτρόνια προάγονται σε υψηλότερες τροχιές στο ultraviolet και visible φάσμα, στο infrared ταλαντώνονται ενώ στα microwaves περιστρέφονται.

Η φασματική απορρόφηση ασχολείται με την μελέτη των ενεργειακών σταθμών των μορίων, των ατόμων και των στερεών. Ένα φάσμα απορρόφησης είναι η απορρόφηση της ακτινοβολίας

σαν συνάρτηση του μήκους κύματος. Για την μέτρηση της συγκέντρωσης ενός απορροφητή χρησιμοποιείται ο Beer-Lambert Law. Ο Beer-Lambert Law είναι μια γραμμική σχέση μεταξύ της απορροφητικότητας και της συγκέντρωσης του απορροφητή.



Εικόνα 1. 3 Απορρόφηση και Εκπομπή φωτονίου

1.4 Beer-Lambert law

Ο νόμος **Beer-Lambert**, επίσης γνωστός **Beer's law** αποτελεί τη βάση όλων των τεχνικών φασματομέτρησης όπως είναι η oximetry. Είναι ένας συνδυασμός δύο νόμων που περιγράφουν την απορρόφηση μίας μονοχρωματικής ακτίνας φωτός από ένα διαφανές μέσο, μέσα από το οποίο διέρχεται:

1. Beer's law: η ένταση του μεταδιδόμενου φωτός μειώνεται εκθετικά όσο η συγκέντρωση του μέσου αυξάνεται
2. Lambert's law: η ένταση του μεταδιδόμενου φωτός μειώνεται εκθετικά όσο η απόσταση που διανύει η ακτίνα όσο διέρχεται το μέσο αυξάνεται

Είναι μια εμπειρική σχέση που συσχετίζει την απορρόφηση του φωτός με τις ιδιότητες του υλικού μέσα από το οποίο διέρχεται.. Σύμφωνα με το νόμο υπάρχει λογαριθμική σχέση μεταξύ της μετάδοσης του φωτός μέσω ενός υλικού ,της συγκέντρωσης του υλικού και τη διαδρομή που ακολούθησε το φως.

Ο νόμος μπορεί να εκφραστεί από την ακόλουθη εξίσωση:

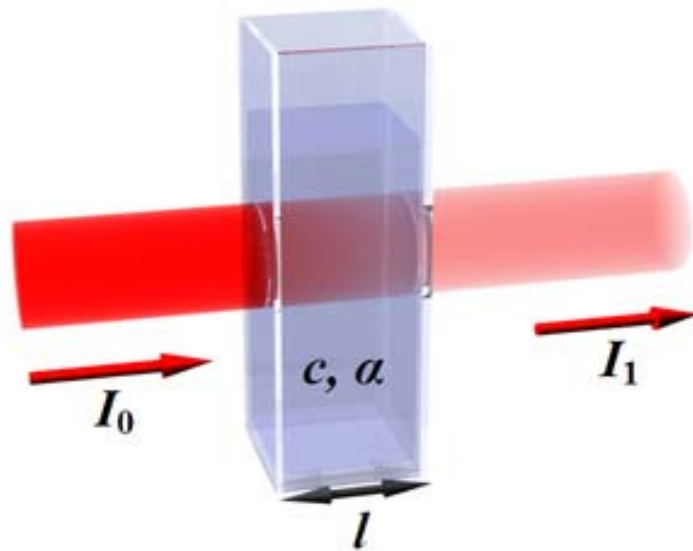
$$A = \epsilon l c,$$

όπου

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I_1}{I_0} \right)$$

και

- A είναι η απορρόφηση του μέσου
- I_0 είναι η ένταση του προσπίπτοντος στο μέσο φωτός
- I_1 είναι η ένταση του φωτός αφού έχει περάσει μέσα από το μέσο
- ϵ είναι η μοριακή απορροφητικότητα του απορροφητή
- l είναι η απόσταση που διανύει το φως μέσα από το υλικό
- c είναι η συγκέντρωση των υλικών που απορροφούν μέσα στο μέσον



Εικόνα 1. 4: Διάγραμμα απορρόφησης Beer-Lambert μίας ακτίνας φωτός καθώς διανύει απόσταση l σε μέσο

Αυτός ο νόμος τείνει να γίνει αναξιόπιστος για πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, ειδικά εάν το μέσον έχει υψηλό δείκτη σκέδασης. Επίσης εάν το φως είναι έχει μεγάλη ένταση μπορεί να έχουμε και αποκλίσεις.. [11] [21]

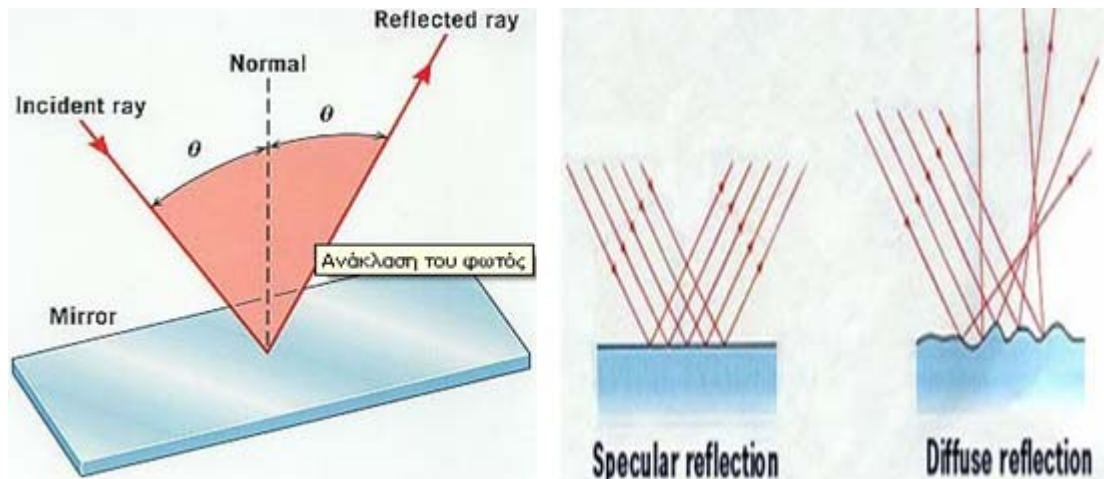
1.5 Ανάκλαση

Η ανάκλαση του φωτός είναι το φαινόμενο εκείνο κατά το οποίο η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συναντά μια επιφάνεια, η οποία δεν μπορεί να την απορροφήσει και " επιστρέφει πίσω" ένα ποσοστό της ή ολοκλήρη τη δεσμίδα φωτός . Έχουμε δύο είδη ανάκλασης:

1. Κατοπτρική ανάκλαση (specular reflection) και
2. Διαχυτική ανάκλαση (diffuse reflection)

Εάν η ακτινοβολία ανακλάται προς μία κατεύθυνση έχουμε κατοπτρική ανάκλαση, ενώ εάν η ανακλώμενη ακτινοβολία εμφανίζει ισοκατανομή της ισχύος προς πολλές διευθύνσεις τότε

έχουμε διάχυση. Στην πραγματικότητα κάθε επιφάνεια ανακλά με τρόπο που είναι ενδιάμεσος αυτών των δύο ακραίων καταστάσεων.

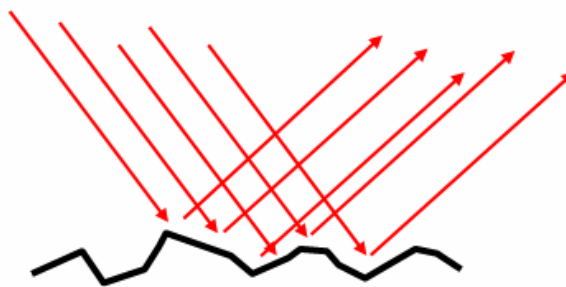


Εικόνα 1. 5: Παραδείγματα ανάκλασης σε λεία επιφάνεια

1.6 Σκέδαση

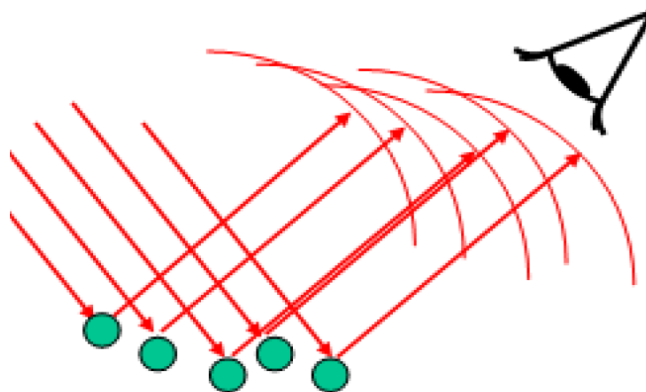
Η σκέδαση είναι μια φυσική διαδικασία με την οποία η ύλη αλληλεπιδρά με το προσπίπτουσα σε αυτή ακτινοβολία. Αλλαγές στην εσωτερική κατανομή της ακτινοβολίας, την ανάκλαση και τη διάδοση του φωτός οφείλονται στα φαινόμενα σκέδασης. Η κατανόηση της σκέδασης και απορρόφησης των φωτονίων μας βοηθάει να κατανοήσουμε τη διάδοση του φωτός στους βιολογικούς ιστούς. Όσο το ηλεκτρομαγνητικό κύμα αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια στο μέσο από το οποίο διέρχεται, ελατώνεται ο ρυθμός διάδοσης του, ανάλογα με το δείκτη διάθλασης του μέσου. Αυτή η αλλαγή στο ρυθμό μετάδοσης της ακτινοβολίας καθώς διέρχεται από ένα μέσο σε άλλο, είναι επίσης υπεύθυνη για την ανάκλαση Fresnel. Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με τα μόρια έχει ως αποτέλεσμα την πολλαπλή εσωτερική ανάκλαση και αλλαγή πορείας του προσπίπτοντος φωτός. Η σκέδαση (γωνιακή κατανομή) περιγράφεται από μια πολύπλοκη εξίσωση που μπορεί μονάχα να υπολογιστεί για γεωμετρικά απλά σώματα, ενώ λεπτομερείς μαθηματικές περιγραφές δεν είναι διαθέσιμες για άμορφα βιολογικά σώματα. Σε βιολογικά μέσα η σκέδαση είναι ανισοτροπική για τα ορατά στον άνθρωπο μήκη κύματος. Η Flow cytometry είναι μία εφαρμογή όπου χρησιμοποιούνται τα φαινόμενα της σκέδασης της ακτινοβολίας στα κύτταρα. Με ελάχιστες εξαιρέσεις (π.χ. κερατοειδής χιτώνας) η διάδοση του φωτός στους βιολογικούς ιστούς με πάχος λιγότερο από 10 microns χαρακτηρίζεται από πολλαπλά φαινόμενα σκέδασης. Η σκέδαση σε οπτικά μέσα με μικρό πάχος μπορεί να χαρακτηριστεί από δύο παραμέτρους (τη σταθερά σκέδασης και την ανισοτροπία σκέδασης),

που συχνά αναφέρονται ως ένας παράγοντας. Η πολλαπλή σκέδαση επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη διάδοση της ακτινοβολίας, αλλά όταν η σταθερά σκέδασης είναι γνωστή, οι αλλαγές που προκλήθηκαν στη πορεία των φωτονίων από τη σκέδαση μπορούν να διορθωθούν και να υπολογιστούν σωστά η ποσοτική απορρόφηση της ακτινοβολίας, ο φθορισμός και άλλες φασματικές μετρήσεις είναι επίσης δυνατόν να γίνουν. [23]



Εικόνα 1. 6: Παράδειγμα σκέδασης ακτίνων σε μη λεία επιφάνεια

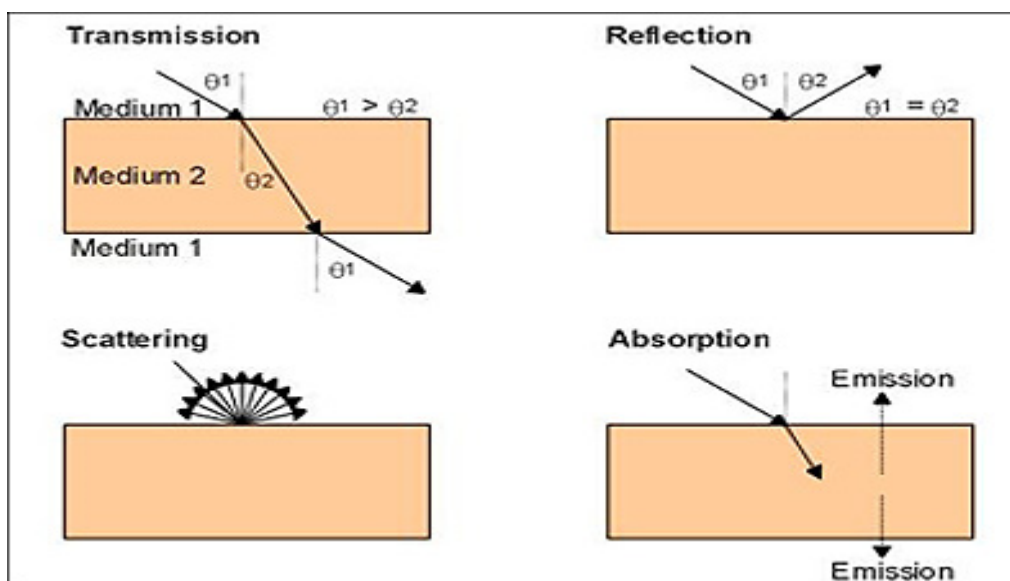
Ο σκεδαστής δεν είναι απαραίτητα ένα σωματίδιο, μπορεί για παράδειγμα να είναι μία επαναλαμβανόμενη κρυσταλλική δομή. Η σκέδαση ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων είναι αρκετά συνηθισμένη για ραδιοκύματα(π.χ. ραντάρ) και ορατό φως. Μαζί με την απορρόφηση είναι οι δύο φυσικές διαδικασίες που είναι υπεύθυνες για το τι βλέπουμε, π.χ. λευκά σώματα σκεδάζουν όλα τα μήκη κύματος χωρίς να απορροφούν κανένα. Η σκέδαση διαιρείται σε ελαστική (= αμελητέα μεταφορά ενέργειας) και ανελαστική. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν η σκέδαση Rayleigh και Mie, ενώ στη δεύτερη η σκέδαση Brillouin, Raman, ανελαστική σκέδαση ακτίνων X και σκέδαση Compton. Για παράδειγμα στην σκέδαση Raman το σκεδαζόμενο φωτόνιο ανταλλάσσει ενέργεια με τις ταλαντώσεις (κυρίως μοριακών δεσμών, αλλά παρατηρείται και με ταλαντώσεις κρυσταλλικού πλέγματος) του σκεδαστή και συνήθως (Stokes) δίνει ενέργεια στον σκεδαστή (κυρίως στην θεμελιώδη ιδιοκατάσταση του σκεδαστή), αν και είναι επίσης παρατηρήσιμο το να παίρνει ενέργεια (anti-Stokes) από διεγερμένες ιδιοκαταστάσεις που μεταπίπτουν σε χαμηλότερες και άρα να έχει τελικά μικρότερο μήκος κύματος από το αρχικό. Σημειωτέον ότι στην περίπτωση αυτή μιλάμε για πολύ μικρότερες ενέργειες, π.χ. ακτίνες X, οι βασικές διεργασίες όμως είναι οι ίδιες. Βαθεία ανελαστική σκέδαση (deep inelastic) είναι σκέδαση που οδηγεί στην καταστροφή του σκεδαστή ή στόχου και μερικές φορές και του σκεδαζόμενου σωματιδίου/κύματος, με αποτέλεσμα την παραγωγή νέων σωματιδίων.



Εικόνα 1. 7: Παράδειγμα σκέδασης ακτίνων

1.7 Φασματοσκοπία

Η φασματοσκοπία είναι η μελέτη της ακτινοβολίας που αλληλεπιδρά (εκπέμπεται ,ανακλάται, σκεδάζεται ή απορροφάται) με την ύλη (Εικόνα 1.8), στο πεδίο της συχνότητας ή στο πεδίο του χρόνου προκειμένου να προσδιορίσει τις φυσικές ή χημικές ιδιότητες της ‘ ύλης ’.

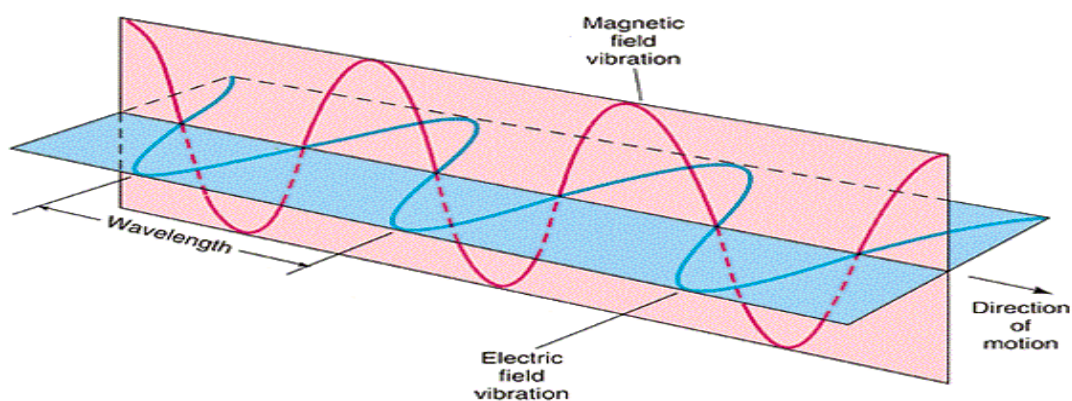


Εικόνα 1. 8: Φαινόμενα που συμβαίνουν με τη πρόσπτωση μια ακτίνας φωτός σε μία επιφάνεια

1.8 Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι τύπος κυμάτων σε μορφή ακτινοβολίας, με συνιστώσες ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.9, που διαδίδονται στην ύλη και στο κενό. Ο κόσμος όλος βομβαρδίζεται καθημερινά από ενέργεια σε μορφή ακτινοβολίας που και εξ’ αυτού ονομάζεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Ένα μέρος αυτής είναι το ορατό

φως, όμως το μεγαλύτερο μέρος της είναι μη ορατό. Ο Ήλιος, τα αστέρια και οι γαλαξίες εκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που φθάνει και στη Γη. Αν και κάποια είδη αυτής είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο και τη φύση του, εν τούτοις μπορεί να γίνει εκμετάλλευση αυτών, επ' ωφελεία του. Η Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συνίσταται σε ηλεκτρομαγνητικά κύματα που καλύπτουν μεγάλο εύρος συχνοτήτων και έτσι μπορεί να παραχθεί και τεχνικά. Ορισμένες μορφές αυτής της ακτινοβολίας είναι, σε αυξητική σειρά συχνότητας ή φθίνοντος μήκους κύματος: τα ραδιοκύματα, τα μικροκύματα, οι υπέρυθρες ακτίνες, το ορατό φως, οι υπεριώδεις ακτίνες, οι ακτίνες X και οι ακτίνες γάμμα. Όλες αυτές οι παραπάνω μορφές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας κινούνται (ταξιδεύουν) με την ταχύτητα φωτός και μπορούν ακόμη να διαπεράσουν και ορισμένα υλικά.



Εικόνα 1. 9: Ηλεκτρομαγνητικό κύμα

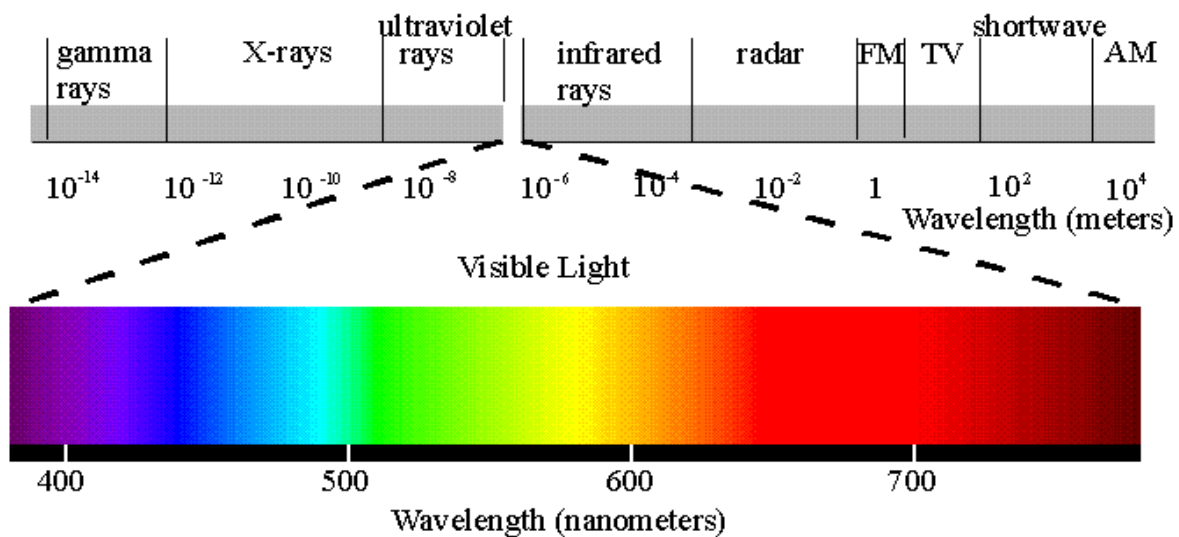
1.9 Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Αν κατατάξουμε όλα τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα σε συνεχόμενη σειρά σε σχέση με το μήκος κύματος τους (ή τη συχνότητά τους) τότε έχουμε το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Όλα τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα του φάσματος, από τα ραδιοκύματα μέχρι τις κοσμικές ακτίνες έχουν την ίδια φύση και διαδίδονται στο κενό με την ίδια ταχύτητα (300.000 km/s), διαφέρουν όμως στη συχνότητά τους, στις εφαρμογές τους και στην παραγωγή τους.

Στις τηλεπικοινωνίες χρησιμοποιούνται τα ραδιοκύματα (ραδιοφωνία, τηλεόραση) και τα μικροκύματα (ραντάρ, κινητή τηλεφωνία, δορυφόροι), τα τελευταία χρόνια όμως χρησιμοποιείται και το υπέρυθρο (οπτικές ίνες). Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα που χρησιμοποιούνται στις τηλεπικοινωνίες παράγονται από ηλεκτρικές ταλαντώσεις στις κεραίες, όταν τις τροφοδοτήσουμε με εναλλασσόμενη τάση.

Στη φύση υπάρχουν και ηλεκτρομαγνητικά κύματα με ακόμα μεγαλύτερες συχνότητες απ' αυτές του ραδιοηλεκτρικού φάσματος. Έτσι μετά την περιοχή των μικροκυμάτων έχουμε τα υπέρυθρα κύματα (εκπέμπονται από θερμά σώματα), το ορατό φως (εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση διεγερμένων ατόμων), την υπεριώδη ακτινοβολία, τις ακτίνες X, τις ακτίνες γ (εκπέμπονται από ραδιενεργούς πυρήνες) και τις κοσμικές ακτίνες.

Δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ των διαφόρων περιοχών του φάσματος και στα άκρα ή μια υπερκαλύπτει την άλλη. Ανάλογα με τη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος επιλέγουμε και το πως θα το εκφράσουμε δηλαδή με τη συχνότητα ή το μήκος κύματος ή την ενέργεια. Έτσι για ραδιοκύματα - μικροκύματα επιλέγουμε κυρίως τη συχνότητα (σε KHz-MHz-GHz), λόγω των τηλεπικοινωνιακών τους εφαρμογών. Για την υπέρυθρη ακτινοβολία και το φως επιλέγουμε συνήθως το μήκος κύματος (σε $\text{nm}=10^{-9}\text{m}$). Τέλος για τις υπεριώδεις ακτίνες, τις ακτίνες X και τις ακτίνες γ, επιλέγουμε την ενέργεια (σε eV - KeV - MeV) λόγω του πολύ μικρού μήκους κύματος.

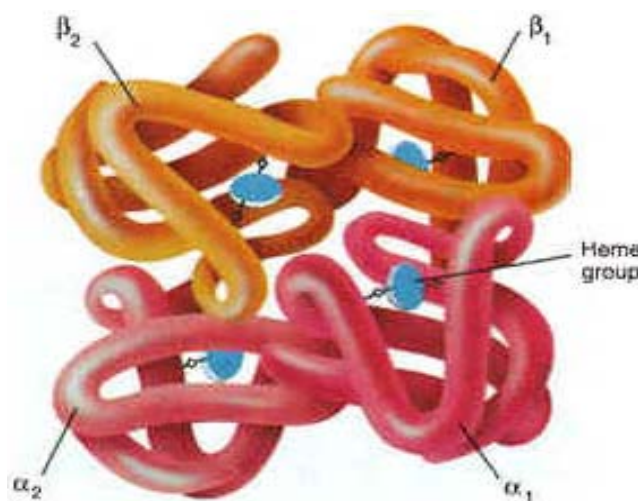


Εικόνα 1. 10: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Κεφάλαιο 2: Βασική αρχή λειτουργίας Pulse Oximeter και Αλγόριθμοι Ποσοτικού Διαχωρισμού Χρωμοφόρων

2.1 Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη αποτελεί πρωτεϊνική ένωση του αίματος, υπάρχει μόνο στα ερυθρά αιμοσφαίρια και είναι αυτή που ουσιαστικά που δίνει στο αίμα το χαρακτηριστικό του χρώμα, για τον άνθρωπο, τα σπονδυλωτά και κάποια ασπόνδυλα ζώα. Σχηματίζεται από δύο ζεύγη διαφορετικών πρωτεϊνικών αλυσίδων και τέσσερις προσθετικές ομάδες αίμης. (Εικόνες 2.1 & 2.2) Καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η παρουσία σιδήρου σε αυτές τις ομάδες αίμης, ο οποίος έχει υψηλότερη τάση σύνδεσης με το οξυγόνο και χαμηλότερη με το διοξείδιο του άνθρακα. Γι' αυτό το λόγο, γίνεται η σύνδεση του οξυγόνου με την αιμοσφαιρίνη στους πνεύμονες, όπου εμφανίζεται και μεγάλη συγκέντρωση αυτού, οπότε και δημιουργείται η **οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη**. Έτσι, είναι δυνατή η μεταφορά οξυγόνου στα τριχοειδή αγγεία, εξαιτίας της ιδιότητας της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης να αποβάλλει εύκολα οξυγόνο.

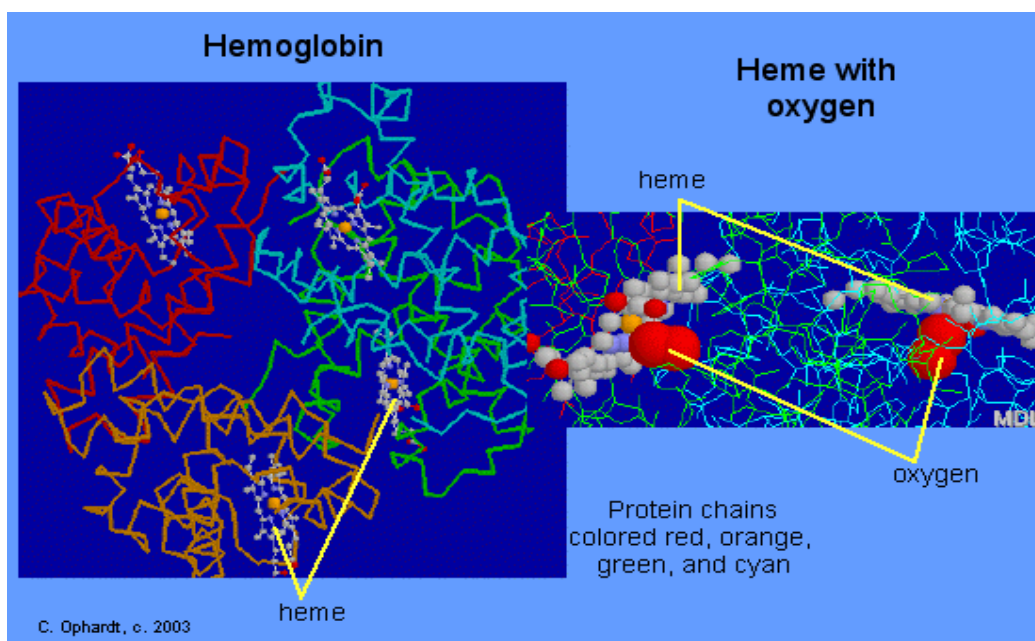


Εικόνα 2. 1: Μόριο αιμοσφαιρίνης

Το αίμα που έχει κορεστεί από οξυγόνο και έχει μεγάλη ποσότητα οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης λέγεται αρτηριακό αίμα. Αυτό καθώς φτάνει στα λεπτά τριχοειδή αγγεία διασπάται σε αιμοσφαιρίνη και οξυγόνο με αποτέλεσμα τη μεταφορά του οξυγόνου στους

ιστούς. Αντίστροφα, η απόθεση του διοξειδίου του άνθρακα στις πνευμονικές κυψελίδες γίνεται μέσω της απόθεσης του διοξειδίου του άνθρακα που αποβάλλεται από αυτούς, στην αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη αυτή ονομάζεται **μη οξυγονομένη-αιμοσφαιρίνη** και το αίμα που την περιέχει έχει πιο σκοτεινό χρώμα από το αρτηριακό και ονομάζεται φλεβικό. Η μη οξυγονομένη-αιμοσφαιρίνη διασπάται στους πνεύμονες όπου και αποβάλλεται το διοξείδιο του άνθρακα. Σύμφωνα με την περιγραφή αυτού του κύκλου φαίνεται ότι η λειτουργία της αιμοσφαιρίνης αφορά τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς και την απαγωγή του διοξειδίου του άνθρακα από αυτούς.

Η ποσότητά της στο αίμα μετριέται σε γραμμάρια (g) αιμοσφαιρίνης ανά 100 κυβικά εκατοστά (cc) αίματος. Ένας ενήλικος άνθρωπος έχει συνήθως μέσο όρο αιμοσφαιρίνης 14 g/100 cc. Ένας πρακτικός τρόπος για να υπολογίζεται ο αιματοκρίτης από την τιμή της αιμοσφαιρίνης είναι μέσω πολλαπλασιασμού της τιμής αυτής επί 3. Το γινόμενο είναι συνήθως λίγο μικρότερο από την πραγματική τιμή του αιματοκρίτη. Η ποσότητα της αιμοσφαιρίνης στο αίμα αποτελεί σημαντική διαγνωστική μέθοδο για την ιατρική καθώς μπορεί να δώσει ενδείξεις για ένα ευρύ φάσμα παθήσεων.



Εικόνα 2. 2: Πολυπεπτιδικές αλυσίδες συνδεδεμένες με μόρια O₂

2.2 Ρόλος της αιμοσφαιρίνης σε ασθένειες &

σημασία oxy-deoxy mapping

Ανεπάρκεια αιμοσφαιρίνης στον οργανισμό μπορεί να προκληθεί είτε από μείωση των μορίων αιμοσφαιρίνης στο αίμα, όπως συμβαίνει στη περίπτωση της αναιμίας, είτε από τη μειωμένη ικανότητα του κάθε μορίου να συνδεθεί με μόριο οξυγόνου, όπως συμβαίνει στις αιμοσφαιρινοπάθειες (γενετικές παθήσεις που έχουν σαν συνέπεια ανωμαλίες στη δομή του μορίου της αιμοσφαιρίνης).

Σε κάθε περίπτωση ανεπάρκεια της αιμοσφαιρίνης στο αίμα επηρεάζει αρνητικά τη κυκλοφορία του οξυγόνου στο αίμα και προκαλεί υποξία που είναι παθολογική κατάσταση κατά την οποία, ολόκληρο το σώμα (γενικευμένη υποξία) ή ένα μέρος του, στερείται επαρκούς οξυγόνωσης. Η υποξία στην οποία υπάρχει ολική στέρηση οξυγόνου ονομάζεται ανοξία και διαφέρει από την αποξαιμία που είναι μια κατάσταση κατά την οποία η μερική πίεση του οξυγόνου στο αρτηριακό αίμα είναι αφύσικα χαμηλή.

Γενικευμένη υποξία συμβαίνει σε υγιείς ανθρώπους όταν ανεβαίνουν σε μεγάλο υψόμετρο όπου προκαλείται η ασθένεια του υψόμετρου, με πιθανές θανάσιμες επιπλοκές: το πνευμονικό οίδημα μεγάλου υψόμετρου, και το εγκεφαλικό οίδημα μεγάλου υψόμετρου. Υποξία συμβαίνει επίσης σε υγιείς ανθρώπους όταν αυτοί εισπνέουν μείγματα αερίων με χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, οι δύτες για παράδειγμα, ιδίως αυτοί που χρησιμοποιούν ρυθμιστή για την ποσότητα του οξυγόνου που λαμβάνουν. Η εκπαίδευση αθλητών στο υψόμετρο εκμεταλλεύεται την ήπια υποξία που προκαλείται, για την μεγαλύτερη συγκέντρωση ερυθρών αιμοσφαιρίων στο σώμα του αθλητή με αποτέλεσμα την υψηλότερη επίδοση αυτού.

Υψηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης σχετίζονται με αύξηση του αριθμού ή του μεγέθους των ερυθροκυττάρων και προκαλούν την ερυθραιμία. Αυτή η αύξηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης στο αίμα μπορεί να προκληθεί από συγγενή καρδιοπάθεια (congenital heart disease), πνευμονική καρδιά (cor pulmonale), πνευμονική ίνωση (pulmonary fibrosis), αυξημένη ποσότητα ερυθροποιητίνης ή γνήσια ερυθραιμία (polycythemia vera).

Η αναλογία οξυγονωμένης και μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης στο αίμα παραμένει σταθερή εφόσον η κυκλοφορία του οξυγόνου από το από το αίμα στους ιστούς είναι σταθερή. Εάν όμως υπάρξει κάποια βλάβη ή ανωμαλία σε κάποιο τμήμα ενός ιστού η αναλογία oxy-deoxy

αιμοσφαιρίνης επηρεάζεται. Γι'αυτο το λόγο έχουν αναπτυχθεί πάρα πολλές μέθοδοι που αποσκοπούν στη παρακολούθηση αυτής της αναλογίας (σαν δείκτη της κατάστασης σοβαρότητας του ασθενή) σε επιφανειακό δερματικό ιστό που πάσχει από κάποια ασθένεια.

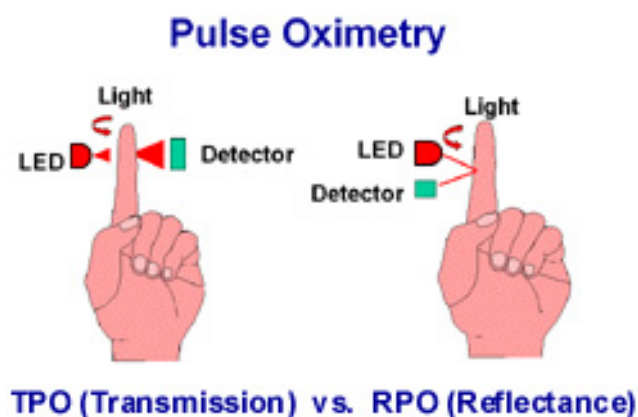
Καθώς τμήματα του δέρματος που πάσχουν από κάποια ασθένεια ή ανωμαλία (οίδημα, καρκινικός όγκος, έγκαυμα κ.α.) εμφανίζουν αυξημένες τιμές deoxy αιμοσφαιρίνης σε σχέση με την oxy Hb διότι δεν οξυγονώνονται σωστά. Γι'αυτο οι ερευνητές χρησιμοποιούν τις πληροφορίες που παίρνουν από την αναλογία της συγκέντρωσης oxy-deoxy Hb για την έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της ασθένειας, για το διαχωρισμό καλοηθών και κακοηθών όγκων και πρόβλεψη επιτυχούς ανάρρωσης τραυμάτων του δέρματος που προκλήθηκαν από εγκαύματα ή μεταμοσχεύσεις.

2.3 Θεωρητικό υπόβαθρο της Oximetry

2.3.1 Εισαγωγή στην Oximetry

Η Pulse oximetry είναι μια μη επεμβατική μέθοδος παρακολούθησης ασθενών κάτω από διάφορες συνθήκες. Το pulse oximeter δίνει στον χειριστή του χρήσιμες ενδείξεις για την καρδιο-αναπνευστική κατάσταση του ασθενή και πλέον χρησιμοποιείται ευρέως στις μονάδες εντατικής θεραπείας και κατά τη διάρκεια της αναισθησίας, όπου το προσωπικό με τη κατάλληλη εκπαίδευση παρακολουθεί διαρκώς την κατάσταση του ασθενή.

Υπάρχουν δύο μέθοδοι υπολογισμού της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης με την pulse oximetry: με μετάδοση ακτινοβολίας μέσω ενός τμήματος του σώματος ή με ανάκλαση όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.3. [13]



Εικόνα 2. 3: Είδη Pulse Oximetry

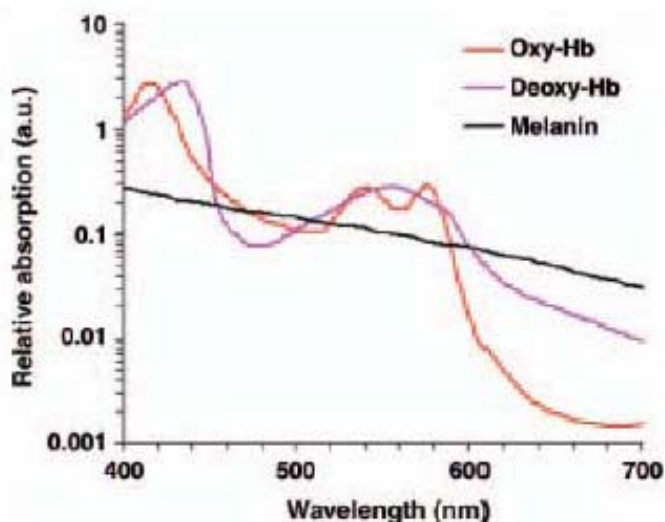
Τα pulse oximeters μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια ευρεία κατηγορία από εφαρμογές αλλά χρησιμοποιούνται κυρίως για την παρακολούθηση της οξυγόνωσης και του ποσοστού των σφυγμών των ασθενών κατά τη διαδικασία της αναισθησίας, όπως και κατά τη φάση της ανάρρωσης. Ο κορεσμός του οξυγόνου πρέπει να υπερβαίνει πάντοτε το 95%. Σε ασθενείς με μακροχρόνια καρδιοαναπνευστικά προβλήματα ή με συγγένη καρδιοπάθεια οι ενδείξεις μπορεί να είναι χαμηλότερες του αναμενόμενου και επιδεικνύουν τη σοβαρότητα της ασθένειας. Στις μονάδες εντατικής θεραπείας τα oximeters χρησιμοποιούνται ευρέως κατά τη διάρκεια του μηχανικού εξαερισμού (ventilation) και συχνά ανιχνεύουν προβλήματα με την οξυγόνωση του ασθενή προτού να γίνει αντιληπτό αυτό κλινικά.

2.3.2 Βασική Αρχή της Pulse Oximetry

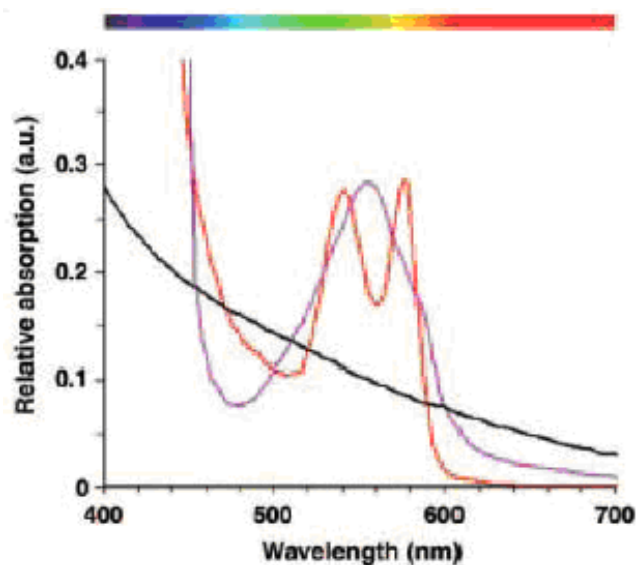
Τα Pulse oximeters μετρούν τον αρτηριακό κορεσμό του οξυγόνου της αιμοσφαιρίνης με βάση μία βασική αρχή:

- Η απορρόφηση του φωτός από την αιμοσφαιρίνη διαφέρει ανάλογα με το βαθμό οξυγόνωσης της. Η οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό μέγιστο στην απορρόφηση της στα 412nm (γνωστό σαν Soret Band) και τοπικά μέγιστα στα 542 και 577 nm (γνωστά σαν alpha-beta ή q-bands). Ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης μειώνεται σε περιοχές του φάσματος μεγαλύτερες από 600 nm, κάτι το οποίο ερμηνεύει και το κόκκινο χρώμα που εμφανίζεται στα ερυθρήματα. Η μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη παρουσιάζει μέγιστο στα 430nm και τοπικό μέγιστο στα 555 nm και χαμηλές τιμές, αν και μεγαλύτερες από την οξυγονωμένη στην «κόκκινη» περιοχή. Αυτό ερμηνεύει και το «μαύρισμα» που παρατηρείται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης, σε περιπτώσεις αιμόστασης. Τα τοπικά μέγιστα που παρουσιάζει η αιμοσφαιρίνη μας δίνουν, θεωρητικά, τη δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού της στην περιοχή 540-580nm.

Στα ισοσβεστικά σημεία η απορρόφηση του φωτός από τα δύο διαφορετικά είδη αιμοσφαιρίνης είναι η ίδια. Τα φάσματα απορρόφησης των χρωμοφόρων απαρίστανται παρακάτω στις Γραφικές 1 & 2:



Γραφική 1



Γραφική 2

Η Γραφική (1) είναι σχεδιασμένη σε λογαριθμική κλίμακα για να φανεί ότι η απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης μειώνεται κατά τρεις τάξεις μεγέθους μέχρι να φτάσει σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από τα 600 nm, ενώ η απορρόφηση της μελανίνης μειώνεται μόνο κατά μία τάξη μεγέθους.

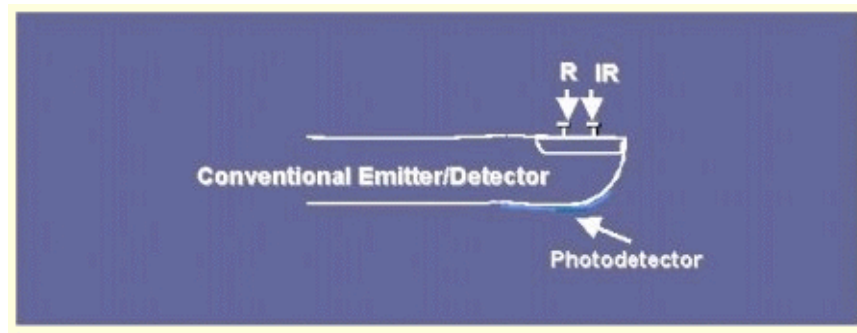
Η Γραφική (2) είναι σχεδιασμένη σε γραμμική κλίμακα για να αναπαρασταθούν οι σχετικές συνεισφορές των χρωμοφώρων στο χρώμα του δέρματος στο ορατό φάσμα. Η color-bar δείχνει την αντιστοιχία των χρωμάτων στα διάφορα μήκη κύματος.

2.4 Είδη Pulse Oximeter

2.4.1 Transmittance Pulse Oximeter

Ένα pulse oximeter αποτελείται από ένα peripheral probe (μανταλάκι), μαζί με μία μονάδα μικροεπεξεργαστή που μας δείχνει το ποσοστό του κορεσμένου οξυγόνου στο αίμα του ασθενή καθώς και το ποσοστό των σφυγμών του σε beats per minute. Το “μανταλάκι” (probe) τοποθετείται σε κάποιο περιφερειακό σημείο του σώματος, όπως σε κάποιο δάχτυλο, στο λοβό του αυτιού, ή και στη μύτη του ασθενή. Στο εσωτερικό του probe υπάρχουν τουλάχιστον 2 LED's (light emitting diodes), οπωσδήποτε ένα στην ερυθρή περιοχή του φάσματος και το άλλο στην υπέρυθρη όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.4. Οι ακτίνες του φωτός διαπερνούν τους ιστούς και φθάνουν σε ένα φωτοανιχνευτή που βρίσκεται στο πίσω μέρος του σώματος. Καθώς το φως περνάει μέσα από το σώμα ένα μεγάλο ποσοστό του απορροφάται από το αίμα και τους

ιστούς ανάλογα με τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης. Το ποσοστό της απορρόφησης της ακτινοβολίας σε κάθε συχνότητα εξαρτάται από το βαθμό οξυγόνωσης της αιμοσφαιρίνης στους ιστούς.



Εικόνα 2. 4: Αρχή Λειτουργίας TPO

Από τη αναλογία της ακτινοβολίας που απορροφάται σε κάθε συχνότητα, ο μικροεπεξεργαστής υπολογίζει τη σχέση μεταξύ οξυγονομένης και μη αιμοσφαιρίνης. Στη μνήμη του μικροεπεξεργαστή υπάρχει μια βάση δεδομένων με τιμές κορεσμένου οξυγόνου από πειράματα που έγιναν σε ασθενείς, ώστε να συγκριθούν η αναλογία οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης στα δύο μήκη κύματος με τις ήδη υπάρχουσες αποθηκευμένες τιμές. [1] [2] [3]



Εικόνα 2. 5: Εφαρμογές TPO

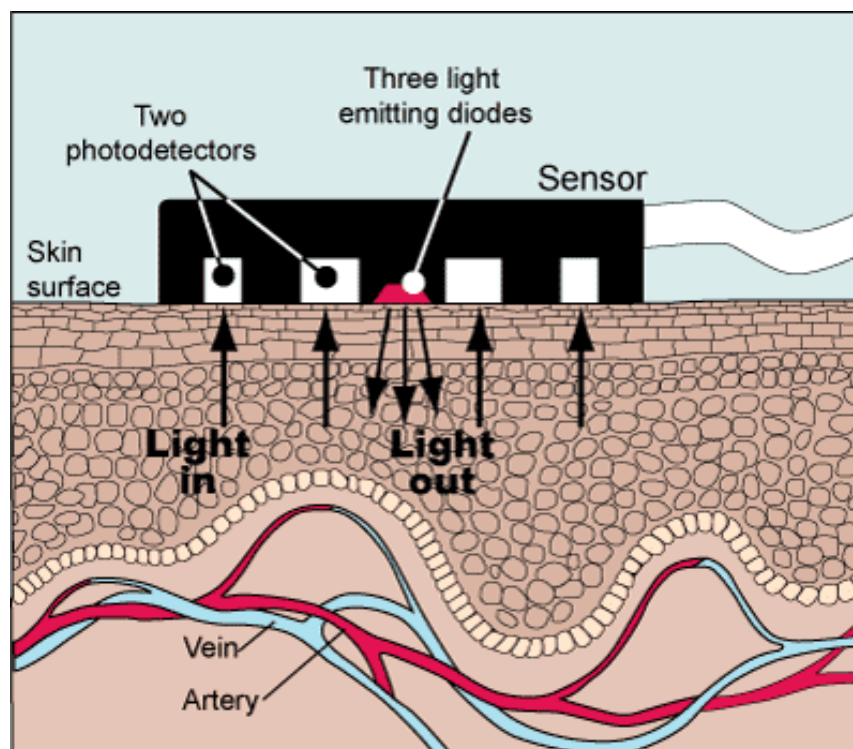
Το pulse oximeter δεν δίνει πληροφορίες για καμία από τις παρακάτω μεταβλητές:

- Το ποσοστό του οξυγόνου που είναι διαλυμένο στο αίμα
- Τον αναπνευστικό ρυθμό του ασθενή
- Τη πίεση του αίματος και τη λειτουργία της καρδιάς

Η λειτουργία ενός pulse oximeter επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι: ο περιβαλλοντικός φωτισμός, πιθανές ανωμαλίες στα ερυθρά αιμοσφαίρια, η αγγειοσυστολή και η καρδιακή λειτουργία. Το pulse oximeter δεν δίνει πληροφορίες για τον εξαερισμό (ventilation) του ασθενή, παρά μόνο για την οξυγόνωση του.

2.4.2 Reflection pulse oximetry

Η Reflection pulse oximetry (RPO) σε αντίθεση με την transmittance χρησιμοποιεί ανακλώμενο φως αντί για μεταδιδόμενο (Εικόνα 2.6). Γενικά η transmission μέθοδος μπορεί μονάχα να χρησιμοποιηθεί σε περιορισμένα σημεία του σώματος, όπως στα δάχτυλα και στους λοβούς αυτιών. Επιπλέον σε ορισμένες περιπτώσεις όταν η transmission μέθοδος χρησιμοποιείται, φυσιολογικές καταστάσεις, όπως το stress και η θερμοκρασία μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια των υπολογισμών του pulse oximeter.



Εικόνα 2. 6: Αρχή λειτουργίας RPO

2.5 Υπολογισμός του κορεσμένου οξυγόνου στο αίμα (SaO_2)

Το οξυγόνο που είναι χημικά συνδεδεμένο με την αιμοσφαιρίνη στα ερυθροκύτταρα αποτελεί σχεδόν όλο το ποσοστό του οξυγόνου μέσα στο αίμα. (υπάρχει και ένα πολύ μικρό ποσοστό που

είναι διαλυμένο μέσα στο πλάσμα). Το κορεσμένο οξυγόνο στο αίμα που συχνά αναφέρεται ως, SaO_2 or SpO_2 , ορίζεται ως η αναλογία της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης (HbO_2) προς τη συνολική συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στο αίμα:

$$S_pO_2 = \frac{HbO_2}{HbO_2 + Hb}$$

Το αρτηριακό SaO_2 είναι μια παράμετρος που μετριέται με την oximetry και εκφράζεται σαν ποσοστό. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το αρτηριακό αίμα είναι 97% κορεσμένο, ενώ το φλεβικό είναι 75% κορεσμένο.

Είναι δυνατόν να χρησιμοποιήσουμε τα διαφορετικά φάσματα απορρόφησης της HbO_2 και Hb για τη μέτρηση του αρτηριακού κορεσμένου οξυγόνου *in vivo* διότι το εύρος από τα 600 μέχρι τα 1000nm είναι επίσης το εύρος για το οποίο υπάρχει η ελάχιστη απορρόφηση από τους ιστούς (tissue and pigmentation absorb blue, green and yellow light and water absorbs the longer infrared wavelength).

Μετράμε το φως που διέρχεται μέσω της άκρης ενός δαχτύλου (ή το λοβό του αυτιού) σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος, ένα στη κόκκινη και ένα στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος. Εάν υποθέσουμε αρχικά ότι η μετάδοση του φωτός μέσω ενός σώματος επηρεάζεται μόνο από τις σχετικές συγκεντρώσεις της HbO_2 και Hb και τους συντελεστές απορρόφησης στα δύο διαφορετικά μήκη κύματος, τότε η ένταση του φωτός θα μειώνεται λογαριθμικά κατά τη διαδρομή, σύμφωνα με το νόμο **Beer–Lambert**. Αν θεωρήσουμε, μια αρτηρία μήκους l μέσα από την οποία η δέσμη φωτός αρχικής έντασης I_{in} περνάει με βάση τον παραπάνω νόμο έχουμε:

$$\text{Στο μήκος κύματος } \lambda_1, I_1 = I_{in1} 10^{(a_{o1}C_o / a_{r1}C_r) l}$$

$$\text{Στο μήκος κύματος } \lambda_2, I_2 = I_{in2} 10^{(a_{o2}C_o / a_{r2}C_r) l}$$

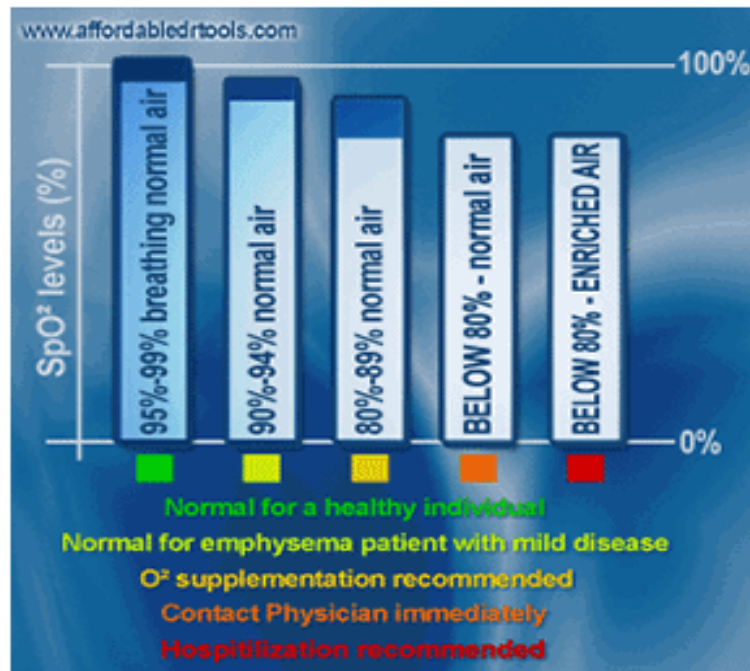
όπου

- C_o είναι η συγκέντρωση της οξυγονομένης αιμοσφαιρίνης (HbO_2)
- C_r είναι η συγκέντρωση της μη οξυγονομένης αιμοσφαιρίνης (Hb)
- a_{on} είναι ο συντελεστής απορρόφησης της HbO_2 στο μήκος κύματος λ_n
- a_{rn} είναι ο συντελεστής απορρόφησης της Hb στο μήκος κύματος λ_n

$$A_v \quad R = \log_{10}(I_1/I_{in1}) / \log_{10}(I_2/I_{in2})$$

Τότε προκύπτει η σχέση:

$$S_pO_2 = C_o / (C_o + C_r) = a_{r2} R a_{r1} / [(a_{r2} a_{o2}) R (a_{r1} a_{o1})]$$



Εικόνα 2. 7: Ιστόγραμμα τιμών SpO₂

2.6 Αλγόριθμοι Ποσοτικού Προσδιορισμού Χρωμοφόρων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των χρωμοφόρων (oxy-deoxyHb, H₂O, melanin) στον ανθρώπινο δερματικό ιστό είναι χρήσιμος για την ανίχνευση διαφόρων μορφών καρκίνου του δέρματος και ασθενειών, παρακολούθηση της υγείας του ασθενή και του μεταβολισμού του δέρματος. Γι'αυτούς τους λόγους πολλοί ερευνητές τα τελευταία χρόνια ασχολήθηκαν με τη δημιουργία αλγορίθμων ποσοτικού προσδιορισμού των χρωμοφόρων. Εμείς ασχοληθήκαμε με

τους αλγορίθμους ποσοτικού προσδιορισμού της oxy-Hb και deoxy-Hb, που παρουσιάζονται παρακάτω:

2.6.1 Feather

Σύμφωνα με τον αλγόριθμο του Feather ο δείκτης της αιμοσφαιρίνης που είναι ανάλογος της συνολικής ποσότητας Hb και ανεξάρτητος του βαθμού οξυγόνωσης μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας τη διαφορά μεταξύ των isobestic points, τα οποία αντιστοιχούν στα μήκη κύματος εκείνα όπου τα φάσματα απορρόφησης της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης τέμνονται. Στη φασματική περιοχή 500-600 nm υπάρχουν πέντε isobestic points στα 500, 527.5, 544, 573 και στα 582.5 nm. Ο δείκτης IHB σύμφωνα με τον Feather δίνεται από τη παρακάτω σχέση:

$$IHB = [(L_{544} - L_{527.5})/16.5 - (L_{573} - L_{544})/29] \times 100 \text{ (absorbance nm}^{-1}\text{)}$$

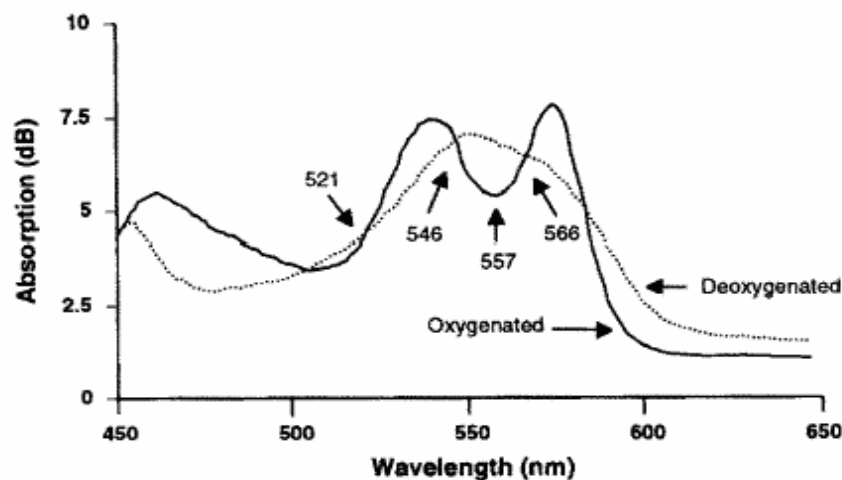
Ενώ ο δείκτης οξυγόνωσης δίνεται από τη σχέση:

$$IOX = [(L_{573} - L_{558.5}) - (L_{558.5} - L_{544})] \times 100 / (14.5 \times IHB)$$

Όπου $LIR = \log_{10} 1/R = \log (I_o / I)$ (Logarithm of inverse reflection)

Όπου I_o είναι ένταση της ακτινοβολίας που ανακλάται από την λευκή επιφάνεια και I η ένταση της ακτινοβολίας που ανακλάται από την υπό εξέταση επιφάνεια.

Όπως παρατηρούμε ο oxygenation index για να είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης της Hb διαιρείται με το haemoglobin index και παίρνει θετικές τιμές για oxy-Hb ενώ αρνητικές για deoxy-Hb. [4]



Γραφική 3

2.6.2 Ferguson-Pell

Ομοίως και οι Ferguson –Pell για να δημιουργήσουν το δείκτη της αιμοσφαιρίνης στηρίχτηκαν στα isobestic points της Hb ή στα μήκη κύματος όπου η απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης δεν επηρεάζεται από το επίπεδο οξυγονώσής της. Οι δείκτες αιμοσφαιρίνης και οξυγόνωσης σύμφωνα με τους Ferguson-Pell δίνονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$IHB = [(A_{545} - A_{522})/23 - (A_{568} - A_{545})/23] \times (100/2)$$

και

$$IOX = [(A_{568} - A_{557}) / (11 \times IHB) - (A_{557} - A_{545}) / (12 \times IHB)] \times (100/2)$$

όπου A_{xxx} η απορρόφηση που αντιστοιχεί στο xxx μήκος κύματος.

2.6.3 Hajizadeh

Ο Hajizadeh με βάση τον Feather δημιούργησε το δείκτη οξυγόνωσης αίματος SaO₂ και το δείκτη αιμοσφαιρίνης H όπως φαίνεται παρακάτω:

$$H = [(L_{544} - L_{527.5})/16.5 - (L_{573} - L_{544})/29]100$$

$$SaO_2 = [(L_{573} - L_{558.5})/14.5 - (L_{558.5} - L_{544})/14.5] \frac{5.1 \times 10^3}{H} + 42$$

Όπου L_x είναι η τιμή του LIR στο x μήκος κύματος και δίνεται από τη σχέση:

$$LIR_c = -\log_{10} (10^{-LIR_0} - 0.025)$$

Δηλαδή η διαφορά του στον υπολογισμό του LIR σε σχέση με το Feather ήταν ότι αφαίρεσε από το οπισθοσκεδαζόμενο φάσμα το ποσοστό που δεν περιείχε πληροφορίες σχετικά με τις χρωμοφόρες. [6]

2.6.4 Shimada-Yamada

Οι Shimada και Yamada χρησιμοποίησαν για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων αιμοσφαιρίνης την σχέση:

$$\Delta A_i(\lambda) = \varepsilon_i(\lambda) \Delta C_i \bar{l}_i(\lambda).$$

Όπου τα ΔCHb και ΔCHbO υπολογίστηκαν παίρνοντας τη διαφορά των συγκεντρώσεων οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης στη φασματική περιοχή 520-580nm.

Ενώ η απορρόφηση δίνεται από τη σχέση :

$A = -\log_{10} R$, όπου $A(\lambda)$ το φάσμα απορρόφησης και $R(\lambda)$ ανάκλασης.

Όπου $I(\lambda) = I_{\text{upper blood net dermis}} + I_{\text{deep blood net dermis}}$, σύμφωνα με το διαχωρισμό του δέρματος που έκανε ο Meglinski (αιμοσφαιρίνη στο 3 και στο 6 στρώμα του δέρματος).

Έτσι για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων της oxy-deoxy Hb χρησιμοποιούμε τη σχέση:

$$A = \varepsilon C x I / 64,500 \quad [(1/\text{cm}) / (\text{moles/litre})] x) \quad [\text{g/litre}] x) [\text{cm}] / \quad [\text{g/mole}]]$$

Όπου:

- $\varepsilon(\lambda)$:είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης,
- C :η μοριακή συγκέντρωση,
- 64,500:είναι το γραμμικό μοριακό βάρος της αιμοσφαιρίνης.
- $I(\lambda)$ η μέση διαδρομή

Παρακάτω δίνονται οι τιμές για το μοριακό συντελεστή απορρόφησης $\varepsilon(\lambda)$ στα 520 και 580nm τόσο για την οξυγονωμένη όσο και τη μη οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη. [5] [7]

e	HbO ₂	Hb	
520nm	24202,4	31589,6	cm-1/M
580nm	50104	37020	

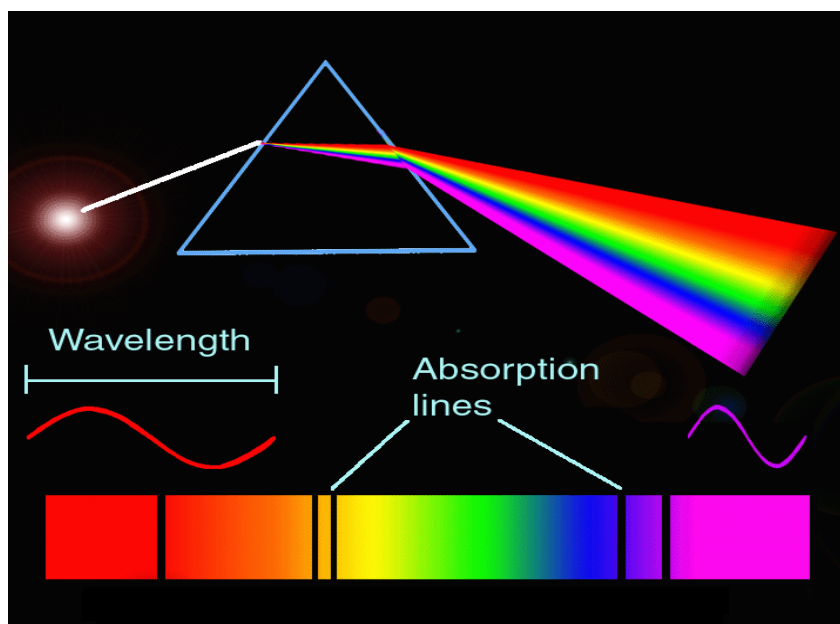
Κεφάλαιο 3 : Υπερφασματική Απεικόνιση και Αλγόριθμοι Ταξινόμησης

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί παρέχουμε πληροφορίες για τα μέσα που χρησιμοποιήσαμε για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας και τα βασικά στοιχεία των αλγορίθμων ταξινόμησης φασμάτων ανάκλασης που χρησιμοποιήσαμε για την ανίχνευση και χαρτογράφηση της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης.

3.1 Φασματική απεικόνιση

Η φασματοσκοπία είναι η μελέτη της ακτινοβολίας που εκπέμπεται ή ανακλάται ή σκεδάζεται ή απορροφάται από υλικά, στο πεδίο της συχνότητας ή στο πεδίο του χρόνου προκειμένου να προσδιορίσει τις φυσικές ή χημικές ιδιότητες του ‘ αντικειμένου ’.

Η φασματική απεικόνιση αναλύει τα μικροσκοπικά και μακροσκοπικά δείγματα στα διάφορα μήκη κύματος, επιτρέποντας υψηλής ανάλυσης φάσμα (ένταση ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος) να αποκτηθεί σε κάθε pixel της εικόνας. Το αποτέλεσμα είναι ένας κύβος εικόνας που περιέχει φασματική και χωρική πληροφορία. Η φασματική πληροφορία μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ταξινομώντας κάθε pixel, ανάλογα με την ένταση του σήματος στην εικόνα. Αντί να ταξινομείται κάθε pixel με απόλυτο τρόπο, οι εντάσεις μοντελοποιούνται σαν γραμμικός συνδυασμός του φάσματος. Αν δοθεί μια βιβλιοθήκη από τα βασικά φάσματα, που αντιστοιχούν σε γνωστά στοιχεία του δείγματος, το ποσοστό του κάθε βασικού φάσματος που συνεισφέρει στο pixel μπορεί να προσδιοριστεί. Χρησιμοποιώντας τα ποσοστά αυτά και τις ολικές εντάσεις του pixel, η ποσότητα του κάθε υλικού από τη φασματική βιβλιοθήκη στο συγκεκριμένο φάσμα μπορεί να μετρηθεί και να αναλυθεί χωρικά.



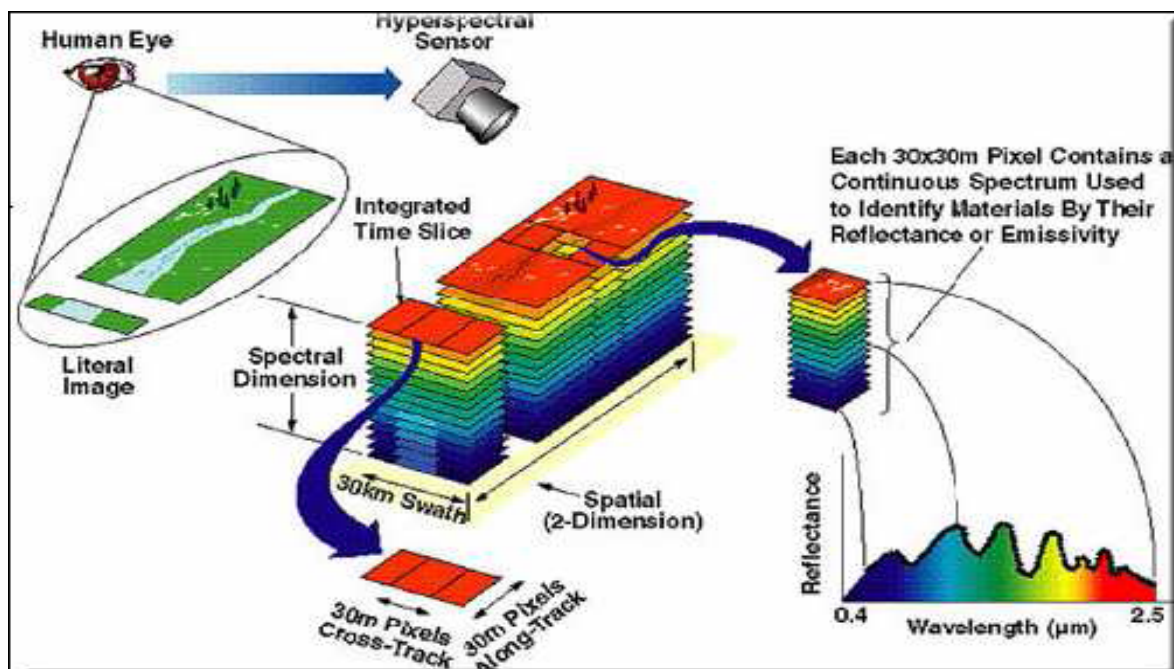
Εικόνα 3. 1: Αρχή φασματοσκοπίας

Τυπικά, μία υπερφασματική εικόνα έχει τη μορφή ενός κύβου όπου οι δύο διαστάσεις αφορούν τη χωρική πληροφορία και η τρίτη τη φασματική. Κατά συνέπεια κάθε εικονοστοιχείο μπορεί να θεωρηθεί ως διάνυσμα στήλης του οποίου οι επιμέρους τιμές αντιπροσωπεύουν το συντελεστή ανακλαστικότητας του εικονοστοιχείου σε συγκεκριμένα κανάλια. Οι φασματικές υπογραφές οι οποίες εξάγονται από τα εικονοστοιχεία της εικόνας συγκρίνονται με αυτές που είναι καταχωρημένες στη βιβλιοθήκη φασματικών υπογραφών (spectral signature library). Με αυτόν τον τρόπο αναγνωρίζονται και χαρτογραφούνται τα αντικείμενα της εικόνας. Η βιβλιοθήκη φασματικών υπογραφών (spectral signature library) αποτελείται από φασματικές υπογραφές των αντικειμένων-στόχων οι οποίες μπορεί να συλλεχθούν στο πεδίο, στον εργαστηριακό χώρο και από την ίδια την υπερφασματική εικόνα.

Αυτήν την περίοδο υπάρχει μεγάλη ποικιλία υπερφασματικών αισθητήρων (sensors) και η επιλογή του καταλληλότερου εξαρτάται από τον επιθυμητό βαθμό χωρικής και φασματικής ανάλυσης (spatial and spectral resolution) και από τους διαθέσιμους πόρους, καθώς έχουν αυξημένο κόστος ιδιαίτερα σε σύγκριση με τους πολυφασματικούς. Με τον όρο χωρική ανάλυση (spatial resolution) γίνεται αναφορά στην ελάχιστη απόσταση μεταξύ δύο παρακείμενων αντικειμένων ή στο ελάχιστο εμβαδόν ενός αντικειμένου ενώ με τον όρο φασματική ανάλυση (spectral resolution) ορίζεται το ελάχιστο φασματικό εύρος που απαιτείται για τη διάκριση δύο φασματικών χαρακτηριστικών γνωρισμάτων.

3.1.2 Υπερφασματική απεικόνιση

Με την **υπερφασματική απεικόνιση** συλλέγουμε και επεξεργαζόμαστε πληροφορίες από ολόκληρο το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Η υπερφασματική απεικόνιση χρησιμοποιείται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών αν και αρχικά αναπτύχθηκε για την ανίχνευση ορυκτών πόρων και τη γεωλογία (Η δυνατότητα που προσφέρει η υπερφασματική απεικόνιση στον προσδιορισμό των διαφόρων μετάλλων την καθιστά ιδανικό εργαλείο για τη μεταλλεία και τις εταιρίες πετρελαίου). Οι υπερφασματικοί αισθητήρες συλλέγουν δεδομένα εικόνων έως και σε εκατοντάδες στενές φασματικές ζώνες με φασματική ανάλυση της τάξης των 10 nm ή και μικρότερη με αποτέλεσμα να παράγουν ένα πλήρες, συνεχές φάσμα για κάθε pixel της εικόνας. Η ανάπτυξη αυτών των πολύπλοκων αισθητήρων είναι εφικτή με το συνδυασμό δύο σχετικών αλλά διαφορετικών τεχνολογιών: της φασματοσκοπίας και της τηλεπισκόπησης. Οι φασματικές εικόνες κύβων είναι παρόμοιες με το σύνολο των εικόνων ενός αντικειμένου, δείγματος ή τοποθεσίας, όπου κάθε εικόνα αποκτάται σε μία στενή φασματική ζώνη. Κάθε pixel στους κύβους εικόνων απεικονίζει το φάσμα σε εκείνο το σημείο.

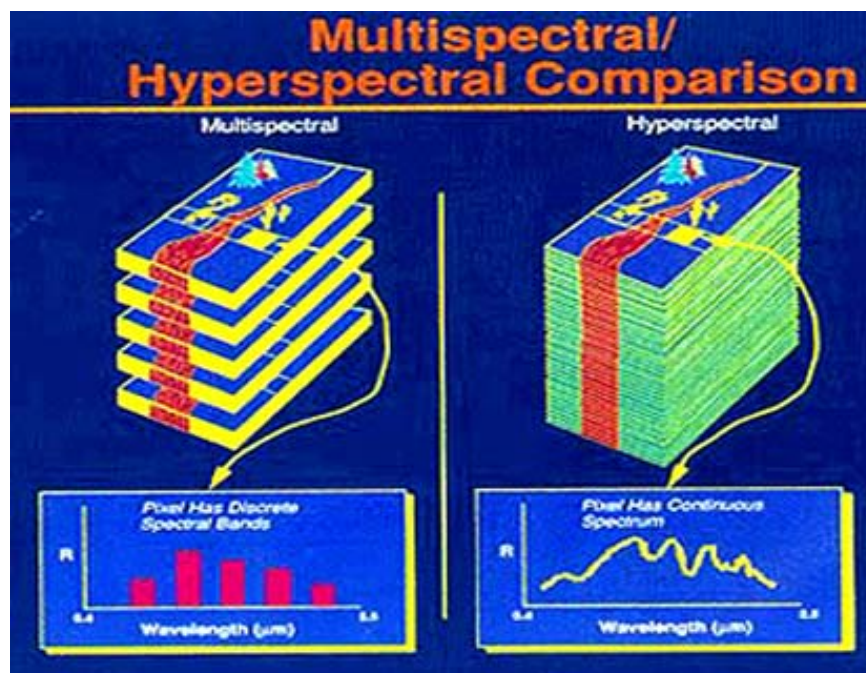


Εικόνα 3. 2: Παρουσίαση της υπερφασματικής απεικόνισης

Πηγή: Naval EarthMap Observer (NEMO)

Στη φασματοσκοπία ανακλώμενου φωτός σκοπός μας είναι να μετρήσουμε την αναλογία της ενεργειας του ανακλώμενου φωτός προς την ενέργεια του προσπίπτοντος φωτός, σαν συνάρτηση του μήκους κύματος. Η ανάκλαση διαφέρει ανάλογα με το μήκος κύματος για τα περισσότερα υλικά γιατί η ενέργεια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος σκεδάζεται ή απορροφάται σε διαφορετικό βαθμό. Αυτές η διαφορές στην ανάκλαση είναι ορατές όταν συγκρίνουμε καμπύλες από φάσματα ανάκλασης διαφορετικών υλικών, κάτι που μας βοηθάει να διαχωρίσουμε διαφορετικά υλικά μεταξύ τους.

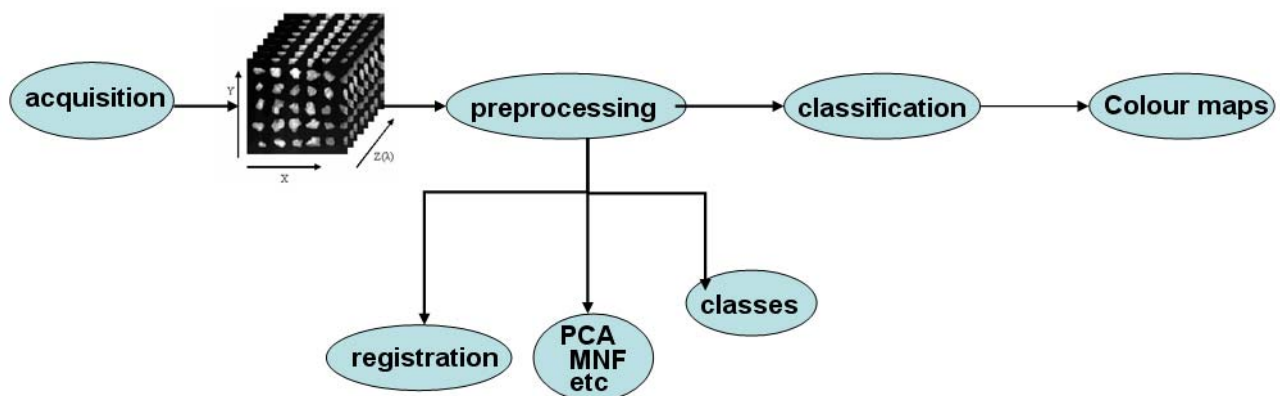
Η διαφορά μεταξύ των συστημάτων υπερφασματικής απεικόνισης και των πολυφασματικών συστημάτων είναι ο αριθμός των φασματικών ζωνών. Τα πολυφασματικά δεδομένα περιέχουν από δεκάδες έως εκατοντάδες φασματικές ζώνες, ενώ τα υπερφασματικά περιέχουν από εκατοντάδες έως χιλιάδες φασματικές ζώνες. Με αποτέλεσμα τα πολυφασματικά συστήματα να έχουν φίλτρα περιορισμένων ζωνών, με μεγαλύτερο εύρος φάσματος συγκριτικά με της υπερφασματικής απεικόνισης, προκαλώντας μικρότερη φασματική ανάλυση. Η υπερφασματική απεικόνιση χρησιμοποιεί στενό εύρος φάσματος, εξασφαλίζοντας υψηλή φασματική ανάλυση. Συγκεκριμένα, στα συστήματα πολυφασματικής απεικόνισης, οι απεικονιστικοί μονοχρωμάτορες είναι σχετικά απλές διατάξεις και επιτρέπουν την λήψη εικόνων σε δέκα ή λιγότερες διαφορετικές περιοχές του οπτικού φάσματος. Αντίθετα, στην περίπτωση της υπερφασματικής απεικόνισης οι μονοχρωμάτορες επιτρέπουν την λήψη διαδοχικών εικόνων σε 30-100 διαφορετικές περιοχές του οπτικού φάσματος και η τεχνολογία τους είναι πολύ υψηλού επιπέδου.



Εικόνα 3. 3: Hyperspectral vs Multispectral

3.2 Επεξεργασία υπερφασματικών δεδομένων

Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα περιγράφουμε τα βασικά βήματα που ακολουθούμε, για να αποκτήσουμε χρήσιμες πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης:



Εικόνα 3. 4: Βήματα από την απόκτηση του φασματικού κύβου έως την απεικόνιση ουσιαστικής πληροφορίας

3.2.1 Προεπεξεργασία δεδομένων

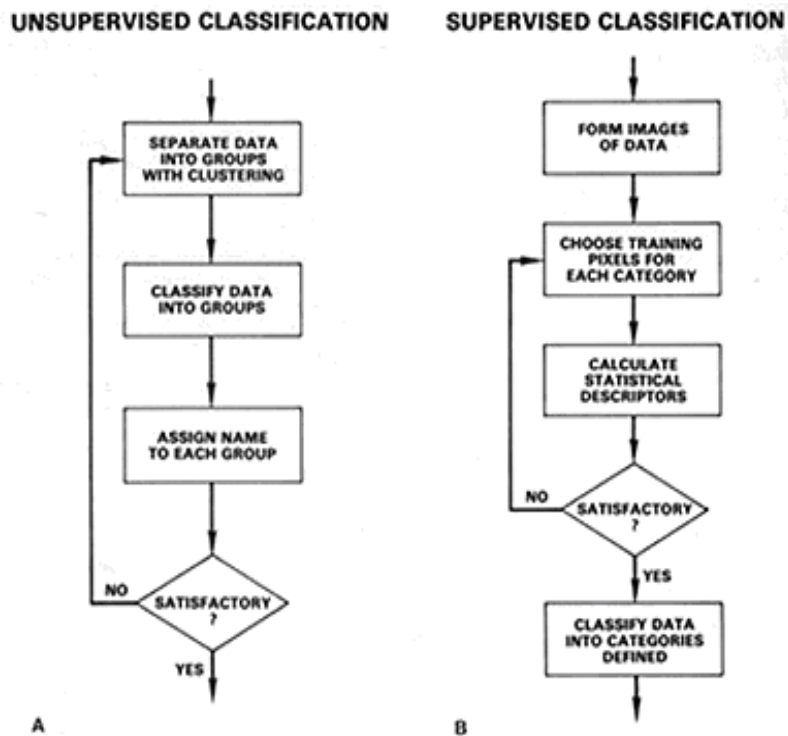
Κατά τη λήψη των υπερφασματικών κύβων είναι αναπόφευκτοι παράγοντες η παρουσία θορύβου και η μη σωστή ευθυγράμμιση του κύβου. Γι'αυτούς τους λόγους, πριν χρησιμοποιήσουμε τον φασματικό κύβο στο περιβάλλον ανάλυσής μας, πρέπει να περιορίσουμε, να αφαιρέσουμε ή και να εμπλουτίσουμε κάποιες όψεις των κύβων μας, ώστε να αφαιρέσουμε τις ατέλειες που προκαλούνται κατά την διάρκεια των μετρήσεων. Έτσι κάνουμε προεπεξεργασία του φασματικού κύβου με το Image Registration από την πολυφασματική κάμερα MuSIS. Η ανάγκη αυτή δημιουργήθηκε από την σχετική κίνηση ανάμεσα στον μηχανισμό μέτρησης και τον στόχο της κάμερας αλλά και τις οπτικές ιδιότητες των εξαρτημάτων που χρησιμοποιούμε στο πείραμα, που καταλήγουν σε λανθασμένη τοποθέτηση των εικόνων στην στοίβα του φασματικού κύβου. Ευθυγραμμίζοντας τις εικόνες του φασματικού κύβου ευθυγραμμίζουμε τα pixels, έτσι ώστε η επιλογή ενός pixel να καταλήγει

στο ίδιο pixel για κάθε φέτα του φασματικού κύβου. Σε κάποια φάση του πειράματος μας όπου δεν προέκυπταν καθαρές εικόνες εξαιτίας της παρουσίας θορύβου εφαρμόσαμε και μια άλλη μέθοδο προεπεξεργασίας την Principal Component Analysis (PCA).

Η **PCA** είναι μια στατιστική τεχνική, που εξετάζει τις σχέσεις που διέπουν τις μεταβλητές ενός συνόλου δεδομένων και βρίσκει ένα υποσύνολο από τις πιο σημαντικές μεταβλητές. Οι νέες μεταβλητές περιγράφονται σαν γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών και κατατάσσονται σε σειρά σημαντικότητας σε σχέση με τη διακύμανση των δεδομένων που η κάθε μια εκφράζει. Η πρώτη σημαντική συνιστώσα (**principal component**) είναι η μεταβλητή που εκφράζει το μέγιστο ποσό διακύμανσης. Η δεύτερη σημαντική συνιστώσα εκφράζει το επόμενο μεγαλύτερο ποσό διακύμανσης και είναι ανεξάρτητη από της πρώτης κ.ο.κ.. Ουσιαστικά, το σύνολο των αρχικών σχετιζόμενων μεταβλητών μετασχηματίζεται σε ένα σύνολο ασυσχέτιστων μεταβλητών, όπου οι λιγότερο σημαντικές μεταβλητές μπορούν να απομακρυνθούν χωρίς ουσιαστική απώλεια πληροφορίας. Εφαρμόζοντας συνεπώς την **PCA** και αφαιρώντας τις συνιστώσες που αντιστοιχούν στον θόρυβο μπορούμε να επιτύχουμε σημαντική μείωση του.

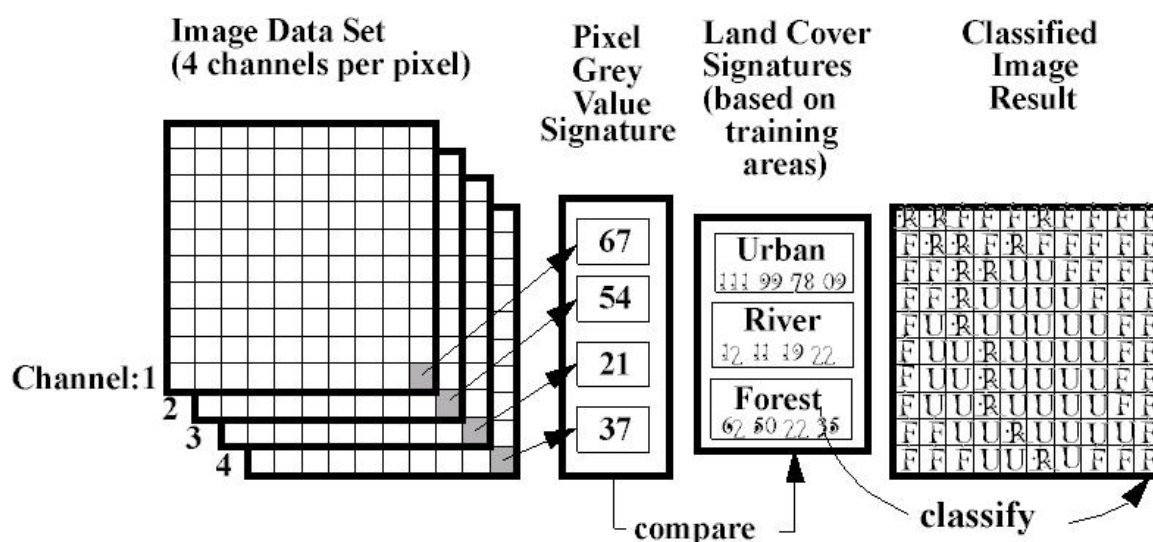
3.2.2 Image Classification

Ο σκοπός της διαδικασίας ταξινόμησης είναι να κατηγοριοποιήσει όλα τα pixels σε μια ψηφιακή εικόνα, σε μία συγκεκριμένη κλάση. Δύο είδη ταξινόμησης είναι η supervised και η unsupervised classification, τα βήματα των οποίων φαίνονται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Εικόνα 3. 5: Βήματα Supervised & Unsupervised classification

Στην *unsupervised classification* κάθε pixel συγκρίνεται με όλα τα υπόλοιπα της ομάδας (cluster) για να βρεθεί με ποιο είναι πιο κοντινό. Στη συνέχεια δημιουργείται ένας χάρτης όλων των pixels, που έχουν κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με το σε ποια ομάδα (cluster) ανήκουν, όπου διαφορετικά χρώματα κατανέμονται σε κάθε ομάδα. Δηλαδή η *unsupervised classification* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ομαδοποιήσει pixels σε ομάδες με βάση στατιστικά τους στοιχεία μόνο. Ενώ η *supervised classification* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ομαδοποιήσει pixels σε ομάδες ανάλογα με τις ορισμένες από το χρήστη training classes. Αυτός ο τύπος ταξινόμησης απαιτεί να επιλέξει ο χρήστης training areas για χρήση ώστε να γίνει η ταξινόμηση. Διάφορες μέθοδοι σύγκρισης χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για να καθορίσουν αν ένα συγκεκριμένο pixel αντιστοιχεί στη σωστή κλάση.



Εικόνα 3. 6: Βήματα της supervised classification

3.3 Αλγόριθμοι φασματικής ταξινόμησης

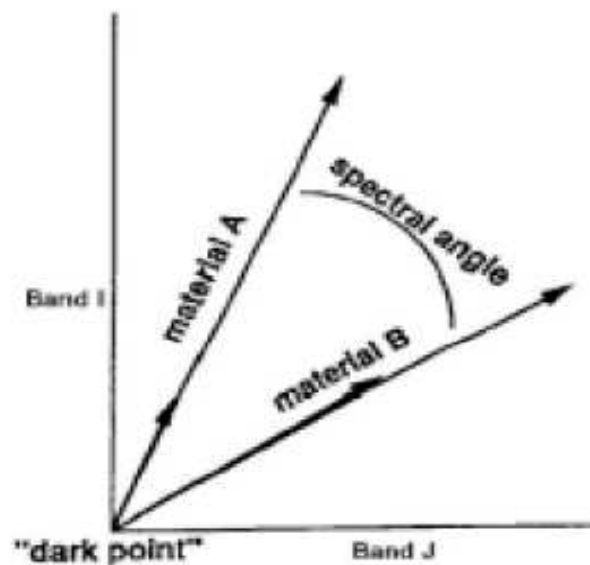
Υπάρχουν πολλοί αλγόριθμοι φασματικής ταξινόμησης που έχουν αναπτυχθεί ώστε να εκμεταλευτούν τις πληροφορίες που μας παρέχει μια υπερφασματική εικόνα. Οι περισσότεροι από αυτούς τους αλγόριθμους επίσης προσφέρουν ακριβή, άλλα πιο περιορισμένες αναλύσεις πολυφασματικών δεδομένων. Οι μέθοδοι φασματικής ανάλυσης συνήθως συγκρίνουν φάσματα pixel με ένα φάσμα αναφοράς. Εμείς για την επεργασία των εικόνων στα πειραματά μας, χρησιμοποιήσαμε τους Spectral Angle Mapper (SAM) και Spectral Information Divergence (SID) που τους περιγράφουμε παρακάτω:

3.3.1 Spectral Angle Mapper (SAM)

Ο αλγόριθμος Φασματικής Γωνίας, Spectral Angle Mapper (SAM) εφαρμόζεται για την διάκριση των αντικειμένων-στόχων από το υπόβαθρο μέσω μέτρησης της ομοιότητας των ψηφιακών τιμών (Kruse 1993) στο επίπεδο του εικονοστοιχείου (whole pixel method). Πιο συγκεκριμένα, με την προϋπόθεση ύπαρξης φασματικών υπογραφών αναφοράς για τους στόχους (για παράδειγμα από τη βιβλιοθήκη φασματικών υπογραφών) γίνεται σύγκριση με τη ψηφιακή τιμή κάθε εικονοστοιχείου. Ο αλγόριθμος SAM υποθέτει ότι τα εικονοστοιχεία έχουν μειωμένη ανακλαστικότητα (apparent reflectance), δηλαδή ο αληθινός συντελεστής ανακλαστικότητας πολλαπλασιάζεται με κάποιον άγνωστο παράγοντα ο οποίος ελέγχεται από

την τοπογραφία και τις σκιές. Η ομοιότητα μεταξύ δύο φασματικών υπογραφών (του στόχου και του εικονοστοιχείου) τα οποία θεωρούνται διανύσματα υπολογίζεται μέσω της φασματικής τους γωνίας (spectral angle) σε χώρο διάστασης ίσης με τον αριθμό των καναλιών. Όσο μικρότερη είναι η γωνία, τόσο περισσότερο όμοιες είναι οι φασματικές υπογραφές.

Μία απλουστευμένη εξήγηση δίνεται εάν θεωρηθεί πως τα κανάλια είναι δύο. Σε αυτήν την περίπτωση, η φασματική υπογραφή αναφοράς και η <<άγνωστη>> (προς εξέταση) φασματική υπογραφή απεικονίζονται σε δυσδιάστατο χώρο ως σημεία για ένα δεδομένο φωτισμό ή ως διανύσματα για όλους τους πιθανούς φωτισμούς. Επειδή ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί μόνο τη <<κατεύθυνση>> των φασμάτων, και όχι <<το μήκος τους>> η μέθοδος δεν επηρεάζεται από τον άγνωστο παράγοντα της έντασης της ακτινοβολίας και όλοι οι πιθανοί φωτισμοί αντιμετωπίζονται όμοια. Όπως είναι προφανές, η γωνία μεταξύ των διανυσμάτων είναι η ίδια ανεξαρτήτως του μήκους τους. Το μήκος του διανύσματος αφορά μόνο στο πόσο φωτισμένο είναι το εικονοστοιχείο.



Εικόνα 3. 7: Δυσδιάστατο παράδειγμα του Spectral Angle Mapper (SAM)

Ο αλγόριθμος SAM αποτελεί εύκολη και γρήγορη μέθοδο σύγκρισης των φασμάτων της εικόνας με τα φάσματα αναφοράς. Επίσης, είναι μία πολύ ισχυρή μέθοδος ταξινόμησης καθώς καταστέλλει την επιρροή της σκίασης των αποτελεσμάτων και τονίζει τη φασματική υπογραφή των στόχων.

Η μαθηματική σχέση με την οποία υπολογίζεται η γωνία μεταξύ της φασματικής υπογραφή αναφοράς και του άγνωστου είναι η εξής:

$$SAM(t_i, r_i) = \cos^{-1}(t_i r_i / \|t_i\| \cdot \|r_i\|)$$

$$= \cos^{-1}\left(\frac{\sum_{i=1}^L t_i r_i}{\sum_{i=1}^L t_i^{1/2} \sum_{i=1}^L r_i^{1/2}}\right)$$

όπου L το πλήθος των καναλιών

t_i : η φασματική υπογραφή του εικονοστοιχείου

r_i : η φασματική υπογραφή αναφοράς

Για την εκτίμηση της ομοιότητας εισάγεται ένα κατώτερο όριο (κατώφλι) για την τιμή της γωνίας από το οποίο εξαρτάται το αποτέλεσμα. Στην περίπτωση που το κατώτερο όριο έχει μεγάλη τιμή μπορεί να περιληφθούν μη επιθυμητά αντικείμενα-στόχοι ενώ έχοντας μικρή τιμή κατωφλίου μπορεί να αποκλειστούν οι επιθυμητοί στόχοι. Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό να δίνεται προσοχή κατά την εισαγωγή του κατώτερου ορίου.

3.3.2 Spectral Information Divergence (SID)

Ο αλγόριθμος φασματικής ταξινόμησης SID δεδομένων των φασμάτων $\mathbf{x}$ and $\mathbf{y}$, ορίζεται ως:

$$SID(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \left\langle \frac{\mathbf{x}}{\mathbf{x}} - \frac{\mathbf{y}}{\mathbf{y}}, \log\left(\frac{\mathbf{x}}{\mathbf{x}}\right) - \log\left(\frac{\mathbf{y}}{\mathbf{y}}\right) \right\rangle$$

Που προκύπτει από τη συνάρτηση πληροφορίας των Kullback-Leibler:

$$SID(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = D(\mathbf{x} \parallel \mathbf{y}) + D(\mathbf{y} \parallel \mathbf{x})$$

Ο SID θεωρεί κάθε pixel σαν τυχαία μεταβλητή και χρησιμοποιεί το φασματικό του ιστόγραμμα για να ορίσει μία κατανομή πιθανότητας. Έπειτα, μετράει την ασυμφωνία των πιθανοκρατούμενων συμπεριφορών, ανάμεσα στα φάσματά τους.

Κεφάλαιο 4: Τεχνολογίες ανίχνευσης Hb και εφαρμογές

Στο Κεφάλαιο αυτό περιγράφουμε τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των τεχνολογιών χαρτογράφησης oxy και deoxy Hb και ορισμένες ήδη υπάρχουσες εφαρμογές που προσπαθούν να εκμεταλεψτούν αυτές τις τεχνολογίες.

4.1 Τεχνολογίες για την χαρτογράφηση Oxy-Deoxy Hemoglobin

Οι τεχνολογίες που χρησιμοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια σε μια ευρεία κατηγορία εφαρμογών που αφορούν την χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης, για ιατρικούς λόγους είναι οι παρακάτω:

- **Near-infrared spectroscopy (απεικόνιση στα μήκη κύματος του υπέρυθρου)**
- **Visible light spectroscopy (απεικόνιση στα μήκη κύματος του ορατού) και**
- **Hyperspectral spectroscopy (υπερφασματική απεικόνιση)**

Παρακάτω αναφέρουμε ορισμένες ενδεικτικές εφαρμογές που χρησιμοποιούν κάποια από τις παραπάνω μεθόδους για την χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης.

4.1.1 Functional near-infrared optical imaging: Utility and limitations in human brain mapping

Μέσω της NIR spectroscopy ο **Yoko Hoshi** από το τμήμα της Integrated Neuroscience του Ινστιτούτου Ψυχιατρικής του Tokyo κατάφερε να παρατηρήσει δυναμικές αλλαγές στη ροή του αίματος σε τμήματα του εγκεφάλου σε πραγματικό χρόνο. Αυτό το κατάφερε μετρώντας τις αλλαγές στη συγκέντρωση της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης, με τη πάροδο του χρόνου. Το βασικό μειονέκτημα αυτής της εφαρμογής είναι η ελλιπής γνώση του πως η ακτινοβολία διαδίδεται διαμέσου του εγκεφάλου. Ωστόσο η NIRS είναι μια μη επεμβατική μέθοδος και

επιτρέπει τη διαρκή παρακολούθηση, καθώς την ελεύθερη κίνηση του ασθενή ακόμα και κατά τη διάρκεια της μέτρησης.

Continuous-Wave-Type Instruments

Με τα CW-type instruments μετράμε τη μεταδιδόμενη ένταση και υπολογίζουμε τις σχετικές αλλαγές στη συγκέντρωση των χρωμοφόρων σύμφωνα με τον Beer–Lambert law. Όταν μια ακτίνα φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος περνάει μέσα από ένα μη σκεδάσιμο ομογενές μέσο, η απορρόφηση (A) εκφράζεται ως:

$$A = -\log I/I_0 = \varepsilon CL,$$

Όπου I είναι η ένταση του φωτός που ανιχνεύεται και I_0 η αρχική ένταση προτού περάσει από το μέσο, ε είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης, C είναι η συγκέντρωση, και L είναι η απόσταση που διανύει το φως στο μέσο.

Όταν το κρανίο φωτίζεται από φως μήκους κύματος λ_1 σύμφωνα με τον Beer–Lambert law, η απορρόφηση (A_{λ_1}) γράφεται σαν:

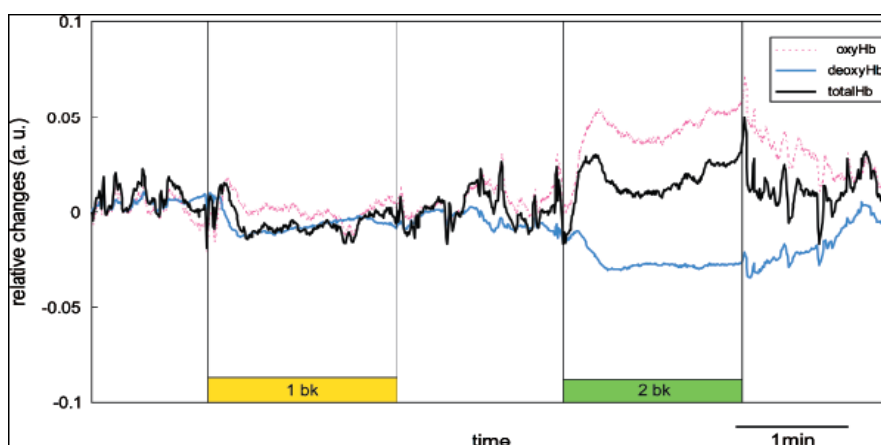
$$A_{\lambda_1} = \varepsilon_{\lambda_1}[\text{oxy-Hb}]L_{\lambda_1} + \varepsilon'_{\lambda_1}[\text{deoxy-Hb}]L_{\lambda_1} + \varepsilon''_{\lambda_1}[\text{oxidized cyt. ox.}]L_{\lambda_1} + S_{\lambda_1},$$

Όπου S_{λ_1} εκφράζει τις απώλειες λόγω σκέδασης που μπορούμε να τις μειώσουμε υπολογίζοντας τη διαφορά στην απορρόφηση του μετρησιμου με ένα μήκος κύματος αναφοράς $A_{\lambda_1} - A_{\lambda} = A_{\lambda_1-r}$.

$$\Delta A_{\lambda_1-r} = \varepsilon_{\lambda_1-r}\Delta[\text{oxy-Hb}]L_{\lambda_1-r} + \varepsilon'_{\lambda_1-r}\Delta[\text{deoxy-Hb}]L_{\lambda_1-r} + \varepsilon''_{\lambda_1-r}\Delta[\text{oxidized cyt. ox.}]L_{\lambda_1-r}.$$

Από τις παραπάνω εξισώσεις μπορούμε να υπολογίσουμε τις διαφορές στις συγκεντρώσεις της oxy-Hb, της deoxy-Hb και της t-Hb. Ωστόσο με τα εργαλεία αυτού του τύπου δεν μπορούμε να υπολογίσουμε τις απόλυτες τιμές στις αλλαγές των συγκεντρώσεων παρά μόνο σχετικές τιμές.

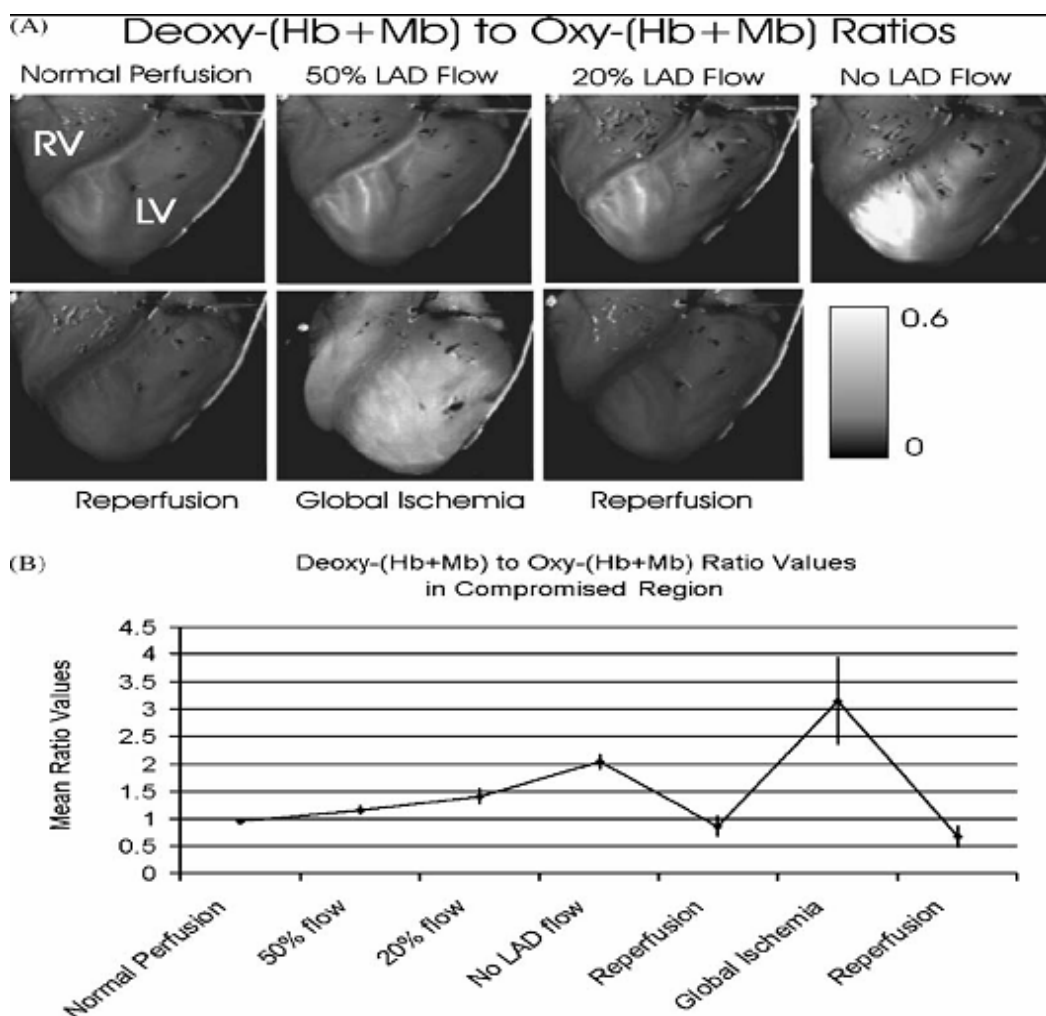
[8]



Γραφική 4

4.1.2 Mapping tissue oxygenation in the beating heart with near-infrared spectroscopic imaging

Οι Stephen P. Nighswander-Rempel, R. Anthony Shaw, Valery V. Kupriyanov, John Rendell, Bo Xiang, Henry H. Mantsch κατόρθωσαν να κάνουν χαρτογράφηση της οξυγόνωσης της παλόμενης καρδιάς. Πήραν φασματικές εικόνες στα 650-1050nm από απομονωμένες, παλλόμενες καρδιές χοίρων, στις οποίες η LAD αρτηρία είχε φραγεί. Με αποτέλεσμα η ροή του αίματος στη LAD αρτηρία να μειώνεται σταδιακά στο 50, 20 και 0% της κανονικής ροής και στη συνέχεια αποκαταστάθηκε πάλι στα κανονικά επίπεδα. Φασματικές εικόνες πάρθηκαν από κάθε στάδιο ξεχωριστά και στη συνέχεια υπολογίστηκαν τα επίπεδα Oxy και Deoxy (Hb+Mb) με έναν least square fitting algorithm. Οι εικόνες έδειξαν καθαρά μείωση της οξυγόνωσης στις περιοχές της καρδιάς που επηρεάζονταν από τη φραγή της αρτηρίας, δηλαδή σημαντική αύξηση των επιπέδων deoxy-(Hb+Mb) σε αντίθεση με τα επίπεδα oxy-(Hb+Mb) που μειώθηκαν.



Εικόνα 4. 1: (A) Φασματική απεικόνιση της καρδιάς σε όλες τις καταστάσεις
B) Η αναλογία oxy-deoxy (Hb+Mb) σε όλες τις καταστάσεις

Έτσι κατέληξαν στο ότι η NIR φασματική απεικόνιση μπορεί να ανιχνεύσει επιτυχώς αλλαγές στην οξυγόνωση του αίματος και των ιστών, καθώς και να καθορίσει όχι μόνο τη περιοχή όπου δημιουργήθηκε ισχαιμία, αλλά και το βαθμό ισχαιμίας αυτής. Έπιπλεον είναι μια μη επεμβατική μέθοδος.

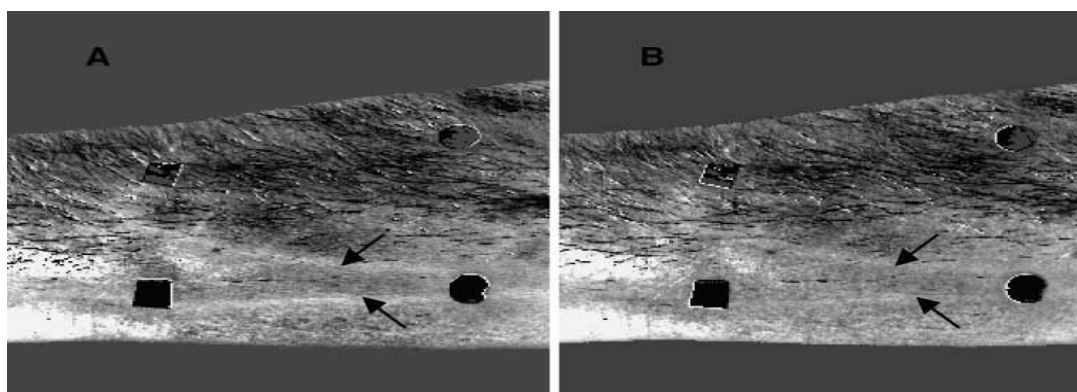
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να παραχθούν οι εικόνες βασίστηκαν στο Beer's Law που παρουσιάζει την αναλογία μεταξύ συγκέντρωσης και απορρόφησης. [9]

4.1.3 Visualization of cutaneous hemoglobin oxygenation and skin hydration using near-infrared spectroscopic imaging

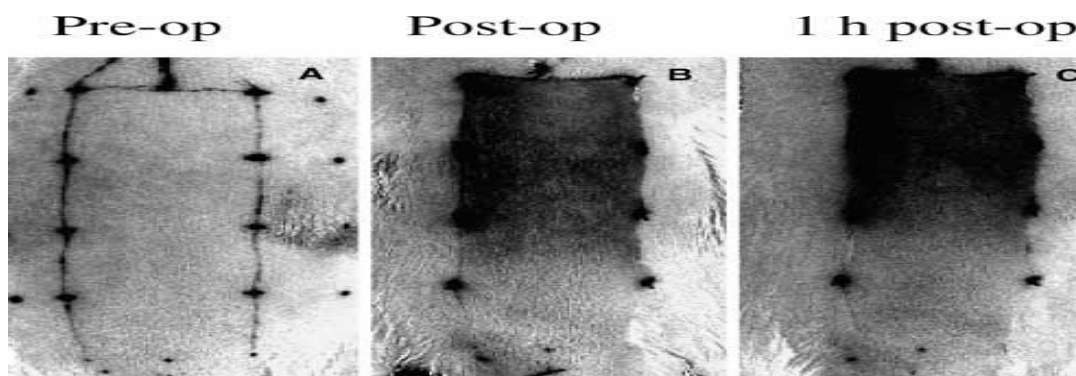
Οι Michael Attas, Mark Hewko, Jeri Payette, Trevor Posthumus, Michael Sowa and Henry Mantsch μέσω της NIR φασματικής απεικόνισης κατόρθωσαν:

- Να εξετάσουν τη χωρική και χρονική μεταβλητότητα της οξυγόνωσης του δέρματος,
- Τη παρακολούθηση τραυματισμένων, μη υγιών ιστών
- Να καθορίσουν περιοχές που κινδυνεύουν λόγω ελλειπούς οξυγόνωσης

Συνέλεξαν εικόνες από τα 650-1050nm και με τη βοήθεια του προγράμματος ENVI παρουσιάζουν την αναλογία των τιμών έντασης oxy-Hb και deoxy-Hb για κάθε pixel ξεχωριστά. Τις εικόνες τις πήραν από το βραχίονα ενός εθελοντή πριν και αφότου φράξουν μια κύρια αρτηρία όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2, και από το ραχιαίο τμήμα ενός ποντικού πριν την αφαίρεση του, αμέσως μετά την αφαίρεση καθώς και μια ώρα αφότου αφαιρέθηκε. Και κατέληξαν στο ότι αυξάνονταν σημαντικά τα επίπεδα της deoxy-Hb όσο οι ιστοί δεν οξυγονώνονταν, με αποτέλεσμα αυτή η μέθοδος να είναι πολύ χρήσιμη για τη παρακολούθηση της φάσης ανάρρωσης ιστών και την εξακρίβωση της επιτυχούς ή μη μεταμόσχευσης, κάτι που διαφορετικά γίνεται οπτικά αρκετές ημέρες αφότου έγινε η μεταμόσχευση. [10]



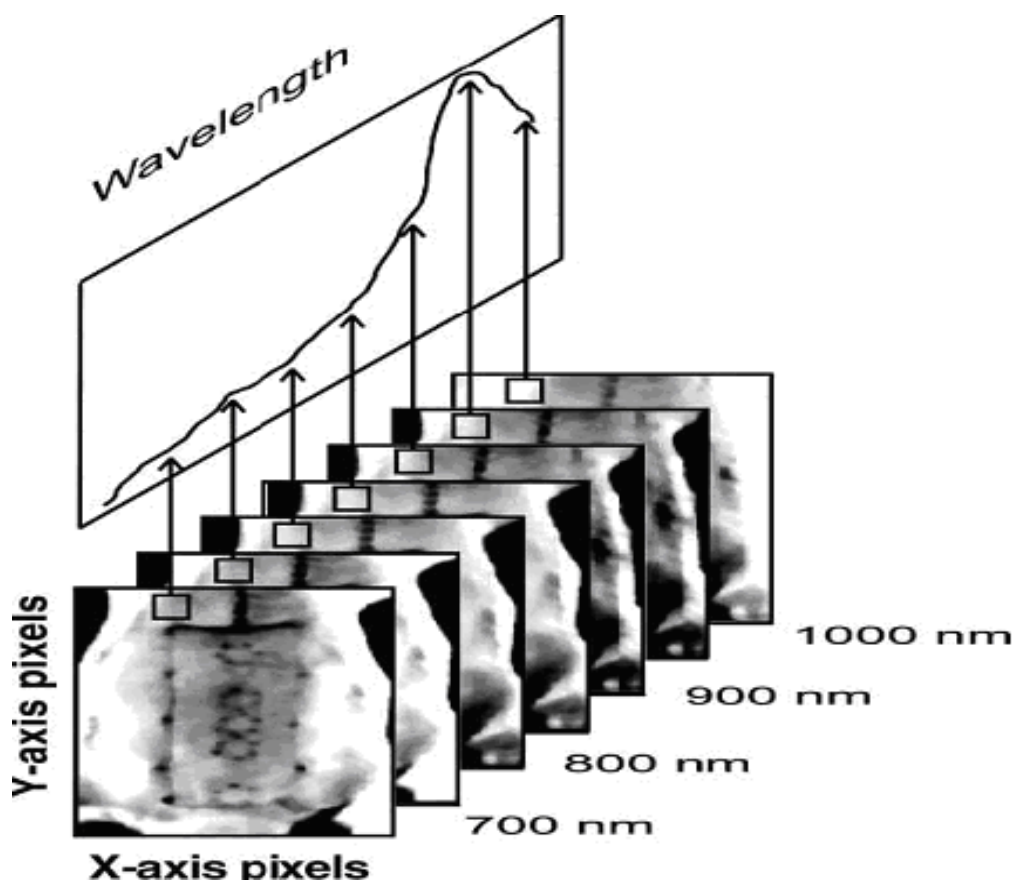
Εικόνα 4. 2: Εικόνες κατά τη διάρκεια της διακοπής του αίματος στο βραχίονα (Α) και μετά τη διακοπή (Β). Οι φωτεινότερες περιοχές δείχνουν υψηλότερη αναλογία oxy-deoxy



Εικόνα 4. 3: Εικόνες από ραχιαίο τμήμα ενός ποντικού πριν την αφαίρεση του, αμέσως μετά την αφαίρεση καθώς και μια ώρα αφότου αφαιρέθηκε

Για την κανονικοποίηση των εικόνων και τη μετατροπή τους σε OD (optical density) φόρμα δεδομένων λαμβάνεται μια εικόνα αναφοράς. Στη συνέχεια κάθε τιμή pixel μιας εικόνας διαιρείται με τη τιμή της αντίστοιχης τιμής του pixel αναφοράς χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση για την δημιουργία των OD δεδομένων που αποτελούν ένα τρισδιάστατο set:

$$OD = -\log_{10} (Subject/Reference)$$



Εικόνα 4. 4: Στοιίβα φασματικών εικόνων απο ραχιαίο τμήμα ποντικού και το φάσμα Ανάκλασης από ένα συγκεκριμένο pixel σε κάθε εικόνα

4.1.4 In vivo measurement of parameters of dosimetric importance during interstitial photodynamic therapy of thick tumors

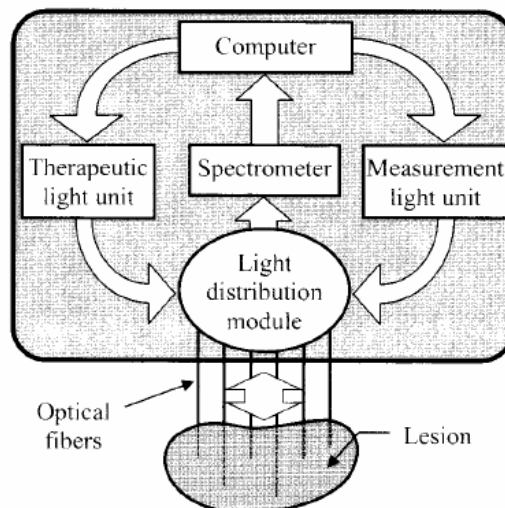
Οι Ann Johansson Thomas Johansson Marcelo Soto Thompson Niels Bendsoe Katarina Svanberg Sune Svanberg Stefan Andersson-Engels κατόρθωσαν με την NIR φασματική απεικόνιση να παρακολουθήσουν τις μεταβολές στην oxy-Hb και deoxy-Hb κατά τη διάρκεια φωτοδυναμικής θεραπείας, για την αντιμετώπιση καρκινωμάτων του δέρματος. Οι αλλαγές αυτές στην oxy-Hb και deoxy-Hb παρουσίασαν μια μεταβαλλόμενη οξυγόνωση του δέρματος και σημαντικές αλλαγές στον όγκο του αίματος κατά τη διάρκεια της θεραπείας.

Η σχετική συγκέντρωση των oxy-Hb και deoxy-Hb υπολογίζεται για να μας παρέχει το επίπεδο κορεσμού σε οξυγόνο του δέρματος ώστε να υπολογιστεί σωστά η απαραίτητη δόση για τη φωτοδυναμική θεραπεία. [11]

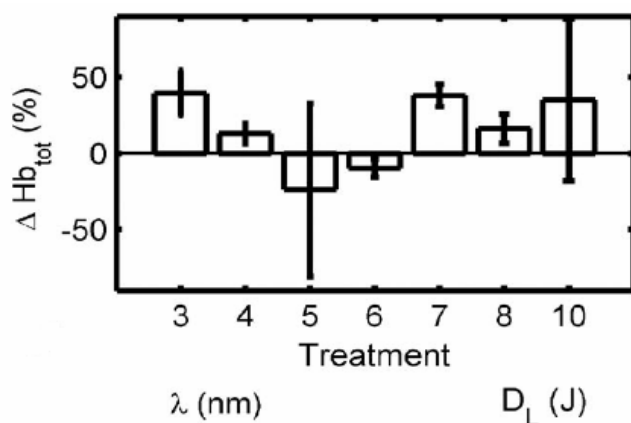
$$S(t) = \frac{[HbO(t)]}{[HbO(t)] + [Hb(t)]}$$

Οι αλλαγές στην οπτική πυκνότητα στη φασματική περιοχή 760-810nm μετρήθηκε:

$$\Delta A(t, \lambda) = - \ln \frac{I(t, \lambda)}{I(t = 0, \lambda)}$$



Εικόνα 4. 5: Σχεδιάγραμμα συστήματος που χρησιμοποιήθηκε



Εικόνα 4. 6: Μεταβολές στη περιεκτικότητα σε Hb για 7 θεραπείες

4.1.5 Diffuse optics in breast cancer: detecting tumors in pre-menopausal women and monitoring neoadjuvant chemotherapy

Οι Bruce J Tromberg, Albert Cerussi, Natasha Shah, Montana Compton, Amanda Durkin, David Hsiang, John Butler and Rita Mehta χρησιμοποίησαν τη NIR φασματική απεικόνιση για να ανιχνεύσουν καρκινώματα και να μετρήσουν την αντίδραση των ασθενών στη neoadjuvant χημιοθεραπεία. Παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των oxy-Hb και deoxy-Hb στις περιοχές που έπασχαν από καρκίνο σε σχέση με τις υγιείς.

Από το φάσμα απορρόφησης υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των oxy-Hb και deoxy-Hb και του H₂O και με βάση αυτές υπολογίστηκαν:

- η συγκέντρωση σε αιμοσφαιρίνη του δέρματος από τη σχέση:

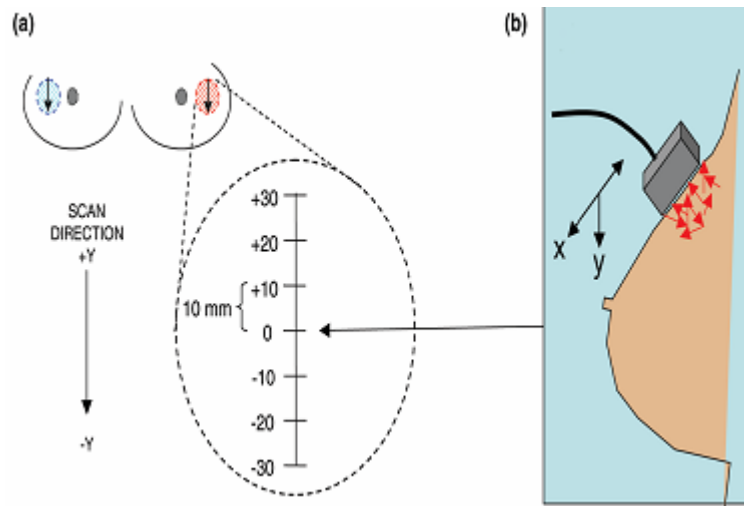
$$\text{ctTHb} = \text{ctO}_2\text{Hb} + \text{ctHHb}$$

- Ο κορεσμός της οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης στο αίμα:

$$\text{stO}_2 = \text{ctO}_2\text{Hb} / \text{ctTHb} \times 100\%$$

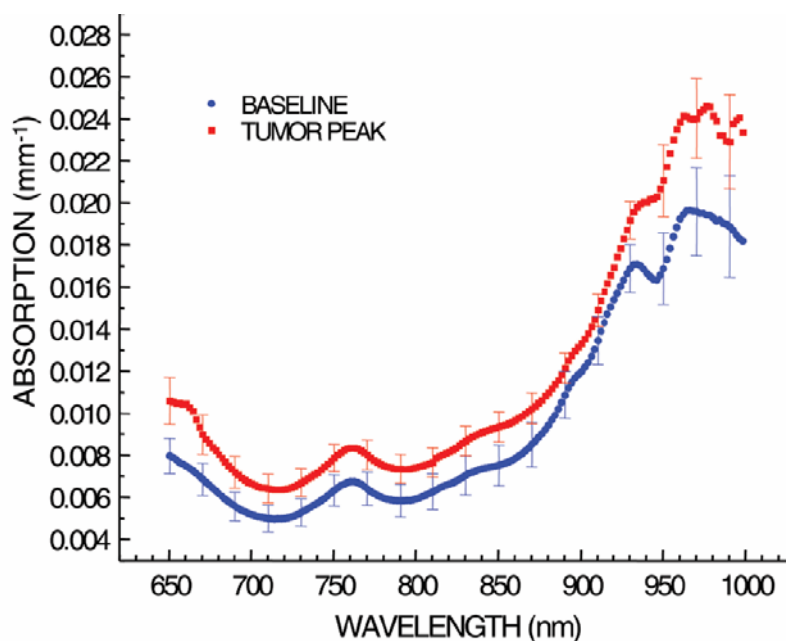
- Ένας οπτικός δείκτης του δέρματος (TOI):

$$\text{TOI} = \text{ctHHb} \times \text{ctH}_2\text{O} / (\% \text{lipid})$$



Εικόνα 4. 7: (a) Περιοχές μέτρησης, (b) Διάχυση φωτονίων

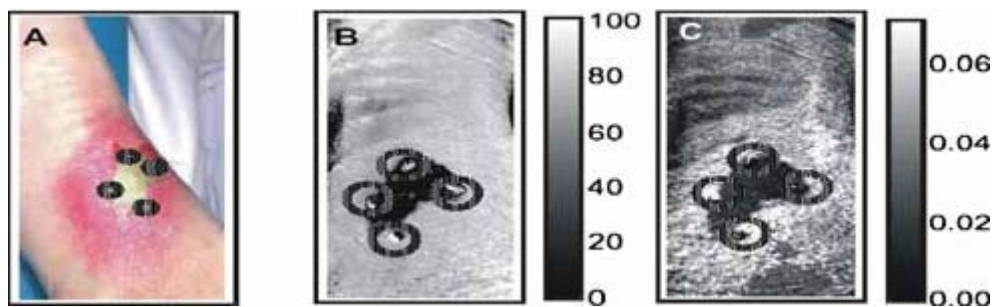
Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις καμπύλες απορρόφησης των ασθενών περιοχών σε σχέση με τις υγιείς σε όλο το φάσμα από τα 650nm-1000nm. Η αύξηση της απορρόφησης από τα 650-850nm στις ασθενείς περιοχές είναι ενδεικτική της αύξησης των συγκεντρώσεων deoxy-Hb και H₂O που οφείλονται στην αγγειογένεση. Ενώ η αύξηση της απορρόφησης από τα 950-1000nm είναι ενδεικτική της αύξησης της συγκέντρωσης H₂O, που οφείλεται στην ύπαρξη οιδήματος και την ανώμαλη αύξηση των κυττάρων σε αυτή τη περιοχή. Οι αυξημένες τιμές στο δείκτη TOI υποδεικνύουν υψηλή μεταβολική δραστηριότητα και κακοηθείς όγκους. [12]



Εικόνα 4. 8: : Διαφορές στους μέσους όρους των φασμάτων απορρόφησης καρκινικών και υγιών περιοχών του μαστού

4.1.6 Near infrared point and imaging spectroscopy for burn depth assessment

Οι K.M. Crossa, M.A. Hastings, J.R. Payette, M. Gomez B.J. Schattka, M.G. Sowa, L. Leonardi, J.S. Fish κατόρθωσαν με τη NIR φασματική απεικόνιση να προβλέψουν με ακρίβεια το βαθμό σοβαρότητας των εγκαυμάτων σε ασθενείς. Υπολόγισαν τις συγκεντρώσεις σε oxy-Hb και deoxy-Hb τόσο για τις περιοχές που έπασχαν από εγκαύματα όσο και από τις υγιείς. Οι ίδιες συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν για κάθε pixel των εικόνων NIR. Παρατήρησαν αύξηση στον κορεσμό του οξυγόνου και στη συνολική αιμοσφαιρίνη στα επιφανειακά εγκαύματα σε αντίθεση με τα σοβαρότερα, όπου εκεί είχαμε μείωση στον κορεσμό του οξυγόνου και στη συνολική αιμοσφαιρίνη. Έτσι κατέληξαν στο ότι με τη NIR φασματική απεικόνιση μπορούμε να ξεχωρίσουμε με ακρίβεια τα διαφορετικά εγκαύματα ανάλογα με το βαθμό σοβαρότητας τους, με βάση το κορεσμό του οξυγόνου, τη συνολική αιμοσφαιρίνη και το περιεχόμενο σε H₂O των ιστών. [13]

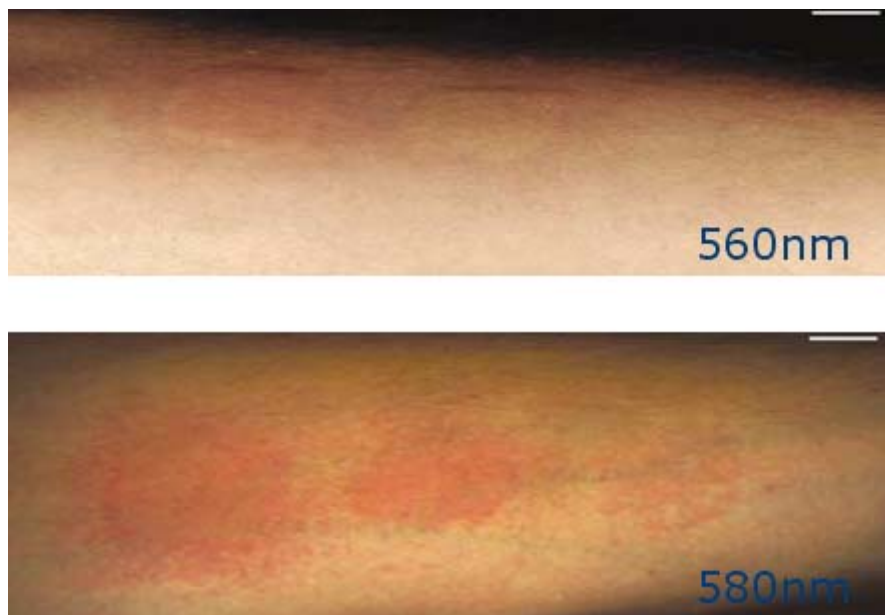


Εικόνα 4. 9: NIRS εικόνες εγκαυμάτων

4.1.7 In Vivo Monitoring of Cutaneous Edema

Οι Σταματάς, Southall και Κολλιάς κατόρθωσαν να ποσοτικοποιήσουν in vivo την αντίδραση του οιδήματος μέσω της φασματικής απεικόνισης, υπολογίζοντας τις συγκεντρώσεις της oxy-Hb, deoxy-Hb και του H₂O, για τις οποίες κατασκευάστηκαν αντίστοιχοι χάρτες συγκέντρωσης.

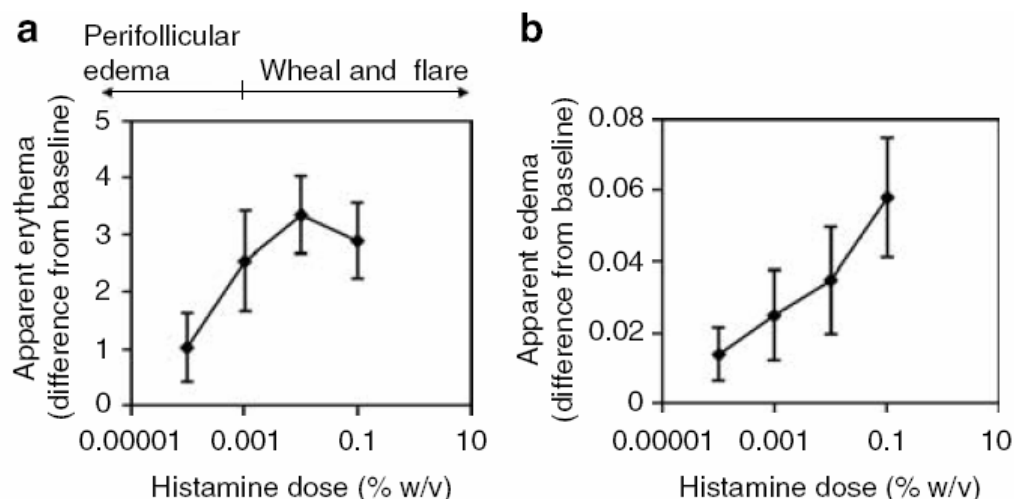
Αυτό έγινε εφικτό αφού πρώτα προκάλεσαν οίδημα (Εικόνα 4.10) σε εθελοντές με τη χορήγηση ισταμίνης και στη συνέχεια πήραν το φασματικό χάρτη των περιοχών όπου είχε δημιουργηθεί οίδημα τόσο στο ορατό όσο και στο υπέρυθρο



Εικόνα 4. 10: Edema & Erythema reaction

Παρατήρησαν ότι το οίδημα γινόταν εντονότερο όσο αυξάνανε τη δόση της ισταμίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αλλά σταθεροποιούνταν ή και μειωνόταν το ‘‘κοκκινισμα’’ σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στις φασματικές εικόνες στα 560 και 580nm (Εικόνα 4.10) όπου τόσο η deoxy-Hb όσο και η oxy-Hb απορροφούν ισχυρά, οι σκοτεινές περιοχές αντιστοιχούν στην απορρόφηση που οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση αίματος στα σημεία του δέρματος όπου εμφανίστηκε οίδημα. Οι φασματικές εικόνες από τα 600nm και άνω φαίνονται πιο φωτεινές από αυτές στα 560 και 580nm, διότι η αιμοσφαιρίνη και η μελανίνη δεν απορρόφουν πολύ σε αυτές τις περιοχές του φάσματος και έτσι το φως μπορεί να διαδοθεί σε βαθύτερα στρώματα του δέρματος χωρίς να υποστεί σημαντικές απώλειες.

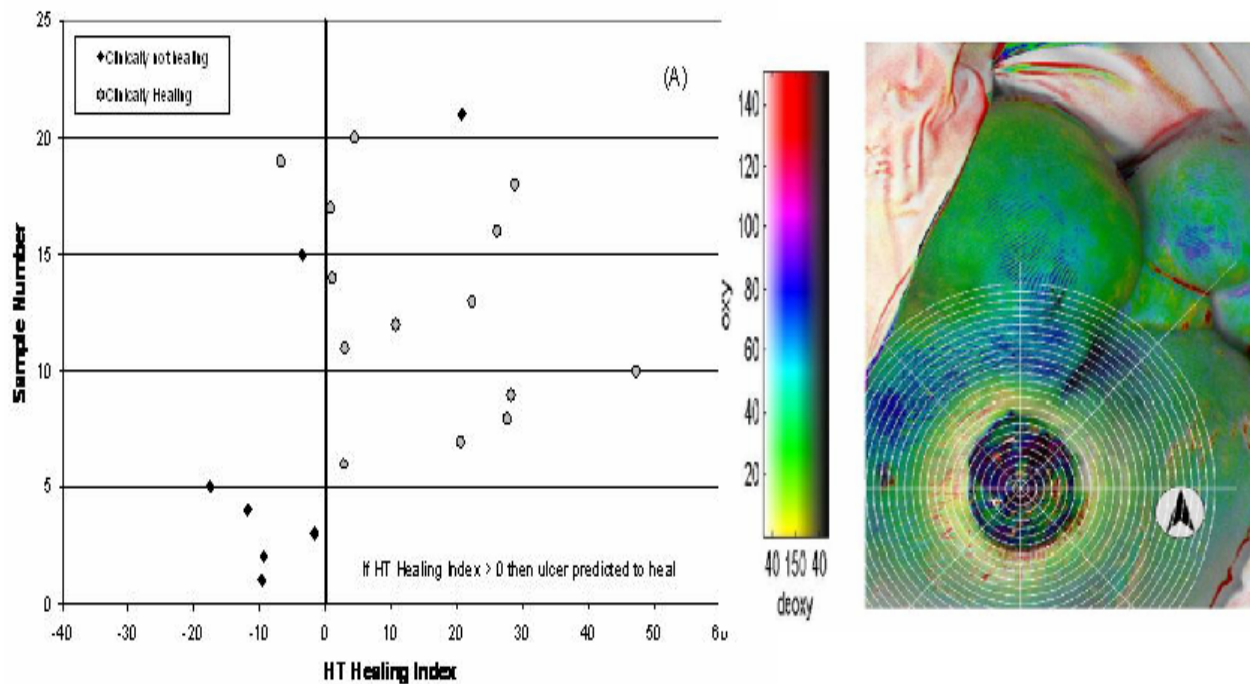
Επίσης ήταν απαραίτητο να εφαρμοστεί στις εικόνες ο αλγόριθμος των **Kollias και Baqer** ώστε να εξαχθούν οι απαραίτητες ποσοτικές πληροφορίες. Αρχικά υπολογίστηκε η συγκέντρωση της μελανίνης στη φασματική περιοχή 630-700nm, ώστε να διορθωθεί το φάσμα απορρόφησης από την συνεισφορά της μελανίνης και στη συνέχεια έγινε fitted για την oxy-Hb και deoxy-Hb στα 560-580nm όπου εμφανίζουν μέγιστα. Χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της oxy-Hb για τον υπολογισμό της έντασης του οιδήματος και κατασκευάστηκαν χάρτες κατανομής για κάθε χρωμοφόρο. [14]



Εικόνα 4. 11: Apparent erythema and edema intensities depend on histamine dose

4.1.8 The Use of Medical Hyperspectral Technology to Evaluate Microcirculatory Changes in Diabetic Foot Ulcers and Predict Clinical Outcomes

Οι Lalita Khaodhilar, MD, Thanh Dinh, DPM, Kevin T Schomacker, PhD, Svetlana Panasyuk, PhD, Jenny E Freeman, MD, Aristidis Veves, MD μέσω της υπερφασματικής απεικόνισης κατέστησαν εφικτή τη πρόβλεψη της επιτυχούς ή μη αντιμετώπισης του έλκους των διαβητικών (Εικόνα 4.12). Μπόρεσαν να υπολογίσουν την οξυγόνωση των περιοχών που πάσχουν από έλκος μετρώντας τις συγκεντρώσεις oxy-deoxy Hb. Επίσης δημιούργησαν ένα δείκτη HT(healing Index) με τη βοήθεια του οποίου μπορούμε να προβλέψουμε εάν το έλκος στο πόδι του ασθενή μπορεί να γιατρευτεί ή όχι, ανάλογα με τη τιμή που λαμβάνει.



Εικόνα 4. 12: Υπερφασματική εικόνα έλκους σε πόδι ασθενούς και διάγραμμα τιμών HT

Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση pixel by pixel των τιμών oxy-Hb, deoxy-Hb και H₂O των εικόνων που προέκυψαν από την υπερφασματική απεικόνιση, έδειξαν ότι οι οι χρωμοφόρες αυτές λαμβάνουν χαμηλότερες τιμές στις περιοχές του δέρματος που πάσχουν από έλκος που δεν μπορεί να γιατρευτεί. Έτσι στις περιοχές αυτές ο δείκτης HT λαμβάνει τιμές υπό του 0 και με βάση αυτή την πρόληψη το ιατρικό προσωπικό αντιμετωπίζει κατάλληλα τον ασθενή. [15]

4.1.9 Oxygen Saturation in Optic Nerve Head

Structures by Hyperspectral Image Analysis

Οι James Beach Jinfeng Ning and Bahram Khoobehi κατόρθωσαν να καθορίσουν το ποσοστό του κορεσμένου οξυγόνου στον οπτικό νευρικό ιστό του εγκεφάλου μέσω της υπερφασματικής απεικόνισης σε κανονικές συνθήκες και σε συνθήκες όπου αύξησαν την πίεση στο εσωτερικό του ματιού (intraocular pressure IOP). Παρατήρησαν ότι οι τιμές του κορεσμένου οξυγόνου μειώνονταν όσο αυξάνονταν η IOP και οι αλλαγές αυτές παρουσιάστηκαν σε ψευδοχρωματικούς χάρτες. Υπολόγισαν έναν δείκτη κορεσμού (relative saturation index RSI)

ανέξαρτητο της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης. Για να τον υπολογίσουν χρησιμοποίησαν έναν απλό αλγόριθμο με βάση της καμπύλες απορρόφησης της oxy-Hb και deoxy-Hb:

$$OSC = (a_2/A_2 - a_1/A_1 - a_3/A_3)$$

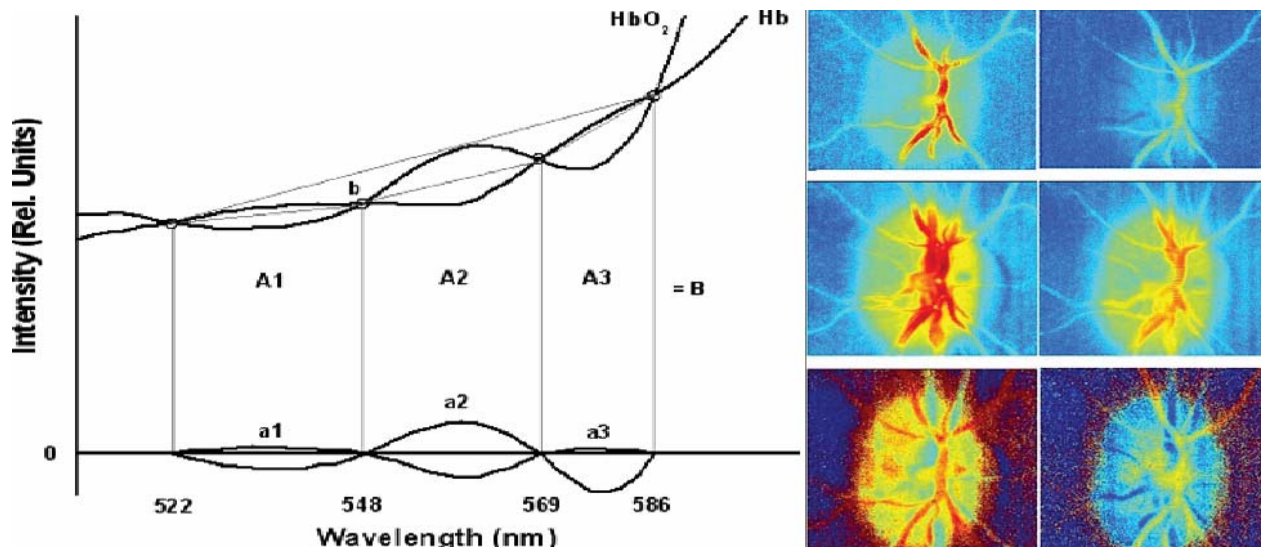
$$BVC = b/B$$

$$RSI_v = OSC/BVC$$

Όπου a_1, a_2, a_3 είναι οι oxygen-sensitive areas,

BVC: blood volume component και

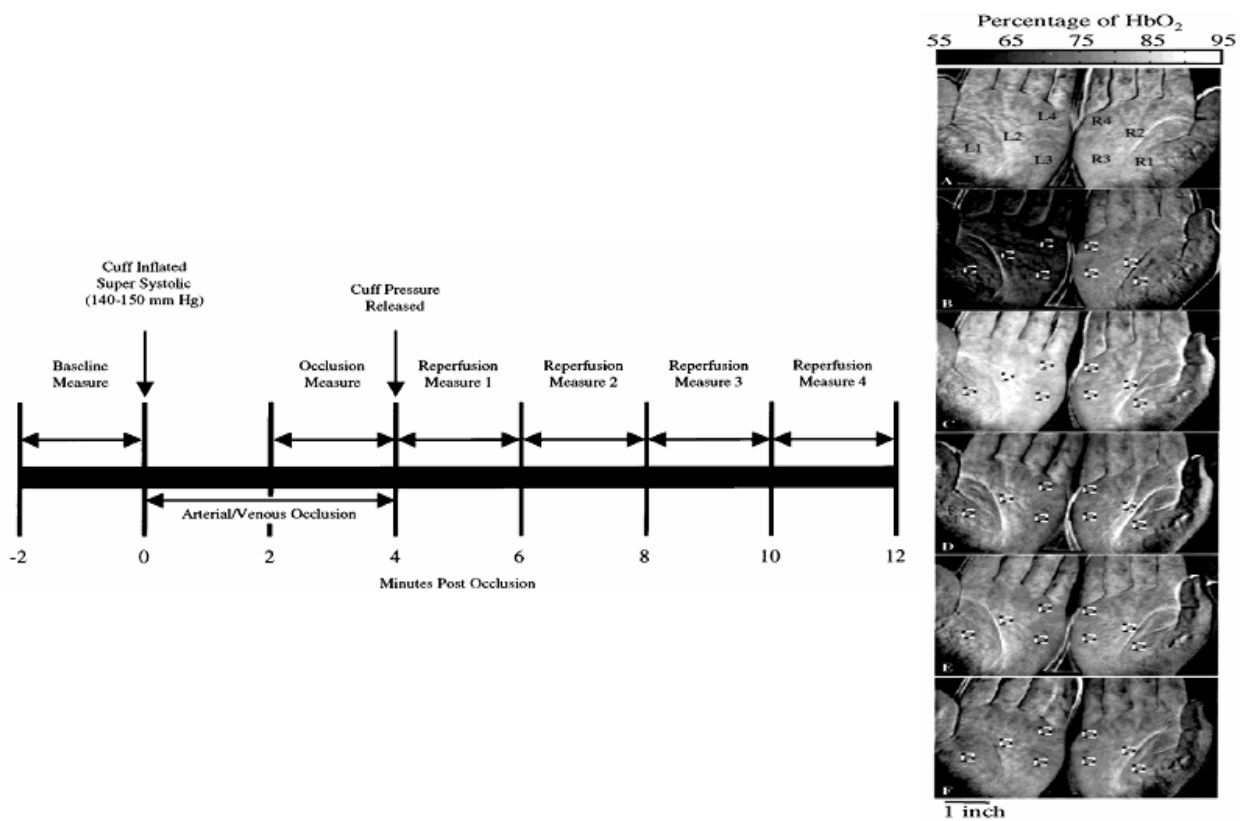
OSC: oxygen-sensitive component [16]



Εικόνα 4. 13: Χρωματικοί χάρτες ONH και γραφική απεικόνιση του αλγορίθμου εύρεσης του δείκτη κορεσμού

4.1.10 Visible Reflectance Hyperspectral Imaging: Characterization of a Noninvasive, in Vivo System For Determining Tissue Perfusion

Οι Karel J. Zuzak, Michael D. Schaeberle, E. Neil Lewis, and Ira W. Levin πραγματοποίησαν υπερφασματική απεικόνιση σε ανθρώπινο χέρι υπό κανονικές συνθήκες και υπό συνθήκες όπου έχει διακοπεί η ροή του αίματος (ισχαιμία) όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.14.



Εικόνα 4. 14: Υπερφασματικός κύβος δεμένου και ελεύθερου χεριού και διάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας

Παρατηρήθηκε όπως ήταν αναμενόμενο ότι η συγκέντρωση της oxy-Hb μειώνεται διαρκώς με τη πάροδο του χρόνου, ενώ επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα μόλις αποκατασταθεί η κυκλοφορία του αίματος στο χέρι. Γι'αυτο το λόγο και οι εικόνες της αριστερής παλάμης είναι σκοτεινότερες όσο το χέρι παραμένει δεμένο απο αυτές του δεξιού (ελεύθερο) και φωτεινότερες κατά τη διαδικασία της υπεραιμάτωσης. [17]

4.2 Μειονεκτήματα και Πλεονεκτήματα των μεθόδων

Η φασματοσκοπία στο υπέρυθρο (near-infrared spectroscopy) χρησιμοποιεί τα μήκη κύματος του υπέρυθρου για τη φασματική απεικόνιση των ιστών. Καθώς η απορρόφηση της υπέρυθρης (NIR) ακτινοβολίας από τους ιστούς είναι πολύ μικρή, με αποτέλεσμα η υπέρυθρη ακτινοβολία να φθάνει σε μεγάλα βάθη στο εσωτερικό των ιστών και μεγάλο μέρος της να ανακλάται πίσω στους ανιχνευτές μας και άρα να παίρνουμε περισσότερες πληροφορίες.

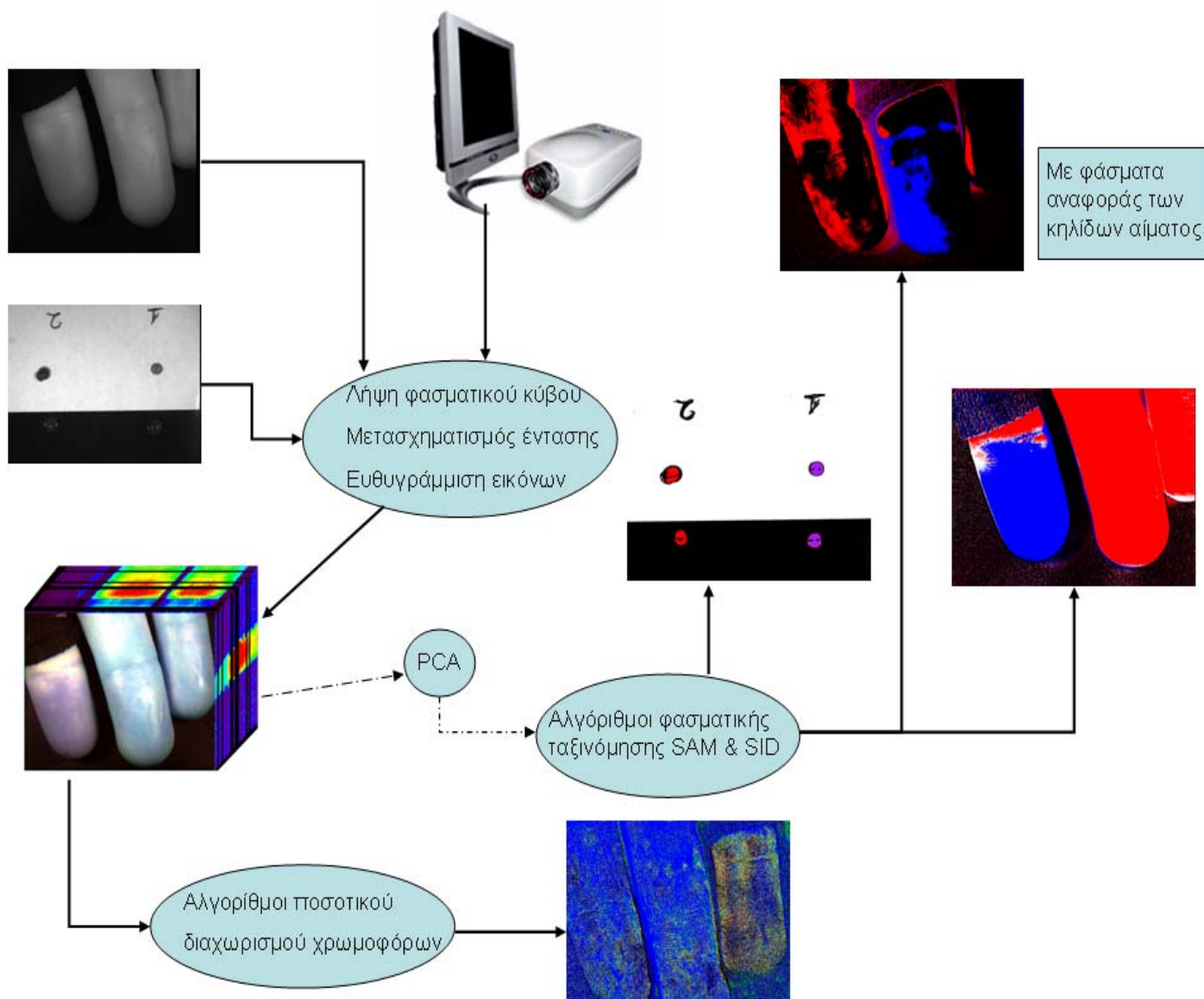
Η φασματοσκοπία ορατού φωτός (visible light spectroscopy, VLS) χρησιμοποιεί για την απεικόνιση της αιμοσφαιρίνης κορεσμένης σε οξυγόνο το εύρος φάσματος των 400-625nm (blue to yellow) για τα οποία η απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης (Q- and Soret-band) είναι κατά 2-3 τάξεις μεγέθους ισχυρότερη απ'οτι στα μήκη κύματος του υπέρυθρου. Επίσης η VLS επιτρέπει τη συλλογή σε πραγματικό χρόνο φασματικών και οξυμετρικών δεδομένων από ιστούς με μικρές τυπικές αποκλίσεις (standard deviations). Ένα άλλο χαρακτηριστικό της VLS είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί για τη παρακολούθηση της κορεσμένης σε οξυγόνο αιμοσφαιρίνης σε τοπικές, ενδοεπιφανειακές περιοχές ιστών, επιτρέποντας την εφαρμογή της σε θεραπευτικούς καθετήρες (catheters), κάτι που δεν μπορεί να γίνει για την NIRS που βασίζεται στη διείσδυση φωτονίων σε μεγάλο βάθος στο εσωτερικό των ιστών και απαιτεί μεγαλύτερους αισθητήρες. Τέλος παρατηρήθηκε από μετρήσεις ότι με τη VLS ελαχιστοποιούνται τα αρνητικά αποτελέσματα της σκέδασης στη συλλογή δεδομένων. [design of a visible-light spectroscopy clinical tissue oximeter]

Η υπερφασματική απεικόνιση συνδιάζει τα πλεονεκτήματα και των δύο παραπάνω μεθόδων καθώς με αυτή συλλέγουμε και επεξεργαζόμαστε πληροφορίες από όλοκληρο το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα και αυτός είναι ο λόγος που και εμείς χρησιμοποιήσαμε στα πειράματά μας κάμερα υπερφασματικής απεικόνισης.

Κεφάλαιο 5: Πειραματική διαδικασία και αποτελέσματα

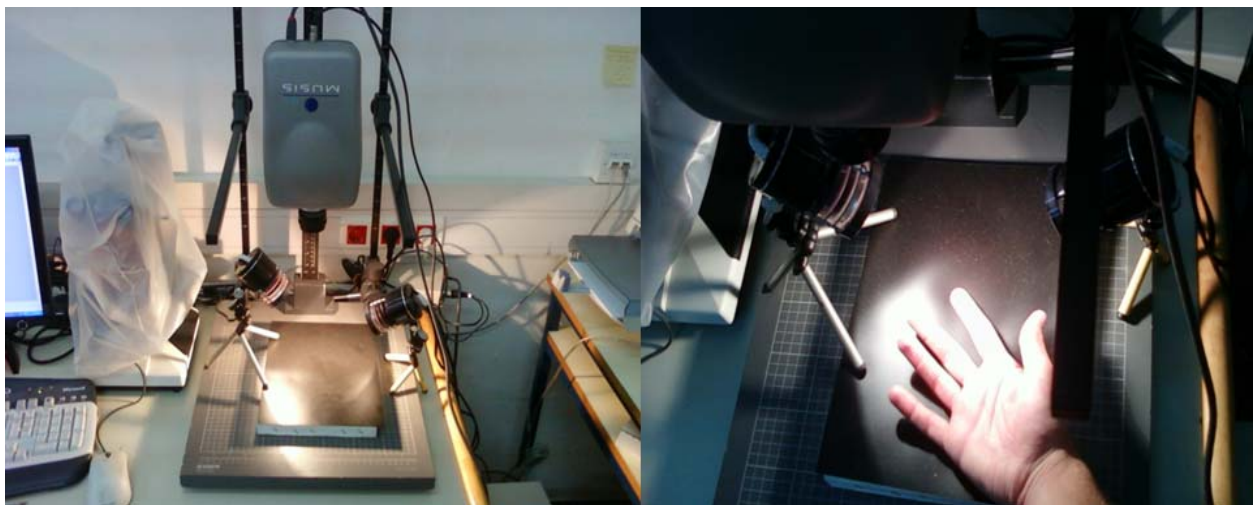
5.1 Στάδια Εργασίας

Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα συνοψίζονται όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας:



5.1.2 Σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης (MuSIS)

Τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε έγιναν με το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης **MuSIS** που είναι διαθέσιμο στο εργαστήριο Οπτοηλεκτρονικής του Πολυτεχνείου Κρήτης. Το σύστημα αυτό βασίζεται σε έναν όλο-οπτικό μονοχρωμάτορα απεικόνισης και παράγει φασματικές εικόνες 5nm Full Width Half Maximum (FWHM), με βήμα ρύθμισης 3nm, στη φασματική ζώνη 360nm – 1550nm. Ο φωτισμός πραγματοποιείται μέσω δύο λαμπών αλογόνου 250W, οι οποίες σχηματίζουν γωνία 45° με το φακό της κάμερας, ώστε να αποφεύγεται το φαινόμενο του κατοπτρισμού. Ο μονοχρωμάτορας είναι συνδεδεμένος με μια ασπρόμαυρη CCD κάμερα και είναι ικανός να παράγει εικόνες σε ένα ποσοστό 15 frames/sec σε πλήρη ανάλυση και περισσότερες από 30 frames/sec σε VGA ανάλυση. Η μετατόπιση των οπτικών στοιχείων των πιο πρόσφατων αποτελεσμάτων στο συντονισμό του μήκους κύματος απεικόνισης εκτελείται με τη βοήθεια μηχανικών χειρισμών που ελέγχονται από τον υπολογιστή μέσω ενός μικροελεγκτή.



Εικόνα 5. 1: Εικόνες κάμερας MuSIS

Ο συντονισμός του φασματικού εύρους ταιριάζει με το φασματικό εύρος της δυνατότητας απόκρισης (responsivity) του CCD (Charge Couple Device), αλλά μπορεί να επεκταθεί και σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, μέχρι τη μέση-υπέρυθηρη περιοχή. Το παραγόμενο σήμα ανατροφοδότησης του μονοχρωμάτορα φέρει τις πληροφορίες για την κατάσταση του μεταβλητού φίλτρου, επιτρέποντας κατά συνέπεια το συγχρονισμό του με τη διαδικασία σύλληψης της εικόνας. Ένα ειδικά αναπτυγμένο λογισμικό χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του συστήματος και του μονοχρωμάτορα καθώς επίσης και για τη φασματική ανάλυση της εικόνας. Το σύστημα λειτουργεί σε δύο καταστάσεις: την κατάσταση της φασματοσκοπίας και την

κατάσταση της φασματομετρίας. Η πρώτη επιτρέπει την τυχαία επιλογή και την απεικόνιση, σε πραγματικό χρόνο, των επιθυμητών φασματικών εικόνων, ενώ η κατάσταση της φασματομετρίας εκτελεί συγχρονισμένα τη φασματική σύλληψη και ανίχνευση της εικόνας και, τελικά, τον υπολογισμό ενός πλήρους φάσματος ανά εικονοστοιχείο εικόνας. Ομοίως και στις δύο περιπτώσεις, μια ειδική διαδικασία βαθμονόμησης εκτελείται πριν από αυτές τις διαδικασίες απεικόνισης, προκειμένου να αντισταθμιστεί η εξάρτηση μήκους κύματος της απόκρισης των ηλεκτροπτικών μερών του συστήματος, όπως το CCD, ο φωτισμός κ.τ.λ. Μια πλάκα Ba_2SO_4 με ενιαίο συντελεστή ανάκλασης στη φασματική ζώνη 400-1000 nm χρησιμοποιείται ως δείγμα βαθμολόγησης. Το δείγμα τοποθετείται στο οπτικό πεδίο του φακού και η γκρι τιμή του κεντρικού τομέα της εικόνας αναπαρίσταται σε πραγματικό χρόνο. Κατόπιν ο μονοχρωμάτορας ανιχνεύει τη συνολική φασματική ζώνη και σε κάθε βήμα το διάφραγμα (shutter) και το gain της κάμερας ρυθμίζονται έτσι ώστε να επιτυγχάνεται τιμή λίγο κάτω από 255. Αυτό εξασφαλίζει ότι η δυναμική περιοχή του CCD αξιοποιείται πλήρως. Οι τιμές των shutter και gain, που χρησιμοποιούνται για να λάβουν το γκρι επίπεδο 255, αποθηκεύονται σε κάθε μήκος κύματος, μαζί με την εικόνα του άσπρου δείγματος, αποτελώντας το σύνολο των στοιχείων βαθμονόμησης του συστήματος.

Οι ρυθμίσεις αυτές προσδιορίζουν το επίπεδο ευαισθησίας της κάμερας, το οποίο αυξάνεται όταν το μήκος κύματος απεικόνισης συντονιστεί σε μικρότερα ή μεγαλύτερα μήκη κύματος, σε σχέση με τη ζώνη των μηκών κύματος όπου επιτυγχάνεται τόσο η μέγιστη ρυθμοαπόδοση του φωτός όσο και η απόδοση του συστήματος. Αυτό καθιστά την απόκρισή του συστήματος, σχεδόν, ανεξάρτητη του μήκους κύματος, διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο φασματική απεικόνιση και φασματομετρία ανεξάρτητες της συσκευής. Οι αποθηκευμένες φασματικές εικόνες του λευκού δείγματος χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση των ανωμαλιών της φωτεινότητας της εικόνας εξαιτίας της μη ομοιόμορφης συνάρτησης της οπτικής. Τρέχοντας τον κώδικα για την κατάσταση της φασματομετρίας, που ακολουθεί τη διαδικασία της βαθμονόμησης, το σύστημα εκτελεί συγχρονισμένα τη ρύθμιση του μήκους κύματος απεικόνισης της εικόνας, τη σύλληψη της εικόνας και την αποθήκευση της υπό ανάλυσης περιοχής. Σε κάθε βήμα, η ευαισθησία της κάμερας ρυθμίζεται αυτόματα σύμφωνα με τις αποθηκευμένες τιμές του shutter και gain.

Από την αποθηκευμένη “στοίβα” των φασματικών εικόνων, ένα φάσμα μπορεί να υπολογιστεί και να αναπαρασταθεί σε οποιοδήποτε επιλεγμένο χωρικό σημείο της φασματικής εικόνας. Τα φάσματα υπολογίζονται από τις γκρι τιμές της φασματικής στήλης που αντιστοιχεί στο pixel που επιλέγεται. Η χωρική ανάλυση του ανιχνευτή προσδιορίζει τον αριθμό των φασμάτων που δύναται να συλλεχθούν σε ένα κύκλο πειράματος. Με την παραπάνω περιγραφή, ένα

εκατομμύριο φάσματα δύναται να συλλεχθούν σε δύο λεπτά, περίπου, χρόνου ανίχνευσης. Τέλος, το σύστημα ενσωματώνει μια γρήγορη διαδικασία αποθήκευσης σε μικρότερη ανάλυση, η οποία μειώνει το χρόνο ανίχνευσης του συστήματος σε 10 δευτερόλεπτα.

1^ο Στάδιο

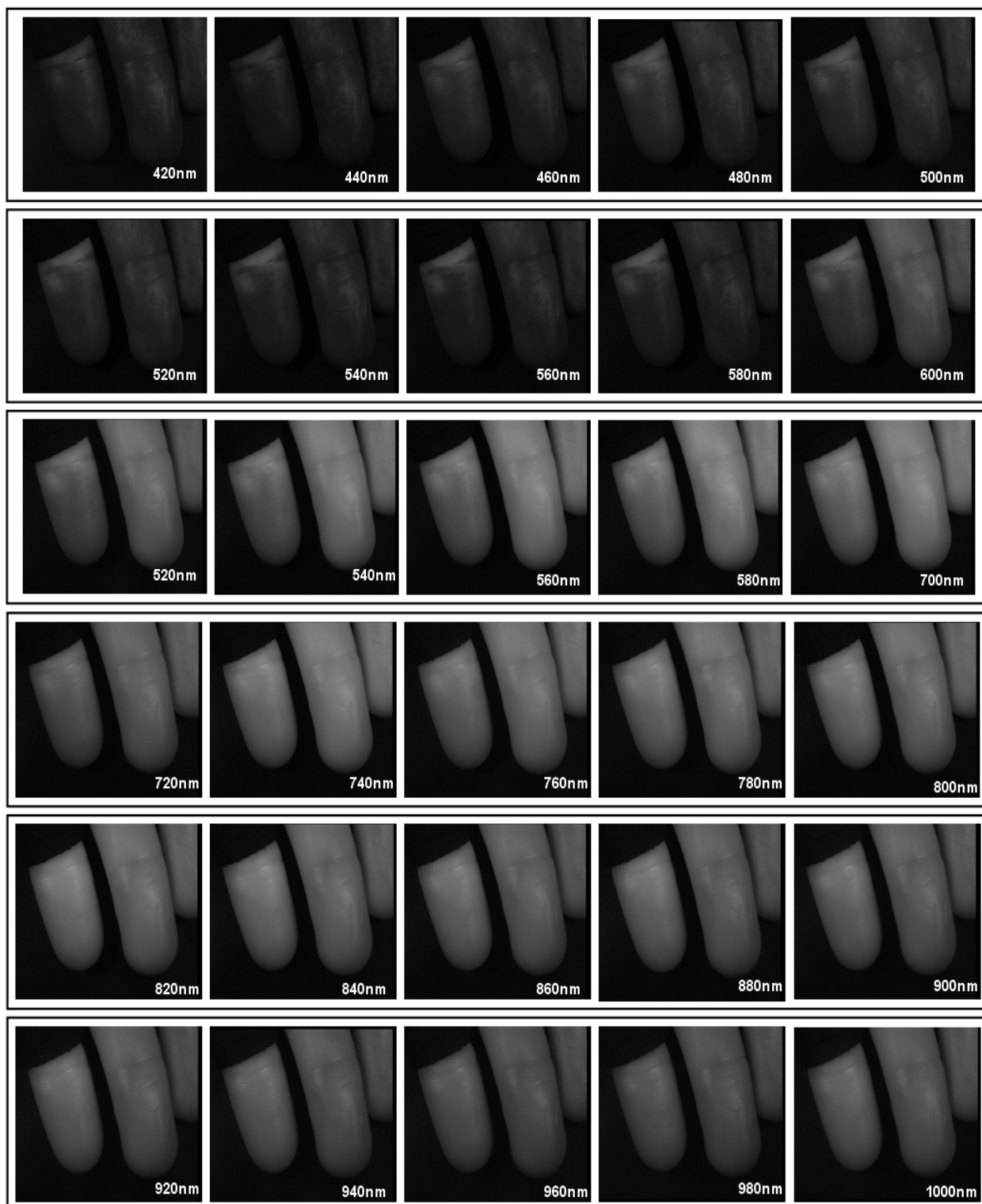
Αρχικά λοιπόν χρησιμοποιώντας το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS πήραμε υπερφασματικούς κύβους από τα δάχτυλα του χεριού μου (δείκτη, μέσο και παράμεσο) σε 3 διαφορετικές καταστάσεις:

- Σε ελεύθερη κατάσταση
- Ενώ ήταν δεμένα με λάστιχο για 1min και
- Ενώ ήταν δεμένα με λάστιχο για 6min

Δηλαδή συνολικά πήραμε 9 φασματικούς κύβους από τα 420-1000nm. Ο λόγος για τον οποίο διακόψαμε τη κυκλοφορία του αίματος στα δάχτυλα με τη τοποθέτηση λάστιχου ήταν για να γίνει ανίχνευση και χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και της μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης, η συγκέντρωση της οποίας αυξάνεται στο τμήμα του δαχτύλου που παραμένει δεμένο με τη πάροδο του χρόνου, αφού σε εκείνη τη περιοχή το αίμα δεν οξυγονώνεται. Γι' αυτό επιλέξαμε αρχικά να δέσουμε τα δάχτυλα:

- Για 1min ώστε να ανιχνεύσουμε τη deoxy Hb, η συγκέντρωση της οποίας αρχίζει να αυξάνει με το που διακόψουμε τη ροή του αίματος και
- Για 6min ,όπου πλέον έχει διακοπεί για αρκετή ώρα η οξυγόνωση του αίματος στο δάχτυλο, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της deoxy Hb να έχει αυξηθεί κατά πολύ σε βάρος της oxy Hb.

Συγκεκριμένα για το δείκτη του χεριού μου ενώ είναι δεμένο για 6min, παρουσιάζεται παρακάτω ο φασματικός κύβος που προέκυψε κάνοντας χρήση της κάμερας MuSIS:



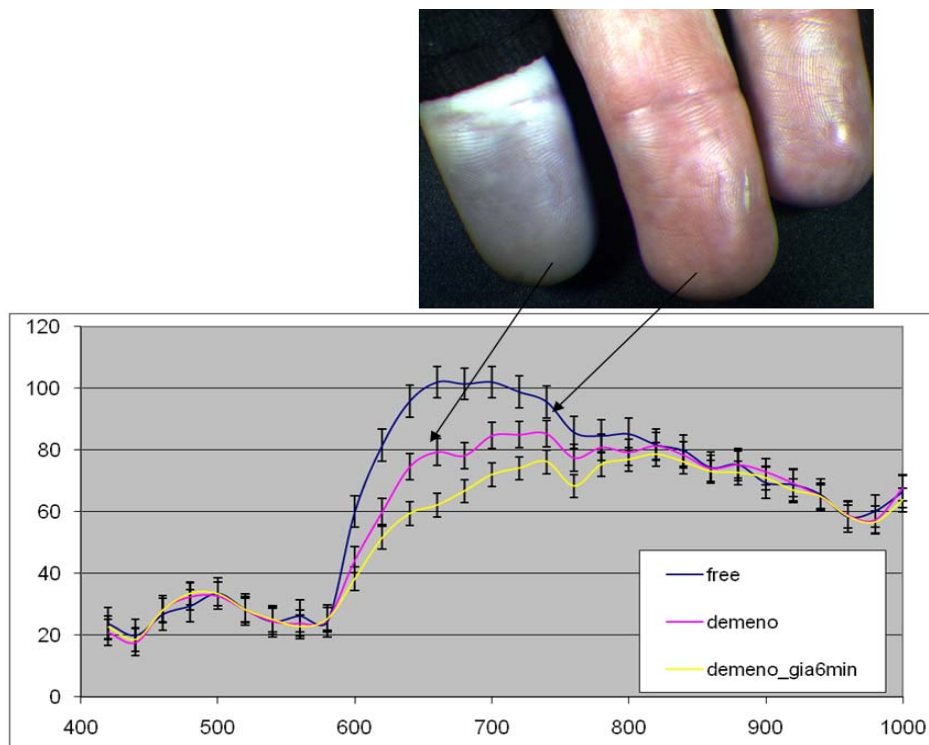
Εικόνα 5. 2: Φασματικός κύβος για το δείκτη ενώ είναι δεμένο για *6min*, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης *MuSIS*

Οι φασματικοί κύβοι που προέκυψαν από τα υπόλοιπα δάχτυλα σε όλες τις καταστάσεις παρουσιάζονται συγκεντρωμένοι στο Παράρτημα.

2^ο Στάδιο

Μετά τη παραπάνω πειραματική διαδικασία όσον αφορά το στάδιο της υπερφασματικής απεικόνισης έχουμε στη διάθεση μας ένα σύνολο από 9 φασματικούς κύβους, καθένας εκ των οποίων αντιστοιχεί σε ένα δάχτυλο (δείκτη, μέσο, παράμεσο) σε μια συγκεκριμένη κατάσταση (ελεύθερο, δεμένο για 1min, δεμένο για 6min). Σκοπός του 2^{ου} Σταδίου είναι η μελέτη των φασματικών ιδιοτήτων των δαχτύλων, προκειμένου να εντοπίσουμε τα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνωσης της αιμοσφαιρίνης σε κάθε δάχτυλο, ανάλογα με τη κατάσταση στην οποία βρίσκεται.

Έτσι ξεκινήσαμε αποκτώντας τα φάσματα ανάκλασης από 10 σημεία (pixel) κάθε δαχτύλου που με οπτική παρατήρηση φαίνονταν λιγότερο οξυγονωμένα (πιο σκούρο χρώμα) και απο σημεία που φαίνονταν να οξυγονώνονται κανονικά (πιο ανοιχτόχρωμα). Στη συνέχεια υπολογίσαμε τον μέσο όρο των φασμάτων αυτών, βρίσκοντας μία αντικειμενική προσέγγιση των φασμάτων ανάκλασης για περιοχές που είναι περισσότερο ή λιγότερο οξυγονωμένες. Την διαδικασία αυτή την ακολουθήσαμε για όλα τα δάχτυλα, προκειμένου να πειστούμε για την αντικειμενικότητα και την ορθότητα του κριτηρίου υπολογισμού που χρησιμοποιήσαμε. Παρακάτω παρουσιάζουμε τη διαδικασία που ακολουθήσαμε για 2 δάχτυλα που βρίσκονται σε διαφορετική κατάσταση και κατά συνέπεια εμφανίζουν χρωματικές διαφορές:



Εικόνα 5. 3: Μέσοι όροι ανάκλασης για περιοχές δαχτύλων οξυγονωμένης και μη Hb

Όπως παρατηρούμε στις 2 αυτές καταστάσεις (Εικόνα 5. 4), όπου ο δείκτης είναι δεμένος για 1min και αυξήθηκε ήδη η συγκέντρωση της deoxy-Hb και όπου ο μέσος είναι ελεύθερος, υπάρχει σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των φασμάτων ανάκλασης. Επίσης παρατηρούμε ότι όσο περνάει η ώρα και μειώνεται η ροή του αίματος στην περιοχή του δαχτύλου, το φάσμα ανάκλασης μειώνεται. Όσο η περιοχή δεν αιματώνεται τόσο η απορρόφηση της ακτινοβολίας αυξάνεται και γι' αυτό το λόγο το φάσμα ανάκλασης μειώνεται.

Βρίσκοντας τις διαφορές στις τιμές των εντάσεων μεταξύ των 3 διαφορετικών καταστάσεων στις οποίες υποβάλαμε τα δάχτυλα για κάθε μήκος κύματος, διαπιστώνουμε ότι η μέγιστη διαφορά εντάσεως παρατηρείται στα 680nm όπως φαίνεται και γραφικά από τα παραπάνω φάσματα. Όπως παρατηρούμε, τα 3 φάσματα έχουν μεγάλες αποκλίσεις τιμών έντασης από τα 600 έως τα 800nm περίπου. Από τα 800nm και για μεγαλύτερα μήκη κύματος όπως και για τιμές χαμηλότερες από τα 600nm τα 3 φάσματα πλησιάζουν μεταξύ τους ώσπου τελικά συμπίπτουν.

Συνεπώς προκειμένου να βγάλουμε σωστά συμπεράσματα για το βαθμό οξυγόνωσης της αιμοσφαιρίνης για κάθε περιοχή του δαχτύλου πρέπει να έχουμε ως περιοχή μελέτης περίπου τα 600nm-800nm. Αυτό οφείλεται στο ότι η αιμοσφαιρίνη έχει χαμηλή απορρόφηση από τα 600nm και πάνω και κατά συνέπεια μεγαλύτερη σκέδαση.

Καθώς στο υπερίωδες (στα χαμηλά μήκη κύματος), η απορρόφηση αυξάνεται εξαιτίας της παρουσίας στο αίμα της πρωτεΐνης, του DNA και άλλων μορίων που έχουν σε αυτές τις συχνότητες υψηλούς δείκτες απορρόφησης, γι' αυτό και έχουμε χαμηλή σκέδαση και εκεί οι καμπύλες όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.2 συμπίπτουν. Το ίδιο ισχύει και για τα μήκη κύματος του υπερύθρου (στα υψηλά μήκη κύματος) όπου η απορρόφηση αυξάνεται εξαιτίας του νερού που είναι βασικό συστατικό του αίματος.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε τους αλγόριθμους ποσοτικού προσδιορισμού χρωμοφόρων που περιγράψαμε αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2 για να ανιχνεύσουμε τη παρουσία της deoxy Hb, και περιμένουμε οι τιμές της deoxy Hb να υπερτερούν αυτών της oxy-Hb όσο το δάχτυλο παραμένει δεμένο, ώστε να δικαιολογηθεί και το μαύρισμα που παρατηρείται. Η παρουσία της deoxy Hb υποδηλώνεται με τις αρνητικές τιμές του δείκτη οξυγόνωσης (IOX, SaO₂), ενώ οι θετικές τιμές του δείκτη οξυγόνωσης αντιστοιχούν σε οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη.

Παρακάτω παρουσιάζουμε τους πίνακες με τα αποτελέσματα που βγάλαμε με βάση τον αλγόριθμο του Feather ενδεικτικά, καθώς και οι υπολοίποι αλγόριθμοι βγάζουν παρόμοια αποτελέσματα και για εξοικονόμηση χώρου τα παρουσιάσαμε όλα στο Παράρτημα, εκτός από

τις εικόνες που προέκυψαν με τη Matlab με βάση αυτούς τους αλγόριθμους που τις παρουσιάζουμε στη συνέχεια.

Ο **Feather** για τον υπολογισμό των δεικτών χρησιμοποίησε τις παρακάτω σχέσεις:

$$IHB = [(L_{544} - L_{527.5})/16.5 - (L_{573} - L_{544})/29] \times 100$$

$$IOX = [(L_{573} - L_{558.5}) - (L_{558.5} - L_{544})] \times 100 / (14.5 \times IHB)$$

Όπου

$$L = LIR = \log_{10} 1/R = \log (I_0 / I)$$

Επειδή η σύλληψη των εικόνων πραγματοποιείται με βήμα 20 nm από τα 420-1000 nm δεν υπάρχουν πληροφορίες για όλη τη φασματική περιοχή. Για το λόγο αυτό αναγκαστήκαμε να κάνουμε μερικές προσεγγίσεις, μιας και κάθε αλγόριθμος χρησιμοποιεί για τον υπολογισμό των δεικτών της μελανίνης και της αιμοσφαιρίνης και ενδιάμεσες φασματικές μπάντες.

Η αντιστοιχία των μηκών κύματος που επιλέχτηκε φαίνεται παρακάτω:

Μήκη κύματος αλγορίθμου(nm)	Μήκη κύματος που χρησιμοποιήσαμε
527,5	520
544	540
558,5	560
573	580

Παρακάτω παρατίθενται οι τιμές των δεικτών αιμοσφαιρίνης (IHB) και οξυγόνωσης (IOX) για 10 διαφορετικά σημεία του δείκτη και στις 3 καταστάσεις όπου υποβλήθηκε (σε ελεύθερη κατάσταση, δεμένος για 1min και δεμένος για 6min).

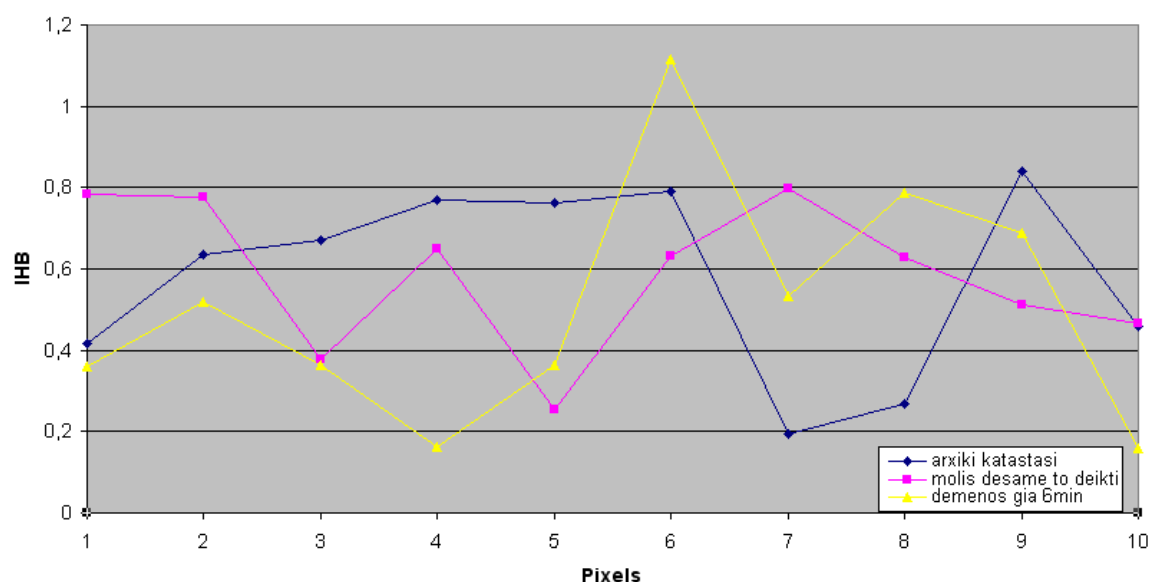
Πίνακας δεικτών αιμοσφαιρίνης

	IHB1	IHB2	IHB3	IHB4	IHB5	IHB6	IHB7	IHB8	IHB9	IHB10
Ελεύθερος	0,415929	0,636061	0,668853	0,767861	0,762712	0,79134	0,193222	0,267506	0,841618	0,458536
Δεμένος 1min	0,784261	0,776358	0,376276	0,648089	0,25405	0,630608	0,799188	0,628787	0,510448	0,464421
Δεμένος 6min	0,360927	0,517686	0,364788	0,162599	0,362813	1,114788	0,532684	0,786859	0,687488	0,15958

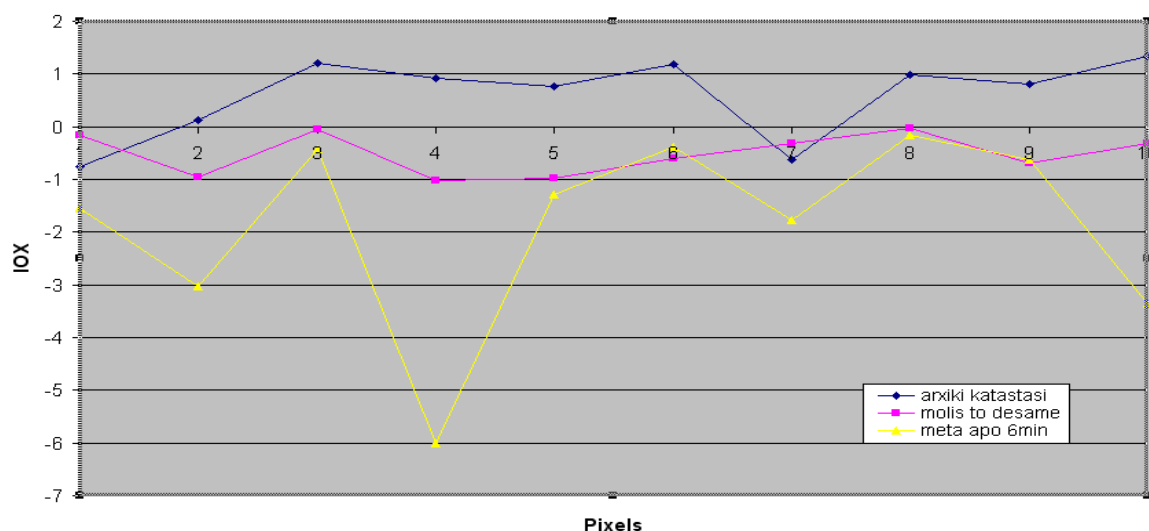
Πίνακας δεικτών οξυγόνωσης

	IOX1	IOX 2	IOX 3	IOX 4	IOX 5	IOX 6	IOX 7	IOX 8	IOX 9	IOX 10
Ελεύθερος	-0,75458	0,124513	1,215001	0,921277	0,770851	1,189734	-0,62107	0,996072	0,798542	1,334958
Δεμένος 1min	-0,16837	-0,96476	-0,05053	-1,02224	-0,98217	-0,60421	-0,32377	-0,02196	-0,69076	-0,31541
Δεμένος 6min	-1,54682	-3,02013	-0,41709	-5,99877	-1,27597	-0,37582	-1,76918	-0,16684	-0,62666	-3,35272

Παραθέτουμε τους παραπάνω δείκτες στις ακόλουθες γραφικές όπου η αρχική κατάσταση αντιστοιχεί με το μπλε χρώμα, η κατάσταση όπου ο δείκτης είναι δεμένος για 1min αντιστοιχεί με το ροζ χρώμα και η κατάσταση όπου ο δείκτης είναι δεμένος για 6min αντιστοιχεί με το κίτρινο χρώμα:



Γραφική 5



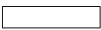
Γραφική 6

Στον αλγόριθμο του Feather παρατηρούμε ότι:

- Από τα φάσματα ανάκλασης της αρχική κατάστασης (με μπλε χρώμα) όπου το δάχτυλο είναι ελεύθερο και της κατάστασης όπου είναι δεμένο για 1min (με ροζ χρώμα) σε ορισμένα pixels η τιμή του IHB μειώνεται ενώ σε άλλα αυξάνεται, ενώ ο IOX παίρνει αρνητικές τιμές υποδηλώνοντας την παρουσία μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης στο 1min.
- Ομοίως από τα φάσματα ανάκλασης της κατάστασης όπου το δάχτυλο είναι δεμένο για 1min (ροζ χρώμα) και της κατάστασης όπου είναι δεμένο για 6min (κίτρινο χρώμα) σε ορισμένα pixels η τιμή του IHB μειώνεται ενώ σε άλλα αυξάνεται, ενώ ο IOX εξακολουθεί να παίρνει αρνητικές τιμές υποδηλώνοντας την παρουσία μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης.

Στη συνέχεια υλοποιήσαμε τους αλγορίθμους προσδιορισμού χρωμοφόρων σε Matlab και πήραμε τους χρωματικούς χάρτες (colourmap) για κάθε δάχτυλο παρουσιάζοντας το κάθε εικονοστοιχείο της εικόνας μας (pixel) με ένα χρώμα από το χρωματικό κώδικα RGB. Συγκεκριμένα προσπαθήσαμε να διαχωρίσουμε σε κάθε δάχτυλο τα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνωσης της αιμοσφαιρίνης αντιστοιχίζοντας τις περιοχές που οξυγονώνονται κανονικά ή αποτελούν background της εικόνας με μπλε χρώμα και τα υπόλοιπα χρωματικά στάδια με βάση τα όρια τιμών των δεικτών της deoxy Hb που κυμάνθηκαν στις ίδιες τιμές και για τα 3 δάχτυλα και παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακες με όρια deoxy Hb after 1min

Feather	Ferguson	Hajizadeh	Deoxy Hb
-0.3 =<IOX<0	-0.3 =<IOX<0	-9 =<SaO ₂ <0	
-0.6 =<IOX< -0.3	-0.6 =<IOX< -0.3	-50 =<SaO ₂ < -9	
-0.9 =<IOX< -0.6	-0.9 =<IOX< -0.6	-100 =<SaO ₂ < -50	

Πίνακες με όρια deoxy Hb after 6min

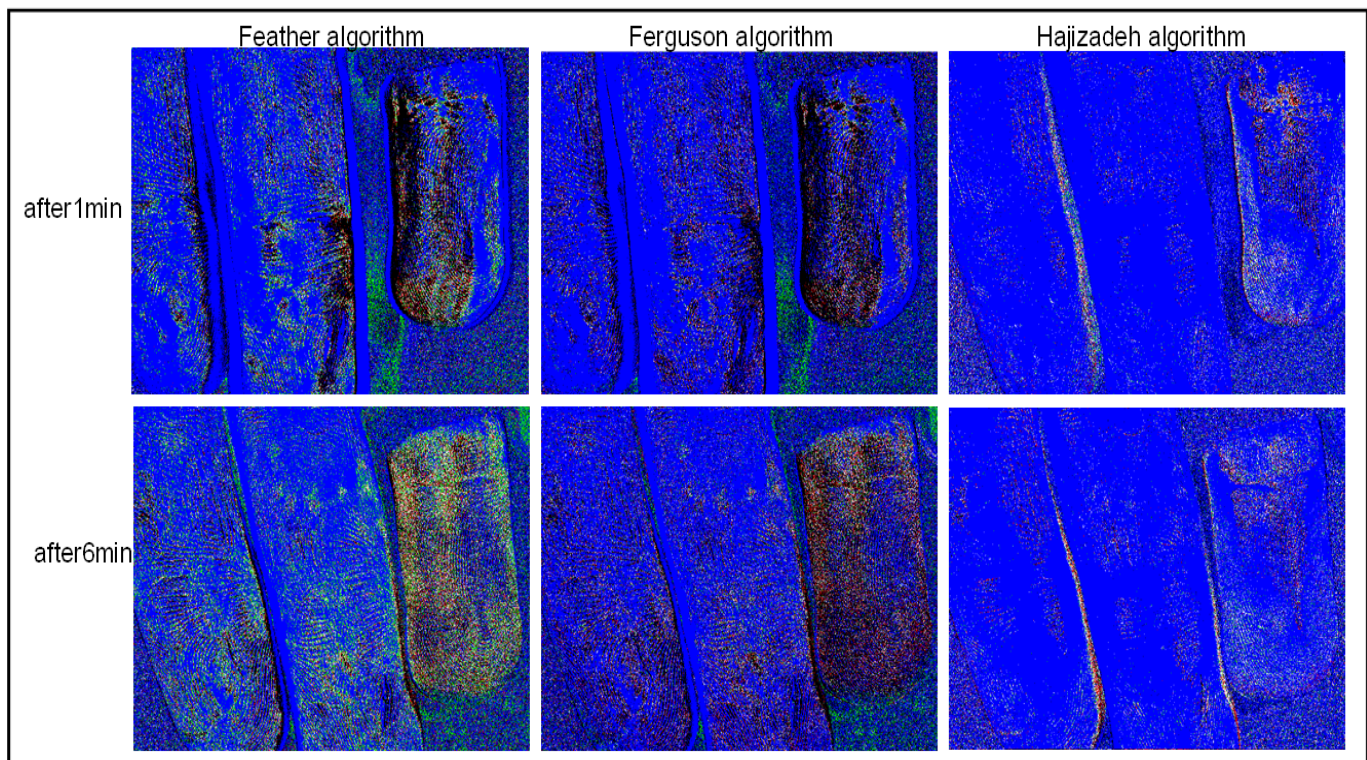
Feather	Ferguson	Hajizadeh	Deoxy Hb
-0.1 =<IOX<0	-0.1 =<IOX<0	-9 =<SaO ₂ <0	
-0.8 =<IOX< -0.1	-0.8 =<IOX< -0.1	-50 =<SaO ₂ < -9	
-0.08 =<IOX< -0.8	-0.08 =<IOX< -0.8	-100 =<SaO ₂ < -50	

Shimada

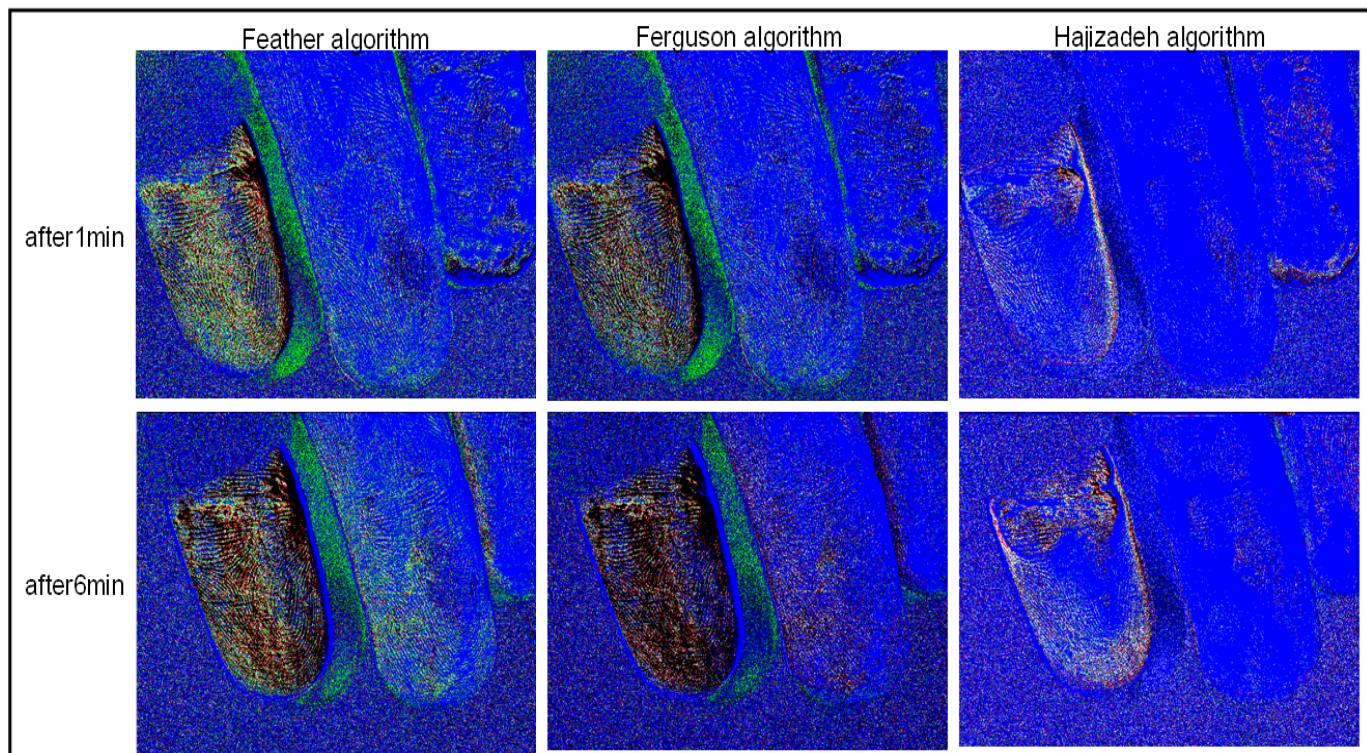
520-580nm oxy Hb	520-580nm deoxy Hb	560-540nm oxy Hb	560-540nm deoxy Hb
0.03=<DC<0.05 	0.003=<DC<0.005 	0.01 =<DC<0.03 	0.01 =<DC<0.03 
0.05=<DC<0.07 	0.005=<DC<0.007 	0.03 =<DC< 0.04 	0.03 =<DC< 0.04 
0.07=<DC<0.08 	0.007=<DC<0.010 	0.04 =<DC< 0.06 	0.04 =<DC< 0.06 

Τα όρια τιμών για του δείκτες DC που προέκυψαν με τον αλγόριθμο Shimada ήταν τα ίδια και για τα 3 δάχτυλα και τόσο ενώ ήταν δεμένα για 1min όσο και για 6min.

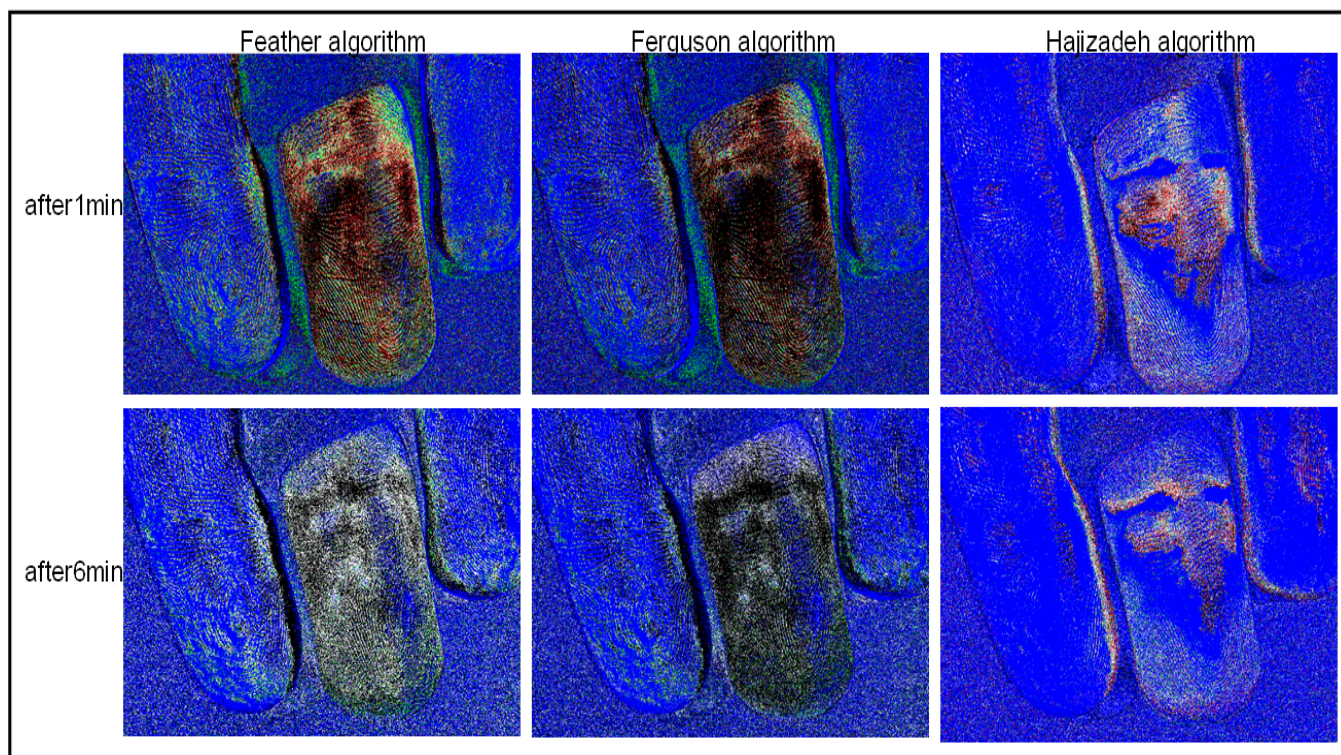
Με βάση λοιπόν τα παραπάνω όρια τιμών των δεικτών της deoxy Hb πήραμε τους ακόλουθους χρωματικούς χάρτες για τα 3 δάχτυλα:



Εικόνα 5. 4: Δείκτης IOX Παράμεσων δεμένον μετά απο 1 και 6 min

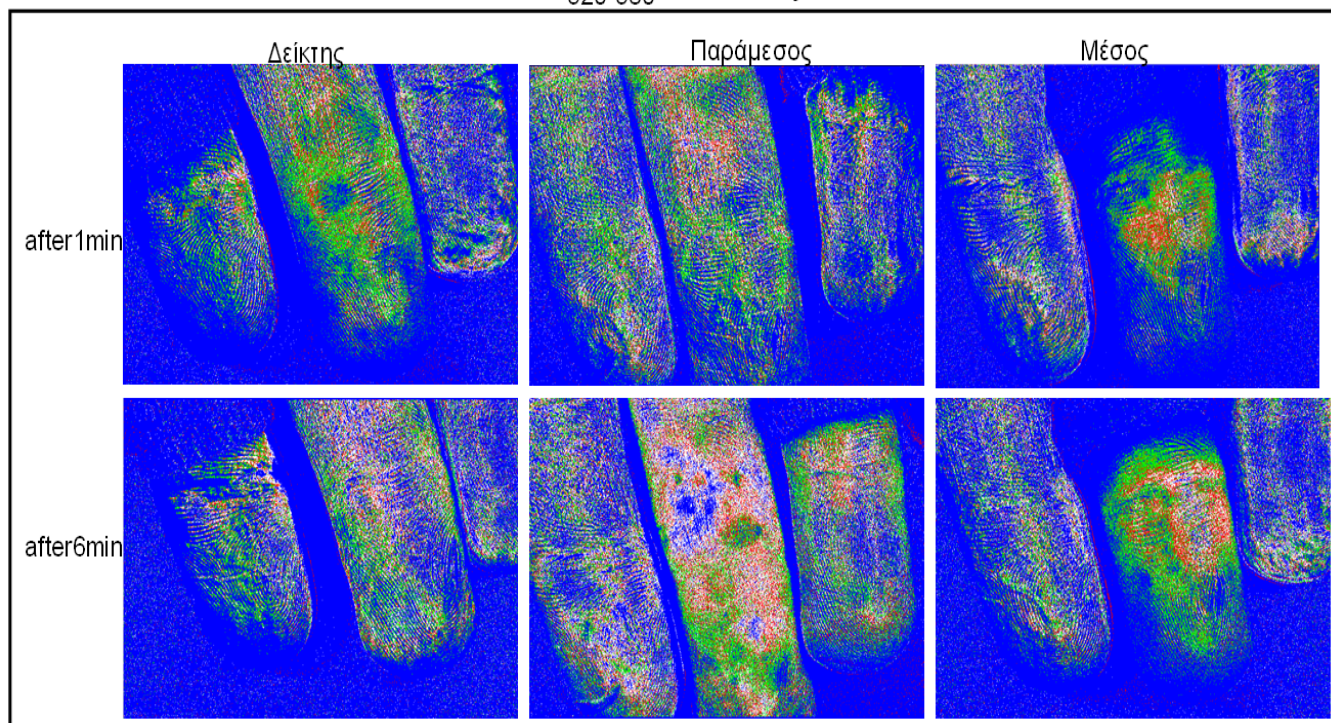


Εικόνα 5. 5: Δείκτης IOX δείκτη δεμένον μετά απο 1 και 6 min



Εικόνα 5. 6: Δείκτης IOX Μέσου δεμένου μετά απο 1 και 6 min

Shimada algorithm
 $DC_{520-580}$ nm deoxy Hb



Εικόνα 5. 7: Δείκτης $DC_{520-580}$

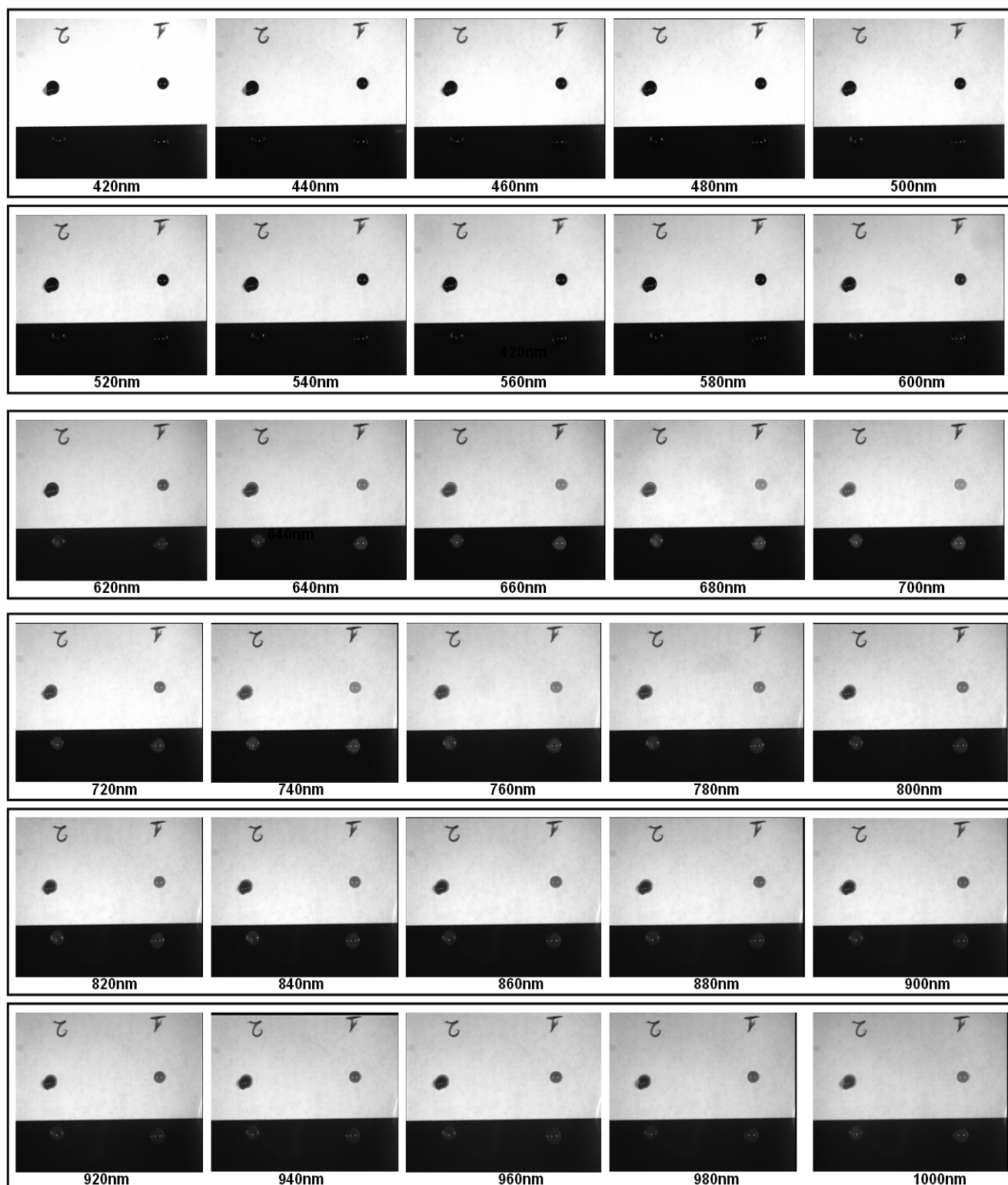
Όπως παρατηρούμε από τις παραπάνω εικόνες δεν κατέστη δυνατό με τους παραπάνω αλγορίθμους να προσδιορίσουμε το κατάλληλο συνδιασμό μπαντών και ορίων που να απεικονίζει με ακρίβεια τις διαφορές στις συγκεντρώσεις της deoxy Hb. Με τους αλγορίθμους των Feather και Ferguson παρατηρούμε υπάρχει κάποιος ελάχιστος διαχωρισμός μεταξύ των δεμένων και ελεύθερων δαχτύλων, σε αντίθεση με τους αλγορίθμους των Hajizadeh και Shimada, όπου δεν γίνεται σχεδόν καθόλου διαχωρισμός. Για τους παραπάνω λόγους χρησιμοποιήσαμε στη συνέχεια αλγορίθμους φασματικής ταξινόμησης ώστε να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των διαφορετικών ορίων οξυγόνωσης των περιοχών του κάθε δαχτύλου.

3^ο Στάδιο

Σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας επαναλάβαμε τη διαδικασία του 1^{ου} Σταδίου για τη λήψη υπερφασματικών κύβων 2 κηλίδων αρτηριακού και φλεβικού αίματος με μαύρο και άσπρο φόντο.

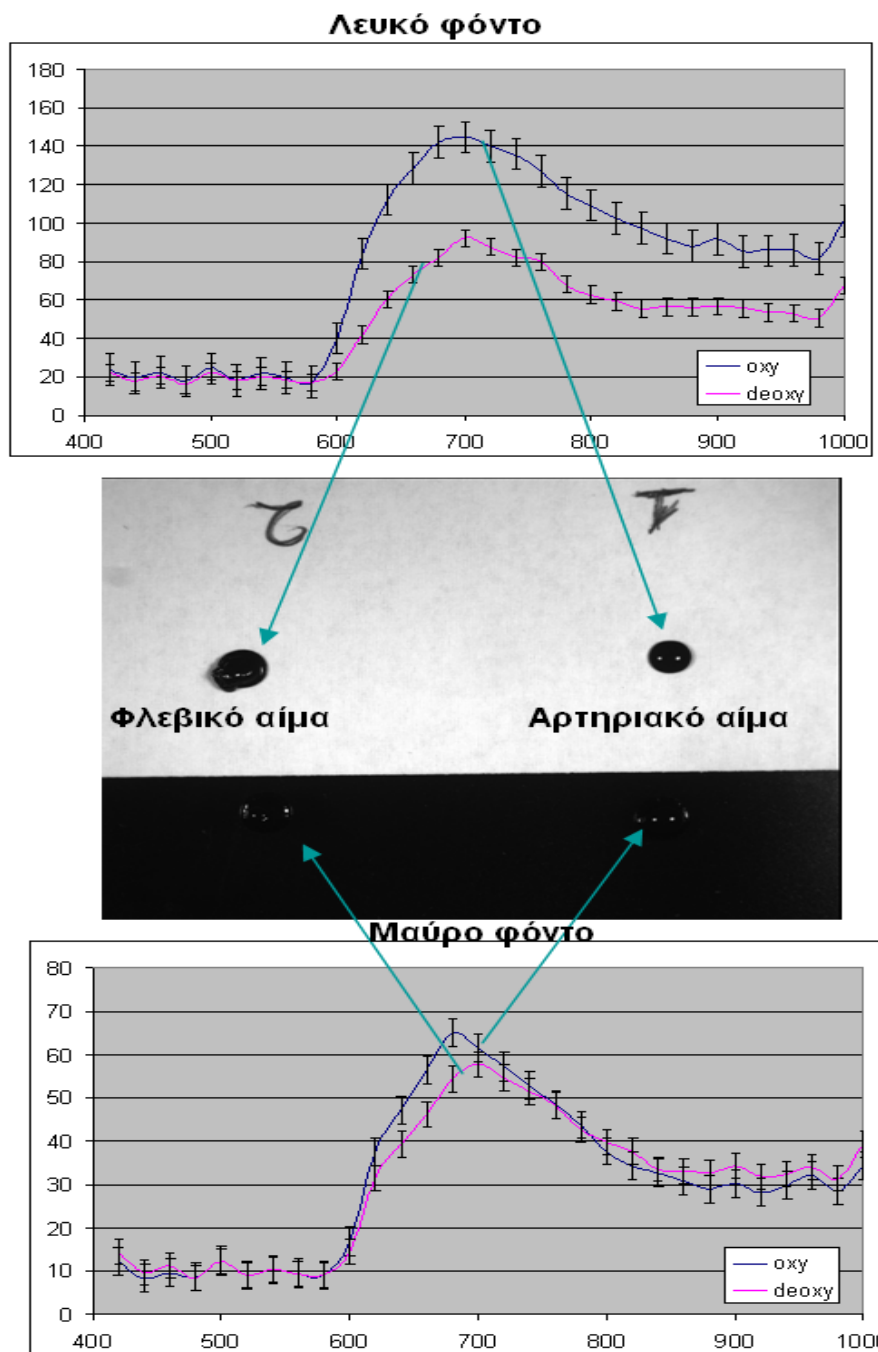
Σκοπός μας ήταν και πάλι να γίνει ανίχνευση και χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης στις κηλίδες του αίματος. Καθώς αναμένουμε η συγκέντρωση της deoxy Hb να είναι μεγαλύτερη στην κηλίδα του φλεβικού αίματος, που είναι λιγότερο οξυγονωμένο, σε αντίθεση με του αρτηριακού που είναι οξυγονωμένο.

Συγκεκριμένα για τις 2 κηλίδες αίματος παρουσιάζεται παρακάτω ο φασματικός κύβος που προέκυψε κάνοντας χρήση της κάμερας MuSIS:



Εικόνα 5. 8: Φασματικός κύβος για τις κηλίδες αρτηριακού και φλεβικού αίματος , κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS

Στη συνέχεια πήραμε τα φάσματα ανάκλασης από 10 σημεία κάθε κηλίδας αίματος και υπολογίσαμε τους μέσους όρους των φασμάτων, τους οποίους παρουσιάζουμε παρακάτω:



Εικόνα 5.9: Μέσοι όροι φασμάτων ανάκλασης για αρτηριακό και φλεβικό αίμα, σε λευκό και μαύρο φόντο

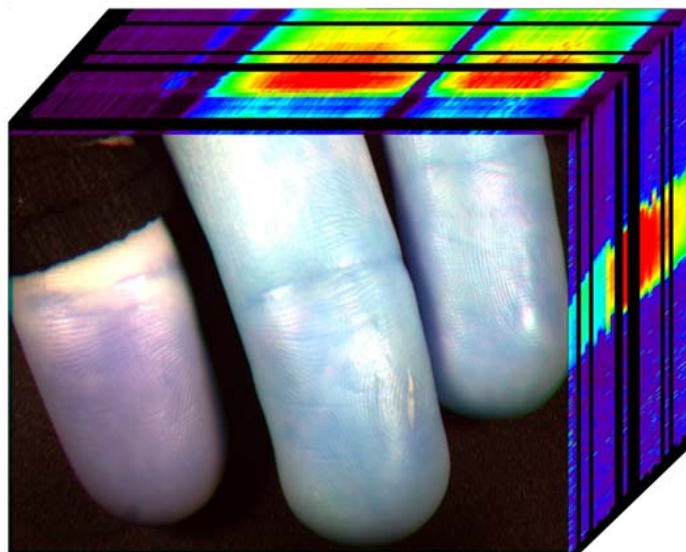
Στην Εικόνα 5.9 παρατηρούμε ότι το φάσμα ανάκλασης του φλεβικού αίματος τόσο με λευκό όσο και με μαύρο φόντο είναι χαμηλότερο από το αντίστοιχο του αρτηριακού, κάτι που είναι απολύτως λογικό καθώς η deoxy Hb που υπερτερεί στο φλεβικό αίμα σε βάρος της oxy Hb, έχει μεγαλύτερη απορρόφηση ακτινοβολίας, ιδιαίτερα σε περιοχές του φάσματος μεγαλύτερες από

600nm, και άρα έχουμε λιγότερη σκέδαση. Ενώ στο αρτηριακό αίμα όπου υπερτερεί η oxy Hb συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο.

Συγκεκριμένα στη Εικόνα 5.9 βλέπουμε ότι η σκέδαση τόσο στο οξυγονωμένο όσο και στο μη οξυγονωμένο αίμα μέχρι τα 580 nm είναι μικρή, αφού στη φασματική περιοχή των 400-580 nm τόσο η oxy όσο και η deoxy Hb έχουν σχετικά υψηλή απορρόφηση ακτινοβολίας. Ενώ η σκέδαση εκτινάσσεται στις φασματικές περιοχές άνω των 600nm, όπου εκεί η απορρόφηση της deoxy και περισσότερο της oxy Hb μειώνεται αισθητά. Στη συνέχεια η σκέδαση μειώνεται πάλι από τα 700-900 nm και από εκεί και πέρα σταθεροποιείται λόγω του γεγονότος ότι αυξάνεται η απορρόφηση της ακτινοβολίας από το νερό, που είναι κύριο συστατικό του αίματος, σε εκείνες τις φασματικές περιοχές.

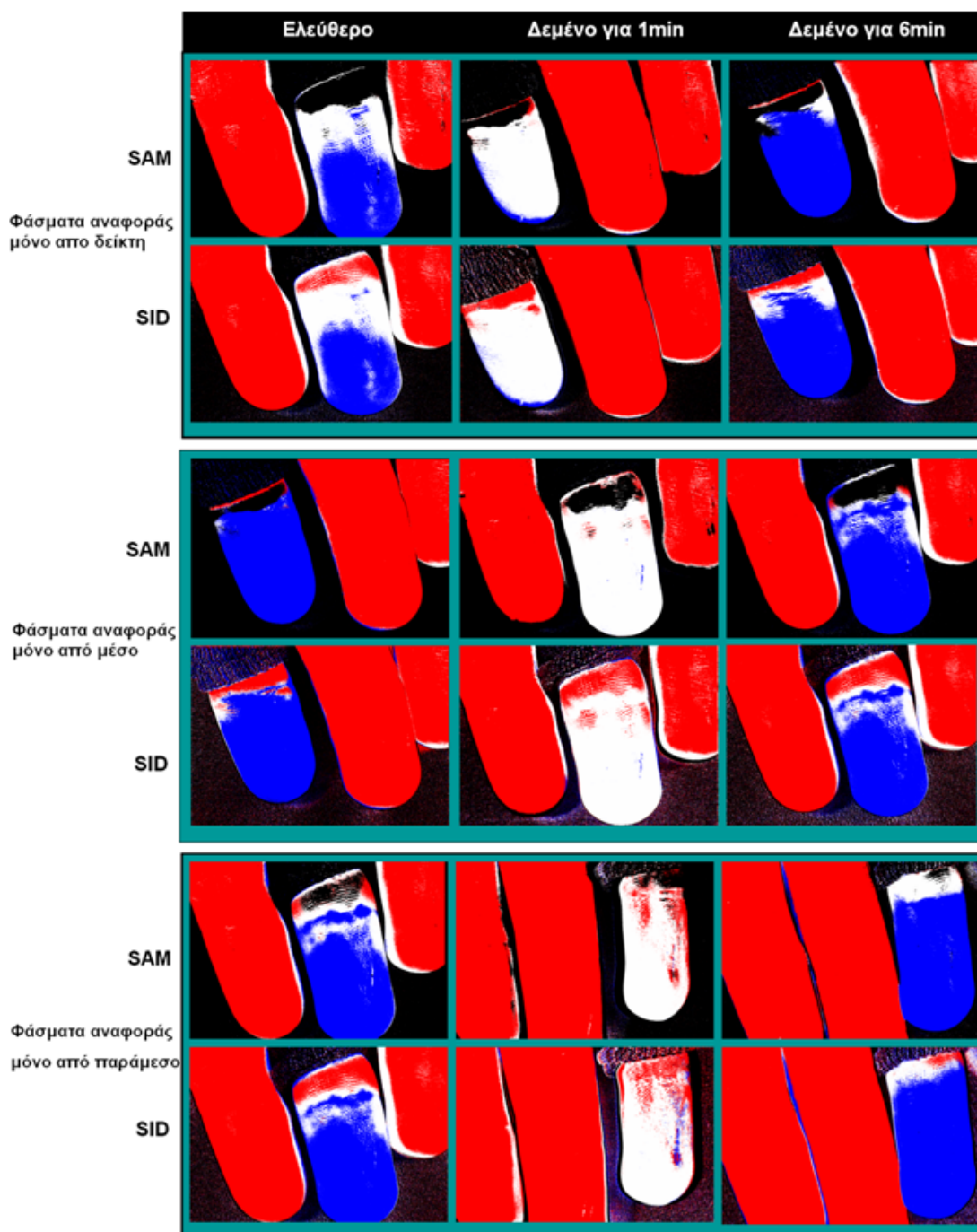
4^ο Στάδιο

Συνεχίζοντας την έρευνα μας, εφαρμόσαμε σε κάθε υπερφασματικό κύβο (Εικόνα 5.10) τους αλγορίθμους: Spectral Angle Mapper (SAM) και Spectral Information Divergence (SID) που περιγράψαμε λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 3. Από τους αλγορίθμους αυτούς προέκυψαν χρωματικοί χάρτες που θα μας βοηθήσουν στην προσπάθειά μας για μη επεμβατική ανίχνευση της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης στο αίμα.



Εικόνα 5. 10: Υπερφασματικός κύβος

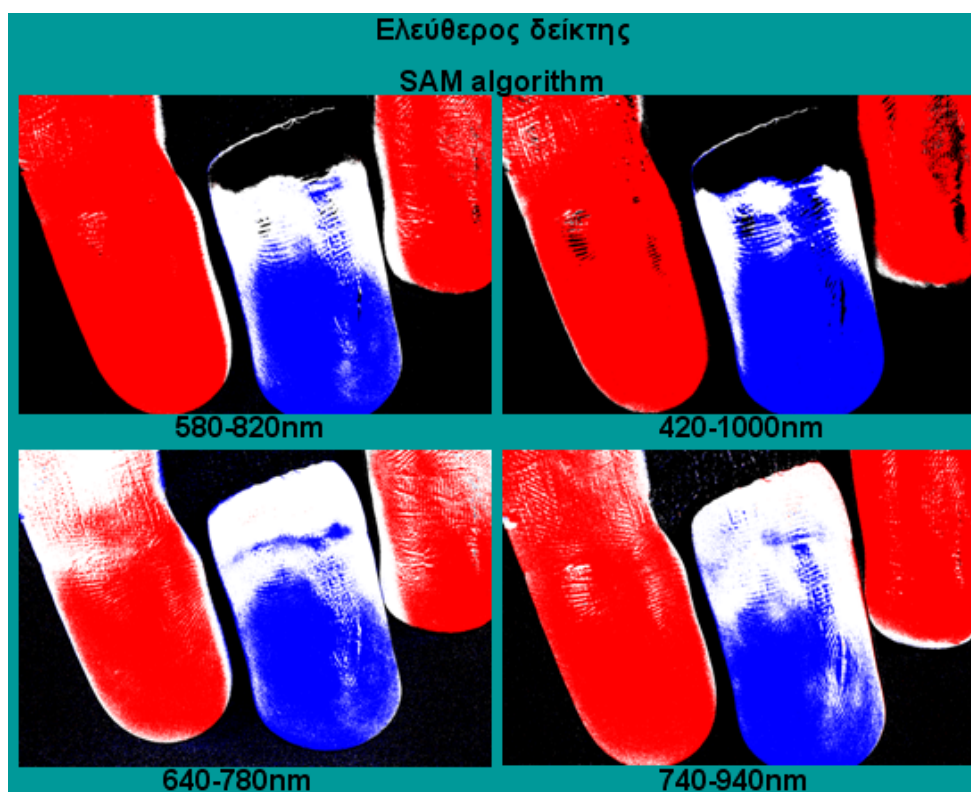
Συγκεκριμένα, για την εφαρμογή τους ορίσαμε αρχικά 3 κλάσεις, αυτή όπου το δάχτυλο είναι ελεύθερο και οξυγονώνεται κανονικά (κόκκινο χρώμα), αυτή όπου το δάχτυλο είναι δεμένο για 1min (λευκό χρώμα) και αυτή όπου το δάχτυλο είναι δεμένο για 6min (μπλε χρώμα). Πήραμε από κάθε δάχτυλο 12 φάσματα αναφοράς από κάθε διαφορετική περιοχή που περιείχε, προκειμένου να κάνουμε την μελέτη μας όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστη και να βγάλουμε αντικειμενικά συμπεράσματα από την παρατήρηση των χρωματικών χαρτών που προέκυψαν από την εφαρμογή κάθε αλγορίθμου. Έτσι προέκυψαν οι ακόλουθοι χρωματικοί χάρτες:



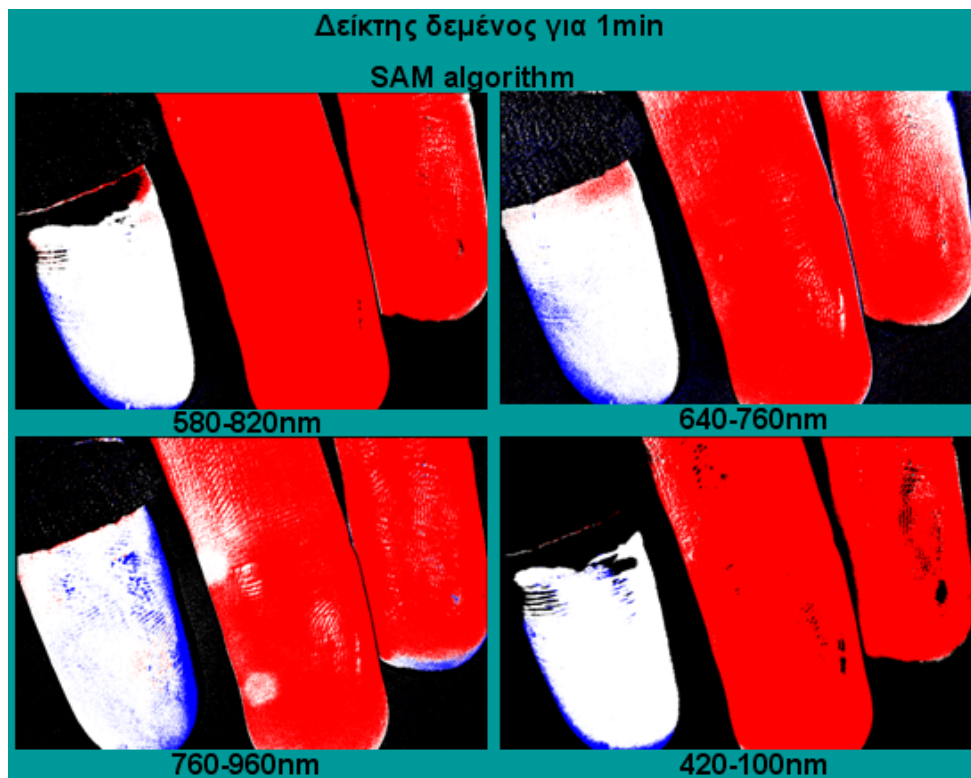
Εικόνα 5. 11: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων και στα 3 δάχτυλα (ελεύθερη κατάσταση->κόκκινο, δεμένο για 1min-> λευκό , δεμένο για 6min->μπλε)

Από την σύγκριση όλων των χρωματικών χαρτών που προκύπτουν από την εφαρμογή των αλγορίθμων, παρατηρούμε ότι οι περιοχές που μας ενδιαφέρουν (οξυγονωμένες με κόκκινο χρώμα, λιγότερο οξυγονωμένες με λευκό χρώμα και ελάχιστα οξυγονωμένες με μπλε χρώμα) διαφοροποιούνται σε κάθε περίπτωση με τον ίδιο περίπου τρόπο, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα κριτήρια επιλογής μας για τον διαχωρισμό των διαφόρων βαθμίδων οξυγόνωσης μίας περιοχής είναι σωστά.. Τέλος, το γεγονός ότι οι αλγόριθμοι που υλοποιήθηκαν για κάθε δάχτυλο παίρνοντας φάσματα αναφοράς είτε από το ίδιο το δάχτυλο είτε από όλα τα δείγματα δαχτύλων έχουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας μεταξύ τους, αποτελεί απόδειξη εγκυρότητας της διάκρισης που κάναμε για τα διάφορα στάδια οξυγόνωσης του δαχτύλου.

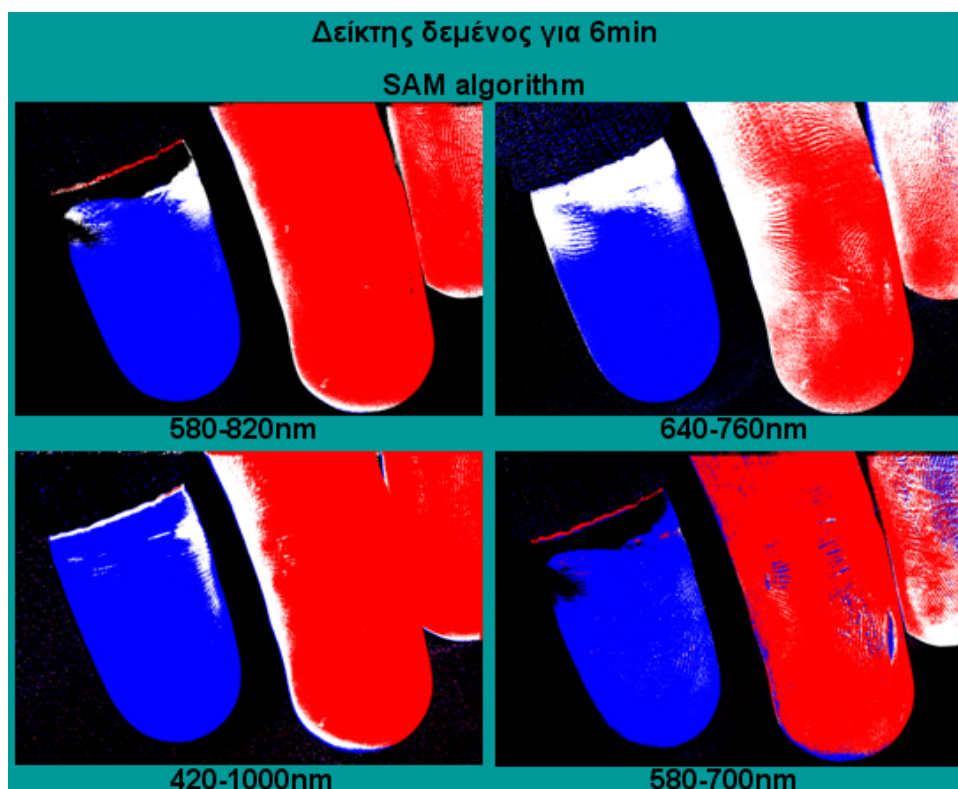
Στην Εικόνα 5.11 παρουσιάζονται οι Εικόνες που προέκυψαν με το καλύτερο δυνατό συνδιασμό μπαντών και είναι 13 μπάντες: από τα 580 έως τα 820nm (ανά 20nm). Ο συνδιασμός αυτός μπαντών προέκυψε ύστερα απο πολλαπλές δοκιμές κάποιες από τις οποίες παρουσιάζουμε ενδεικτικά παρακάτω:



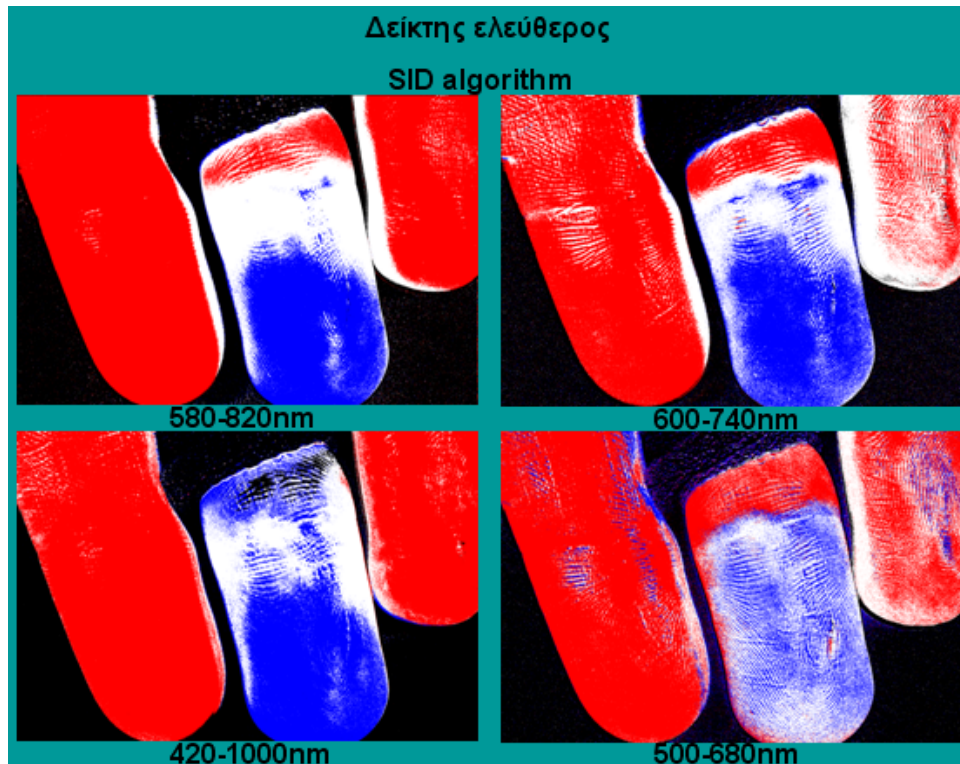
Εικόνα 5. 12: Εικόνες από την εφαρμογή του SAM αλγορίθμου στον ελεύθερο δείκτη (ελεύθερη κατάσταση->κόκκινο, δεμένο για 1min-> λευκό , δεμένο για 6min->μπλε)



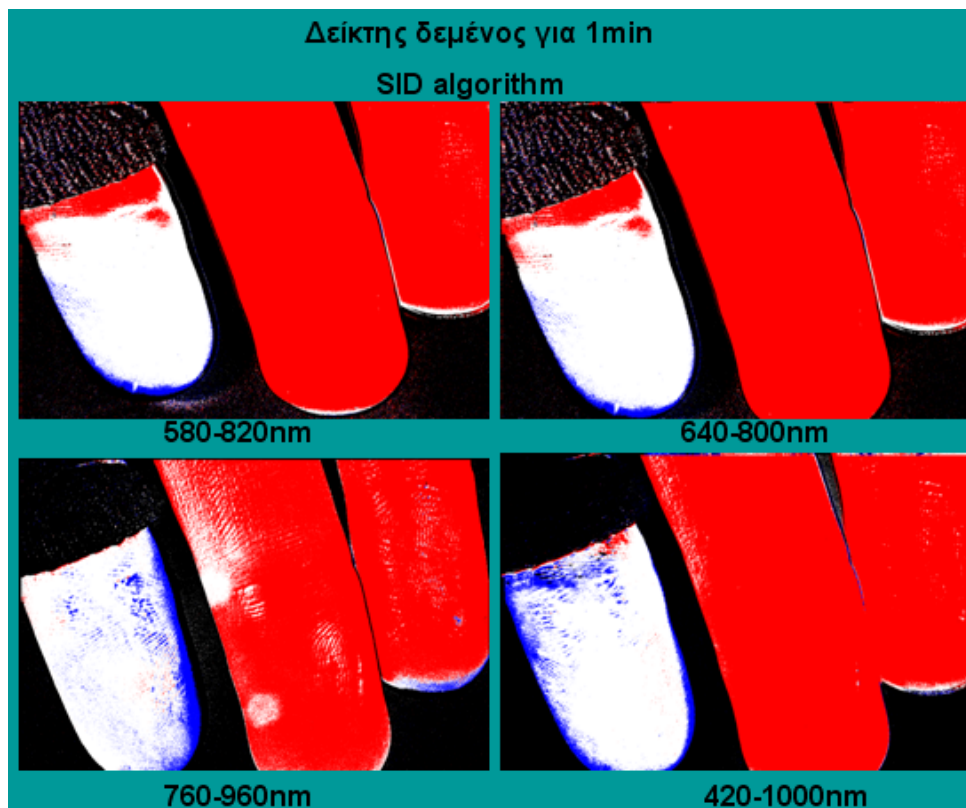
Εικόνα 5. 13: Εικόνες από την εφαρμογή του SAM αλγορίθμου στο δεμένο για 1min δείκτη (ελεύθερη κατάσταση->κόκκινο, δεμένο για 1min-> λευκό , δεμένο για 6min->μπλε)



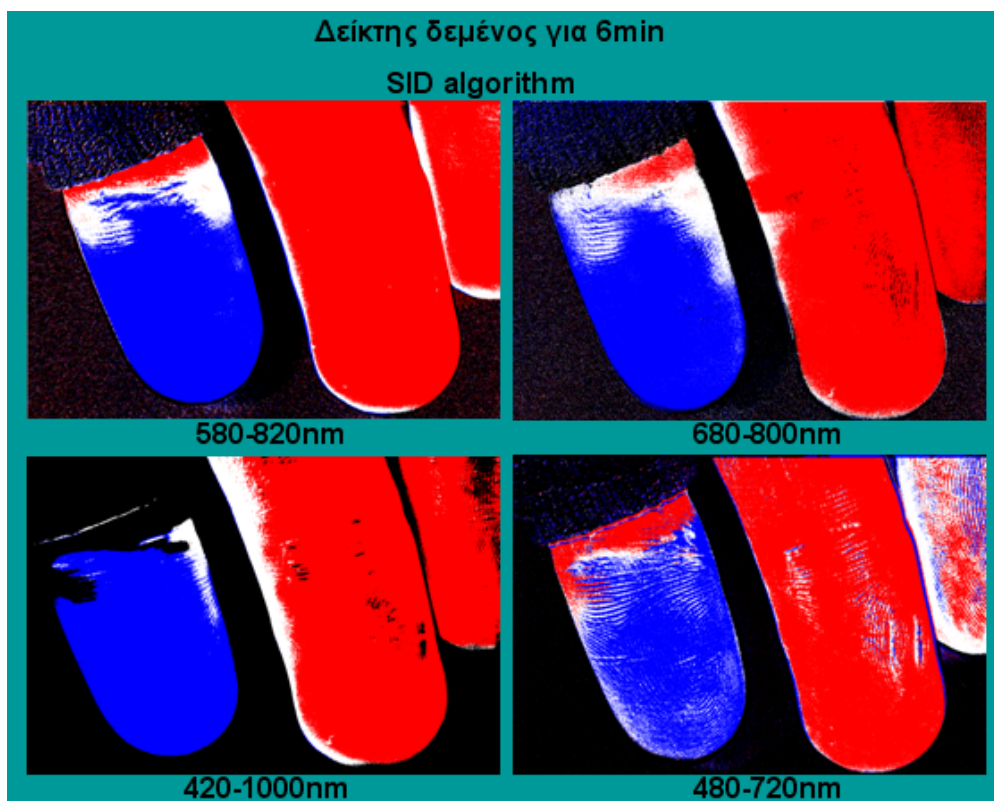
Εικόνα 5. 14: Εικόνες από την εφαρμογή του SAM αλγορίθμου στο δεμένο για 6min δείκτη (ελεύθερη κατάσταση->κόκκινο, δεμένο για 1min-> λευκό , δεμένο για 6min->μπλε)



Εικόνα 5. 15: Εικόνες από την εφαρμογή του SID αλγορίθμου στον ελεύθερο δείκτη (ελεύθερη κατάσταση->κόκκινο, δεμένο για 1min-> λευκό , δεμένο για 6min->μπλε)



Εικόνα 5. 16: Εικόνες από την εφαρμογή του SID αλγορίθμου στο δεμένο για 1min δείκτη (ελεύθερη κατάσταση->κόκκινο, δεμένο για 1min-> λευκό , δεμένο για 6min->μπλε)

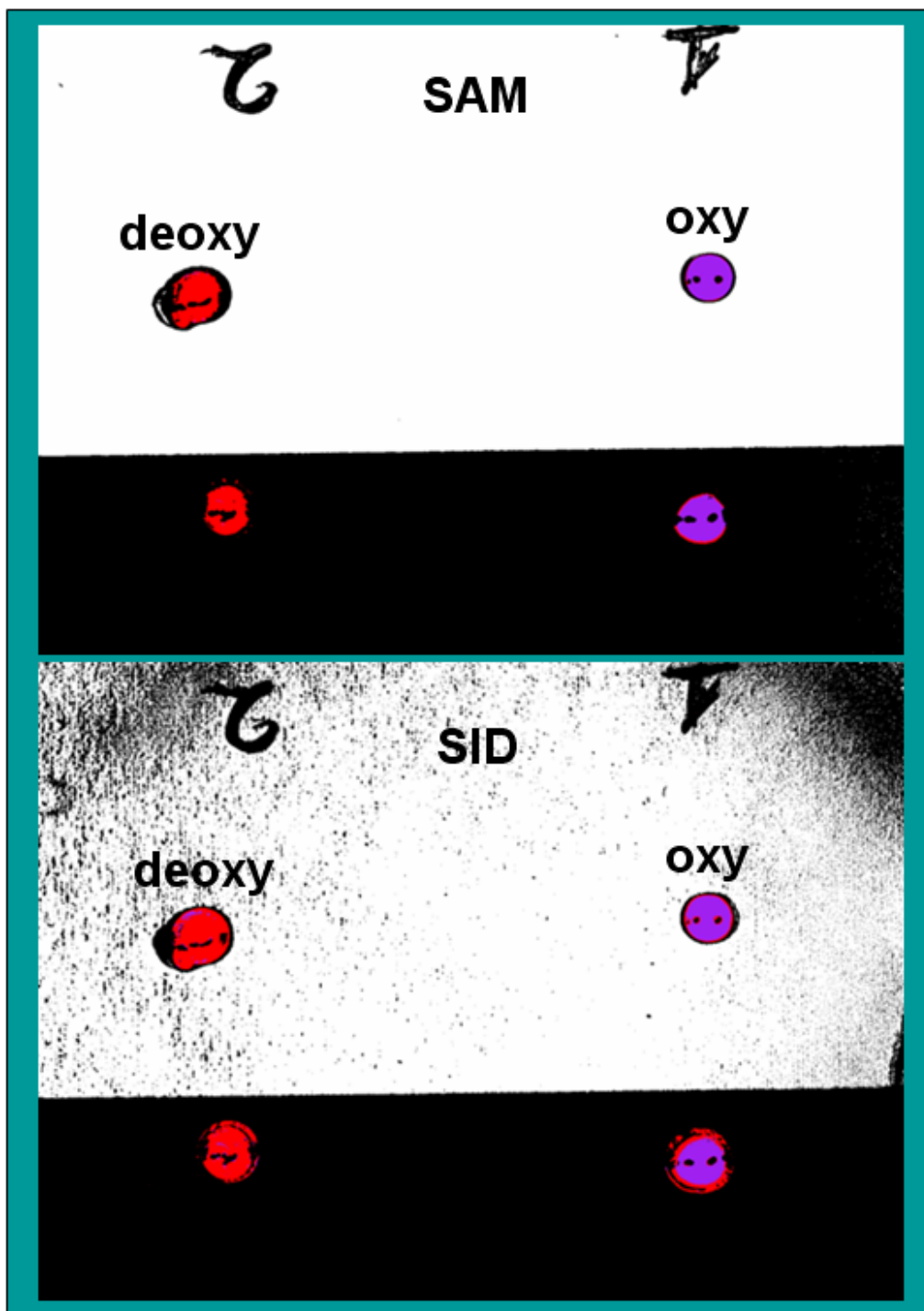


Εικόνα 5.1 7: Εικόνες από την εφαρμογή του SID αλγορίθμου στο δεμένο για 6min δείκτη (ελεύθερη κατάσταση->κόκκινο, δεμένο για 1min-> λευκό , δεμένο για 6min->μπλε)

Τις υπόλοιπες δοκιμές για την εύρεση του καλύτερου δυνατού συνδιασμού μπαντών και για τα υπόλοιπα δάχτυλα τις παρουσιάζουμε αναλυτικά στο Παράρτημα για εξοικονόμηση χώρου.

Τη ίδια διαδικασία ακολουθήσαμε και για τους φασματικούς κύβους που πήραμε από τις κηλίδες αίματος. Δηλαδή εφαρμόσαμε τους αλγορίθμους SAM και SID στους φασματικούς κύβους ορίζοντας 2 κλάσεις για οξυγονωμένο (πορφυρό) και μη οξυγονωμένο αίμα (κόκκινο). Πήραμε από κάθε κηλίδα αίματος 12 φάσματα αναφοράς από διάφορα σημεία, προκειμένου να κάνουμε την μελέτη μας όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστη και να βγάλουμε αντικειμενικά συμπεράσματα από την παρατήρηση των χρωματικών χαρτών που προέκυψαν από την εφαρμογή κάθε αλγορίθμου. Η Εικόνα 5.18 παρουσιάζει και για τους 2 αλγορίθμους το

καλύτερο δυνατό συνδιασμό μπαντών, ο οποίος είναι αυτός που είχαμε καταλήξει και για τα δάχτυλα παραπάνω και είναι: 13 μπάντες από τα 580 έως τα 820nm (ανά 20nm).

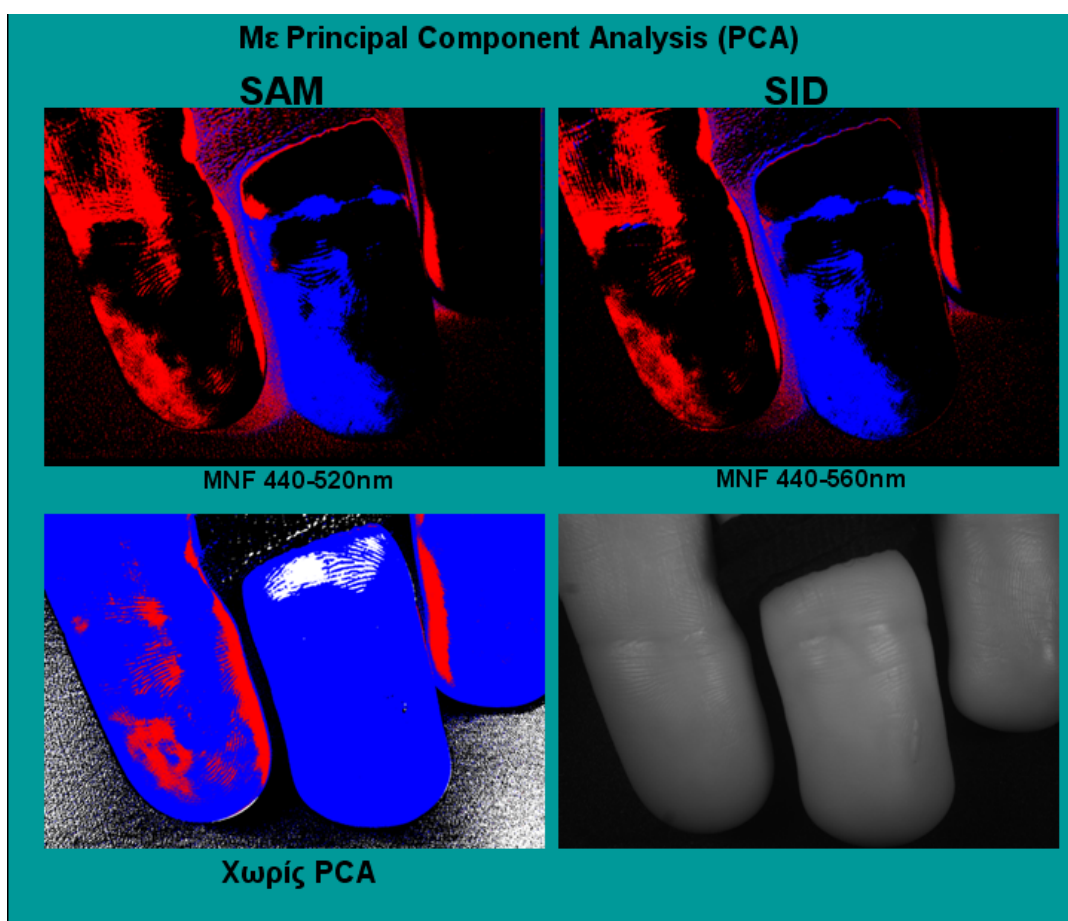


Εικόνα 5. 18: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων στις κηλίδες αίματος

Από την σύγκριση των χρωματικών χαρτών που προκύπτουν από την εφαρμογή των αλγορίθμων, παρατηρούμε ότι οι περιοχές που μας ενδιαφέρουν (οξυγονωμένες με πορφυρό χρώμα, μη οξυγονωμένες με κόκκινο) διαφοροποιούνται σε κάθε περίπτωση με τον ίδιο

περίπου τρόπο, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα κριτήρια επιλογής μας για τον διαχωρισμό των διαφόρων βαθμών οξυγόνωσης μίας περιοχής είναι σωστά..

Στη συνέχεια τρέξαμε και πάλι τους αλγορίθμους SAM και SID, έχοντας κάνει Principal Component Analysis (PCA) και χωρίς PCA, για τους φασματικούς κύβους που πήραμε από τα μέσο δάχτυλο, αλλά με φάσματα αναφοράς που πήραμε από τις κηλίδες αίματος. Στόχος μας ήταν να δούμε εάν θα φαίνεται στους νέους χρωματικούς χάρτες (Εικόνα 5.19) η παρουσία oxy και deoxy Hb στα δάχτυλα.



Εικόνα 5. 19: Χρωματικοί χάρτες με PCA και χωρίς

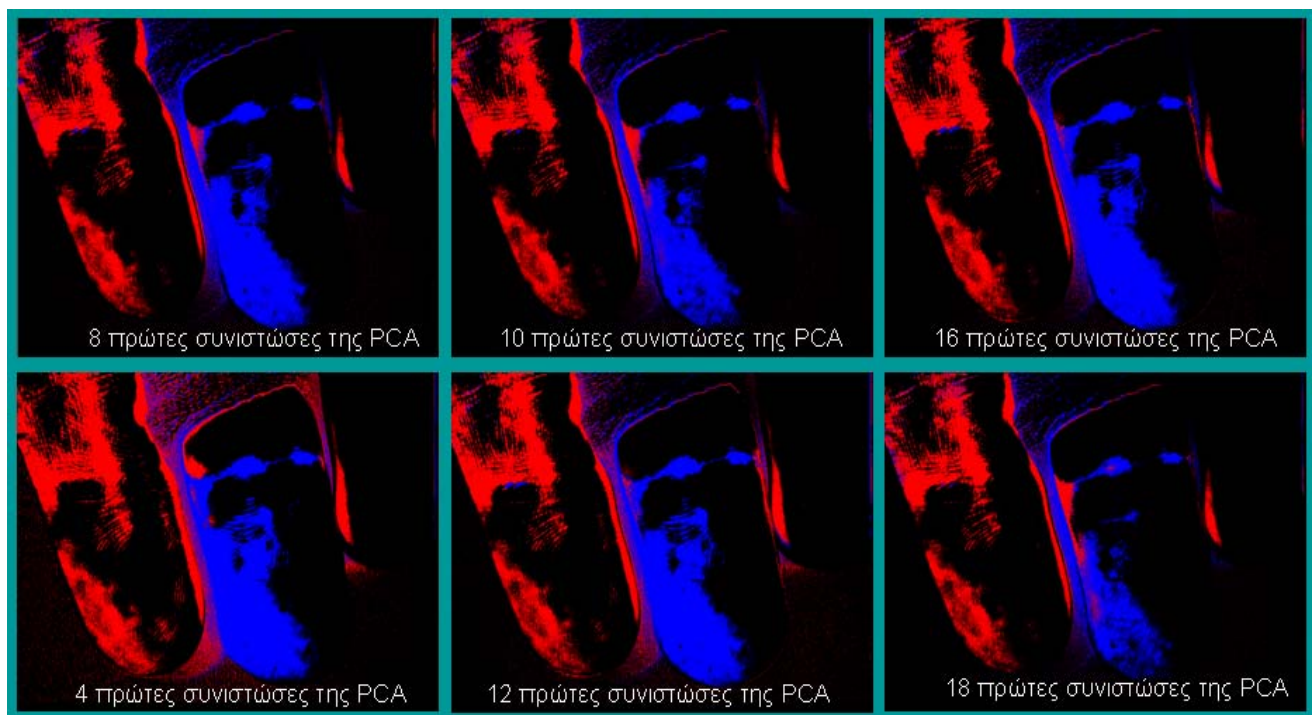
Όπως μπορούμε να δούμε στην Εικόνα 5.19 οι χρωματικοί χάρτες των δαχτύλων που προέκυψαν από τους αλγορίθμους SAM και SID, έχοντας επεξεργαστεί πρώτα τις εικόνες με PCA, δείχνουν καθαρά την ύπαρξη deoxy Hb (με μπλε χρώμα) στο δεμένο για 6min μέσο

δάχτυλο, και τη παρουσία oxy Hb (με κόκκινο χρώμα) στα υπόλοιπα ελεύθερα δάχτυλα. Παρατηρούμε ότι υπάρχουν στις εικόνες πολλά pixels με τιμές NaN (μαύρο χρώμα) και αυτό οφείλεται στο ότι υπάρχει απορρόφηση ακτινοβολίας και από άλλα συστατικά του δαχτύλου εκτός από την αιμοσφαιρίνη, όπως είναι ο δερματικός ιστός, τα τριχοειδή αγγεία, το νερό, η μελανίνη και άλλα. Στον χρωματικό χάρτη που προέκυψε χωρίς να έχουμε επεξεργαστεί τις εικόνες πρώτα με PCA παρατηρούμε ότι δεν γίνεται πολύ καλός διαχωρισμός μεταξύ oxy και deoxy Hb στα δάχτυλα εξαιτίας της παρουσίας θορύβου στην εικόνα.

Τέλος στην Εικόνα 5.19 παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τους καλύτερους συνδιασμούς συνιστωσών και είναι για τις:

- 4 πρώτες συνιστώσες της PCA
- 6 πρώτες συνιστώσες της PCA

. Παρακάτω παρουσιάζουμε ενδεικτικά ορισμένους άλλους συνδιασμούς συνιστωσών που μας έδωσαν λιγότερο καλές εικόνες μαζί με αυτούς που αναφέραμε παραπάνω:



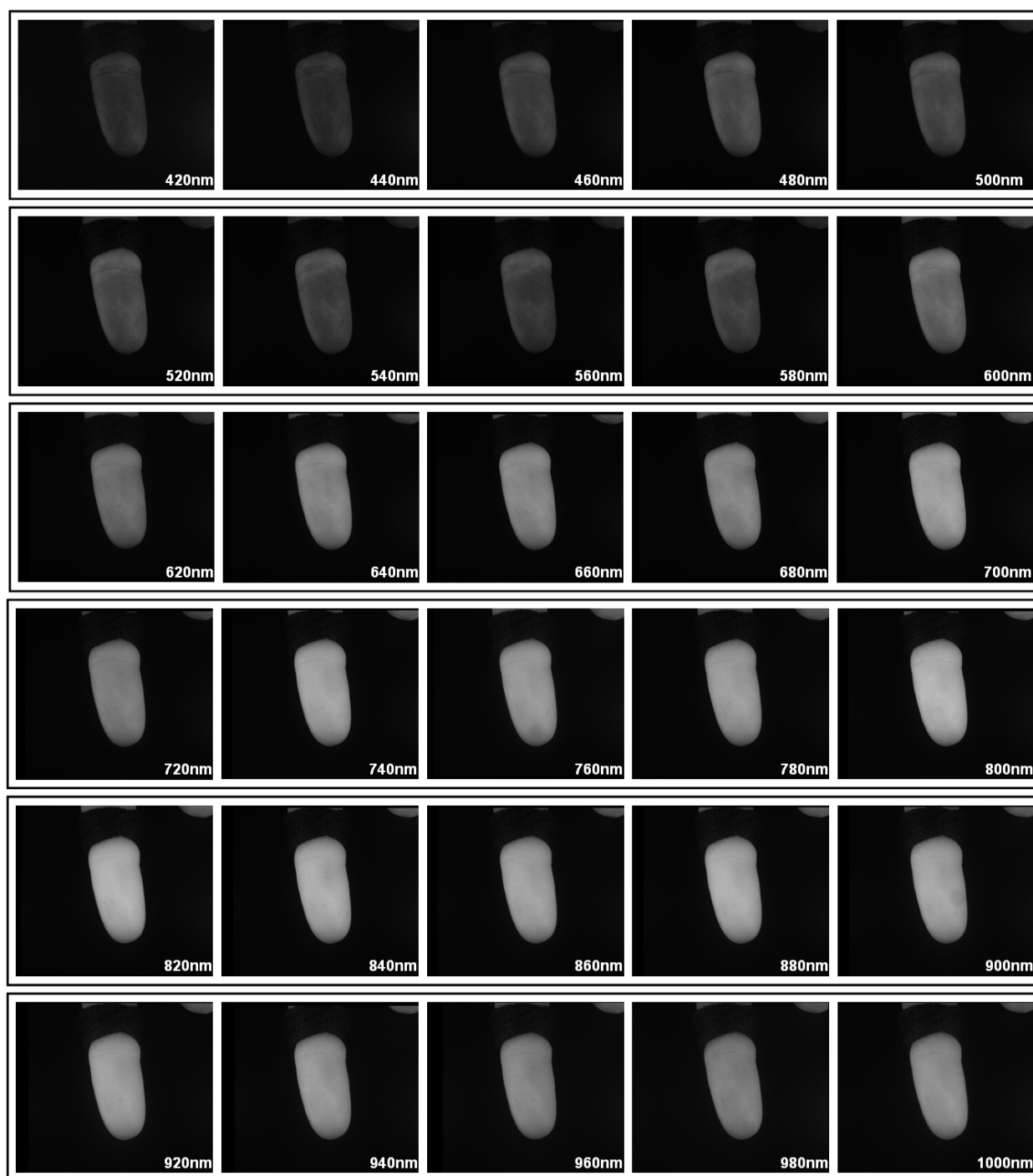
Εικόνα 5. 20: Συνδιασμοί συνιστωσών PCA

5^ο Στάδιο

Αφού προέκυψαν καλά αποτελέσματα στα προηγούμενα πειραματικά στάδια με τους αλγορίθμους φασματικής ταξινόμησης SAM και SID, όπου κάναμε εφικτή την ανίχνευση και χαρτογράφηση της αιμοσφαιρίνης και προσδιορίσαμε το βαθμό οξυγόνωσης της στα δάχτυλα του χεριού μου, σε αυτό το στάδιο θελήσαμε να επεκτείνουμε την έρευνα μας λαμβάνοντας υπερφασματικούς κύβους από τα δάχτυλα δύο άλλων ατόμων (μέλη του εργαστηρίου) με διαφορετικούς δείκτες μελανίνης στο δέρμα τους. Σκοπός ήταν να δούμε κατά πόσο τα αποτελέσματα και συμπεράσματα που βγάλαμε στα προηγούμενα πειραματικά στάδια επηρεάζονται από την παρουσία μελανίνης στο δέρμα.

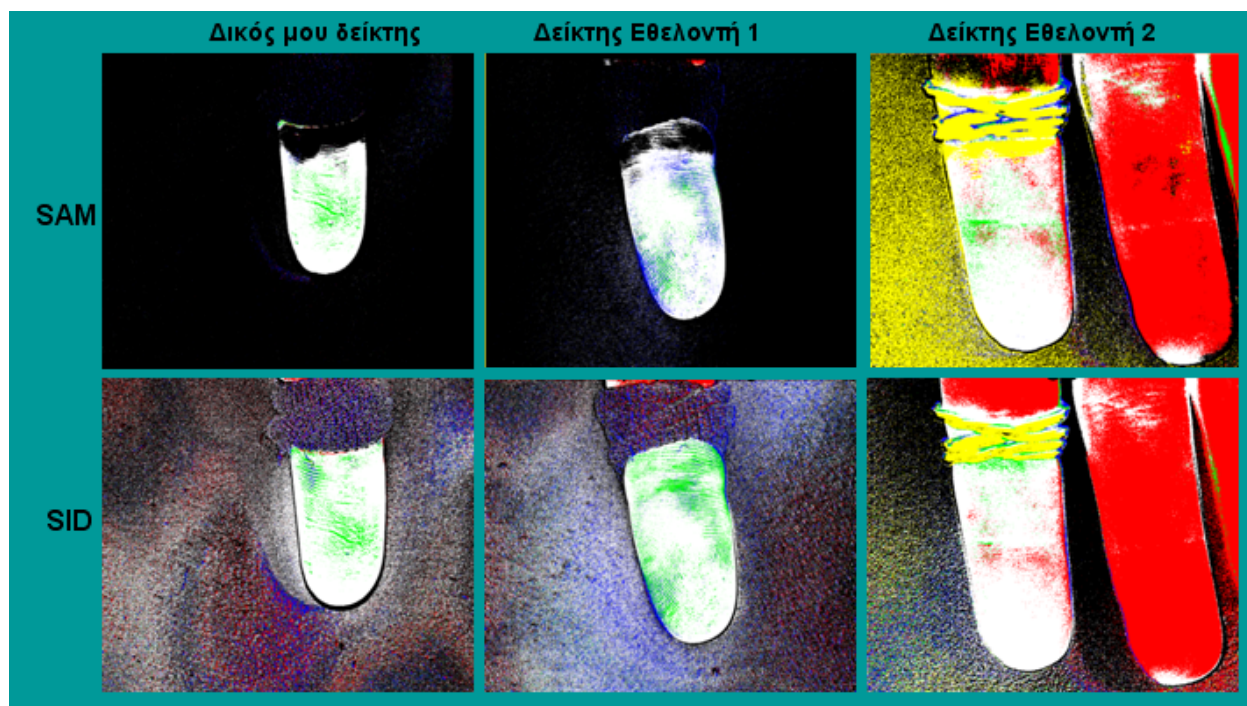
Έτσι πήραμε με τη βοήθεια της κάμερας MuSIS φασματικούς κύβους από το δείκτη των χεριών δύο εθελοντών, το ιατρικό ιστορικό των οποίων δεν λάβαμε υπόψιν, καθώς θέλαμε απλά να κάνουμε επίδειξη των όποιων διαφορών που θα προεκύπταν όπως ήταν αναμενόμενο στους φασματικούς χάρτες. Οι εθελοντές είχαν τα δάχτυλα τους δεμένα για 1min, για 3min και για 6min αντίστοιχα, διαστήματα στα οποία λάβαμε τους κύβους. Το πείραμα το επαναλάβαμε και πάλι για το δείκτη του χεριού μου, ενώ ήταν δεμένο για 3min αυτή τη φορά. Ο λόγος ήταν πως παρόλο που είχαμε τους κύβους των δαχτύλων ενώ ήταν δεμένα για 1min (όπου μόλις άρχιζε να αυξάνεται η deoxy Hb στο αίμα) και για 6min (όπου η συγκέντρωση της deoxy Hb υπερτερούσε κατά πολύ της oxy Hb) θέλαμε και μια ενδιάμεση κατάσταση (3min) ώστε να δούμε αν μπορεί να διαχωριστεί σωστά από της υπόλοιπες δύο καταστάσεις.

Παρακάτω παρουσιάζουμε το φασματικό κύβο που προέκυψε κάνοντας χρήση της κάμερας MuSIS για το δείκτη του Εθελοντή 1 ενώ ήταν δεμένο για 6min. Οι υπόλοιποι κύβοι παρουσιάζονται στο Παράρτημα για εξοικονόμηση χώρου.

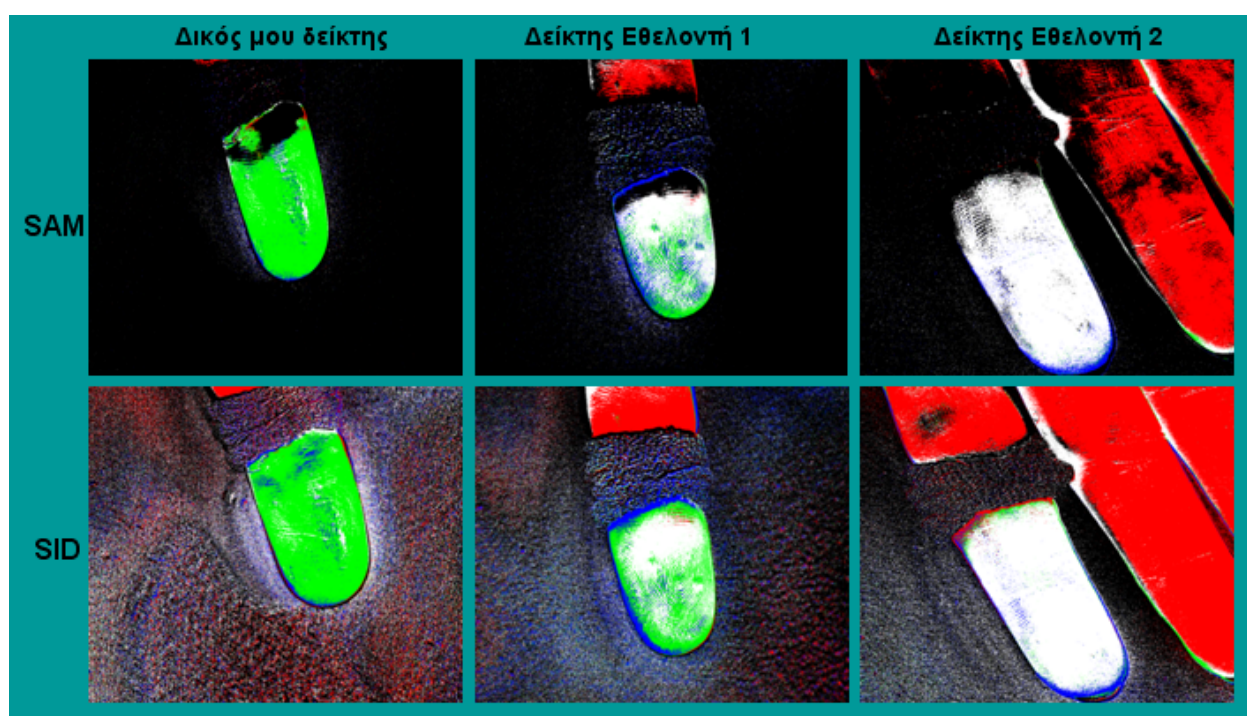


Εικόνα 5.21: Φασματικός κύβος για το δείκτη του Εθελοντή 1 ενώ είναι δεμένο για 6min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS

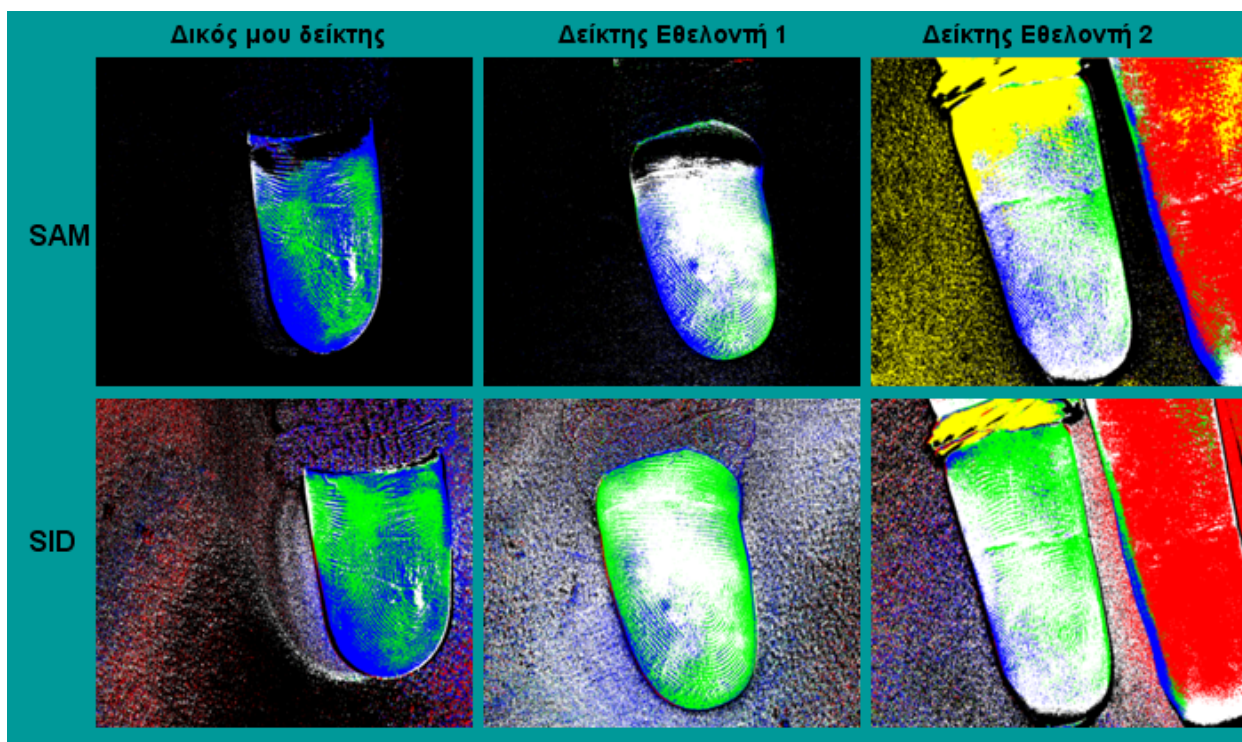
Στη συνέχεια τρέξαμε τους αλγορίθμους φασματικής ταξινόμησης SAM και SID για τους κύβους που πήραμε σε αυτό το στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, αλλά με φάσματα αναφοράς από τα δικά μου δάχτυλα. Έτσι προέκυψαν:



Εικόνα 5. 22: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων στα δάχτυλα 3 διαφορετικών ατόμων, που είναι δεμένα για 1min (λευκό χρώμα), με φάσματα αναφοράς από το δικό μου δείκτη



Εικόνα 5.23: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων στα δάχτυλα 3 διαφορετικών ατόμων, που είναι δεμένα για 3min (πράσινο χρώμα), με φάσματα αναφοράς από το δικό μου δείκτη



Εικόνα 5.24: Εικόνες από την εφαρμογή αλγορίθμων στα δάχτυλα 3 διαφορετικών ατόμων, που είναι δεμένα για 6min (μπλε χρώμα), με φάσματα αναφοράς από το δικό μου δείκτη

Στις Εικόνες 5.22, 5.23 και 5.24 παρουσιάζονται οι χρωματικοί χάρτες με το συνδιασμό 13 μπάντων: από τα 580 έως τα 820nm (ανά 20nm), που όπως παρουσιάσαμε και παραπάνω είναι ο καλύτερος δυνατός.

Στους χρωματικούς χάρτες της Εικόνας 5.22 παρατηρούμε ότι διακρίνεται καθαρά στα δάχτυλα και των 3 διαφορετικών ατόμων που είναι δεμένα με λάστιχο για 1min η παρουσία του 1^{ου} σταδίου (λευκό χρώμα) συγκέντρωσης της deoxy Hb.

Στους χρωματικούς χάρτες της Εικόνας 5.23 όπου τα δάχτυλα είναι δεμένα με λάστιχο για 3 min με βάση τα φάσματα αναφοράς του δικού μου δείκτη, παρατηρούμε ότι γίνεται εμφανής η παρουσία του 2^{ου} σταδίου (πράσινο χρώμα) συγκέντρωσης της deoxy-Hb μόνο στο δάχτυλο του Εθελοντή 1, σε αντίθεση με αυτό του Εθελοντή 2 που εμφανίζει ακόμα το 1^ο Στάδιο (λευκό χρώμα). Από αυτή τη διαφορά συμπεραίνουμε ότι ο δείκτης μελανίνης του Εθελοντή 1 πλησιάζει πιο πολύ το δικό μου δείκτη, σε αντίθεση με τον Εθελοντή 2.

Τέλος στην Εικόνα 5.24 όπου τα δάχτυλα είναι δεμένα για 6min παρατηρούμε στους χρωματικούς χάρτες των δαχτύλων τόσο του Εθελοντή 1 όσο και του Εθελοντή 2 (αν και λιγότερο) το 3^ο Στάδιο (μπλε χρώμα) συγκέντρωσης της deoxy-Hb. Ταυτόχρονα στους ίδιους χρωματικούς χάρτες παρατηρούμε και τα άλλα 2 Στάδια (πράσινο και λευκό χρώμα) συγκέντρωσης της deoxy-Hb που είναι απόλυτα λογικό εξαιτίας των διαφορετικών δεικτών

μελανίνης που έχει το κάθε άτομο, καθώς και στο ότι η μετατροπή oxy σε deoxy Hb δεν γίνεται σε όλες τις περιοχές των δαχτύλων ταυτόχρονα αλλά σταδιακά.

Συνεπώς από την σύγκριση όλων των χρωματικών χαρτών που προκύπτουν από την εφαρμογή των αλγορίθμων, παρατηρούμε ότι οι περιοχές που μας ενδιαφέρουν οι οποίες είναι:

- 1^ο Στάδιο: χαμηλή συγκέντρωση deoxy-Hb (λευκό χρώμα)
- 2^ο Στάδιο: μέτρια συγκέντρωση deoxy-Hb (πράσινο χρώμα) και
- 3^ο Στάδιο: υψηλή συγκέντρωση deoxy-Hb (μπλε χρώμα),

είναι ευδιάκριτες (αλλού περισσότερο και αλλού λιγότερο) στα δάχτυλα και των 3 διαφορετικών ατόμων με τα ίδια φάσματα αναφοράς, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα κριτήρια επιλογής μας για τον διαχωρισμό των διαφορετικών βαθμίδων οξυγόνωσης μίας περιοχής είναι σωστά..

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : Συμπεράσματα και προοπτική εξέλιξης της εργασίας

Κλείνοντας, συμπεραίνουμε ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε, δηλαδή ο συνδυασμός της υπερφασματικής απεικόνισης, κάνοντας χρήση των δυνατοτήτων που μας προσέφερε η υπερφασματική κάμερα MuSIS που διαθέτουμε στο εργαστήριο Οπτοηλεκτρονικής, μαζί με την εφαρμογή των αλγορίθμων ταξινόμησης SAM και SID στους κύβους, μας προσέφερε μια ακριβή τεχνική ανίχνευσης και χαρτογράφησης *in vivo* της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης.

Μέχρι σήμερα οι περισσότερες εφαρμογές στο τομέα αυτό έκαναν κυρίως χρήση της φασματικής απεικόνισης στο υπέρυθρο ή στο ορατό φως λόγω έλλειψης πιο εξελιγμένης τεχνολογίας. Ωστόσο αν και αυτές οι μέθοδοι φασματικής απεικόνισης μας δίνουν καλά αποτελέσματα σε ορισμένα μήκη κύματος, εμφανίζουν και οι δύο σημαντικά μειονεκτήματα. Καθώς χρησιμοποιούν συγκεκριμένες μπάντες του φάσματος (στο υπέρυθρο ή στο ορατό), οπότε έχαναν χρήσιμες πληροφορίες από κάποιες άλλες μπάντες.

Ενώ εμείς με τη χρήση της υπερφασματικής κάμερας MuSIS είχαμε τη δυνατότητα λήψης φασμάτων από όλες τις περιοχές των δαχτύλων (περισσότερο ή λιγότερο οξυγονωμένες) και από 30 φασματικές μπάντες (420nm-1000nm). Συνεπώς, είχαμε το πλεονέκτημα να μελετήσουμε την φασματική πληροφορία κάθε σημείου, καθώς και να ανακτήσουμε χρήσιμες πληροφορίες από την ακτινοβολία σκέδασης, τόσο στο φάσμα του υπέρυθρου όσο και στο φάσμα του ορατού. Επιπλέον η χρήση των αλγορίθμων φασματικής ταξινόμησης Spectral Angle mapper (SAM) και Spectral Information Divergence (SID) μας βοήθησε να ταξινομήσουμε με πιο αντικειμενικά κριτήρια τις περιοχές με διαφορετικό βαθμό οξυγόνωσης στα δάχτυλα και κατά συνέπεια κάναμε εφικτή την ανίχνευση και χαρτογράφηση της αιμοσφαιρίνης και προσδιορίσαμε το βαθμό οξυγόνωσης της στα δάχτυλα του χεριού.

Μάλιστα μετά από πολλές δοκιμές καταλήξαμε στο ότι οι αλγόριθμοι φασματικής ταξινόμησης SAM και SID δίνουν καλύτερα αποτελέσματα (χρωματικούς χάρτες) για το συνδιασμό μπαντών από τα 580 έως τα 820nm (ανά 20nm), δηλαδή για 13 μπάντες, όταν τα φάσματα αναφοράς προέρχονται από τα δάχτυλα και για τιμή κατωφλίου 0,120. Ενώ όταν πήραμε φάσματα αναφοράς από τις κηλίδες φλεβικού και αρτηριακού αίματος και τρέξαμε τους αλγορίθμους μας για τους κύβους των δαχτύλων είχαμε καλύτερα αποτελέσματα για τις :

- 4 πρώτες συνιστώσες της PCA
- 6 πρώτες συνιστώσες της PCA

Που καταλήγουν σχεδόν στους ίδιους χρωματικούς χάρτες.

Όσον αφορά κάποια μελλοντική επέκταση της έρευνας μας, θα ήταν δυνατό να υλοποιηθεί κάποια συσκευή στην οποία θα είναι ενσωματωμένη η υπερφασματική κάμερα MuSIS που χρησιμοποιήσαμε εμείς στα πειράματά μας, η οποία θα εκμεταλλεύεται τους συνδιασμούς μπαντών που αναφέραμε παραπάνω για την ανίχνευση και χαρτογράφηση της οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης. Αυτή η συσκευή θα ήταν πολύ χρήσιμη για τη διάγνωση όγκων (κακοηθών ή μη) και οποιονδήποτε άλλων ανωμαλιών και παθήσεων του δέρματος, καθώς για τη παρακολούθηση ασθενών στο στάδιο ανάρρωσης ή και στο χειρουργικό, όπως επίσης και αθλητών και στρατιωτών υπό αντίξοες συνθήκες.

Όσον αφορά τώρα τα πειραματά μας θα ήταν χρήσιμο να γίνουν περισσότερες δοκιμές και να πάρουμε περρισσότερους φασματικούς κύβους και φάσματα αναφοράς από ένα μεγαλύτερο εύρος ατόμων καθώς και να γνωρίζουμε το ιατρικό τους ιστορικό, ώστε να είμαστε τελείως σίγουροι για τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αλλά και να γίνουν κάποιες ακόμα μελέτες που δεν ήταν εφικτό να υλοποιήσουμε στα πλαίσια μίας μόνο διπλωματικής εργασίας.

Στο σημείο αυτό ίσως να είναι χρήσιμη και η συνεργασία μας με κάποιους δερματολόγους ή και αναισθησιολόγους προκειμένου να τους συμβουλευτούμε σε θέματα που είναι περισσότερο ειδικευμένοι. Επίσης, η εφαρμογή ακόμα περισσότερων αλγορίθμων, ίσως αποκαλύψει νέες πτυχές στην ήδη υπάρχουσα μελέτη.

∴

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] "Update In Anaesthesia" A journal for anaesthetists in developing countries, www.nda.ox.ac.uk
- [2] "Michael R Neumann"-Pulse oximetry: Physical Principles
- [3] Oxygen Saturation Monitoring by Pulse Oximetry,
[http://www.aacn.org/aacn/practice.nsf/Files/PO1/\\$file/ch%2014%20PO.pdf](http://www.aacn.org/aacn/practice.nsf/Files/PO1/$file/ch%2014%20PO.pdf)
- [4] J B Dawson, D J Barker, D J Ellis, E Grassamt, J A Cotterill, G W Fisher, and J W Feather, *A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by in vivo skin*
- [5] Miho SHIMADA, Yuji MASUDA, Yukio YAMADA, Masahide ITOH, Motoji TAKAHASHI and Toyohiko YATAGAI, *Explanation of Human Skin Color by Multiple Linear Regression Analysis Based on the Modified Lambert-Beer Law*
- [6] M Hajizadeh-Saffar, J W Feather and J B Dawson, *An investigation of factors affecting the accuracy of in vivo measurements of skin pigments by reflectance spectrophotometry*
- [7] M Shimada, Y Yamada, M Itoh and T Yatagai, *Melanin and blood concentration in human skin studied by multiple regression analysis: experiments*
- [8] Yoko Hoski, *Functional near-infrared optical imaging: Utility and limitations in human brain mapping*
- [9] Stephen P. Nighswander-Rempel, R. Anthony Shaw, Valery V. Kupriyanov, John Rendell, Bo Xiang, Henry H. Mantsch, *Mapping tissue oxygenation in the beating heart with near-infrared spectroscopic imaging*
- [10] Michael Attas, Mark Hewko, Jeri Payette, Trevor Posthumus, Michael Sowa and Henry Mantsch, *Visualization of cutaneous hemoglobin oxygenation and skin hydration using near-infrared spectroscopic imaging*

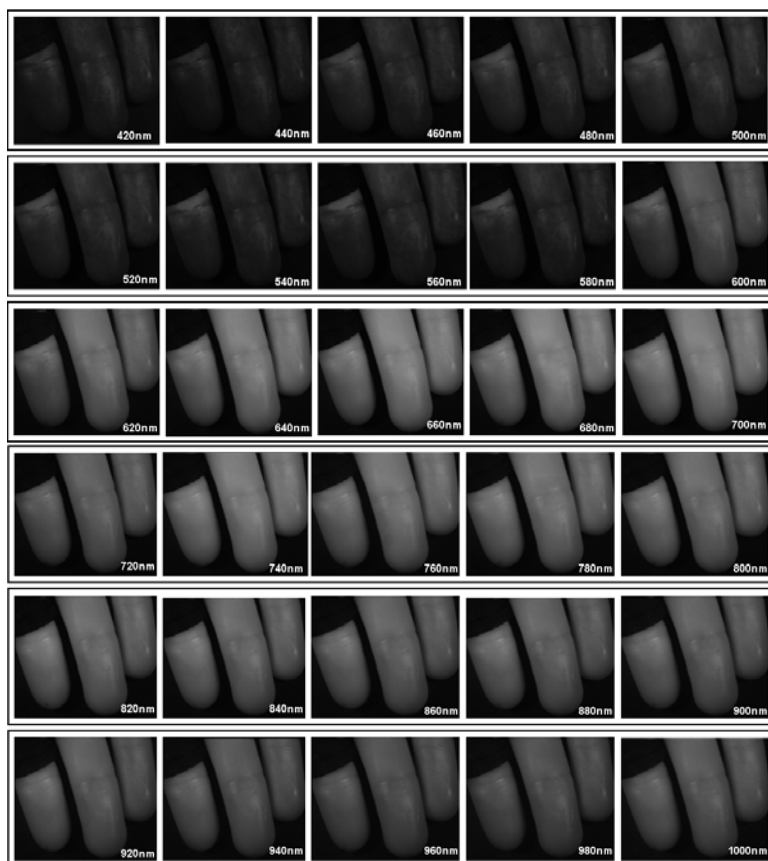
- [11] Ann Johansson Thomas Johansson Marcelo Soto Thompson Niels Bendsoe Katarina Svanberg Sune Svanberg Stefan Andersson-Engels, *In vivo measurement of parameters of dosimetric importance during interstitial photodynamic therapy of thick tumors*
- [12] Bruce J Tromberg, Albert Cerussi, Natasha Shah, Montana Compton, Amanda Durkin, David Hsiang, John Butler and Rita Mehta, *Diffuse optics in breast cancer: detecting tumors in pre-menopausal women and monitoring neoadjuvant chemotherapy*
- [13] K.M. Crossa, M.A. Hastings, J.R. Payette, M. Gomez B.J. Schattka, M.G. Sowa, L. Leonardi, J.S. Fish, *Near infrared point and imaging spectroscopy for burn depth assessment*
- [14] Georgios N. Stamatias, Michael Southall and Nikiforos Kollias, *In Vivo Monitoring of Cutaneous Edema using Spectral Imaging in the Visible and Near Infrared*
- [15] Lalita Khaodhiar, MD, Thanh Dinh, DPM, Kevin T Schomacker, PhD, Svetlana Panasyuk, PhD, Jenny E Freeman, MD, Aristidis Veves, MD, *The Use of Medical Hyperspectral Technology to Evaluate Microcirculatory Changes in Diabetic Foot Ulcers and Predict Clinical Outcomes*
- [16] James Beach Jinfeng Ning and Bahram Khoobehi, *Oxygen Saturation in Optic Nerve Head Structures by Hyperspectral Image Analysis*
- [17] Karel J. Zuzak, Michael D. Schaeberle, E. Neil Lewis, and Ira W. Levin, *Visible Reflectance Hyperspectral Imaging: Characterization of a Noninvasive, in Vivo System For Determining Tissue Perfusion*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

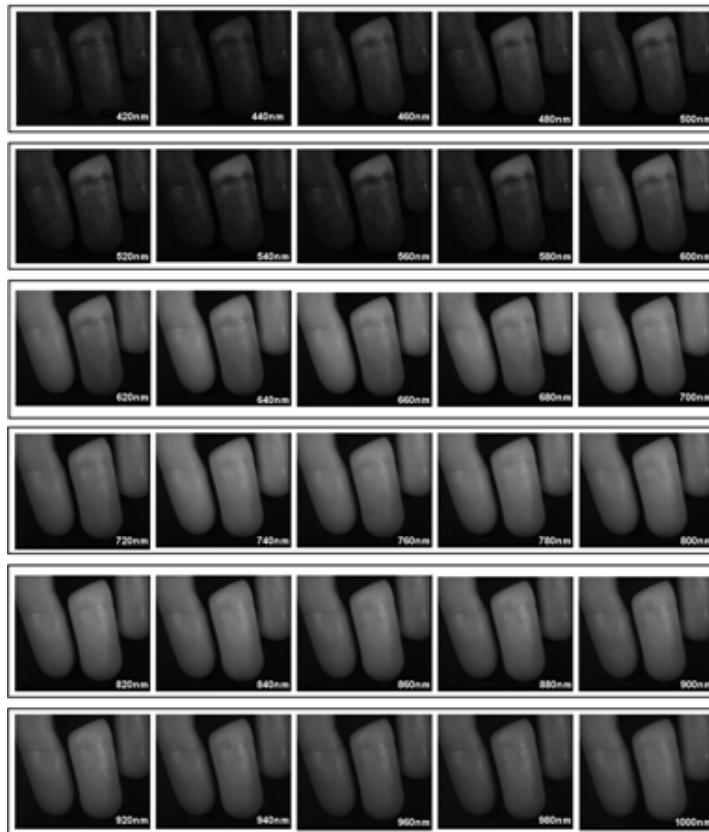
Στο Παράρτημα βρίσκονται εικόνες που ανήκουν στο κεφάλαιο 5 : «Πειραματική διαδικασία και Αποτελέσματα», προκειμένου να εξοικονομήσουμε ορισμένο χώρο από το κείμενο. Οι εικόνες εμφανίζονται ανάλογα με το στάδιο εργασίας στο οποίο ανήκουν. Έχουμε λοιπόν :

1^ο Στάδιο

Παρουσιάζονται παρακάτω αναλυτικά οι φασματικοί κύβοι για τα υπόλοιπα δάχτυλα, που λάβαμε μετά από πειράματα με την υπερφασματική κάμερα MuSIS και για τις 3 καταστάσεις στις οποίες υποβάλαμε τα δάχτυλα..



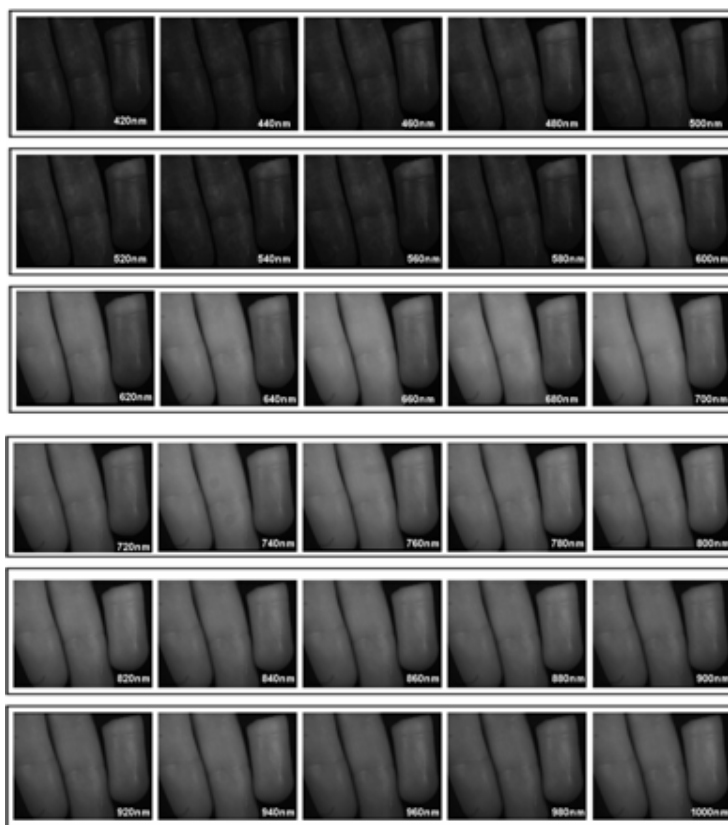
Εικόνα Π 1: Φασματικός κύβος για το δείκτη ενώ είναι δεμένο 1min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS



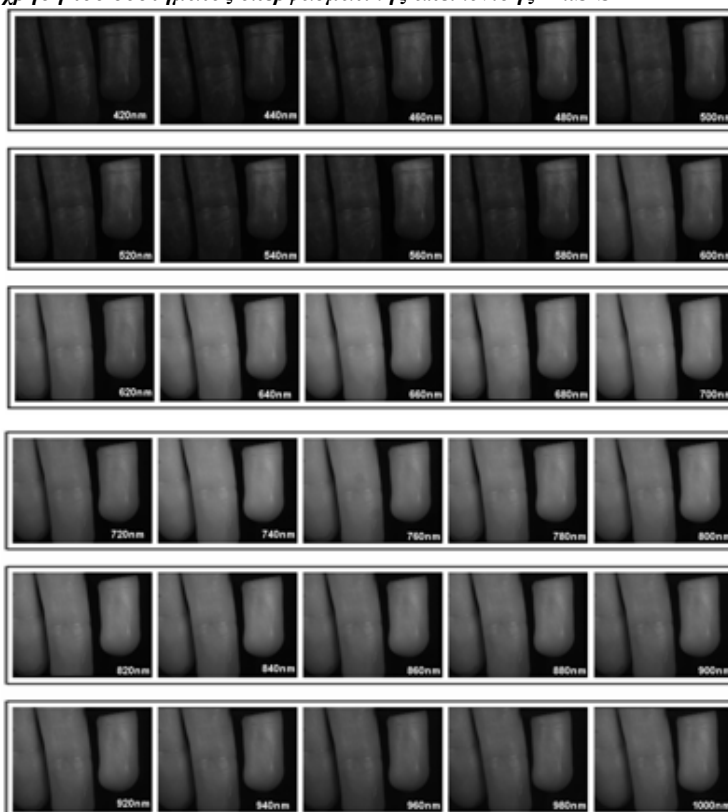
Εικόνα Π 2: Φασματικός κύβος για το μέσο ενώ είναι δεμένο 0min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS



Εικόνα Π 3: : Φασματικός κύβος για το μέσο ενώ είναι δεμένο 1min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS



Εικόνα Π 4: Φασματικός κύβος για το παράμεσο ενώ είναι δεμένο 60min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης *MuSIS*



Εικόνα Π 5: Φασματικός κύβος για το παράμεσο ενώ είναι δεμένο 1min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης *MuSIS*

2^ο Στάδιο

Παρουσιάζονται οι πίνακες και οι γραφικές που προέκυψαν για τους δείκτες αιμοσφαιρίνης και οξυγόνωσης με τους υπόλοιπους αλγορίθμους που περιγράψαμε στο Στάδιο2.

Ο **Ferguson** χρησιμοποιώντας τις παρακάτω σχέσεις υπολόγισε τις τιμές των IHB και IOX ανεξάρτητα από τα διαφορετικά επίπεδα οξυγόνωσης και τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης αντίστοιχα:

$$IHB = [(A_{545} - A_{522})/23 - (A_{568} - A_{545})/23] \times (100/2)$$

$$IOX = [(A_{568} - A_{557}) / (11 \times IHB) - (A_{557} - A_{545}) / (12 \times IHB)] \times (100/2),$$

όπου A_{xxx} είναι η τιμή απορρόφησης στα xxx nm.

Η αντιστοιχία των μηκών κύματος που επιλέχτηκε φαίνεται παρακάτω:

Μήκη κύματος αλγορίθμου(nm)	Μήκη κύματος που χρησιμοποιήσαμε
522	520
545	540
557	560
568	580

Παρακάτω παρατίθενται οι τιμές των δεικτών αιμοσφαιρίνης (IHB) και οξυγόνωσης (IOX) για 10 διαφορετικά σημεία του δείκτη και στις 3 καταστάσεις όπου υποβλήθηκε (σε ελεύθερη κατάσταση, δεμένος για 1min και δεμένος για 6min).

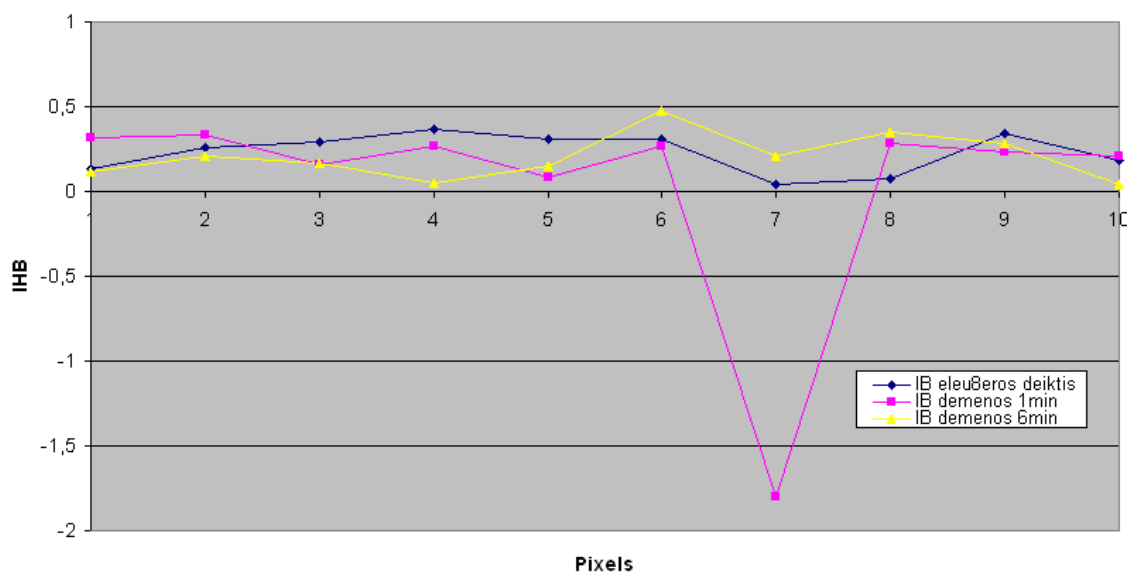
Πίνακας δεικτών αιμοσφαιρίνης

	IHB1	IHB2	IHB3	IHB4	IHB5	IHB6	IHB7	IHB8	IHB9	IHB10
Ελεύθερος	0,130006	0,26237	0,290946	0,364284	0,311775	0,304724	0,045743	0,078041	0,342613	0,185348
Δεμένος 1min	0,317543	0,330669	0,155842	0,269953	0,080681	0,263031	-1,80179	0,280349	0,237258	0,204779
Δεμένος 6min	0,114928	0,206565	0,169811	0,049039	0,151013	0,475084	0,211945	0,353009	0,285562	0,044183

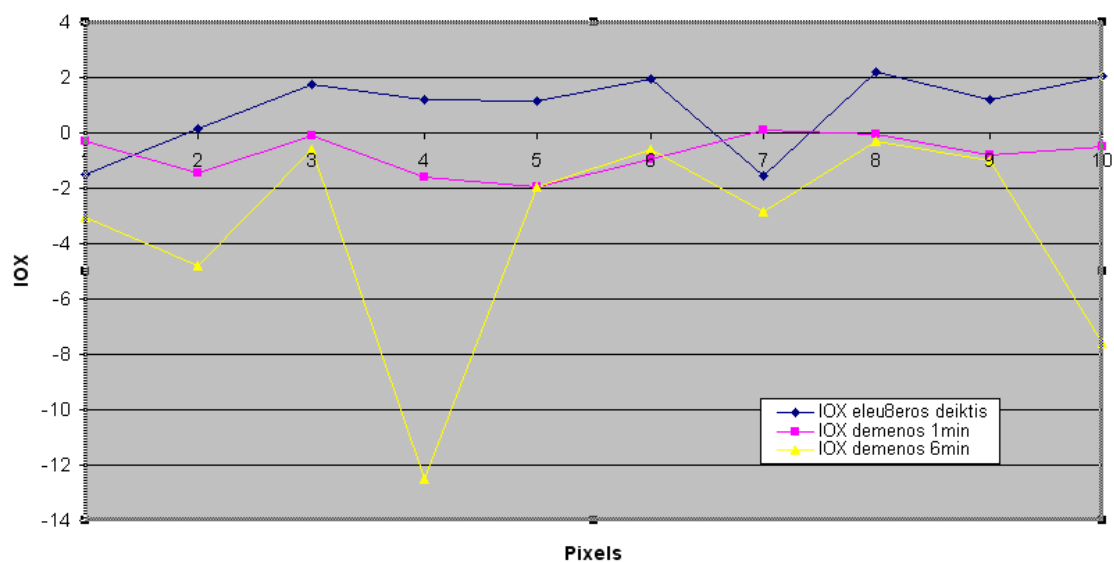
Πίνακας δεικτών οξυγόνωσης

	IOX1	IOX 2	IOX 3	IOX 4	IOX 5	IOX 6	IOX 7	IOX 8	IOX 9	IOX 10
Ελεύθερος	-1,49502	0,164301	1,728782	1,177273	1,16635	1,937654	-1,55291	2,20297	1,214969	2,063235
Δεμένος 1min	-0,28572	-1,46261	-0,10413	-1,57817	-1,92726	-0,94326	0,09670 2	-0,07062	-0,77728	-0,48952
Δεμένος 6min	-3,04273	-4,80117	-0,61232	-12,5249	-1,96423	-0,58901	-2,82845	-0,27541	-0,9805	-7,58898

Παραθέτουμε τους παραπάνω δείκτες στις ακόλουθες γραφικές:



Γραφική 7



Γραφική 8

Στον αλγόριθμο του Ferguson παρατηρούμε ότι:

- Αρχική κατάσταση ->1min: σε ορισμένα pixels η τιμή του IHB μειώνεται ενώ σε άλλα αυξάνεται, ενώ ο IOX παίρνει αρνητικές τιμές υποδηλώνοντας την παρουσία μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης στο 1min.

- 1min -> 3min : σε ορισμένα pixels η τιμή του IHB μειώνεται ενώ σε άλλα αυξάνεται ενώ ο IOX εξακολουθεί να παίρνει αρνητικές τιμές υποδηλώνοντας την παρουσία μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης.

Ο **Hajizadeh** αφαίρεσε από το οπισθοσκεδαζόμενο φάσμα το ποσοστό που δεν περιείχε πληροφορίες σχετικά με τις χρωμοφόρες όπως φαίνεται στον παρακάτω τύπο:

$$LIR_c = -\log_{10}(10^{-LIR_o} - 0,025)$$

Και για τον υπολογισμό των δεικτών χρησιμοποίησε τις παρακάτω σχέσεις:

$$H = [(L_{544} - L_{527,5}) / 16,5 - (L_{573} - L_{544}) / 29] 100$$

$$SaO_2 = [(L_{573} - L_{558,5}) / 14,5 - (L_{558,5} - L_{544}) / 14,5] \times (5,1 \times 10^3 / H) + 42$$

Όπου L_n είναι η διορθωμένη απορρόφηση σε μήκος κύματος n και οι SaO_2

Και H οι δείκτες οξυγόνωσης και αιμοσφαιρίνης αντίστοιχα.

Η αντιστοιχία των μηκών κύματος που επιλέχτηκε φαίνεται παρακάτω:

Μήκη κύματος αλγορίθμου(nm)	Μήκη κύματος που χρησιμοποιήσαμε
527,5	520
544	540
558,5	560
573	580

Παρακάτω παρατίθενται οι τιμές των δεικτών αιμοσφαιρίνης (IHB) και οξυγόνωσης (IOX) για 10 διαφορετικά σημεία του δείκτη και στις 3 καταστάσεις όπου υποβλήθηκε (σε ελεύθερη κατάσταση, δεμένος για 1min και δεμένος για 6min).

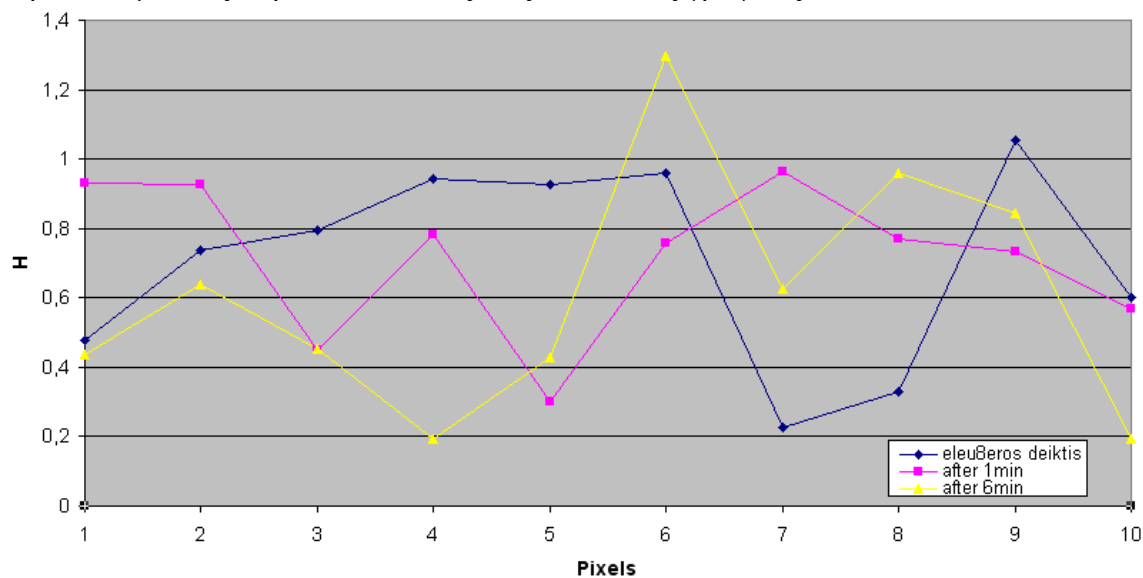
Πίνακας δεικτών αιμοσφαιρίνης

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
Ελεύθερος	0,475755	0,737815	0,795796	0,943919	0,926437	0,957415	0,225065	0,329398	1,053395	0,599146
Δεμένος 1min	0,928742	0,927992	0,450454	0,783097	0,301032	0,756033	0,962559	0,768189	0,734931	0,569804
Δεμένος 6min	0,435339	0,639182	0,453587	0,192024	0,428473	1,296379	0,625911	0,957476	0,845699	0,192288

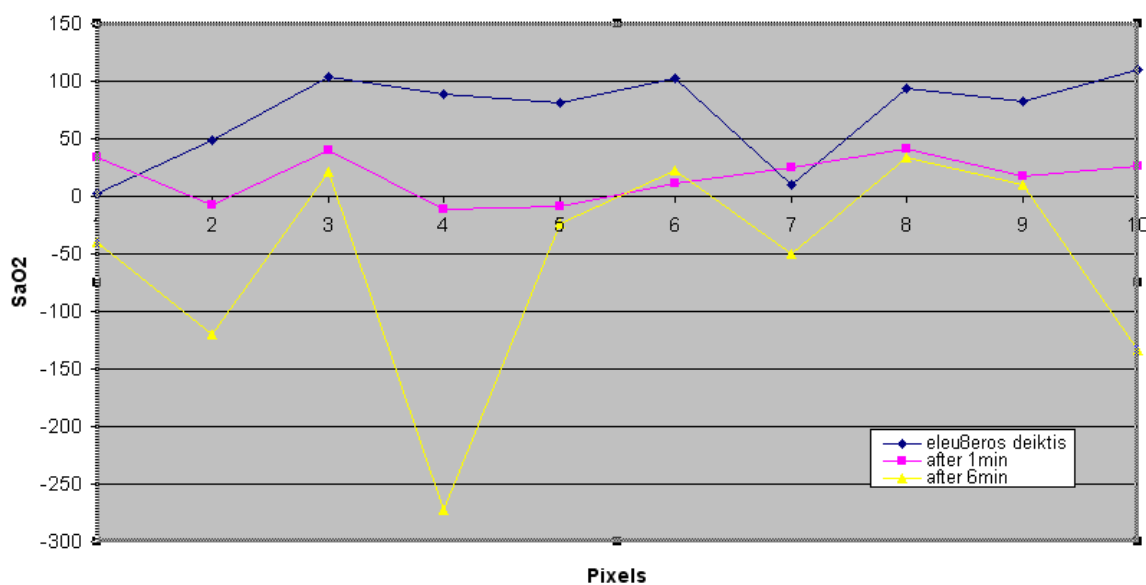
Πίνακας δεικτών οξυγόνωσης

	SaO ₂ 1	SaO ₂ 2	SaO ₂ 3	SaO ₂ 4	SaO ₂ 5	SaO ₂ 6	SaO ₂ 7	SaO ₂ 8	SaO ₂ 9	SaO ₂ 10
Ελεύθερος	2,554488	48,45879	103,5949	88,74992	81,46943	102,9342	9,704255	93,9367	82,92605	109,8893
Δεμένος 1min	33,3686	-8,02582	39,46431	-11,1161	-9,05803	10,84949	25,46944	41,1251	17,43685	26,00058
Δεμένος 6min	-39,7315	-119,582	20,91512	-272,605	-23,7714	22,77148	-50,4496	33,78025	9,559813	-133,428

Παραθέτουμε τους παραπάνω δείκτες στις ακόλουθες γραφικές:



Γραφική 9



Γραφική 10

Στον αλγόριθμο του Hajizadeh παρατηρούμε ότι:

- Αρχική -> 1min: σε ορισμένα pixels η τιμή του H μειώνεται ενώ σε άλλα αυξάνεται, ενώ ο SaO₂ παίρνει αρνητικές τιμές υποδηλώνοντας την παρουσία μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης στο 1min.

- 1min -> 3min : Ο Η σε άλλα pixels μειώνεται ενώ σε άλλα αυξάνεται ενώ ο SaO_2 εξακολουθεί να παίρνει αρνητικές τιμές υποδηλώνοντας την παρουσία μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης.

Οι **Shimada και Yamada** χρησιμοποίησαν για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων αιμοσφαιρίνης την σχέση:

$$\Delta A_i(\lambda) = \varepsilon_i(\lambda) \times \Delta C_i \times l_i(\lambda)$$

Παρακάτω παρατίθενται οι τιμές για τις συγκεντρώσεις οξυγονωμένης και μη αιμοσφαιρίνης στο δείκτη του χεριού για δύο μήκη κύματος (520 και 580nm) σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις (ενώ είναι ελεύθερος, δεμένος για 1min και δεμένος για 6min).

Σε ελεύθερη κατάσταση

oxy	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
520nm	0,055786	0,057796	0,063371	0,069966	0,065867	0,064598	0,062185	0,071442	0,069966	0,078037
580nm	0,031	0,029835	0,031613	0,032908	0,034307	0,03505	0,032908	0,037492	0,036639	0,039333
deoxy										
520nm	0,04274	0,04428	0,048552	0,053604	0,050464	0,049491	0,047643	0,054736	0,053604	0,059788
580nm	0,041957	0,04038	0,042786	0,044539	0,046432	0,047438	0,044539	0,050743	0,049589	0,053234

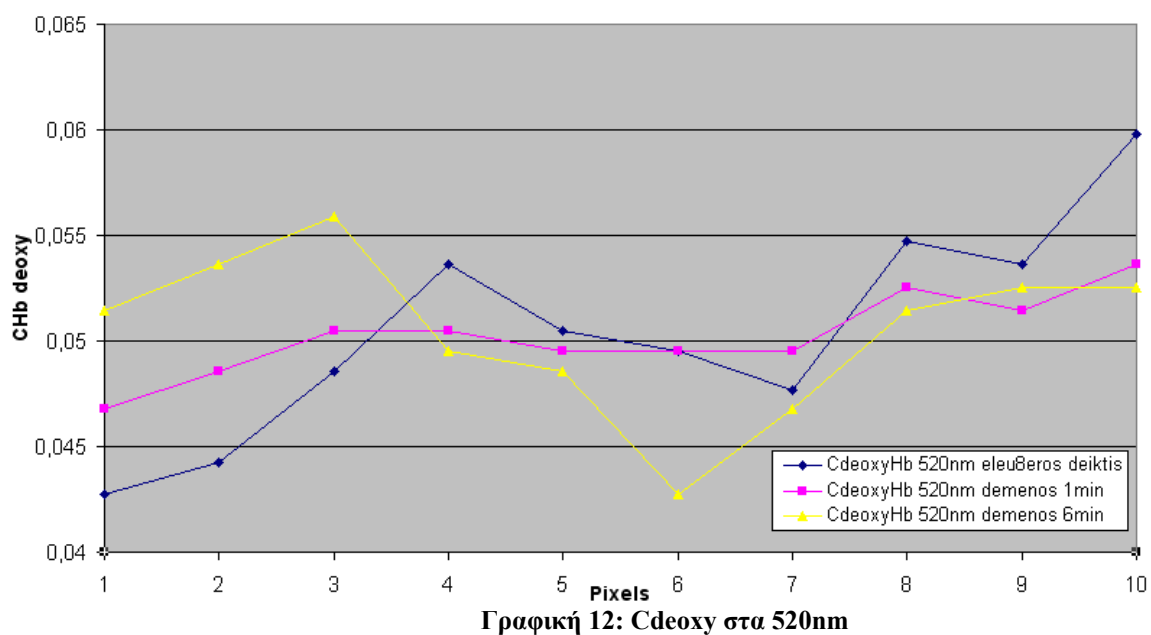
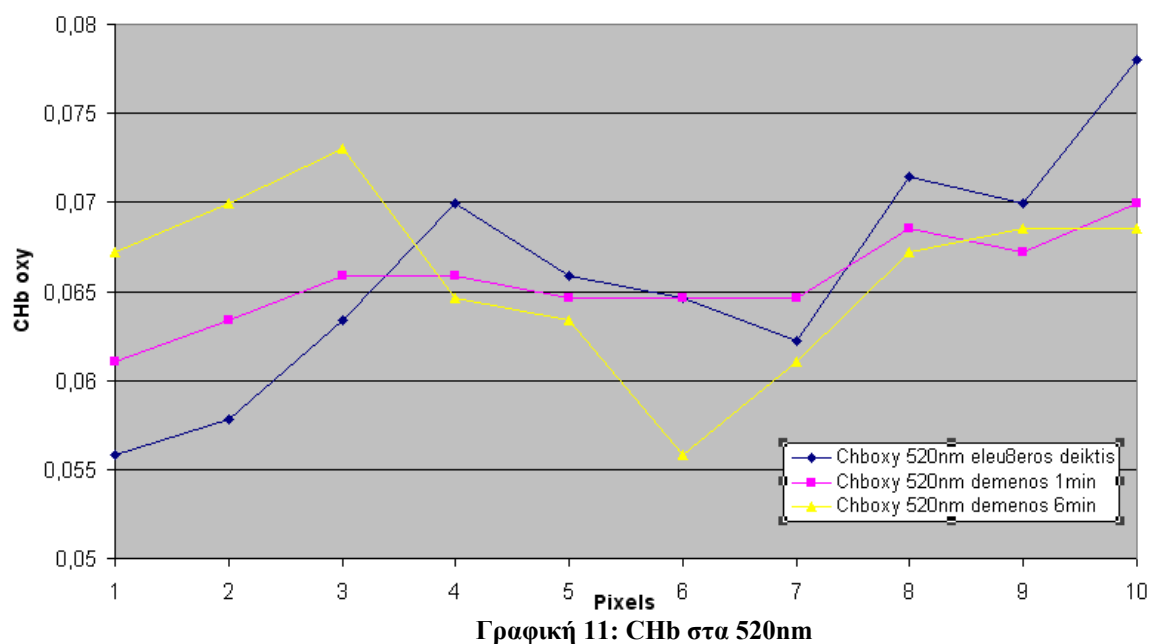
Δεμένος για 1min

oxy	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
520nm	0,061037	0,063371	0,065867	0,065867	0,064598	0,064598	0,064598	0,068547	0,067182	0,069966
580nm	0,032249	0,032249	0,032908	0,033593	0,033593	0,032908	0,032908	0,033593	0,03505	0,034307
deoxy										
520nm	0,046764	0,048552	0,050464	0,050464	0,049491	0,049491	0,049491	0,052517	0,051472	0,053604
580nm	0,043646	0,043646	0,044539	0,045466	0,045466	0,044539	0,044539	0,045466	0,047438	0,046432

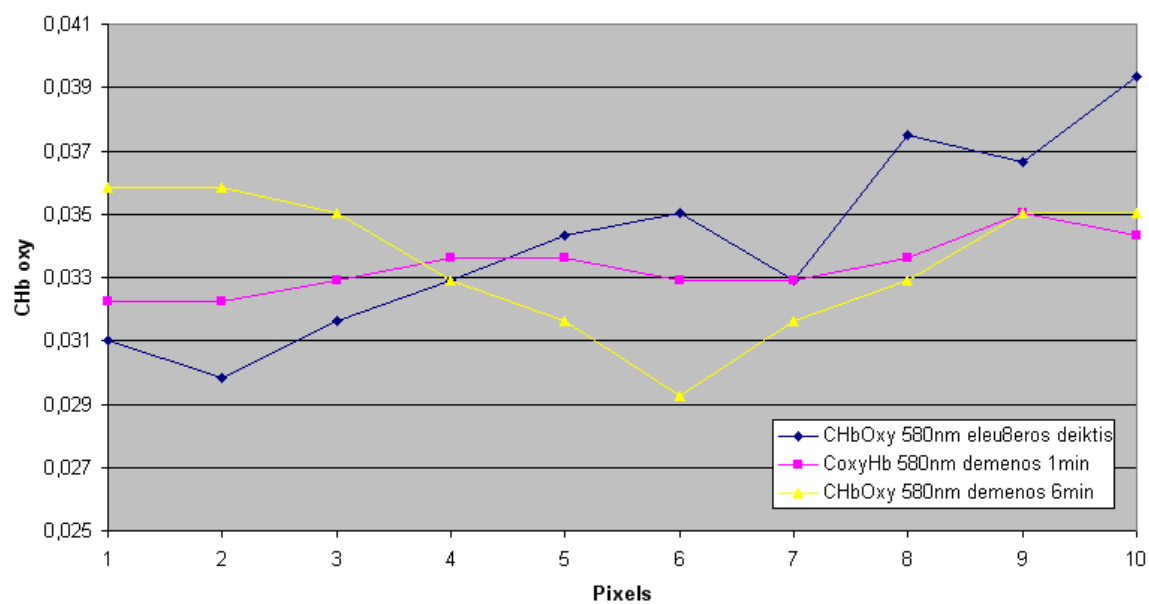
Δεμένος για 6min

oxy	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
520nm	0,067182	0,069966	0,072982	0,064598	0,063371	0,055786	0,061037	0,067182	0,068547	0,068547
580nm	0,035827	0,035827	0,03505	0,032908	0,031613	0,02928	0,031613	0,032908	0,03505	0,03505
deoxy										
520nm	0,051472	0,053604	0,055915	0,049491	0,048552	0,04274	0,046764	0,051472	0,052517	0,052517
580nm	0,048489	0,048489	0,047438	0,044539	0,042786	0,039629	0,042786	0,044539	0,047438	0,047438

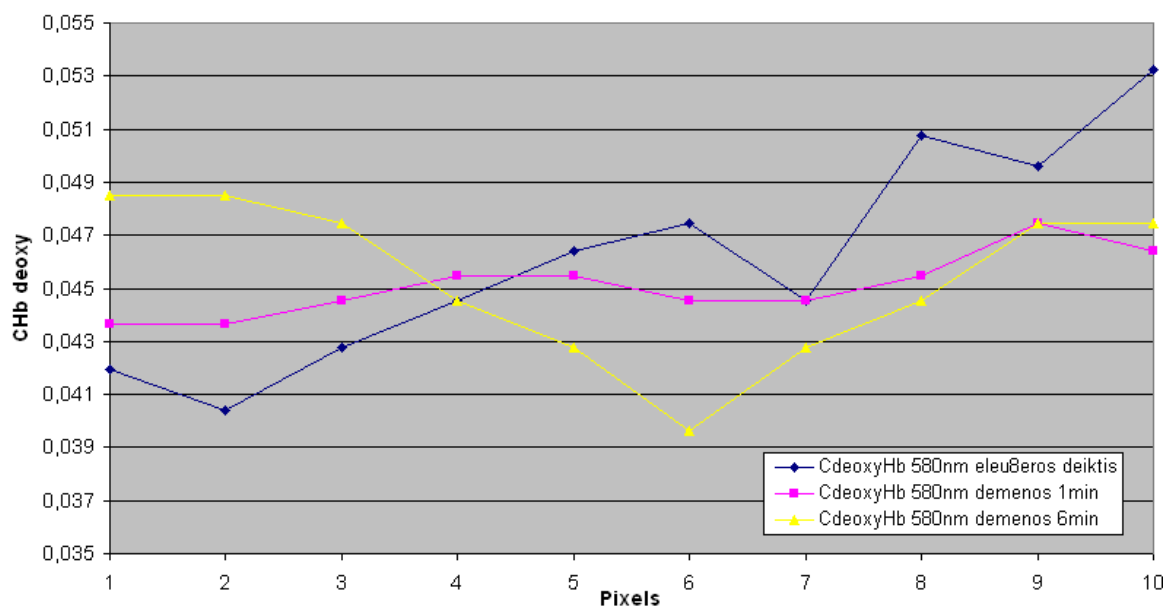
Οι αντίστοιχες γραφικές φαίνονται παρακάτω:



Στα 520nm τόσο η CHb όσο και η Cdeoxy παρουσιάζουν ομοιομορφία στο σύνολο των τιμών τους. Από την αρχική κατάσταση μέχρι το 1^ο λεπτό η CHb και η Cdeoxy σε άλλα pixel αυξάνεται και σε άλλα μειώνεται, όμοια συμπεριφορά έχουν και από το 1^ο λεπτό μέχρι το 6^ο.



Γραφική 13:CHb στα 580nm



Γραφική 14:Cdeoxy στα 580nm

Στα 580nm τόσο η CHb όσο και η Cdeoxy παρουσιάζουν ομοιομορφία στο σύνολο των τιμών τους. Από την αρχική κατάσταση μέχρι το 1^ο λεπτό η CHb και η Cdeoxy σε άλλα pixel αυξάνεται και σε άλλα μειώνεται, όμοια συμπεριφορά έχουν και από το 1^ο λεπτό μέχρι το 6^ο.

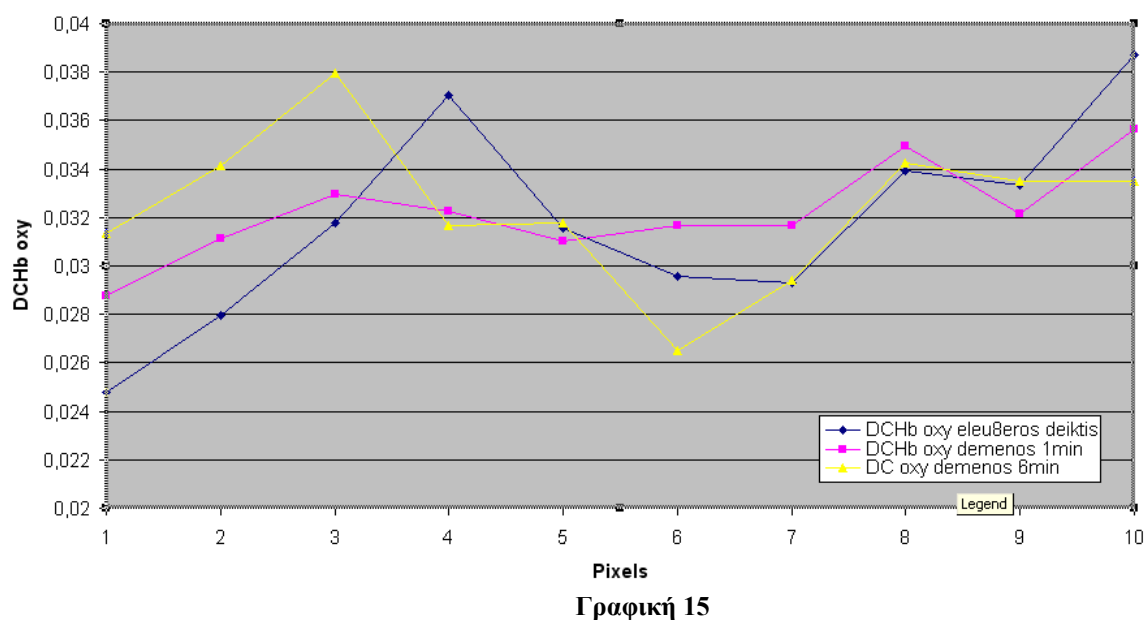
Οι τιμές για τα ΔCHbO και ΔCHb φαίνονται παρακάτω:

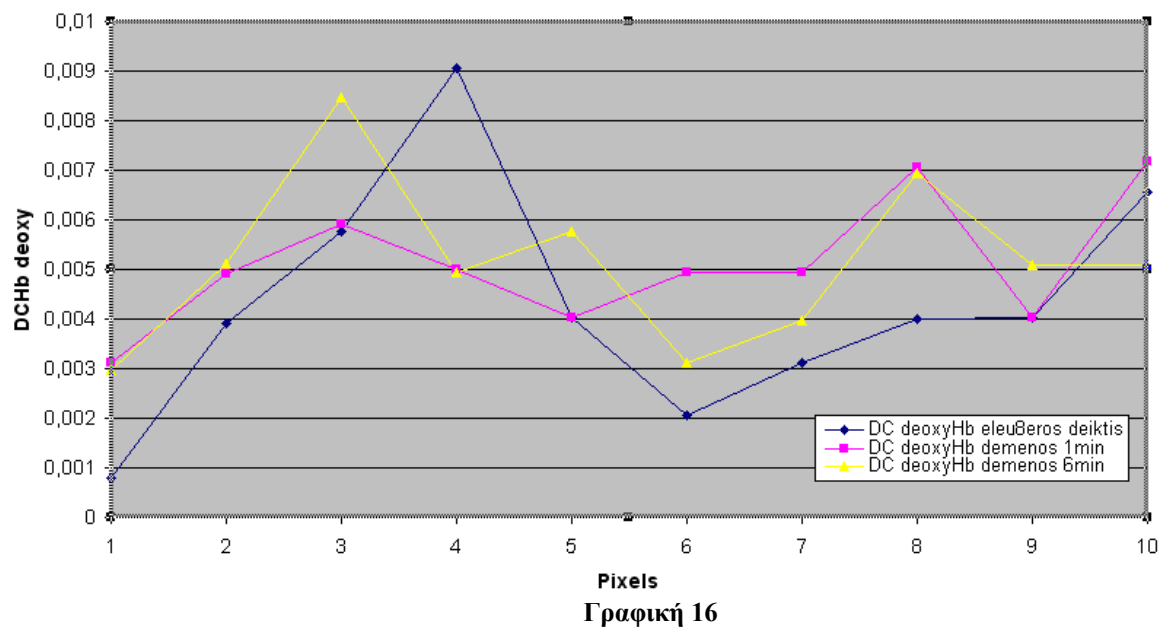
Αρχική κατάσταση	ΔC1	ΔC 2	ΔC 3	ΔC 4	ΔC5	ΔC 6	ΔC 7	ΔC 8	ΔC 9	ΔC10
oxy	0,024786	0,027961	0,031758	0,037058	0,03156	0,029547	0,029277	0,03395	0,033326	0,038704
deoxy	0,000784	0,003901	0,005766	0,009065	0,004032	0,002054	0,003105	0,003993	0,004015	0,006554

Δεμένος 1min	ΔC1	ΔC 2	ΔC 3	ΔC 4	ΔC5	ΔC 6	ΔC 7	ΔC 8	ΔC 9	ΔC10
oxy	0,028788	0,031123	0,032959	0,032273	0,031004	0,031689	0,031689	0,034954	0,032132	0,035659
deoxy	0,003117	0,004906	0,005925	0,004998	0,004025	0,004953	0,004953	0,007051	0,004034	0,007173

Δεμένος 6min	ΔC1	ΔC 2	ΔC 3	ΔC 4	ΔC5	ΔC 6	ΔC 7	ΔC 8	ΔC 9	ΔC10
oxy	0,031355	0,034139	0,037931	0,031689	0,031758	0,026506	0,029424	0,034274	0,033497	0,033497
deoxy	0,002983	0,005115	0,008477	0,004953	0,005766	0,003112	0,003977	0,006933	0,00508	0,00508

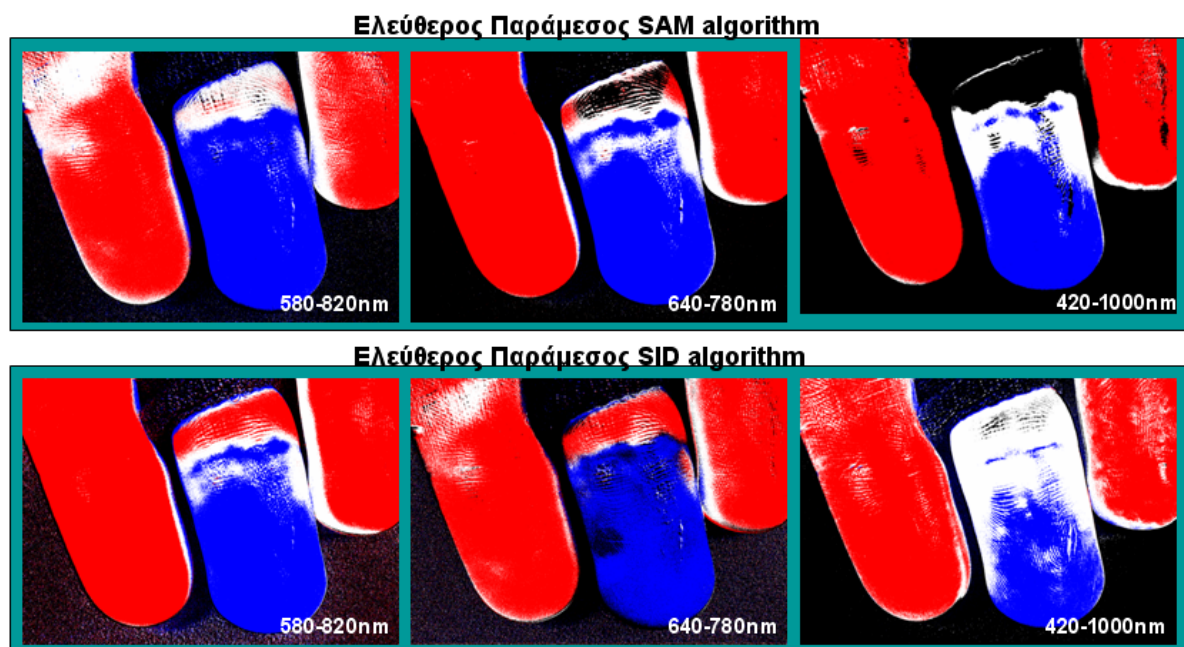
Παρακάτω παρατίθενται και οι αντίστοιχες γραφικές τους:





4^ο Στάδιο

Παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένες δοκιμές που κάναμε για την εύρεση του καλύτερου δυνατού συνδιασμού μπαντών για το μέσο και το παράμεσο:



Εικόνα Π 6: Εικόνες από την εφαρμογή SAM & SID σε ελεύθερο παράμεσο

Παράμεσος δεμένος για 1min SAM algorithm

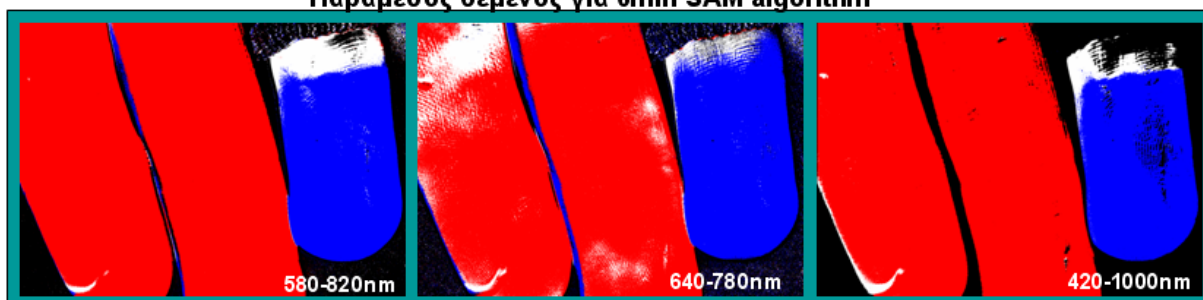


Παράμεσος δεμένος για 1min SID algorithm



Εικόνα Π 7: Εικόνες από την εφαρμογή SAM & SID σε παράμεσο δεμένο για 1min

Παράμεσος δεμένος για 6min SAM algorithm

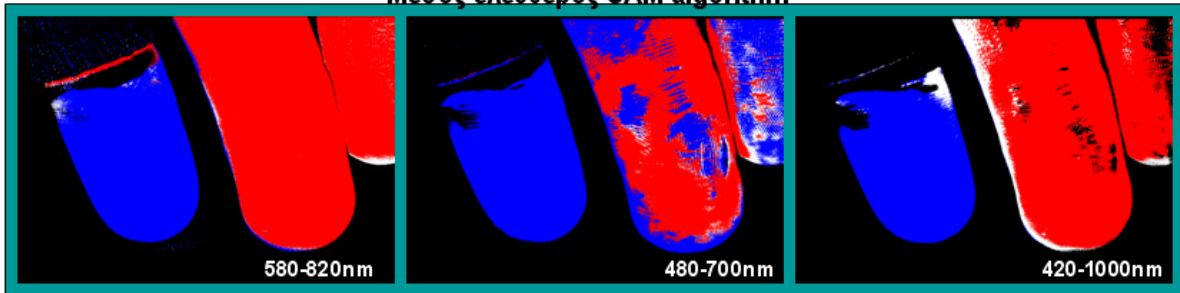


Παράμεσος δεμένος για 6min SID algorithm



Εικόνα Π 8: Εικόνες από την εφαρμογή SAM & SID σε παράμεσο δεμένο για 6min

Μέσος ελεύθερος SAM algorithm

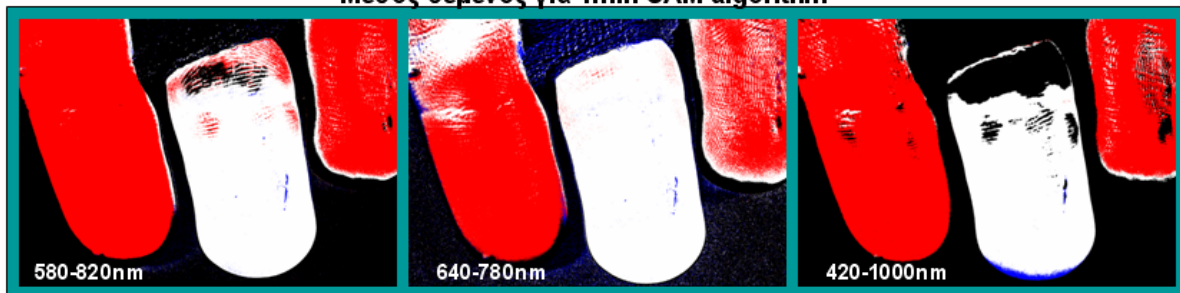


Μέσος ελεύθερος SID algorithm

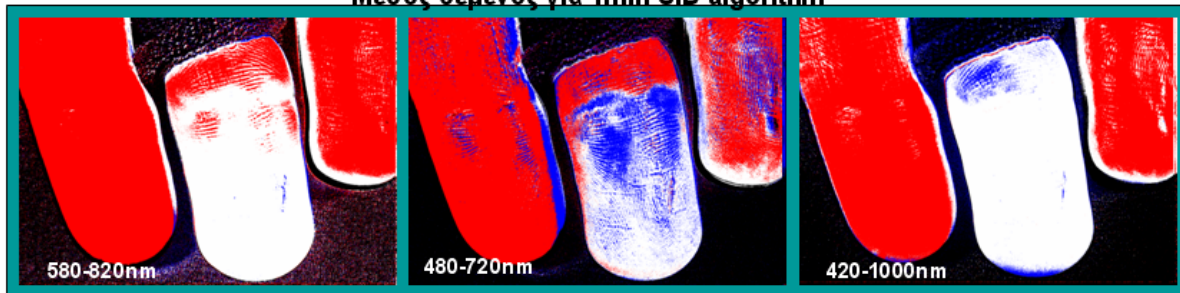


Εικόνα Π 9: Εικόνες από την εφαρμογή SAM & SID σε ελεύθερο μέσο

Μέσος δεμένος για 1min SAM algorithm

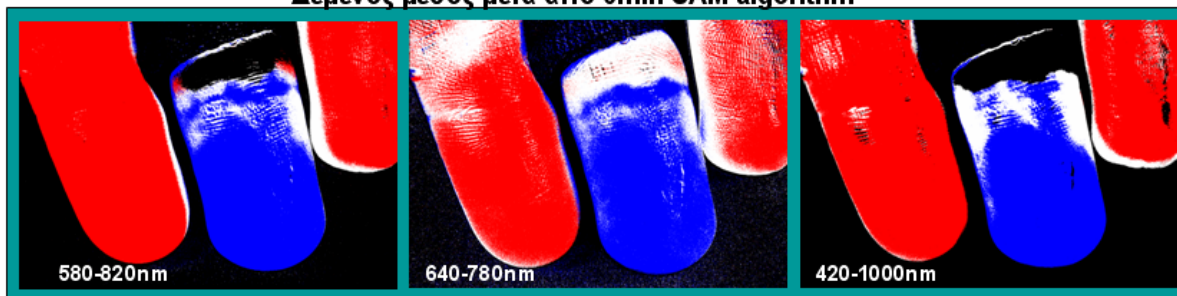


Μέσος δεμένος για 1min SID algorithm

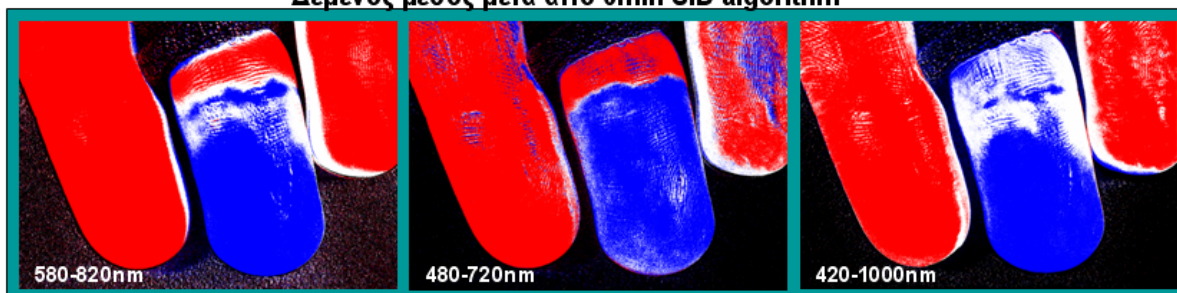


Εικόνα Π 10: Εικόνες από την εφαρμογή SAM & SID σε μέσο δεμένο για 1min

Δεμένος μέσος μετά από 6min SAM algorithm



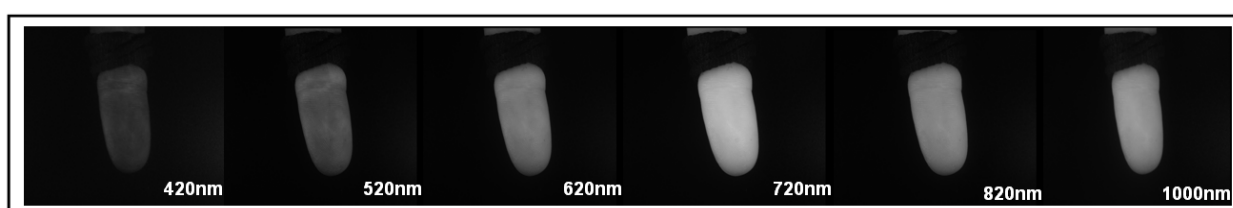
Δεμένος μέσος μετά από 6min SID algorithm



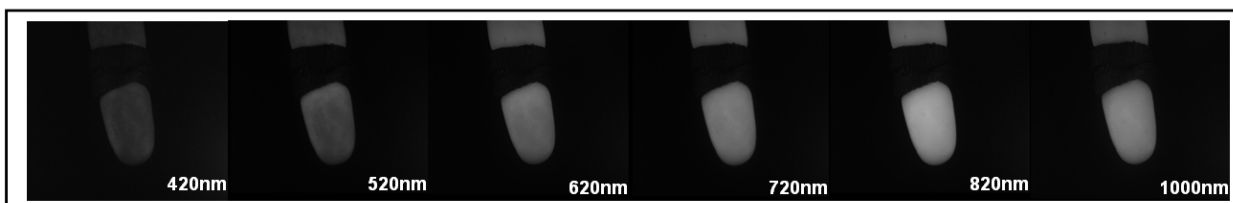
Εικόνα Π 11: Εικόνες από την εφαρμογή SAM & SID σε μέσο δεμένο για 6min

5^ο Στάδιο

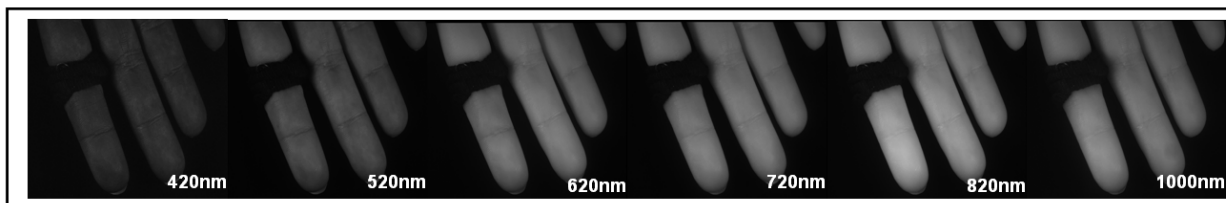
Παρουσιάζονται οι κύβοι που προέκυψαν από τους δείκτες των Εθελοντών 1 και 2 καθώς και ο κύβος του δείκτη μου ενώ είναι δεμένο για 3min



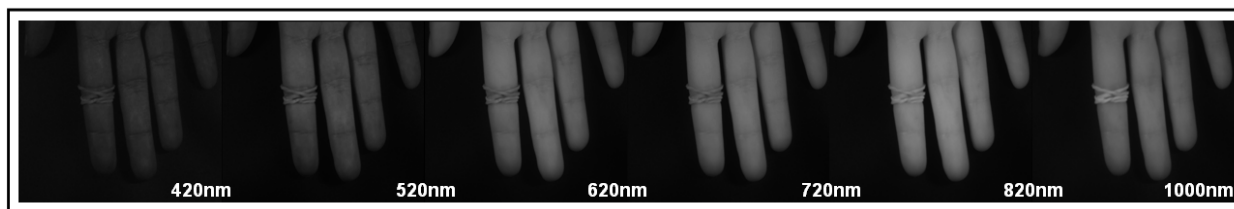
Εικόνα Π 12: Φασματικός κύβος για το δείκτη του Εθελοντή 1 ενώ είναι δεμένο 1min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS



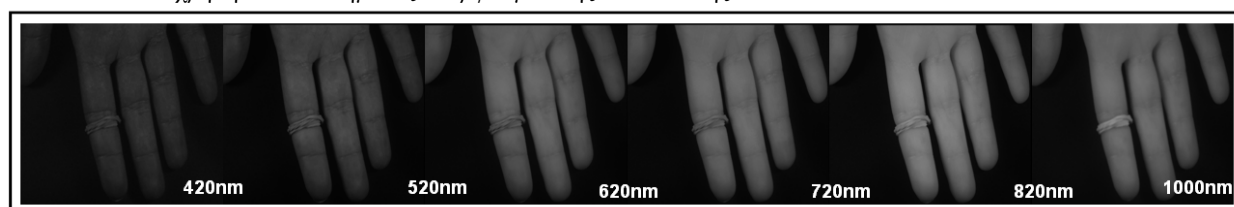
Εικόνα Π 13: Φασματικός κύβος για το δείκτη του Εθελοντή 1 ενώ είναι δεμένο 3min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS



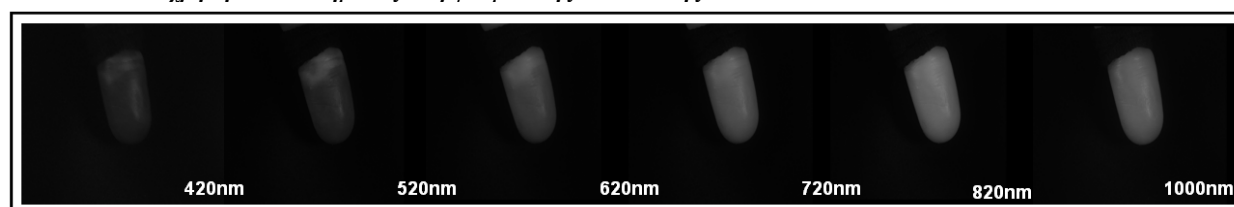
Εικόνα Π 14: Φασματικός κύβος για το δείκτη Εθελοντή 2 ενώ είναι δεμένο 3min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS



Εικόνα Π 15: Φασματικός κύβος για το δείκτη Εθελοντή 2 ενώ είναι δεμένο 1min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS



Εικόνα Π 16: Φασματικός κύβος για το δείκτη του Εθελοντή 1 ενώ είναι δεμένο 6min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS



Εικόνα Π 17: Φασματικός κύβος για το δείκτη μου ενώ είναι δεμένο 3min, κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS

