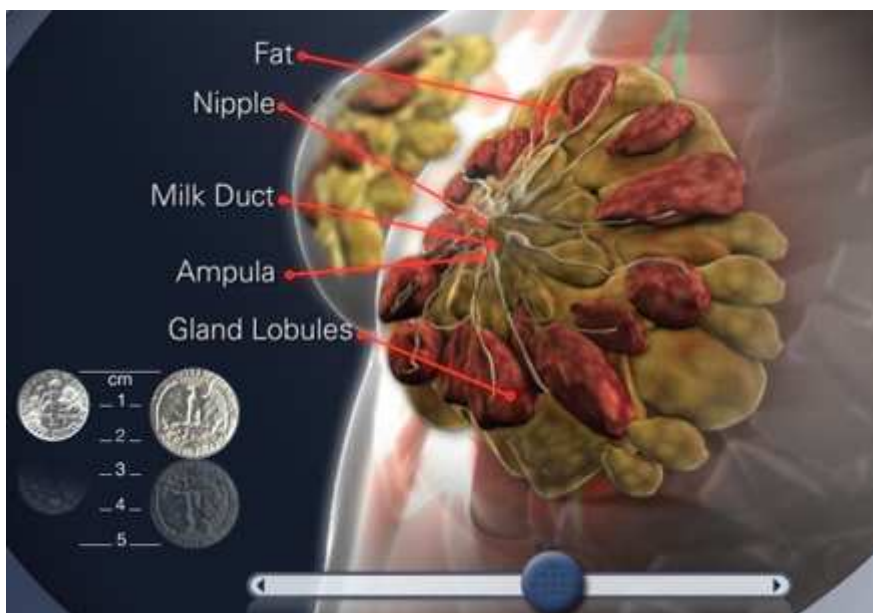




ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

Υπερφασματική μικροσκοπία και αλγόριθμοι φασματικής ταξινόμησης για την διακεκριμένη χαρτογράφηση χρωστικών οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκίνο μαστού.

Μακρίδου Γεωργία



Επιτροπή Διπλωματικής :

Μπάλας Κώστας , Αναπληρωτής Καθηγητής (επιβλέπων)
Ζερβάκης Μιχάλης , Καθηγητής
Μπούχερ Ματτίας , Επίκουρος Καθηγητής

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή εκτίμησή και τις θερμές ευχαριστίες μου προς τον καθηγητή Κώστα Μπάλα για την καθοδήγηση και υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Οι πολύτιμες συμβουλές του με καθοδήγησαν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Είμαι ευγνώμων επίσης στους υποψήφιους διδάκτορες, Παπουτσόγλου Γεώργιο και Τσάπρα Αθανάσιο για τη βοήθεια και συμπαράσταση που μου προσέφεραν σε κάθε στάδιο της διπλωματικής μου εργασίας. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τον μεταπτυχιακό φοιτητή Επιτρόπου Γεώργιο, για τις πολύτιμες συμβουλές και την αμέριστη ηθική υποστήριξη του.

Ακόμα, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές Ζερβάκη Μιχάλη και Μπούχερ Ματτία, για την συμμετοχή τους στην παρουσίαση και αξιολόγηση της προσπάθειάς μου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να αναφερθώ στους φίλους μου, με τους οποίους μοιράστηκα τις σκέψεις, τις ανησυχίες και τις προσδοκίες μου όλα αυτά τα χρόνια της φοιτητικής μου ζωής. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερος έναν σημαντικό άνθρωπο στη ζωή μου που στέκεται πάντα δίπλα μου με απίστευτη υπομονή και κατανόηση.

Πάνω απ' όλα όμως, ευχαριστώ τους γονείς μου, Παντελή και Αικατερίνη, και τις πολυαγαπημένες μου αδερφές, οι οποίοι με στηρίζουν και με ενθαρρύνουν πάντα να συνεχίζω κάθε προσπάθεια μου και να τολμώ να κάνω νέα βήματα στη ζωή μου. Αφιερώνω, λοιπόν, την διπλωματική μου εργασία στην οικογένειά μου, ως ελάχιστη έκφραση της ευγνωμοσύνης και της αγάπης μου.

Περίληψη

Στόχος της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η διερεύνηση των διαγνωστικών δυνατοτήτων της υπερφασματικής μικροσκοπίας σε δείγματα καρκίνου του μαστού. Αρχικά έγινε ανάλυση των φασματικών χαρακτηριστικών που παρουσίαζαν οι χρωστικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την οπτική παρατήρηση των οιστρογονικών υποδοχέων σε περιπτώσεις τόσο υγιείς όσο και καρκινοπαθείς. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν η Fast Red και η hematoxylin που προσδιορίζουν την παρουσία και απουσία οιστρογονικών υποδοχέων στα κύτταρα αντίστοιχα. Συνδυάστηκε η υπερφασματική απεικόνιση και μικροσκοπία για την λήψη φασματικών εικόνων εντός και εκτός του ορατού φάσματος. Έτσι προέκυψε ένα φάσμα για κάθε εικονοστοιχείο (pixel) του εξεταζόμενου δείγματος βιοψίας και το σύνολο αυτών αναλύθηκε με φασματικούς ταξινομητές διερευνώντας τις δυνατότητές τους στην ανίχνευση, στον εντοπισμό και στην εκτίμηση της συγκέντρωσης των οιστρογονικών υποδοχέων. Κάθε pixel του υπό εξέταση δείγματος ταξινομείται σε μια κλάση και σε κάθε μια από αυτές τις κλάσεις αντιστοιχίζεται ένα ψευδόχρωμα με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός ψευδοχρωματικού χάρτη. Τα χρώματα του χάρτη εκφράζουν διαφορετικές συγκεντρώσεις των οιστρογονικών υποδοχέων, καθιστώντας έτσι δυνατή την άμεση οπτικοποίηση της διαγνωστικής πληροφορίας. Με στόχο την μεγιστοποίηση της τελευταίας, αξιολογήθηκαν συγκριτικά οι supervised φασματικοί ταξινομητές: Spectral Angle Mapper, Spectral Correlation Mapper, Spectral Information Divergence, Spectral Gradient Mapper). Συγκρίνοντας τους ψευδοχρωματικούς χάρτες αυτών, ο ταξινομητής Spectral Angle Mapper προκρίθηκε ως ο πιο αποτελεσματικός ακόμα και σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού. Στους αλγόριθμους αυτούς έγινε σταδιακή μείωση των φασματικών διαστάσεων (dimensionality), συγκεκριμένα από 20 σε 4 και τελικά σε 3 μπάντες. Συνεπώς καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι φασματικές εικόνες σε μόλις 3 στενές περιοχές συχνότητας στο ορατό και στο κοντινό υπέρυθρο (near-infrared) μέρος του φάσματος αρκούν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των οιστρογονικών υποδοχέων και ως συνέπεια την λήψη ακριβής διαγνωστικής πληροφορίας. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση χρήσης 4 μπαντών τα ποσοστά ομοιότητας κυμαίνονται κοντά στο 82.39 % ενώ για 3 μπάντες φτάνουν στο 80.97 %. Η προκαταρκτική εφαρμογή της μεθόδου αυτής σε δείγματα βιοψίας με διαφορετικές συγκεντρώσεις χρωστικών οιστρογονικών υποδοχέων οδήγησε σε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ειδικότερα έγινε δυνατή η αντικειμενικότερη αξιολόγηση και ποσοτικοποίηση της παρουσίας τους σε τέτοια δείγματα βιοψίας από καρκίνο του μαστού.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ο καρκίνος του μαστού.....	15
1.1 Γενικές πληροφορίες για τον μαστό	15
1.1.1 Δομή του μαστού	15
1.1.2 Μέγεθος του μαστού	16
1.2 Καρκίνος του μαστού	17
1.2.1 Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο του μαστού	18
1.2.2 Μορφές του καρκίνου του μαστού	20
1.2.3 Στάδια του καρκίνου του μαστού	21
1.2.4 Έλεγχοι για τον εντοπισμό του καρκίνου του μαστού.....	24
1.2.4.1 Διαγνωστικές μέθοδοι για τον καρκίνο του μαστού	25
1.2.5 Θεραπεία κατά του καρκίνου του μαστού	25
1.2.5.1 Χημειοθεραπεία	27
1.3 Οιστρογόνα και οιστρογονικοί υποδοχείς	29
1.3.1 Τι είναι τα οιστρογόνα.....	29
1.3.2 Οιστρογονικοί υποδοχείς.....	29
1.3.3 Οι ευεργετικές και επιβλαβείς επιδράσεις των οιστρογόνων	31
1.3.4 Οιστρογόνο και καρκίνος του μαστού.....	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : Αλληλεπίδραση φωτός και ιστού.....	33
2.1 Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.....	33
2.2 Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα	34
2.3 Φασματοσκοπία.....	37
2.3.1 Εκπομπή- Απορρόφηση.....	38
2.3.2 Ανάκλαση – Σκέδαση	39
2.4 Ιστός και αλληλεπίδραση αυτού με το φως	41
2.4.1 Αλληλεπιδράσεις φωτός	42
2.4.1.1 Αλληλεπιδράσεις μικροκυμάτων	42
2.4.1.2 Αλληλεπιδράσεις υπερύθρων	42
2.4.1.3 Αλληλεπιδράσεις ορατού φωτός.....	42
2.4.1.4 Αλληλεπιδράσεις υπεριώδους ακτινοβολίας	42
2.4.1.5 Αλληλεπιδράσεις ακτίνων X	43
2.5 Beer-Lambert law	43
2.5.1 Περιορισμοί του Beer-Lambert law	44
Κεφάλαιο 3: Ποσοτική παθολογία και οι εναλλακτικές τεχνικές της	45
3.1 Ποσοτική παθολογία (QUANTITATIVE PATHOLOGY).....	45
3.2 Βιοψία.....	45
3.2.1 Γενικά	45
3.2.2 Προετοιμασία του ιστού μετά την βιοψία	46
3.3 Χρώση	47
3.3.1 Γενικά.....	47

3.3.2 Οι χρωστικές.....	47
3.4 Τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην παθολογία	48
3.4.1 Οπτική πυκνότητα	48
3.4.2 Ανοσοϊστοχημεία.....	49
3.4.2.1 Ερμηνεία αποτελεσμάτων ανοσοϊστοχημείας	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : Υπερφασματική απεικόνιση και αλγόριθμοι ταξινόμησης.....	51
4.1 Φασματική απεικόνιση.....	51
4.1.1 Κατηγορίες φασματικής απεικόνισης.....	52
4.2 Μικροσκοπία	54
4.2.1 Μικροσκόπιο	55
4.2.2 Τα συστατικά μέρη του μικροσκοπίου	55
4.2.3 Είδη μικροσκοπίου	57
4.3 Σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης (MuSIS) και οπτικό μικροσκόπιο.....	57
4.3.1 Σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης (MuSIS).....	57
4.3.2 Οπτικό μικροσκόπιο	60
4.4 Επεξεργασία υπερφασματικών δεδομένων	61
4.4.1 Γενικά.....	61
4.4.2 Ταξινόμηση δεδομένων	62
4.5 Αλγόριθμοι ταξινόμησης.....	63
4.6 Ακρίβεια αξιολόγησης.....	66
Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι και έρευνες ποσοτικοποίησης του καρκίνου του μαστού....	67
5.1 Γενικά.....	67
5.1.1 Συγκρίσεις μεθόδων	67
5.2 Μελέτες που έχουν γίνει για τον εντοπισμό των ER	69
5.2.1 Αυτοποιημένα συστήματα ανάλυσης της εικόνας	70
5.2.2 Μελέτες με βάση την φασματική απεικόνιση	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : Πειραματική διαδικασία και αποτελέσματα	90
6.1 Γενικά.....	90
6.2 Βήματα εργασίας.....	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : Συμπεράσματα και προοπτική εξέλιξης της εργασίας.....	137
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	139
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	142

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Ο μαστός.....	15
Εικόνα 1.2 Λοβοί-λοβίο	16
Εικόνα 1.3 Λοβοί-αγωγοί-θηλή.....	16
Εικόνα 1.4 Στρώμα	16
Εικόνα 1.5 Μυς.....	16
Εικόνα 1.6 Αρτηρίες.....	16
Εικόνα 1.7 Λεμφικοί αγωγοί και κόμβο	16
Εικόνα 1.8 Κανονικά κύτταρα.....	20
Εικόνα 1.9 Μη-επιθετικά κύτταρα.....	20
Εικόνα 1.10 Επιθετικά κύτταρα	20
Εικόνα 1.11 Καρκίνος του μαστού στο στάδιο I.....	21
Εικόνα 1.12 Καρκίνος του μαστού στο στάδιο II.....	22
Εικόνα 1.13 Καρκίνος του μαστού στο στάδιο III	23
Εικόνα 1.14 Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού	23
Εικόνα 1.15 Καρκίνος του μαστού στο στάδιο IV.....	23
Εικόνα 1.16 Τα μεγέθη του καρκίνου	24
Εικόνα 1.17 Μοριακός σκελετός των οιστρογόνων.....	29
Εικόνα 1.18 Τα βήματα γονιδιακής ενεργοποίησης κατά την δέσμευση του οιστρογόνου από τον αντίστοιχο υποδοχέα του.....	30
Εικόνα 1.19 Οι θετικές και αρνητικές επιδράσεις του οιστρογόνου.....	31
Εικόνα 2.1 Η καμπύλη δείχνει τη σχέση, $E \text{ (eV)} = 1.240 / \lambda \text{ (nm)}$	34
Εικόνα 2.2 Το λευκό φως διέρχεται μέσα από το πρίσμα και αναλύεται στα χρώματα του	35
Εικόνα 2.3 και 2.4 Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.....	36
Εικόνα 2.5 Ένα φάσμα εκπομπής γεννιέται.....	36
Εικόνα 2.6 Ένα φάσμα απορρόφησης γεννιέται	39
Εικόνα 2.7 Γωνία πρόσπτωσης ίση με γωνία ανάκλασης.....	40
Εικόνα 2.8 Περιπτώσεις ανάκλασης.....	40
Εικόνα 2.9 Απορρόφηση του φωτός από ένα δείγμα	44
Εικόνα 4.1 Η διαδικασία φασματικής απεικόνισης. Σε κάθε σημείο της εικόνας, pixel αντιστοιχεί ένα χαρακτηριστικό φάσμα	52
Εικόνα 4.2 Ένας υπερφασματικός (Hyper-spectral) κύβος.....	53
Εικόνα 4.3 Οι κατηγορίες φασματικής απεικόνισης	54
Εικόνα 4.4 Τα συστατικά μέρη του οπτικού μικροσκοπίου.....	56
Εικόνα 4.5 Η κάμερα MuSIS.....	58
Εικόνα 4.6 Διάγραμμα λειτουργίας του υπερφασματικού συστήματος απεικόνισης	60
Εικόνα 4.7 Το σύστημα MuSIS - οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική μας διαδικασία.....	61
Εικόνα 4.6 Αναπαράσταση διανυσμάτων δύο φασμάτων για 3 διαφορετικά λ.....	63
Εικόνα 4.7 Αναπαράσταση διανυσμάτων δύο φασμάτων για 3 διαφορετικά λ.....	64.

Εικόνα 5.1 Υπολογιστικό σύστημα ανάλυσης εικόνας	71
Εικόνα 5. 2 Περιστρεφόμενο αμετάβλητο φίλτρο	72
Εικόνα 5.3 Οι ROC καμπύλες δείχνουν την ευαισθησία και την εξειδίκευση σε όλα τα πιθανά cutoff για την θετική γενετική ενίσχυση (≥ 2.3)	73
Εικόνα5.4 Διάγραμμα ροής για την αυτοματοποιημένη επεξεργασία της υπο-εικόνας. Τα βήματα που εμπλέκονται περιλαμβάνουν μετατροπή σε grayscale κλίμακα, διαχωρισμό με προσαρμοστικά κατώφλια ορίων και μορφολογικούς χειρισμούς, χρωματική επισήμανση, εξαγωγή χαρακτηριστικών, ταξινόμηση χρώσης και ταξινόμηση πυρήνων.....	77
Εικόνα 5.5 Σχηματικό διάγραμμα του SMS.....	80
Εικόνα5.6 Οι γραφικές της απορρόφησης ως προς το μήκος κύματος για τις δυο χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν και αυτή που αντιστοιχεί σε μη χρωματισμένο ιστό.....	82
Εικόνα5.7 Οι γραφικές της απορρόφησης ως προς το μήκος κύματος για τις δυο χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν για διάφορες συγκεντρώσεις αυτών μαζί με τις αντίστοιχες αυτών που έχουν εφαρμοστεί στο δείγμα ιστού (FR-T, HEM-T).....	82
Εικόνα5.8 Οι χάρτες συγκέντρωσης για α)FR και β)HEM. Η ψευδοχρωματική κλίμακα κυμαίνεται από μαύρο σε άσπρο καθώς η συγκέντρωση ποικίλει από μηδέν στη μέγιστη	83
Εικόνα5.9 Διπλή χρωματική επισήμανση των CD4+ και CD8+ κυττάρων. Τα CD4+ κύτταρα χρωματίστηκαν με 3,30-Diaminobenzidine (DAB, καφέ) και τα CD8+ με Fast RED (κόκκινο), και counterstained με αιματοξυλίνη. Α) Η RGB εικόνα. Β) Η εικόνα μετά την αφαίρεση της αιματοξυλίνης. Γ) Τα φάσματα των τριών χρωστικών. Δ), Ε), F) οι μεμονωμένες χρωστικές. Γ) Εικόνα όπου οι χρωστικές είναι διαχωρισμένες. Η) Μια περιοχή της εικόνας (G). Ι) Μια εικόνα όπου έχει αφαιρεθεί η αιματοξυλίνη.....	84
Εικόνα5.10 Διπλή χρωματική επισήμανση των ER και των PR στον καρκίνο του μαστού. Οι ER χρωματίστηκαν με DAB και οι PR με Fast Red παρουσία της αιματοξυλίνης ως counterstain. Α) δείχνει το αρχικό δείγμα, Β) τα φάσματα των τριών χρωστικών που χρησιμοποιούνται για unmixing στα επιμέρους κανάλια, Γ) δείχνει το σήμα της αιματοξυλίνης το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της θέσης όλων των πυρήνων. Δ), Ε), F) δείχνουν την τοποθεσία των PR, ER, και της συνύπαρξής τους αντίστοιχα. Μια εναλλακτική μέθοδος απεικόνισης φαίνεται στις εικόνες Γ), Η), Ι), που παρουσιάζουν αναλυτικά μια περιοχή από το πάνω κέντρο της αρχικής εικόνας. Τα δεδομένα έχουν αναστραφεί, ώστε το πράσινο και κόκκινο σήμα να σχηματίσουν κίτρινο όπου αλληλοεπικαλύπτονται.....	84
Εικόνα 5.11 Invasive ductal τμήμα καρκίνωμα με χρωματισμένους τους ER με DAB και τους PR με Fast RED και counterstained με αιματοξυλίνη. (Α) RGB παρουσίαση (Β-Δ) unmixed εικόνες που αντιστοιχούν σε αιματοξυλίνη, ER και PR αντίστοιχα	86
Εικόνα 5.12 (Α) unmixed εικόνα αιματοξυλίνης (μπλε χρώμα σε άσπρο), (Β) thresholded εικόνα αιματοξυλίνης με τα θετικά σε αιματοξυλίνη pixels να απεικονίζονται σε σκούρο μπλε επάνω στην παρουσίαση της RGB (C) thresholded Ki-67 (κόκκινο) και pHH3 (πράσινο) εικόνες επάνω στην παρουσίαση της RGB (D) η ίδια εικόνα 6(C) αλλά με σαλληλοεπικαλυπόμενα pixels (εκείνα που περιέχουν τόσο Ki-67 και pHH3) εμφανίζονται με κίτρινο χρώμα.....	87
Εικόνα 5.13 Η διαδικασία φασματικής απεικόνισης που ακολουθήθηκε. Το τμήμα ιστού (Α) (DAB-χρωματισμένο με μεγέθυνση 100) , αναλύεται φασματικά (Β) για τη δημιουργία ενός χάρτη του TS (C). Ένα αυθαίρετο όριο εφαρμόζεται στο ιστόγραμμα συχνότητας (D) (x-άξονα, OD- y-άξονα, συχνότητα	

pixel), που επιτρέπει τον διαχωρισμό του όγκου (υψηλότερη OD κορυφή) και του στρώματος (χαμηλότερη OD κορυφή) της TS έκφρασης.....	88
Εικόνα 6.1 Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας(121688.2.B.32) , κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.....	93
Εικόνα 6.2 Γραφικές παραστάσεις των κλάσεων που επιλέξαμε	94
Εικόνα 6.3 Σημειώνονται τα pixels που αντιστοιχούν στις αντίστοιχες σε κάθε περίπτωση κλάσεις.....	95
Εικόνα 6.4 Γραφικές παραστάσεις που αντιστοιχούν στις κλάσεις RED, BLUE.....	95
Εικόνα 6.5 Σημειώνονται τα pixels απο τα οποία προέκυψαν οι παραπάνω γραφικές παραστάσεις	96
Εικόνα 6.6 Οι χρωματικοί χάρτες που προκύπτουν κατά την εφαρμογή των αλγορίθμων	97
Εικόνα 6.7 Σύγκριση SAM, SID με SAM_total,SID_total αντίστοιχα.....	98
Εικόνα 6.8 Εικόνες στα 420nm, 520nm, 700nm και 800nm από τους φασματικούς κύβους που προέκυψαν για 5 διαφορετικές συνθήκες φωτισμού	100
Εικόνα 6.9 Πλακίδιο 123493.18 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.....	101
Εικόνα 6.10 Πλακίδιο 124358.22 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.....	101
Εικόνα 6.11 Πλακίδιο 123493.20 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.....	101
Εικόνα 6.12 Στις παραπάνω εικόνες φαίνεται το αποτέλεσμα εφαρμογής του αλγορίθμου που εφαρμόσαμε.Τα thresholds προσδιορίστηκαν με βάση την πρώτη εικόνα (Α)και όπως βλέπουμε δεν λειτουργούν για τις άλλες περιπτώσεις αφού δεν διαχωρίζονται οι χρωστικές ικανοποιητικά.Για παράδειγμα στις υπόλοιπες εικόνες (B,C,D,E)παρατηρούμε ότι εμφανίζεται μπλε ή κόκκινη χρώση σε σημεία (pixels) ενώ δεν θα έπρεπε σύμφωνα με την RGB εικόνα.....	131
Εικόνα 6.13 Γραφικές παραστάσεις που αντιστοιχούν σε φάσματα από την κόκκινη και μπλε κλάση	132
Εικόνα6.14 Ασπρόμαυροι χάρτες που προκύπτουν κατά την σύγκριση ομοιότητας δυο εικόνων.....	136
Εικόνα1.Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας(121588.2.B.32) , κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.	
Εικόνα2.Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας(121588.2.B.31) , κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.	
Εικόνα3.Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας(122108.2.17), κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.	
Εικόνα4.Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας(122182.2.25), κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.	

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Περιοχές του ηλεκτομαγνητικού φάσματος	37
Πίνακας 5.1 Τα πλεονεκτήματα και οι διαφορές των μεθόδων ποσοτικοποίησης των ER.....	69
Πίνακας5.2 Τα αποτελέσματα του υπολογιστικού συστήματος συγκριτικά με τα αντίστοιχα του ιστοπαθολόγου.....	71

Πίνακας 5.3 Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του ISA συγκριτικά με αυτά του ιστοπαθολόγου	75
Πίνακας 5.4 Σύστημα βαθμονόμησης των δειγμάτων βιοψία με βάση την οπτική παρατήρηση.....	87
Πίνακας 6.1 Οι συνδυασμοί τεσσάρων μπαντών	103
Πίνακας 6.2 Πίνακας με ποσοστά ακριβείας (%) του SAM για 4 μπάντες ,συγκριτικά με SAM για 20 μπάντες λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα φάσματα αναφοράς που επιλέξαμε από κάθε πλακίδιο σε κάθε περίπτωση	104
Πίνακας 6.3 Δείχνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας του SAM20,SAM4 μπαντών και την τετράδα μπαντών που εντοπίζονται αυτά.....	106
Πίνακας 6.4 Πίνακας με τα ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα(κλάση)μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 4 μπαντών για το πλακίδιο. 121588.2.32 (πλακίδιο1)	107
Πίνακας 6.5 Παρουσιάζει τον αριθμό κλάσεων που συνολικά για τους 22 συνδυασμούς 4 μπαντών παρουσιάζουν μέγιστο ποσοστό απόκλισης από τον SAM20.....	108
Πίνακας 6.6 Ο πίνακας αυτός δείχνει για τις καλύτερες επιλογές 4 μπαντών την κλάση που εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης από την αντίστοιχη της του SAM 20 μπαντών	109
Πίνακας 6.7 Οι συνδυασμοί τριών μπαντών	110
Πίνακας 6.8 Πίνακας με ποσοστά ακριβείας (%) του SAM για 3 μπάντες ,συγκριτικά με SAM για 20 μπάντες λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα φάσματα αναφοράς που επιλέξαμε από κάθε πλακίδιο σε κάθε περίπτωση	110
Πίνακας 6.9 Δείχνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας του SAM20,SAM4 μπαντών και την τριάδα μπαντών που εντοπίζονται αυτά.....	112
Πίνακας 6.10 Πίνακας με τα ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.32 (πλακίδιο1)	113
Πίνακας 6.11 Παρουσιάζει τον αριθμό κλάσεων που συνολικά για τους 18 συνδυασμούς 3 μπαντών παρουσιάζουν.....	113
μέγιστο ποσοστό απόκλισης από τις αντίστοιχες κλάσεις του SAM20.....	115
Πίνακας 6.12 Ο πίνακας αυτός δείχνει για τις καλύτερες επιλογές 3 μπαντών την κλάση που εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης από την αντίστοιχη της του SAM 20 μπαντών	116
Πίνακας 6.13 Πίνακας με ποσοστά ακριβείας (%) του SAM για 4 μπάντες ,συγκριτικά με SAM για 20 μπάντες λαμβάνοντας το σύνολο των φασμάτων αναφοράς που επιλέξαμε από όλα τα πλακίδια.	118
Πίνακας 6.14 Δείχνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας του SAM20,SAM4 μπαντών και την τετράδα μπαντών που εντοπίζονται αυτά.	119
Πίνακας 6.15 Πίνακας με τα ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα(κλάση)μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 4 μπαντών για το πλακίδιο. 121588.2.32 (πλακίδιο1)	120
Πίνακας 6.16 Παρουσιάζει τον αριθμό κάθε κλάσης που συνολικά για τους 22 συνδυασμούς 4 μπαντών παρουσιάζουν μέγιστο ποσοστό απόκλισης από τις αντίστοιχες του SAM20.....	121
Πίνακας 6.17 Ο πίνακας αυτός δείχνει για τις καλύτερες επιλογές 4 μπαντών την κλάση που εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης από την αντίστοιχη της του SAM 20 μπαντών	122
Πίνακας 6.18 Πίνακας με ποσοστά ακριβείας (%) του SAM για 3 μπάντες ,συγκριτικά με SAM για 20 μπάντες λαμβάνοντας υπόψη όλα τα φάσματα αναφοράς	123
Πίνακας 6.19 Δείχνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας του SAM20,SAM4 μπαντών και την τριάδα μπαντών που εντοπίζονται αυτά.....	124

Πίνακας 6.20 Πίνακας με τα ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.32 (πλακίδιο1).....	125
Πίνακας 6.21 Παρουσιάζει τον αριθμό κλάσεων που συνολικά για τους 18 συνδυασμούς 3 μπαντών παρουσιάζουν μέγιστο ποσοστό απόκλισης από τις αντίστοιχες κλάσεις του SAM20.....	126
Πίνακας 6.22 Ο πίνακας αυτός δείχνει για τις καλύτερες επιλογές 3 μπαντών την κλάση που εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης από την ατίστοιχη της του SAM 20 μπαντών.....	127
Πίνακας 6.23 Πλακίδιο 123493.18 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.....	128
Πίνακας 6.24 Οι μεταβολές του μέγιστου ποσοστού ομοιότητας για τις διάφορες συνθήκες φωτισμού και οι τριάδες μπαντών που εντοπίζονται.....	128
Πίνακας 6.25 Πλακίδιο 124358.22 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.....	129
Πίνακας 6.26 Οι μεταβολές του μέγιστου ποσοστού ομοιότητας για τις διάφορες συνθήκες φωτισμού και οι τριάδες μπαντών που εντοπίζονται.....	133
Πίνακας 6.27 Πλακίδιο 123493.18 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.....	133
Πίνακας 6.28 Δείχνει τους χρωματικούς χάρτες που αντιστοιχούν στον SAM20 με φάσματα αναφοράς από το κάθε πλακίδιο μόνο σε κάθε περίπτωση και στο αποτέλεσμα του color segmentation καθώς και το ποσοστό ομοιότητας τους.....	134
Πίνακας 6.29 Δείχνει τους χρωματικούς χάρτες που αντιστοιχούν στον SAM20 με φάσματα αναφοράς από όλα τα πλακίδια και το αποτέλεσμα του color segmentation καθώς και το ποσοστό ομοιότητας τους.....	135
Πίνακας1. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.32 (πλακίδιο2).....	141
Πίνακας2.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.32 (πλακίδιο2).	142
Πίνακας3.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122108.2.17 (πλακίδιο4).....	
Πίνακας4.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.25 (πλακίδιο5).....	
Πίνακας5.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.26 (πλακίδιο 6).....	
Πίνακας6. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.32 (πλακίδιο 2).	
Πίνακας7.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.31 (πλακίδιο3).	
Πίνακας8.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.31 (πλακίδιο3).	
Πίνακας9.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.25 (πλακίδιο 5).....	
Πίνακας10. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.26 (πλακίδιο 6).	

Πίνακας11. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 4 μπαντών για το πλακίδιο. 121588.2.B.32 (πλακίδιο 2).....	
Πίνακας12. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 4 μπαντών για το πλακίδιο. 121588.2.B.31 (πλακίδιο3).....	
Πίνακας13. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122108.2.17 (πλακίδιο4).....	
Πίνακας14. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.25 (πλακίδιο5).....	
Πίνακας15. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.26 (πλακίδιο 6).....	
Πίνακας16. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 124358.2.20 (πλακίδιο 8).....	
Πίνακας17.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.21 (πλακίδιο 9).....	
Πίνακας18. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.32 (πλακίδιο 2).....	
Πίνακας19. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.31 (πλακίδιο 3).....	
Πίνακας20. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122108.2.17 (πλακίδιο 4).....	
Πίνακας21 Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.25 (πλακίδιο 5).....	
Πίνακας22. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.26 (πλακίδιο 6).....	
Πίνακας23. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 124358.2.27 (πλακίδιο 7).....	
Πίνακας24. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 124358.2.20 (πλακίδιο 8).....	
Πίνακας25.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.21 (πλακίδιο 9).....	
Πίνακας26.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 123493.18.1 (πλακίδιο 10).....	
Πλακίδιο27. 123493.20 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.....	

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε όλο τον κόσμο, ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών, με ένα ποσοστό εμφάνισης διπλάσιο από αυτό του καρκίνου του παχέος εντέρου και του τραχήλου. Μάλιστα, είναι η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα ενώ η θνησιμότητα που παρουσιάζει παγκοσμίως είναι μόλις 25% μεγαλύτερη από εκείνη του καρκίνου του πνεύμονα για τις γυναίκες. Το 2004, ο καρκίνος του μαστού προκάλεσε 519.000 θανάτους σε όλο τον κόσμο με το ποσοστό εμφάνισης του να έχει αυξηθεί σημαντικά από το 1970, ένα φαινόμενο που εν μέρει ευθύνεται στον σύγχρονο τρόπο ζωής του δυτικού κόσμου. Η συχνότητα εμφάνισης του ωστόσο διαφέρει σημαντικά σε όλο τον κόσμο, συγκεκριμένα είναι χαμηλότερη στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες και μεγαλύτερη στις πιο αναπτυγμένες χώρες.

Πρόκειται για μια νόσο που μάχονται οι επιστήμονες σε όλο τον κόσμο καθημερινά εξαιτίας αυτών των επιδημικών διαστάσεων που έχει πάρει τελευταία. Παρά τα ανησυχητικά στατιστικά στοιχεία, το ιστορικό καρκίνου του μαστού στις ΗΠΑ αποκαλύπτει ότι ο αριθμός των θανάτων λόγω της νόσου αυτής μειώνεται, καθώς η επιστήμη κάνει άλματα στην έγκαιρη διάγνωση και στις μεθόδους θεραπείας. Το μέσο πενταετές ποσοστό επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του μαστού είναι μεταξύ 81% και 86%, ανάλογα με την ηλικία της γυναίκας. Αλλά με την έγκαιρη διάγνωση, οι πιθανότητες επιβίωσης από καρκίνο του μαστού είναι πιο κοντά στο 96%. Εν ολίγοις, συνιστάται ο προγραμματισμός μια μαστογραφίας για όλες τις γυναίκες ειδικά μετά την ηλικία των 40.

Ωστόσο, σημαντικό ρόλο στην διάγνωση και απόφαση της θεραπευτικής πορείας που θα ακολουθηθεί για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού παίζει η εκτίμηση των επιπέδων των οιστρογονικών υποδοχέων στα καρκινικά κύτταρα. Τα οιστρογόνα, μια ομάδα ορμονών που παράγονται από τον γυναικείο οργανισμό, ενεργούν στους ιστούς του μαστού (καλοήθεις και κακοήθεις), καθώς δεσμεύονται από τους οιστρογονικούς υποδοχείς (ER), και προκαλούν κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αν και αυτή η διαδικασία είναι σημαντική για τη φυσιολογική ανάπτυξη του μαστού, περιλαμβάνει εγγενή κίνδυνο ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων. Οι ασθενείς με καρκίνο του μαστού, των οποίων τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν ER στους πυρήνες τους (ER + status) υποβάλλονται σε διαφορετική θεραπεία από εκείνους που δεν έχουν ER (ER-status) αφού οι τελευταίοι δεν ανταποκρίνονται στην ορμονική θεραπεία. Έχει αποδειχθεί ότι η κατάσταση των ER αποτελεί έναν σημαντικό βιολογικό παράγοντα για την διάγνωση του καρκίνου του μαστού και την πρόβλεψη της κλινικής ανταπόκρισης. Τελευταία, η αξιολόγηση της κατάστασης ER πραγματοποιείται μέσω της ανοσοϊστοχημείας (IHC) που αντικατέστησε τις βιοχημικές μεθόδους που χρησιμοποιούνταν μέχρι πρότεινως για το σκοπό αυτό.

Η ανοσοϊστοχημεία (IHC) χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση της κατανομής και έκφρασης των ER σε βιολογικά τμήματα με στόχο την λήψη προγνωστικών πληροφοριών και την πρόβλεψη της πιθανότητας για πετυχημένη θεραπεία. Η ακριβής ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών σε χρωματισμένους από την IHC ιστούς είναι όμως δύσκολη λόγω έλλειψης αντικειμενικότητας, αναπαραγωγής και ευρέως διαθέσιμων μεθόδων. Ως συνέπεια, αυτοματοποιημένοι μέθοδοι ανάλυσης της εικόνας έχουν διερευνηθεί σαν στρατηγικές για την λήψη ακριβών ποσοτικών και αναπαραγωγικών

δεδομένων. Οι μέθοδοι αυτοί ανάλυσης της εικόνας εξασφαλίζουν την απαιτούμενη αντικειμενικότητα και ακρίβεια που απαιτείται στην κλινική πρακτική.

Η φασματική απεικόνιση είναι μια πολλά υποσχόμενη μορφή ανάλυσης που είναι κατάλληλη τόσο στην bright field μικροσκοπία όσο και στην μικροσκοπία φθορισμού (fluorescence). Η ικανότητα της να μετράει ένα μεγάλο αριθμό μηκών κύματος για κάθε pixel είναι ένα πλεονέκτημα σε σχέση με τα πρότυπα συστήματα χρωματικής απεικόνισης. Αυτό επίσης επιτρέπει σε ιστολογικές χρωστικές με χαρακτηριστικά φάσματα να διαχωρίζονται και ταυτόχρονα να ποσοτικοποιούνται. Η φασματική απεικόνιση είναι ουσιαστικά μια μορφή ανάλυσης εικόνας που παράγει ένα υψηλής ανάλυσης φάσμα της έντασης του φωτός ως συνάρτηση του μήκους κύματος για κάθε pixel της εικόνας.

Αυτήν την μέθοδο, της φασματικής απεικόνισης, χρησιμοποιήσαμε στην έρευνα μας για να την αντικειμενική ποσοτικοποίηση των επιπέδων ER σε IHC δείγματα βιοψίας από καρκίνο του μαστού. Ουσιαστικά σκοπός μας ήταν να διαχωρίσουμε τις δυο χρωστικές που εφαρμόστηκαν στα δείγματα μας και τελικά να ποσοτικοποιήσουμε τους οιστρογονικούς υποδοχείς με την βοήθεια της υπερφασματικής απεικόνισης. Χρησιμοποιώντας το υπερφασματικό σύστημα απεικόνισης και το οπτικό μικροσκόπιο σκοπεύουμε αρχικά να διασαφηνίσουμε την αντίληψή μας όσο αναφορά την κατάσταση των κυττάρων στα δείγματα μας. Η παρουσία της χρώσης Fast Red υποδηλώνει ER θετικότητα των κυττάρων λειτουργώντας σαν ένας δείκτης εντοπισμού των οιστρογονικών υποδοχέων και κατ' επέκταση των καρκινικών κυττάρων στο μαστό. Ο διαχωρισμός αυτής της χρωστικής από την hematoxylin που χρησιμοποιήθηκε ως counterstain είναι σημαντικός για την επιτυχή ποσοτικοποίηση των οιστρογονικών υποδοχέων στα κύτταρα των δειγμάτων και επομένως στην απόφαση της θεραπευτικής οδού που αρμόζει στην συγκεκριμένη περίπτωση.

Η χρήση της υπερφασματικής απεικόνισης που χρησιμοποιήσαμε στην έρευνα μας κρίνεται επιτυχής για την διακεκριμένη χαρτογράφηση χρωστικών οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκίνο μαστού. Η παρατήρηση αυτή προέκυψε με τη χρήση κάποιων αλγορίθμων ταξινόμησης που εφαρμόσαμε για την απόδοση κάθε pixel της εικόνας στην αντίστοιχη κλάση με την οποία εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας. Από όλους τους αλγόριθμους που χρησιμοποιήσαμε αυτός που λειτουργεί ικανοποιητικότερα είναι ο SAM (spectral angle mapper). Επιπλέον ελαχιστοποιώντας τον συνολικό αριθμό μπαντών καταλήγουμε σε μόλις τρεις που εξασφαλίζουν ακριβή πληροφόρηση όσον αναφορά το φασματικό διαχωρισμό των χρωστικών στα δείγματα μας.

Αναλυτικότερα, στην συνέχεια του κειμένου ακολουθούν τα εξής :

Κεφάλαιο 1 : Δίνουμε γενικές πληροφορίες για τον μαστό και την δομή του, ενώ επικεντρωνόμαστε στους οιστρογονικούς υποδοχείς και πως αυτοί συνδέονται με τον καρκίνο του μαστού.

Κεφάλαιο 2 : Περιγράφουμε κάποιες φυσικές αρχές στις οποίες στηρίζεται η πειραματική μας μελέτη καθώς και τους τρόπους αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τον ιστό.

Κεφάλαιο 3 : Περιγράφουμε κάποιες βασικές αρχές που αφορούν την ποσοτική παθολογία, την βιοψία και την χρώση καθώς και κάποιες βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην παθολογία.

Κεφάλαιο 4 : Παρουσιάζουμε τις γενικές έννοιες της υπερφασματικής απεικόνισης και της ταξινόμησης υπερφασματικών δεδομένων, ενώ αναλύουμε το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και το οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιούμε στην έρευνα αυτή. Τέλος περιγράφουμε τους αλγορίθμους ταξινόμησης φασμάτων που εφαρμόζουμε για την χαρτογράφηση των χρωστικών οιστρογονικών υποδοχέων σε δείγματα βιοψίας καρκίνου μαστού.

Κεφάλαιο 5: Παρουσιάζουμε μεθόδους και έρευνες που έχουν γίνει κατά καιρούς για την ποσοτικοποίηση των οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκίνο του μαστού καθώς και σε άλλες μορφές καρκίνου.

Κεφάλαιο 6 : Περιγράφουμε την πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε σε όλη την διάρκεια της μελέτης μας. Αναφέρουμε και αναλύουμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν με εφαρμογή διαφόρων μεθόδων.

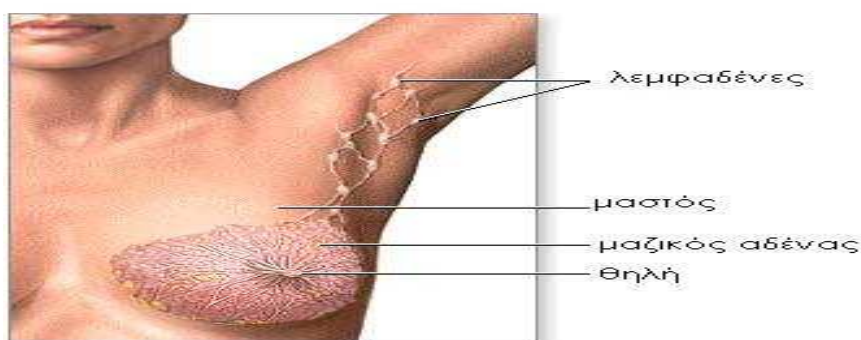
Κεφάλαιο 7: Συνοψίζουμε τα συμπεράσματα που προέκυψαν κατά την διάρκεια της έρευνάς μας και κάνουμε προτάσεις για μελλοντική επέκταση της δουλειάς μας.

Παράρτημα : Εκθέτουμε εικόνες χρωματικών χαρτών που προέκυψαν από διάφορες διαδικασίες που περιγράφονται αναλυτικά στα διάφορα στάδια του βου κεφαλαίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ο καρκίνος του μαστού

1.1 Γενικές πληροφορίες για τον μαστό

Ο μαστός είναι όργανο του δέρματος και η βασική του λειτουργία είναι η παραγωγή γάλακτος μετά τον τοκετό για τη θρέψη του νεογνού. Ωστόσο ο μαστός ως το εμφανέστερο από τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του γυναικείου φύλου, έχει συνδυαστεί σε πολλές κοινωνίες από την αρχαιότητα έως σήμερα με τη θηλυκότητα, το δυναμικό αναπαραγωγής και τελικά πρωταγωνιστεί στις συμπεριφορές πρόκλησης του αντίθετου φύλου.



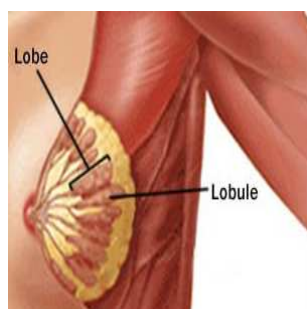
Εικόνα 1.1 Ο μαστός.

Κατά τη διάρκεια της ερωτικής επαφής είναι κοινωνικά αποδεκτό οι μαστοί να αποτελούν αντικείμενο παιχνιδιού και αμοτερόπλευρης ερωτικής διέγερσης, κάτι στο οποίο συμβάλλει η πλούσια αισθητική νεύρωση που διαθέτουν. Τόσο οι άνδρες όσο και οι γυναίκες αναπτύσσουν στήθος από τους ίδιους (embrological) ιστούς. Ωστόσο, κατά την εφηβεία οι ορμόνες του γυναικείου φύλου, κυρίως τα οιστρογόνα, προωθούν την ανάπτυξη του στήθους, πράγμα που δεν συμβαίνει στους άνδρες. Ως αποτέλεσμα τα γυναικεία στήθη γίνονται πιο εμφανή από των ανδρών.

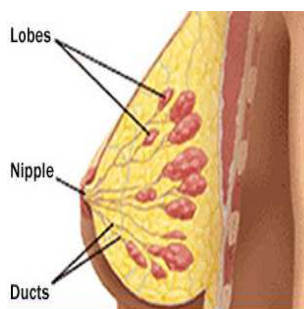
1.1.1 Δομή του μαστού

Η δομή του γυναικείου μαστού είναι αξιοθαύμαστη και πολύπλοκη. Στο μεγαλύτερο μέρος του, το στήθος της γυναίκας αποτελείται από λίπος και συνδετικό ιστό. Υπάρχουν όμως και άλλα, λιγότερο ευδιάκριτα μέρη του γυναικείου μαστού, συμπεριλαμβανομένου των αγωγών του γάλακτος (milk ducts), των λοβών (lobes), των λοβίων (lobules), των αρτηριών και των λεμφαδένων. Κάθε μαστός έχει 15 με 20 τμήματα (lobes). Κάθε λοβός αποτελείται από πολλές μικρότερες δομές (lobules) που καταλήγουν σε μικροσκοπικούς βολβούς που παράγουν το γάλα (εικόνα 1.2). Οι λοβοί (lobes), τα λοβία (lobules) και οι βολβοί (bulbs) συνδέονται μέσω ενός δικτύου λεπτών σωλήνων, τους αγωγούς (ducts). Οι αγωγοί μεταφέρουν το γάλα από τους βολβούς, όπου παράγεται, προς τη σκοτεινή περιοχή του δέρματος στο κέντρο του στήθους (areola). Αυτοί ενώνονται σε μεγαλύτερους αγωγούς που καταλήγουν στη θηλή από όπου το γάλα γίνεται διαθέσιμο σε ένα πεινασμένο παιδί (εικόνα 1.3). Οι περιοχές γύρω από τους λόβιους (lobules) και τους αγωγούς (ducts) είναι γεμάτοι με λιπώδη ιστούς, και

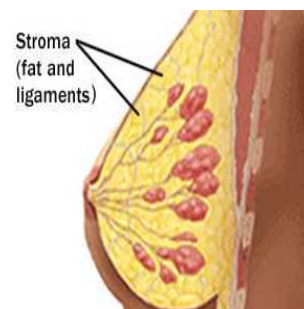
συνδετικό ιστό, το στρώμα (stroma) (εικόνα 1.4). Η ποσότητα του λίπους στο στήθος είναι σε μεγάλο βαθμό αυτή που καθορίζει το μέγεθος του. Το στήθος δεν έχει μυϊκό ιστό, αλλά οι μύες βρίσκονται κάτω από το στήθος διαχωρίζοντας το από τα πλευρά (εικόνα 1.5). Οξυγόνο, θρεπτικά και άλλα στοιχεία για τη διατήρηση της ζωής μεταφέρονται στους ιστούς του μαστού από το αίμα μέσω των αρτηριών (εικόνα 1.6). Το λεμφικό σύστημα - οι λεμφικοί αγωγοί (lymph ducts) και οι λεμφικοί κόμβοι (lymph nodes) - βοηθά στην καταπολέμηση της λοίμωξης (εικόνα 1.7) [1].



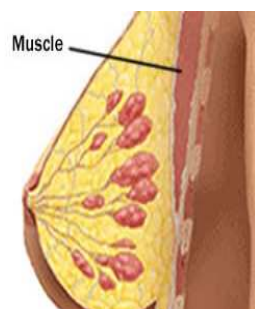
Εικόνα 1.2 Λοβοί-λοβίοι



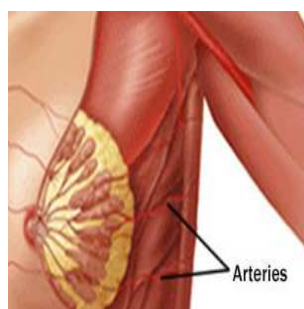
Εικόνα 1.3 Λοβοί-αγωγοί-θηλή



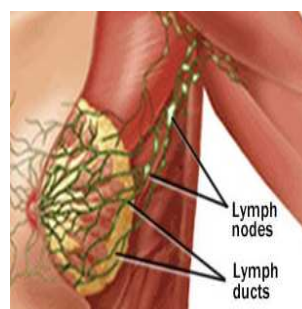
Εικόνα 1.4 Στρώμα



Εικόνα 1.5 Μυς



Εικόνα 1.6 Αρτηρίες



Εικόνα 1.7 Λεμφικοί αγωγοί και κόμβοι

1.1.2 Μέγεθος του μαστού

Το σχήμα και το μέγεθος των μαστού ποικίλλει και εξαρτάται τόσο από κληρονομικούς παράγοντες, όσο και από την ορμονική ανάπτυξη της γυναίκας. Δεν είναι σπάνιο φαινόμενο ο ένας από τους δύο μαστούς να είναι μεγαλύτερος από τον άλλον. Αν αυτό συμβαίνει από μικρή ηλικία, τότε δεν είναι ανησυχητικό. Αν όμως αναπτυχθεί αυτή η διαφορά στο μέγεθος στη συνέχεια, τότε θα πρέπει να γίνει διερεύνηση (χωρίς να σημαίνει ότι κατ'ανάγκη είναι και παθολογικό). Το μέγεθος του μαστού αυξάνει κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, λόγω της υπερτροφίας των αδένων που προετοιμάζονται για την παραγωγή γάλακτος, που θα χρησιμοποιηθεί για τη θρέψη του νεογνού. Επίσης, το μέγεθος του μαστού μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του μηνιαίου κύκλου με το μεγαλύτερο μέγεθος να παρατηρείται στο δεύτερο μισό του κύκλου, λόγω της κατακράτησης υγρών. Τέλος, επηρεάζεται από

την πρόσληψη ή την απώλεια βάρους της γυναίκας, μια και ο μαστός περιέχει σημαντική ποσότητα λίπους.

1.2 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των κυττάρων του μαστού. Για την καλύτερη κατανόηση του καρκίνου του μαστού, βοηθά να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο κάθε καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί. Ο καρκίνος του μαστού είναι περίπου 100 φορές πιο συχνός στις γυναίκες από ότι στους άνδρες, αλλά τα ποσοστά επιβίωσης είναι τα ίδια και για τα δύο φύλα. Ο καρκίνος εμφανίζεται ως αποτέλεσμα των μεταλλάξεων, ή μη φυσιολογικών αλλαγών, στα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων και τη διατήρησή της υγείας τους. Τα γονίδια βρίσκονται στον πυρήνα κάθε κυττάρου, ο οποίος λειτουργεί ως το "δωμάτιο ελέγχου" κάθε κυττάρου. Συνήθως, τα κύτταρα στο σώμα μας αντικαθιστούν τον εαυτό τους με την ομαλή διαδικασία της κυτταρικής ανάπτυξης: νέα υγιή κύτταρα αντικαθιστούν αυτά που πεθαίνουν. Αλλά με τον καιρό, μεταλλάξεις μπορεί να "ενεργοποιήσουν" ορισμένα γονίδια και να "απενεργοποιήσουν" άλλα σε ένα κύτταρο. Αυτό το μεταλλαγμένο κύτταρο αποκτά την δυνατότητα να διαιρείται χωρίς έλεγχο, παράγοντας περισσότερα κύτταρα όμοια με αυτό δημιουργώντας έτσι έναν όγκο [2].

Ένας όγκος μπορεί να είναι καλοήθης (δεν είναι επικίνδυνος για την υγεία) ή κακοήθης (έχει το δυναμικό να είναι επικίνδυνος). Οι καλοήθεις όγκοι δεν θεωρούνται καρκινικοί: τα κύτταρα βρίσκονται κοντά στο κανονικό στην όψη, μεγαλώνουν αργά, δεν εισβάλλουν στους γύρω ιστούς ή εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος. Οι κακοήθεις όγκοι είναι καρκινικοί. Αν αφεθούν ανεξέλεγκτοι τα κακοήθη κύτταρα ενδεχομένως μπορεί να εξαπλωθούν πέραν του αρχικού όγκου και σε άλλα μέρη του σώματος. Ο όρος "καρκίνος του μαστού" αναφέρεται σε έναν κακοήθη όγκο που έχει αναπτυχθεί στα κύτταρα του μαστού. Συνήθως ο καρκίνος του μαστού είτε αρχίζει στα κύτταρα των λοβίων (lobules), που είναι οι αδένες που παράγουν γάλα, είτε στους αγωγούς (ducts) που μεταφέρουν το γάλα από τους λοβίους στην θηλή (ρώγα). Λιγότερα συχνά, ο καρκίνος του μαστού μπορεί να αρχίσει στους ιστούς που περιλαμβάνουν τους λιπαρούς και ινώδης συνδετικούς ιστούς του μαστού. Με τον καιρό, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εισβάλλουν στους γύρω υγιείς ιστούς του μαστού και να φτάσουν στους underarm λεμφαδένες (lymph nodes), μικρά όργανα που φιλτράρουν τις ξένες ουσίες στο σώμα. Αν τα καρκινικά κύτταρα φτάσουν στους λεμφαδένες, στη συνέχεια φτάνουν και σε άλλα μέρη του σώματος.

Το στάδιο του καρκίνου του μαστού αναφέρεται σε ποιο βαθμό τα καρκινικά κύτταρα έχουν εξαπλωθεί πέραν του αρχικού όγκου. Ο καρκίνος όπως προαναφέραμε προκαλείται από βλάβη του DNA (δηλαδή, μεταλλάξεις) σε γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Ορισμένες μεταλλάξεις έχουν κληρονομηθεί, άλλες προκαλούνται από την έκθεση σε ακτινοβολία ή σε χημικές ουσίες, όπως αυτές που βρέθηκαν στον καπνό των τσιγάρων. Μεταλλάξεις επίσης μπορεί να προκύψουν αυθόρμητα ως αποτέλεσμα των λαθών που γίνονται όταν ένα κύτταρο αντιγράφει τα μόρια του DNA πριν από την κυτταρική διαίρεση. Αργότερα, περισσότερες μεταλλάξεις σε αυτά τα ήδη μεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν να οδηγήσουν σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και την εμφάνιση του καρκίνου. Ο καρκίνος του μαστού προκαλείται πάντα από μια γενετική ανωμαλία (ως "σφάλμα"

στο γενετικό υλικό). Ωστόσο, μόνο το 5-10% των καρκίνων οφείλονται σε μια ανωμαλία που κληρονομήθηκε από τη μητέρα ή τον πατέρα. Περίπου το 90% των καρκίνων του μαστού οφείλονται σε γενετικές ανωμαλίες που συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της διαδικασίας γήρανσης και της "φυσικής φθοράς" της ζωής γενικότερα.

1.2.1 Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο του μαστού [6],[18]

Χάρη στις πολυάριθμες δημοσιεύσεις σε εφημερίδες, περιοδικά, συζητήσεις στην τηλεόραση και το ραδιόφωνο, πολλές γυναίκες γνωρίζουν την ύπαρξη του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού των γυναικών δεν έχει επίγνωση των βασικών αρχών που αφορούν τον καρκίνο του μαστού: πόσο συχνά και για ποιο λόγο προκύπτει, ποια είναι τα πρώιμα σημάδια και συμπτώματα του, τι θεραπείες εφαρμόζονται και το πόσο καλά λειτουργούν. Πολλές διαφορετικές μορφές του καρκίνου του μαστού (περισσότερες από 30) μπορούν να εκδηλωθούν στο ήμισυ του γυναικείου πληθυσμού. Ευτυχώς, η συντριπτική πλειοψηφία τους είναι καλοήθεις και δεν θέτουν σε κίνδυνο την υγεία. Οι κακοήθεις όγκοι του καρκίνου του μαστού είναι δέκα φορές λιγότεροι, αλλά εξακολουθούν να είναι η κύρια μορφή καρκίνου στην παθολογία για γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών. Αρκεί να αναφέρουμε ότι στον κόσμο κάθε χρόνο περισσότερες από 1 εκατομμύριο νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού εκδηλώνονται σε γυναίκες και μάλιστα μια στις 8 γυναίκες στις Η.Π.Α πάσχει από αυτήν την μορφή καρκίνου.

Οι επιδημιολογικοί παράγοντες κινδύνου για μία ασθένεια μπορεί να προσφέρουν σημαντικά στοιχεία ως προς την αιτιολογία της ασθένειας. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού διαφέρει σημαντικά σε όλο τον κόσμο, συγκεκριμένα είναι χαμηλότερη στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες και μεγαλύτερη στις πιο αναπτυγμένες χώρες. Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να χτυπήσει σε οποιαδήποτε ηλικία, αλλά μόνο το 5% όλων των καρκίνων του μαστού εμφανίζονται σε γυναίκες κάτω των 40 ετών [20]. Κάποια στατιστικά στοιχεία που έχουν δημοσιευθεί και αφορούν τον καρκίνο του μαστού είναι τα εξής :

- Η συχνότητα του καρκίνου του μαστού σε γυναίκες στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι 1 προς 8 (13%).
- Το 2008, εκτιμάται ότι περίπου 182.460 νέες περιπτώσεις επιθετικού καρκίνου του μαστού έχουν διαγνωσθεί σε γυναίκες στις ΗΠΑ, μαζί με 67.770 νέες περιπτώσεις μη επιθετικού (in situ) καρκίνου του μαστού.
- Περίπου 1.990 νέες περιπτώσεις επιθετικού καρκίνου του μαστού έχουν διαγνωσθεί σε άνδρες το 2008. Λιγότερο από το 1% όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου του μαστού εμφανίζονται σε άνδρες.
- Από το 2001 έως το 2004, τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του μαστού στις ΗΠΑ μειώθηκαν κατά 3,5% ανά έτος. Μια θεωρία είναι ότι η μείωση αυτή οφείλεται στη μειωμένη χρησιμοποίηση της θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης (HRT) σε γυναίκες μετά τα αποτελέσματα μιας μεγάλης μελέτης, που ονομάζεται Πρωτοβουλία Γυναικών Υγείας και δημοσιεύθηκε το 2002. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την σύνδεση μεταξύ HRT και της

αύξησης του κινδύνου καρκίνου του μαστού.

- Περίπου 40.480 γυναίκες στις ΗΠΑ πιστεύεται ότι έχουν πεθάνει το 2008 από καρκίνο του μαστού, αν και τα ποσοστά θανάτου παρουσιάζουν μείωση από το 1990. Αυτές οι μειώσεις είναι αποτέλεσμα των επιτευγμάτων στην θεραπεία, της έγκαιρης διάγνωσης και της αύξησης της ευαισθητοποίησης.
- Για τις γυναίκες, τα ποσοστά θανάτου από καρκίνο του μαστού είναι υψηλότερα από εκείνα για οποιονδήποτε άλλο καρκίνο μετά τον καρκίνο του πνεύμονα.
- Εκτός από τον καρκίνο του δέρματος, ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνά διαγνωσμένη μορφή καρκίνου μεταξύ των γυναικών στις ΗΠΑ. Περισσότεροι από 1 στους 4 καρκίνους είναι καρκίνος του μαστού.
- Σε σύγκριση με τις αμερικανοαφρικανές γυναίκες, οι λευκές γυναίκες έχουν ελαφρώς περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού, αλλά είναι λιγότερο πιθανό να πεθάνουν από αυτό. Μια πιθανή αιτία είναι ότι αυτές οι γυναίκες τείνουν να έχουν πιο επιθετικούς όγκους αν και ο λόγος δεν είναι γνωστός. Οι γυναίκες των άλλων εθνοτήτων - Ασίας, Ισπανίας και ντόπιες αμερικανίδες- εμφανίζουν μικρότερο κίνδυνο να αναπτύξουν και να πεθαίνουν από καρκίνο του μαστού από τις λευκές και τις αμερικανοαφρικανές γυναίκες.
- Μέχρι το 2008, υπάρχουν περίπου 2,5 εκατομμύρια γυναίκες στις ΗΠΑ, που έχουν επιβιώσει από καρκίνο του μαστού.
- Ο κίνδυνος μια γυναίκα να εμφανίσει καρκίνο του μαστού σχεδόν διπλασιάζεται εάν έχει μια πρώτου βαθμού (μητέρα, αδελφή, την κόρη) συγγένεια με κάποια που έχει διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού. Περίπου 20-30% των γυναικών που πάσχουν από καρκίνο του μαστού έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού.
- Σχετικά 5-10% των καρκίνων του μαστού οφείλονται σε γονιδιακές μεταλλάξεις που κληρονομήθηκαν από μια μητέρα ή πατέρα. Μεταλλάξεις στα BRCA1 και BRCA2 γονίδια είναι οι πιο κοινές. Γυναίκες με αυτές τις μεταλλάξεις έχουν πάνω από 80% κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού κατά τη διάρκεια της ζωής τους, και συχνά έχουν διαγνωστεί σε νεαρή ηλικία (πριν από την ηλικία των 50). Η αύξηση του κινδύνου καρκίνου των ωοθηκών είναι επίσης συνδεδεμένη με τις εν λόγω γενετικές μεταλλάξεις. Οι άνδρες με μετάλλαξη γονιδίων BRCA1 έχουν 1% κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού μέχρι την ηλικία των 70 ετών και ένα 6% του κινδύνου, όταν έχουν μια μετάλλαξη BRCA2.
- Περίπου το 90% των καρκίνων του μαστού δεν οφείλεται στην κληρονομικότητα, αλλά σε γενετικές ανωμαλίες που συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της διαδικασίας γήρανσης και της ζωής εν γένει.

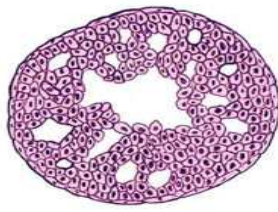
1.2.2 Μορφές του καρκίνου του μαστού

Οι γιατροί μετρούν τους καρκίνους σε εκατοστά (cm). Το μέγεθος του καρκίνου συμβάλλει στο να καθορίσει το στάδιο του. Το μέγεθος δεν λέει όλη την ιστορία. Η κατάσταση των λεμφαδένων είναι επίσης σημαντική. Ένας μικρός καρκίνος μπορεί να είναι πολύ fastgrowing. Ένας μεγαλύτερος καρκίνος μπορεί να είναι ένας "ήπιος γίγαντας". Το πιο σημαντικό γεγονός για τον καρκίνο του μαστού είναι αν έχει αυξηθεί πέρα από τους milk ducts or lobules αγωγούς του μαστού, όπου ξεκίνησε. Οι μη επιθετικοί καρκίνοι παραμένουν εντός των γαλακτοκομικών lobules ή αγωγών στο μαστό. Δεν αναπτύσσονται ή εισβάλλουν σε κανονικούς ιστούς εντός ή πέρα από το στήθος. Αυτοί μερικές φορές καλούνται επί τόπου (in-situ) ή προ-καρκίνος. Αν ο καρκίνος έχει αυξηθεί πέρα από όπου ξεκίνησε, λέγεται επιθετικός. Οι περισσότεροι καρκίνοι είναι επιθετικοί. Μερικές φορές, τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να εξαπλωθούν και σε άλλα μέρη του σώματος μέσω του αίματος ή του λεμφικού συστήματος. Παρακάτω φαίνεται η μορφή ενός κανονικού κυττάρου (εικόνα 1.8), ενός μη-επιθετικού (εικόνα 1.9) και ενός επιθετικού (εικόνα 1.10).

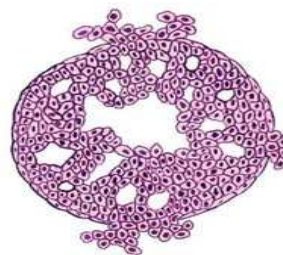
Normal Cells



Non-invasive Cells



Invasive Cells



Εικόνα 1.8 Κανονικά κύτταρα

Εικόνα 1.9 Μη-επιθετικά κύτταρα

Εικόνα 1.10 Επιθετικά κύτταρα

Οι μορφές του καρκίνου έχουν ως εξής :

➤ **DCIS (Ductal καρκίνωμα in situ)**

Αυτό είναι ένα καρκίνωμα που δεν είναι επιθετικό. Παραμένει μέσα στους αγωγούς (milk ducts).

➤ **LCIS (Lobular καρκίνωμα in situ)**

Πρόκειται για έναν όγκο που έχει μια υπερβολική αύξηση των κυττάρων που παραμένουν στο εσωτερικό μέρους του μαστού που παράγει το γάλα (που ονομάζεται lobules). LCIS δεν είναι ένας αληθινός καρκίνος. Είναι ένα προειδοποιητικό σημάδι για αυξημένο κίνδυνο επιθετικού καρκίνου στο μέλλον.

➤ **IDC (Επιθετικός Ductal Καρκίνος)**

Αυτός είναι ένα καρκίνος που αρχίζει στους γαλακτοκομικούς αγωγούς, αλλά αυξάνεται και στον γύρω φυσιολογικό ιστό στο εσωτερικό του στήθους. Αυτό είναι το πιο κοινό είδος του καρκίνου του μαστού.

➤ **ILC (Επιθετικός Lobular Καρκίνος)**

Αυτός είναι ένα καρκίνος που αρχίζει στο εσωτερικό μέρος του μαστού που παράγει το γάλα (που ονομάζεται lobules), αλλά αυξάνεται και γύρω φυσιολογικό ιστό μέσα το στήθος.

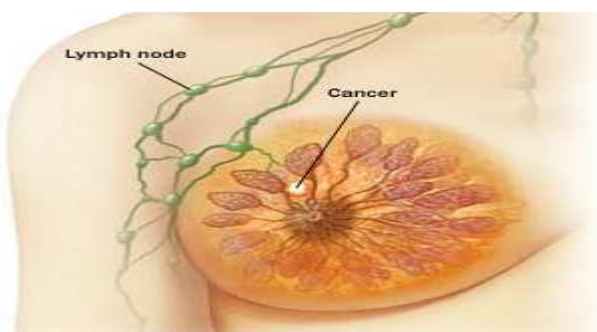
1.2.3 Στάδια του καρκίνου του μαστού [5],[17]

Το στάδιο του καρκίνου βασίζεται στο μέγεθος του όγκου, στο αν ο καρκίνος είναι επιθετικός ή μη, και αν έχει εξαπλωθεί πέρα από το στήθος. Το στάδιο του καρκίνου του μαστού αναφέρεται στο πόσο εκτεταμένος είναι ο καρκίνος, σε μια κλίμακα από το I έως το IV. Ο γιατρός καθορίζει το στάδιο του καρκίνου του μαστού μέσα από την εξέταση των αφαιρούμενων ιστών κατά τη διάρκεια μιας μαστεκτομής ή των μασχαλικών λεμφαδένων. Ο προσδιορισμός του σταδίου του καρκίνου από το γιατρό δίνει μια ιδέα για την πρόγνωση - το πιθανό αποτέλεσμα της νόσου - και βοηθά στις αποφάσεις θεραπείας. Έτσι έχουμε τα εξής στάδια του καρκίνου [17]:

• **Στάδιο I**

- ο Ο όγκος δεν είναι μεγαλύτερος από 2 cm (3 / 4 του) σε διάμετρο,
- ο Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί σε λεμφαδένες.
- ο Ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί εκτός των μαστών.

Πενταετές συνολικό ποσοστό επιβίωσης των γυναικών σε θεραπεία σε φάση I, είναι σχεδόν το 100 τοις εκατό.



Εικόνα 1.11 Καρκίνος του μαστού
στο στάδιο I.

• **Στάδιο II**

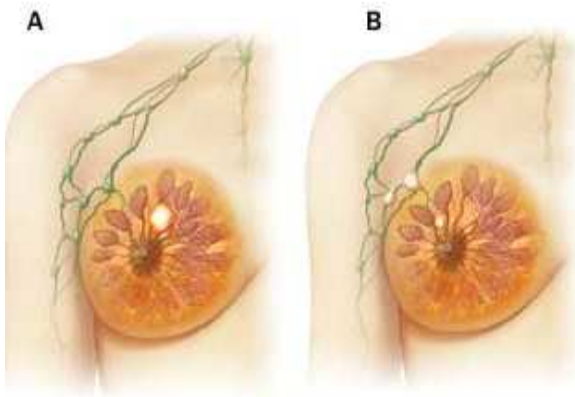
Ο καρκίνος του μαστού σε αυτό το στάδιο είναι μεγαλύτερος από εκείνον του σταδίου I αλλά δεν έχει εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα μέρη του σώματος. Εάν ένας καρκίνος είναι τέτοιου βαθμού τότε συμβαίνει κάποιο από τα παρακάτω:

- (a) Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 5 εκατοστά, αλλά δεν έχει εξαπλωθεί στους μασχαλικούς λεμφαδένες (εικόνα 1.12 A)
- (b) Ο όγκος μετρά 2 εκατοστά ή λιγότερο σε διάμετρο και έχει εξαπλωθεί σε όχι περισσότερους

από τρεις μασχαλικούς λεμφαδένες (εικόνα 1.12 B) ή

- (c) Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 2 εκατοστά, αλλά μικρότερος από 5 εκατοστά και μπορεί να έχει ή να μην έχει εξαπλωθεί στους μασχαλικούς λεμφαδένες.
- (d) Δεν έχει βρεθεί όγκος στο στήθος αλλά ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε λιγότερους από τρεις μασχαλικούς λεμφαδένες.

Το πενταετές συνολικό ποσοστό επιβίωσης των γυναικών σε θεραπεία για το στάδιο II είναι από 86 μέχρι 91 τοις εκατό.



Εικόνα 1.12

Καρκίνος του μαστού στο στάδιο II.

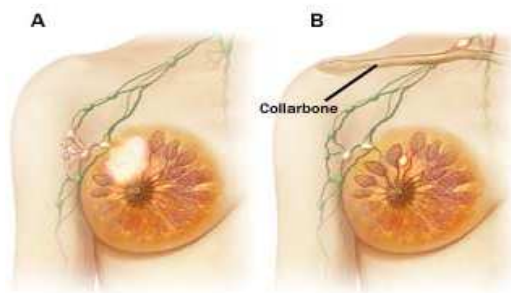
• Στάδιο III

Στο στάδιο αυτό ο όγκος μπορεί να έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες κοντά στο στήθος, δηλαδή σε αυτούς κάτω από την μασχάλη ή στο στήθος, αλλά όχι σε ποιο απόμακρα μέρη του σώματος. Εάν ένας καρκίνος είναι τέτοιου βαθμού τότε συμβαίνει κάποιο από τα παρακάτω:

- (a) Ο όγκος είναι 5 εκατοστά ή μικρότερος και έχει εξαπλωθεί σε γειτονικούς λεμφαδένες που αναπτύσσονται ο ένας πάνω στον άλλο ή σε γειτονικό ιστό (stroma) ή
- (b) Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 5 εκατοστά και τα καρκινικά κύτταρα έχουν εξαπλωθεί στους μασχαλικούς λεμφαδένες που συσσωματώνονται ή επικολλούν σε άλλες δομές αλλά δεν εμπλέκονται μεταξύ τους. (εικόνα 1.13 A)
- (c) Ο όγκος είναι μικρότερος από 5 εκατοστά και έχει εξαπλωθεί στους μασχαλικούς λεμφαδένες πάνω από το στήθος (collarbone). (εικόνα 1.13 B)

Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού (εικόνα 1.14) - στον οποίο ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε λεμφικά αγγεία στο δέρμα του μαστού, προκαλούν οίδημα, ερυθρότητα, και ραβδώσεις - ταξινομείται στο στάδιο III του καρκίνου του μαστού.

Το πενταετές συνολικό ποσοστό επιβίωσης των γυναικών σε θεραπεία για καρκίνο του μαστού σταδίου III είναι από 54 μέχρι 67%.



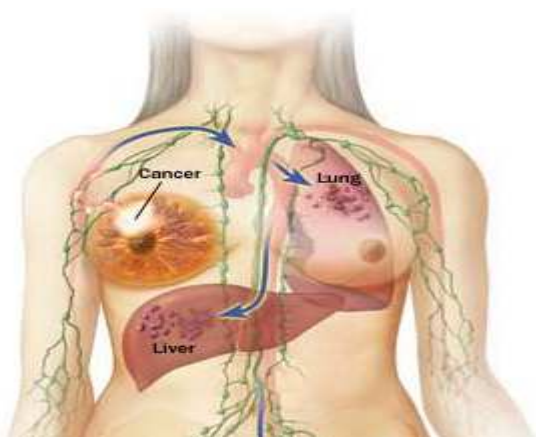
Εικόνα 1.13 Καρκίνος του μαστού στο στάδιο III.



Εικόνα 1.14 Φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού.

▪ Στάδιο IV

Η πιο προηγμένη μορφή του καρκίνου του μαστού. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν εξαπλωθεί σε απομακρυσμένα μέρη του σώματος, όπως τα οστά, τα όργανα ή λεμφαδένες μακριά από το στήθος (εικόνα 1.15). Η θεραπεία μπορεί να συρρικνώσει ή ελέγξει τον καρκίνο για λίγο, αλλά συνήθως δεν τον θεραπεύει πλήρως. Σε αυτό το στάδιο, ανακούφιση των συμπτωμάτων γίνεται κατά προτεραιότητα. Το πενταετές συνολικό ποσοστό επιβίωσης για τη φάση IV, είναι 20 τοις εκατό.



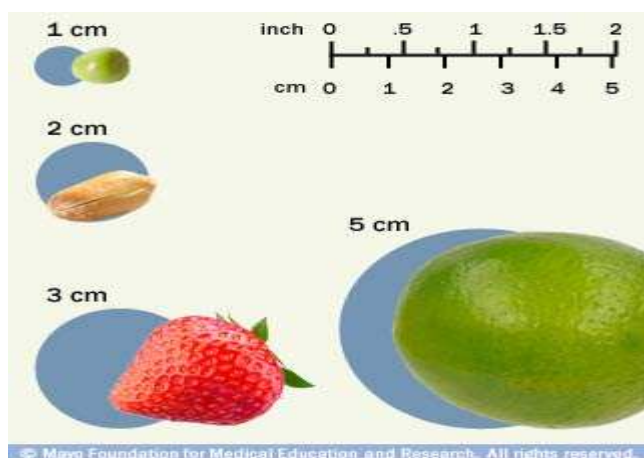
Εικόνα 1.15

Καρκίνος του μαστού στο στάδιο IV.

"Μεταστατικός στην παρουσίαση" ("Metastatic at presentation") σημαίνει ότι ο καρκίνος του μαστού έχει εξαπλωθεί πέρα από το στήθος και στους γύρω λεμφαδένες, έστω και αν αυτή είναι η πρώτη διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Ο λόγος για αυτό είναι ότι η πρωταρχική του καρκίνου του μαστού δεν βρέθηκε όταν ήταν μόνο στο εσωτερικό του μαστού. Μεταστατικός καρκίνος θεωρείται στο στάδιο IV.

Όσο μεγαλύτερο είναι το στάδιο, τόσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος ή τόσο περισσότερο έχει εξαπλωθεί ο καρκίνος. Κατά τα στάδια I και II, οι όγκοι δεν είναι γενικά περισσότερο από 2 εκατοστά (cm), ή περίπου 3 / 4 inches, σε διάμετρο – περίπου το μέγεθος ενός πυρήνα καλαμποκιού ή χωρίς

κέλυφος φυστίκι. Στα στάδια III και IV οι όγκοι τείνουν να είναι περισσότερο από 5 cm (2 in) σε διάμετρο – περίπου το μέγεθος ενός μικρού lime.(εικόνα 1.16)



Εικόνα 1.16 Τα μεγέθη του καρκίνου.

1.2.4 Έλεγχοι για τον εντοπισμό του καρκίνου του μαστού

Υπάρχει ένας ολόκληρος κόσμος ελέγχων που μπορούν να γίνουν προκειμένου να διαγνωστεί ο καρκίνος του μαστού. Αν και οι ιατρικές εξετάσεις μπορεί να είναι ψυχολογικά επώδυνες - ειδικά η αναμονή αποτελεσμάτων - έχουν ουσιώδη σημασία στη διατήρηση της υγείας του στήθους, την πρόληψη ή και θεραπεία αυτής της μορφής του καρκίνου. Οι περισσότεροι έλεγχοι που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού εμπίπτουν σε μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες κατηγορίες:

- Απεικονιστικοί έλεγχοι (screening tests) : τέτοιου είδους έλεγχοι (όπως ετήσιες μαστογραφίες) γίνονται συνήθως σε άτομα που φαίνονται υγιή και δεν υπάρχει υπόνοια ότι έχουν καρκίνο του μαστού. Σκοπός τους είναι να βρουν τον καρκίνο του μαστού νωρίς, πριν από οποιαδήποτε συμπτώματα έτσι ώστε να είναι πιο εύκολη η θεραπεία του.
- Διαγνωστικοί έλεγχοι (diagnostic tests): διαγνωστικές εξετάσεις (όπως βιοψία) γίνονται σε άτομα που είναι ύποπτα ότι έχουν καρκίνο του μαστού, είτε λόγω των συμπτωμάτων που μπορεί να εμφανίσουν ή είναι αποτέλεσμα κάποιου απεικονιστικού ελέγχου. Οι έλεγχοι αυτοί καθορίζουν αν είναι ή δεν είναι παρών ο καρκίνος καθώς και αν έχει κάνει μετάσταση σε άλλα μέρη του σώματος πέρα από τον μαστό. Οι δοκιμές αυτές επίσης χρησιμοποιούνται για τον προσανατολισμό των αποφάσεων σχετικά με τη θεραπεία.
- Έλεγχοι παρακολούθησης (monitoring tests): μόλις ο καρκίνος του μαστού διαγνωστεί, πολλοί έλεγχοι γίνονται κατά τη διάρκεια και μετά τη θεραπεία για να παρακολουθεί το πόσο καλά δουλεύουν οι θεραπείες. Τέτοιοι έλεγχοι μπορεί επίσης να γίνουν για τον εντοπισμό τυχόν σημα-διών επανεμφάνισης του καρκίνου.

Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης και η ψηλάφηση. Πρόκειται για μια φυσική εξέταση του μαστού , ένα εγχειρίδιο προσεκτικής εξέτασης, που μπορεί να γίνει από γιατρό ή από την ίδια τη γυναίκα..Η Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία συστήνει ότι οι γυναίκες μεταξύ 20 και 30 χρονών θα πρέπει να κάνουν μια φυσική εξέταση του μαστού, στο πλαίσιο της περιοδικής (τακτικής) εξέτασης της υγείας τους από γιατρούς κατά προτίμηση κάθε 3 χρόνια, ενώ μετά την ηλικία των 40 κάθε χρόνο.

1.2.4.1 Διαγνωστικές μέθοδοι για τον καρκίνο του μαστού

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι διαγνωστικών εξετάσεων, συμπεριλαμβανομένων των εξής:

- Βιοψία-μια πολύ μικρή εγχείρηση που αφαιρεί ιστό από μια περιοχή του σώματος. Τα κύτταρα από τον ιστό εξετάζονται στη συνέχεια με το μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί εάν καρκινικά κύτταρα είναι παρόντα.
- MRI (μαγνητική τομογραφία)-χρησιμοποιεί μαγνητικά πεδία, όχι ακτινοβολία, για να παράγει εικόνες του σώματος.Μια ένεση ειδικής ουσίας, το γαδολίνιο, χρησιμοποιείται για να καταστεί ευκολότερος ο εντοπισμός του καρκίνου. Το γαδολίνιο κάνει τον καρκίνο να "ανάβει" σε αντίθεση με τον γύρω από αυτόν φυσιολογικό ιστό.
- Ultrasound (υπερηχογράφημα)-στέλνει υψηλής συχνότητας ηχητικά κύματα μέσα στο στήθος και τα μετατρέπει σε εικόνες σε μια οθόνη προβολής. Το υπερηχογράφημα είναι ο καλύτερος τρόπος για να μάθουμε αν μια ανωμαλία είναι στερεά ή υγρά-γεμάτη.
- PET (τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων) σάρωση - μια μικρή ποσότητα ραδιενεργού ζακχάρου εγχέεται μέσα στο σώμα. Τα ενεργά κύτταρα αναλαμβάνουν το ραδιενεργό ζάχαρο, και αυτό βοηθά τους ακτινολόγους στον εντοπισμό περιοχών όπου βρίσκονται τα υπερδραστήρια κύτταρα, υποδεικνύοντας έτσι τον καρκίνο.
- Scintimammography(σπινθηρογράφος)-όπως σε ένα PET scan, μια μικρή ποσότητα ραδιενεργού υλικού εγχέεται στο σώμα. Τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού καταλαμβάνουν μικρό μέρος του ραδιενεργού υλικού, ενώ τα ενεργά κύτταρα καταλαμβάνουν περισσότερο υποδεικνύοντας τον καρκίνο.

1.2.5 Θεραπεία κατά του καρκίνου του μαστού [21]

Το υπόβαθρο της θεραπείας του καρκίνου του μαστού είναι η χειρουργική επέμβαση όταν ο όγκος είναι εντοπισμένος, ακολουθούμενη από τη χημειοθεραπεία (όταν ενδείκνυται), την ακτινοθεραπεία και την ορμονική θεραπεία για ER θετικών όγκων (με την ταμοξифαίνη ή τον αναστολέα της αρωματάσης). Ανάλογα με τα κλινικά κριτήρια (ηλικία, είδος του καρκίνου, μέγεθος, μετάσταση) οι ασθενείς χωρίζονται σε εκείνους του υψηλού κινδύνου και εκείνους του χαμηλού, με κάθε κατηγορία κινδύνου να ακολουθεί διαφορετικούς κανόνες για την θεραπεία.Οι θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν την ακτινοθεραπεία, την χημειοθεραπεία, την ορμονική θεραπεία και την ανοσοθεραπεία.

➤ ΕΠΕΜΒΑΣΗ

Ανάλογα με τον τύπο του όγκου, μόλις μια lumpectomy (αφαίρεση του λεμφαδένα μόνο) μπορεί να είναι ό,τι χρειάζεται ή η απομάκρυνση μεγαλύτερων ποσοτήτων των ιστών του μαστού μπορεί να είναι απαραίτητη. Η χειρουργική αφαίρεση ολόκληρου του μαστού καλείται μαστεκτομή.

➤ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ

Ακτινοθεραπεία είναι μια συνήθης θεραπεία για γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε μαστεκτομή ή lumpectomy . Σε αυτές τις περιπτώσεις, σκοπός της ακτινοβολίας είναι να μειώσει την πιθανότητα ο καρκίνος να επαναληφθεί. Η ακτινοθεραπεία συνεπάγεται τη χρήση-X υψηλής ενέργειας ακτίνων ή ακτίνων γάμμα με στόχο έναν όγκο ή την εστία όγκου μετά την χειρουργική επέμβαση. Η ακτινοβολία αυτή είναι πολύ αποτελεσματική στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων που μπορούν να παρέμειναν μετά από χειρουργική επέμβαση ή να επανεμφανίστηκαν όπου ο όγκος αφαιρέθηκε. Οι θεραπείες γίνονται συνήθως για μια περίοδο πέντε έως επτά εβδομάδων, εκτελούνται πέντε ημέρες την εβδομάδα. Κάθε θεραπεία διαρκεί περίπου 15 λεπτά. Παρόλο που η ακτινοθεραπεία μπορεί να μειώσει την πιθανότητα επανεμφάνισης του καρκίνου του μαστού, είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματική στην παράταση της επιβίωσης των ασθενών.

➤ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ [21]

Χημειοθεραπεία (φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου), μπορεί να χρησιμοποιηθεί πριν από τη χειρουργική επέμβαση, μετά από χειρουργική επέμβαση, ή αντί της χειρουργικής επέμβασης για εκείνες τις περιπτώσεις στις οποίες η χειρουργική επέμβαση θεωρείται ακατάλληλη. Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι της χημειοθεραπείας.

- Neoadjuvant chemotherapy: γίνεται πριν από την χειρουργική επέμβαση για να συρρικνωθεί το μέγεθος του όγκου.
- Adjuvant chemotherapy: γίνεται μετά από χειρουργική επέμβαση για να μειωθεί ο κίνδυνος επανεμφάνισης.
- Palliative chemotherapy: χρησιμοποιείται για τον έλεγχο (αλλά δεν θεραπεύει) του καρκίνου στις ρυθμίσεις, στις οποίες ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί πέρα από το στήθος και τους λεμφαδένες.

➤ ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ [22]

Ασθενείς με θετικό υποδοχέα οιστρογόνου όγκων λαμβάνουν συνήθως ορμονική θεραπεία μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας. Τυπικές ορμονικές θεραπείες περιλαμβάνουν:

- Ταμοξифίνη: δίνεται συνήθως σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες για την αναστολή της δράσης των οιστρογονικών υποδοχέων

- Αναστολείς της αρωματάσης: δίνονται συνήθως σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες για την μείωση της ποσότητας των οιστρογόνων στον οργανισμό τους.

1.2.5.1 Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία είναι μια συστηματική θεραπεία που βασίζεται στην χρήση φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου. Αυτό σημαίνει ότι επηρεάζει ολόκληρο το σώμα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Ο σκοπός της χημειοθεραπείας και άλλων συστηματικών θεραπειών είναι να απαλλαγούμε από κάθε καρκινικό κύτταρο που μπορεί να έχει εξαπλωθεί σε άλλο μέρος του σώματος μακριά από όπου άρχισε. Η χημειοθεραπεία είναι αποτελεσματική κατά των καρκινικών κυττάρων, καθώς τα φάρμακα τείνουν να αλληλεπιδρούν ταχέως με τα διαιρούμενα κύτταρα.

Πριν από την χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τη μείωση του μεγέθους του όγκου του μαστού όσο και για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων όπου και αν βρίσκονται. Μετά από χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία ενεργεί σε όλο το σύστημά μας για να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα που ενδέχεται να έχουν εξαπλωθεί σε όλο το σώμα μας. Όταν χρησιμοποιείται ως συστηματική θεραπεία μετά τη χειρουργική επέμβαση, η χημειοθεραπεία έχει ένα άλλο πλεονέκτημα, να είναι στο σωστό μέρος τη σωστή στιγμή.

Οι γιατροί χρησιμοποιούν πολλούς παράγοντες για να καθορίσουν σε ποια περίπτωση ασθενούς θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί η χημειοθεραπεία, η ορμονική (αντι-οιστρογόνου) θεραπεία, ή ο συνδυασμός και των δύο. Οι παράγοντες με βάση τους οποίους αποφασίζουν για αυτό είναι:

- Βασικά χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους του όγκου και της βαθμού, της κατάστασης των υποδοχέων της ορμόνης, του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων του όγκου, της έκφρασης ογκογονιδίου, και της συμμετοχής των λεμφαδένων.
- Ατομικό προφίλ των ασθενών (ηλικία, γενική υγεία, θέση του όγκου, εάν υπάρχει ή όχι διόγκωση των λεμφαδένων στο πλαίσιο του βραχίονα).
- Στάδιο της νόσου.
- Κατάσταση Εμμηνόπαυσης (αν είναι ακόμη σε εμμηνόρροια ή είχαν ήδη περάσει στην εμμηνόπαυση όταν ο καρκίνος διαγνώστηκε).
- Κινδύνος / όφελος της θεραπείας. Ο ογκολόγος θα σταθμίσει τους κινδύνους που αντιμετωπίζει η γυναίκα από τον καρκίνο σε σχέση με τα μακροπρόθεσμα οφέλη που θα μπορούσε να εξασφαλίσει από την χημειοθεραπεία ή την ορμονική (αντι-οιστρογόνου) θεραπεία, λαμβάνοντας υπόψη τις παρενέργειες της θεραπείας και τη γενική εικόνα της υγείας της.

Ο γιατρός αναλύσει τα στοιχεία από όλους αυτούς τους παράγοντες, και προτείνει διάφορες ευρέως αποδεκτές κατευθυντήριες γραμμές της θεραπείας.

- Η χημειοθεραπεία δεν συνιστάται για μη επιθετικό, in situ καρκίνο, όπου σχεδόν δεν υπάρχει κίνδυνος μετάστασης.
- Σε γενικές γραμμές, οι γιατροί έχουν την τάση να συστήνουν πιο επιθετική θεραπεία

σε γυναίκες με επιθετικής μορφής καρκίνο του μαστού που είναι στην προ-εμμηνόπαυση (ακόμη εμμηνόρροια). Ο καρκίνος του μαστού σε αυτές τις γυναίκες τείνει να είναι πιο επιθετικός, και η χημειοθεραπεία συνήθως απαιτείται προκειμένου να επιτευχθούν τα καλύτερα αποτελέσματα.

- Η χημειοθεραπεία συνιστάται σχεδόν πάντα, αν εμπλέκονται οι λεμφαδένες, ανεξάρτητα από το μέγεθος του όγκου ή την κατάσταση εμμηνόπαυσης.
- Η χημειοθεραπεία συνιστάται συνήθως για γυναίκες στην προ-εμμηνόπαυση, αν ο όγκος είναι επιθετικός, δεν έχει εξαπλωθεί στους λεμφαδένες, και είναι ένα εκατοστό ή περισσότερο σε μέγεθος. Με αυτούς τους παράγοντες παρόντες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η χημειοθεραπεία θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη.
- Η χημειοθεραπεία μπορεί να συνιστάται στις γυναίκες (κυρίως γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση), οι οποίες διαθέτουν έναν συνδυασμό ευνοϊκών και λιγότερο ευνοϊκές χαρακτηριστικών καρκίνου-για παράδειγμα, εάν ο όγκος είναι επιθετικός, περιορίζεται στο στήθος, είναι μικρότερος από ένα εκατοστό, αλλά έχει μία ή περισσότερα δυσμενή “προσωπικά χαρακτηριστικά”.

Ο «κύκλος» της χημειοθεραπείας αναφέρεται σε ένα χρόνο ή ένα «γύρο», στο οποίο ο γιατρός δίνει το φάρμακο. Ανάλογα με το φάρμακο (ή ναρκωτικό) που λαμβάνετε μπορεί να προκύψουν τέσσερις με οκτώ κύκλοι χημειοθεραπείας. Κάποιες από τις αρνητικές επιπτώσεις της χημειοθεραπείας είναι: ναυτία, εμετός, διάρροια, απώλεια μαλλιών, κόπωση, αναιμία, απώλεια μνήμης, νευροπάθεια κτλ.

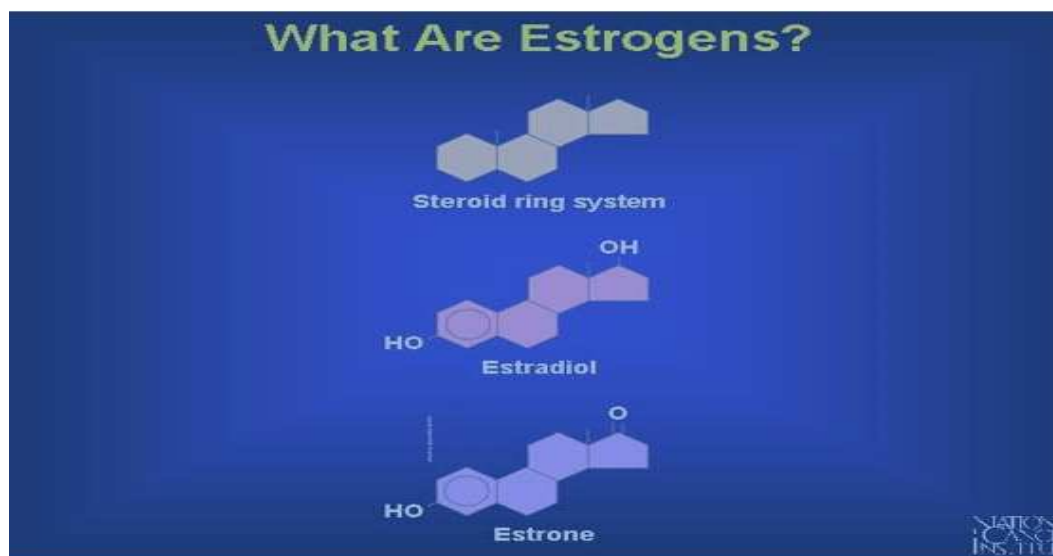
Η Ορμονική θεραπεία σε συνδυασμό με την χημειοθεραπεία ενδύκνεται όταν:

- Ορμονική (αντι-οιστρογόνου) θεραπεία θα πρέπει να εφαρμοστεί σε κάθε προεμμηνοπαυσιακή γυναίκα της οποίας ο καρκίνος είναι υποδοχέας οιστρογόνου-θετικός. Οι αποφάσεις σχετικά με τη χημειοθεραπεία και την ορμονική θεραπεία είναι συντονισμένες.
- Η χημειοθεραπεία σε συνδυασμό με την ορμονική θεραπεία μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του κινδύνου επανεμφάνισης για ορισμένους καρκίνους θετικούς σε υποδοχείς οιστρογόνου που έχουν επίσης δυσμενή χαρακτηριστικά.
- Οι γυναίκες με υποδοχέα οιστρογόνων -αρνητικό (οι όγκοι δεν χρειάζονται οιστρογόνα για να αυξηθούν) θα είχαν τα ίδια αποτελέσματα αν έκαναν μόνο χημειοθεραπεία ή και ορμονική θεραπεία ταυτόχρονα.
- Η ορμονική θεραπεία συνιστάται σε σχεδόν όλες τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με υποδοχείς οιστρογόνου-θετικό ή υποδοχείς προγεστερόνης-θετικό σε καρκίνο του μαστού.
- Πολλές γυναίκες μπορούν να κάνουν χημειοθεραπεία και ορμονική θεραπεία ανεξάρτητα από την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση στην οποία βρίσκονται.

1.3 Οιστρογόνα και οιστρογονικοί υποδοχείς [7]

1.3.1 Τι είναι τα οιστρογόνα

Τα "Οιστρογόνα" είναι μια οικογένεια μορίων που σχετίζονται με την ενίσχυση της ανάπτυξης και της συντήρησης των θηλυκών χαρακτηριστικών και της σεξουαλικής αναπαραγωγής. Είναι μια ομάδα ορμονών που βρέθηκαν σε άντρες και γυναίκες. Τα φυσικά οιστρογόνα που παράγονται από τις γυναίκες είναι στεροειδή μόρια, πράγμα που σημαίνει ότι έχουν προέλθει από έναν συγκεκριμένο τύπο μοριακού σκελετού με τέσσερα δαχτυλίδια ατόμων άνθρακα, δίνοντας το σχήμα που εμφανίζονται παρακάτω (εικόνα 1.17). Οι πιο συνηθισμένες μορφές ανθρώπινων οιστρογόνων είναι η εστρόνη (estrone) και η εστραδιόλη (estradiol). Και τα δύο είναι που παράγονται και εκκρίνονται από τις ωοθήκες, αν και η εστρόνη παράγεται επίσης από τα επινεφρίδια και άλλα όργανα. Τα οιστρογόνα είναι ορμόνες, πράγμα που σημαίνει ότι λειτουργούν ως σηματοδότες μορίων. Ένα τέτοιο μόριο ασκεί τις δράσεις του στο ταξίδι μέσω του αίματος και αλληλεπιδρά με τα κύτταρα σε μια σειρά από ιστούς-στόχους. Το στήθος και η μήτρα, τα οποία διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη σεξουαλική αναπαραγωγή, είναι δύο από τους κύριους στόχους των οιστρογόνων. Επιπλέον, τα οιστρογονικά μόρια ενεργούν στον εγκέφαλο, τα οστά, το ήπαρ και την καρδιά.

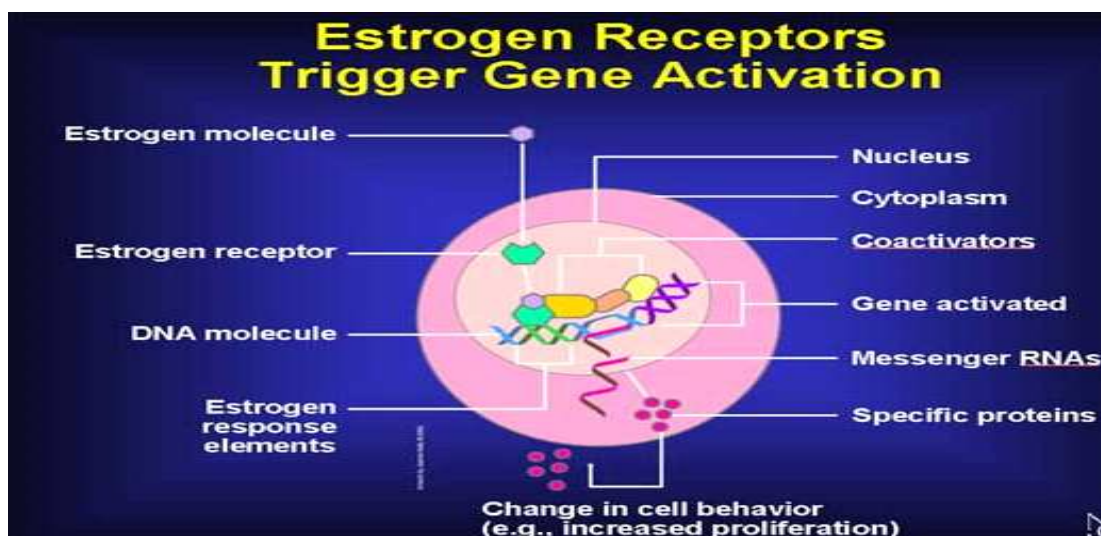


Εικόνα 1.17 Μοριακός σκελετός των οιστρογόνων.

1.3.2 Οιστρογονικοί υποδοχείς

Τα οιστρογόνα ενεργούν στους ιστούς-στόχους δεσμεύοντας μέρη των κυττάρων που καλούνται υποδοχείς οιστρογόνων. Ένας υποδοχέας οιστρογόνου είναι ένα μόριο πρωτεΐνης που βρίσκεται στο εσωτερικό αυτών των κυττάρων που είναι στόχοι της οιστρογονικής δράσης. Οι υποδοχείς οιστρογόνων περιλαμβάνουν μια ειδική θέση στην οποία μόνο οιστρογόνα (ή στενά σχετικά με αυτά μόρια) μπορούν να δεσμευτούν. Οι ιστοί-στόχοι που επηρεάζονται από τα οιστρογονικά μόρια περιέχουν υποδοχείς οιστρογόνων, άλλοι ιστοί και όργανα του σώματος δεν το κάνουν. Ως εκ τούτου,

όταν τα οιστρογονικά μόρια κυκλοφορούν στο αίμα και κινούνται σε ολόκληρο το σώμα, ασκούν επίδραση μόνο σε κύτταρα που περιέχουν υποδοχείς οιστρογόνων. Ο οιστρογονικός υποδοχέας (ER) είναι ένας ρυθμιστής της κυτταρικής ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης. Εκτός από την προγνωστική αξία του, ο ER είναι ο πιο σημαντικός βιολογικός σηματοδότης της θεραπευτικής απάντησης για τον καρκίνο του μαστού. Οι υποδοχείς οιστρογόνων διαμένουν στο πυρήνα του κυττάρου μαζί με τα μόρια του DNA. Σε περίπτωση έλλειψης των οιστρογονικών μορίων, οι εν λόγω υποδοχείς οιστρογόνων είναι ανενεργοί και δεν έχουν επιρροή στο DNA (το οποίο περιέχει τα γονίδια του κυττάρου). Αλλά όταν ένα οιστρογονικό μόριο εισέλθει σε ένα κύτταρο και περάσει στο πυρήνα αυτού, το οιστρογόνο συνδέεται με τον υποδοχέα του, προκαλώντας αλλαγή στο σχήμα του υποδοχέα. Αυτό το οιστρογόνο-υποδοχέας στη συνέχεια συνδέεται σε μια συγκεκριμένη θέση του DNA, που ονομάζεται **estrogen response elements** και βρίσκεται κοντά σε γονίδια που ελέγχονται από τα οιστρογόνα. Αφού έχει προσαρτηθεί σε αυτήν την θέση του DNA (estrogen response elements), αυτό το οιστρογόνο-υποδοχέας συνδέεται με **coactivator** πρωτεΐνες και τα πιο κοντινά γονίδια γίνονται ενεργά. Τα ενεργά αυτά γονίδια παράγουν μόρια του **messenger RNA**, τα οποία καθοδηγούν τη σύνθεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των κυττάρων με διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με το είδος των κυττάρων που εμπλέκονται. Έχει ειπωθεί ότι η μοριακή ποικιλομορφία του ER αντικατοπτρίζει τη βιολογική ποικιλομορφία του καρκίνου του μαστού με την οποία όλοι οι παθολόγοι και ογκολόγοι είναι εξοικειωμένοι. Για δύο δεκαετίες πίστευαν ότι οι υποδοχείς στεροειδών πρωτεϊνών βρίσκονταν στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων. Ωστόσο, το 1984 εμφανίστηκαν δύο άρθρα που αμφέβαλλαν για αυτήν την τοποθεσία τους και προσδιόριζαν ότι το περισσότερο από τον υποδοχέα βρίσκεται στον πυρήνα με λίγο ή καθόλου στο κυτταρόπλασμα. Στην εικόνα 1.18 φαίνεται οπτικά όλη η παραπάνω διαδικασία.



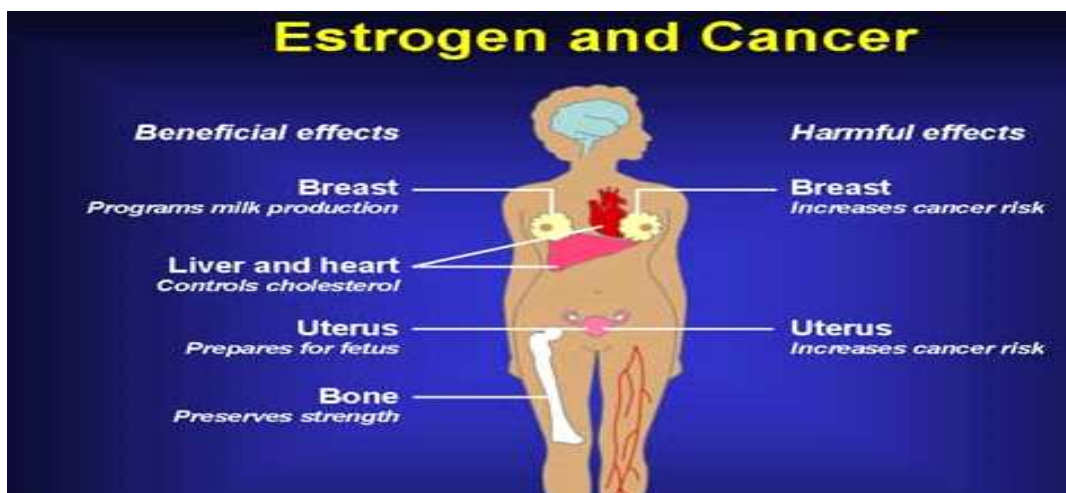
Εικόνα 1.18 Τα βήματα γονιδιακής ενεργοποίησης κατά την δέσμευση του οιστρογόνου από τον αντίστοιχο υποδοχέα του.

1.3.3 Οι ευεργετικές και επιβλαβείς επιδράσεις των οιστρογόνων

Παραδόξως, το οιστρογόνο μπορεί να είναι ταυτόχρονα ευεργετικό και επιβλαβές μόριο. Η κύρια ευεργετική επίδραση των οιστρογόνων περιλαμβάνει :

- προγραμματισμό του μαστού και της μήτρας για σεξουαλική αναπαραγωγή,
- έλεγχο της παραγωγής της χοληστερόλης με τρόπο που περιορίζει την συσσώρευση της πλάκας στις στεφανιαίες αρτηρίες,
- διατήρηση της οστικής δύναμης, βοηθώντας να διατηρηθεί η σωστή ισορροπία μεταξύ της δημιουργίας και βλάβης των οστών.

Δυστυχώς, εκτός από αυτά τα σημαντικά ευεργετικά αποτελέσματα, το οιστρογόνο μπορεί επίσης να είναι επιβλαβές. Το σοβαρότερο πρόβλημα ανακύπτει από την ικανότητα του οιστρογόνου να προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στο μαστό και τη μήτρα. Αν και αυτή η ικανότητά του να προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων είναι ένας από τους κανονικούς ρόλους του οιστρογόνου, μπορεί επίσης να αυξήσει τις πιθανότητες σε μια γυναίκα για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού ή της μήτρας. Στην εικόνα 1.19 συνοψίζονται οι θετικές και αρνητικές επιπτώσεις που προκαλεί το οιστρογόνο.



Εικόνα 1.19 Οι θετικές και αρνητικές επιδράσεις του οιστρογόνου.

1.3.4 Οιστρογόνο και καρκίνος του μαστού

Κατά τη διάρκεια της εμμηνόρροιας, το οιστρογόνο φυσιολογικά προκαλεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που διαμορφώνουν τους αδένες παραγωγής γάλατος από το στήθος. Αν δεν προκύψει εγκυμοσύνη, τα επίπεδα οιστρογόνων πέφτουν δραματικά στο τέλος κάθε μηνιαίου κύκλου της εμμηνόρροιας. Κατά την απουσία υψηλών επιπέδων οιστρογόνων, τα κύτταρα των αδένων που έχουν πολλαπλασιασθεί κατά τη διάρκεια ενός μηνός θα επιδεινωθούν και θα πεθάνουν, ακολουθούμενα από ένα παρόμοιο κύκλο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και θάνατο των κυττάρων τον επόμενο μήνα.

Για τη μέση γυναίκα, αυτό σημαίνει εκατοντάδες κύκλων από διαίρεση των κυττάρων του μαστού και κυτταρικό θάνατο επαναλαμβανόμενο επί ενός διαστήματος περίπου 40 χρόνων, από την εφηβεία μέχρι την εμμηνόπαυση. Αλλά πώς αυτοί οι υποκινούμενοι από τα οιστρογόνα κύκλοι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του μαστού αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου;

Ακόμη και σε γυναίκες που δεν έχουν κανένα μεταλλαγμένο κύτταρο μαστού, ο υποκινούμενος από το οιστρογόνο πολλαπλασιασμός των κανονικών κυττάρων του στήθους μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου. Αυτό οφείλεται στο DNA. Ένα κύτταρο θα πρέπει να αντιγράψει τα μόρια του DNA πριν από κάθε κυτταρική διαίρεση, εξασφαλίζοντας έτσι ότι τα δυο νέα κύτταρα που προκύπτουν από την διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης κάθε ένα εμφανίζει ένα πλήρες σύνολο των μορίων DNA. Αλλά η διαδικασία της αντιγραφής του DNA, κατά καιρούς κάνει λάθη, οπότε προκύπτει το αντίγραφο του DNA που μπορεί να περιέχει ένα μικρό αριθμό λαθών (δηλαδή, μεταλλάξεις). Αν μία από αυτές τις αυθόρμητες μεταλλάξεις εμφανίζεται σε ένα γονίδιο που ελέγχει την κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη, τότε θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου. Ο πολλαπλασιασμός των φυσιολογικών κυττάρων από την έκθεση στα οιστρογόνα δημιουργεί μια ευπάθεια σε αυθόρμητες μεταλλάξεις, ορισμένες από τις οποίες μπορεί να αποτελέσουν ένα πρώτο βήμα στην πορεία προς καρκίνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : Αλληλεπίδραση φωτός και ιστού

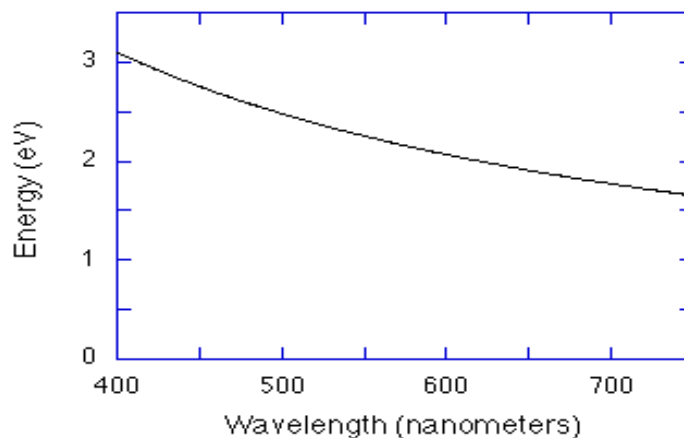
2.1 Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

Ο κόσμος όλος βομβαρδίζεται καθημερινά από ενέργεια σε μορφή ακτινοβολίας που ονομάζεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Ένα μέρος αυτής είναι το ορατό φως. Όμως το μεγαλύτερο μέρος της είναι αόρατο όπως οι ακτίνες X, η υπεριώδης ακτινοβολία, τα μικροκύματα κ.τ.λ. Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία παρουσιάζει δυική φύση δηλαδή κυματικά και σωματιδιακά χαρακτηριστικά ταυτόχρονα. Η βασική μονάδα ("quantum") της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, που συνήθως ονομάζονται γ, είναι το **φωτόνιο**. Σύμφωνα με την θεωρία του φωτός, **φωτόνιο** είναι ένα ξεχωριστό πακέτο (*quantum*) ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας. Τα φωτόνια είναι πάντα σε κίνηση ακόμη και στο κενό και έχουν μια σταθερή ταχύτητα φωτός για όλους τους παρατηρητές. Στο κενό η ταχύτητα αυτή είναι ίση με $c = 2.998 \times 10^8$ m/s. Τα φωτόνια για πρώτη φορά προσδιορίστηκαν από τον Planck του οποίου οι μετρήσεις για το φάσμα blackbody έδειξαν ότι η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία έπρεπε να έρθει σε διακριτές μονάδες, οι οποίες είχαν βαπτιστεί "φωτόνια" από τον χημικό Lewis Gilbert το 1926. Ένα από τα αποτελέσματα της δυαδικότητας που παρουσιάζει το φως σώμα-κύμα είναι ότι τα φωτόνια αν και αντιμετωπίζονται ως σωματίδια μπορούν να έχουν συχνότητα, μήκος κύματος, πλάτος και άλλες ιδιότητες της μηχανικής κύματος. Το φωτόνιο είναι ένα στοιχειώδες σωματίδιο αν και δεν έχει μάζα. Δεν μπορεί να καταστραφεί από μόνο του αν και η ενέργεια του μπορεί να μεταφερθεί (ή δημιουργηθεί) κατά την αλληλεπίδραση του με άλλα σωματίδια. Το φωτόνιο είναι ηλεκτρικά ουδέτερο και είναι ένα από τα σπάνια σωματίδια που είναι ακριβώς ίδιο με το αντισωματίδιο (antiphoton). Τα φωτόνια είναι σωματίδια με spin-1 με την περιστροφή του άξονα τους να είναι παράλληλη προς την κατεύθυνση κίνησης τους. Αυτή η δυνατότητα είναι που επιτρέπει την πόλωση του φωτός. Κάθε φωτόνιο έχει ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και μια πολύ συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας. Τα φωτόνια παράγονται ή απορροφώνται όταν ηλεκτρόνια κινούνται μεταξύ διαφορετικών επιπέδων ενέργειας στα άτομα.

Η ενέργεια ενός φωτονίου συχνότητας ν δίνεται από τον τύπο

$$E = h\nu = hc / \lambda$$

όπου h είναι η σταθερά του Planck ($h = 6.626 \times 10^{-34}$ J s), c η ταχύτητα του φωτός, ν η συχνότητα και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Η καμπύλη δείχνει τη σχέση, E (eV) = $1.240 / \lambda$ (nm) που παρουσιάζεται για την ενέργεια σε eV έναντι φωτονίου μήκους κύματος σε νανόμετρα για την ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (εικόνα 2.1).



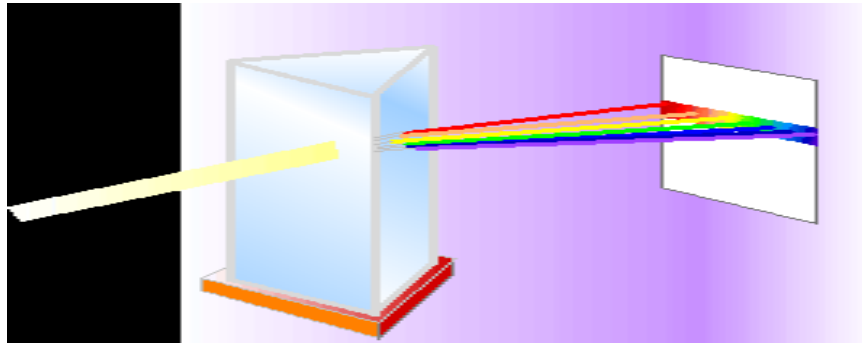
Εικόνα 2.1 Η καμπύλη δείχνει τη σχέση, $E \text{ (eV)} = 1.240 / \lambda \text{ (nm)}$.

Επειδή η ενέργεια των φωτονίων είναι ευθέως ανάλογη με τη συχνότητα, τα χαμηλής ενέργειας φωτόνια έχουν χαμηλές συχνότητες, ενώ τα υψηλής ενέργειας έχουν υψηλές συχνότητες. Τα φωτόνια χαμηλής ενέργειας ονομάζονται ραδιοκύματα ή μικροκύματα, τα μεσαίας ενέργειας (κύματα φωτός, ή ορατό φως) τα φωτόνια υψηλής ενέργειας ονομάζονται ακτίνες X, ενώ εκείνα που έχουν ακόμη μεγαλύτερη ενέργεια ονομάζονται ακτίνες γάμμα.

2.2 Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Με τον όρο **φάσμα** εννοούμε την κατανομή της έντασης του φωτός κατά μήκος κύματος. Ένα φάσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να λάβουμε πληροφορίες σχετικά με την ατομική ενέργεια, το μοριακό επίπεδο, τη μοριακή γεωμετρία, τους χημικούς δεσμούς, τις αλληλεπιδράσεις των μορίων και σχετικές διαδικασίες. Χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των στοιχείων που συνιστούν ένα δείγμα (ποιοτική ανάλυση) καθώς και για την μέτρηση της ποσότητας των υλικών σε ένα δείγμα (ποσοτική ανάλυση).

Περνώντας το ηλιακό φως μέσα από ένα γυάλινο πρίσμα, ο μεγάλος Sir Isaac Newton πρώτα απέδειξε ότι το "λευκό" φως αποτελείται από μια ποικιλία χρωμάτων του φωτός. Τα χρώματα αντιστοιχούν σε διαφορετικά μήκη κύματος του φωτός. Όσο περνά μέσα από το πρίσμα, τα μήκη κύματος του φωτός κάμπτονται (λυγίζουν). Αυτά, έρχονται σε μια ελαφρώς διαφορετική κατεύθυνση από αυτήν της αρχικής ακτίνας που εισήλθε στο πρίσμα. Τα μεγαλύτερα μήκη κύματος του κόκκινου φωτός κάμπτονται λιγότερο από τα μικρότερα μήκη κύματος του μπλε φωτός. Κόκκινο, μπλε και άλλα μήκη κύματος του φωτός που συνδυάζονται μαζί διαμορφώνουν το λευκό φως. Ωστόσο, όταν διέρχεται από ένα πρίσμα, οι διαφορετικές κατευθύνσεις του φωτός διαχωρίζουν τα χρώματα για το σχηματισμό του φάσματος (εικόνα 2.2).



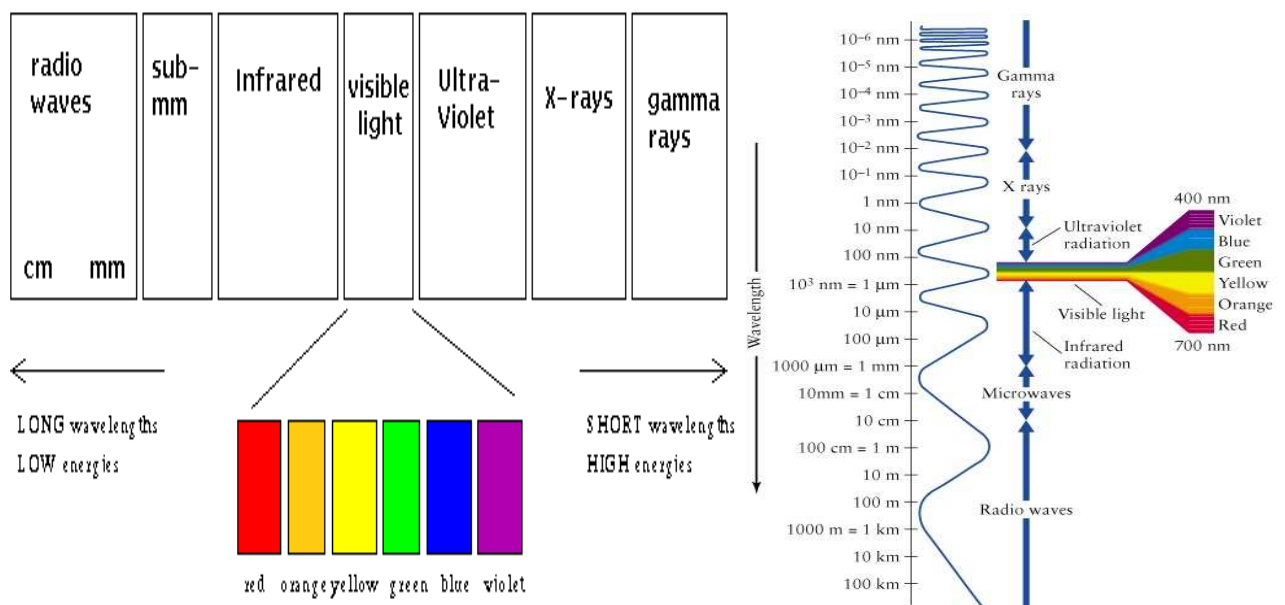
Εικόνα 2.2 Το λευκό φως διέρχεται μέσα από το πρίσμα και αναλύεται στα χρώματα του.

Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα είναι το εύρος όλων των πιθανών συχνοτήτων μιας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Το "ηλεκτρομαγνητικό φάσμα" (συνήθως μόνο φάσμα) ενός αντικειμένου είναι η χαρακτηριστική κατανομή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από το συγκεκριμένο αντικείμενο (εικόνα 2.3 και 2.4). Για λόγους ευκολίας διαιρούμε το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα σε φασματικές περιοχές, οι οποίες λόγω των διαφορετικών ενεργειών αλληλεπιδρούν με την ύλη πολύ διαφορετικά. Έτσι εκτείνεται κάτω από τις συχνότητες που χρησιμοποιούνται για το σύγχρονο ραδιόφωνο (στο τέλος του μεγάλου μήκους κύματος), την γάμμα ακτινοβολία (στο τέλος του μικρού μήκους κύματος), καλύπτοντας μήκη κύματος από χιλιάδες χιλιόμετρα σε ένα κλάσμα του μεγέθους ενός ατόμου. Εικάζεται ότι το όριο του σύντομου μήκους κύματος είναι κοντά με το μήκος Planck, και το όριο του μεγάλου μήκους κύματος κοντά με το μέγεθος του σύμπαντος αν και καταρχήν το φάσμα είναι απέραντο και συνεχές. Παρακάτω δίδονται οι διάφοροι τύποι ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (από χαμηλότερη προς υψηλότερη ενέργεια) [8]:



- **Ραδιοκύματα:** είναι το είδος της ενέργειας που εκπέμπουν οι ραδιοσταθμοί. Ραδιοκύματα εκπέμπονται επίσης και από άλλα σώματα, όπως αστέρες και αέρια στο διάστημα (όπου και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της σύστασης των αντικειμένων αυτών). Παράγονται από φορτισμένα σωματίδια που κινούνται μπρος-πίσω. Η ατμόσφαιρα είναι διάφανη στα ραδιοκύματα με μήκη από λίγα mm σε περίπου 20 m.
- **Μικροκύματα:** χρησιμοποιούνται από τους αστρονόμους για τον προσδιορισμό της δομής των γειτονικών γαλαξιών καθώς και του δικού μας.
- **Υπέρυθρο (IR):** Συχνά το ταυτίζουμε με τη θερμότητα γιατί ζεσταίνει το δέρμα μας.

- Ορατό: είναι το τμήμα του φάσματος που βλέπει το μάτι μας. Εκπέμπεται από κάθε τί: από πυγολαμπίδες, λαμπτήρες, αστέρες, καθώς και από ταχέως κινούμενα σωματίδια που συγκρούονται με άλλα σωματίδια.
- Υπεριώδες (UV): Καίει το δέρμα! Οι αστέρες και άλλα "θερμά" αντικείμενα του διαστήματος εκπέμπουν UV.
- Ακτίνες-X: Χρησιμοποιούνται στην ιατρική για απεικόνιση οστών και ...δοντιών. Θερμά αέρια στο σύμπαν επίσης εκπέμπουν ακτίνες-X.
- Ακτίνες-γ: Εκπέμπονται από ραδιενεργά υλικά, φυσικά ή τεχνητά. Μεγάλοι επιταχυντές που χρησιμοποιούν οι επιστήμονες για την κατανόηση της δομής της ύλης επίσης μπορούν να δώσουν ακτινοβολία γ. Αλλά η μεγαλύτερη πηγή ακτίνων γ είναι το σύμπαν! Παράγει ακτινοβολία-γ με όλους τους δυνατούς τρόπους.



Εικόνα 2.3 και 2.4 Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Προσεγγιστικά, στον πίνακα 2.1 καταγράφονται μήκη κύματος, συχνότητες και ενέργειες των διάφορων περιοχών του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος [9].

	Μήκος κύματος	Συχνότητα (Hz)	Ενέργεια
Ραδιοκύματα	> 10 cm	$< 3 \times 10^9$	$< 2 \times 10^{-24} \text{J}$
Μικροκύματα	10 cm - 1 mm	$3 \times 10^9 - 3 \times 10^{11}$	$2 \times 10^{-24} - 2 \times 10^{-22} \text{J}$
Υπέρυθρο	1 mm - 750 nm	$3 \times 10^{11} - 4 \times 10^{14}$	$2 \times 10^{-22} - 3 \times 10^{-19} \text{J}$
Οπτικό	750 nm - 450 nm	$4 \times 10^{14} - 7.5 \times 10^{14}$	1.8 eV - 3 eV
Υπεριώδες	450 nm - 10 nm	$7.5 \times 10^{14} - 3 \times 10^{16}$	$5 \times 10^{-19} - 2 \times 10^{-17}$
Ακτίνες-X	10 nm - 0.01 nm	$3 \times 10^{16} - 3 \times 10^{19}$	$2 \times 10^{-17} - 2 \times 10^{-14}$
Ακτίνες-γ	< 0.01 nm	$> 3 \times 10^{19}$	$> 2 \times 10^{-14}$

Πίνακας 2.1 Περιοχές του ηλεκτομαγνητικού φάσματος.

2.3 Φασματοσκοπία [10]

Φασματοσκοπία ήταν αρχικά η μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ ύλης και ακτινοβολίας ως συνάρτηση του μήκους κύματος (λ). Στην πραγματικότητα, ιστορικά, η φασματοσκοπία αναφερόταν στη χρήση του ορατού φωτός που διασκορπίζονταν στα μήκη κύματος του, π.χ. από ένα πρίσμα. Αργότερα η έννοια επεκτάθηκε σε μεγάλο βαθμό να περιλαμβάνει κάθε μέτρηση μιας ποσότητας είτε ως συνάρτηση του μήκους κύματος είτε της συχνότητας. Το είδος της φασματοσκοπίας εξαρτάται από τη φυσική ποσότητα που μετράται. Κανονικά, η ποσότητα αυτή είναι μια ένταση, είτε της ενέργειας που παράγεται είτε που απορροφάται. Έτσι έχουμε τα εξής ήδη φασματοσκοπίας:

- **Ηλεκτρομαγνητική φασματοσκοπία:** περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις της ύλης με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, όπως το φως.
- **Ηλεκτρονική φασματοσκοπία:** περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις με δέσμη ηλεκτρονίων. Η φασματοσκοπία Auger περιλαμβάνει την εισαγωγή του Auger αποτελέσματος από μια δέσμη ηλεκτρονίων. Στην περίπτωση αυτή, η μέτρηση συνήθως περιλαμβάνει την κινητική ενέργεια των ηλεκτρονίων ως μεταβλητή.
- **Φασματομετρία μάζας:** αφορά την αλληλεπίδραση φορτισμένων ειδών από μαγνητικά ή / και ηλεκτρικά πεδία, με αποτέλεσμα το φάσμα μάζας. Ο όρος "φασματοσκοπία μάζας" είναι παρωχημένος, για την τεχνική που είναι κυρίως μια μορφή μετρήσεων, αλλά ταυτόχρονα παράγει ένα φάσμα για την παρατήρηση. Αυτό το φάσμα έχει τη μάζα m ως μεταβλητή.
- **Ακουστική φασματοσκοπία:** αφορά την συχνότητα του ήχου.
- **Διηλεκτρική φασματοσκοπία:** αφορά τη συχνότητα ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου.
- **Μηχανική φασματοσκοπία:** αφορά τη συχνότητα μιας εξωτερικής μηχανικής πίεσης, π.χ. μια ροπή στρέψης που εφαρμόζεται σε ένα κομμάτι του υλικού.

Η φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της συγκέντρωσης ή του ποσού ενός συγκεκριμένου είδους ονομάζεται φασματομετρία ενώ το μέσο που εκτελεί αυτές τις μετρήσεις **φασματόμετρο** ή Spectrograph. Μια ιδιαίτερη εφαρμογή της φασματοσκοπίας συναντάται

στην αστρονομία, όπου η φασματοσκοπία χρησιμεύει στην ανάλυση των ιδιοτήτων των μακρινών αντικειμένων. Τα μεγαλύτερα τηλεσκόπια έχουν φασματόμετρα που χρησιμοποιούνται είτε για την μέτρηση της χημικής σύστασης και των φυσικών ιδιοτήτων των αστρονομικών αντικειμένων είτε για την μέτρηση των ταχυτήτων τους από την μετακίνηση Doppler των φασματικών γραμμών. Χρησιμοποιείται επίσης στην φυσική και αναλυτική χημεία για τον προσδιορισμό των υλικών μέσω του φάσματος ανάκλασης ή απορρόφησης τους. Επομένως, η φασματοσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάδειξη ιδιαίτερων φασματικών χαρακτηριστικών, τα οποία οφείλονται στους χημικούς δεσμούς των στερεών, υγρών ή αερίων σωμάτων.

Η φασματοσκοπία θα μπορούσε επομένως να οριστεί ως η χρήση των φαινομένων αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη με σκοπό την ποσοτική ή ποιοτική ανάλυση της ύλης ή τη μελέτη φυσικών διεργασιών. Τα φαινόμενα αυτά είναι τα εξής:

- ✓ απορρόφηση (absorption),
- ✓ εκπομπή (emission),
- ✓ ανάκλαση (reflection),
- ✓ σκέδαση (scattering),

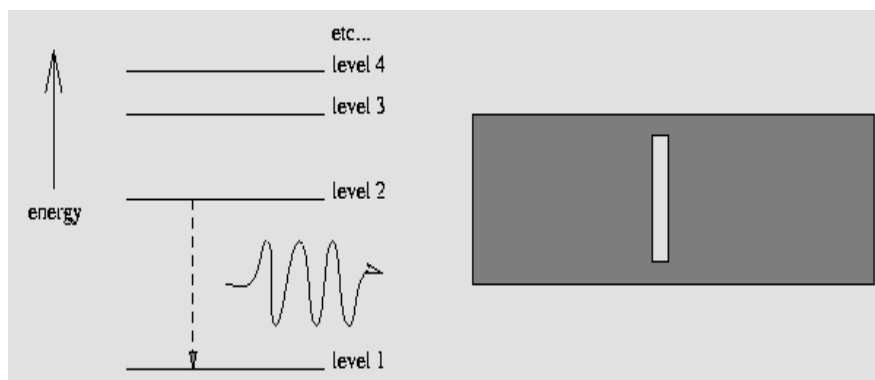
Οι περισσότερες φασματοσκοπικές μέθοδοι διαφοροποιούνται είτε ως ατομικές ή μοριακές με βάση το αν εφαρμόζονται σε άτομα ή μόρια. Σύμφωνα με αυτή τη διάκριση, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη φύση των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων:

- **Φασματοσκοπία απορρόφησης:** χρησιμοποιεί την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος στην οποία μια ουσία απορροφά.
- **Φασματοσκοπία εκπομπής:** χρησιμοποιεί την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος στην οποία μια ουσία ακτινοβολεί(εκπέμπει). Η ουσία πρώτα πρέπει να απορροφά την ενέργεια. Αυτή η ενέργεια μπορεί να είναι από ποικίλες πηγές, η οποία καθορίζει το όνομα της μετέπειτα εκπομπής.
- **Φασματοσκοπία σκέδασης (διασποράς):** μέτρα την ποσότητα του φωτός που μια ουσία διασκορπίζει σε ορισμένα μήκη κύματος, τυχαίες γωνίες, και γωνίες πόλωσης. Η διαδικασία διασποράς είναι πολύ ταχύτερη από την διαδικασία απορρόφησης/εκπομπής. Μια από τις πιο χρήσιμες εφαρμογές της φασματοσκοπίας σκέδασης του φωτός είναι η φασματοσκοπία Raman.

2.3.1 Εκπομπή- Απορρόφηση [11]

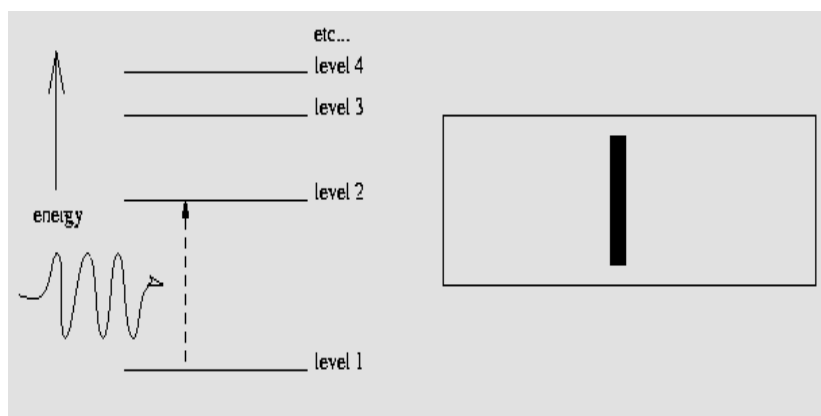
Ένα άτομο υδρογόνου πέφτει από το 2^ο επίπεδο ενέργειας στο 1^ο,εκπέμποντας ένα κύμα φωτός με ενέργεια ίση με τη διαφορά μεταξύ των ενεργειακών επιπέδων 2 και 1(E₂-E₁). Η μετάπτωση από την διεγερμένη κατάσταση level2 στην αρχική κατάσταση level1, με την ταυτόχρονη εκπομπή ενός φωτονίου με συχνότητα ω , όπου $h\omega = E_2 - E_1$, ονομάζεται **εκπομπή** (emission).Η ενέργεια ($h\omega = E_2 - E_1$)αυτή αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο χρώμα, ή μήκος κύματος του φωτός - και έτσι βλέπουμε

μια φωτεινή γραμμή σε αυτό το ακριβές μήκος κύματος! ... ένα φάσμα εκπομπής γεννιέται, όπως φαίνεται παρακάτω(εικόνα 2.5):



Εικόνα 2.5 Ένα φάσμα εκπομπής γεννιέται.

Αντίστροφα,έστω ότι το άτομο βρίσκεται στο επίπεδο level1, με ενέργεια E_1 . Τα ηλεκτρόνια του ατόμου αυτού μπορούν να μεταβούν σε μία διεγερμένη κατάσταση level2 υψηλότερης ενέργειας E_2 , αν αλληλεπιδράσει με αυτό θερμική ακτινοβολία πυκνότητας ενέργειας J και συχνότητας ω , τέτοιας ώστε το γινόμενο $h\omega$ να ισούται με τη διαφορά ενέργειας των δύο επιπέδων, $h\omega = E_2 - E_1$. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **απορρόφηση** (absorption). Κατά το φαινόμενο αυτό μια σκοτεινή γραμμή απορρόφησης φάσματος έχει γεννηθεί, όπως φαίνεται παρακάτω(εικόνα 2.6):



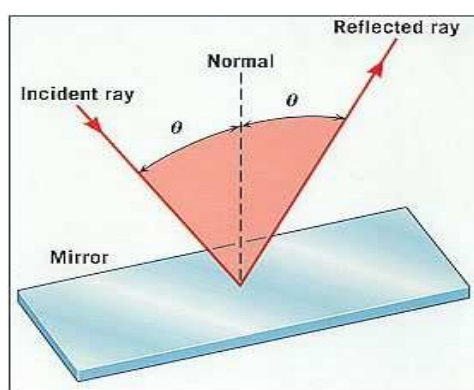
Εικόνα 2.6 Ένα φάσμα απορρόφησης γεννιέται.

2.3.2 Ανάκλαση – Σκέδαση

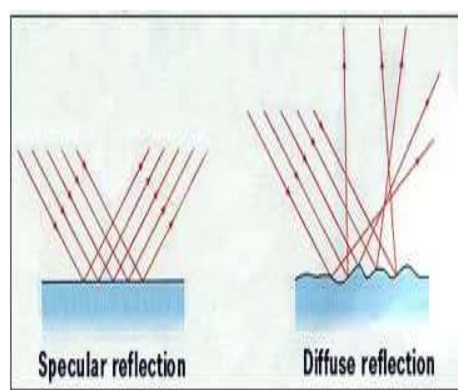
Ανάκλαση του φωτός είναι το φαινόμενο εκείνο κατά το οποίο το φως επιστρέφει μετά την πρόσκρουση του σε μια επιφάνεια.Η ανάκλαση έχει να κάνει με κύματα.Μέρος του κύματος του φωτός ή όλο το κύμα παραμένει στο ίδιο μέσο μετά την ανάκλαση.Κατά τη διάρκεια της ανάκλασης η

γωνία που σχηματίζει η κατεύθυνση κίνησης του κύματος με την κάθετη προς την επιφάνεια ανάκλασης ονομάζεται γωνία πρόσπτωσης ενώ η γωνία μεταξύ της κατεύθυνσης κίνησης του ανακλώμενου κύματος και της κάθετης ,γωνία ανάκλασης.Η γωνία πρόσπτωσης είναι ίση με την γωνία ανάκλασης σύμφωνα με το νόμο του Snell (εικόνα 2.7).

Όταν το φως συναντά έναν καθρέφτη αντανακλάται και ό, τι ακολουθεί είναι η αναπαράσταση της εικόνας μας πάνω στον καθρέφτη. Αυτό όμως δεν είναι η συνηθισμένη κατάσταση, επειδή ένας καθρέφτης θεωρείται ότι είναι μια τέλεια επιφάνεια χωρίς ανωμαλίες στην επιφάνεια του. Τις περισσότερες φορές το φως δεν συναντά επίπεδες επιφάνειες.Έτσι μιλάμε για κατοπτρική ανάκλαση (specular reflection) εάν η ακτινοβολία ανακλάται προς μία κατεύθυνση (όπως σε ένα καθρέφτη) ή διαχυτική ανάκλαση (diffuse reflection) εάν η ανακλώμενη ακτινοβολία εμφανίζει ισοκατανομή της ισχύος προς πολλές διευθύνσεις (εικόνα 2.8).



Εικόνα 2.7 Γωνία πρόσπτωσης ίση με γωνία ανάκλασης.



Εικόνα 2.8 Περιπτώσεις ανάκλασης.

Στην πραγματικότητα κάθε επιφάνεια ανακλά με τρόπο που είναι ενδιάμεσος αυτών των δύο ακραίων καταστάσεων. Ουσιαστικά, όταν το μήκος κύματος της ακτινοβολίας είναι πολύ μεγαλύτερο από τις μικρο-ανωμαλίες της επιφάνειας πρόσπτωσης αυτή δεν μπορεί να ‘δεί’ τις ανωμαλίες αυτές και άρα η επιφάνεια μοιάζει με κάτοπτρο και έχουμε κατοπτρική ανάκλαση σε αντίθετη περίπτωση με μικρότερο μήκος κύματος έχουμε διαχυτική.

Σκέδαση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μικρά σωματίδια που αιωρούνται σε ένα μέσο με διαφορετικό δείκτη διάθλασης διαχέουν ένα μέρος της ακτινοβολίας προς όλες τις κατευθύνσεις. Κατά την σκέδαση δεν γίνεται ενεργειακή μετατροπή αλλά αλλαγή της χωρικής κατανομής της ενέργειας. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται έχει διαφορετικό μήκος κύματος, ένταση, φάση, διεύθυνση διάδοσης και πόλωση από την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Ουσιαστικά, κατά την σκέδαση απορροφάται ενέργεια από ένα σύστημα (σκεδαστής) από ένα προσπίπτον φωτόνιο και επανεκπέμπεται μέρος της ενέργειας του φωτονίου αυτού από το ίδιο σύστημα. Το φαινόμενο της σκέδασης εξαρτάται από την φύση του σκεδαστή (υλικό, μέγεθος) και την διάταξή του στο χώρο (τυχαία ή κατανομημένη).

2.4 Ιστός και αλληλεπίδραση αυτού με το φως

Ιστός είναι ένα κυψελωτό οργανωμένο επίπεδο μεταξύ των κυττάρων και του πλήρη οργανισμού. Κατά συνέπεια, ένας ιστός είναι ένα σύνολο κυττάρων. Αυτά δεν είναι απαραίτητα ταυτόσημα, αλλά έχουν την ίδια προέλευση και πραγματοποιούν από κοινού μια συγκεκριμένη λειτουργία. Επομένως τα όργανα σχηματίζονται από την λειτουργική ομαδοποίηση πολλαπλών ιστών. Ο ιστός είναι ένα μη-διαυγές οπτικό μέσο με μικρές διακυμάνσεις των οπτικών του ιδιοτήτων. Η μελέτη των ιστών είναι γνωστή ως ιστολογία ή σε σχέση με την ασθένεια ιστοπαθολογία. Τα κλασικά εργαλεία για τη μελέτη των ιστών είναι:

- 1) το μπλοκ παραφίνης στο οποίο ο ιστός είναι ενσωματωμένος και στη συνέχεια χωρισμένος,
- 2) η ιστολογική κηλίδα,
- 3) το οπτικό μικροσκόπιο.

Κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι εξελίξεις στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν ενισχύσει τις λεπτομέρειες που μπορούν να παρατηρηθούν στους ιστούς. Με αυτά τα εργαλεία, οι κλασικές εμφανίσεις των ιστών μπορούν να εξεταστούν στην υγεία και την ασθένεια, επιτρέποντας σημαντική βελτίωση στην κλινική διάγνωση και πρόγνωση.

2.4.1 Αλληλεπιδράσεις φωτός

Το φως που αλληλεπιδρά με τους ιστούς μπορεί να υποστεί σκέδαση, ανάκλαση, μετάδοση ή ακόμη και απορρόφηση. Μάλιστα το απορροφούμενο φως μπορεί να προκαλέσει θερμότητα, χημική αλλαγή, φθορισμό και φωσφορισμό. Σε πολύπλοκα υλικά όλες οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις είναι πιθανές. Η φυσική και χημική δομή του βιοϋλικού είναι που καθορίζει την κάθε αλληλεπίδραση. Η απορρόφηση υπερτερεί έναντι της σκέδασης για μήκη κύματος $\lambda < 250 \text{ nm}$ και $\lambda > 2000 \text{ nm}$ ενώ η σκέδαση κυριαρχεί της απορρόφησης για μήκη κύματος στην περιοχή του μακρινού ορατού και κοντινού υπέρυθρου (600-1200 nm).

Τα διάφορα μέρη του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εμφανίζουν πολύ διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με την ύλη. Ξεκινώντας με χαμηλής συχνότητας ραδιοκύματα, το ανθρώπινο σώμα είναι απόλυτα διαφανές. Όπως κινούμαστε προς τα πάνω από τα μικροκύματα και την υπέρυθη ακτινοβολία στο ορατό φως, το σώμα μας απορροφάει όλο και πιο έντονα. Στο χαμηλότερο υπεριώδες φάσμα, όλες οι UV ακτίνες του ήλιου απορροφούνται από ένα λεπτό εξωτερικό στρώμα του δέρματός μας. Στην X-ray περιοχή του φάσματος, το σώμα μας θα γίνει διαφανές και πάλι επειδή οι περισσότεροι από τους μηχανισμούς για την απορρόφηση έχουν χαθεί. Τότε απορροφάται μόνο ένα μικρό τμήμα της ακτινοβολίας, αλλά η απορρόφηση περιλαμβάνει τις πιο βίαιες εκδηλώσεις ιονισμού. Κάθε τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος έχει κβαντικές ενέργειες κατάλληλες για την διέγερση ορισμένων τύπων φυσικών διεργασιών. Τα επίπεδα ενέργειας για το σύνολο των φυσικών διαδικασιών σε ατομικό και μοριακό επίπεδο είναι κβαντισμένα (quantized), και αν δεν υπάρχουν διαθέσιμα τέτοια κβαντισμένα (quantized) επίπεδα ενέργειας με αποστάσεις που ταιριάζουν με την κβαντική ενέργεια

τυχαίας ακτινοβολίας, τότε το υλικό θα είναι διαφανές για αυτήν την ακτινοβολία, και θα διέρχεται μέσα από αυτό.

2.4.1.1 Αλληλεπιδράσεις μικροκυμάτων

Η κβαντική ενέργεια από τα φωτόνια των μικροκυμάτων κυμαίνεται στην περιοχή μεταξύ 0,00001 και 0,001 eV, που είναι στην κλίμακα των ενεργειών που χωρίζει τις κβαντικές καταστάσεις της μοριακής περιστροφής και ροπής στρέψης. Η αλληλεπίδραση των μικροκυμάτων με την ύλη εκτός των μεταλλικών αγωγών είναι να περιστρέφει τα μόρια και να παράγει θερμότητα ως αποτέλεσμα της μοριακής κίνησης. Οι αγωγοί απορροφούν έντονα τα μικροκύματα και τις τυχόν χαμηλότερες συχνότητες, διότι θα προκαλέσουν ηλεκτρικά ρεύματα που θα θερμάνουν το υλικό. Η περισσότερη ύλη, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου σώματος, είναι σε μεγάλο βαθμό διαφανής στα μικροκύματα.

2.4.1.2 Αλληλεπιδράσεις υπέρυθρων

Η κβαντική ενέργεια των φωτονίων στην υπέρυθρη ζώνη κυμαίνεται στην περιοχή μεταξύ 0,001 και 1,7 eV που είναι στην κλίμακα των ενεργειών που χωρίζει τις κβαντικές καταστάσεις των μοριακών δονήσεων. Η υπέρυθρη ακτινοβολία απορροφάται πιο έντονα από ότι τα μικροκύματα, αλλά λιγότερο έντονα από ότι το ορατό φως. Το αποτέλεσμα της υπέρυθρης απορρόφησης είναι η θέρμανση των ιστών αφού αυξάνεται η μοριακή παλμική δραστηριότητα. Η υπέρυθρη ακτινοβολία διεισδύει στο δέρμα περισσότερο από ότι το ορατό φως και επομένως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για φωτογραφική απεικόνιση των υποδόριων αιμοφόρων αγγείων.

2.4.1.3 Αλληλεπιδράσεις ορατού φωτός

Ο κύριος μηχανισμός για την απορρόφηση των φωτονίων του ορατού φωτός είναι η ανάδειξη των ηλεκτρονίων σε υψηλότερα επίπεδα ενέργειας. Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες καταστάσεις και για αυτό το ορατό φως απορροφάται έντονα. Με μια ισχυρή πηγή φωτός το κόκκινο χρώμα μπορεί να μεταδοθεί από το χέρι ή μια πτυχή του δέρματος, δείχνοντας ότι το κόκκινο άκρο του φάσματος δεν απορροφάται τόσο έντονα όσο του ιώδους. Αν και η έκθεση σε ορατό φως προκαλεί θέρμανση, δεν προκαλεί ιονισμό και τους κινδύνους αυτού.

2.4.1.4 Αλληλεπιδράσεις υπεριώδους ακτινοβολίας

Το εγγύς υπεριώδες απορροφάται πολύ έντονα από το επιφανειακό στρώμα του δέρματος κατά τις μεταβάσεις ηλεκτρονίων. Σε υψηλότερες ενέργειες, οι ενέργειες ιονισμού για πολλά μόρια επιτυγχάνονται και οι πιο επικίνδυνες photoionization διεργασίες λαμβάνουν χώρα. Το στρώμα του όζοντος στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας είναι σημαντικό για την ανθρώπινη υγεία, διότι απορροφά τις περισσότερες από τις βλαβερές υπεριώδεις ακτίνες του ήλιου πριν φτάσουν στην επιφάνεια. Οι υψηλότερες συχνότητες στο υπεριώδες είναι οι ιονίζουσες ακτινοβολίες και μπορούν να παράγουν επιβλαβείς φυσιολογικές επιπτώσεις που κυμαίνονται από ηλιακά εγκαύματα ως καρκίνο του δέρματος. Ανησυχίες για την υγεία από την έκθεση σε UV είναι ως επί το πλείστον για την σειρά σε μήκος κύματος 290-330 nm, περιοχή που ονομάζεται UVB.

2.4.1.5 Αλληλεπιδράσεις ακτίνων X

Δεδομένου ότι οι κβαντικές ενέργειες των φωτονίων των ακτίνων X είναι υπερβολικά υψηλές για να απορροφηθούν κατά τις μεταβάσεις ηλεκτρονίων μεταξύ των καταστάσεων για τα περισσότερα άτομα, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ένα ηλεκτρόνιο μόνο χτυπώντας το εντελώς έξω από το άτομο. Όλες οι ακτινογραφίες ορίζονται ως ιοντίζουσα ακτινοβολία. Αυτό μπορεί να συμβεί, δίνοντας όλη την ενέργεια σε ένα ηλεκτρόνιο (photoionization) ή δίνοντας μέρος της ενέργειας στο ηλεκτρόνιο και το υπόλοιπο σε ένα χαμηλότερο ενεργειακό φωτόνιο (σκέδαση Compton).

2.5 Beer-Lambert law

Στην οπτική, ο νόμος **Beer-Lambert** ή **Beer's law** συσχετίζει την απορρόφηση του φωτός με τις ιδιότητες του υλικού μέσα στο οποίο ταξιδεύει. Πρόκειται για έναν συνδυασμό δύο νόμων που περιγράφουν την απορρόφηση μίας μονοχρωματικής ακτίνας φωτός από ένα διαφανές μέσο, μέσα από το οποίο διέρχεται:

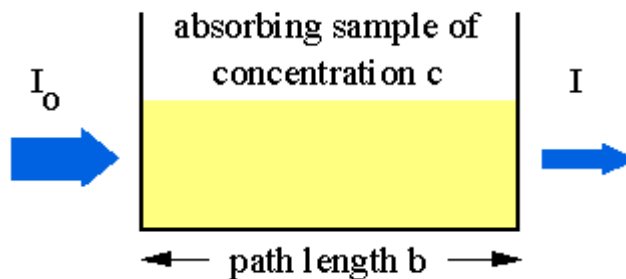
1. Beer's law: η ένταση του μεταδιδόμενου φωτός μειώνεται εκθετικά όσο η συγκέντρωση του μέσου αυξάνεται
2. Lambert's law: η ένταση του μεταδιδόμενου φωτός μειώνεται εκθετικά όσο η απόσταση που διανύει η ακτίνα όσο διέρχεται το μέσο αυξάνεται.

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. Μια άγνωστη συγκέντρωση του καταλύτη μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέτρηση της ποσότητας φωτός που απορροφά ένα δείγμα και εφαρμογή του νόμου του Beer. Εάν ο συντελεστής απορρόφησης δεν είναι γνωστός, η άγνωστη συγκέντρωση μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση μιας καμπύλης απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης που προέρχεται από τα πρότυπα [13].

Απλά ο νόμος υποστηρίζει ότι όταν ένα δείγμα τοποθετείται στη δέσμη ενός φασματόμετρου, υπάρχει μια άμεση και γραμμική σχέση μεταξύ του ποσού (συγκέντρωση) των συστατικών του (-ους) και της ποσότητας ενέργειας που απορροφά. Σε μαθηματικούς όρους:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} bC$$

A_{λ} είναι τιμή απορρόφησης του μέσου σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (ή συχνότητα) λ , ϵ_{λ} είναι ο συντελεστής απορροφητικότητας του υλικού (στοιχείου) σε αυτό το μήκος κύματος, b είναι το pathlength μέσα από το δείγμα και C είναι η συγκέντρωση. Ο συντελεστής απορροφητικότητας για κάθε υλικό είναι διαφορετικός, αλλά για μια συγκεκριμένη ένωση σε ένα επιλεγμένο μήκος κύματος, η τιμή αυτή είναι σταθερή [14].



Εικόνα 2.9 Απορρόφηση του φωτός από ένα δείγμα

Συνοψίζοντας ο νόμος μπορεί να εκφραστεί και ως εξής :

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

- 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 μεσο
- Απορρόφηση 0 σε κάποιο μήκος κύματος σημαίνει ότι το φως του συγκεκριμένου μήκους κύματος δεν έχει απορροφηθεί. Οι εντάσεις του δείγματος και της δέσμης αναφοράς είναι και οι δύο το ίδιο, έτσι ώστε η αναλογία $I_0 / I_1 = 1$.
- Απορρόφηση 1 συμβαίνει όταν το 90% του φωτός σε αυτό το μήκος κύματος έχει απορροφηθεί - πράγμα που σημαίνει ότι η ένταση είναι 10% του τι θα ήταν διαφορετικά. Στην περίπτωση αυτή, $I_0 / I_1 = 100/10 (= 10)$ και $\log_{10}$ του 10 είναι 1.[15]

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

2.5.1 Περιορισμοί του Beer-Lambert νόμου [16]:

Η γραμμικότητα του Beer-Lambert νόμου περιορίζεται από χημικούς και οργανικούς παράγοντες. Αιτίες της μη-γραμμικότητας (nonlinearity) είναι:

- Αποκλίσεις στους συντελεστές απορροφητικότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις ($> 0.01M$), λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων σε στενή γειτνίαση.
- Σκέδαση του φωτός που οφείλεται στα σωματίδια του δείγματος.
- Φθορισμός ή φωσφορισμός του δείγματος.
- Αλλαγές στο δείκτη διάθλασης σε υψηλή συγκέντρωση καταλύτη
- Αλλαγές στη χημική ισορροπία ως συνάρτηση της συγκέντρωσης.
- Μη μονοχρωματική ακτινοβολία, οι αποκλίσεις μπορεί να ελαχιστοποιηθούν με τη χρήση ενός σχετικά επίπεδου μέρους του φάσματος απορρόφησης, όπως είναι το ανώτατο όριο της ζώνης απορρόφησης.

Κεφάλαιο 3: Ποσοτική παθολογία και οι εναλλακτικές τεχνικές της

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφουμε τα στάδια από τα οποία περνάει ο ιστός, δηλαδή την διαδικασία βιοψίας, την χρώση και τις τεχνικές που ακολουθούνται για την ανίχνευση αλλαγών στις φασματοσκοπικές ιδιότητες του ιστού.

3.1 Ποσοτική παθολογία (QUANTITATIVE PATHOLOGY)

Η απότομη αύξηση του ενδιαφέροντος για την εφαρμογή της ποσοτικής παθολογίας για τη διάγνωση του καρκίνου και την πρόγνωση αυτού οφείλεται κυρίως στους ακόλουθους λόγους:

- αυξημένες κοινωνικές απαιτήσεις για ποσοτικοποίηση και αντικειμενικότητα,
- βελτίωση και ευρεία διαθεσιμότητα της κατάλληλης τεχνολογίας,
- συνειδητοποίηση ότι οι αλλαγές μπορεί να ανιχνευθούν με ποσοτική ανάλυση που διαφορετικά θα ξέφευγε της παρατήρησης,
- βελτίωση των θεραπευτικών δυνατοτήτων για ασθενείς με καρκίνο.

Τέλος, οι γνωμοδοτήσεις των παθολόγων δεν είναι πάντοτε συνεπείς ή εύκολο να αναπαραχθούν, ενώ οι ποσοτικά παθολογικές αναλύσεις είναι περισσότερο αναπαραγωγικές και πιο ικανές να εμποδίσουν την υπό ή υπέρ θεραπεία [23].

3.2 Βιοψία

3.2.1 Γενικά

Οι απεικονιστικές μελέτες (Imaging studies), όπως η μαστογραφία και η μαγνητική τομογραφία, συχνά μαζί με τη σωματική εξέταση του μαστού, μπορεί να οδηγήσουν τους γιατρούς στην υποψία ότι ένα άτομο έχει καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, ο μόνος τρόπος να είναι βέβαιοι για αυτό είναι να πάρουν δείγμα ιστού από την ύποπτη περιοχή και να το εξετάσουν με το μικροσκόπιο. Η βιοψία είναι μια μικρή εγχείριση που γίνεται για την αφαίρεση ιστού από μια περιοχή ενδιαφέροντος του σώματος. Εάν ο γιατρός δει τίποτα ύποπτο στο στήθος του ασθενούς, ή βλέπει κάτι ύποπτο σε μια απεικονιστική μελέτη, ο ασθενής θα υποβληθεί σε βιοψία. Ο ιστός δείγμα εξετάζεται από παθολόγο (ένας γιατρός που ειδικεύεται στην διάγνωση της ασθένειας) για να δει αν καρκινικά κύτταρα είναι παρόντα ή όχι. Εάν ο καρκίνος είναι παρόν, ο παθολόγος μπορεί στη συνέχεια να εξετάσει τα χαρακτηριστικά του. Η βιοψία θα οδηγήσει σε μια έκθεση που περιέχει όλες τις διαπιστώσεις του παθολόγου για τον καρκίνο. Η βιοψία είναι συνήθως μια απλή διαδικασία. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, μόνο το 20% των γυναικών που έχουν υποβληθεί σε βιοψία αποδεικνύεται ότι έχουν καρκίνο. Αντιθέτως, στη Σουηδία, όπου το κόστος είναι πολύ αυστηρότερο και μόνο στις πλέον ύποπτες βλάβες εφαρμόζεται βιοψία, το 80% αυτών αποδεικνύεται ότι πρόκειται για καρκινική βλάβη (κακοήθης).

Διαφορετικές τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διενέργεια βιοψίας, και είναι πιθανό ότι ο χειρουργός θα προσπαθήσει να χρησιμοποιήσει τη δυνατόν λιγότερο επεμβατική διαδικασία - αυτή που αφορά τη μικρότερη τομή και το ελάχιστο ποσό των ουλών. Ωστόσο, η επιλογή της διαδικασίας εξαρτάται πραγματικά από την κατάσταση του ασθενούς. Βιοψία μπορεί να γίνει με την τοποθέτηση μιας βελόνα μέσα στο δέρμα του στήθους για να απομάκρυνση του δείγματος ιστού. Ή, μπορεί να περιλαμβάνει μια μικρή χειρουργική διαδικασία, στην οποία ο χειρουργός κάνει τομές στο δέρμα για την αφαίρεση ορισμένων ή όλων των ύποπτων ιστών. Συγκεκριμένα οι συνηθέστερες διαδικασίες βιοψίας είναι:

1. incisional βιοψία: μόνο ένα δείγμα ιστού αφαιρείται,
2. excisional βιοψία: ένας ολόκληρος αδένας ή ύποπτη περιοχή αφαιρείται και
3. βιοψία με βελόνα (needle biopsy): ένα δείγμα ιστού ή υγρού αφαιρείται με βελόνα. Όταν μια μεγάλη βελόνα χρησιμοποιείται, η διαδικασία αυτή ονομάζεται βιοψία πυρήνα (core biopsy). Όταν μια λεπτή βελόνα χρησιμοποιείται, η διαδικασία ονομάζεται fine-needle aspiration biopsy.

Οι κοινές μέθοδοι για την βιοψία μπορεί να κατηγοριοποιηθούν και ως εξής:

1. Μια βελόνα χρησιμοποιείται για την λήψη ιστού ή υγρού.
2. Ένα ενδοσκόπιο (ένα λεπτό, φωτιζόμενο σωλήνα) χρησιμοποιείται για να εξετάσει τις τομές στο εσωτερικό του σώματος και την αφαίρεση κυττάρων ή ιστών.
3. Το χειρουργείο χρησιμοποιείται για την αφαίρεση τμήματος του όγκου ή του συνόλου του όγκου. Αν το σύνολο του όγκου απομακρυνθεί, συνήθως κάποιος φυσιολογικός ιστός γύρω από τον όγκο επίσης αφαιρείται.

Οι ιστοί αφαιρούνται κατά τη διάρκεια μιας βιοψίας και αποστέλλονται σε εργαστήριο παθολογίας, όπου κόβονται σε λεπτές φέτες για την παρατήρηση τους με το μικροσκόπιο. Αυτό είναι γνωστό ως ιστολογική εξέταση και είναι συνήθως ο καλύτερος τρόπος για να πούμε εάν ο καρκίνος υφίσταται.

3.2.2 Προετοιμασία του ιστού μετά την βιοψία

Ο ιστός που αφαιρείται κατά τη διάρκεια μιας βιοψίας ή χειρουργικής επέμβασης πρέπει να κοπεί σε λεπτές τομές, που τοποθετούνται σε διαφάνειες, και βάφονται με χρωστικές πριν εξεταστούν υπό το μικροσκόπιο. Δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται προκειμένου να είναι δυνατόν ο ιστός να κοπεί σε λεπτά τμήματα: κατεψυγμένα τμήματα και παραφίνη-ενσωματωμένα (μόνιμο) τμήματα. Τα μόνιμα τμήματα ετοιμάζονται με την τοποθέτηση του ιστού σε στερεωτικό (συνήθως φορμαλίνη, επεξεργάζονται με επιπλέον διαλύματα και, στη συνέχεια τοποθετούνται σε κερί παραφίνης. Αφού το κερί έχει σκληρύνει, ο ιστός κόβεται σε πολύ λεπτές φέτες, οι οποίες τοποθετούνται σε διαφάνειες και χρωματίζονται. Η διαδικασία συνήθως διαρκεί αρκετές ημέρες. Ένα μόνιμο τμήμα παρέχει καλύτερη ποιότητα για εξέταση από παθολόγο και παράγει πιο ακριβή αποτελέσματα από ένα κατεψυγμένο τμήμα.

3.3 Χρώση

3.3.1 Γενικά

Η χρώση είναι μια βιοχημική τεχνική πρόσθεσης μιας ειδικής κατηγορίας χρωστικής στο υπόστρωμα για την ποσοτικοποίηση και τον προσδιορισμό της παρουσίας ενός ειδικού συστατικού. Είναι παρόμοια με την τοποθέτηση πινακίδων φθορισμού. Οι χρωστικές χρησιμοποιούνται συχνά στη βιολογία και την ιατρική για να επισημανθούν δομές βιολογικών ιστών, συχνά με τη βοήθεια διαφορετικών μικροσκοπίων. Χρωστικές μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να καθορίσουν και να εξετάσουν χύμα ιστούς (επισημαίνοντας, για παράδειγμα, μυϊκές ίνες), τον πληθυσμό των κυττάρων (ταξινόμηση των διαφόρων κυττάρων του αίματος, για παράδειγμα), ή οργανίδια μέσα σε μεμονωμένα κύτταρα. Η χρώση μπορεί να είναι:

- In vitro: αφορά το χρωματισμό των κυττάρων ή των δομών που δεν είναι πλέον στη ζωή.
- In vivo: αφορά το χρωματισμό ζώντων κυττάρων ή δομών.

Ορισμένες χρωστικές συχνά συνδυάζονται για να αποκαλύψουν περισσότερες λεπτομέρειες και στοιχεία από μια και μόνο χρωστική. Σε συνδυασμό με ειδικά πρωτόκολλα για τη στερέωση και την προετοιμασία του δείγματος, οι επιστήμονες και οι γιατροί μπορούν να χρησιμοποιούν αυτές τις πρότυπες τεχνικές σαν συνεπή, επαναλήψιμα διαγνωστικά εργαλεία. Μια χρωστική counterstain είναι που κάνει τα κύτταρα ή τις δομές πιο ορατές, όταν δεν είναι πλήρως ορατές με την κύρια χρωστική. Προκαλώντας ορισμένα κύτταρα ή δομές να πάρουν αντίθετο χρώμα, η μορφή τους (μορφολογία) ή η θέση τους εντός των κυττάρων ή των ιστών μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν και να μελετηθούν. Ο συνήθης στόχος είναι να αποκαλύψει κυτταρολογικές λεπτομέρειες που θα μπορούσαν να μην είναι εμφανείς.

3.3.2 Οι χρωστικές [24]

Οι πιο γνωστές χρωστικές που χρησιμοποιούνται για την χρώση των αδένων του μαστού είναι η hematoxylin, carmine alum, and trypan blue:

1. hematoxylin: παράγει ένα μπλε χρώμα σε αλκαλικό μέσο σε πυρήνα και συνεκτικό ιστό. Σε όξινο μέσο κηλιδώνει τον πυρήνα κόκκινο ενώ το κολλαγόνο και άλλα ενδοκυτταρικά συστατικά κίτρινο, ροζ ή κόκκινο-καφέ.
2. trupan blue: όπως μαρτυρά το όνομα κηλιδώνει τον επιδερμικό ιστό μπλε. Χρησιμοποιείται βασικά in vivo για να τονίσει την θέση των αδένων του μαστού κυρίως σε παρθενικά ποντίκια.
3. carmine alum: είναι ένα κόκκινο μείγμα που προέρχεται από την κόκκινη σκόνη ενός εντόμου, coccus casti. Είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό αλλά διαλυτό σε οξέα ή αλκάλια

Η H & E ή HE κηλίδα ή hematoxylin και eosin κηλίδα, είναι πάντως η πιο δημοφιλής μέθοδος χρώσης που εφαρμόζεται στην ιστολογία και στην ιατρική διάγνωση. Για παράδειγμα όταν ένας παθολόγος μελετάει μια βιοψία στην οποία υπάρχει υποψία για καρκίνο, το ιστολογικό τμήμα είναι πιθανόν να βαφτεί με την H & E. Η hematoxylin χρωματίζει μπλε τους πυρήνες των κυττάρων, ενώ

η eosin το κυτταρόπλασμα, τους συνδετικούς ιστούς και άλλα εξωκυτταρικά συστατικά ροζ ή κόκκινα. Η Eosin απορροφάται έντονα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, χρωματίζοντας τα με φωτεινό κόκκινο.

3.4 Τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην παθολογία

Η ανοσοϊστοχημική χρώση τμημάτων του ιστού επιτρέπει την οπτικοποίηση με μικροσκόπιο των δομών και των ουσιών επί των οποίων επισυνάπτονται οι χρωστικές [26]. Ιδιαίτερα, μια ποικιλία από μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται στην ιστολογία για την επισήμανση των συγκεκριμένων αντιγόνων, oncoproteins, υποδοχέων ορμονών, των πυρηνικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό, κλπ [27]. Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως στην παθολογία, όπου η οπτική εκτίμηση περίπλοκων χρωστικών αποτελεί τη βάση για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό της κατάστασης του εξεταζόμενου ιστού. Παρ'όλα αυτά, έχει ευρέως αναγνωριστεί ότι η οπτική εκτίμηση αυτών είναι αναποτελεσματική, και ότι η ποιοτική και υποκειμενική εκτίμηση είναι σε θέση να εκμεταλλεύεται μόνον εν μέρει το διαγνωστικό περιεχόμενο των τεχνικών χρώσης του ιστού.

Σε μια προσπάθεια να ληφθούν ποσοτικές πληροφορίες για την χρώση, μια ποικιλία από αλγόριθμους ανάλυσης της εικόνας έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας. Μέθοδοι μορφομετρίας και αλγόριθμοι που ασχολούνται με τον αυτόματο ή ημιαυτόματο διαχωρισμό των χρωματισμένων περιοχών σε ψηφιακές φωτογραφίες έχουν περιληφθεί στα εμπορικά διαθέσιμα λογισμικά.

3.4.1 Οπτική πυκνότητα (optical density) [26] –[28]

Η οπτική πυκνότητα (OD) των διαχωρισμένων περιοχών υπολογίζεται ως ο λογάριθμος της αντίστροφης διαπερατότητα των χρωματισμένων περιοχών του ιστού. Η διαγνωστική σημασία της OD απορρέει από το γεγονός ότι, σύμφωνα με νόμο του Beer-Lambert (BLL), συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της χρωστικής. Ως εκ τούτου, η οπτική πυκνότητα (OD) μπορεί δυνητικά να αποτελέσει ένα μέσο για την ποσοτική μέτρηση της συγκέντρωσης αυτής, η οποία, όπως πιστεύεται ευρέως, παρουσιάζει μεγάλη διαγνωστική και προγνωστική σημασία. Ωστόσο, η ποσοτική αξιολόγηση της συγκέντρωσης μεμονωμένων ή πολλαπλών χρωστικών δεν είναι απλή, κυρίως λόγω των περιορισμών στην εφαρμογή του BLL νόμου σε συμβατική ανάλυση των μικροσκοπικών εικόνων. Ιδιαίτερα, είναι γνωστό ότι ο νόμος BLL εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου το δείγμα φωτίζεται και το μεταδιδόμενο φως καταγράφεται σε στενές φασματικές ζώνες. Αυτή η προϋπόθεση δεν πληρείται στην συμβατική μικροσκοπία και ως εκ τούτου οι υπολογισμοί που βασίζονται σε BLL είναι περιορισμένης ακρίβειας. Επιπλέον, ο ίδιος νόμος ορίζει ότι, εκτός από την συγκέντρωση, η OD είναι επίσης μια συνάρτηση του πάχους του δείγματος και της μοριακής απορροφητικότητας της χρώσης(-ων). Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, η σύγχρονη ιστολογία χρησιμοποιεί πολλές χρωστικές ουσίες, που χρωματίζουν

διαφορετικές ουσίες των ιστών και των δομών. Αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη αξιολόγηση της πλειονότητας των χαρακτηριστικών διαγνωστικής σημασίας, σε κάθε συγκεκριμένο μικροσκοπικό πεδίο. Το γεγονός αυτό βελτιώνει σημαντικά τις παραγόμενες διαγνωστικές πληροφορίες. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η εκτίμηση του ποσού της κάθε συγκεκριμένης χρωστικής σε οποιοδήποτε σημείο του χώρου είναι ανέφικτη επειδή τα φάσματα τους συνήθως επικαλύπτονται. Κατά συνέπεια, η υπολογιζόμενη OD προσδιορίζεται από τις πολλαπλές χρώσεις. Ως εκ τούτου, ποσοτικές πληροφορίες δεν μπορούν να εξαχθούν ανεξάρτητα για κάθε χρωματισμένη ουσία.

Η λύση στα παραπάνω προβλήματα εντοπίζεται στην ανάπτυξη και την εφαρμογή απεικονιστικών φασματικών συστημάτων, ικανών να αποκτήσουν εικόνες σε μια πληθώρα στενών μπαντών σε όλο το ορατό και το εγγύς υπέρυθρο (NIR) φασματικό εύρος.

3.4.2 Ανοσοϊστοχημεία

Η Ανοσοϊστοχημεία ή IHC αναφέρεται στη διαδικασία εντόπισης πρωτεϊνών στα κύτταρα των ιστών αξιοποιώντας την αρχή της δέσμευσης αντισωμάτων από τα αντιγόνα των βιολογικών ιστών. Πήρε το όνομά της από τις ρίζες " immuno " σε σχέση με τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την διαδικασία, και " histo ", με την έννοια του ιστού. Η ανοσοϊστοχημική χρώση χρησιμοποιείται ευρέως στη διάγνωση της ανωμαλίας κυττάρων σαν αυτά που βρέθηκαν σε καρκινικούς όγκους. Ειδικοί μοριακοί δείκτες (markers) χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα γεγονότα όπως ο πολλαπλασιασμός ή ο κυτταρικός θάνατος (απόπτωση). Η IHC επίσης χρησιμοποιείται ευρέως στην βασική έρευνα για την κατανόηση της διανομής και τον εντοπισμό των βιοδεικτών ενώ έχει την δυνατότητα να εκφράζει με διαφορετικό τρόπο τις πρωτεΐνες που βρίσκονται σε διαφορετικά τμήματα ενός βιολογικού ιστού. Αποτελεί επομένως μια εξαιρετική τεχνική ανίχνευσης και έχει το τεράστιο πλεονέκτημα να είναι σε θέση να δείξει ακριβώς που μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη βρίσκεται εντός του ιστού που εξετάζεται. Αυτό, την έχει κάνει ευρέως χρησιμοποιούμενη στην διαγνωστική χειρουργική παθολογία για την χαρτογράφηση όγκων (π.χ. immunostaining για e-cadherin) , για την διάκριση μεταξύ DCIS (ductal καρκίνωμα in situ: κηλίδες θετικό) και LCIS (lobular καρκίνωμα in situ: δεν έχει κηλίδες θετικό).

3.4.2.1 Ερμηνεία αποτελεσμάτων ανοσοϊστοχημείας

Τα περισσότερα εργαστήρια χρησιμοποιούν την IHC διαδικασία για να κάνουν οποιαδήποτε ορμονικό υποδοχέα να εμφανίζεται στα κύτταρα των δειγμάτων ιστού στον καρκίνο του μαστού. Εάν υπάρχουν υποδοχείς ορμονών, αυτό σημαίνει ότι η καρκινική ανάπτυξη των κυττάρων προωθείται από τις γυναικείες ορμόνες όπως είναι τα οιστρογόνα ή / και η προγεστερόνη. Όλα τα εργαστήρια δεν χρησιμοποιούν την ίδια μέθοδο για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μιας δοκιμής, και δεν ανακοινώνουν τα αποτελέσματα με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Έτσι, μπορούμε να δούμε κάποια από τα εξής, όταν θα πάρουμε πίσω τα αποτελέσματα:

1. Ποσοστό που λέει πόσα κύτταρα στα 100 έχουν χρωματιστεί θετικά για τους υποδοχείς ορμονών. Θα δούμε έναν αριθμό μεταξύ 0% (δεν έχει υποδοχείς) και 100% (όλα έχουν υποδοχείς).
2. Έναν αριθμό μεταξύ 0 και 3. Το "0" σημαίνει ότι δεν υπάρχουν υποδοχείς, το "1" υπάρχει ένας μικρός αριθμός, το "2" ένας μέσος αριθμός, και το "3" ένας μεγάλος αριθμός.
3. Έναν αριθμό μεταξύ 0 και 4 που αντιστοιχεί στο ποσοστό των θετικά χρωσμένων πυρήνων ως προς το συνολικό αριθμό των πυρήνων στο δείγμα. Η κλίμακα αυτή έχει ως εξής: (0=>0-5%, 1=>6-10%, 2=>11-33%, 3=>34-66%, 4=>67-100%).
4. Ένα Allred σκορ μεταξύ 0 και 8. Το σύστημα εξετάζει το ποσοστό των κυττάρων που είναι θετικά για τους υποδοχείς των ορμονών, μαζί με το πόσο καλά οι υποδοχείς εμφανίζονται μετά από χρώση (αυτό ονομάζεται "ένταση"). Η πληροφορία αυτή συνδυάζεται στην συνέχεια, για να βαθμολογήσει το δείγμα σε μια κλίμακα από 0 έως 8. Όσο υψηλότερη είναι η βαθμολογία, περισσότεροι υποδοχείς βρέθηκαν και ήταν πιο εύκολο να φανούν στο δείγμα.
5. Η λέξη "θετικό" ή "αρνητικό".

Μερικές φορές, η έκθεση που θα επιστραφεί από το εργαστήριο μπορεί να λέει ότι η ορμονική κατάσταση είναι "άγνωστη". Αυτό μπορεί να σημαίνει ένα από τα εξής:

1. Η δοκιμή δεν είχε ποτέ οριστεί να γίνει.
2. Το δείγμα των ιστών που το εργαστήριο έλαβε ήταν πολύ μικρό για να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα.
3. Λίγοι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης ήταν παρόντες.

Εάν δεν υπάρχουν υποδοχείς ορμονών, ή δεν μπορούν να μετρηθούν ή να φανούν, ο καρκίνος αναφέρεται ως hormone-receptor-negative.

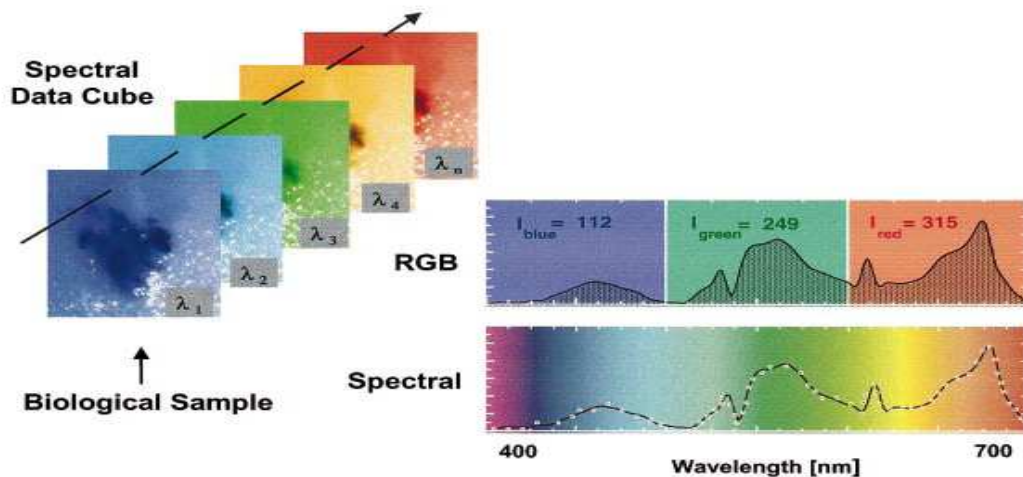
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : Υπερφασματική απεικόνιση και αλγόριθμοι ταξινόμησης

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται κάποιες βασικές έννοιες που αφορούν την φασματική απεικόνιση και συγκεκριμένα την υπερφασματική, τα μέσα που χρησιμοποιήσαμε κατά την πειραματική διαδικασία καθώς και οι αλγόριθμοι ταξινόμησης φασμάτων που υλοποιήθηκαν προκειμένου να προσδιοριστεί με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αντικειμενικότητα το ποσοστό του καρκίνου του μαστού των δειγμάτων βιοψίας που είχαμε στην διάθεση μας για την συγκεκριμένη έρευνα.

4.1 Φασματική απεικόνιση

Η φασματική απεικόνιση είναι ο συνδυασμός φασματοσκοπίας και απεικόνισης προκειμένου να πάρουμε πληροφορία (εικόνα 4.1). Η φασματοσκοπία μελετά την αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη και παρέχει μεγάλη φασματική αλλά όχι χωρική πληροφορία. Ενώ η απεικόνιση, μας δίνει την ένταση του φωτός σε κάθε pixel της οθόνης παρέχοντας μεγάλη χωρική πληροφορία αλλά όχι φασματική. Επομένως η φασματική απεικόνιση μας εξασφαλίζει τόσο φασματική όσο και χωρική πληροφόρηση και βρίσκει ολοένα και περισσότερες εφαρμογές σε πολλές επιστήμες:

- Στην **ιατρική** χρησιμοποιείται για την διάγνωση και την θεραπεία κάποιων ασθενειών και βοηθάει σημαντικά σε διάφορες χειρουργικές επεμβάσεις.
- Στην **αναλυτική χημεία** χρησιμοποιείται για την στοιχειωμέτρηση κάποιων λύσεων.
- Στη **βιοχημεία** χρησιμοποιείται για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των πρωτεϊνών.
- Στη **βιομηχανία** χρησιμοποιείται για την ποιοτική ανάλυση των προϊόντων που χρησιμοποιούνται από αυτήν.
- Σε **διαγνωστικές τεχνικές** χρησιμοποιείται για την in-vitro ανάλυση. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται σε in-vivo εφαρμογές για την χαρτογράφηση των λειτουργιών του εγκεφάλου, την οπτική βιοψία, την οφθαλμολογία, αλλεργίες και πληγές του δέρματος. Επίσης σε ex-vivo εφαρμογές που περιλαμβάνουν την ανάπτυξη ανθρώπινων όγκων σε ζώα.
- Σε **περιβαλλοντικά θέματα** όπως την μέτρηση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης και την χαρτογράφηση του εδάφους.



Εικόνα 4.1 Η διαδικασία φασματικής απεικόνισης. Σε κάθε σημείο της εικόνας, pixel αντιστοιχεί ένα χαρακτηριστικό φάσμα.

Η Φασματική απεικόνιση είναι ένας τρόπος ανάλυσης της εικόνας που επιτρέπει το διαχωρισμό του μεταδιδόμενου φωτισμού σε αυθαίρετα μεγάλο αριθμό ζωνών μήκους κύματος και παράγει υψηλής ανάλυσης φάσμα της έντασης του φωτός ως συνάρτηση του μήκους κύματος για κάθε pixel εικόνας.

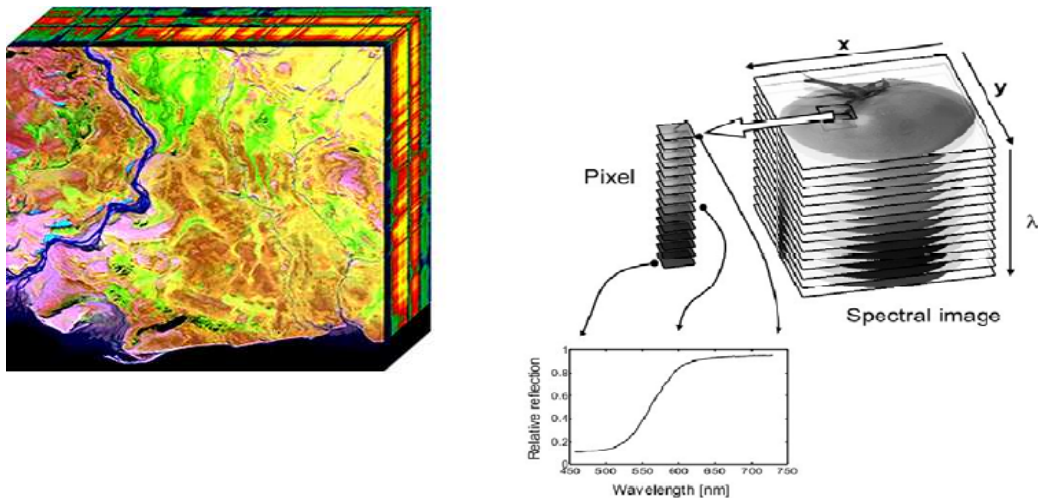
Συνήθως, οι πρωτεΐνες και άλλα μόρια του ενδιαφέροντος μπορεί να είναι παρόντα σε ίδια ή χωρικά επικαλυπτόμενα κυτταρικά μέρη. Αυτή η συνύπαρξη (η οποία δεν συνεπάγεται απαραίτητα βιοχημική αλληλεπίδραση) περιπλέκει τις μεθόδους απεικόνισης για πολυπλεγμένη (multiplexing) ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό, ειδικά όταν υπάρχει φασματική επικάλυψη χρωστικών. Ωστόσο, η φασματική απεικόνιση, μπορεί να αντιμετωπίσει σε μεγάλο βαθμό αυτές τις προκλήσεις με την επίλυση της επικάλυψης χρωστικών ή ετικετών φθορισμού, δημιουργώντας έτσι ποσοτικές εικόνες των επιμέρους δεικτών. Επίσης, μέσω της ικανότητάς της να διαχωρίζει τις ενδείξεις των εξωγενών ετικετών φθορισμού από το ενίοτε ενδογενή φόντο αυτοφθορισμού, μπορεί σε μεγάλο βαθμό να βελτιώσει την ευαισθησία και την ποσοτική ακρίβεια [44]. Η επιτυχία για τον διαχωρισμό παρόμοιων φασματικών ειδών μέσω τη φασματικής απεικόνισης εξαρτάται από τον αριθμό των ειδών που πρέπει να διακριθούν, την απόλυτη και σχετική φωτεινότητα, το δυναμικό εύρος της κάμερας, και την παρουσία ή απουσία θορύβου ή άλλους παράγοντες όπως αυτοφθορισμός, καθώς και αν τα είδη αυτά είναι φυσικά διαχωρισμένα ή συνυπάρχουν στα ίδια pixels.

4.1.1 Κατηγορίες φασματικής απεικόνισης

- **Multi-Spectral (πολυφασματική απεικόνιση)** [29]: περιλαμβάνει μετρήσεις σε ευρείς, ξεχωριστές και διαχωρισμένες ζώνες μήκους κύματος. Αυτή η κατηγορία μας δίνει μέτρια φασματική ανάλυση καθώς δεν παράγει το φάσμα ενός αντικειμένου. Μια πολυφασματική εικόνα είναι μια συλλογή πολλών μονόχρωμων εικόνων της ίδιας σκηνής, κάθε μία από αυτές λαμβανόμενη από διαφορετικό αισθητήρα. Κάθε εικόνα αναφέρεται ως μια μπάντα. Μια γνωστή Multi-Spectral (ή πολλαπλών ζωνών) εικόνα είναι μια RGB χρωματική εικόνα, που

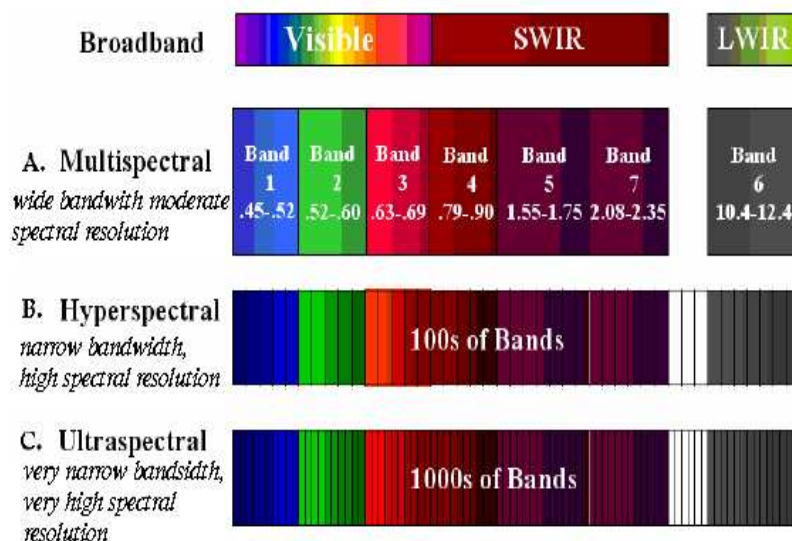
αποτελείται από μια κόκκινη, μια πράσινη και μια μπλε εικόνα, κάθε μία από αυτές λαμβανόμενη από έναν αισθητήρα ευαίσθητο σε διαφορετικό μήκος κύματος.

- **Hyper-Spectral (υπερφασματική απεικόνιση)** [30]: περιλαμβάνει μετρήσεις σε πολλές συνεχείς και στενές μπάντες. Αυτή η κατηγορία μας δίνει υψηλή φασματική πληροφορία καθώς παράγει το φάσμα ενός αντικειμένου. Η Hyper-spectral απεικόνιση συλλέγει και επεξεργάζεται πληροφορίες από ολόκληρο το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Η διάκριση μεταξύ Hyper-spectral και Multi-Spectral απεικόνισης ορίζεται στον αριθμό των ζωνών φάσματος. Η Multi-Spectral απεικόνιση περιέχει δεδομένα από δεκάδες έως εκατοντάδες μπάντες ενώ η Hyper-spectral εκατοντάδες έως χιλιάδες μπάντες. Η χωρική και φασματική πληροφορία που προκύπτει κατά την υπερφασματική απεικόνιση αναπαριστάται με τη μορφή ενός κύβου (spectra cube), με χωρική πληροφορία στη x και y διάσταση και φασματική στην z (εικόνα 4.2). Τα υπερφασματικά δεδομένα είναι ένα σύνολο από συνεχόμενες ζώνες (συνήθως από έναν αισθητήρα) ενώ τα πολυφασματικά είναι ένα σύνολο από βέλτιστα επιλεγμένες ζώνες φάσματος που συνήθως δεν είναι συνεχόμενες και μπορούν να συλλέγονται από πολλούς αισθητήρες. Βρίσκει εφαρμογές σε τομείς όπως την γεωργία, μεταλλουργία, φυσική και σε εφαρμογές επιτήρησης και παρακολούθησης.



Εικόνα 4.2 Ένας υπερφασματικός (Hyper-spectral) κύβος.

- **Ultra-Spectral** : περιλαμβάνει μετρήσεις σε πολύ λεπτές λωρίδες. Αυτή η κατηγορία μας δίνει πολύ υψηλή φασματική πληροφορία και περιέχει μεγάλο αριθμό δεδομένων. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της Ultra-Spectral έναντι της Hyper-spectral είναι μια σημαντική μείωση του ρυθμού δεδομένων και του όγκου. Η Ultra-Spectral απεικόνιση αποσπά και αποθηκεύει μόνο την πληροφορία που είναι στο διάνυσμα δεδομένων.



Εικόνα 4.3 Οι κατηγορίες φασματικής απεικόνισης.

Οι φασματικές εικόνες κύβων είναι παρόμοιες με το σύνολο των εικόνων ενός αντικειμένου, όπου κάθε εικόνα αποκτάται σε μία στενή φασματική ζώνη (μπάντα). Κάθε pixel στους κύβους εικόνων απεικονίζει το φάσμα σε εκείνο το σημείο. Διαφορετικά υλικά έχουν διαφορετική μοριακή δομή και συνεπώς διαφορετικά φάσματα. Έτσι, μπορούμε να αποκτήσουμε διαφορετικές φασματικές αποκρίσεις για κάθε είδος υλικού. Τα φάσματα αυτά αποτελούν τις φασματικές υπογραφές (spectral signature) για γνωστά υλικά, όπως το χρώμα, το νερό, η βλάστηση κ.τ.λ.

4.2 Μικροσκοπία [31]

Μικροσκοπία είναι ο τεχνικός τομέας που χρησιμοποιεί μικροσκόπια για να δει δείγματα ή αντικείμενα. Υπάρχουν τρεις γνωστοί κλάδοι της μικροσκοπίας:

- η οπτική μικροσκοπία,
- η ηλεκτρονική μικροσκοπία,
- η μικροσκοπία σάρωσης καθετήρα.

Η οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία περιλαμβάνουν την διάθλαση, ανάκλαση και περίθλαση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας περιστασιακά πάνω στο αντικείμενο της μελέτης και την συνεπακόλουθη συλλογή της ακτινοβολίας που έχει υποστεί σκέδαση προκειμένου να δημιουργηθεί μια εικόνα. Αυτή η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί από το ευρύ πεδίο ακτινοβολίας του δείγματος (για παράδειγμα μικροσκοπία πρότυπου φωτός και μετάδοση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας) ή με σάρωση μιας ακτίνας πάνω από το δείγμα. Η μικροσκοπία σάρωσης καθετήρα περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μιας σάρωσης καθετήρα με την επιφάνεια ή το αντικείμενο του ενδιαφέροντος.

4.2.1 Μικροσκόπιο

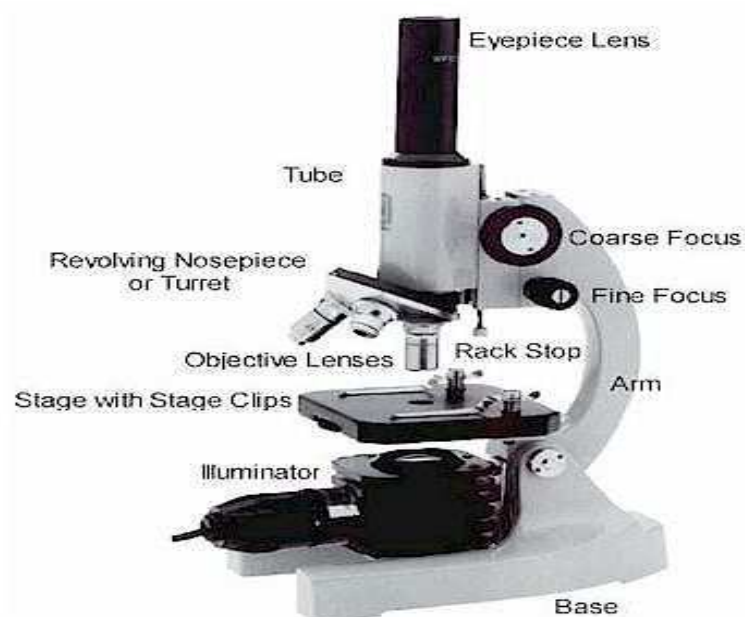
Μικροσκόπιο (ελληνικά: μικρόν (μ) = + σκοπε μικρό; v (skopein) = δούμε ή να δείτε) είναι ένα μέσο για την προβολή αντικειμένων που είναι πολύ μικρά για να δούμε με γυμνό μάτι ή από μόνα τους. Το μικροσκόπιο μεγεθύνει και επιλύει την εικόνα ενός αντικειμένου που διαφορετικά θα ήταν αόρατη με γυμνό μάτι. Αυτά τα αντικείμενα περιλαμβάνουν στοιχεία όπως το ανθρώπινο δέρμα, τα κύτταρα ενός ζωντανού οργανισμού, τα κύτταρα μικροοργανισμών (όπως τα βακτήρια, τα πρωτόζωα και οι ιοί), τα μεμονωμένα μόρια και άτομα. Ήταν ο **Anton van Leeuwenhoek** (Λέβενχουκ) ο πρώτος άνθρωπος που έκανε χρήση του μικροσκοπίου, εξέτασε τον μικροσκοπικό κόσμο και ανακάλυψε μικροσκοπικά ζώα όπως φυτά και βακτήρια σε μια σταγόνα νερού. Εξέτασε τα αιμοφόρα κύτταρα και πως κινούνται καθώς και τον κύκλο ζωής των εντόμων. Λόγω του πρωτοποριακού έργου του, ο Leeuwenhoek συχνά αποκαλείται "ο πατέρας της μικροσκοπίας" [32]- [33]-[37].

4.2.2 Τα συστατικά μέρη του μικροσκοπίου [34,35,36]

Τα μέρη από τα οποία αποτελείται το μικροσκόπιο είναι τα εξής:

- **Eyepiece Lens** (προσοφθάλμιο φακός): οι φακοί στο πάνω μέρος του μικροσκοπίου μέσα από τους οποίους βλέπουμε. Συνήθως προκαλούν μεγέθυνση ίση με 10 ή 15 φορές. Το eyepiece ουσιαστικά είναι ένας κύλινδρος που περιέχει δύο ή περισσότερους φακούς προκειμένου να φέρουν την εικόνα σε εστίαση για το μάτι και είναι τοποθετημένος στο άνω άκρο του σωλήνα. Οι προσοφθάλμιοι φακοί (Eyepieces) είναι ανταλλάξιμοι και πολλοί διαφορετικοί μπορούν να εισαχθούν με διαφορετική μεγέθυνση ο καθένας.
- **Tube** (σωλήνας ή κορμός): συνδέει τους οφθαλμικούς φακούς (Eyepiece Lens) με τους αντικειμενικούς (Objective Lens).
- **Arm** (βραχίονας): υποστηρίζει τον σωλήνα και τον συνδέει με την βάση του μικροσκοπίου. Τοποθετημένοι στον βραχίονα είναι οι έλεγχοι για την εστίαση, συνήθως ένα μεγάλος knurled τροχός για να επιτυγχάνει χονδροειδή εστίαση, μαζί με ένα μικρότερο τροχό για να ελέγχει το βαθμό εστίασης (πιο ακριβής εστίαση).
- **Base** (βάση): το κάτω μέρος του μικροσκοπίου που χρησιμοποιείται για την στήριξη του.
- **Illuminator** (πηγή φωτισμού): Μια σταθερή πηγή φωτισμού (110 volts) χρησιμοποιείται στη θέση ενός καθρέπτη. Αν το μικροσκόπιο έχει έναν καθρέπτη αυτός χρησιμοποιείται για να αντανάκλα το φως από μια εξωτερική πηγή φωτισμού μέσω του πάτου του σταδίου.
- **Stage** (στάδιο): η επίπεδη πλατφόρμα όπου τοποθετούνται οι διαφάνειες. Σταθεροποιούμε τις διαφάνειες με κλιπς πάνω στο στάδιο ώστε να μένουν στη θέση τους. Αν το μικροσκόπιο έχει ένα μηχανικό στάδιο, θα μπορούμε να μετακινήσουμε τη διαφάνεια γύρω από μια καμπή δύο κομβίων. Η μία θα τις μετακινεί αριστερά και δεξιά και η άλλη πάνω κάτω.
- **Revolving Nosepiece or Turret** (περιστρεφόμενη θέση αντικειμενικού φακού ή πυργίσκος): Αυτό είναι το τμήμα που κρατάει δύο ή περισσότερους αντικειμενικούς φακούς και μπορεί να περιστραφεί για να αλλάξει εύκολα την ισχύ.

- **Objective Lenses** (αντικειμενικοί φακοί): Συνήθως υπάρχουν 3 ή 4 αντικειμενικοί φακοί σε ένα μικροσκόπιο. Αυτοί είναι σχεδόν πάντα 4x, 10X, 40x και 100X ισχύος. Σε συνδυασμό με 10X (συνηθέστερη) eyepiece φακό, θα έχουμε συνολικές μεγεθύνσεις 40x (4x φορές 10X), 100X, 400X και 1000x. Ο μικρότερος φακός είναι με την χαμηλότερη ισχύ, ενώ ο μεγαλύτερος είναι με τη μεγαλύτερη ισχύ. Η υψηλής ισχύος αντικειμενικοί φακοί είναι αναίρεσιμοι (δηλαδή 40XR). Αυτό σημαίνει ότι εάν μια διαφάνεια 'χτυπηθεί', το τέλος του φακού θα μπει μέσα προστατεύοντας έτσι το φακό και τη διαφάνεια. Όλες οι ποιότητες των μικροσκοπίων έχουν αχρωματικούς, parcentered, parfocal φακούς.
- **Rack Stop:** Αυτή είναι μια ρύθμιση που καθορίζει πόσο κοντά στον αντικειμενικό φακό θα βρίσκεται η διαφάνεια (slide). Τοποθετείται από το εργοστάσιο και μπορούμε να το ρυθμίσουμε εάν χρησιμοποιούμε λεπτές διαφάνειες και δεν είμαστε σε θέση να επικεντρώσουμε το δείγμα σε υψηλή ισχύ. (Συμβουλή: Αν χρησιμοποιείτε λεπτές πλάκες και δεν μπορείτε να επικεντρωθείτε, αντί να προσαρμόσετε το **Rack Stop**, τοποθετήστε μια καθαρή γυάλινη διαφάνεια υπό την αρχική διαφάνεια για να τεθεί λίγο ψηλότερα).
- **Condenser Lens** (συγκεντρωτικός φακός): Ο σκοπός αυτού είναι να εστιάσει το φως πάνω στο δείγμα. Ο συγκεντρωτικός φακός είναι πιο χρήσιμος σε ανώτατες ισχύς (400X και άνω). Μικροσκόπια με συγκεντρωτικό φακό στο στάδιο καθιστούν ευκρινέστερη την εικόνα από εκείνα χωρίς συγκεντρωτικό φακό (σε 400X). Εάν το μικροσκόπιο μας έχει μέγιστη ισχύ (400X), μπορούμε να πάρουμε μέγιστο όφελος χρησιμοποιώντας συγκεντρωτικό φακό που κυμαίνεται σε 0,65 NA ή μεγαλύτερο.
- **Diaphragm or Iris:** .το διάφραγμα αυτό βρίσκεται κάτω από το στάδιο (stage) έχει τρύπες διαφορετικού μεγέθους και χρησιμοποιείται για να διαφοροποιεί την ένταση και το μέγεθος του κώνου φωτός που προβάλλεται πάνω από την διαφάνεια. Δεν υπάρχει κανόνας που αφορά την ρύθμιση που θα χρησιμοποιηθεί για μια συγκεκριμένη ενέργεια. Αντίθετα, η ρύθμιση είναι συνάρτηση της διαφάνειας του υποδείγματος, του βαθμού αντίθεσης που επιθυμούμε και των αντικειμενικών φακών που χρησιμοποιούνται.



Εικόνα 4.4 Τα συστατικά μέρη του οπτικού μικροσκοπίου.

4.2.3 Είδη μικροσκοπίου

Υπάρχουν βασικά δύο τύποι μικροσκοπίων, υψηλής ισχύος και χαμηλής ισχύος. Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ένα υψηλής ισχύος μικροσκόπιο για να εξετάσουμε πολύ μικρά πράγματα όπως τα βακτήρια, κύτταρα του αίματος, τη ζωή στην μικρή λίμνη, κύτταρα εντόμων και άλλα. Τα χαμηλής ισχύος μικροσκόπια χρησιμοποιούνται για να δούμε πράγματα μεγαλύτερα όπως μια μέλισσα, μια μύγα, ύφασμα υφάνσεως, νομίσματα, γραμματόσημα και κόκκοι άμμου. Πέρα από αυτήν την κατηγοριοποίηση έχουμε τα εξής είδη μικροσκοπίου:

- ✓ **Στερεοσκοπικό μικροσκόπιο:** Ποικίλα μήκη κύματος του φωτός χρησιμοποιούνται για ειδικούς σκοπούς, για παράδειγμα, στη μελέτη του βιολογικού ιστού ενώ συχνά χρησιμοποιείται το υπεριώδες φως για το φωτισμό του αντικειμένου που εξετάζεται προκειμένου να διεγείρει φθορισμό (CCD).
- ✓ **Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο:** Δύο σημαντικές παραλλαγές των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων είναι οι παρακάτω:
 1. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης : εξετάζει την επιφάνεια ογκώδη αντικειμένων σαρώνοντας την με μια δέσμη ηλεκτρονίων και μετρώντας την ανάκλαση.
 2. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης : περνάει τα ηλεκτρόνια εντελώς μέσα από το δείγμα, ανάλογα με την βασική οπτική μικροσκοπία.
- ✓ **Ακουστικό μικροσκόπιο:** Χρησιμοποιεί ηχητικά κύματα για τη μέτρηση διακυμάνσεων στην ακουστική εμπόδιση (impedance).
- ✓ **Μικροσκόπιο φθορισμού:** Αντί για ανάκλαση και απορρόφηση φωτός χρησιμοποιείται ο φθορισμός και ο φωσφορισμός.
- ✓ **Μικροσκόπιο κάμερα:** Πρόκειται για μια ψηφιακή συσκευή λήψης βίντεο που βασίζεται στο οπτικό μικροσκόπιο και είναι εξοπλισμένο με USB ή καλώδιο AV.
- ✓ **Σύνθετο μικροσκόπιο:** Είναι ο πιο διαδεδομένος τύπος μικροσκοπίου και έχει περισσότερους από 1 φακούς. Η εφεύρεση του σύνθετου μικροσκοπίου οφείλεται στον Ολλανδό Zacharias Janssen γύρω στο 1590. Το σύνθετο μικροσκόπιο χρησιμοποιεί φακούς και φως για την μεγένθυση της εικόνας και ονομάζεται επίσης οπτικό ή light μικροσκόπιο.

4.3 Σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης (MuSIS) και οπτικό μικροσκόπιο

4.3.1 Σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης (MuSIS) [42,43]

Η πειραματική διαδικασία που υλοποιήσαμε έγινε με την χρήση ενός υπερφασματικού συστήματος απεικόνισης (MuSIS) και ενός οπτικού μικροσκοπίου. Ο Dr. Μπάλας και μια ομάδα διακεκριμένων επιστημόνων κατασκεύασαν έναν ολο-οπτικό μονοχρωμάτορα που λειτουργεί σαν ένα ηλεκτρονικά στενής μπάντας οπτικό φίλτρο. Η μετατόπιση των οπτικών στοιχείων από το φίλτρο αυτό εκτελείται με τη βοήθεια ηλεκτρομηχανικών χειρισμών που ελέγχονται από τον υπολογιστή μέσω ενός

μικροελεγκτή. Συγκεκριμένα, το σύστημα απεικόνισης MuSIS (εικόνα 4.5) έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά γνωρίσματα:

- Παράγει φασματικές εικόνες 5nm Full Width Half Maximum (FWHM), με βήμα ρύθμισης 3nm, στη φασματική ζώνη 360nm – 1550nm, περίπου 20nm πλάτους η κάθε μια από τις 34 συνολικές φασματικές μπάντες.
- Πραγματοποιεί λήψη σε πραγματικό χρόνο και έκθεση εικόνων με ανάλυση 1600x1200 pixels.
- Ο συντονισμός του φασματικού εύρους ταιριάζει με το φασματικό εύρος της δυνατότητας απόκρισης (responsivity) του CCD (Charge Couple Device), με την δυνατότητα επέκτασης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, μέχρι και τη μέση-υπέρυθρη περιοχή.
- Ο μονοχρωμάτορας είναι συνδεδεμένος με μια ασπρόμαυρη CCD κάμερα, βασισμένη στο πρωτόκολλο μετάδοσης δεδομένων 1394 της IEEE, το οποίο μπορεί να παράγει τις εικόνες σε ένα ποσοστό 15 frames/s σε πλήρη ανάλυση και περισσότερων από 30 frames/s σε VGA ανάλυση.
- Η ελάχιστη εκπομπή είναι 40% κατά μήκος της φασματικής περιοχής, που καθορίζει την υψηλή έξοδο του μονοχρωμάτορα.
- Το σύστημα λειτουργεί σε δύο καταστάσεις, την κατάσταση της φασματοσκοπίας και την κατάσταση της φασματομετρίας.
- Ο φωτισμός πραγματοποιείται από 2 λάμπες αλογόνου 250W.
- Μια ειδική διαδικασία βαθμονόμησης (calibration) εκτελείται πριν από κάθε απεικονιστική διαδικασία. Ως δείγμα βαθμολόγησης χρησιμοποιείται μια πλάκα Ba₂SO₄ με ενιαίο συντελεστή ανάκλασης στη φασματική ζώνη 400- 1000 nm.



Εικόνα 4.5 Η κάμερα MuSIS.

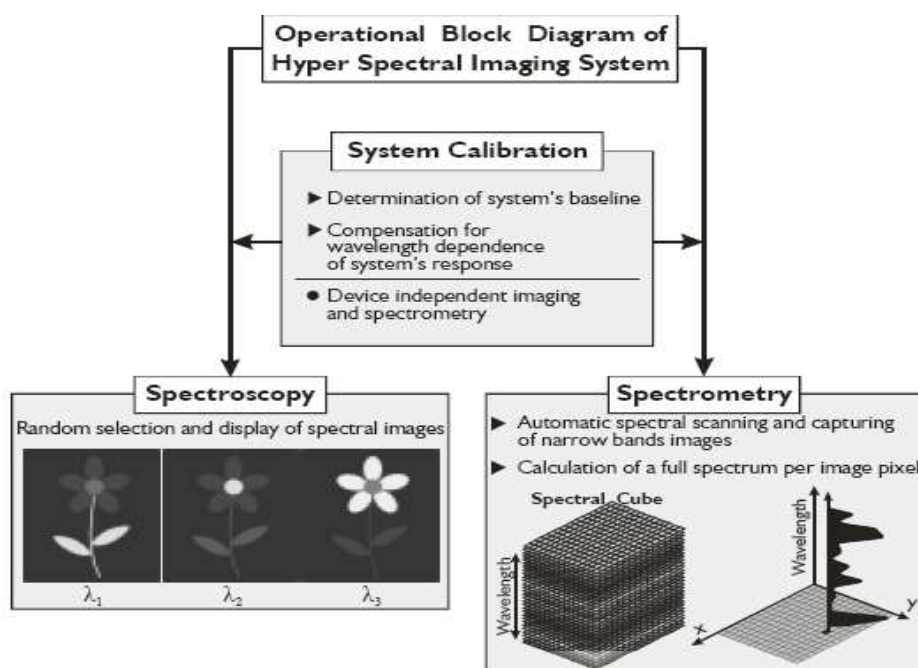
Ο έλεγχος του συστήματος και η φασματική ανάλυση της εικόνας πραγματοποιείται από ένα ειδικά αναπτυγμένο λογισμικό. Το σύστημα λειτουργεί σε δύο καταστάσεις, αυτή της φασματοσκοπίας και της φασματομετρίας (εικόνα 4.6). Η φασματοσκοπία επιτρέπει την τυχαία επιλογή και την απεικόνιση των επιθυμητών φασματικών εικόνων, σε πραγματικό χρόνο, ενώ η κατάσταση της φασματομετρίας εκτελεί συγχρονισμένα τη φασματική σύλληψη και ανίχνευση της εικόνας και επομένως τον υπολογισμό ενός πλήρους φάσματος ανά εικονοστοιχείο εικόνας. Τόσο στην φασματοσκοπία όσο και στην φασματομετρία απαιτείται μια ειδική διαδικασία βαθμονόμησης η οποία εκτελείται πριν από αυτές τις διαδικασίες απεικόνισης. Σκοπός της βαθμονόμησης είναι η αντιστάθμιση της εξάρτησης μήκους κύματος της απόκρισης των ηλεκτροπτικών μερών του συστήματος, όπως το CCD, ο φωτισμός κ.τ.λ. Η διαδικασία βαθμονόμησης είναι κοινή για όλα τα πειράματα που γίνονται με την χρήση του MuSIS. Αυτή γίνεται ως εξής :

- Το δείγμα τοποθετείται στο οπτικό πεδίο του φακού και η γκρι τιμή του κεντρικού τομέα της εικόνας αναπαρίσταται σε πραγματικό χρόνο.
- 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. Έτσι εξασφαλίζεται 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.

Αυτές οι ρυθμίσεις καθορίζουν το επίπεδο ευαισθησίας του συστήματος, το οποίο αυξάνεται όσο το μήκος κύματος απεικόνισης συντονίζεται σε μικρότερα ή μεγαλύτερα μήκη κύματος από τη ζώνη μηκών κύματος στην οποία η μέγιστη ρυθμαπόδοση του φωτός και η αποδοτικότητα του συστήματος λαμβάνονται. Έτσι η απόκριση του συστήματος είναι σχεδόν ανεξάρτητη από το μήκος κύματος, εξασφαλίζοντας κατά συνέπεια φασματική απεικόνιση και φασματομετρία ανεξάρτητες από τη συσκευή. Οι αποθηκευμένες φασματικές εικόνες του άσπρου δείγματος χρησιμοποιούνται προκειμένου να διορθώσουν την ανωμαλία της φωτεινότητας της εικόνας λόγω της ανομοιόμορφης συνάρτησης μεταφοράς της οπτικής. Με το τρέξιμο του τμήματος κώδικα για την κατάσταση της φασματομετρίας που ακολουθεί, το σύστημα εκτελεί συγχρονισμένα τη ρύθμιση του μήκους κύματος απεικόνισης της εικόνας και τη σύλληψη της εικόνας ενώ αποθηκεύει την υπό εξέταση περιοχή. Σε κάθε βήμα, η ευαισθησία του συστήματος είναι αυτόματα ρυθμισμένη σύμφωνα με τις αποθηκευμένες τιμές του διαφράγματος (shutter) και του gain. Τα φάσματα υπολογίζονται από τις γκρι τιμές της επιλεγμένης φασματικής στήλης pixel. Η χωρική ανάλυση του ανιχνευτή καθορίζει τον αριθμό των φασμάτων που μπορούν να συλλεχθούν σε ένα κύκλο πειράματος. Με την περιγεγραμμένη διαμόρφωση, ένα εκατομμύριο φάσματα μπορούν να συλλεχθούν σε περίπου δύο λεπτά χρόνου ανίχνευσης. Αυτός ο τρόπος βαθμονόμησης εφαρμόζεται κατά βάση όταν χρησιμοποιείται το υπερφασματικό σύστημα απεικόνισης.

Στην περίπτωση μας όμως που χρησιμοποιούμε το σύστημα αυτό σε συνδυασμό με το οπτικό μικροσκόπιο, η διαδικασία βαθμονόμησης εφαρμόζεται σε ένα τμήμα του πλακιδίου που δεν παρουσιάζει κανένα είδος χρωστικής. Το δείγμα δηλαδή που χρησιμοποιείται είναι ‘καθαρό’ από οποιαδήποτε χρωστική ουσία που μπορεί να επηρεάσει τα φασματικά χαρακτηριστικά του γυαλιού που

καλύπτει και ενσωματώνει το δείγμα βιοψίας,. Μάλιστα το χαρακτηριστικό φάσμα που αντιστοιχεί στο δείγμα βαθμονόμησης και πιο συγκεκριμένα σε καθαρό γυαλί είναι μια ευθεία γραμμή δηλαδή σταθερή, ανεξάρτητη του μήκους κύματος.



Εικόνα 4.6 Διάγραμμα λειτουργίας του υπερφασματικού συστήματος απεικόνισης.

4.3.2 Οπτικό μικροσκόπιο

Το οπτικό μικροσκόπιο, που συχνά αναφέρεται ως "μικροσκόπιο φως" (light microscope), είναι ένα είδος μικροσκοπίου που χρησιμοποιεί το ορατό φως καθώς και ένα σύστημα φακών που μεγεθύνει τις εικόνες από τα μικρά δείγματα. Ένα τέτοιο είδος μικροσκοπίου χρησιμοποιήσαμε και εμείς κατά την πειραματική μας διαδικασία (εικόνα 4.5). Συγκεκριμένα επειδή το υλικό προς εξέταση ήταν μικροσκοπικών διαστάσεων, κύτταρα, εφαρμόσαμε μεγέθυνση ως και 400 x προκειμένου να μπορέσουμε να διακρίνουμε ικανοποιητικά τα χαρακτηριστικά των κυττάρων. Το οπτικό μικροσκόπιο που διαθέτουμε στο εργαστήριο μας έχει υποδοχή όπου και τοποθετήσαμε την κάμερα MuSIS και ο συνδιασμός αυτών των δυο αποτέλεσε τον απαραίτητο εξοπλισμό για την υλοποίηση της πειραματικής διαδικασίας (εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7 Το σύστημα MuSIS - οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική μας διαδικασία.

4.4 Επεξεργασία υπερφασματικών δεδομένων

4.4.1 Γενικά

Η πληροφορία που μπορούμε να πάρουμε κατά την επεξεργασία των υπερφασματικών δεδομένων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον προσδιορισμό και διαχωρισμό των επι μέρους στοιχείων που εξετάζονται κάθε φορά. Αρχικά απαιτείται η απόκτηση και συγκέντρωση των φασματικών κύβων που αντιστοιχούν σε κάθε εμπλεκόμενο υλικό αφού οι κύβοι αυτοί είναι χαρακτηριστικοί για το καθένα. Στην συνέχεια γίνεται η εξαγωγή των χαρακτηριστικών (feature extraction) που περιλαμβάνει τον διαχωρισμό της χρήσιμης πληροφορίας από τον θόρυβο ή την περιττή πληροφορία και την μείωση της διάστασης των δεδομένων αφού πολλές από τις μετρούμενες μεταβλητές δεν είναι χρήσιμες. Με μαθηματική έννοια, το πρόβλημα της μείωσης της διάστασης μπορεί να εκφραστεί ως εξής : δοθέντος μιας M -διάστατης τυχαίας μεταβλητής $x=[x_1 \ x_2 \ \dots \ x_M]$, βρίσκουμε μια αναπαράσταση μικρότερης διάστασης $y=[y_1 \ y_2 \ \dots \ y_K]$ με $K < M$ που περιέχει την πληροφορία που μας ενδιαφέρει από τα αρχικά μας δεδομένα σύμφωνα με κάποιο κριτήριο προκειμένου να απλοποιήσουμε τους υπολογισμούς που απαιτούνται. Τέλος εφαρμόζουμε μια μέθοδο ταξινόμησης για την παραγωγή ενός ψευδοχρωματικού χάρτη (4.5.2) που θα μας δώσει οπτικά την πληροφορία που αναζητούμε.

4.4.2 Ταξινόμηση δεδομένων (classification)

Η διαδικασία ταξινόμησης περιλαμβάνει την αντιστοίχιση (απόδοση) κάθε εικονοστοιχείου (pixel) της εικόνας σε μία από την λίστα κλάσεων. Έτσι θα πρέπει να δημιουργείται μια ικανοποιητικά μεγάλη λίστα απο κλάσεις προκειμένου να περιλαμβάνεται μια κλάση στην οποία θα μπορεί να αντιστοιχίζεται το κάθε δεδομένο. Επιπλέον οι κλάσεις θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από πληρότητα και ακρίβεια.

Η ταξινόμηση περιλαμβάνει δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, προσδιορίζεται ο αριθμός και η φύση των κλάσεων ενώ στο δεύτερο κάθε άγνωστο ή μη εμφανές στοιχείο αποδίδεται σε μια από αυτές τις κλάσεις σύμφωνα με το επίπεδο ομοιότητας που παρουσιάζουν. Αυτά τα στάδια ονομάζονται αναγνώριση (identification) και ταξινόμηση (classification) αντίστοιχα. Σκοπός της ταξινόμησης είναι η δημιουργία ενός αυτοματοποιημένου συστήματος που ταξινομεί τα δεδομένα μας, καταλήγοντας σε έναν ψευδοχρωματικό χάρτη (pseudo – colourmap) όπου κάθε χρώμα αντιπροσωπεύει pixel με όμοια φασματικά χαρακτηριστικά. Ο βαθμός ομοιότητας προσδιορίζεται από τον αλγόριθμο ταξινόμησης και την συνάρτηση απόφασης που χρησιμοποιείται.

Οι τεχνικές ταξινόμησης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε επεμβατικές (supervised) και μη-επεμβατικές (unsupervised) ανάλογα με το αν επεμβαίνει ή όχι ο χρήστης στην διαδικασία ταξινόμησης. Η supervised μέθοδος είναι η πιο κατάλληλη όταν τα αποτελέσματα των δεδομένων που ο χρήστης θέλει να προβλέψει είναι γνωστά εκ των προτέρων. Η supervised ταξινόμηση μπορεί να οριστεί ως η διαδικασία αναγνώρισης και προσδιορισμού αγνώστων αντικειμένων χρησιμοποιώντας τη φασματική πληροφορία που προκύπτει από τα δείγματα εκπαίδευσης που έχει ορίσει ο ίδιος ο χρήστης. Με αυτήν την μέθοδο δηλαδή εκμεταλλευόμαστε την εκ των προτέρων γνώση των φασματικών χαρακτηριστικών από ορισμένα αντικείμενα και χρησιμοποιούμε την πληροφορία αυτή σαν σύνολο εκπαίδευσης για το σύστημά μας. Οι επιδόσεις ενός τέτοιου ταξινομητή μετρούνται από την ακρίβεια στο να δοθεί η σωστή κλάση στις γνωστές εισόδους που δεν χρησιμοποιήθηκαν στο training. Πολλά διαφορετικά είδη ταξινομητών υπάρχουν, συμπεριλαμβανομένων των γραμμικών ταξινομητών, δέντρων αποφάσεων, k-πλησιέστερου γείτονα ταξινομητών, νευρωνικά δίκτυα και support vector machines (SVM).

Από την άλλη, η unsupervised μέθοδος είναι πιο χρήσιμη όταν ο χρήστης δεν γνωρίζει τις υποδιαιρέσεις στις οποίες τα δεδομένα μπορούν να διαιρεθούν. Η διαίρεση μπορεί να μην είναι προφανής επειδή το πρόβλημα είναι καινούργιο και ο χρήστης δεν έχει προηγούμενη εμπειρία. Ουσιαστικά, η μέθοδος αυτή ψάχνει για φυσικές κλάσεις που ονομάζονται clusters που προσδιορίζονται από τις σχετικές θέσεις των pixels στο χώρο. Έτσι τα pixels της εικόνας με παρόμοια στατιστικά και φασματικά χαρακτηριστικά αυτόματα ομαδοποιούνται σε αυτές τις ομάδες (clusters). Η βασική διαφορά των δυο μεθόδων είναι ότι η supervised ταξινόμηση απαιτεί τη χρήση δειγμάτων εκπαίδευσης.

Οι μέθοδοι υποδιαιρούνται επιπλέον σε παραμετρικές και μη-παραμετρικές. Στην παραμετρική ταξινόμηση τα γνωρίσματα της κάθε τάξης ορίζονται από την PDF (συνάρτηση πυκνότητας πιθανότητας) της τάξης, οπότε οι παράμετροί της πρέπει να είναι γνωστοί ή να προσδιορίζονται στη διαδικασία της εκπαίδευσης. Οι παραμετρικές μέθοδοι είναι γενικά πιο δραστικές από τις μη παραμετρικές και οδηγούν σε μεγαλύτερη συνολικά ακρίβεια ταξινόμησης αν τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται ικανοποιούν το παραμετρικοποιημένο μοντέλο. Αντίθετα στην μη παραμετρική ταξινόμηση, η PDF της κάθε τάξης δεν μας ενδιαφέρει. Οι πιο απλές μορφές ταξινομητή βασίζονται σε

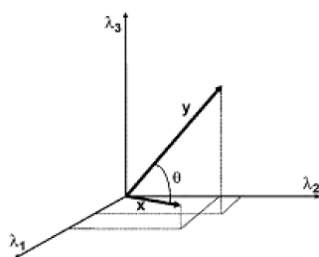
μη παραμετρικές μεθόδους επειδή αυτοί οι αλγόριθμοι δεν κάνουν υποθέσεις σχετικά με την πιθανότητα κατανομής των δεδομένων και συχνά θεωρούνται εύρωστοι αφού μπορούν να δουλέψουν ικανοποιητικά για μια μεγάλη ποικιλία κλάσεων. Οι μη παραμετρικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την ταξινόμηση ελάχιστης απόστασης, μη στατιστικές μεθόδους όπως neural network, support vector machines, decision trees.

4.5 Αλγόριθμοι ταξινόμησης

Η ταξινόμηση των pixels της εικόνας μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους. Στη μελέτη αυτή ακολουθήσαμε τις εξής :

➤ *Spectral Angle Mapper (SAM) [38]*

Πρόκειται για έναν μη παραμετρικό, supervised ταξινομητή. Ο αλγόριθμος SAM θεωρεί κάθε pixel της φασματικής εικόνας σαν ένα διάνυσμα με το μήκος αυτού να αντιστοιχεί στην φωτεινότητα που παρουσιάζει το pixel και η κατεύθυνση του διανύσματος να αναπαριστά τα φασματικά χαρακτηριστικά του pixel αυτού. Κατά την ταξινόμηση με αυτήν την μέθοδο, γίνεται σύγκριση των γωνιών ανάμεσα στο pixel – διάνυσμα και ορισμένα διανύσματα αναφοράς και το κάθε pixel ταξινομείται στην κλάση που αναπαριστάται από το διάνυσμα αναφοράς που οδηγεί στην μικρότερη γωνία. Έστω x, y μη αρνητικά δεδομένα M -διάστασης. Ο SAM υπολογίζει την γωνία μεταξύ των δύο φασμάτων ως εξής :



$$\langle x, y \rangle = \|x\| \|y\| \cos(\theta) \rightarrow$$

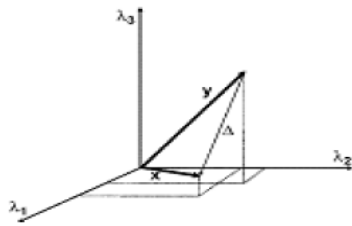
$$\theta(x, y) = SAM(x, y) = \cos^{-1} \left(\frac{\langle x, y \rangle}{\|x\| \|y\|} \right), \quad 0 \leq \theta \leq \frac{\pi}{2}$$

Εικόνα 4.6 Αναπαράσταση διανυσμάτων δύο φασμάτων για 3 διαφορετικά λ .

Ο SAM για τον υπολογισμό της γωνίας μεταξύ του pixel που εξετάζεται και των διανυσμάτων αναφοράς χρησιμοποιεί μόνο την κατεύθυνση του διανύσματος και όχι το μήκος του και γι' αυτό είναι ανεξάρτητος από τον φωτισμό. Επίσης, είναι ανεξάρτητος του πολλαπλασιασμού ενός διανύσματος με μια φυσική ποσότητα αφού ο πολλαπλασιασμός αυτός απλά αυξάνει το μέγεθος του διανύσματος προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση χωρίς όμως να μεταβάλλει την γωνία που δημιουργεί με κάποιο άλλο διάνυσμα. Τέλος, ο SAM είναι μια μη-προσθετική συνάρτηση απόστασης.

➤ **Normalized Euclidean Distance (NEUC)**

Η συνηθισμένη απόσταση που θα μπορούσε κάποιος να μετρήσει μεταξύ δύο φασμάτων με τη χρήση ενός χάρακα είναι η Ευκλείδεια απόσταση. Η απόσταση αυτή μπορεί να αποδειχτεί με την επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του Πυθαγόρειου θεωρήματος (εικόνα 4.7). Έστω x, y μη αρνητικά δεδομένα M διάστασης, η ευκλείδεια απόσταση υπολογίζει την απόσταση μεταξύ των δύο φασμάτων ως εξής :



$$\Delta(x, y) = \|x - y\| = \sqrt{\sum_{i=1}^M (x_i - y_i)^2}$$

Εικόνα 4.7 Αναπαράσταση διανυσμάτων δύο φασμάτων για 3 διαφορετικά λ .

Κατά την διαίρεση της Ευκλείδειας απόστασης με τις μέσες τιμές των δειγμάτων προκύπτει η κανονικοποιημένη ευκλείδεια απόσταση (NEUC). Ο τύπος για αυτήν την μετατροπή είναι ο εξής :

$$EUC\left(\frac{x}{\bar{x}}, \frac{y}{\bar{y}}\right) = \left\| \frac{x}{\bar{x}} - \frac{y}{\bar{y}} \right\| = \sqrt{\sum_{i=1}^M \left(\frac{x_i}{\bar{x}} - \frac{y_i}{\bar{y}}\right)^2}$$

➤ **Spectral Correlation Mapper (SCM) [39]**

Έστω x, y είναι δύο M – διάστατα φάσματα και $\bar{x}, \bar{y}$ είναι οι μέσες τιμές των δειγμάτων αυτών αντίστοιχα. Η απόσταση που ο SCM υπολογίζει είναι η εξής :

$$SCM(x, y) = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$$

Ουσιαστικά η παραπάνω συνάρτηση απόστασης υπολογίζει τον λεγόμενο συντελεστή συσχέτισης Pearson, μια στατιστική μονάδα μέτρησης της ανεξαρτησίας. Η συσχέτιση κατά την θεωρία πιθανοτήτων και στατιστικής εκφράζει την δύναμη και την κατεύθυνση μίας γραμμικής σχέσης μεταξύ δύο

τυχαίων μεταβλητών. Η παραπάνω συνάρτηση είναι στην ουσία το συνημίτονο των x, y μετατοπισμένο από τις μέσες τιμές των δειγμάτων τους. Ισχύει δηλαδή η σχέση :

$$\cos(\text{SAM}(\bar{x}, \bar{y})) = \text{SCM}(x, y)$$

Ο SCM αποτελεί μία βελτιωμένη έκδοση του SAM, καθώς μπορεί να αναγνωρίζει τόσο θετική όσο και αρνητική συσχέτιση.

➤ **Spectral Information Divergence (SID) [40]**

Πρόκειται για μία μετρική απόσταση που πηγάζει από την ιδέα της απόκλισης στην θεωρία πληροφορίας. Έστω x, y υπερφασματικά διανύσματα pixel με $x = [x_1 \ x_2 \ \dots \ x_M]$, $y = [y_1 \ y_2 \ \dots \ y_M]$ που μπορούμε να μοντελοποιηθούν σε τυχαίες μεταβλητές ορίζοντας τις κατάλληλες κατανομές πιθανότητας. Έτσι τα επιθυμητά διανύσματα πιθανοτήτων που προκύπτουν από τα pixel – διανύσματα x, y αντίστοιχα είναι τα εξής :

$$p_j = \frac{x_j}{\sum_{i=1}^M x_i}, \quad q_j = \frac{y_j}{\sum_{i=1}^M y_i}, \quad \text{όπου } \mathbf{p} = \{p_m\}_{m=1}^M, \quad \mathbf{q} = \{q_m\}_{m=1}^M$$

Ο SID χρησιμοποιώντας τα $\mathbf{p}, \mathbf{q}$, ορίζεται ως :

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

$$D(\mathbf{x} \parallel \mathbf{y}) = \sum_{i=1}^M p_i \log\left(\frac{p_i}{q_i}\right) \quad \text{και} \quad D(\mathbf{y} \parallel \mathbf{x}) = \sum_{i=1}^M q_i \log\left(\frac{q_i}{p_i}\right).$$

Στην παραπάνω σχέση ο όρος $D(\mathbf{x} \parallel \mathbf{y})$ ονομάζεται σχετική εντροπία του y σε σχέση με το x , γνωστός και ως συνάρτηση πληροφορίας Kullback – Leibler. Ο SID μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μέτρηση της φασματικής ομοιότητας μεταξύ του διανύσματος που αντιστοιχεί στο pixel x και στο διάνυσμα του pixel αναφοράς y . Αυτό που κάνει ουσιαστικά ο SID είναι να βλέπει κάθε φάσμα του pixel σαν τυχαία μεταβλητή και χρησιμοποιώντας το φασματικό του ιστόγραμμα να μετράει την ασυμφωνία ή διαφορά των συμπεριφορών πιθανότητας, ανάμεσα στα φάσματά τους.

➤ **Spectral Gradient Angle (SGA) [41]**

Η φασματική κλίση (spectral gradient) περιγράφει επιφάνειες ανάκλασης και το χαρακτηριστικό γνώρισμα της είναι ότι παρουσιάζει σταθερότητα στην γεωμετρία της εικόνας για επίπεδες και διάχυτες επιφάνειες. Ο SGA είναι επίσης σταθερός στις συνθήκες φωτισμού προσδιορίζοντας έτσι υλικά με ίδιες ανακλάσεις αλλά κάτω από ποικίλες συνθήκες παρατήρησης. Ορίζεται ως εξής :

$$SGA(\mathbf{x}, \mathbf{y}) = \cos^{-1} \left(\frac{\left\langle \frac{\partial \ln[I(\mathbf{x}, \lambda)]}{\partial \lambda}, \frac{\partial \ln[I(\mathbf{y}, \lambda)]}{\partial \lambda} \right\rangle}{\left\| \frac{\partial \ln[I(\mathbf{x}, \lambda)]}{\partial \lambda} \right\| \left\| \frac{\partial \ln[I(\mathbf{y}, \lambda)]}{\partial \lambda} \right\|} \right), \quad 0 \leq \theta \leq \frac{\pi}{2}$$

$$\frac{\partial \ln[I(\mathbf{x}, \lambda)]}{\partial \lambda}, \frac{\partial \ln[I(\mathbf{y}, \lambda)]}{\partial \lambda}, \text{ τα μερικά παράγωγα των } \mathbf{x}, \mathbf{y} \text{ M-διάστατων εντάσεων σε σχέση με το } \lambda.$$

4.6 Ακρίβεια αξιολόγησης

Τα αποτελέσματα της κάθε διαδικασίας ταξινόμησης που εφαρμόζεται σε υπερφασματικά δεδομένα πρέπει να αξιολογούνται ποσοτικά, προκειμένου να καθοριστεί η ακρίβειά τους. Ο σκοπός της ποσοτικής αυτής αξιολόγησης είναι η αναγνώριση και η μέτρηση των σφαλμάτων στον χρωματικό χάρτη που προκύπτει από την ταξινόμηση. Η εκτίμηση αυτή περιλαμβάνει σύγκριση μιας περιοχής του χάρτη με την πληροφορία αναφοράς στην ίδια περιοχή, θεωρώντας τα δεδομένα αναφοράς σωστά. Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να προσδιοριστεί ο βαθμός σφάλματος στο τελικό προϊόν, το οποίο είναι συνήθως ένας θεματικός χάρτης ή μια εικόνα, με τη μέτρηση της συνολικής ακρίβειας ταξινόμησης, καθώς και τον υπολογισμό των Kappa στατιστικών για έναν αριθμό δεδομένων για δοκιμή.

Η ακρίβεια της ταξινόμησης κατά βάση μετράται από την συνολική ακρίβεια δημιουργώντας ένα confusion matrix και καθορίζοντας τα επίπεδα ακρίβειας με την διαίρεση του συνολικού αριθμού των ορθώς ταξινομημένων pixels με το συνολικό αριθμό των pixels αναφοράς. Ωστόσο, η συνολική ακρίβεια δεν δίνει καμία εικόνα για το πόσο καλά ο ταξινομητής λειτουργεί για καθεμία από τις διάφορες κλάσεις. Για αυτό η αξιολόγηση της ακρίβειας ενός ταξινομητή, είναι σημαντικό να εξεταστεί ως προς την ακρίβεια του σε κάθε επιμέρους κατηγορία. Μεμονωμένη ακρίβεια για κάθε κλάση μπορεί να προκύπτει από τη διαίρεση του συνολικού αριθμού των ορθώς ταξινομημένων pixels σε αυτή την κατηγορία με το συνολικό αριθμό των pixels της εν λόγω κλάσης.

Κεφάλαιο 5: Μέθοδοι και έρευνες ποσοτικοποίησης του καρκίνου του μαστού

5.1 Γενικά

Ο καρκίνος του μαστού είναι η επικρατούσα κακοήθεια όπου οι ογκολόγοι χρησιμοποιούν δείκτες για να τις θεραπευτικές τους επιλογές, με τους στεροειδείς υποδοχείς (steroid receptors) να χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια. Στο παρελθόν η αξιολόγηση των υποδοχέων και άλλων δεικτών γινόταν με βιοχημικές μεθόδους, DCC ή SGA. Πρόκειται για βιοχημικές μεθόδους που προσδιόριζαν ποσοτικά την συγκέντρωση των ER στα κύτταρα. Η πρακτική όμως έχει αλλάξει με την ανοσοϊστοχημεία τώρα να είναι η επικρατέστερη μέθοδος που χρησιμοποιείται. Αν και πολλοί δείκτες έχουν εκτιμηθεί, ο οιστρογονικός υποδοχέας παραμένει το πιο αξιόπιστο και καλύτερο παράδειγμα για την πρόβλεψη της θεραπευτικής απάντησης και είναι αναμφισβήτητο ο πιο σημαντικός βιοδείκτης στην κλινική ογκολογία σήμερα [45]. Περίπου το 70% έως 80% όλων των επιθετικών καρκίνων του μαστού εμφανίζουν θετικότητα προς την παρουσία των υποδοχέων αυτών (ERpositive) και ως εκ τούτου θεωρείται πιθανότερο να ανταποκριθούν στην ενδοκρινική θεραπεία. Η ορμονική κατάσταση των υποδοχέων αυτή τη στιγμή αξιολογείται από παθολόγο, με το Cutoff όριο 10% για θετικά καρκινικά κύτταρα να είναι κοινώς αποδεκτό για την πρόβλεψη ανταπόκρισης σε ανοσοενισχυτική ορμονική θεραπεία. Το εν λόγω όριο όμως μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μεταξύ των παρατηρητών μεταβλητότητα αφού η εκτίμηση είναι υποκειμενική. Η βελτίωση των τεχνολογιών της εικονικής ανάλυσης αντιμετωπίζει αυτήν την μεταβλητότητα, με την ανάπτυξη αντικειμενικά αυτοματοποιημένων ποσοτικών μοντέλων για την IHC βαθμολόγηση.

5.1.1 Συγκρίσεις μεθόδων [46]-[47]-[48]

➤ Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα βιοχημικών μεθόδων

Οι τυπικές βιοχημικές διαδικασίες για την ανίχνευση και τη μέτρηση των ER και PgR στον καρκίνο του μαστού είναι η **dextran-coated charcoal (DCC)** και η **sucrose gradient assay (SGA)**. Και στις δύο, ένα τμήμα του ιστού που επιλέγεται από τον παθολόγο ομογενοποιείται. Ρυθμιστικό pH προστίθεται και το μείγμα υπερφυγοκεντρείται (ultracentrifuged). Το επιπλέον στην επιφάνεια καλείται cytosol και χρησιμοποιείται για τη διαδικασία προσδιορισμού. Αυτό απαιτεί την προσθήκη ραδιοσημασμένου στεροειδούς και την μέτρηση αυτού που ειδικά δεσμεύεται. Το στερεό τμήμα συνήθως απορρίπτεται. Οι βιοχημικές μέθοδοι, όπως είναι οι DCC και SGA έχουν το πλεονέκτημα να εξασφαλίζουν ένα ποσοτικό αποτέλεσμα για την ποσότητα του υποδοχέα (π.χ fmole / mg πρωτεΐνης στην περίπτωση της DCC μεθόδου).

Οι μέθοδοι αυτές έχουν όμως ορισμένα εγγενή μειονεκτήματα. Κατά πρώτον, ο πυρήνας (αναμφίβολα περιέχει πολύ υπολειμματικό υποδοχέα) συνήθως δεν εξετάζεται. Σχεδόν πάντα υπάρχουν μη κακοήγη στοιχεία παρόντα, περιλαμβάνοντας το στρώμα, τις νευρικές ίνες, τα αιμοφόρα αγγεία, και τα λεμφικά κανάλια, καθώς και καλοήγη επιθήλια του μαστού. Κάθε ένα περιέχει εκχυλίσιμες

πρωτεΐνες, και το καλοήθες επιθηλιακό συστατικό συχνά περιέχει υποδοχείς στεροειδών. Ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό και εξειδικευμένος εξοπλισμός είναι απαραίτητα, και οι επιδόσεις περιορίζονται σε λίγα μεγάλα ιατρικά κέντρα και εργαστήρια αναφοράς. Το ποσό του μετρήσιμου υποδοχέα εξαρτάται από το ποσοστό του όγκου στο στρώμα και την αναλογία των καλοήθων στα κακοήγη επιθήλια. Επιπλέον, αν υπάρχουν μόνο λίγα κύτταρα του παρόντος όγκου η μετρήσιμη ποσότητα του υποδοχέα μπορεί να είναι κάτω από τα όρια ευαισθησία της δοκιμασίας. Οι περισσότερες βιοχημικές δοκιμασίες απαιτούν μεταξύ 250 mg και 1,0 g ιστού. Επιπλέον, εάν υπάρχουν πολλά καλοήγη επιθηλιακά κύτταρα, αρκετός υποδοχέας μπορεί να οδηγήσει το cytosol να δώσει ένα θετικό αποτέλεσμα ακόμη και αν τα κύτταρα του όγκου είναι αρνητικά.

Αυτό που είναι ακόμη πιο αρνητικό είναι ότι η βιοχημική δοκιμή στον υποδοχέα δεν μπορεί να αξιολογήσει την ανομοιογένεια των μεμονωμένων υποδοχέων των κυττάρων και όπως θα αποδειχθεί αργότερα, αυτή μπορεί να είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος. Οι παράγοντες αυτοί οδήγησαν σε μεθόδους με βάση την ιστολογία, και την ανάπτυξη των μονοκλωνικών αντισωμάτων για ER και PGR που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε fixed ιστούς και να εφαρμόζονται σε συνθήκες ρουτίνας.

➤ Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα ανοσοϊστοχημείας

Η ανοσοϊστοχημεία θα μπορούσε εύκολα να εφαρμοστεί σε πολύ μικρά δείγματα (fine needle and core needle biopsies). Η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι συγκρίσιμη με άλλες ανοσολογικές που συνήθως εκτελούνται στα εργαστήρια χειρουργικής παθολογίας. Επιτρέπει διάκριση των υποδοχέων σε καλοήγη έναντι κακοήγη κυττάρων και επιτρέπει μια εκτίμηση της ετερογένειας των κυτταρικών υποδοχέων του όγκου. Ένα θετικό κύτταρο μπορεί εύκολα να διακριθεί μεταξύ 500 αρνητικών κυττάρων. Η προετοιμασία του υπό εξέταση ιστού είναι περισσότερο ή λιγότερο μόνιμη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά. Επιπλέον, δεν απαιτείται εξειδικευμένος εξοπλισμός και η προετοιμασία αυτή θα μπορούσε να γίνει από τους τεχνικούς της ιστολογίας που είναι ειδικοί σε ανοσοϊστοχημικές διαδικασίες. Τέλος, η ανοσοϊστοχημεία ως μέθοδος για την ανίχνευση των ER δίνει καλύτερα αποτελέσματα από τις βιοχημικές δοκιμασίες σε σχέση με τον τύπο και τη διάρκεια της ανταπόκρισης του μεταστατικού καρκίνου του μαστού στην πρώτη γραμμή θεραπείας με ταμοξιφαίνη.

Όπως συμβαίνει με όλες τις εργαστηριακές δοκιμές, οι ανοσοϊστοχημικές δοκιμασίες στεροειδών ορμονών έχουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως και απαιτήσεις. Είναι πολύ δύσκολο να παράγει αριθμητικά αποτελέσματα ισοδύναμα με την fmole / mg πρωτεΐνης που διατίθενται από βιοχημικές τεχνικές, ακόμη και αν μπορεί μερικές φορές να είναι αβάσιμα. Είναι σημαντικό να αναγνωρίσουμε ότι όπως υπάρχει ανάγκη για την άμεση δέσμευση και αποθήκευση του όγκου δείγματος για να προκύψει ακριβές βιοχημικό αποτέλεσμα, υπάρχει μεγάλη ανάγκη για ταχεία βύθιση του δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης για τη διατήρηση των επιτόπων ώστε να αναγνωρισθούν από την ιστοχημική μέθοδο. Από την άλλη, παρατεταμένη διατήρηση σε φορμόλη μπορεί να μετουσιώσει αυτούς τους επιτόπους σε τέτοιο βαθμό που μια μεγαλύτερη περίοδος ανάκτησης του αντιγόνου (antigen retrieval) να είναι απαραίτητη. Έτσι ακόμη και στην ανοσοϊστοχημεία έχουν μεταβιβαστεί και παρουσιάζονται κάποια προβλήματα των βιοχημικών τεχνικών εφόσον απαιτεί προετοιμασία του εξεταζόμενου όγκου.

Μελέτες από μεγάλα κέντρα έχουν δείξει ότι η ανοσοϊστοχημεία ως μέθοδος για την ανίχνευση των ER είναι πιο ευαίσθητη από την DCC για καρκίνους σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, και γενικότερα η ανοσοϊστοχημεία για ER και PgR έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα σε σύγκριση με την βιοχημική αποφασιστικότητα.

Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των βιοχημικών μεθόδων και της μεθόδου της ανοσοϊστο-χημείας συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Table 1. Comparison of immunocytochemical and cytosol assays

Immunohistochemistry	
Advantages	Disadvantages
Works on routine, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue	Subjective, semi-quantitative assessment
No extra tissue required	All receptors demonstrated may not be functional
Can be used on archival material for retrospective analysis	Limited standardisation and quality control of the assay
Possible to assay very small tumours routinely	No agreement on the method of evaluation of staining
Possible to do the assay on FNAs and needle core biopsies so it is possible to monitor receptor status during therapy	No agreement on the correct cut-off value between positive and negative
Possible to ensure that the tissue section contains tumour	
Possible to relate receptor content to morphology	
Increased specificity because (a) positive cells can be recognised in tumours of low cellularity; and (b) false positive results due to ER in adjacent normal tissue can be avoided	
Knowledge of intra-tumour heterogeneity	
Internal quality control for ER-negative tumours if some normal tissue (which stains positively) is included in the section	
Cytosol assays	
Advantages	Disadvantages
Objective assessment with numerical results and good reproducibility	Relatively large amounts of tissue required
Technically and clinically validated	Care must be taken over the conditions of storage and assay
Good quality control schemes available	LBA is labour intensive and time consuming and uses radioactivity
LBA measures functional receptors	EIA kits are expensive
	May underestimate ER content if there is a large number of receptors occupied by oestradiol or if the tumour is sparsely cellular
	May overestimate ER content if there is a large amount of ER in surrounding normal tissue
	No exact control of quality of sample so there is the possibility of false negative results due to assay of non-tumour tissue

ER, oestrogen receptor(s); LBA, ligand-binding assay; EIA, enzyme immunoassay; FNA, fine needle aspirates.

Πίνακας 5.1 Τα πλεονεκτήματα και οι διαφορές των μεθόδων ποσοτικοποίησης των ER.

5.2 Μελέτες που έχουν γίνει για τον εντοπισμό των ER

Πολλές είναι οι έρευνες που έχουν γίνει κατά καιρούς για την αξιολόγηση της κατάστασης των ER στα κύτταρα αφού οι οιστρογονικοί υποδοχείς έχουν αποδειχτεί ότι αποτελούν σημαντικό δείκτη για την πρόβλεψη της αντίδρασης των ασθενών στην ορμονική θεραπεία [52]. Όπως προαναφέραμε, τις

τελευταίες δεκαετίες η εκτίμηση της κατάστασης των ER γίνεται με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Αυτό σημαίνει ότι δείγματα βιοψίας χρωματίζονται με κάποιες χρωστικές οι οποίες έχουν την ιδιότητα να εντοπίζουν, να αναγνωρίζουν και να χρωματίζουν συγκεκριμένα στεροειδή μόρια όπως είναι και οι οιστρογονικοί υποδοχείς. Στην κλινική μελέτη, η αξιολόγηση των ER σε IHC δείγματα που εξετάζονται γίνεται με βάση την υποκειμενική εκτίμηση του παθολόγου που τα εξετάζει κάθε φορά. Αυτό όμως εμπεριέχει πολλούς κινδύνους αφού παρατηρείται μεταβλητότητα των αξιολογήσεων όχι μόνο από δείγμα σε δείγμα αλλά και στο ίδιο δείγμα. Κάθε γιατρός οπτικά αναγνωρίζει και κατά συνέπεια ποσοτικοποιεί με τον δικό του υποκειμενικό τρόπο τα εξεταζόμενα δείγματα και αυτή η ποσοτικοποίηση συνήθως αφορά το ποσοστό των κυττάρων που είναι θετικά ως προς την παρουσία ER σε αυτά.

5.2.1 Αυτοποιημένα συστήματα ανάλυσης της εικόνας

Με βάση την επιτακτική ανάγκη για ακριβή προσδιορισμό των χρωστικών ER, η χρήση της ανάλυσης των εικόνων (image analysis) αναγνωρίστηκε ως μια βιώσιμη προσέγγιση. Πολλά από αυτά τα υπολογιστικά συστήματα ανάλυσης της εικόνας μετατρέπουν την RGB εικόνα που λαμβάνουν κατά την παρατήρηση των δειγμάτων μέσω κάποιας κάμερας και ενός μικροσκοπίου, σε κάποια άλλη μορφή πιο απλουστευμένη και στη συνέχεια εξάγουν κάποια συμπεράσματα όσο αναφορά την ποσότητα των χρωστικών σε αυτήν και κατά συνέπεια και την ποσότητα των υποδοχέων που χρωματίζουν σε κάθε περίπτωση οι συγκεκριμένες χρωστικές.

➤ Μελέτη 1^η

Έτσι το 2006 μια ομάδα ελλήνων επιστημόνων ανάμεσα τους οι Σ.Κοστόπουλος, Δ.Καβουράς, Α.Δασκαλάκης, Π.Ραβαζούλα και ο Γ.Νικηφορίδης πρότειναν ένα τέτοιο υπολογιστικό σύστημα για την αντικειμενική ποσοτικοποίηση της ER-positive κατάστασης του καρκίνου του μαστού [49]. Το σύστημα αυτό δέχεται ως είσοδο την αρχική έγχρωμη (RGB) εικόνα που αντιστοιχεί σε ένα δείγμα βιοψίας και το μετατρέπει σε $L^* a^* b^*$ (CIELAB) χρωματικό χώρο. Η L^* , αντιπροσωπεύει τη διαφορά μεταξύ φωτός (100) και σκοταδιού (0), ενώ οι άλλες δύο συντεταγμένες a^* και b^* αντιπροσωπεύουν το κόκκινο ($-a^*$), το πράσινο ($+a^*$), το μπλε ($-b^*$) και το κίτρινο ($+b^*$) αντίστοιχα. Έτσι, η χρωματική πληροφορία περιορίζεται στον 2d χρωματικό χώρο αντί του 3d (RGB). Τα (a^* , b^*) pixels της εικόνας ταξινομήθηκαν με βάση τον **k-means clustering algorithm**. Ο αλγόριθμος αυτός λειτουργεί ως εξής: ακολουθεί μια επαναλαμβανόμενη διαδικασία, κατά την οποία τα pixels αποδίδονται σε εκείνο το cluster (σύμπλεγμα) με την ελάχιστη Ευκλείδεια απόσταση από το κέντρο του cluster. Ο στόχος είναι να χωρίσει τα pixels της εικόνας σε clusters δίνοντας σαν έξοδο τα κέντρα των τριών clusters και την ετικέτα του cluster για κάθε pixel. Μάλιστα εφαρμόσαν τον αλγόριθμο αυτό σε 29 ανοσοϊστοχημικά χρωσμένα δείγματα καρκίνου του μαστού που είχαν προηγουμένως χρωματιστεί με hematoxylin και eosin με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να βαφούν 'καφέ' και τα υγιή 'μπλε'. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή του αλγορίθμου τα σύγκριναν με τα αντίστοιχα ενός παθολόγου που μελέτησε τα ίδια δείγματα. Ο συντελεστής συμφωνίας του Kendall έδειξε ένα ικανοποιητικό επίπεδο συμφωνίας ($w = 0,79$) μεταξύ της αξιολόγησης του γιατρού και της

αντικειμενικής ποσοτικοποίησης του automated computer-aided system. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τα ποσοστά θετικότητας των ER όπως προέκυψαν από την υποκειμενική εκτίμηση και την αντίστοιχη του υπολογιστικού αυτού συστήματος (πίνακας 5.2). Το cutoff για θετική κατάσταση ER ήταν το 5 %, δηλαδή αν το ποσοστό των θετικά χρωσμένων πυρήνων ως προς το συνολικό αριθμό των πυρήνων στο δείγμα ήταν μεγαλύτερο από αυτό το ποσοστό ο παθολόγος χαρακτήριζε θετικό το δείγμα.

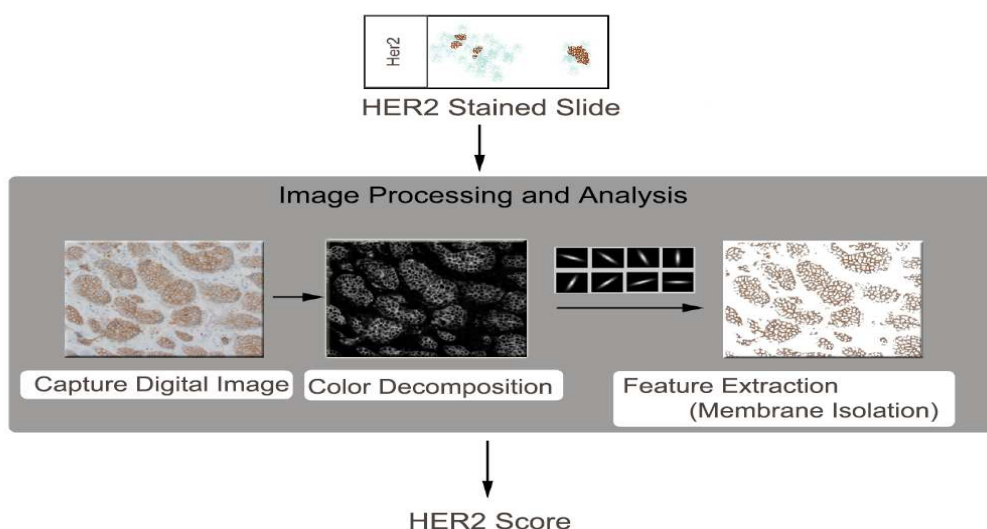
**RESULTS OF THE COMPUTER-AIDED ER EVALUATION SYSTEM AGAINST
PHYSICIAN'S SCORE**

ER Score	Computer-aided score		
	1	2	Accuracy
1	10	1	90.9%
2	2	16	88.9%
Overall accuracy			89.6%

Πίνακας 5.2 Τα αποτελέσματα του υπολογιστικού συστήματος συγκριτικά με τα αντίστοιχα του ιστοπαθολόγου.

➤ Μελέτη 2^η

Πρόσφατα, ο Bonnie HHall [50] παρουσίασε ένα άλλο υπολογιστικό σύστημα ανάλυσης εικόνας με σκοπό την αύξηση της ακρίβειας με την οποία τα HER2 immunostains ποσοτικοποιούνται. Η ακριβή αξιολόγηση του HER2 είναι σημαντική για τον προσδιορισμό των ασθενών με καρκίνο του μαστού που θα επωφεληθούν από την αντι-HER2 θεραπεία. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη αποτελούνταν από 99 περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και μάλιστα επιθετικά ductal και lobular καρκινώματα. Formalin-fixed, paraffin-embedded HER2 IHC τμήματα από ιστούς του μαστού χρωματίστηκαν με diaminobenzidine (DAB) και hematoxylin. Η ροή εργασίας του συστήματος αυτού περιγράφεται στην εικόνα 5.7 που ακολουθεί:



Εικόνα 5.1 Υπολογιστικό σύστημα ανάλυσης εικόνας.

Κατά το σχήμα, η διαδικασία απόδοσης μιας βαθμολογίας (score) σε μια διαφάνεια ξεκινάει με την λήψη μιας ψηφιακής εικόνας. Ένας αλγόριθμος χρωματικής αποσύνθεσης εκτελείται ώστε να απομονωθεί η κηλίδα DAB (καφέ περιοχές) από την κηλίδα hematoxylin (μπλε περιοχές). Στη συνέχεια, ένας αλγόριθμος απομόνωσης της μεμβράνης (membrane isolation algorithm), χρησιμοποιώντας ένα σύνολο από φίλτρα, απομονώνει τα σχετικά pixels της κηλιδωμένης μεμβράνης. Τέλος, με βάση αυτά τα εικονοστοιχεία (pixels), μια βαθμολόγηση του HER2 μπορεί να γίνει. Προκειμένου να απομονώσουν τις περιοχές της κηλιδωμένης μεμβράνης, χρησιμοποιήσαν ένα περιστρεφόμενο (rotationally) αμετάβλητο φίλτρο για την ανίχνευση των μεμβρανών καθ' όλη την DAB κηλιδωμένη εικόνα. Το περιστρεφόμενο αυτό φίλτρο δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύνολο οκτώ Gaussian φίλτρων που εναλλάσσονται $2\pi / 8$ μοίρες κατά μέρος (εικόνα 5.2).



Εικόνα 5. 2 Περιστρεφόμενο αμετάβλητο φίλτρο

Τα χαρακτηριστικά με βάση τα οποία έγινε το feature selection ήταν τα εξής:

- Το **πρώτο χαρακτηριστικό** της εικόνας που χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί μια βαθμονόμηση είναι η M_p , η μέση ένταση των κηλιδωμένων περιοχών της μεμβράνης :

$$M_p = \bar{I}_p$$

όπου I είναι το σύνολο των εντάσεων που προκύπτουν από τα εικονοστοιχεία που διατηρούνται μετά την εκτέλεση του MIA (MEMBRANE ISOLATION ALGORITHM).

- Το **δεύτερο χαρακτηριστικό** είναι το M_n που είναι το M_p κανονικοποιημένο από το positive control. Το M_c ορίζεται παρόμοια με το M_p εκτός από το ότι ο υπολογισμός βασίζεται στο c του control ιστού.

$$M_n = \frac{M_p}{M_c}.$$

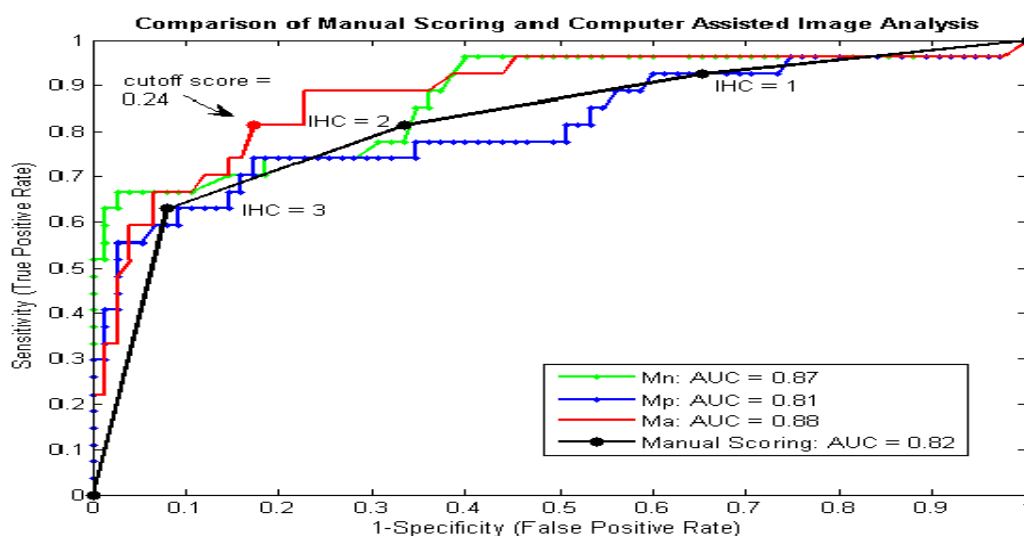
- Το **τρίτο χαρακτηριστικό** M_a προσθέτει ένα συντελεστή d / N , στο M_n .

$$M_a = \frac{d}{N} M_n$$

όπου N είναι το συνολικό ποσό των pixels στην εικόνα, d είναι ο αριθμός των DAB χρωσμένων

εικονοστοιχείων μετά την πρώτη επεξεργασία. Ο συντελεστής d / N χρησιμοποιείται ως προσέγγιση για το ποσοστό των κηλιδωμένων κυττάρων.

Προκειμένου να συγκρίνουν την διαγνωστική αξιοπιστία των Mn και Mp χαρακτηριστικών του αλγορίθμου χρησιμοποίησαν την Receiver Operator Characteristic (ROC) καμπύλη ανάλυσης (εικόνα 5.3). Παρατηρώντας την καμπύλη αυτήν, είδαν ότι η περιοχή κάτω από την καμπύλη Mn (0,87) είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την καμπύλη Mp ($p < .05$), αναφέροντας ότι χρησιμοποιώντας ποσοτικά το δείγμα ελέγχου (control) παρέχεται καλύτερη διαγνωστική εξέταση από την ανάλυση μόνο του ιστού του ασθενούς. Επιπλέον, όταν η AUC της καμπύλης Mn συγκρίθηκε με εκείνη του εγχειριδίου αξιολόγησης, δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά ($p > .14$).



Εικόνα 5.3 Οι ROC καμπύλες δείχνουν την ευαισθησία και την εξειδίκευση σε όλα τα πιθανά cutoff για την θετική γενετική ενίσχυση (≥ 2.3).

Σε παραπάνω διάγραμμα, η ποσοτική χρήση των ελέγχων (Mn) έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει σημαντικά την περιοχή κάτω από την καμπύλη ROC σε σύγκριση με ανάλυση των ιστών και μόνο (Mp). Το βέλος δηλώνει ένα σημείο στην καμπύλη Ma όπου το ψευδώς θετικό ποσοστό έχει μειωθεί σημαντικά σε σύγκριση με το 2+σημείο της καμπύλης του manual Scoring. Η AUC του υπολογιστή με τη βοήθεια μεθόδων Mn και Mp είναι στατιστικώς παρόμοια με εκείνη του εγχειριδίου ταξινόμησης, μόνο Ma έχει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Τα συμπεράσματα της έρευνας τους που βασίστηκε στον αλγόριθμο απομόνωσης της μεμβράνης (MIA) περιγράφονται στο σημείο αυτό λεπτομερώς. Συγκεκριμένα, η αξιολόγηση του HER2 που χρησιμο-ποίησε τα εικονοστοιχεία της μεμβράνης, τους ελέγχους (controls), και επί τοις εκατό περιοχή που χρωματίστηκε, έδειξε σημαντικά μεγαλύτερο AUC από το εγχειρίδιο της βαθμολόγησης, καθώς και σημαντικά λιγότερο ποσοστό ψευδώς θετικών ποσοστών όταν χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση διαφορομένων ανοσοϊστοχημικά περιπτώσεων. Ο αλγόριθμος της απομόνωσης της μεμβράνης (MIA) σε συνδυασμό με την ποσοτική χρήση των ελέγχων (Mn χαρακτηριστικό) έδειξε ότι είναι ανώτερη από την ανάλυση μόνο του ιστού του ασθενούς (Mp χαρακτηριστικό). Η βελτίωση αυτή εικάζεται ότι προέρχεται από τις μοναδικές συνθήκες χρώσης κάθε διαφάνειας που αντικατοπτρίστηκαν τόσο στο δείγμα του ασθενούς όσο και στο δείγμα ελέγχου. Καθώς όλες οι περιπτώσεις 2 + θεωρούνται θετικές από την

Ventana μέθοδο βαθμολόγησης, η χρήση της Ma για την ανάλυση του HER2 ανοσοϊστοχημικά δείχνει την δυνατότητα μείωση του ποσοστού των ψευδώς θετικών, οδηγώντας στην μείωση των ασθενών που εκτίθενται σε μη απαραίτητες τοξικές θεραπείες. Ένα πλεονέκτημα της προσέγγισής μας για την μέτρηση της HER2 χρώσης είναι ότι σε αντίθεση με την κλινική βαθμολόγηση, η οποία έχει τη δυνατότητα διαφοροποίησης μόνο 4 βαθμολογικών επιπέδων, η ποσοτικοποίηση με υπολογιστή αποδίδει σχεδόν συνεχή μεταβλητή, για την οποία το cut-off μπορεί να προσδιοριστεί.

➤ Μελέτη 3^η

Ένα άλλο σύστημα ανάλυσης εικόνας (IAS =image analysis system) προτάθηκε από μια ομάδα Ελλήνων επιστημόνων [51]. Το IAS περιελάμβανε:α)κατάτμηση της εικόνας για τον προσδιορισμό του πυρήνα, αξιοποιώντας το Ιστόγραμμα Συχνότητας των συνεκτικών στοιχείων (FHCE) β)προσδιορισμό των μορφολογικών (textural) χαρακτηριστικών των πυρήνων από την επεξεργασία των εικόνων τους με τη χρήση των Laws και Gabor φίλτρων και γ)PNN και SVM classifiers για την διάκριση των θετικά χρωματισμένων πυρήνων. Το FHCE(frequency histogram of connected elements) ορίζεται ως εξής:

$$H(T) = \sum_{\forall (i,j) \in \{I\}} C_{i,j}(T) \quad 0 \leq T \leq I_{\max} - 1$$

όπου, $I_{\max}$ το μέγιστο greyscale επίπεδο της εικόνας $I(i, j)$, $C_{i,j}(T) \in [T-\varepsilon, T+\varepsilon]$ είναι το συνδετικό στοιχείο, ε είναι το επίπεδο διασύνδεσης, και T είναι το grey level.

Το FHCE λαμβάνει υπόψη τις χωρικές ιδιότητες της εικόνας και ενσαρκώνει τις έννοιες του επιπέδου διασύνδεσης (connectivity level) και τις μορφολογικές συνιστώσες αντίστοιχα. Η μορφολογική συνιστώσα, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, ήταν η four-neighbourhood operator (cross shape). Ενώ η εικόνα σάρωθηκε από τη συνιστώσα, η απόφαση ελήφθη κατά πόσον αυτή αποτελεί ένα συνδετικό στοιχείο, σύμφωνα με παραπάνω εξίσωση. Η grey-value του κεντρικού pixel χρησιμοποιήθηκε για να σχηματίσει το ιστόγραμμα συχνότητας των συνδετικών στοιχείων (FHCE). Μετά από αυτό το bimodal ιστόγραμμα, ένα όριο καθορίστηκε για την μετατροπή της αρχικής εικόνας σε μια νέα εικόνα, με λευκά pixels να αντιστοιχούν σε πυρήνες και μαύρα pixels στο φόντο της εικόνας. Η εικόνα που προέκυψε υπέστη περαιτέρω επεξεργασία με μορφολογικά φίλτρα και φίλτρα μέγεθους (αντικείμενα άνω των 300 εικονοστοιχεία θεωρήθηκαν ως πυρήνες), για την εξάλειψη των μικρών και θορυβώδη περιοχών.

Σε κάθε αρχική grayscale εικόνα εφαρμόστηκαν οι Laws μάσκες με αποτέλεσμα να προκύψουν 25 επεξεργασμένες εικόνες. Κατά συνέπεια, όλες οι εικόνες μετατράπηκαν σε εικόνες ενέργειας της υφής (TEM-texture energy images), και μειώθηκαν τελικά σε 15. Δεκαέξι ομάδες 38 χαρακτηριστικών υφής παρήχθησαν από κάθε πυρήνα, ένα σετ από την αρχική grayscale εικόνα και 15 από τις εικόνες TEM. Επιπλέον, οι διαχωρισμένοι πυρήνες υποβλήθηκαν επίσης σε επεξεργασία με τα Gabor φίλτρα για συγκριτικούς σκοπούς αξιολόγησης. Η σχέση των Gabor φίλτρων είναι:

$$G(x,y)=\exp\left[-\frac{1}{2}\left[\frac{x^2}{\sigma_x^2}+\frac{y^2}{\sigma_y^2}\right]\right]\cos(2\pi xf+\phi)$$

όπου σ_x, σ_y είναι σταθερές του χώρου, f είναι η συχνότητα του φίλτρου και ϕ για συμμετρικό (0) και αντι-συμμετρικό ($-\pi/2$) πυρήνα. Οι διαχωρισμένοι πυρήνες υπέστη επεξεργασία με κάθε ένα από τα φίλτρα με αποτέλεσμα Gabor εικόνες ενέργειας των πυρήνων από τις οποίες δύο Gabor χαρακτηριστικά ενέργειας υφή (GTE), η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση να υπολογιστούν και να αποτελούν ένα σύνολο 20 GTE χαρακτηριστικών. Ο διαχωρισμός χρωστικών έγινε από τους PNN, SVS ταξινομητές με τις παρακάτω εξισώσεις αντίστοιχα:

$$d_i(x) = \frac{1}{(2\pi)^{d/2} \sigma^d} \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \exp\left[-\frac{(x-x_{ik})^T (x-x_{ik})}{2\sigma^2}\right]$$

$$g(x) = \text{sign}\left(\sum_{i=1}^N a_i y_i \cdot [x \cdot x_{ik} (1 + x \cdot x_{ik})] + b\right)$$

σ είναι ο παράγοντας εξομάλυνσης (πειραματικά 0,27), N είναι ο αριθμός πυρήνων / πρότυπο που αποτελούν την κατηγορία i , d είναι η απόσταση του διανύσματος του χαρακτηριστικού, x_{ik} είναι k th πυρήνας / πρότυπο κλάσης i , a_i, b οι συντελεστές βάρους, και x είναι το άγνωστο διάνυσμα του χαρακτηριστικού.

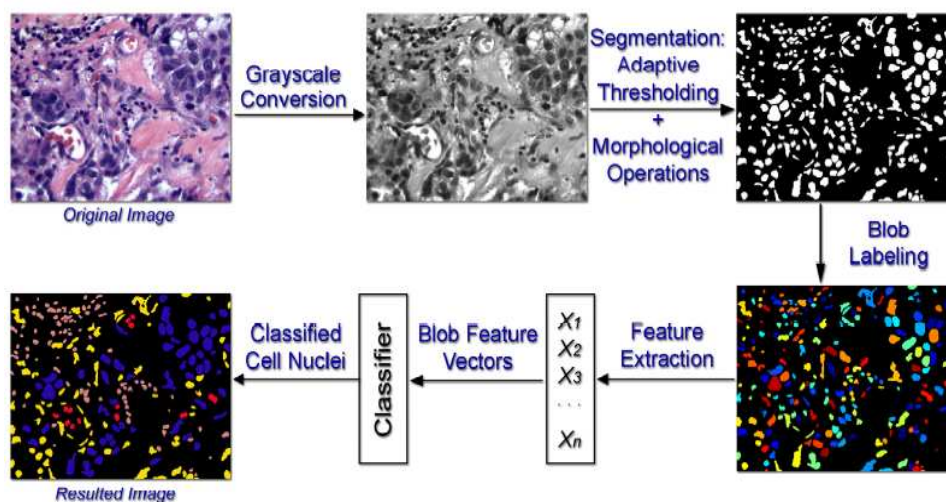
Ακολουθώντας το σχεδιασμό του ταξινομητή, το προτεινόμενο σύστημα IAS εφαρμόστηκε σε 24 περιπτώσεις βιοψίας από καρκίνου του μαστού. Τα δείγματα βιοψίας χρωματίστηκαν με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας για ER και αξιολογήθηκαν τόσο από ιστοπαθολόγο όσο και από το σύστημα αυτό ως προς την κατάσταση θετικότητας των ER. Η αξιολόγηση από το IAS έγινε σε κάθε περίπτωση με την αυτόματη ανίχνευση του αριθμού των θετικά (καφέ) και μη-θετικά (μπλε) χρωματισμένων πυρήνων από τις greyscale ψηφιοποιημένες εικόνες του δείγματος, βασιζόμενο αποκλειστικά σε μορφολογικές πληροφορίες των πυρήνες. Τα αποτελέσματα αυτής της αξιολόγησης συγκριτικά με αυτής του ιστοπαθολόγου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5.3):

Physician's ER Score	Computer-aided score			Accuracy
	2	3	4	
2	5	0	0	100%
3	0	6	1	85.7%
4	0	1	11	91.7%
Overall accuracy				91.6%

Πίνακας 5.3 Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης του ISA συγκριτικά με αυτά του ιστοπαθολόγου. Χρησιμοποιώντας τον Spearman βαθμό συσχέτισης, διαπιστώθηκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ των βαθμολογιών του ιστοπαθολόγου και αυτών που προέκυψαν από το IAS, ($\rho = 0,89$, $p < 0,001$). Η συμβολή της παρούσας μελέτης είναι η πρόταση των μορφολογικών χαρακτηριστικών, που σχετίζονται με την μορφολογία της ER έκφρασης στους πυρήνες που θα μπορούσε να είναι κλινικής σημασίας και να προσδιορίζουν με μεγάλη ακρίβεια την κατάσταση των ER στα καρκινώματα του μαστού.

➤ Μελέτη 4^η

Μια πιο πρόσφατη μελέτη που παρουσιάζει μια αυτοποιημένη μέθοδο ταξινόμησης Hematoxylin & Eosin χρωσμένων καρκινικών ιστών προτάθηκε από τον S. Petushi και τους συναδέλφους του το 2006 [60]. Η H & E χρωματίζει μπλέ τους πυρήνες που είναι πλούσιοι σε DNA και ροζ το εξωκυτταρικό περιβάλλον (ECM) που είναι πλούσιο σε κολλαγόνο επιτρέποντας τη διαφοροποίηση των πυρήνων που περιέχουν DNA από το ECM. Τα σύγχρονα συστήματα ταξινόμησης αξιολογούν τον όγκο του μαστού με βάση τα χαρακτηριστικά του πυρήνα, τον σχηματισμό των σωλήνων (tubule formation) και τον μιτωτικό ρυθμό (mitotic rate). Οι παθολόγοι αξιολογούν κάθε μια από αυτές τις παραμέτρους σε μικρές περιοχές των μικροσκοπικών δειγμάτων και δίνουν μια βαθμολογία από 1 έως 3 σε αύξουσα σειρά από το καλύτερο στο χειρότερο σενάριο. Ο βαθμός όγκος του μαστού είναι το άθροισμα των τριών παραπάνω βαθμών. Τα ιστολογικά δείγματα που εξετάστηκαν περιελάμβαναν 24 H&E χρωσμένες εικόνες που περιελάμβαναν εκατομμύρια καρκινικών κυττάρων και χιλιάδες αγωγών (duct tubules) του μαστού. Η επεξεργασία εικόνων των χρωσμένων ιστών μαστού έγινε για την ανίχνευση και τον εντοπισμό των λιπώδη ιστών, του εξωκυτταρίου πυρήνα και των μορφολογικά διαφορετικών ειδών πυρήνων στα κύτταρα. Η αυτόματη ταξινόμηση των ιστολογικών εικόνων του μαστού έγινε χρησιμοποιώντας δύο texture χαρακτηριστικά: την πυκνότητα του πυρήνα στην επιφάνεια και την χωρική θέση. Η πυκνότητα της επιφάνειας σε πυρήνες αξιολογείται από μια τεχνική που ανιχνεύει και εντοπίζει εκατομμύρια πυρήνες των κυττάρων στα δείγματα και τα κατατάσσει σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την μορφολογία τους. Αυτές ήταν οι NM1 (Nucleus Morphology 1), NM2, NM3. Οι χωρικές θέσεις των πυρήνων των κυττάρων στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό δομών στους ιστούς όπως σωληνοειδείς διατομές και τα όρια των πυρήνων υψηλής πυκνότητας. Αυτές οι θέσεις προσδιορίστηκαν από τις κλάσεις ECM (Extra Cellular Matrix), AT (Adipose Tissue). Το διάνυσμα χαρακτηριστικών (feature vector) περιελάμβανε 9 άλλα χαρακτηριστικά (DNM1, DNM2, DNM3, DNM1-2, DNM1-3, DNM2-3, DNM1-2-3, DT, DN). Η ροή του αυτοματοποιημένου αυτού συστήματος παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί:



Εικόνα 5.4 .Διάγραμμα ροής για την αυτοματοποιημένη επεξεργασία της υπο-εικόνας. Τα βήματα που εμπλέκονται περιλαμβάνουν μετατροπή σε grayscale κλίμακα, διαχωρισμό με προσαρμοστικά κατώφλια ορίων και μορφολογικούς χειρισμούς, χρωματική επισήμανση, εξαγωγή χαρακτηριστικών, ταξινόμηση χρώσης και ταξινόμηση πυρήνων.

Η ταξινόμηση ουσιαστικά βασίζεται σε υποδιαιρέσεις μιας ολόκληρης εικόνας που περιέχει μεγάλη συγκέντρωση πυρήνων στα καρκινικά κύτταρα. Για την ταξινόμηση χρησιμοποίησαν το LNKnet , ένα πακέτο λογισμικού που ενσωματώνει νευρωνικά δίκτυα, στατιστική και μηχανική ταξινόμηση μάθησης, clustering, και αλγόριθμους επιλογής χαρακτηριστικών(feature selection). Συγκεκριμένα η διαδικασία της ταξινόμησης έγινε χρησιμοποιώντας την γραμμική ανάλυση διαχωρισμού (DLinear Discriminant Analysis (LDA)) και την Forward/Back- ward Search μέθοδο του LNKnet.

Το τελικό αποτέλεσμα της επεξεργασίας των χρωσμένων εικόνων από τα δείγματα ήταν ο διαχωρισμός της εικόνας στις ακόλουθες περιοχές: λιπώδης ιστός (AT), κολλαγόνο (ECM), και οι πυρήνες κυττάρων που κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την μορφολογία τους (NM1, NM2, NM3). Ο οπτικός προσδιορισμός των πυρήνων έδειξε στενή αντιστοιχία με αυτόν που προέκυψε από αυτό το αυτοματοποιημένο σύστημα ανάλυσης. Συγκεκριμένα 4,4% των αντικειμένων που ο παθολόγος θεώρησε ως artifacts το σύστημα τα προσδιόρησε ως πυρήνες κυττάρων, 3,2% των αντικειμένων που προσδιορίστηκαν ως πυρήνες από τον παθολόγο το σύστημα τα χαρακτήρισε artifacts. Περίπου 20% των πυρήνων που ταξινομήθηκαν στην NM3 με την οπτική παρατήρηση το σύστημα τα ταξινόμησε στην NM2. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η NM3 θα μπορούσε να υποτιμηθεί σε μερικές εικόνες μέχρι 20% σε σύγκριση με την οπτική εξέταση. Το πρόγραμμα αυτό επιτρέπει αναπτύξη μια συστηματικής έρευνας μιας εικόνας με μικρο-texture παραμέτρους και με δυνατότητες να διαφοροποιεί το στάδιο και το είδος του καρκίνου του μαστού.

5.2.2 Μελέτες με βάση την φασματική απεικόνιση

Η πολυφασματική απεικόνιση (MSI) χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως επειδή παρέχει λύσεις σε προβλήματα που προκύπτουν κατά την απεικόνιση φθορισμού, βελτιώνοντας τις συνέπειες της παρουσίας αυτοφθορισμού. Επίσης εννοεί την μελέτη φαινομένων συνύπαρξης πολλαπλών σημάτων στο

ίδιο σημείο της εικόνας και ενισχύει δραματικά το signal-to-background αποκαλύπτοντας έτσι σημεία που δεν είναι ευδιάκριτα. Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπως μικροσκοπία φθορισμού, brightfield μικροσκοπία, σε μικρά ζώα και σε μη επεμβατικές in-vivo εφαρμογές. Η brightfield μικροσκοπία είναι η επιλεγείσα μορφή μικροσκοπίας που χρησιμοποιείται στην ιστοπαθολογία. Σε αυτήν την περίπτωση πολλαπλές χρωστικές αλληλεπικαλύπτονται χωρικά, και είναι πολύ πιο δύσκολο να διαχωριστούν αν δεν χρησιμοποιούνται MSI προσεγγίσεις. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός μεμονωμένων χρωστικών έχει καταστεί δυνατός χρησιμοποιώντας απλές χρωματικές κάμερες και κατάλληλα συστήματα διαχωρισμού. Η χρήση διπλής και τριπλής-χρώσης σε IHC δείγματα είναι πλέον εφικτή χάρη στην έλευση αυτόματων μηχανών χρώσης και κατάλληλων αντισωμάτων. Μέχρι σήμερα όμως αυτά χρησιμοποιούνταν μόνο εάν οι χρωστικές δεν αλληλοκαλύπτονται χωρικά αφού ούτε τα μάτια μας, ούτε οι συμβατικές κάμερες είναι σε θέση εύκολα να τις διαχωρίσουν. Η φασματική απεικόνιση όμως μπορεί να δώσει λύση σε τέτοιες περιπτώσεις αφού επιτρέπει τις χωρικές αλληλοεπικαλύψεις των χρωστικών σε ένα κύτταρο να διαχωριστούν στις επιμέρους τους.

Έτσι οι τεχνολογίες φασματικής απεικόνισης έχουν καταστεί ένα σημαντικό μέρος της μικροσκοπίας και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για την ανάλυση δειγμάτων που έχουν χρωματιστεί με πολλαπλούς (δύο ή περισσότερους) μοριακούς δείκτες. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία για τον διαχωρισμό των δεικτών είναι ο γραμμικός διαχωρισμός (linear unmixing), ο οποίος οδηγεί σε μια ποσοτική εικόνα της θέσης και της ποσότητας κάθε δείκτη που υπάρχει στο δείγμα.

Έτσι οι J.Mansfield, C.Hoyt, R.Levenson περιέγραψαν μια ευρεία κλίμακα χρήσιμων εργαλείων οπτικοποίησης με σκοπό να διαχωρίσουν τα διαφορετικά χαρακτηριστικά πολυχρωματισμένων δειγμάτων ιστού[53]. Δείγματα που περιέχουν ακόμη και έξι ή οκτώ μοριακούς δείκτες μπορούν με επιτυχία να απεικονιστούν και να διαχωριστούν μεταξύ τους. Σε γενικές γραμμές, οι περισσότερες εφαρμογές χρησιμοποιούν μια γραμμική στρατηγική για το διαχωρισμό των διαφόρων δεικτών. Μόλις διαχωριστούν, υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, που επιτρέπουν τη χωρική και ποσοτική σχέση των βιολογικών σημάτων στα δείγματα να εκτιμηθεί. Έτσι σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να καλύψουν μια ποικιλία μεθόδων για την εξαγωγή αυτής της βιολογικής πληροφορίας, αρχής γενομένης από τα μέσα με τα οποία τα επίπεδα των δεικτών υπολογίζονται, και στη συνέχεια, να επικεντρωθούν σε μεθόδους οπτικοποίησης.

Για τον διαχωρισμό των συνεισφορών των μεμονωμένων fluorophores ή χρωστικών χρησιμοποιήσαν κάποια μορφή ελαχίστων τετραγώνων, ή οπισθοδρόμησης. Έτσι, τα πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από παρατήρηση στρογγυλοποιούνται με την προσαρμογή των παραμέτρων ενός μοντέλου προκειμένου να επιτευχθεί ένα βέλτιστο fit, για παράδειγμα ρυθμίζοντας τους συντελεστές του γραμμικού συνδυασμού του φάσματος κάθε fluorophore ή χρωστικής τα οποία όταν θα προστεθούν θα ανακατασκευάσουν καλύτερα το μετρούμενο φάσμα. Η μεθοδολογία αυτή αναφέρεται συνήθως ως linear unmixing ή απλά "unmixing". Η κανονική εξίσωση για μια φόρμα ελαχίστων τετραγώνων μιας μόνο μεταβλητής δίνεται ως εξής:

$$(X^T X) \hat{\beta} = X^T y$$

Και

$$\hat{\beta} = (X^T X)^{-1} X^T y$$

όπου X είναι ο πίνακας δεδομένων του φάσματος, X^T είναι ο αντίστροφος του, και y είναι η εξαρτημένη μεταβλητή, και β οι ελαχίστων τετραγώνων εκτιμητές των παραμετρικών τιμών.

Για τα δεδομένα φασματικής απεικόνισης, ένα οπτικό φάσμα είναι διαθέσιμο σε κάθε pixel της εικόνας και, συνήθως, καμιά εξαρτημένη μεταβλητή για το pixel. Σε αυτή την περίπτωση, εξυπηρετεί συχνά να σκεφτούμε ένα γραμμικό μοντέλο, όπου, ρυθμίζοντας κατάλληλα τους συντελεστές, ελαχιστοποιούμε την διαφορά μεταξύ του φάσματος των δεδομένων, S , και του προσαρμοσμένου μοντέλου:

$$\min \| S_y - (a_y A + b_y B + \dots) \|_2$$

Όπου $S_{i,j}$ το μετρούμενο φάσμα για το pixel i,j ,

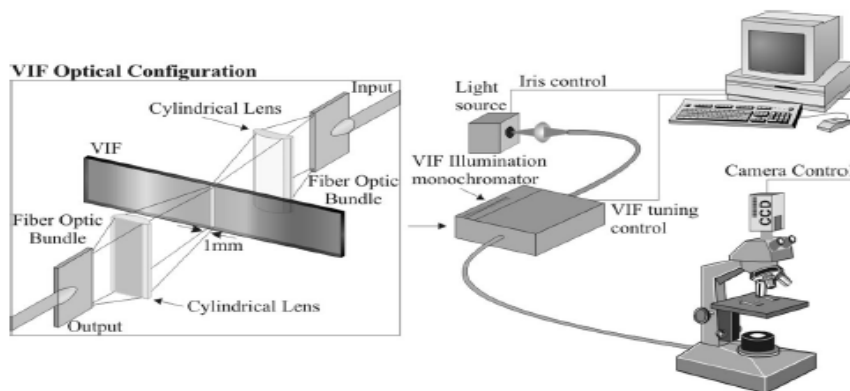
$A, B \dots$ η φασματική βιβλιοθήκη που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό $a_{i,j}$, $b_{i,j}$ οι συντελεστές των ελαχίστων τετραγώνων για το pixel i,j .

Οι τιμές των a_{ij} και b_{ij} που επιστρέφονται από τον least-squares fit αντιπροσωπεύουν εικόνες που είναι τα διαχωρισμένα, "deconvolved", αποτελέσματα καθενός από τα συστατικά. Αυτές οι "unmixed" εικόνες αποτελούν τη βάση για την ανάλυση των δεδομένων της φασματικής απεικόνισης.

Οι περισσότερες, αν δεν είναι όλες οι εταιρείες που πωλούν φασματικά συστήματα απεικόνισης, ανεξάρτητα από τη φασματική τεχνολογία που χρησιμοποιείται, ενσωματώνουν κάποια μορφή γραμμικού διαχωρισμού (linear unmixing) στο λογισμικό τους. Πολλοί κατασκευαστές έχουν συμπεριλάβει βελτιώσεις σε τέτοιους γραμμικούς αλγορίθμους, όπως οι μη-αρνητικότητα περιορισμοί των συντελεστών. Σε γενικές γραμμές, πάντως, ενώ οι αλλαγές μπορεί να βελτιώσουν τα αποτελέσματα σε μια ευρύτερη κλίμακα δειγμάτων, δεν αλλάζουν τη βασική ιδέα του unmixing, η οποία είναι η ποσοτικοποίηση των ποσών και των θέσεων των διαφόρων φασματικών υπογραφών σε φασματικά δεδομένα εικόνας. Ενώ τα ανωτέρω φαίνονται να είναι πολύπλοκα, η πραγματική εφαρμογή του unmixing είναι πολύ απλή.

➤ Μελέτη 1^η

Το Φεβρουάριο του 2003, μια ομάδα Ελλήνων επιστημόνων ανάμεσα τους και ο κ.Μπάλας παρουσίασαν ένα νέο φασματικό μικροσκοπικό σύστημα (SMS=spectral microscope system) με σκοπό την ποσοτική εκτίμηση και χαρτογράφηση της συγκέντρωσης των κηλίδων που χρησιμο-ποιήθηκαν για τον χρωματισμό (label) των οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκινικά κύτταρα του μαστού.[54] Το SMS χρησιμοποίησε ένα μεταβλητό μονοχρωματικό φίλτρο παρεμβολής (VIF= variable interference filter monochromator) και ήταν ικανό να εκτελεί σε πραγματικό χρόνο φασματική απεικόνιση σε μια πληθώρα από φασματικές ζώνες σε κάθε pixel της εικόνας, με φασματικό εύρος 400-1000 nm (εικόνα 5.5). Επιπλέον, το σύστημα αυτό ενσωματώνει αλγορίθμους και διαδικασίες βαθμονόμησης για τον υπολογισμό της απορρόφησης της κηλίδας από τον ιστό.



Εικόνα 5.5 Σχηματικό διάγραμμα του SMS.

Τα χαρακτηριστικά λειτουργίας του έχουν ως εξής: Το VIF έχει βελτιστοποιηθεί για να διαβιβάσει φως σε ορατές και NIR ζώνες (400 nm-1000 nm), καλύπτοντας έτσι όλο το φάσμα ευαισθησίας της CCD κάμερας. Η λήψη μικροσκοπικών φασματικών εικόνων γίνεται με μια 8-bit black and white, megapixel CCD κάμερα. Η κάμερα χρησιμοποιεί το πρότυπο IEEE-1394 πρωτόκολλο και είναι σε θέση να αποκτήσει τις εικόνες με ρυθμό 15 frames/s σε πλήρη ανάλυση και άνω των 30 frames/s σε ανάλυση VGA. Ειδικά σχεδιασμένο λογισμικό χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της κάμερας, της πηγής του φωτός καθώς και της ανάλυσης κατά την απεικόνιση δεδομένων. Τμήματα ιστού (2 μm-πάχος) από δείγματα βιοψίας καρκίνου του μαστού κόπηκαν και τοποθετήθηκαν σε γυάλινες διαφάνειες. Σε αυτές προστέθηκαν μονοκλωνικά αντίσωματα κατά των οιστρογονικών υποδοχέων (αντιγόνα). Διαφάνειες που αποτελούνταν από ακηλίδωτο ιστό ήταν επίσης διαθέσιμες για να μετρηθεί η απορροφητικότητα μόνο του ιστού. Για την οπτική παρατήρηση της ύπαρξης ER σε αυτά τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν δυο χρωστικές. Η FR χρωμάτισε κόκκινα τα καρκινοπαθή κύτταρα, αυτά δηλαδή που εμφάνιζαν ER και η Hematoxylin (HEM), μπλε τους non-ER/PgR πυρήνες των κυττάρων. Η λογική που εφαρμόστηκε έχει ως εξής :

- Όταν φως μήκους κύματος λη περνά μέσα από ένα δείγμα b πάχος (x, y), που αποτελείται από ένα μείγμα L συστατικών με ci συγκέντρωση (x, y), η απορρόφηση An σε ένα μήκος κύματος λη δίνεται από την BLL:

$$A_n(x, y) = \log \left(\frac{\Phi_{0n}(x, y)}{\Phi_n(x, y)} \right) = b(x, y) \sum_{i=1}^L \epsilon_{in}(x, y) c_i(x, y)$$

$\Phi_n(x, y)$ και $\Phi_{0n}(x, y)$ είναι οι χωρικές κατανομές έντασης που μετριοούνται για τα στοιχεία L και στην απουσία τους αντίστοιχα, και ϵ_{in} είναι ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της i-συνιστώσα σε μήκος κύματος λη.

- Για κηλιδωμένους ιστούς ισχύει η σχέση:

$$A_{tsn}(x, y) = t(x, y) \sum_{i=1}^L \varepsilon_{sin} c_{si}(x, y) + A_{tn}(x, y)$$

όπου $A_{tsn}(x, y)$ είναι η απορρόφηση του συστήματος ιστός-κηλίδα, $t(x, y)$ το πάχος της διαφάνειας του ιστού, $\varepsilon_{sin}(x, y)$ η μοριακή απορροφητικότητα και $c_{si}(x, y)$ η συγκέντρωση της i th κηλίδας, $A_{tn}(x, y)$ η απορρόφηση του δείγματος ιστού πριν από την προσθήκη χρωστικών σε μήκος κύματος λ_n στο (x, y) χωρικό σημείο.

- Η μετρούμενη $A_{tf}(x, y)$ σε μια μπάνα λ_f μπορεί να αφαιρεθεί από την $A_{tdn}(x, y)$ για να προκύψει η απορρόφηση $A_{sn}(x, y)$ του μείγματος των κηλίδων:

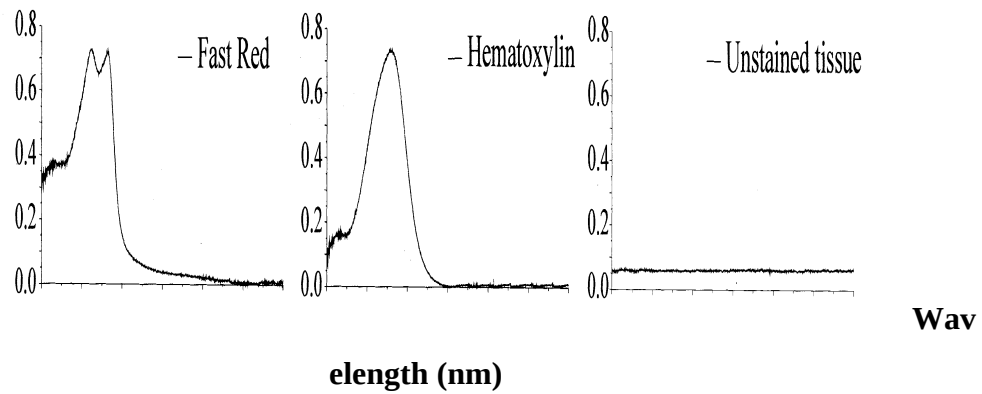
$$\begin{aligned} A_{sn}(x, y) &= A_{tsn}(x, y) - A_{tf}(x, y) \\ &\cong t(x, y) \sum_{i=1}^L \varepsilon_{sin} c_{si}(x, y). \end{aligned}$$

$A_{sn}(x, y)$ αναφέρεται στην απορρόφηση των κηλίδων και μόνο και άρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των κηλίδων.

- Οι συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων συστατικών του μείγματος μπορεί να εκτιμηθούν ποσοτικά με τη μέτρηση της $A_{sn}(x, y)$ σε μια πληθώρα από μήκη κύματος.

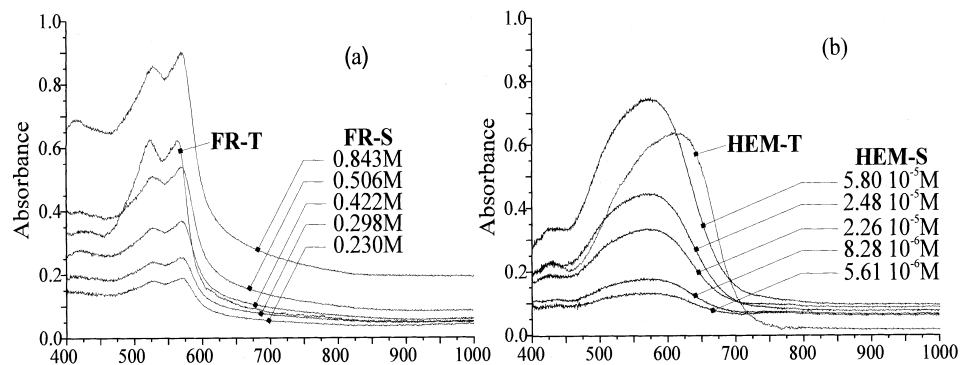
$$\begin{aligned} \begin{bmatrix} A_{11} \\ A_{21} \\ \dots \\ A_{N1} \end{bmatrix} &= \begin{bmatrix} \varepsilon_{11} & \varepsilon_{12} & \dots & \varepsilon_{1L} \\ \varepsilon_{21} & \varepsilon_{22} & \dots & \varepsilon_{2L} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \varepsilon_{N1} & \varepsilon_{N2} & \dots & \varepsilon_{NL} \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} C_{11} \\ C_{21} \\ \dots \\ C_{L1} \end{bmatrix} \\ \mathbf{A}_{N \times 1} &= \mathbf{\varepsilon}_{N \times L} \mathbf{C}_{L \times 1} \end{aligned}$$

Παρακάτω απεικονίζεται η τυπική απορρόφηση συναρτήσεως του μήκους κύματος του fast red και της hematoxylin που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη καθώς και η καμπύλη απορρόφησης συναρτήσεως του μήκους κύματος ενός ακηλιδωτού ιστού (εικόνα 5.6). Είναι σαφές ότι στην NIR φασματική περιοχή και για φάσματα μηκών κύματος μεγαλύτερα από ένα όριο, η απορρόφηση της κηλίδας τείνει στο μηδέν. Σε όλες τις περιπτώσεις, η απορρόφηση της κηλίδας καθίσταται αμελητέα για μεγαλύτερα από 900-nm μήκη κύματος.



Εικόνα 5.6 Οι γραφικές της απορρόφησης ως προς το μήκος κύματος για τις δυο χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν και αυτή που αντιστοιχεί σε μη χρωματισμένο ιστό.

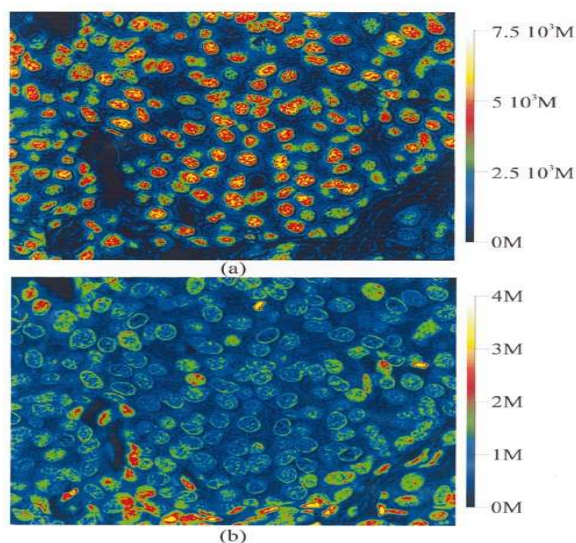
Παρακάτω στο (a) απεικονίζεται η απορρόφηση σε σχέση με το μήκος κύματος που λαμβάνονται από FR διαλύματα (FR-S) διαφόρων συγκεντρώσεων (molarities) μαζί με την απορρόφηση του φάσματος του FR που εναποτίθενται πάνω στο δείγμα ιστού (FR-T). Το FR-T φάσμα μετρήθηκε σε χώρο της διαφάνειας όπου η FR κηλίδα σαφώς δεσπόζει σε σχέση με άλλες χρωστικές. Στο (b) απεικονίζονται παρόμοια αποτελέσματα, αλλά για διαλύματα HEM (HEM-S) και για μια HEM-χρωσμένο ιστό (HEM-T) (εικόνα 5.7).



Εικόνα 5.7 Οι γραφικές της απορρόφησης ως προς το μήκος κύματος για τις δυο χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν για διάφορες συγκεντρώσεις αυτών μαζί με τις αντίστοιχες αυτών που έχουν εφαρμοστεί στο δείγμα ιστού (FR-T, HEM-T).

Το σύστημα SMS επιτρέπει επίσης την ξεχωριστή καταγραφή των συγκεντρώσεων, ακόμη και αν πολλαπλές κηλίδες χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα. Ο βαθμός χρώσης εκφράζεται σε μονάδες συγκέντρωσης, οι οποίες είναι καλύτερα συσχετιζόμενες με την περιεκτικότητα των κυττάρων σε οιστρογόνα. Η εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 5.8) παρουσιάζει τους συγκεντρωτικούς χάρτες του FR και HEM αντίστοιχα. Για την καλύτερη απεικόνιση της χωροταξικής κατανομής των συγκεντρώσεων, μία κλίμακα pseudocolor χρησιμοποιείται και κυμαίνεται από μαύρο σε λευκό, καθώς η συγκέντρωση κυμαίνεται από το μηδέν στο μέγιστο. Τα φάσματα που αποκτήθηκαν από τους ιστούς που είχαν κηλιδωθεί καθώς και από τα βαθμονομημένα διαλύματα κηλίδων επιτρέπουν τον υπολογισμό των

συγκεντρωτικών χαρτών για τις κηλίδες, ακόμη και αν αυτές είναι πολλαπλές και επικαλύπτονται χωρικά και φασματικά.



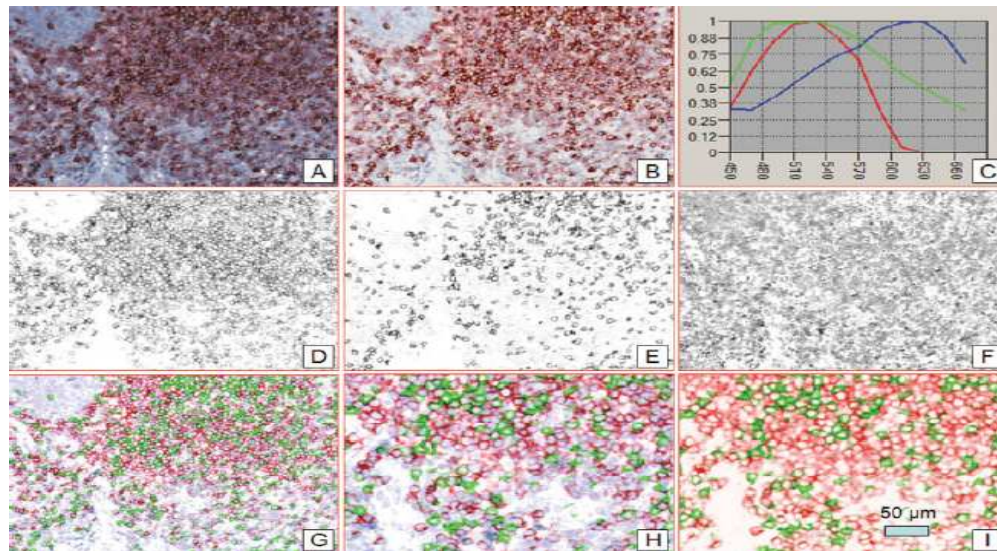
Εικόνα 5.8 Οι χάρτες συγκέντρωσης για α)FR και β)HEM. Η ψευδοχρωματική κλίμακα κυμαίνεται από μαύρο σε άσπρο καθώς η συγκέντρωση ποικίλει από μηδέν στη μέγιστη.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το μοντέλο επικύρωσης δείχνει ότι αν και δύο κηλίδες χρησιμοποιούνται, η λήψη της διαπερατότητας τους σε περισσότερα από δέκα μήκη κύματος είναι αναγκαία για την απόκτηση μιας αποδεκτής ακρίβειας. Η φασματική απεικόνιση στην NIR χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά προκειμένου να διαχωρίσει τη μετρούμενη απορρόφηση των φασμάτων στο σύστημα χρώση-ιστός. Η εφαρμογή τόσο της μεθόδου όσο και του συστήματος μπορεί να επεκταθεί και σε εφαρμογές όπου πολλαπλές χρώσεις συμμετέχουν. Τα λαμβανόμενα αποτελέσματα δείχνουν, για πρώτη φορά, ότι ακόμη και για δύο χρώσεις, απεικόνιση σε περισσότερες από οκτώ στενές ζώνες φάσματος απαιτείται προκειμένου να αποκτηθεί επαρκής πληροφορία για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των κηλίδων. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν την ανεπάρκεια των συμβατικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην παθολογία, δεδομένου ότι βασίζονται σε συστήματα απεικόνισης ικανά για την απόκτηση τριών ή λιγότερων φασματικών ζωνών στο ορατό τμήμα του φάσματος. Τέλος, υπογραμμίζουν την ανάγκη για την ανάπτυξη και την εφαρμογή της φασματικής μικροσκοπίας στην παθολογία και τις δυνατότητές της για την εισαγωγή νέων πιο αξιόπιστων διαγνωστικών κριτηρίων.

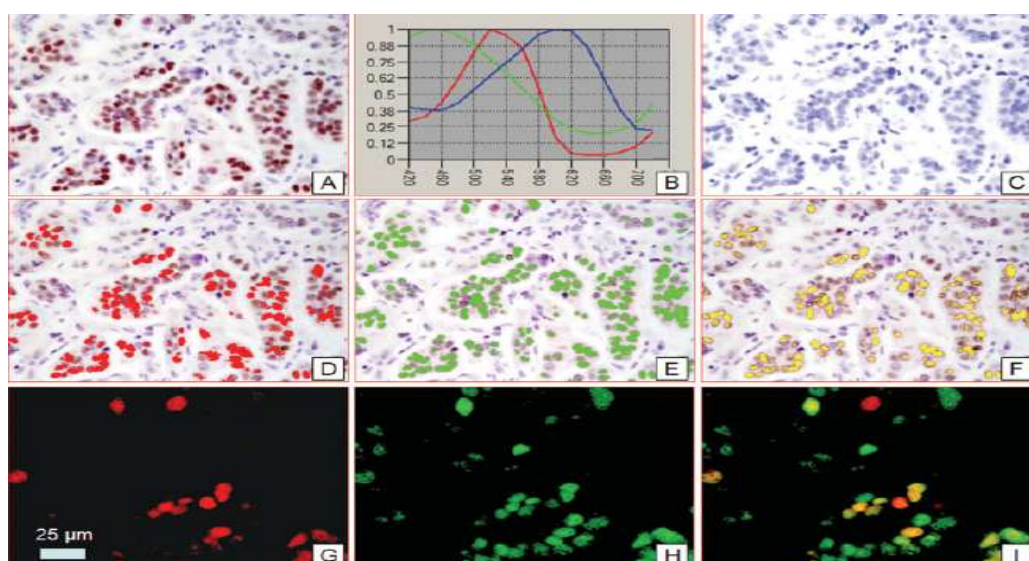
➤ Μελέτη 2^η

Οι M. Levenson, J. Mansfield [2005] μελέτησαν την χρησιμότητα της πολυφασματικής απεικόνισης στον διαχωρισμό πολλαπλών χρωστικών που αλληλοκαλύπτονται χωρικά σε IHC δείγματα [58]. Χρησιμοποίησαν ένα LCTF σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης και μια CCD κάμερα. Αρχικά, προσδιόρισαν έναν κύβο αναφοράς και συνέχισαν με την λήψη του συνόλου των φασματικών δεδομένων σε ίδιους χρόνους έκθεσης. Τέλος, τα φασματικά δεδομένα μετατράπηκαν από μονάδες φωτονίων σε μονάδες οπτικής πυκνότητας σύμφωνα με τον νόμο του Beer. Όλες οι εικόνες προσδιορίστηκαν ως RGB εικόνες από τα φασματικά σύνολα δεδομένων που συνέλεξαν. Η αυτοματοποιημένη φασματική εξαγωγή των χαρακτηριστικών που παρουσίαζαν οι εικόνες πραγματοποιήθηκε από μια πραγματική συνιστώσα ανάλυσης, RCA (commercially available from Ma-

estro). Έτσι, στο παράδειγμα που ακολουθεί αφαιρέθηκε το φάσμα που αντιστοιχεί στο background από έναν ολόκληρο κύβο με καθορισμένη ένταση. Αυτό εφαρμόζεται όταν τα δεδομένα είναι σε μορφή φθορισμού ή απορρόφησης. Συγκεκριμένα, απομάκρυναν την περίσσεια της χρωστικής που αντιστοιχούσε στην αιματοξυλίνη από το κυτταρόπλασμα αφήνοντας πίσω έτσι τις πυκνότερες των χρωστικών στους πυρήνες. Ακολουθούν δύο εικόνες που δείχνουν τα αποτελέσματα της έρευνας τους αυτής σε brightfield μικροσκοπεί:



Εικόνα 5.9 Διπλή χρωματική επισήμανση των CD4+ και CD8+ κυττάρων. Τα CD4+ κύτταρα χρωματίστηκαν με 3,30-Diaminobenzidine (DAB, καφέ) και τα CD8+ με Fast RED (κόκκινο), και counterstained με αιματοξυλίνη. Α) Η RGB εικόνα. Β) Η εικόνα μετά την αφαίρεση της αιματοξυλίνης. Γ) Τα φάσματα των τριών χρωστικών. Δ), Ε), F) οι μεμονωμένες χρωστικές. Γ) Εικόνα όπου οι χρωστικές είναι διαχωρισμένες. Η) Μια περιοχή της εικόνας (Γ). Ι) Μια εικόνα όπου έχει αφαιρεθεί η αιματοξυλίνη.



Εικόνα 5.10 Διπλή χρωματική επισήμανση των ER και των PR στον καρκίνο του μαστού. Οι ER χρωματίστηκαν με DAB και οι PR με Fast Red παρουσία της αιματοξυλίνης ως counterstain. Α) δείχνει το αρχικό δείγμα, Β) τα φάσματα των τριών χρωστικών που χρησιμοποιούνται για unmixing στα επιμέρους κανάλια, Γ) δείχνει το σήμα της αιματοξυλίνης το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της θέσης όλων των πυρήνων. Δ), Ε), F) δείχνουν την τοποθεσία των PR, ER, και της συνύπαρξής τους αντίστοιχα. Μια εναλλακτική μέθοδος απεικόνισης φαίνεται στις εικόνες Γ), Η), Ι), που παρουσιάζουν αναλυτικά μια περιοχή από το πάνω κέντρο της αρχικής εικόνας. Τα δεδομένα έχουν αναστραφεί, ώστε το πράσινο και κόκκινο σήμα να σχηματίσουν κίτρινο όπου αλληλοεπικαλύπτονται.

Με την έρευνα τους επιβεβαίωσαν έτσι ότι η φασματική απεικόνιση είναι κατάλληλη για πολλούς διαφορετικούς τρόπους απεικόνισης, συμπεριλαμβανομένων της brightfield μικροσκοπίας και μικροσκοπίας φθορισμού, καθώς και της απεικόνισης in-vivo ζώου. Μάλιστα, σε brightfield μικροσκοπία τουλάχιστον τρεις χωρικά και φασματικά επικαλυπτόμενες χρωστικές μπορούν να επιλυθούν ποσοτικά, επιτρέποντας έτσι πολυμετρική μοριακή απεικόνιση.

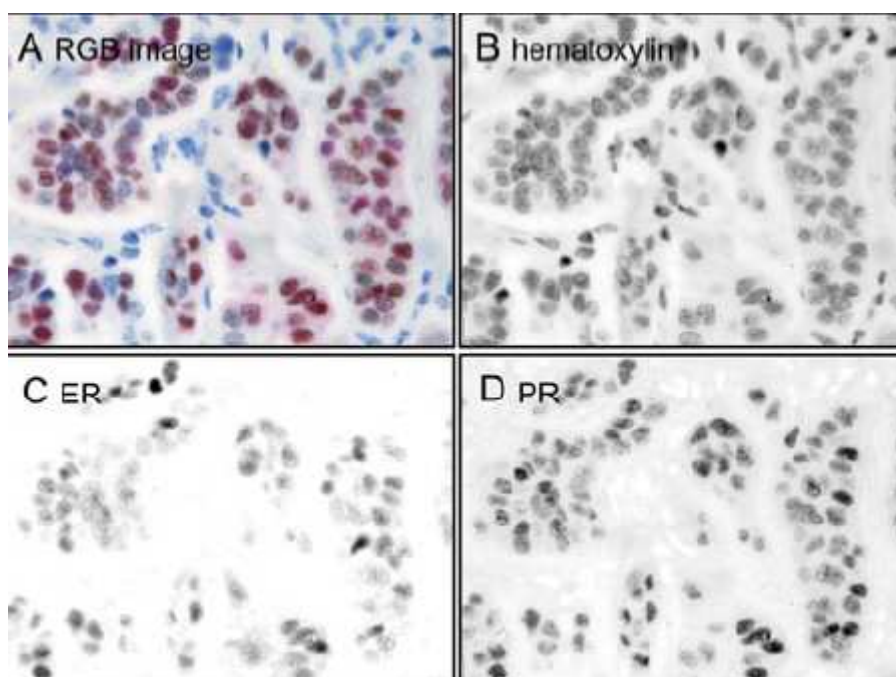
➤ Μελέτη 3^η

Το 2007, ο L. Boucheron και οι συνάδελφοι του μελέτησαν την χρησιμότητα της πολυφασματικής απεικόνισης έναντι των πρότυπων εικόνων RGB για συνήθη H & E χρωσμένες εικόνες, ιδίως κατά την ταξινόμηση των pixels των πυρήνων [59]. Η πολυφασματική απεικόνιση περιλαμβάνει 29 φασματικές ζώνες, με 10 nm απόσταση στο οπτικό φάσμα των 420-700 nm και έγινε με την χρήση ενός LCTF και ενός κλινικού μικροσκοπίου που προκάλεσε μεγέθυνση ίση με 400x. Τα δείγματα εξέτασης ήταν 58 H&E χρωματισμένοι ιστοί από στήθος. Αρχικά χρησιμοποίησαν όλες τις μπάντες και εφάρμοσαν έξι διαφορετικούς ταξινομητές για να κάνουν ταξινόμηση σε κάθε εικόνα. Οι ταξινομητές ήταν οι εξής: Maximum Likelihood (ML), Minimum Euclidean Distance (MED), Spectral Angle Mapper (SAM), Fisher Linear Analysis (FLDA), an automated Feature Extraction (AFE) και Support Vector Machine (SVM). Κατά την ταξινόμηση με χρήση όλων των διαθέσιμων μπαντών, η καλύτερη απόδοση παρατηρήθηκε με τους αλγόριθμους ML, AFE στην RGB απεικόνιση και τους MED, FLDA, SAM, SVM στην πολυφασματική απεικόνιση. Η συνολική όμως αύξηση στην απόδοση ήταν μόλις 0,79% σε σύγκριση με την επόμενη καλύτερες επιδόσεις τύπου εικόνας και άρα κατέληξαν ότι υπάρχει μια πολύ μικρή διαφορά μεταξύ της πολυφασματικής και της RGB απεικόνισης. Στη συνέχεια εφάρμοσαν τους ML, MED, FLDA, AFE ταξινομητές σε μεμονωμένες μπάντες σε κάθε εικόνα. Σε αυτήν την περίπτωση δεν εφάρμοσαν τους SAM, SVM ταξινομητές. Από αυτήν την ταξινόμηση κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η καλύτερη απόδοση παρατηρείται στην κόκκινη περιοχή του φάσματος με χαμηλότερη στην πράσινη μπάντα και στις μπάντες που αντιστοιχούν στα άκρα του φάσματος. Ομοίως για RGB εικόνες το κόκκινο κανάλι παρουσίασε καλύτερη απόδοση. Επιπλέον, κόκκινες ζώνες είχαν τους υψηλότερους συντελεστές / προτίμηση στους συγκεκριμένους ταξινομητές. Έτσι οι διαφορές των επιδόσεων μεταξύ μεμονωμένης πολυφασματικής ζώνης και μεμονωμένης RGB ζώνης δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Αυτό φαίνεται να δείχνει ότι η ατομική πολυφασματική μπάντα εικόνας δεν είναι ικανή να επιφέρει πιο συγκεκριμένη φασματική πληροφορία από την ατομική ζώνη RGB εικόνας για την ταξινόμηση του πυρήνα.

Τέλος χρησιμοποίησαν την Principal Components Analysis (PCA), για να δούν πόσες "σημαντικές" μπάντες πράγματι υπάρχουν εντός της πολυφασματικής στοίβας εικόνων. Τα αποτελέσματά της έρευνας τους έδειξαν ότι οι πολυφασματικές εικόνες για τη συνήθη H & E stained histopathology προβλέπουν ελάχιστη πρόσθετη φασματική πληροφορία για την ταξινόμηση ενός pixel του πυρήνα από ό, τι θα έδιναν οι RGB εικόνες.

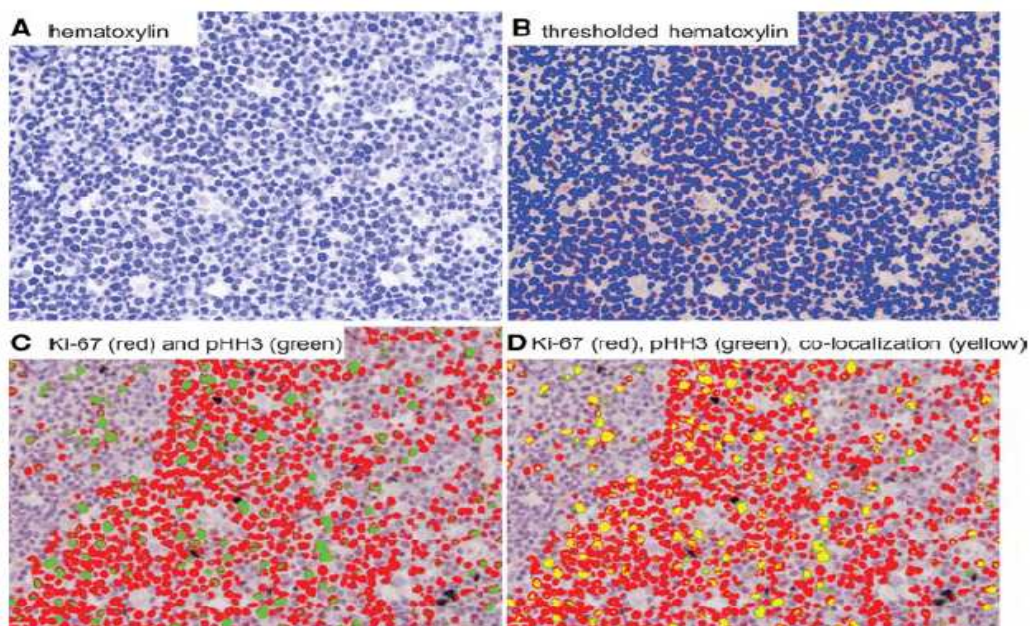
➤ Μελέτη 4^η

Τον Οκτώβριο του 2008 δημοσιεύτηκε ένα άρθρο που περιέγραφε την χρησιμότητα της φασματικής απεικόνισης σε περιπτώσεις δειγμάτων ιστού όπου παρατηρείται χωρική αλληλοεπικάλυψη των χρωστικών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες σε κάθε περίπτωση. Η παρακάτω εικόνα δείχνει μια RGB παρουσίαση μιας φασματικής εικόνας που αποκτήθηκαν από ένα δείγμα χρωματισμένο ως προς τους οιστρογονικούς υποδοχείς (ER) με την χρωστική DAB και ως προς τους υποδοχείς της προγεστερόνης (PR) με Fast Red ενώ ως counterstain χρησιμοποιήθηκε η αιματοξυλίνη. Η εικόνα 5.11 αποκτήθηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα απεικόνισης με βάση την χρήση liquid crystal tunable filters (LCTFs) στην κλίμακα φάσματος 480-720 nm. Στην RGB εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος linear unmixing (που έχει ήδη περιγραφεί) και διαχώρισε τις χρωστικές μεταξύ τους όπου αλληλοεπικάλυπτονταν. Οι unmixed εικόνες που προέκυψαν φαίνονται στην ίδια εικόνα.



Εικόνα 5.11 Invasive ductal τμήμα καρκίνωμα με χρωματισμένους τους ER με DAB και τους PR με Fast RED και counterstained με αιματοξυλίνη. (A) RGB παρουσίαση (B-D) unmixed εικόνες που αντιστοιχούν σε αιματοξυλίνη, ER και PR αντίστοιχα.

Μια άλλη εικόνα όπου φαίνεται η επιτυχία του linear unmixing στο διαχωρισμό των χρωστικών και αφορά ένα δείγμα από αμυγδαλές είναι η παρακάτω:



Εικόνα 5.12 (Α) unmixed εικόνα αιματοξυλίνης (μπλε χρώμα σε άσπρο), (Β) thresholded εικόνα αιματοξυλίνης με τα θετικά σε αιματοξυλίνη pixels να απεικονίζονται σε σκούρο μπλε επάνω στην παρουσίαση της RGB (C) thresholded Ki-67 (κόκκινο) και pHH3 (πράσινο) εικόνες επάνω στην παρουσίαση της RGB (D) η ίδια εικόνα 6(C) αλλά με σαλληλοεπικαλυπόμενα pixels (εκείνα που περιέχουν τόσο Ki-67 και pHH3) εμφανίζονται με κίτρινο χρώμα.

➤ Μελέτη 5^η

Τον Μάρτιο του 2005, ο Gary Atkin και οι συνάδελφοι του προσπάθησαν να ποσοτικοποιήσουν την πρωτεΐνη ονόματι thymidylate synthase (TS) [56]. Πρόκειται για ένα ένζυμο που αποτελεί δείκτη της πρόγνωσης και ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία σε μια ποικιλία τύπων όγκου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παχέος εντέρου. Είκοσι-οχτώ δείγματα βιοψίας πρωτογενούς καρκίνου του παχέος εντέρου χρωματίστηκαν από τις χρωστικές DAB (diaminobenzidine) και Haematoxylin. Η έκφραση της πρωτεΐνης TS σε όλα τα δείγματα ποσοτικοποιήθηκε με βάση ένα οπτικό σύστημα ταξινόμησης και την φασματική απεικόνιση. Το οπτικό σύστημα βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στον πίνακα 5.4 και βαθμονομεί με βάση την ένταση και την έκταση της TS χρώσης.

Table 1 The visual grading system used for manual scoring of stain intensity and area for all sections

Visual grade	Stain intensity	Area of staining (%)
1	Negative	<20
2	Weak	20-50
3	Moderate	50-75
4	Strong	>75

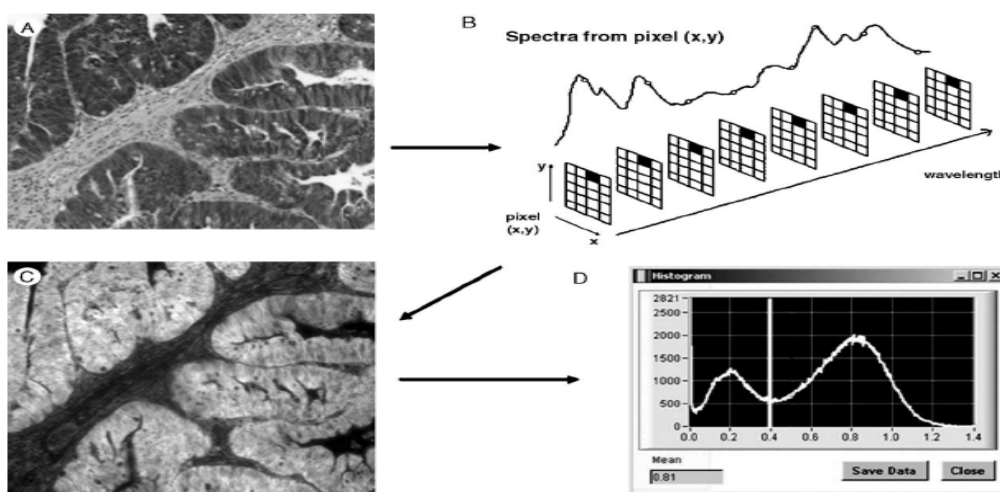
Πίνακας 5.4 Σύστημα βαθμονόμησης των δειγμάτων βιοψία με βάση την οπτική παρατήρηση.

Η έκφραση της πρωτεΐνης TS ποσοτικοποιήθηκε και με βάση την φασματική απεικόνιση στην περιοχή 400 - 700 nm του ορατού φάσματος. Η οπτική πυκνότητα (OD) του δείγματος, καθορίστηκε από την ένταση του φωτός, σε δεδομένο pixel και μήκος κύματος (λ), χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$OD(\lambda) = -10 \log [(I(\lambda) - I_{\text{black}}) / (I_{\text{blank}}(\lambda) - I_{\text{black}})]$$

όπου λ το μήκος κύματος, I η ένταση σε ένα pixel της εικόνας, I_{black} η ένταση σε ένα pixel χωρίς φως και I_{blank} η ένταση σε ένα blank pixel της εικόνας με φως.

Τα χαρακτηριστικά φάσματα των χρωστικών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημική διαδικασία (DAB, αιματοξυλίνη) παρήχθησαν αναλύοντας τμήματα χρωματισμένα από μόνο μια χρωστική κάθε φορά. Αυτά τα φάσματα χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της συνεισφοράς της κάθε χρωστικής στο φάσμα του κάθε pixel της εικόνας του δείγματος με την εφαρμογή ενός (nonnegative least squares unmixing algorithm) ελαχίστων τετραγώνων unmixing αλγορίθμου. Αυτό επιτρέπει το διαχωρισμό της χρώσης DAB από την αιματοξυλίνη.



Εικόνα 5.13 Η διαδικασία φασματικής απεικόνισης που ακολουθήθηκε. Το τμήμα ιστού (A) (DAB-χρωματισμένο με μεγέθυνση 100) , αναλύεται φασματικά (B) για τη δημιουργία ενός χάρτη του TS (C). Ένα αυθαίρετο όριο εφαρμόζεται στο ιστογράμμο συχνότητας (D) (x-άξονα, OD- y-άξονα, συχνότητα pixel), που επιτρέπει τον διαχωρισμό του όγκου (υψηλότερη OD κορυφή) και του στρώματος (χαμηλότερη OD κορυφή) της TS έκφρασης.

Τα αποτελέσματα της OD από τα unmixing φάσματα αντιπροσωπεύουν αναλογίες των φασμάτων αναφοράς και, ως τέτοια, έχουν αυθαίρετες μονάδες (au) της OD κανονικοποιημένες ως προς τις αναφορές. Τα ιστογράμματα της συχνότητας αυτής της κανονικοποιημένης OD παρήχθησαν για την DAB χρωστική και παρουσιάστηκαν ως grayscale χάρτες έντασης για ολόκληρη την εικόνα (εικόνα 5.13). Από το ιστογράμμο συχνοτήτων, καθορίστηκε η μέση κανονικοποιημένη OD, που αντιπροσώπευε την ένταση της TS για αυτήν την εικόνα. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη του ιστογράμματος της συχνότητας υπολογίστηκε επίσης και αντιπροσώπευε τον αριθμό των pixels και, ως εκ τούτου, την περιοχή της εικόνας που παρουσίαζε έκφραση της TS. Επειδή η έκφραση της TS είναι

διαφορετική στην περίπτωση του όγκου από την περίπτωση του στρώματος, το ιστόγραμμα συχνότητας παρουσίαζε 2 κορυφές (εικόνα 5.13). Η υψηλότερη OD κορυφή εκπροσωπεί την TS στον ιστό του όγκου και η χαμηλότερη αντιστοιχεί σε TS χρώση του στρώματος. Ένα αυθαίρετο όριο (0,4 au) επιλέχθηκε για την ταξινόμηση της εικόνας και την ελαχιστοποίηση της συμμετοχής του στρώματος στην τελική ανάλυση. Αυτό επέτρεψε την επιλεκτική και αντικειμενική μέτρηση της έκφρασης TS στον όγκο. Το ίδιο όριο εφαρμόσαν σε όλες τις εικόνες.

Αυτή είναι η πρώτη έρευνα που χρησιμοποιεί την φασματική απεικόνιση για την ποσοτικοποίηση πρωτεΐνης σε περίπτωση καρκίνου του παχέος εντέρου. Η μόνη προηγούμενη μελέτη που σύγκρινε την φασματική απεικόνιση με την οπτική τεχνική ταξινόμησης αφορούσε την αξιολόγηση της κατάστασης των οιστρογονικών υποδοχέων σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού [57]. Με την μελέτη τους αυτή απέδειξαν την επιτυχή εφαρμογή της φασματικής απεικόνισης στην ποσοτικοποίηση της TS από IHC για τον καρκίνο του παχέος εντέρου. Ωστόσο, οι έννοιες και τα αποτελέσματα αυτής βρίσκουν εφαρμογή και σε άλλους δυνητικούς προγνωστικούς δείκτες σε διάφορους τύπους όγκων. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δυο ποσοτικών τεχνικών που εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό της έντασης και της περιοχής της χρώσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η φασματική απεικόνιση είναι ένας έγκυρος τρόπος για την ποσοτικοποίηση βιολογικών τμήματα χρωματισμένων από IHC [55].

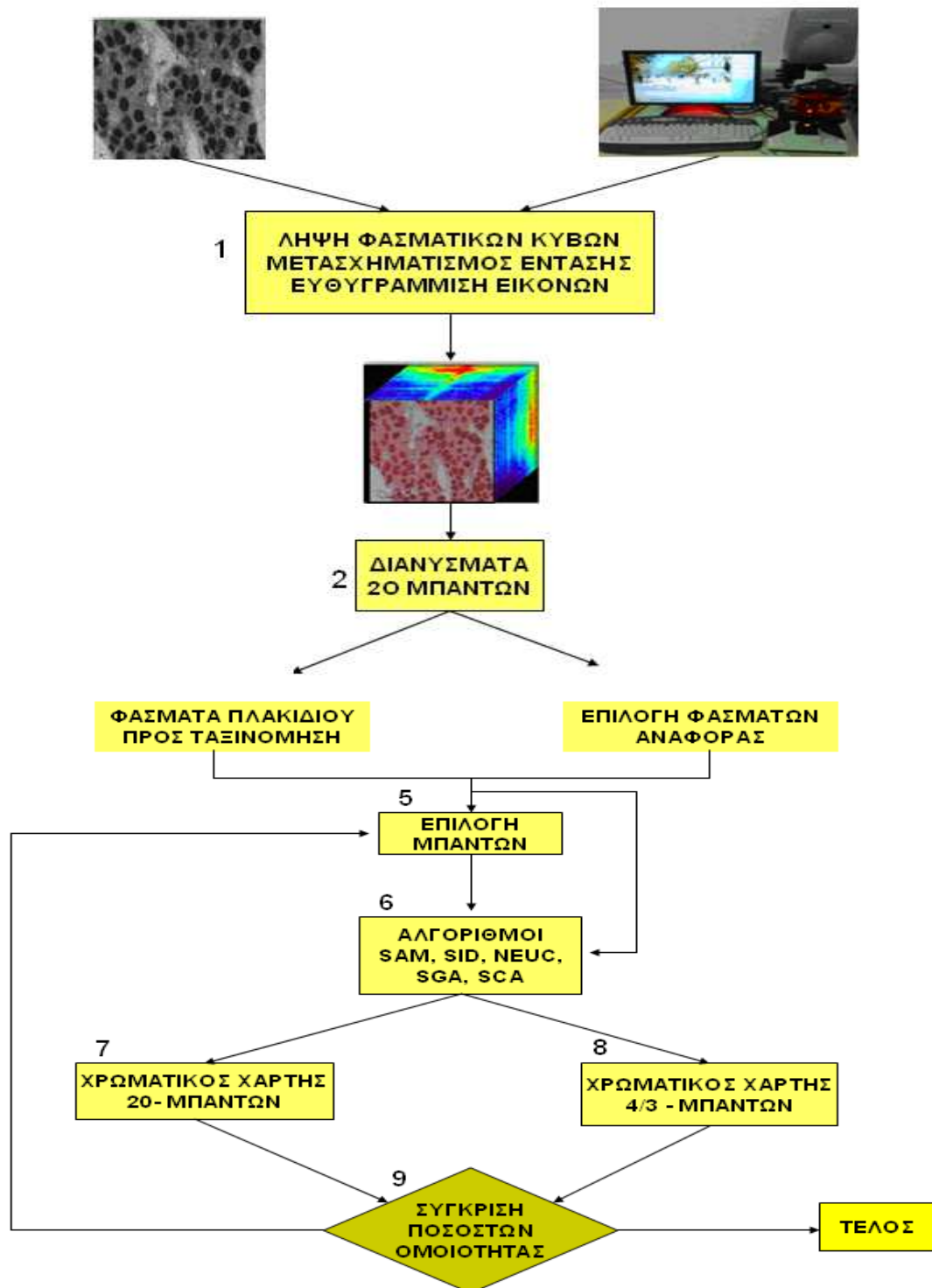
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : Πειραματική διαδικασία και αποτελέσματα

6.1 Γενικά

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφουμε τα βήματα τα οποία ακολουθήσαμε στην πειραματική μας διαδικασία. Τα μέσα που χρησιμοποιήσαμε ήταν το υπερφασματικό σύστημα απεικόνισης (MuSIS) και το οπτικό μικροσκόπιο, τα χαρακτηριστικά λειτουργίας των οποίων τα έχουμε περιγράψει στο κεφάλαιο 4. Όσο αναφορά την κάμερα, έχουμε εφαρμόσει την διαδικασία βαθμονόμησης η οποία επίσης έχει περιγραφεί αναλυτικά. Από την άλλη, στο μικροσκόπιο χρησιμοποιήσαμε ανάλυση 400x, χρησιμοποιώντας αντικειμενικό φακό ισχύος 40x. Αυτός ο φακός σε συνδυασμό με τον προσοφθάλμιο φακό μεγέθυνσης 10x μας δίνει τελική μεγέθυνση του υπό εξέταση δείγματος ίση με 400x. Το οπτικό μικροσκόπιο διαθέτει στο πάνω μέρος του, πάνω από τους προσοφθάλμιους φακούς ειδική θέση τοποθέτησης της κάμερας ώστε να δημιουργηθεί ένα ενιαίο σύστημα. Η ανάλυση του μικροσκοπίου ήταν η καλύτερη δυνατή ώστε να είναι ευδιάκριτα τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του εξεταζόμενου δείγματος μας. Το δείγμα αυτό το τοποθετήσαμε στην επίπεδη πλατφόρμα του μικροσκοπίου, γνωστή ως στάδιο, ενώ τοποθετήσαμε το δείγμα κάτω από τον αντικειμενικό φακό και ρυθμίσαμε το διάφραγμα ώστε η ένταση του φωτός που πέφτει στο δείγμα να είναι ικανή για την οπτική παρατήρηση και διάκριση του περιεχομένου του δείγματος από τον προσοφθάλμιο φακό μέσα από τον οποίο παρατηρούσαμε το δείγμα μας.

Όσο αναφορά το δείγμα εξέτασης που χρησιμοποιήσαμε πρόκειται για δείγματα βιοψίας από καρκίνο του μαστού. Τα δείγματα αυτά έφτασαν σε εμάς αφού είχαν υποστεί μια ειδική διαδικασία για την ανοσοϊστολογική τους χρώση. Τμήματα ιστού (2 μm-πάχος) από αυτά τα δείγματα κόπηκαν και τοποθετήθηκαν σε γυάλινες διαφάνειες. Οι διαφάνειες αυτές επώαστηκαν με μονοκλωνικό αντίσωμα κατά των οιστρογονικών υποδοχέων (αντιγόνο). Διαφάνειες που αποτελούνταν από ακηλίδωτο ιστό ήταν επίσης διαθέσιμες για να μετρηθεί η απορροφητικότητα μόνο του ιστού και για να γίνει η βαθμονόμηση του συστήματος. Αυτές οι διαφάνειες είχαν προκύψει από τμήμα μαστού που είχε υποστεί αφυδάτωση μέσω αλκοόλ (alcohol) και ξυλένιο (xylene) ενώ καμιά χρωστική τεχνική δεν είχε εφαρμοστεί σε αυτές. Οι κηλιδωμένες διαφάνειες ιστών προέκυψαν αφότου εφαρμόστηκε σε αυτές η APAAP τεχνική. Πρόκειται για μια ανοσοϊστοχημική μέθοδο που χρησιμοποιείται για την βαφή των ιστών προκειμένου να ανιχνευτεί η παρουσία των υποδοχέων σε αυτούς. Συγκεκριμένα η τεχνική APAAP περιλαμβάνει τρία στρώματα ακολουθίας αντιδραστηρίων. Ένα πρωταρχικό μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το αντιγόνο (ER, PR), με τη σειρά του, αναγνωρίζεται από την ανοσοσφαιρίνη (IG). Η χρήση του τελευταίου αντισώματος που υπερβαίνει εξασφαλίζει ότι μόνο ένα από τα σημεία δέσμευσης αντιγόνου είναι κατειλημμένο, αφήνοντας τα άλλα ελεύθερα να δεσμεύσουν το ανοσοποιητικό σύμπλεγμα της αλκαλικής φωσφατάσης και μονοκλωνικής αντί-αλκαλικής φωσφατάσης, που αποτελούν το τρίτο στάδιο της ακολουθίας. Η αλκαλική φωσφατάση, στη συνέχεια εντοπίζεται μέσω της αντίδρασης μεταξύ του fast red (FR) και του υποστρώματος Napthol AS-MX φωσφορικό. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται μόνο σε κυτταρικές δομές όπου η αλκαλική φωσφατάση, και, κατά συνέπεια, ER και PR είναι διαθέσιμα. Το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης είναι ένα κόκκινο ίζημα βαφής. Για την οπτικοποίηση των κυτταρικών περιοχών που δεν χρωματίζονται με το

κόκκινο ίζημα, χρησιμοποιείται η Hematoxylin (HEM), η οποία ηλιδώνει μπλε τους non-ER/PgR πυρήνες των κυττάρων. Αφού περιγράψαμε τα μέσα και υλικά ,είμαστε έτοιμοι να συνεχίσουμε με την περιγραφή των βημάτων που ακολουθήθηκαν στην πειραματική μας διαδικασία.Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε δίνεται παρακάτω στο σχήμα που ακολουθεί:



Τα βήματα έχουν ως εξής:

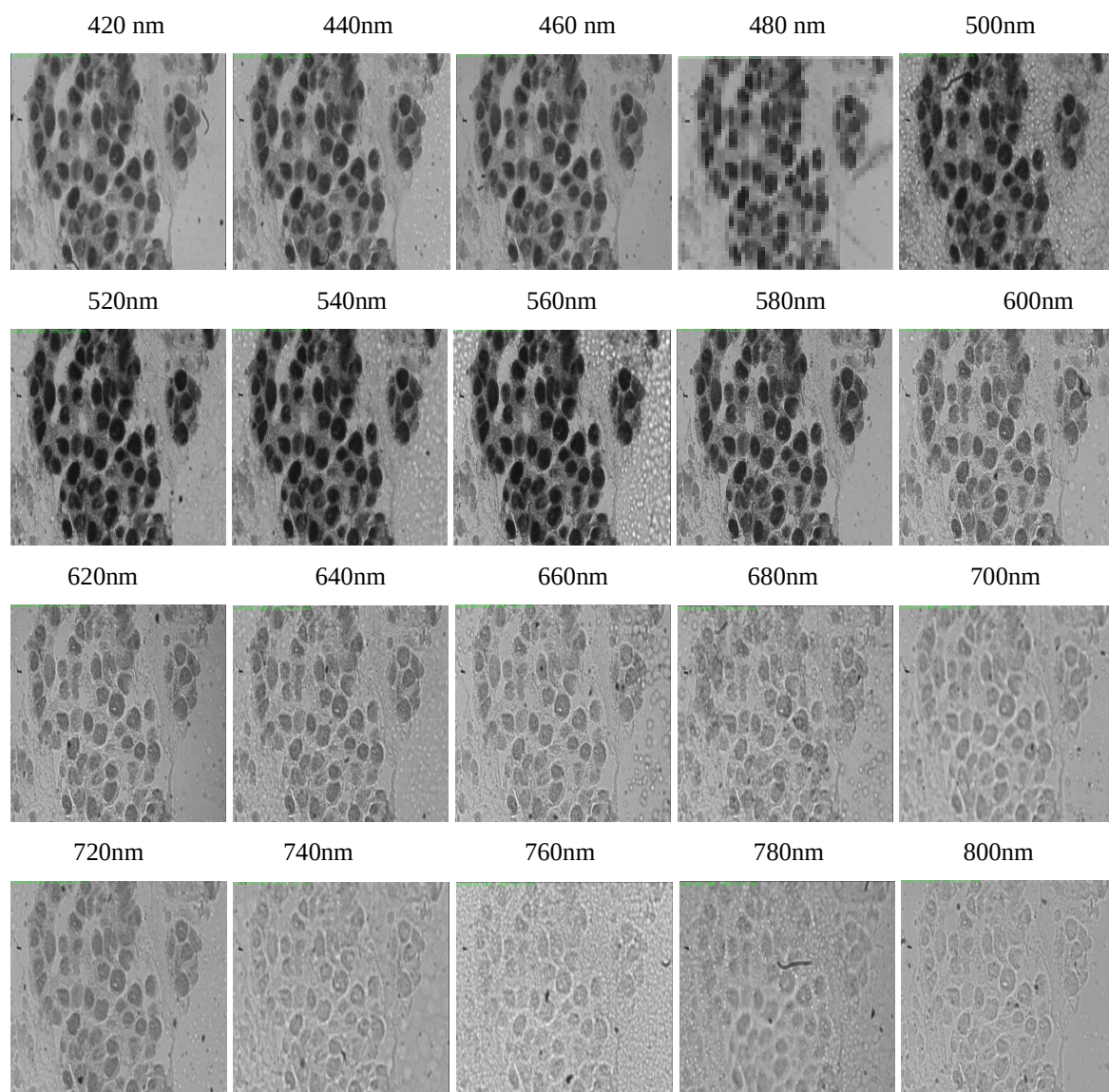
- 1) Λαμβάνουμε τους φασματικούς κύβους που αντιστοιχούν στο κάθε δείγμα βιοψίας με τη χρήση του μικροσκοπίου και του MuSIS.Ο μετασχηματισμός της ακτινοβολίας ανάκλασης του κάθε pixel της εικόνας σε ένταση από 0 έως 255 (optical density) και η ευθυγράμμιση των εικόνων γίνεται από το software του MuSIS ταυτόχρονα με την λήψη των φασματικών κύβων.
- 2) Οι φασματικοί κύβοι λαμβάνονται για τα μήκη κύματος από 420 μέχρι 800 nm ,άρα συνολικά αντιστοιχούν σε 20 μπάντες στο ορατό και κοντινό υπέρυθρο φάσμα.
- 3) (Training set) Επιλέγουμε τα χαρακτηριστικά φάσματα αναφοράς για κάθε μια από τις κλάσεις τις οποίες ορίσαμε (RED,BLUE, ORANGE, PURPLE, WHITE).
- 4) (Test set)Τα φάσματα για κάθε pixel της εικόνας που θέλουμε να ταξινομήσουμε στην κατάλληλη κλάση.
- 5) Επιλέγουμε διάφορους συνδυασμούς μπαντών, 4 και 3 αντίστοιχα για να καταλήξουμε στον συνδυασμό που θα μας δώσει ικανοποιητική πληροφορία.
- 6) Εφαρμόζουμε τους αλγόριθμους ταξινόμησης τόσο για τις 20 μπάντες ,όσο και για τον μειωμένο συνδυασμό μπαντών που επιλέγουμε κάθε φορά.
- 7) Προκύπτει ο χρωματικός χάρτης για το σύνολο των μπαντών (20 μπάντες) για κάθε αλγόριθμο ταξινόμησης που υλοποιήσαμε.
- 8) Προκύπτει ο χρωματικός χάρτης για διάφορους συνδυασμούς μπαντών (3, 4 μπάντες)για κάθε αλγόριθμο ταξινόμησης που υλοποιήσαμε.
- 9) Γίνεται σύγκριση των δυο χρωματικών χαρτών, δηλαδή αυτού που αντιστοιχεί στις συνολικές μπάντες με εκείνον που αντιστοιχεί σε μειωμένο αριθμό μπαντών.Αν το αποτέλεσμα της σύγκρισης δώσει μεγάλο ποσοστό ομοιότητας μεταξύ των δυο χαρτών που συγκρίνονται, τότε ο συγκεκριμένος συνδυασμός μπαντών δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ως αποτέλεσμα του βήματος αυτού,προκύπτουν τα αντίστοιχα ποσοστά ομοιότητας των χαρτών που δείχνουν ακριβώς το βαθμό ομοιότητας τους. Στην συνέχεια, επιστρέφουμε στο βήμα 5 για να γίνει επιλογή νέου συνδυασμού μπαντών και επαναλαμβάνονται εκ νέου τα βήματα που ακολουθούν ή τερματίζουμε την πειραματική μας διαδικασία.

6.2 Βήματα εργασίας

▪ *BHMA 1^ο*

Σε αυτό το βήμα της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήσαμε το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης (MuSIS) και το οπτικό μικροσκόπιο. Αντικείμενο προς μελέτη αποτέλεσαν τα 7 δείγματα βιοψίας καρκίνου του μαστού που εκχωρήθηκαν αποκλειστικά σε εμάς από το πανεπιστημιακό νοσοκομείο Ηρακλείου για την διεξαγωγή αυτής της μελέτης.Αρχικός μας στόχος ήταν η λήψη των φασματικών κύβων των 7 διαφορετικών δειγμάτων βιοψίας (πλακιδίων) από 420nm μέχρι 1000nm, προκειμένου να γίνει φασματική απεικόνιση των διαφόρων περιοχών των δειγμάτων υγίων και

καρκινοπαθών και κατόπιν να επιτευχθεί ανίχνευση και χαρτογράφηση με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αντικειμενικότητα του ποσοστού συγκέντρωσης των οιστρογονικών υποδοχέων από τα φάσματα ανάκλασης που προκύπτουν. Κατόπιν παρατήρησης καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι πέρα από τα 800 nm η φασματική πληροφορία ήταν περιττή (χωρίς ουσιαστική πληροφόρηση) και για αυτό το λόγο οι φασματικοί μας κύβοι καλύπτουν την περιοχή των 420nm -800nm του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Συγκεκριμένα, για μια περιοχή δείγματος βιοψίας, παρουσιάζεται παρακάτω ο φασματικός κύβος που προέκυψε κάνοντας χρήση της κάμερας MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου (εικόνα 6.1):



Εικόνα 6.1 Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας(121688.2.B.32), κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.

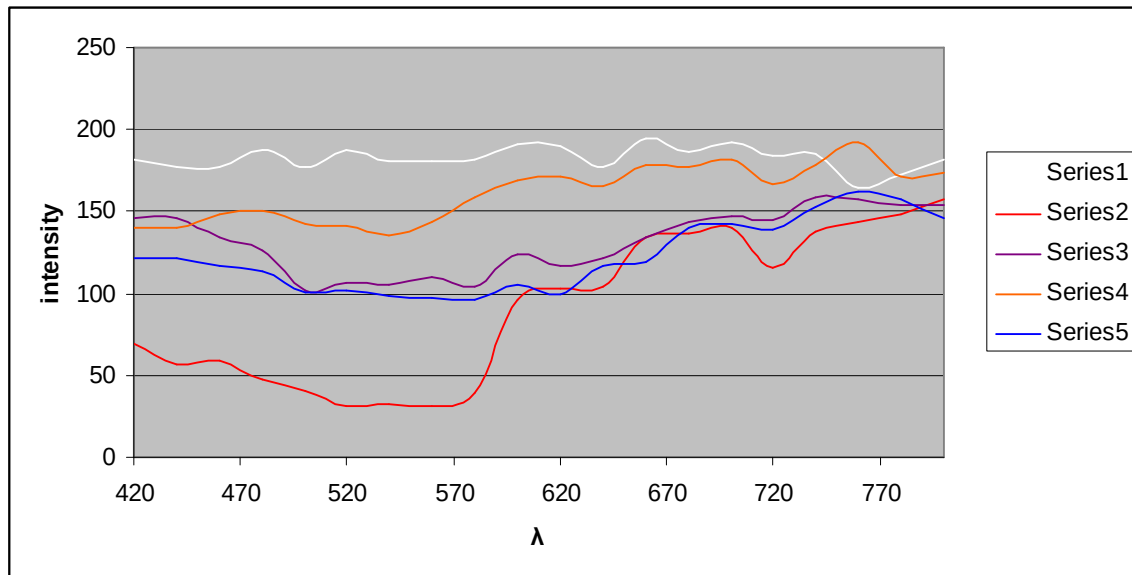
Οι φασματικοί κύβοι για τα υπόλοιπα 6 δείγματα βιοψίας (πλακίδια) παρουσιάζονται συγκεντρωμένοι στο Παράρτημα. (εικόνες Π1-Π6).

▪ ΒΗΜΑ 2^ο

Σκοπός του βήματος αυτού είναι η μελέτη των φασματικών ιδιοτήτων των κυττάρων με βάση τους φασματικούς κύβους που προέκυψαν στο προηγούμενο βήμα (ΒΗΜΑ 1^ο), προκειμένου να καταλήξουμε σε ένα διαγνωστικό κριτήριο για την καλύτερη και αντικειμενικότερη διάκριση μεταξύ των υγιών και καρκινοπαθών κυττάρων καθώς και των ενδιάμεσων καταστάσεων που εντοπίσαμε (μη ειδική χρώση και συνύπαρξη και των δυο χρωστικών). Κρίνεται απαραίτητο να σημειωθεί ότι η κατάσταση υγιούς και καρκινοπαθούς κυττάρου σε κάθε δείγμα επιλέχθηκε από εμάς με βάση την οπτική παρατήρηση και την μελέτη των διαφόρων χαρακτηριστικών των κυττάρων. Ο υποκειμενικός παράγοντας ήταν αναπόφευκτος κατά την διαδικασία επιλογής των φασμάτων αναφοράς, αλλά έγινε με ιδιαίτερη προσοχή βασιζόμενος στα φασματικά χαρακτηριστικά των χρωστικών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την HIC χρώση των δειγμάτων βιοψίας.. Συγκεκριμένα, ορίσαμε τις εξής 5 κλάσεις :

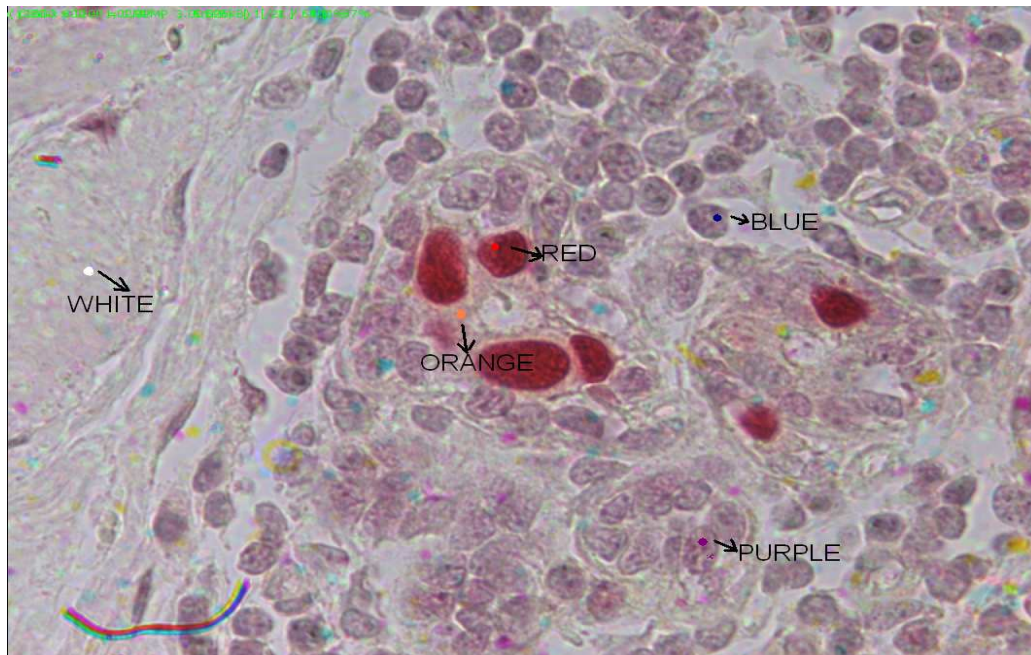
- αυτήν των υγιών κυττάρων (μπλέ), BLUE
- αυτήν των καρκινοπαθών κυττάρων (κόκκινο), RED
- αυτήν των κατά λάθος χρωσμένων κυττάρων (πορτοκαλί), ORANGE
- αυτήν των χρωσμένων κυττάρων και με τις δυο χρωστικές (μωβ), PURPLE
- και τέλος αυτήν που αντιστοιχεί στο γυαλί του πλακιδίου όπου δεν εντοπίζεται κύτταρο, WHITE.

.Παρακάτω παραθέτουμε τις γραφικές παραστάσεις που αντιστοιχούν σε αυτές τις 5 κλάσεις (εικόνα 6.2).



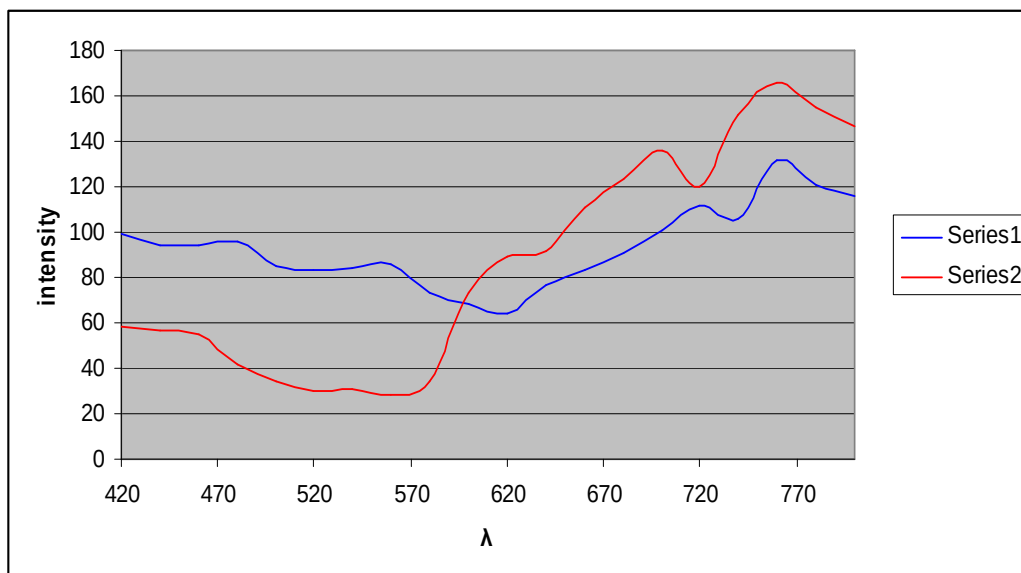
Εικόνα 6.2 Γραφικές παραστάσεις των κλάσεων που επιλέξαμε.

Οι αντίστοιχες γραφικές αντιστοιχούν στα αντίστοιχα επιλεγμένα pixels της παρακάτω εικόνας (εικόνα 6.3).

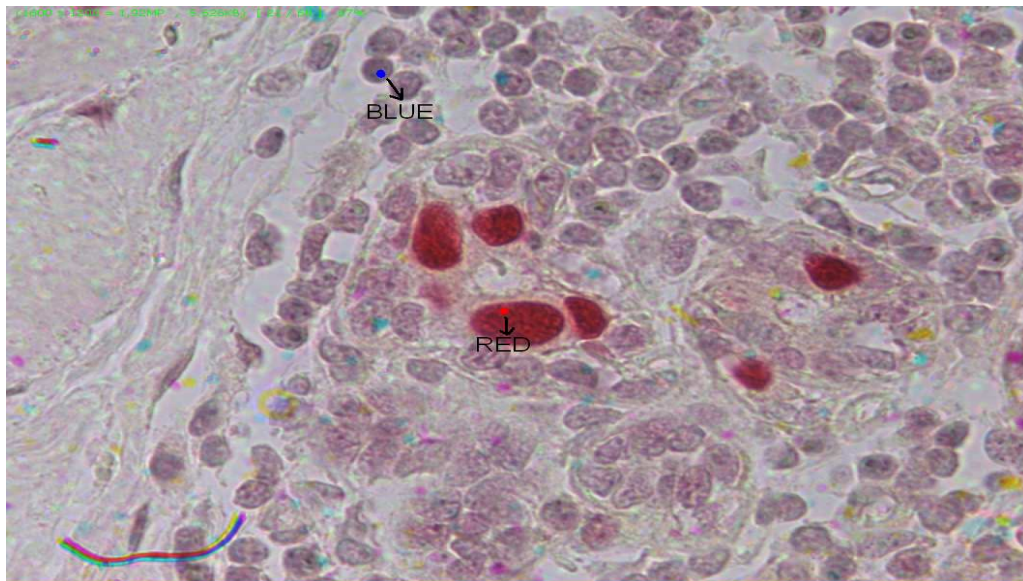


Εικόνα 6.3 Σημειώνονται τα pixels που αντιστοιχούν στις αντίστοιχες σε κάθε περίπτωση κλάσεις.

Επειδή στόχος της μελέτης αυτής είναι ο διαχωρισμός των κόκκινων από τα μπλε κύτταρα παραθέτουμε μια γραφική παράσταση που περιέχει μόνο pixels από αυτές τις δυο κλάσεις για να είναι οπτικά πιο εμφανή τα φασματικά χαρακτηριστικά των δυο αυτών κλάσεων.(εικόνα 6.4)



Εικόνα 6.4 Γραφικές παραστάσεις που αντιστοιχούν στις κλάσεις RED, BLUE.



Εικόνα 6.5 Σημειώνονται τα pixels απο τα οποία προέκυψαν οι παραπάνω γραφικές παραστάσεις.

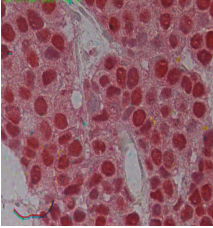
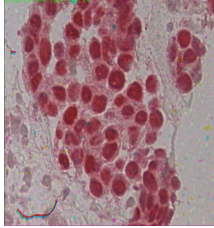
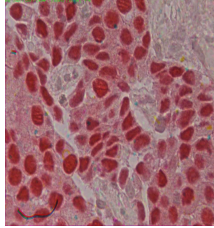
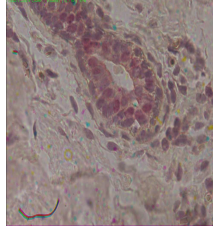
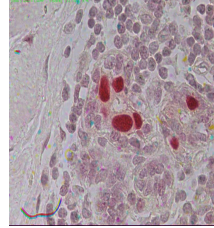
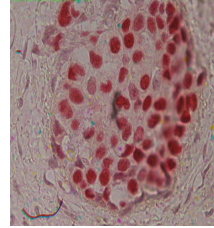
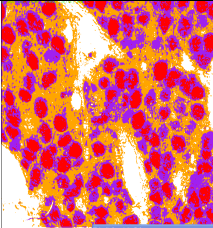
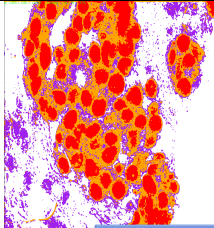
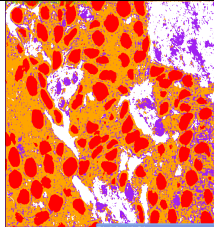
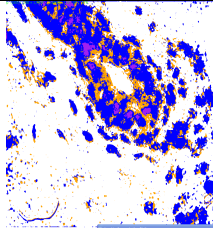
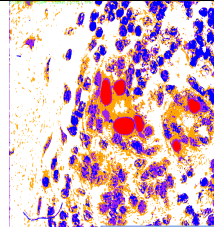
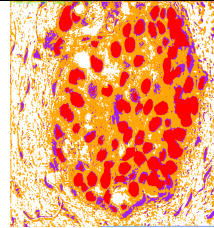
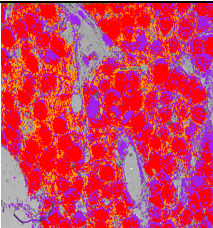
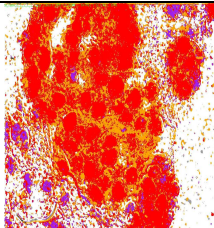
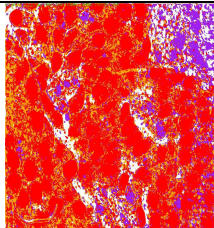
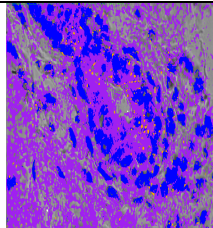
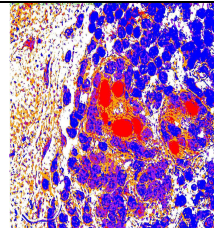
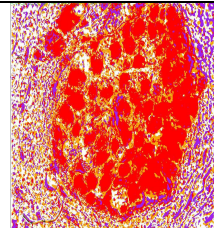
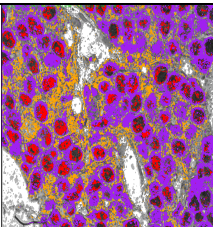
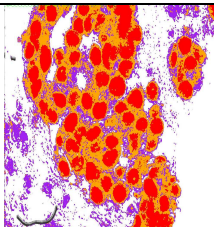
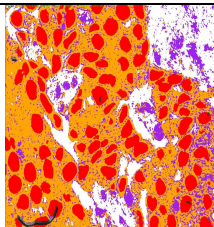
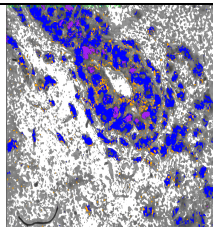
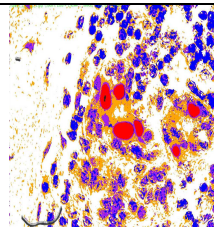
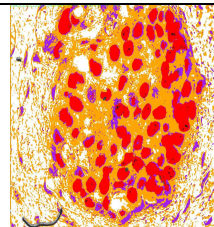
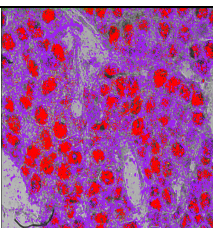
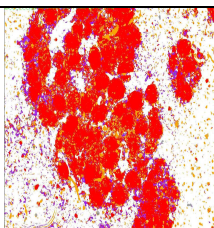
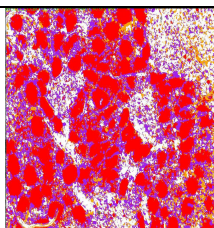
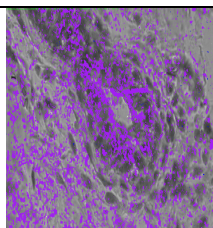
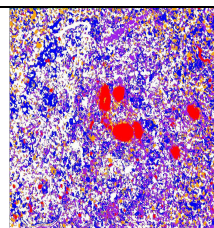
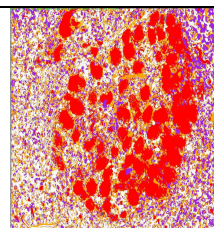
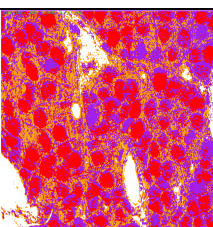
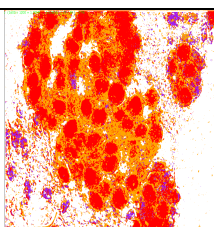
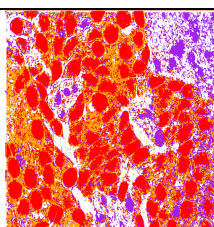
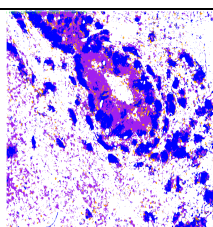
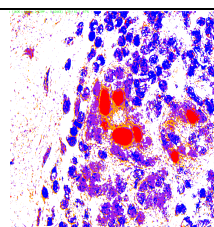
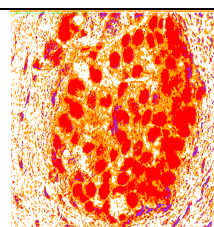
▪ BHMA 3^ο

Σε αυτό το βήμα εφαρμόσαμε σε κάθε πλακίδιο τους αλγορίθμους που περιγράψαμε αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο (Κεφάλαιο 4). Συγκεκριμένα τρέξαμε τους εξής αλγορίθμους :

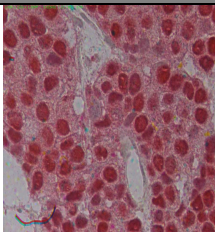
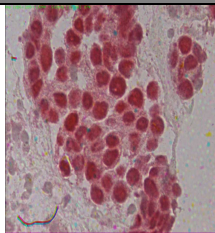
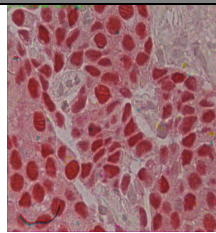
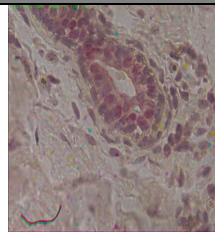
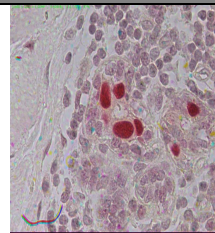
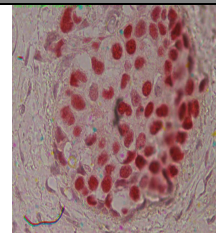
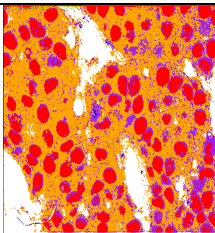
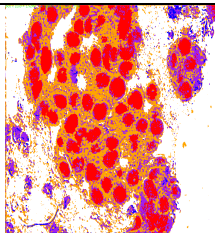
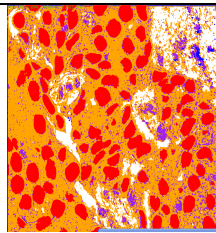
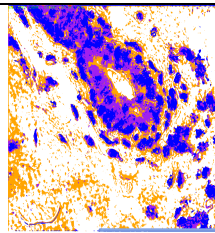
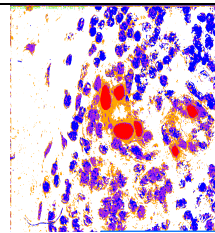
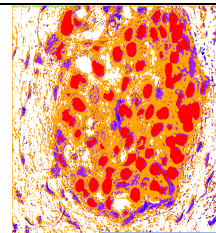
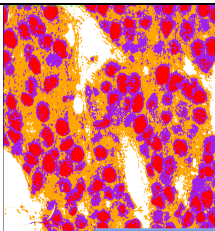
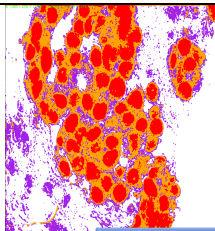
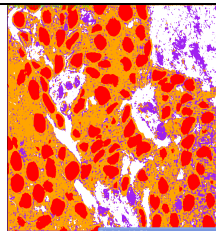
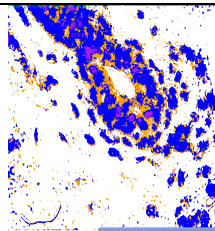
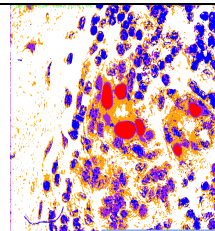
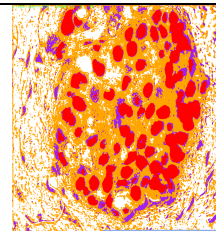
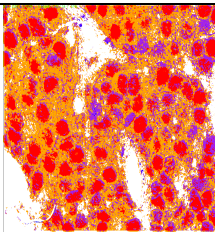
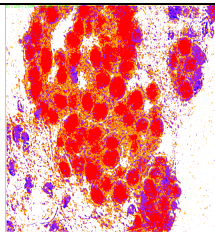
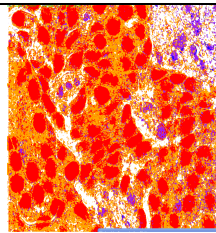
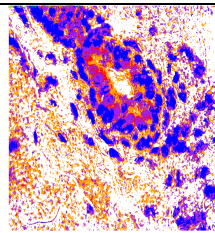
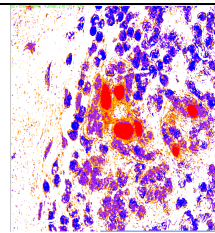
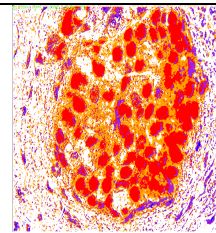
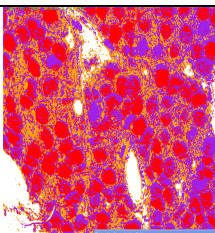
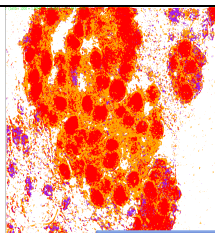
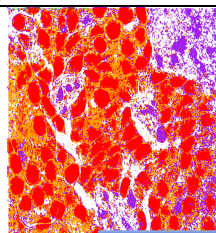
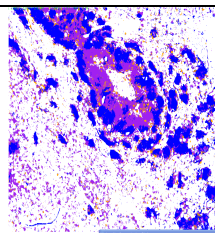
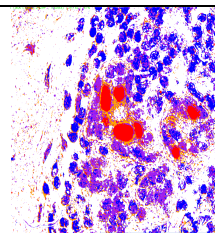
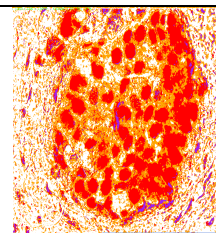
- Normalized Euclidean Distance (NEUC),
- Spectral Correlation Mapper (SCM),
- Spectral Angle Mapper (SAM),
- Spectral Information Divergence (SID),
- Spectral Gradient Angle (SGA),

Από τους αλγόριθμους αυτούς προέκυψαν κάποιοι χρωματικοί χάρτες που είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι για μη επεμβατική ανίχνευση και διάγνωση του καρκίνου του μαστού σε δείγματα βιοψίας. Τα φάσματα αναφοράς που χρησιμοποιήσαμε για την εφαρμογή των αλγορίθμων αυτών , προέκυψαν από 6 δείγματα βιοψίας (πλακίδια) και συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε συνολικά 90 δείγματα αναφοράς που αντιστοιχούν σε όλες τις κλάσεις που ορίσαμε (‘κόκκινες’, ‘άσπρες’, ‘μώβ’, ‘μπλέ’ και ‘πορτοκαλί’ περιοχές). Έτσι από κάθε ένα από αυτά τα 6 πλακίδια πήραμε κατά μέσο όρο 16 φάσματα αναφοράς από κάθε διαφορετική περιοχή που περιείχε και το σύνολο αυτών το χρησιμοποιήσαμε κατά την εφαρμογή των αλγορίθμων (εικόνα 6.6). Στόχος της εφαρμογής του συνολικού αριθμού φασμάτων ήταν να εξετάσουμε κατά πόσο αυτά μπορούν να λειτουργήσουν ικανοποιητικά σε οποιαδήποτε δείγμα βιοψίας και να δημιουργήσουμε έτσι ένα σύνολο φασμάτων που θα έχει ευρεία εφαρμογή. Επιπλέον, υλοποιήσαμε και ορισμένους αλγορίθμους παίρνοντας δείγματα αναφοράς μόνο από ένα συγκεκριμένο πλακίδιο κάθε φορά, δηλαδή από αυτό το οποίο εξετάζουμε κάθε φορά και λάβαμε το χρωματικό χάρτη του (SAM, SID), προκειμένου να γίνει άμεση σύγκριση με τους αντίστοιχους χάρτες που προκύπτουν

χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς και από τα 6 πλακίδια (SAM_total, SID_total). (εικόνα 6.7)

	Πλακίδιο 1ο	Πλακίδιο 2ο	Πλακίδιο 3ο	Πλακίδιο 4ο	Πλακίδιο 5ο	Πλακίδιο 6ο
R G B						
S AM						
S CM						
N E U C						
S G A						
S I D						

Εικόνα 6.6 Οι χρωματικοί χάρτες που προκύπτουν κατά την εφαρμογή των αλγορίθμων.

	Πλακίδιο 1ο	Πλακίδιο 2ο	Πλακίδιο 3ο	Πλακίδιο 4ο	Πλακίδιο 5ο	Πλακίδιο 6ο
R G B						
S AM totl						
S A M						
S I D totl						
S I D						

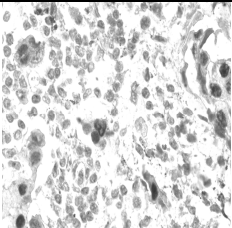
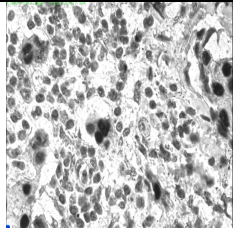
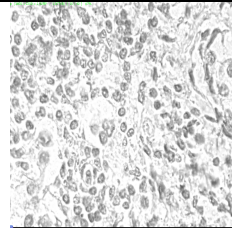
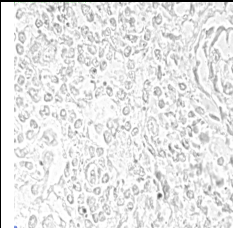
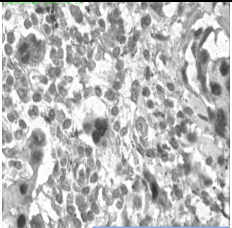
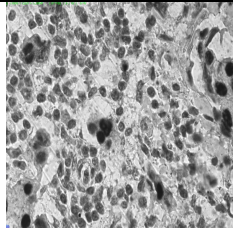
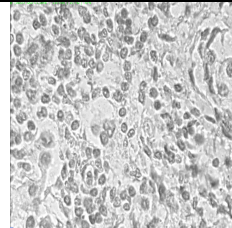
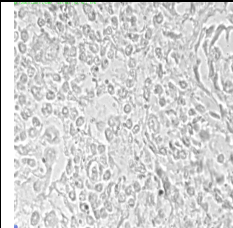
Εικόνα 6.7 Σύγκριση SAM, SID με SAM_total, SID_total αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας όλους τους χρωματικούς χάρτες που προκύπτουν από την εφαρμογή των παραπάνω αλγορίθμων, παρατηρούμε ότι οι περιοχές που μας ενδιαφέρουν (υγιείς, καρκινοπαθείς, ενδιάμεσες) διαφοροποιούνται σε κάθε περίπτωση με τον ίδιο περίπου τρόπο. Επομένως, τα κριτήρια επιλογής μας για τον διαχωρισμό των διαφόρων βαθμών αλλοίωσης μίας περιοχής είναι σωστά. Ακόμα, διακρίνουμε ότι οι χρωματικοί χάρτες που προκύπτουν κατά την εφαρμογή του αλγορίθμου SAM διαχωρίζουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τις διάφορες καταστάσεις των κυττάρων συγκριτικά με τους υπολοίπους που στην περίπτωση μας δεν μας δίνουν κάποια χρήσιμη πληροφορία όσο αναφορά την κατηγοριοποίηση των κυττάρων σε υγιή, καρκινοπαθή και στις ενδιάμεσες

καταστάσεις που έχουμε ορίσει. Αξιοσημείωτο είναι ότι οι αλγόριθμοι που εφαρμόστηκαν σε κάθε πλακίδιο, ιδιαίτερα ο SAM που όπως προαναφέραμε μας δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα από όλους, χρησιμοποιώντας το σύνολο των φασμάτων αναφοράς από όλα τα πλακίδια παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας με τους αντίστοιχους που εφαρμόστηκαν χρησιμοποιώντας τα φάσματα αναφοράς από το συγκεκριμένο πλακίδιο κάθε φορά. Δηλαδή οι χρωματικοί χάρτες που προκύπτουν από την εφαρμογή του με φάσματα αναφοράς είτε από το ίδιο το πλακίδιο είτε από όλα τα πλακίδια συνολικά παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους. Αυτή η παρατήρηση καθιστά έγκυρη και εύστοχη την διάκριση που κάναμε για τον προσδιορισμό της κατάστασης των κυττάρων δηλαδή τον ορισμό των κλάσεων. Συμπερασματικά, ο πλέον χρήσιμος αλγόριθμος στην περίπτωση μας είναι μόνο ο SAM, οπότε επικεντρωνόμαστε σε αυτόν στην συνέχεια της μελέτης μας.

▪ ΒΗΜΑ 4^ο

Σε αυτό το βήμα επαναλαμβάνουμε την πειραματική διαδικασία που εφαρμόσαμε και προηγούμενα με την διαφορά όμως ότι τώρα μεταβάλλουμε τις συνθήκες φωτισμού κάτω από τις οποίες πραγματοποιούμε το πείραμα. Συγκεκριμένα με την γνωστή πλέον μέθοδο της υπερφασματικής απεικόνισης παίρνουμε τους φασματικούς κύβους από ένα πλακίδιο σε 5 διαφορετικές συνθήκες φωτισμού. Στόχος του βήματος αυτού είναι να παρατηρήσουμε αν και πόσο οι διαφορετικές συνθήκες φωτισμού επηρεάζουν τα αποτελέσματα της εφαρμογής των αλγορίθμων, δηλαδή τους χρωματικούς χάρτες που προκύπτουν από αυτούς. Αυτή η παρατήρηση κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική για μελλοντική εφαρμογή της έρευνας μας ανεξάρτητα των συνθηκών που επικρατούν σε κάθε δεδομένη περίπτωση. Ακολουθούν τέσσερις μόνο ενδεικτικές εικόνες για κάθε μία διαφορετική συνθήκη φωτισμού, για το ίδιο πλακίδιο, στα 420nm, 520nm, 700nm και 800nm. (εικόνα 6.8)

	420nm	520nm	700nm	800nm
ΦΩΣ 1				
ΦΩΣ 2				

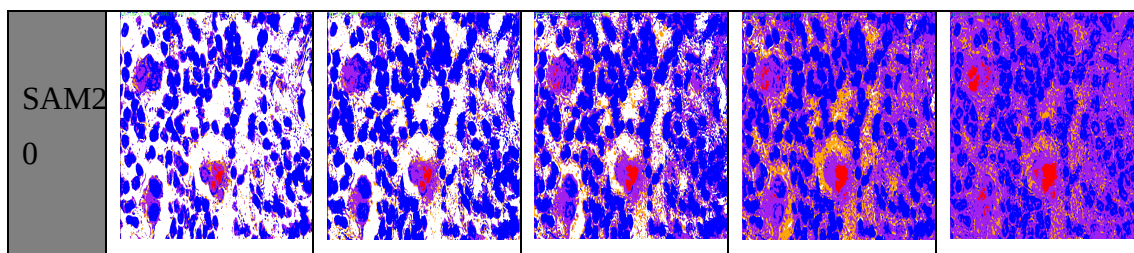
Φ Ω Σ 3				
Φ Ω Σ 4				
Φ Ω Σ 5				

Εικόνα 6.8 Εικόνες στα 420nm, 520nm, 700nm και 800nm από τους φασματικούς κύβους που προέκυψαν για 5 διαφορετικές συνθήκες φωτισμού.

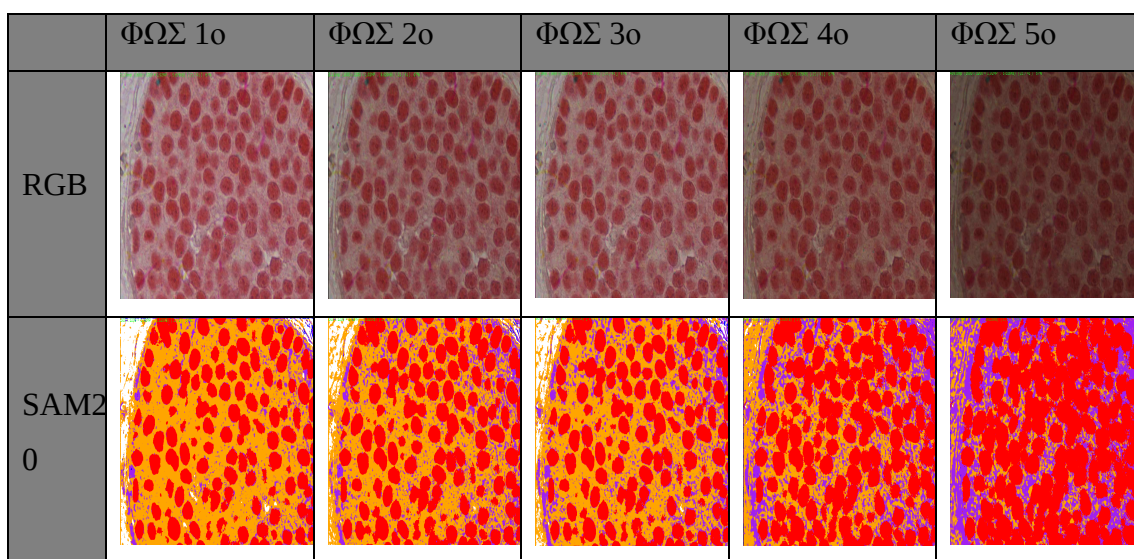
- ΒΗΜΑ 5^ο

Στο σημείο αυτό, χρησιμοποιώντας τους 5 φασματικούς κύβους που λάβαμε από το παραπάνω βήμα, εφαρμόσαμε σε αυτούς τον αλγόριθμο Spectral Angle Mapper (SAM), ο οποίος συγκριτικά με όλους τους άλλους που υλοποιήσαμε είναι ο μόνος που μας δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την ταξινόμηση των pixels σε κάθε περίπτωση. Σκοπός μας ήταν να δούμε εάν και πόσο ο αλγόριθμος αυτός επηρεάζεται από τις αλλαγές στις συνθήκες φωτισμού. Έτσι χρησιμοποιώντας το σύνολο των φασμάτων αναφοράς, εφαρμόσαμε τον SAM σε 5 διαφορετικές συνθήκες φωτισμού και προέκυψαν οι παρακάτω χρωματικοί χάρτες (εικόνα 6.9, 6.10, 6.11):

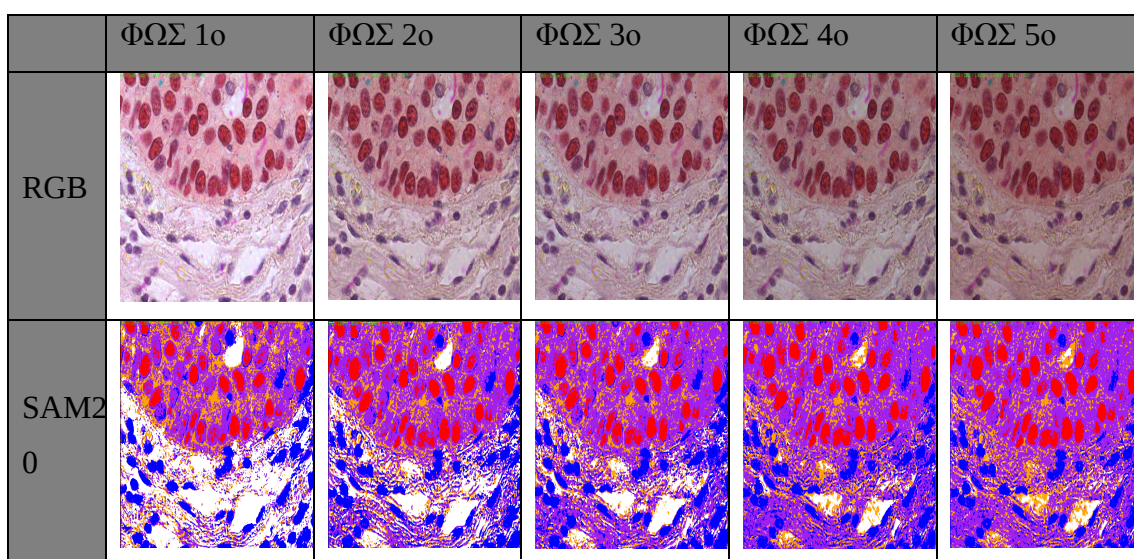
	ΦΩΣ 1ο	ΦΩΣ 2ο	ΦΩΣ 3ο	ΦΩΣ 4ο	ΦΩΣ 5ο
RGB					



Εικόνα 6.9 Πλακίδιο 123493.18 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.



Εικόνα 6.10 Πλακίδιο 124358.22 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.



Εικόνα 6.11 Πλακίδιο 123493.20 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.

Όπως παρατηρούμε τα αποτελέσματα του αλγορίθμου SAM είναι ικανοποιητικά, αφού οι χρωματικοί χάρτες που προκύπτουν σε όλες τις διαφορετικές συνθήκες φωτισμού έχουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας μεταξύ τους και διακρίνουν με σχετικά μεγάλη ακρίβεια τις διαφορετικές καταστάσεις του κυτάρου. Αυτό βέβαια ήταν αναμενόμενο καθώς ο SAM ταξινομεί τα pixels σε μια κλάση σύμφωνα με την γωνία που σχηματίζουν με τα αντίστοιχα φάσματα αναφοράς και άρα οι διαφορετικές συνθήκες φωτισμού δεν επηρεάζουν την γωνία αυτήν παρά μόνο το μέγεθος του διανύσματος.

- ΒΗΜΑ 6^ο

Συνεχίζοντας, εφαρμόζουμε τον Spectral Angle Mapper (SAM), μειώνοντας όμως σταδιακά τις μπάντες που χρησιμοποιούμε. Συγκεκριμένα μειώνουμε τον αριθμό των μπαντών από 20 σε 4 και σε επόμενο βήμα σε 3 μπάντες για την περίπτωση που χρησιμοποιούμε μόνο τα φάσματα αναφοράς που αντιστοιχούν σε κάθε μια από τις περιπτώσεις που εξετάσαμε. Έτσι μειώνοντας τον αριθμό των μπαντών από 20 σε 4 και χρησιμοποιώντας για κάθε περίπτωση τα αντίστοιχα φάσματα αναφοράς αυτής προκύπτει ο παρακάτω πίνακας που παρουσιάζει τα ποσοστά ομοιότητας του SAM 20 μπαντών με τον αντίστοιχο των 4 μπαντών. Αναλυτικότερα, οι 20 μπάντες κυμαίνονται από 420nm μέχρι 800 nm με βήμα 20 nm ενώ οι 4 μπάντες είναι συνδυασμός τεσσάρων μπαντών από αυτές τις 20 συνολικά μπάντες. Συγκεκριμένα οι τετράδες μπαντών που επελέγησαν ήταν συνολικά 22 διαφορετικοί συνδυασμοί μπαντών μεταξύ των 420 και 800 nm. και είναι οι εξής (πίνακας 6.1) :

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΠΑΝΤΩΝ (nm)	ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΠΑΝΤΩΝ(1-20)
460-540-600-760	3-7-10-18
460-580-620-740	3-9-11-17
480-500-640-740	4-5-12-17
480-520-580-740	4-6-9-17
480-520-600-700	4-6-10-15
480-540-600-740	4-7-10-17
480-540-620-700	4-7-11-15
480-560-600-680	4-8-10-14
480-560-640-700	4-8-12-15
480-580-640-740	4-9-12-17
480-580-700-800	4-9-15-20
480-600-640-740	4-10-12-17
480-600-640-800	4-10-12-20

500-520-640-740	5-6-12-17
500-540-580-700	5-7-9-15
500-540-620-740	5-7-11-17
500-580-640-700	5-9-12-15
500-580-640-740	5-9-12-17
520-580-640-740	6-9-12-17
520-580-700-740	6-9-15-17
540-580-620-740	7-9-11-17
540-600-640-740	7-10-12-17

Πίνακας 6.1 Οι συνδυασμοί τεσσάρων μπαντών.

Η εφαρμογή του SAM με λιγότερες μπάντες (4 μπάντες) έγινε και στα 6 δείγματα βιοψίας (πλακίδια) προκειμένου να διαπιστώσουμε το κατά πόσο επηρεάζονται οι χρωματικοί μας χάρτες ή τα ποσοστά ομοιότητας από τη μείωση των μπαντών. Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τα ποσοστά ομοιότητας του SAM 20 μπαντών με τον αντίστοιχο SAM 4 μπαντών για όλους τους παραπάνω συνδυασμούς τεσσάρων μπαντών χρησιμοποιώντας σε κάθε περίπτωση τα φάσματα αναφοράς που αντιστοιχούν σε κάθε ένα από αυτά τα πλακίδια που εξετάζεται. Ο πίνακας αυτός δείχνει το ποσοστό (%) της ομοιότητας συνολικά για όλες τις κλάσεις μεταξύ του SAM20 και του αντίστοιχου SAM για κάθε συνδυασμό 4 μπαντών.(πίνακας 6.2). Σημειώνονται τα μεγαλύτερα ποσοστά, όπου προφανώς οι συνδυασμοί των 4 μπαντών από τους οποίους προκύπτουν έχουν χρήσιμη πληροφορία.

4 μπάντες (nm)	Πλακίδιο 1ο	Πλακίδιο 2ο	Πλακίδιο 3ο	Πλακίδιο 4ο	Πλακίδιο 5ο	Πλακίδιο 6ο
460-540-600-760	81.4490	81.8183	71.9270	67.3412	65.9379	71.2314
460-580-620-740	76.8202	87.5561	75.7753	82.1265	68.5723	72.6756
480-500-640-740	75.6073	82.2223	77.1944	64.9317	66.9607	64.3003
480-520-580-740	83.0268	90.0438	74.9770	81.3216	68.6157	74.2164
480-520-600-700	83.4740	85.4349	80.7119	69.1522	70.3157	76.3061
480-540-600-740	83.1365	88.3893	77.5808	83.1235	73.6854	72.8378
480-540-620-700	79.2237	83.4656	80.6274	75.5668	67.2676	74.5556
480-560-600-680	79.9402	84.7159	76.3957	71.7480	67.3392	73.6975
480-560-640-700	82.6996	85.5664	79.7071	75.5318	67.2143	74.8701
480-580-640-740	81.2738	87.5647	79.3580	80.3214	69.3330	70.2013
480-580-700-800	81.4784	88.1553	71.5876	81.6880	71.8609	71.4189
480-600-640-740	78.6996	82.7168	78.8254	79.3036	67.8280	65.8036
480-600-640-800	78.8966	83.6532	78.5731	80.5471	69.8489	66.9262

500-520-640-740	77.8943	85.3085	79.2370	72.0981	64.4872	74.2283
500-540-580-700	82.5996	88.8495	75.1085	79.3533	71.1287	72.2182
500-540-620-740	79.8817	84.9303	80.3377	80.8181	72.9876	73.6373
500-580-640-700	79.4373	86.6439	77.9827	77.2954	64.2171	72.5519
500-580-640-740	77.3590	86.7450	77.8316	79.9886	64.8291	68.5747
520-580-640-740	80.7172	90.5940	81.1448	81.2390	67.4120	73.5868
520-580-700-740	80.8923	91.3635	76.3748	82.4387	69.8126	75.4157
540-580-620-740	78.5023	90.0928	79.7418	84.3228	73.5173	75.0549
540-600-640-740	79.0325	87.1251	81.1671	81.5778	71.3573	71.3748

Πίνακας 6.2 Πίνακας με ποσοστά ακριβείας (%) του SAM για 4 μπάντες ,συγκριτικά με SAM για 20 μπάντες λαμβάνοντας υπόψη **μόνο τα φάσματα αναφοράς** που επιλέξαμε από κάθε πλακίδιο σε κάθε περίπτωση.

Μελετώντας τον παραπάνω πίνακα με τα ποσοστά ομοιότητας εντοπίζουμε το κάθε πλακίδιο σε ποιο συνδυασμό 4 μπαντών εμφανίζει το μεγιστό ποσοστό ομοιότητας με τον SAM 20 μπαντών.Τις παρατηρήσεις μας αυτές μπορούμε να συγκεντρώσουμε στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6.3)

	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο
ΜΕΓΙΣΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ	83.4740	91.3635	81.1671	84.3228	73.6854	76.3061
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ 4 ΜΠΑΝΤΩΝ	4-6-10-15	6-9-15-17	7-10-12-17	7-9-11-17	4-7-10-17	4-6-10-15

Πίνακας 6.3 Δείχνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας του SAM20,SAM4 μπαντών και την τετράδα μπαντών που εντοπίζονται αυτά.

Άρα οι τετράδες μπαντών όπου εμφανίζονται τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας είναι:

- 1) 480-520-600-700 == 4-6-10-15
- 2) 520-580-700-740 == 6-9-15-17
- 3) 540-600-640-740 == 7-10-12-17
- 4) 540-580-620-740 == 7-9-11-17
- 5) 480-540-600-740 == 4-7-10-17

Από τον πίνακα 6.2 συμπεραίνουμε και τα εξής :

- Για την 1^η τετράδα (4-6-10-15) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παραμένουν σχεδόν σταθερά με μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 16%.
- Για την 2^η τετράδα (6-9-15-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 22%.
- Για την 3^η τετράδα (7-10-12-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παραμένουν σχεδόν σταθερά με μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 10%.
- Για την 4^η τετράδα (7-9-11-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 17%.
- Για την 5^η τετράδα (4-7-10-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 15%.

Άρα οι συνδυασμοί 1), 3), 4), 5) είναι οι καλύτεροι δυνατοί αφού συγκριτικά με τους υπολοίπους παρουσιάζουν την ελάχιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό που παρουσιάζεται σε κάποια περίπτωση από αυτές που εξετάζουμε.

Παρακάτω παραθέτουμε για το πρώτο πλακίδιο τον πίνακα που δείχνει τα ποσοστά απόκλισης (διαφοράς) του αριθμού των pixels κάθε κλάσης με τα αντίστοιχα του SAM 20 (πίνακας 6.4) προς τα συνολικά pixels της εικόνας .Οι αντίστοιχοι πίνακες για τα άλλα 5 πλακίδια παρουσιάζονται στο παράρτημα.

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	1.5728	0	0.6101	-2.1097	0.0095
20 bands_460-580-620-740	0.9653	0	-1.7178	-1.2639	2.2447
20 bands_480-500-640-740	-0.3004	0	-10.9939	8.4851	2.8101
20 bands_480-520-580-740	-0.8605	0	-1.6345	3.4344	-0.2752
20 bands_480-520-600-700	-0.8967	0	2.0590	1.5719	-2.7347

20 bands_480-540-600-740	-0.3464	0	4.6909	-2.2093	-1.7204
20 bands_480-540-620-700	2.8895	0	1.1727	-0.2545	-3.9949
20 bands_480-560-600-680	0.6371	0	-2.7250	4.4072	-2.3193
20 bands_480-560-640-700	1.4946	0	-2.8329	2.5036	-1.1657
20 bands_480-580-640-740	-1.1841	0	-1.6919	0.5738	2.3032
20 bands_480-580-700-800	1.5461	0	-5.5353	1.8035	2.1855
20 bands_480-600-640-740	-3.2368	0	4.9242	-1.8582	0.5857
20 bands_480-600-640-800	-4.0813	0	4.4705	-0.0529	0.0786
20 bands_500-520-640-740	17.5086	0	-11.3384	11.7684	-0.8886
20 bands_500-540-580-700	2.9232	0	-6.5552	5.6743	-2.1047
20 bands_500-540-620-740	4.0011	0	-8.7931	6.1967	-1.4244
20 bands_500-580-640-700	-1.1393	0	-5.6409	4.0744	2.6434
20 bands_500-580-640-740	-1.3180	0	-5.8792	2.8313	13.7281
20 bands_520-580-640-740	0.9010	0	-2.9016	3.2039	-1.2024
20 bands_520-580-700-740	3.3403	0	-5.9073	2.9275	-0.3605
20 bands_540-580-620-740	6.5015	0	-4.5942	0.1835	-1.8625
20 bands_540-600-640-740	1.1187	0	5.8967	-4.2211	-2.7943

Πίνακας 6.4 Πίνακας με τα ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα(κλάση)μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 4 μπαντών για το πλακίδιο. 121588.2.32 (πλακίδιο1).

Ας δούμε όμως ποια κλάση σε κάθε πλακίδιο και για όλους τους συνδυασμούς μπαντών μειώνει το ποσοστό ομοιότητας με τον SAM20 με βάση τα δεδομένα του πίνακα 6.4 και των αντίστοιχων που βρίσκονται στο παράρτημα.(πίνακας 6.5)

	RED	BLUE	PURPLE	ORANGE	WHITE
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	2	-	11	4	5
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	-	-	7	7	8
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	-	-	14	3	5
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	-	11	-	9	2
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	-	-	7	11	4
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο	2	-	4	9	7
ΣΥΝΟΛΟ	4	11	43	43	32

Πίνακας 6.5 Παρουσιάζει τον αριθμό κλάσεων που συνολικά για τους 22 συνδυασμούς 4 μπαντών παρουσιάζουν μέγιστο ποσοστό απόκλισης από τον SAM20.

Άρα οι κλάσεις PURPLE, ORANGE (μωβ, πορτοκαλί) παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και οδηγούν σε μείωση του ποσοστού ομοιότητας.

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει για τους 5 συνδυασμούς 4 μπαντών που βρήκαμε τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας, ποια από τις κλάσεις μας σε κάθε περίπτωση παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό διαφοράς σε σχέση με την αντίστοιχη της στον SAM20.(πίνακας 6.6). Σημειώνονται, οι κλάσεις που παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό διαφοράς σε σχέση με τις υπόλοιπες και αυτές του SAM 20 μπαντών στις τετράδες που κάθε πλακίδιο εμφανίζει το μέγιστο ποσοστό ομοιότητας

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΜΠΑΝΤΩΝ	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο
6-9-15-17	PURPLE	ORANGE	PURPLE	BLUE	ORANGE	ORANGE
7-10-12-17	PURPLE	WHITE	ORANGE	BLUE	PURPLE	ORANGE
7-9-11-17	RED	WHITE	PURPLE	BLUE	ORANGE	ORANGE
4-7-10-17	PURPLE	PURPLE	ORANGE	BLUE	PURPLE	PURPLE

4-6-10-15	WHITE	WHITE	PURPLE	ORANGE	ORANGE	ORANGE
-----------	-------	-------	--------	--------	--------	--------

Πίνακας 6.6 Ο πίνακας αυτός δείχνει για τις καλύτερες επιλογές 4 μπαντών την κλάση που εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης από την αντίστοιχη της του SAM 20 μπαντών.

. Αυτή που εμφανίζεται πιο συχνά να έχει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης στις μπάντες με τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας είναι η ORANGE (πορτοκαλί). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως εξής ,φασματικά χαρακτηριστικά που αντιστοιχούν σε αυτήν την κλάση παρουσιάζουν μεγάλες αυξομειώσεις (variability) οπότε μειώνοντας τον αριθμό των μπαντών από 20 σε 4 χάνουμε σημαντική πληροφορία. Μια πιθανή λύση σε αυτήν την διαπίστωση θα μπορούσε να είναι η συλλογή περισσότερων φασμάτων αναφοράς σε συνδυασμό με άλλους ταξινομητές. Μια δεύτερη εξήγηση μπορεί να δοθεί εξαιτίας της υποκειμενικότητας με την οποία διαλέξαμε τα φάσματα αναφοράς αυτής της κλάσης από κύβο σε κύβο και επομένως η συστηματική συλλογή φασμάτων αναφοράς θα μπορούσε να δώσει λύση σε αυτό το πρόβλημα αλλά δεν είναι ιδιαίτερα εύκολο αφού μεταξύ των κύβων τα φάσματα για την κλάση αυτήν μπορούν να μεταβάλλονται σημαντικά αλλά οπτικά να φαίνονται ίδια.

- ΒΗΜΑ 7^ο

Σε αυτό το βήμα ουσιαστικά επαναλαμβάνουμε την διαδικασία που εφαρμόσαμε και στο ΒΗΜΑ 6^ο με την διαφορά ότι τώρα μειώνουμε τον αριθμό των μπαντών από 4 σε 3 μπάντες. Έτσι εφαρμόζουμε τον Spectral Angle Mapper (SAM), για 3 μπάντες για την περίπτωση που χρησιμοποιούμε μόνο τα φάσματα αναφοράς που αντιστοιχούν σε κάθε μια από τις περιπτώσεις που εξετάζουμε και όχι το σύνολο των φασμάτων αναφοράς από όλα τα πλακίδια μαζί. Συγκεκριμένα οι τριάδες μπαντών που επελέγουμε για να εξετάσουμε τον βαθμό ομοιότητας του SAM αυτών με εκείνον των 20 μπαντών είναι συνολικά 18 διαφορετικοί συνδυασμοί 3 μπαντών μεταξύ των 420 και 800 nm. και είναι οι εξής (πίνακας 6.7) :

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΠΑΝΤΩΝ (nm)	ΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΠΑΝΤΩΝ(1-20)
480-580-700	4-9-15
480-580-740	4-9-17
480-600-700	4-10-15
480-600-740	4-10-17
480-640-700	4-12-15
480-640-720	4-12-16

480-640-800	4-12-20
500-580-700	5-9-15
500-600-700	5-10-15
500-600-740	5-10-17
500-620-740	5-11-17
520-580-700	6-9-15
520-580-740	6-9-17
520-600-700	6-10-15
540-580-700	7-9-15
540-600-740	7-10-17
560-600-680	8-10-14
640-720-800	12-16-20
480-580-700	4-9-15
480-580-740	4-9-17
480-600-700	4-10-15
480-600-740	4-10-17

Πίνακας 6.7 Οι συνδυασμοί τριών μπαντών.

Η εφαρμογή του SAM με ακόμη λιγότερες μπάντες (3 μπάντες) έγινε και στα 6 δείγματα βιοψίας (πλακίδια) προκειμένου να διαπιστώσουμε το κατά πόσο μεταβάλλεται ο βαθμός ομοιότητας με τα αποτελέσματα του αλγορίθμου χρησιμοποιώντας και τις 20 μπάντες και αν υπάρχει μεγάλη απόκλιση με τα αντίστοιχα των 4 μπαντών..Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τα ποσοστά ομοιότητας του SAM 20 μπαντών με τον αντίστοιχο SAM 3 μπαντών για όλους τους παραπάνω συνδυασμούς τριών μπαντών χρησιμοποιώντας σε κάθε περίπτωση τα φάσματα αναφοράς που αντιστοιχούν σε κάθε ένα από αυτά τα πλακίδια που εξετάζουμε. Τα ποσοστά αυτά αναδεικνύουν το βαθμό (%) που μοιάζουν μεταξύ τους οι χρωματικοί χάρτες που δημιουργήθηκαν κάνοντας χρήση 3 μπαντών,με αυτούς που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας όλες τις μπάντες, δηλαδή και τις 20. Σημειώνονται τα μεγαλύτερα ποσοστά, όπου προφανώς οι συνδυασμοί των 3 μπαντών για τους οποίους προκύπτουν είναι οι πιο χρήσιμοι. (πίνακας 6.8).

3 μπάντες (nm)	Πλακίδιο 1ο	Πλακίδιο 2ο	Πλακίδιο 3ο	Πλακίδιο 4ο	Πλακίδιο 5ο	Πλακίδιο 6ο
480-580-700	80.5609	85.3344	70.9209	76.3832	68.2033	71.6151
480-580-740	79.0762	85.9138	67.2558	80.9258	68.1698	67.2444
480-600-700	80.0673	80.2808	74.9556	59.8839	66.7527	68.1234
480-600-740	78.8859	83.0317	74.3369	80.5227	68.4666	65.4477
480-640-700	77.5699	80.6290	76.1982	61.1274	65.4115	67.6614
480-640-720	73.9394	79.9395	74.0254	65.9094	63.3395	63.1465
480-640-800	78.1304	83.7007	78.7181	72.5751	68.2206	66.8152
500-580-700	78.5315	85.2198	74.1373	77.5935	64.1106	73.4384
500-600-700	74.2663	77.2037	69.3483	65.5026	60.8107	65.3302
500-600-740	70.0933	79.7680	66.8526	76.6029	68.2033	61.4555
500-620-740	70.9313	74.5555	70.9037	72.2851	57.2619	55.3289
520-580-700	79.9014	89.4542	75.6403	75.4730	68.4732	73.5416
520-580-740	80.3879	89.9444	75.6052	82.2897	67.2970	73.8908
520-600-700	80.8316	85.9182	79.1911	69.1441	68.5656	74.0227
540-580-700	80.1160	89.3820	73.7077	76.8807	66.7527	70.7759
540-600-740	78.7532	87.6452	75.8187	83.2607	72.3769	72.2894
560-600-680	76.5933	85.2043	73.8398	70.1332	65.7040	71.2951
640-720-800	53.7546	66.8022	53.8533	69.9402	58.1649	41.5905

Πίνακας 6.8 Πίνακας με ποσοστά ακριβείας (%) του SAM για 3 μπάντες ,συγκριτικά με SAM για 20 μπάντες λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα φάσματα αναφοράς που επιλέξαμε από κάθε πλακίδιο σε κάθε περίπτωση.

Ο παραπάνω πίνακας μας δίνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας που μπορούμε να πετύχουμε με τις επιλεγ-μένες τριάδες μπαντών που χρησιμοποιήσαμε και είναι συγκεντρωμένα στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 6.9)

	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο
ΜΕΓΙΣΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ	80.8316	89.9444	79.1911	83.2607	72.3769	74.0227
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ 4 ΜΠΑΝΤΩΝ	6-10-15	6-9-17	6-10-15	7-10-17	7-10-17	6-10-15

Πίνακας 6.9 Δείχνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας του SAM20,SAM4 μπαντών και την τριάδα μπαντών που εντοπίζονται αυτά.

Άρα οι τριάδες μπαντών όπου εμφανίζονται τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας είναι:

1) 520-600-700 == 6-10-15

2) 520-580-740 == 6-9-17

3) 540-600-740 == 7-10-17

Συγκρίνοντας με εκείνους τους συνδυασμούς των τεσσάρων μπαντών (BHMA 6°) παρατηρούμε ότι κάποιες μπάντες επαναλαμβάνονται και μάλιστα ο συνδυασμός τεσσάρων μπαντών προκύπτει από τους συνδυασμούς των τριών με την πρόσθεση σε κάθε περίπτωση μιας επιπλέον μπάντας.

Από τον πίνακα 6.8 και για τους παραπάνω συνδυασμούς μπαντών παρατηρούμε τα εξής :

- Για την 1^η τριάδα (6-10-15) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παραμένουν σχεδόν σταθερά με μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 12%.
- Για την 2^η τριάδα (6-9-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 22%.
- Για την 3^η τριάδα (7-10-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παραμένουν σχεδόν σταθερά με μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 15%.

Άρα οι συνδυασμοί 1), 2), είναι οι καλύτεροι δυνατοί αφού συγκριτικά με τους υπολοίπους παρουσιάζουν την ελάχιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό που παρουσιάζεται σε κάποια περίπτωση από αυτές που εξετάζουμε.

Παρακάτω παραθέτουμε για το πρώτο πλακίδιο τον πίνακα που δείχνει τα ποσοστά απόκλισης (διαφοράς) του αριθμού των pixels κάθε κλάσης με τα αντίστοιχα του SAM 20 (πίνακας 6.10) προς τα συνολικά pixels της εικόνας .Οι αντίστοιχοι πίνακες για τα άλλα 5 πλακίδια παρουσιάζονται στο παράρτημα.

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	1.2780	0	-2.3915	0.5222	0.5288
20 bands_480-580-740	-0.1189	0	-2.3060	-0.0195	3.0466

20 bands_480-600-700	-1.4590	0	4.4766	-2.2382	-0.7800
20 bands_480-600-740	-3.1249	0	4.6938	-2.3744	1.2203
20 bands_480-640-700	-0.0452	0	-1.7335	3.0119	-1.2334
20 bands_480-640-720	-1.1484	0	-8.9036	12.3473	-2.2944
20 bands_480-640-800	-2.0752	0	-5.6571	7.6101	0.1231
20 bands_500-580-700	1.0621	0	-7.1059	2.8522	2.9413
20 bands_500-600-700	-1.9151	0	-5.2399	2.8708	4.0339
20 bands_500-600-740	-7.3778	0	0.5410	1.1385	5.6153
20 bands_500-620-740	-0.4764	0	-8.0013	4.2126	4.1824
20 bands_520-580-700	2.9751	0	-4.2696	3.7623	-2.5306
20 bands_520-580-740	0.8039	0	-3.0767	3.1397	-0.8467
20 bands_520-600-700	2.1733	0	1.6428	-0.8075	-3.0094
20 bands_540-580-700	4.7169	0	-3.2204	1.0461	-2.6051
20 bands_540-600-740	2.2943	0	5.1041	-4.7123	-2.5204
20 bands_560-600-680	2.3197	0	-5.5023	5.2878	-2.1052
20 bands_640-720-800	-12.5521	0	4.8651	10.5173	-2.6435

Πίνακας 6.10 Πίνακας με τα ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.32 (πλακίδιο1).

Ας δούμε όμως ποια κλάση σε κάθε πλακίδιο και για όλους τους συνδυασμούς μπαντών μειώνει το ποσοστό ομοιότητας με τον SAM20 με βάση τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα και των αντίστοιχων που βρίσκονται στο παράρτημα.(πίνακας 6.11)

	RED	BLUE	PURPLE	ORANGE	WHITE
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	3	-	9	4	2
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	-	-	6	7	5
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	-	-	9	8	1

ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	-	4	-	10	4
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	-	2	9	5	2
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο	3	-	3	6	6
ΣΥΝΟΛΟ	6	6	36	40	20

Πίνακας 6.11 Παρουσιάζει τον αριθμό κλάσεων που συνολικά για τους 18 συνδυασμούς 3 μπαντών παρουσιάζουν μέγιστο ποσοστό απόκλισης από τις αντίστοιχες κλάσεις του SAM20.

Άρα και στην περίπτωση των 3 μπαντών οι κλάσεις PURPLE, ORANGE(μωβ, πορτοκαλί) παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και οδηγούν σε μείωση του ποσοστού ομοιότητας. Ακολουθεί πίνακας που παρουσιάζει ποια κλάση εμφανίζει μεγαλύτερη ποσοστιαία διαφορά με την αντίστοιχη του SAM που χρησιμοποιεί όλες τις μπάντες για τις τριάδες μπαντών που εντοπίσαμε να έχουν το μεγαλύτερο βαθμό ομοιότητας με τις 20 μπάντες. (πίνακας 6.12).

ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΜΠΑΝΤΩΝ	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο
6-10-15	WHITE	WHITE	PURPLE	ORANGE	ORANGE	ORANGE
6-9-17	ORANGE	PURPLE	ORANGE	BLUE	ORANGE	ORANGE
7-10-17	PURPLE	WHITE	PURPLE	BLUE	PURPLE	WHITE

Πίνακας 6.12 Ο πίνακας αυτός δείχνει για τις καλύτερες επιλογές 3 μπαντών την κλάση που εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης από την αντίστοιχη της του SAM 20 μπαντών.

Στον παραπάνω πίνακα 6.12 η κλάση που εμφανίζεται πιο συχνά να έχει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης στις μπάντες με τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας είναι η ORANGE. Αυτό εξηγείται με τον ίδιο τρόπο που εξηγήθηκε η αντίστοιχη παρατήρηση στην περίπτωση με τις 4 μπάντες.

Ανακεφαλαιώνοντας ,κατά την μείωση των μπαντών απο 4 σε 3 μπάντες το ποσοστό ομοιότητας με τις 20 μπάντες δεν μεταβάλλεται σημαντικά. Η μέγιστη πτώση του ποσοστού στις 3 μπάντες είναι μόλις περίπου 2%, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός 3 μπαντών μας δίνει ικανοποιητική και επαρκή πληροφόρηση. Επίσης , διαπιστώσαμε ότι κάνοντας μία καλή προσέγγιση στο ορατό φάσμα ή πολύ κοντά στο ορατό, είναι εφικτό να εντοπίσουμε 3 μπάντες σε αυτό που θα δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα με μπάντες ολόκληρου του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

- ΒΗΜΑ 8°

Σε αυτό το βήμα, επαναλαμβάνουμε την ακριβώς την διαδικασία που εφαρμόσαμε στο ΒΗΜΑ 6, με μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιούμε τον συνολικό αριθμό των φασμάτων αναφοράς από όλα τα πλακίδια δηλαδή και τα 90 φάσματα στα οποία καταλήξαμε και αναφέρονται σε όλες τις κλάσεις που ορίσαμε. Εφαρμόζουμε επομένως τον Spectral Angle Mapper (SAM) χρησιμοποιώντας τα συνολικά φάσματα αναφοράς, μειώνοντας όμως σταδιακά τις μπάντες που χρησιμοποιούμε από 20 σε 4 και παρατηρούμε πως μεταβάλλονται τα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ αυτών. Έτσι ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα ποσοστά ομοιότητας του SAM 20 μπαντών με τον αντίστοιχο των 4 μπαντών. Οι 20 μπάντες όπως και προηγουμένως κυμαίνονται από 420nm μέχρι 800 nm με βήμα 20 nm ενώ οι 4 μπάντες είναι οι ίδιοι 22 συνδυασμοί τεσσάρων μπαντών που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.

Η εφαρμογή του SAM με λιγότερες μπάντες (4 μπάντες) έγινε σε συνολικά 9 δείγματα βιοψίας (πλακίδια) από τα οποία τα 6 είναι τα δείγματα από τα οποία έχουμε επιλέξει φάσματα αναφοράς και τα υπόλοιπα 3 είναι τυχαία δείγματα. Σε όλα τα πλακίδια αυτά, και στα 9 δηλαδή, εφαρμόζεται ο αλγόριθμος προκειμένου να διαπιστώσουμε το κατά πόσο επηρεάζονται τα ποσοστά ομοιότητας από τη μείωση των μπαντών. Στόχος της εφαρμογής των συνολικών φασμάτων αναφοράς και σε τυχαία δείγματα βιοψίας (πλακίδια) είναι να καταλήξουμε σε ένα σύνολο φασμάτων που θα φέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε οποιαδήποτε περίπτωση δείγματος και αν εφαρμοστεί, να έχει δηλαδή ευρεία εφαρμογή. Ο πίνακας που ακολουθεί (πίνακας 6.13) παρουσιάζει τον βαθμό ομοιότητας του SAM με 20 και 4 μπάντες αντίστοιχα. Σημειώνονται τα μεγαλύτερα ποσοστά, όπου προφανώς οι συνδυασμοί των 4 μπαντών από τους οποίους προκύπτουν εμπεριέχουν χρήσιμη πληροφορία.

4 μπάντες (nm)	Πλακ.δια 1ο	Πλακ.δια 2ο	Πλακ.δια 3ο	Πλακ.δια 4ο	Πλακ. 5ο	Πλακ. 6ο	Πλακ. 7ο	Πλακ. 8ο	Πλακ. .9ο
460-540-600- 760	78.5414	72.8388	73.8197	68.5678	68.4603	69.9122	76.3295	68.3472	78.1551
460-580-620- 740	76.9722	81.4844	77.3614	70.7745	74.4293	72.4396	79.0741	73.9094	81.6239
480-500-640- 740	76.2972	77.4045	75.2244	60.3691	68.9141	63.3911	77.9593	73.4145	77.2040
480-520-580- 740	73.2964	78.2207	71.5323	70.7603	73.2008	74.4371	79.9556	78.5449	81.8405
480-520-600- 700	78.5408	77.7121	74.6675	70.5107	72.2344	70.5824	78.1254	76.5202	79.2729
480-540-600- 740	80.1598	79.2123	77.6852	72.1608	74.9937	73.1339	80.2284	77.1664	82.1184
480-540-620- 700	78.9294	80.3910	76.5503	72.2555	73.8845	69.8640	78.2898	76.5496	80.8863
480-560-600- 680	73.8220	73.7382	70.0380	67.8795	70.0010	69.1803	76.5545	72.1160	76.4355

480-560-640-700	75.9715	78.3597	74.0444	71.1604	71.7029	70.2813	75.1842	74.8054	79.7142
480-580-640-740	74.9836	80.2927	77.4489	69.3049	72.3636	68.0966	79.0891	77.0933	78.4614
480-580-700-800	65.9537	73.1260	66.6988	63.3759	72.5685	69.2122	73.6717	72.7792	78.4020
480-600-640-740	76.4620	78.4326	76.8131	67.5090	73.0008	65.1119	78.4016	75.8251	79.1334
480-600-640-800	77.4526	78.2518	76.9261	68.5094	74.8365	64.4154	81.2964	74.1799	79.4505
500-520-640-740	76.1778	78.3498	76.0444	69.5218	67.6245	70.0703	78.0744	74.6819	79.8344
500-540-580-700	74.4043	74.0829	66.0800	67.7259	67.7297	68.3527	66.0800	73.0344	77.5691
500-540-620-740	78.2695	77.2382	73.8623	71.4288	74.2728	69.8578	73.9632	72.3647	80.6347
500-580-640-700	72.2506	72.8885	70.1359	64.7661	66.1474	66.4172	68.2346	70.5453	75.2907
500-580-640-740	73.9053	74.9568	72.9701	63.4133	65.4052	66.3933	75.0499	71.5846	72.9065
520-580-640-740	77.0390	80.2679	77.1681	71.5057	71.2148	71.9947	73.2346	76.1418	80.4382
520-580-700-740	74.2039	77.5972	71.7190	72.3691	72.4764	71.8323	76.3590	76.2074	80.8307
540-580-620-740	78.0155	80.2194	75.7523	73.2678	75.6527	72.8733	71.2606	73.8811	82.3954
540-600-640-740	75.6185	77.8068	77.2763	71.4220	71.8186	69.8350	73.1383	73.6096	80.4172

Πίνακας 6.13 Πίνακας με ποσοστά ακριβείας (%) του SAM για 4 μπάντες ,συγκριτικά με SAM για 20 μπάντες λαμβάνοντας υπόψη το σύνολο των φασμάτων αναφοράς που επιλέξαμε από όλα τα πλακίδια.

Με βάση τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα προκύπτει ο παρακάτω (πίνακας 6.14) που δείχνει σε κάθε περίπτωση δείγματος το συνδυασμό 4 μπαντών που εμφανίζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με τις 20 μπάντες καθώς και το ποσοστό αυτό.

	ΜΕΓΙΣΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ 4 ΜΠΑΝΤΩΝ
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	80.1598	4-7-10-17

ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	81.4844	3-9-11-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	77.6852	4-7-10-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	73.267	7-9-11-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	75.6527	7-9-11-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο	74.4371	4-6-9-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 7ο	81.2964	4-10-12-20
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 8ο	78.5449	4-6-9-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 9ο	82.3954	7-9-11-17

Πίνακας 6.14 Δείχνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας του SAM20,SAM4 μπαντών και την τετράδα μπαντών που εντοπίζονται αυτά.

Άρα οι τετράδες μπαντών όπου εμφανίζονται τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας είναι:

- 1) 480-540-600-740 == 4-7-10-17**
- 2) 460-580-620-740 == 3-9-11-17**
- 3) 540-580-620-740 == 7-9-11-17**
- 4) 480-520-580-740 == 4-6-9-17**
- 5) 480-600-640-800 == 4-10-12-20**

Μελετώντας τον πίνακα 6.13 καταλήγουμε στα εξής :

- Για την 1^η τετράδα (4-7-10-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παραμένουν σχεδόν σταθερά με μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 10%.
- Για την 2^η τετράδα (3-9-11-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 11%.
- Για την 3^η τετράδα (7-9-11-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παραμένουν σχεδόν σταθερά με μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 11%.

- Για την 4^η τετράδα (4-6-9-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 11%.
- Για την 5^η τετράδα (4-10-12-20) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 17%.

Άρα όλοι οι συνδυασμοί στους οποίους καταλήξαμε διατηρούν σταθερή την απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό που παρουσιάζεται σε κάποια περίπτωση από αυτές που εξετάζουμε.

Ακολουθεί ο πίνακας 6.15, που δείχνει τα ποσοστά απόκλισης (διαφοράς) του αριθμού των pixels κάθε κλάσης με τα αντίστοιχα του SAM 20 προς τα συνολικά pixels της εικόνας για το πρώτο πλακίδιο. Οι αντίστοιχοι πίνακες για τα υπόλοιπα 8 πλακίδια παρουσιάζονται στο παράρτημα για εξοικονόμηση χώρου.

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	-0.3176	-0.3666	-0.3051	-2.4236	3.4956
20 bands_460-580-620-740	-0.6268	-0.3966	-0.8584	4.2844	-2.1744
20 bands_480-500-640-740	-1.2248	-1.8155	-3.1240	6.4400	-0.2748
20 bands_480-520-580-740	-0.7919	-4.2857	-5.5870	9.4609	1.8679
20 bands_480-520-600-700	-0.6921	-0.0643	-1.6615	2.4794	-0.0620
20 bands_480-540-600-740	-1.1583	-0.3046	3.2718	-2.2306	0.8366
20 bands_480-540-620-700	1.7211	-0.2692	-0.6112	0.6656	-1.6935
20 bands_480-560-600-680	0.5725	-0.6972	-2.7831	5.6811	-2.7733
20 bands_480-560-640-700	0.3237	-1.2412	-0.7158	5.8926	-4.2598
20 bands_480-580-640-740	-0.3730	-5.8512	-0.8115	7.9398	-0.9032
20 bands_480-580-700-800	2.6699	-11.1681	-6.0411	16.6767	-2.1375
20 bands_480-600-640-740	-1.8438	-0.9973	2.1336	3.2761	-2.5686

20 bands_480-600-640-800	-1.9042	-0.8743	1.8759	2.5294	-1.6268
20 bands_500-520-640-740	-4.1738	-1.3291	-0.4755	3.6421	2.3362
20 bands_500-540-580-700	0.2457	-3.3772	-3.3379	6.5335	-0.1266
20 bands_500-540-620-740	0.4556	-0.2476	1.2563	-1.7335	0.0821
20 bands_500-580-640-700	-1.1714	-1.3367	-3.1128	6.1926	-0.6342
20 bands_500-580-640-740	-1.7234	-2.6197	-2.6881	5.3520	1.6176
20 bands_520-580-640-740	-0.5507	-2.7383	-2.2846	3.5721	2.0023
20 bands_520-580-700-740	-0.2876	-2.8856	-6.3312	8.5118	0.9926
20 bands_540-580-620-740	-0.4432	-0.5739	-0.0278	0.1043	1.1688
20 bands_540-600-640-740	-1.4643	-0.6210	-2.4010	3.3702	1.1161

Πίνακας 6.15 Πίνακας με τα ποσοστά διαφορές των pixels για κάθε χρώμα(κλάση)μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 4 μπαντών για το πλακίδιο. 121588.2.32 (πλακίδιο1).

Ας δούμε όμως ποια κλάση σε κάθε πλακίδιο και για όλους τους συνδυασμούς (22 συνδυασμοί) 4 μπαντών μειώνει το ποσοστό ομοιότητας με τον SAM20 με βάση τα δεδομένα του πίνακα 6.15 και των αντίστοιχων που βρίσκονται στο παράρτημα.(πίνακας 6.16)

	RED	BLUE	PURPLE	ORANGE	WHITE
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	2	-	1	17	2
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	-	1	8	7	6
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	1	-	9	9	3
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	-	4	2	8	8
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	-	5	3	13	1
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο	-	2	3	8	9
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 7ο	5	1	11	5	-
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 8ο	-	1	7	3	11

ΠΛΑΚΙΔΙΟ 9ο	-	3	5	14	-
ΣΥΝΟΛΟ	8	17	49	84	40

Πίνακας 6.16 Παρουσιάζει τον αριθμό κάθε κλάσης που συνολικά για τους 22 συνδυασμούς 4 μπαντών παρουσιάζουν μέγιστο ποσοστό απόκλισης από τις αντίστοιχες του SAM20.

Άρα οι κλάσεις PURPLE, ORANGE(μωβ, πορτοκαλί) παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και κυρίως η κλάση ORANGE (πορτοκαλί) που αντιστοιχεί σε περίπτωση μη ειδικής χρώσης του κυττάρου.

Ο παρακάτω πίνακας δείχνει για τους 5 συνδυασμούς 4 μπαντών που βρήκαμε τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας ποια απο τις κλάσεις μας σε κάθε περίπτωση παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό διαφοράς σε σχέση με την αντίστοιχη της στον SAM20.(πίνακας 6.17).Σημειώνονται οι κλάσεις που εμφανίζουν την μεγαλύτερη απόκλιση σε σχέση με τις αντίστοιχες του SAM 20 μπαντών για τις περιπτώσεις που εμφανίζονται συνολικά τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ SAM 20 και SAM 4 μπαντών.

ΣΥΝΔ. ΜΠΑΝΤΩ N	ΠΛΑΚΙΔ Ο 1ο	ΠΛΑΚΙΔ Ο 2ο	ΠΛΑΚΙΔ Ο 3ο	ΠΛΑΚΙΔ Ο 4ο	ΠΛΑΚΙΔ Ο 5ο	ΠΛΑΚΙΔ Ο 6ο	ΠΛΑΚΙΔ Ο 7ο	ΠΛΑΚΙΔ Ο 8ο	ΠΛΑΚΙΔ Ο 9ο
4-7-10-17	PURPLE	ORANGE	RED	WHITE	BLUE	ORANGE	PURPLE	PURPLE	ORANGE
3-9-11-17	ORANGE	PURPLE	ORANGE	PURPLE	PURPLE	ORANGE	ORANGE	ORANGE	PURPLE
7-9-11-17	WHITE	WHITE	ORANGE	ORANGE	WHITE	ORANGE	PURPLE	ORANGE	ORANGE
4-6-9-17	ORANGE	ORANGE	ORANGE	BLUE	ORANGE	PURPLE	PURPLE	PURPLE	PURPLE
4-10-12-20	ORANGE	ORANGE	PURPLE	WHITE	BLUE	WHITE	RED	WHITE	PURPLE

Πίνακας 6.17 Ο πίνακας αυτός δείχνει για τις καλύτερες επιλογές 4 μπαντών την κλάση που εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης από την αντίστοιχη της του SAM 20 μπαντών.

Αυτή που εμφανίζεται πιο συχνά να έχει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης στις μπάντες με τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας είναι η ORANGE.

- ΒΗΜΑ 9^ο

Στο βήμα αυτό ουσιαστικά επαναλαμβάνουμε την διαδικασία που εφαρμόσαμε και προηγούμενα με την διαφορά όμως ότι τώρα μειώνουμε τον αριθμό των μπαντών από 4 σε 3 μπάντες. Επίσης πρόκειται για την ίδια ακριβώς διαδικασία που εφαρμόσαμε και στο ΒΗΜΑ 7 αλλά χρησιμοποιώντας το σύνολο φασμάτων αναφοράς που έχουμε επιλέξει, δηλαδή και τα 90 φάσματα και όχι μόνο τα φάσματα από το αντίστοιχο πλακίδιο που εξετάζουμε κάθε φορά..Εφαρμόζουμε τον Spectral Angle Mapper (SAM), για 3 μπάντες χρησιμοποιώντας τα συνολικά φάσματα αναφοράς. Συγκεκριμένα οι τριάδες μπαντών που επιλέγουμε για να εξετάσουμε τον βαθμό ομοιότητας του SAM αυτών με εκείνον των 20 μπαντών είναι οι 18 διαφορετικοί συνδυασμοί 3 μπαντών που παρουσιάσαμε στο ΒΗΜΑ 7 (πίνακας 6.7).

Η εφαρμογή του SAM με ακόμη λιγότερες μπάντες (3 μπάντες) έγινε σε συνολικά 10 (πλακίδια) δείγματα βιοψίας.Στα αντίστοιχα δείγματα ελέξαμε τα αποτελέσματα του SAM με 4 μπάντες (ΒΗΜΑ 8).Τώρα συγκρίνουμε των SAM 3 μπαντών με τον SAM 20 μπαντών προκειμένου να διαπιστώσουμε το κατά πόσο μεταβάλλεται ο βαθμός ομοιότητας τους και επομένως αν μπορούμε να περιοριστούμε στην χρήση 3 μπαντών για να αποκτήσουμε έγγυρη και ικανοποιητική πληροφόρηση με αυτήν των 20 μπαντών γλιτώνοντας έτσι κόπο και χρόνο.Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τα ποσοστά ομοιότητας του SAM 20 μπαντών με τον αντίστοιχο SAM 3 μπαντών για όλους τους συνδυασμούς τριών μπαντών χρησιμοποιώντας σε κάθε περίπτωση το σύνολο των φασμάτων αναφοράς. Τα ποσοστά αυτά αναδεικνύουν το βαθμό (%) που μοιάζουν μεταξύ τους οι χρωματικοί χάρτες που δημιουργήθηκαν κάνοντας χρήση 3 μπαντών,με αυτούς που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας όλες τις μπάντες, δηλαδή και τις 20. Σημειώνονται τα μεγαλύτερα ποσοστά, όπου προφανώς οι συνδυασμοί των 3 μπαντών από τους οποίους προκύπτουν είναι οι πιο χρήσιμοι. (πίνακας 6.18).

3 μπάντες (nm)	Πλακ. 1ο	Πλακ.2 ο	Πλακ. 3ο	Πλακ. 4ο	Πλακ. 5ο	Πλακ. 6ο	Πλακ. 7ο	Πλακ. 8ο	Πλακ.9 ο	Πλακ. 10ο
480-580-700	65.0711	71.8427	65.1035	64.7024	69.0999	69.8811	70.8816	73.2271	77.4461	68.4120
480-580-740	63.7872	72.9310	65.3264	66.8219	73.9778	67.3140	74.4365	73.2652	79.3176	64.8095
480-600-700	76.0723	75.4155	73.6783	62.9266	73.1316	66.1847	77.4914	75.0658	79.0189	77.9518
480-600-740	77.1366	77.1358	75.6911	66.3007	73.9632	65.7164	78.8970	75.5203	79.6840	76.0842
480-640-700	73.8876	75.6374	73.4344	61.7395	69.1884	62.4305	73.4025	72.4348	77.5944	77.1360
480-640-720	74.4918	73.6635	73.7331	63.5435	66.0315	60.2943	75.7464	69.9853	71.8079	72.6352
480-640-800	76.9221	78.3078	77.0777	64.4482	72.7954	63.5824	80.9728	73.7577	78.3724	78.4868
500-580-700	67.5161	69.8677	62.9565	61.2254	64.2062	66.3882	70.1991	70.0859	74.3078	67.3508
500-600-700	71.9597	63.3382	62.5829	54.4161	58.6452	58.2904	62.9238	62.6790	69.8273	69.3131
500-600-740	71.8920	64.9301	66.6228	56.8868	60.7076	60.5579	72.1603	64.3512	71.1004	73.2885
500-620-740	72.7069	67.5684	67.2994	57.3097	60.7549	59.1740	71.0327	63.0005	71.4286	74.2334
520-580-700	75.3866	75.1011	68.8126	68.2353	69.6757	68.4259	74.0607	73.3164	77.9736	70.3888
520-580-740	72.4352	76.9397	70.0121	70.4973	72.6361	72.0730	76.5876	75.4656	80.8574	68.0916
520-600-700	75.0362	74.9498	71.0670	70.2640	70.0970	67.2494	62.8167	72.0098	77.3744	78.8277
540-580-700	71.9597	75.2058	70.0426	68.2415	67.6161	69.4513	76.3926	75.0061	77.6895	68.0916

540-600-740	75.8701	75.1119	74.3685	71.3985	71.7576	69.5059	71.7181	71.8028	80.5504	77.3252
560-600-680	68.2355	69.3673	60.7879	66.3823	68.2832	62.4003	53.3029	64.3498	75.4163	73.7413
640-720-800	47.3599	52.2207	45.1319	45.1008	56.6848	40.8687	43.4462	45.6288	58.6600	53.1256

Πίνακας 61.8 Πίνακας με ποσοστά ακριβείας (%) του SAM για 3 μπάντες ,συγκριτικά με SAM για 20 μπάντες λαμβάνοντας υπόψη όλα τα φάσματα αναφοράς.

Ο παρακάτω πίνακας μας δίνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας που μπορούμε να πετύχουμε με τις επιλεγμένες τριάδες μπαντών που χρησιμοποιήσαμε καθώς και τις αντίστοιχες τριάδες μπαντών και είναι συγκεντρω-μένα στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 6.19)

	ΜΕΓΙΣΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ 4 ΜΠΑΝΤΩΝ
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	77.1366	4-10-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	78.3078	4-12-20
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	77.0777	4-12-20
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	71.3985	7-10-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	73.9778	4-9-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο	72.0730	6-9-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 7ο	80.9728	4-12-20
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 8ο	75.5203	4-10-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 9ο	80.8574	6-9-17
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 10 ^ο	78.4868	4-12-20

Πίνακας 6.19 Δείχνει τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας του SAM20,SAM4 μπαντών και την τριάδα μπαντών που εντοπίζονται αυτά.

Άρα οι τριάδες μπαντών όπου εμφανίζονται τα μεγαλύτερα ποσοστά ομοιότητας είναι:

1) 480-600-740 == 4-10-17

2) 480-640-800 == 4-12-20

3) 540-600-740 == 7-10-17

4) 480-580-740 == 4-9-17

5) 520-580-740 == 6-9-17

Συγκρίνοντας τις με εκείνους τους συνδυασμούς των τεσσάρων μπαντών (BHMA 8^ο) παρατηρούμε ότι κάποιες μπάντες επαναλαμβάνονται και μάλιστα ο συνδυασμός τεσσάρων μπαντών προκύπτει από τους συνδυασμούς των τριών με την πρόσθεση σε κάθε περίπτωση μιας επιπλέον μπάντας.

Από τον παραπάνω πίνακα και για τους παραπάνω συνδυασμούς μπαντών παρατηρούμε τα εξής :

- Για την 1^η τριάδα (4-10-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 14%.
- Για την 2^η τριάδα (4-12-20) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 17%.
- Για την 3^η τριάδα (7-10-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 11%.
- Για την 4^η τριάδα (4-9-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 16%.
- Για την 5^η τριάδα (6-9-17) τα ποσοστά ομοιότητας με τον SAM20 για όλα τα πλακίδια που εξετάσαμε παρουσιάζουν μέγιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό περίπου 12%.

Άρα οι συνδυασμοί 3), 5), είναι οι καλύτεροι δυνατοί αφού συγκριτικά με τους υπολοίπους παρουσιάζουν την ελάχιστη απόκλιση από το μέγιστο ποσοστό που παρουσιάζεται σε κάποια περίπτωση από αυτές που εξετάζουμε.

Παρακάτω παραθέτουμε για το πρώτο πλακίδιο τον πίνακα που δείχνει τα ποσοστά απόκλισης (διαφοράς) του αριθμού των pixels κάθε κλάσης με τα αντίστοιχα του SAM 20 (πίνακας 6.20) προς τα συνολικά pixels της εικόνας .Οι αντίστοιχοι πίνακες για τα υπόλοιπα πλακίδια παρουσιάζονται στο παράρτημα.

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	3.0285	-10.5094	-5.6352	16.7138	-3.6603

20 bands_480-580-740	2.0813	-13.3956	-3.8436	17.8322	-2.0721
20 bands_480-600-700	0.4258	-0.0862	8.4305	-3.1587	-5.6118
20 bands_480-600-740	-1.7111	-0.6047	7.4425	-1.7156	-2.9962
20 bands_480-640-700	0.8982	-0.9179	0.8031	4.4474	-5.2310
20 bands_480-640-720	0.4695	-19.0414	7.7332	-1.7168	-5.3250
20 bands_480-640-800	-0.7991	-2.2904	0.3927	4.5727	-1.8749
20 bands_500-580-700	-0.1744	-19.6853	-7.5806	11.7934	-1.2990
20 bands_500-600-700	-2.3254	-0.1474	1.4292	0.1429	0.6504
20 bands_500-600-740	-5.8712	-0.0976	5.5910	-1.1522	1.4472
20 bands_500-620-740	-2.4081	-0.3520	0.4511	0.6292	1.5971
20 bands_520-580-700	-1.0887	-2.2347	-3.6626	6.5555	0.3677
20 bands_520-580-740	-2.3570	-3.3487	-3.5143	8.0518	1.1884
20 bands_520-600-700	-2.3443	-0.1176	0.1869	1.6933	0.5809
20 bands_540-580-700	0.6089	-4.5785	-2.2639	7.0722	-0.9011
20 bands_540-600-740	-2.7726	-0.1942	4.2748	-2.0828	0.9403
20 bands_560-600-680	-2.5787	-0.3027	-3.2961	9.6005	-3.4230
20 bands_640-720-800	-21.3097	-1.5078	3.6644	21.1997	-1.8599

Πίνακας 6.20 Πίνακας με τα ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.32 (πλακίδιο1).

Στον πίνακα που ακολουθεί βλέπουμε ποια κλάση σε κάθε πλακίδιο και για όλους τους συνδυασμούς μπαντών μειώνει το ποσοστό ομοιότητας με τον SAM20 με βάση τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα και των αντίστοιχων που βρίσκονται στο παράρτημα.(πίνακας 6.21).Βλέπουμε δηλαδή τον αριθμό της κάθε κλάσης που σε κάθε περίπτωση και για το σύνολο των συνδυασμών 3 μπαντών παρουσιάζει το μεγαλύτερο βαθμό απόκλισης συγκριτικά με τον αντίστοιχο της για 20 μπάντες.Σημειώνονται στον πίνακα αυτόν επίσης και η κλάση που για κάθε πλακίδιο παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε όλες τις τριάδες μπαντών.

	RED	BLUE	PURPLE	ORANGE	WHITE
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	5	1	4	7	1
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	1	-	9	5	3
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	1	-	8	7	2
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	-	2	3	5	8
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	-	5	2	8	3
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο	-	1	3	4	10
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 7ο	2	3	8	4	1
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 8ο	2	4	5	2	5
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 9ο	-	4	1	8	5
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 10ο	-	6	6	5	1
ΣΥΝΟΛΟ	11	26	48	55	39

Πίνακας 6.21 Παρουσιάζει τον αριθμό κλάσεων που συνολικά για τους 18 συνδυασμούς 3 μπαντών παρουσιάζουν μέγιστο ποσοστό απόκλισης από τις αντίστοιχες κλάσεις του SAM20.

Άρα και στην περίπτωση των 3 μπαντών οι κλάσεις PURPLE, ORANGE(μωβ, πορτοκαλί) παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και οδηγούν σε μείωση του ποσοστού ομοιότητας.

Ο ακόλουθος πίνακας παρουσιάζει ποια κλάση εμφανίζει μεγαλύτερη ποσοστιαία διαφορά με την αντίστοιχη του SAM που χρησιμοποιεί όλες τις μπάντες (20 μπάντες) για τις τριάδες μπαντών που εντοπίσαμε να έχουν το μεγαλύτερο βαθμό ομοιότητας με τις 20 μπάντες. (πίνακας 6.22).

ΣΥΝΔ. ΜΠΑΝΤΩΝ	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 7ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 8ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 9ο	ΠΛΑΚΙΔΙΟ 10ο
4-10-17	PURPLE	RED	PURPLE	PURPLE	BLUE	ORANGE	PURPLE	WHITE	BLUE	BLUE
4-12-20	ORANGE	PURPLE	PURPLE	WHITE	BLUE	WHITE	RED	WHITE	WHITE	PURPLE
7-10-17	PURPLE	ORANG	RED	WHITE	ORANG	WHITE	PURPLE	RED	ORANGE	PURPLE
4--9-17	ORANGE	ORANGE	ORANGE	ORANG	BLUE	PURPLE	PURPLE	BLUE	WHITE	BLUE
6-9-17	ORANGE	PURPLE	ORANG	WHITE	ORANG	WHITE	ORANG	RED	PURPLE	ORANGE

Πίνακας 6.22 Ο πίνακας αυτός δείχνει για τις καλύτερες επιλογές 3 μπαντών την κλάση που εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης από την αντίστοιχη της του SAM 20 μπαντών.

Όπως παρατηρούμε στον πίνακα 6.22, η κλάση που εμφανίζεται πιο συχνά να έχει μεγαλύτερο ποσοστό απόκλισης στις τριάδες μπαντών με τα μέγιστα ποσοστά ομοιότητας με τις 20 μπάντες είναι η PURPLE (μωβ) και η ORANGE. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως εξής, αυτές οι κλάσεις παρουσιάζουν μεγάλη variability (interclass variability) ή λόγω της υποκειμενικότητας με την οποία έγινε η επιλογή των φασμάτων αναφοράς για αυτές τις κλάσεις.

Ανακεφαλαιώνοντας, κατά την μείωση των μπαντών από 4 σε 3 μπάντες το ποσοστό ομοιότητας με τις 20 μπάντες δεν μεταβάλλεται σημαντικά. Η μέγιστη πτώση του ποσοστού ομοιότητας με τις 20 μπάντες από τις 4 μπάντες στις 3 είναι μόλις 3%, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός 3 μπαντών μας δίνει ικανοποιητική και επαρκή πληροφόρηση. Επίσης, διαπιστώσαμε ότι κάνοντας μία καλή προσέγγιση στο ορατό φάσμα ή πολύ κοντά στο ορατό, είναι εφικτό να εντοπίσουμε 3 μπάντες σε αυτό που θα δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα συγκριτικά με μπάντες ολόκληρου του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

- BHMA 10°

Σε προηγούμενο βήμα (BHMA 5°) παραθέσαμε τους χρωματικούς χάρτες του SAM για διάφορες συνθήκες φωτισμού και παρατηρήσαμε ότι δεν μεταβάλλονται σημαντικά. Εδώ δίνουμε τον αντίστοιχο πίνακα με τα ποσοστά ομοιότητας του SAM μεταξύ 20 και 3 μπαντών για αυτές τις 5 συνθήκες φωτισμού. (πίνακας 6.23). Τα ποσοστά που εμφανίζονται στον πίνακα αυτόν αφορούν την περίπτωση του πλακιδίου του οποίου οι αντίστοιχοι χρωματικοί χάρτες φαίνονται στην εικόνα 6.9 και ο SAM με 3 μπάντες υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το σύνολο των φασμάτων αναφοράς από όλα τα πλακίδια.

3 μπάντες (nm)	Πλακίδιο (Φως 1)	Πλακίδιο (Φως 2)	Πλακίδιο (Φως 3)	Πλακίδιο (Φως 4)	Πλακίδιο (Φως 5)
480-580-700	68.4120	57.5584	46.9614	40.2604	26.7457
480-580-740	64.8095	60.6238	45.7806	37.4597	27.5978
480-600-700	77.9518	73.4284	46.2808	63.6919	62.2497
480-600-740	76.0842	74.3651	63.2806	60.9083	63.5187
480-640-700	77.1360	70.3157	63.2806	64.9774	68.8735
480-640-720	72.6352	70.8056	63.5455	64.5927	65.8420
480-640-800	78.4868	72.4260	64.9283	65.5032	74.8877
500-580-700	67.3508	59.0346	49.0492	46.5372	38.5572
500-600-700	69.3131	63.3160	59.0791	60.5726	58.5511
500-600-740	73.2885	70.3385	63.2376	61.8227	56.3180
500-620-740	74.2334	71.7014	67.0202	66.9481	72.6754
520-580-700	70.3888	57.3371	51.0472	49.1984	46.8170
520-580-740	68.0916	59.4527	48.7436	45.1124	45.0210
520-600-700	79.8277	70.7134	69.4421	67.2827	66.9528
540-580-700	68.0916	57.4152	46.2808	43.2761	40.6392
540-600-740	77.3252	77.9305	65.9519	57.2093	53.8395
560-600-680	73.7413	68.2430	60.6357	49.2879	45.4899
640-720-800	53.1256	53.9933	53.9219	55.0133	48.6495

Πίνακας 6.23 Πλακίδιο 123493.18 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.

Όπως παρατηρούμε το ποσοστό ομοιότητας δεν μεταβάλλεται σημαντικά και η όποια διαφοροποίηση του για τις μέγιστες τιμές που παίρνει είναι της τάξης του 10%. Έτσι έχουμε:

	ΜΕΓΙΣΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΠΑΝΤΩΝ
ΦΩΣ 1ο	79.8277	6-10-15
ΦΩΣ 2ο	77.9305	7-10-17
ΦΩΣ 3ο	69.4421	6-10-15

ΦΩΣ 4ο	67.2827	6-10-15
ΦΩΣ 5ο	74.8877	4-12-20

Πίνακας 6.24 Οι μεταβολές του μέγιστου ποσοστού ομοιότητας για τις διάφορες συνθήκες φωτισμού και οι τριάδες μπαντών που εντοπίζονται.

Με βάση τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα βλέπουμε ότι τα ποσοστά ομοιότητας SAM20,SAM3 μπαντών διαφέρουν ελάχιστα κατά τις μεταβολές του φωτισμού και κυμαίνονται μεταξύ 68% και 78%.

Ακολουθεί μια άλλη περίπτωση δείγματος βιοψίας όπου και πάλι παραθέτουμε τους αντίστοιχους πίνακες (6.25,6.26).Οι υπόλοιποι παρουσιάζονται στο παράρτημα που ακολουθεί.

3 μπάντες (nm)	Πλακίδιο (Φως 1)	Πλακίδιο (Φως 2)	Πλακίδιο (Φως 3)	Πλακίδιο (Φως 4)	Πλακίδιο (Φως 5)
480-580-700	72.3329	69.0741	67.8377	65.7673	56.4744
480-580-740	76.0130	73.1766	71.3716	71.1508	64.8309
480-600-700	77.8867	75.1818	71.8824	76.2816	72.3704
480-600-740	79.9901	78.6098	72.7383	78.6965	79.3017
480-640-700	79.8947	76.0024	74.5671	75.0149	71.4570
480-640-720	79.8196	77.3947	75.1247	73.8687	67.4587
480-640-800	82.7582	78.5335	75.5240	75.2967	75.9733
500-580-700	69.6727	68.0007	68.3697	66.3306	59.1323
500-600-700	65.5971	64.3852	63.8008	61.5167	62.3557
500-600-740	71.9390	71.6065	67.1538	66.1188	68.0882
500-620-740	70.2420	69.2023	68.4294	65.6740	69.0324
520-580-700	75.0217	71.6612	72.6706	66.5511	57.0974
520-580-740	76.7778	74.3585	74.1279	69.0895	63.2076
520-600-700	65.2709	62.2590	63.2686	57.7397	52.7146
540-580-700	72.1436	66.5041	69.3646	60.2944	50.0553
540-600-740	69.8315	65.0463	65.1961	54.9622	50.7342
560-600-680	57.5737	53.4142	57.3469	47.5168	41.7358
640-720-800	48.5616	50.6571	47.7740	56.6455	62.9761

Πίνακας 6.25 Πλακίδιο 124358.22 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς

	ΜΕΓΙΣΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ	ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΜΠΑΝΤΩΝ
ΦΩΣ 1ο	82.7582	4-12-20
ΦΩΣ 2ο	78.6098	4-10-17
ΦΩΣ 3ο	74.5671	4-12-15
ΦΩΣ 4ο	78.6965	4-10-17
ΦΩΣ 5ο	79.3017	4-10-17

Πίνακας 6.26 Οι μεταβολές του μέγιστου ποσοστού ομοιότητας για τις διάφορες συνθήκες φωτισμού και οι τριάδες μπαντών που εντοπίζονται.

Με βάση τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα βλέπουμε ότι τα ποσοστά ομοιότητας SAM20,SAM3 μπαντών διαφέρουν ελάχιστα κατά τις μεταβολές του φωτισμού και κυμαίνονται μεταξύ 74% και 82%..

Για την πρώτη περίπτωση που παρουσιάσαμε στο βήμα αυτό παραθέτουμε και τον ακόλουθο πίνακα που δείχνει για το ίδιο πλακίδιο και τις ίδιες συνθήκες φωτισμού όπως πριν τα ποσοστά ομοιότητας αυτήν την φορά μεταξύ του SAM 20 και SAM 4 μπαντών.(πίνακας 6.27)

4 μπάντες (nm)	ΦΩΣ 1ο	ΦΩΣ 2ο	ΦΩΣ 3ο	ΦΩΣ 4ο	ΦΩΣ 5ο
460-540-600-760	79.0811	75.0429	64.9112	59.7421	63.3642
460-580-620-740	78.6926	75.3350	71.6117	72.6006	79.6340
480-500-640-740	77.9017	73.9929	65.9961	68.6330	73.2724
480-520-580-740	71.0409	64.8457	50.3045	44.4428	40.9319
480-520-600-700	79.4063	73.6400	68.4827	67.5381	66.3729
480-540-600-740	76.9109	76.0094	67.9244	60.2617	64.8530
480-540-620-700	79.8092	77.4503	69.8372	61.0534	63.9982
480-560-600-680	74.6718	71.5448	66.3688	56.8792	53.6318
480-560-640-700	79.0007	72.1759	63.5328	61.4039	59.4950
480-580-640-740	77.1319	73.1248	66.7273	69.0176	74.1136

480-580-700-800	69.8873	55.8692	51.7227	40.6339	43.6008
480-600-640-740	76.0523	73.6548	68.8177	68.3751	71.3258
480-600-640-800	79.4641	74.7185	68.9989	69.1970	71.8703
500-520-640-740	77.7471	73.4281	66.5841	69.1340	75.7553
500-540-580-700	70.6444	63.7380	52.0383	46.9057	41.3079
500-540-620-740	77.2356	77.3203	71.6772	66.7747	73.3146
500-580-640-700	72.5178	65.8219	61.4883	67.4001	69.1859
500-580-640-740	71.4055	65.9471	63.1956	72.3058	78.3599
520-580-640-740	78.1495	72.9547	65.8828	67.2324	74.6357
520-580-700-740	67.3783	56.4246	48.3978	48.3004	50.0853
540-580-620-740	79.5081	79.8202	70.5285	61.3626	62.0102
540-600-640-740	77.9432	76.5391	68.0493	60.2870	60.8734

Πίνακας 6.27 Πλακίδιο 123493.18 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.

Οι διαφορές των μεγίστων ποσοστών ομοιότητας μεταξύ του SAM 20 και SAM 3 μπαντών για τις διάφορες συνθήκες φωτισμού όπως φαίνεται είναι ασήμαντες και κυμαίνονται μεταξύ 71% και 79%.

- ΒΗΜΑ 11^ο

Στο βήμα αυτό προσπαθήσαμε να υλοποιήσουμε έναν δικό μας αλγόριθμο σε γλώσσα MATLAB για τον διαχωρισμό των χρωστικών κόκκινο και μπλε που αντιστοιχούν στην ύπαρξη ή όχι ER αντίστοιχα.

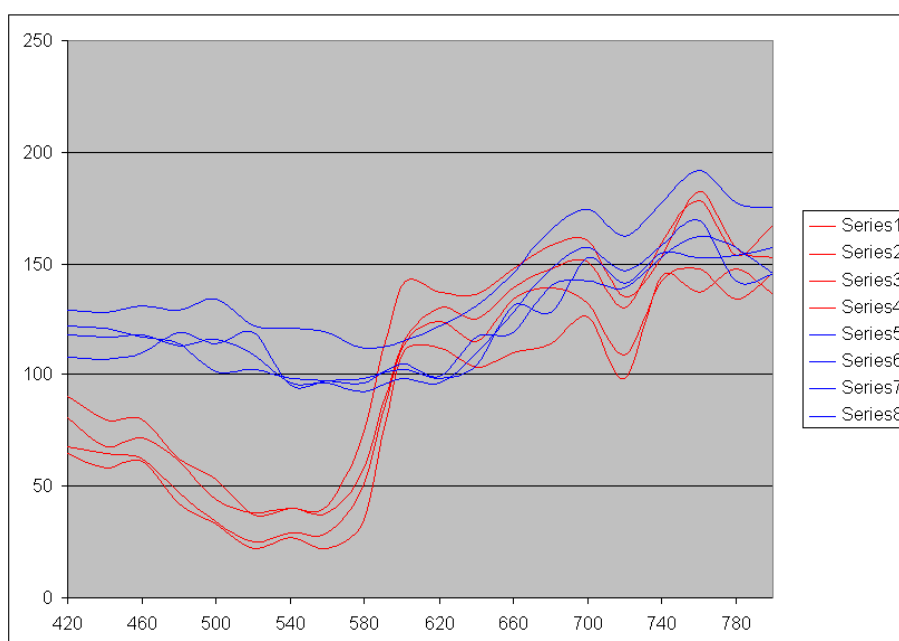
Παρατηρώντας τα διαγράμματα που αντιστοιχούν στην κόκκινη και μπλε χρωστική, βλέπουμε ότι γύρω στα 580-600 nm οι γραφικές τους τέμνονται .Σε αυτό το μήκος κύματος δηλαδή εντοπίζεται το ισοσβεστικό.Μάλιστα παρατηρείται ότι αριστερά αυτού η γραφική της μπλέ χρώσης έχει μεγαλύτερες τιμές έντασης από εκείνη της κόκκινης ενώ δεξιά του σημείου έχει μικρότερες.Δηλαδή σε μικρότερα μήκη κύματος από αυτό που αντιστοιχεί στο ισοσβεστικό σημείο η μπλε χρώση εμφανίζει μεγαλύτερες τιμές έντασης από ότι δεξιά του σημείου.Αντίθετα, η κόκκινη χρώση εμφανίζει για μικρότερα μήκη κύματος μικρότερες τιμές από εκείνες στα μεγαλύτερα από το ...σημείο μήκη κύματος (δεξιά του ισοσβεστικού σημείου).Μάλιστα, οι τιμές εντάσεων για την μπλέ χρώση και αριστερά του ισοσβεστικού σημείου είναι μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές στα αριστερά του σημείου αυτού.Αντίστοιχα για την κόκκινη χρώση, αριστερά του ισοσβεστικού σημείου οι τιμές εντάσεων είναι μικρότερες του ισοσβεστικού ενώ δεξιά του είναι μεγαλύτερες από την ένταση που αντιστοιχεί στο ισοσβεστικό σημείο.

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις προσπαθήσαμε να δημιουργήσουμε έναν αλγόριθμο διαχωρισμού των δυο αυτών χρωστικών , κόκκινη και μπλε χρώση.Τα κριτήρια που χρησιμοποιήσαμε για να το επιτύχουμε αυτό:

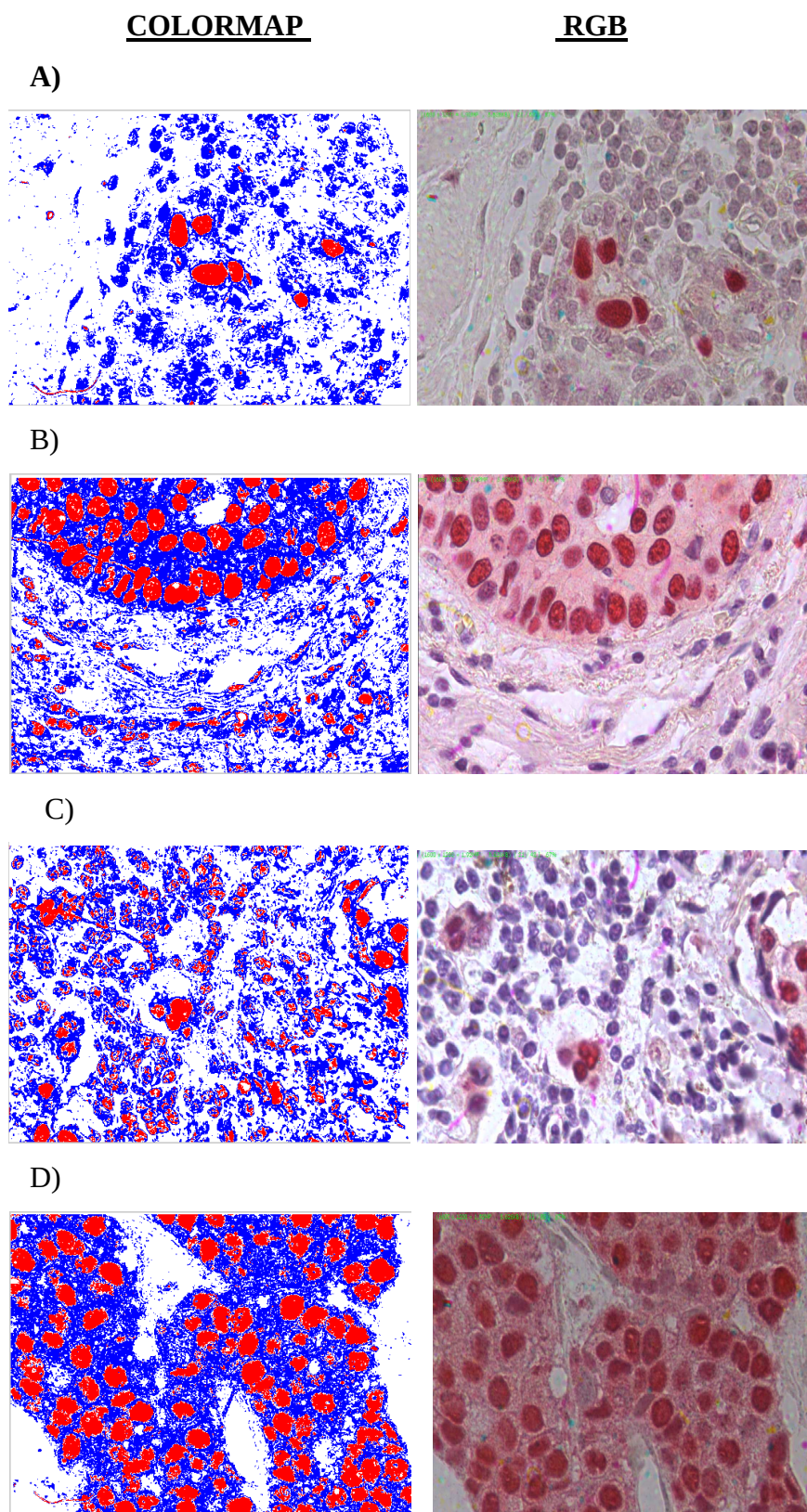
- ήταν η μέση τιμή των εντάσεων που αντιστοιχούσαν σε ένα μήκος αριστερά και σε ένα δεξιά του ισοσβεστικού σημείου.
- η κλίση που αντιστοιχούσε σε δυο μήκη κύματος εκατέρωθεν του ...σημείου
- και ο προσδιορισμός των κατάλληλων thresholds.

Έτσι έγινε προσπάθεια χαρτογράφησης του καρκίνου, δηλαδή δημιουργίας ενός ψευδοχρωματικού χάρτη (colourmap) των χρωστικών μέσω του λογισμικού Matlab. Στην ψευδοχρωματική αυτή εικόνα, στην οποία ο χρωματισμός βασίστηκε στις κλίσεις των φασμάτων όλων των pixel, παρουσιάζεται η παρουσία μιας χρωστικής σύμφωνα με το χρώμα που περιέχει. Συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος που υλοποιήσαμε σε Matlab υπολογίζει τις κλίσεις του φάσματος για κάθε pixel των δεδομένων μας, ενώ ο χρωματισμός κάθε pixel γίνεται με βάση κάποιες τιμές κατωφλίων που ορίστηκαν. Όπως είναι εμφανές, στα 580- 600 nm βρίσκεται ένα σταθερό σημείο, όπου τέμνονται τα φάσματά μας, το οποίο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για την εύρεση του διαγνωστικού κριτηρίου. Ακόμη, δεξιά και αριστερά του σημείου αυτού υπάρχουν κάποια μήκη κύματος όπου παρατηρείται η μέγιστη φασματική διαφορά μεταξύ των δυο χρωστικών και επομένως περιέχουν σαφώς χρήσιμη πληροφορία για τον υπολογισμό μας. Όταν πρόκειται για την μπλε χρώση η κλίση του φάσματος τείνει να γίνει μηδενική ενώ για κόκκινη χρώση η κλίση μεγαλώνει.

Μάλιστα εφαρμόσαμε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς μηκών κύματος δεξιά και αριστερά του σημείου τομής του για να βρούμε εκείνον που θα εμφάνιζε μεγαλύτερο βαθμό διαχωρισμού των χρωστικών. Επίσης διαιρέσαμε τις εντάσεις που αντιστοιχούσαν σε κάθε μήκος με εκείνη στα 800 nm προκειμένου να τις κανονικοποιήσουμε. Από την εφαρμογή του αλγορίθμου αυτού παρατηρήσαμε ότι δεν βρίσκει εφαρμογή σε όλες τις περιπτώσεις αφού δεν ισχύουν τα ίδια thresholds με αποτέλεσμα να μην αποτελεί τρόπο διαχωρισμού των δυο χρωστικών. Ακολουθεί μια ενδεικτική γραφική παράσταση που δείχνει ότι οι γραφικές που αντιστοιχούν σε κόκκινη και μπλε χρωστική μετά το ισοσβεστικό σημείο δεν διαχωρίζονται και αλληλοκαλύπτονται (εικόνα 6.12) και τα αποτελέσματα εφαρμογής του αλγορίθμου (εικόνα 6.13):



Εικόνα 6.12 Γραφικές παραστάσεις που αντιστοιχούν σε φάσματα από την κόκκινη και μπλε κλάση.

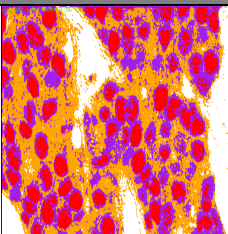
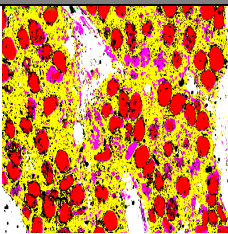
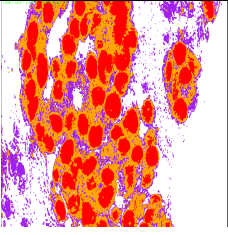
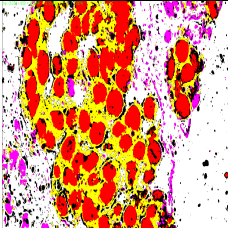


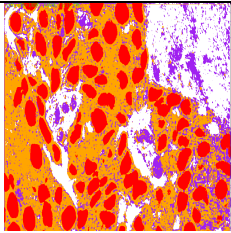
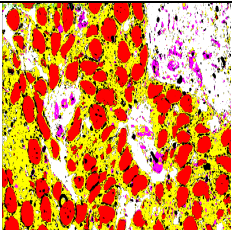
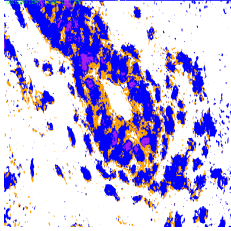
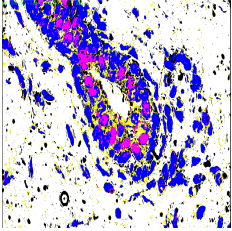
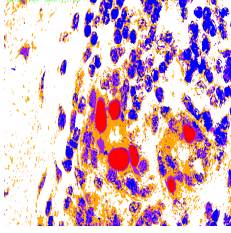
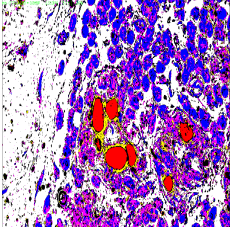
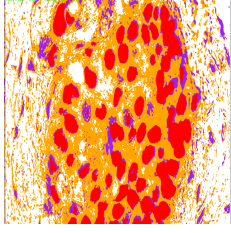
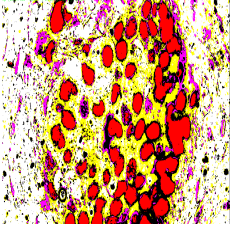
Εικόνα 6.13 Στις παραπάνω εικόνες φαίνεται το αποτέλεσμα εφαρμογής του αλγορίθμου που εφαρμόσαμε. Τα thresholds προσδιορίστηκαν με βάση την πρώτη εικόνα (Α) και όπως βλέπουμε δεν λειτουργούν για τις άλλες περιπτώσεις αφού δεν διαχωρίζονται οι χρωστικές ικανοποιητικά. Για παράδειγμα στις υπόλοιπες εικόνες (Β, C, D, E)

παρατηρούμε ότι εμφανίζεται μπλε ή κόκκινη χρώση σε σημεία (pixels) ενώ δεν θα έπρεπε σύμφωνα με την RGB εικόνα.

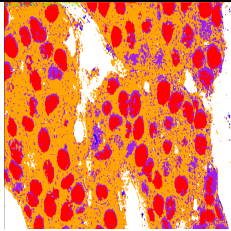
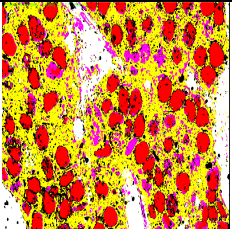
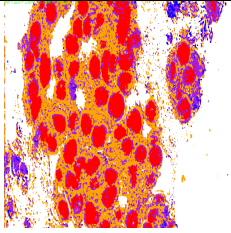
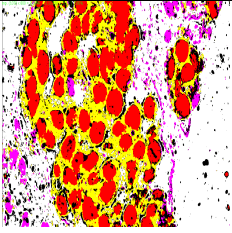
- BHMA 12°

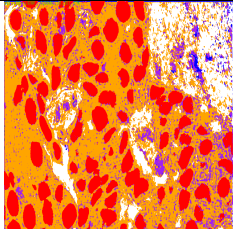
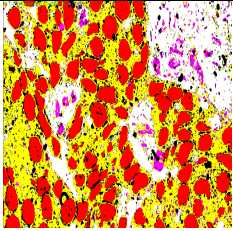
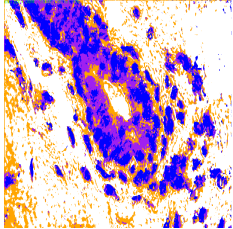
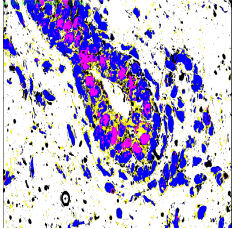
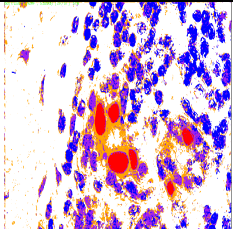
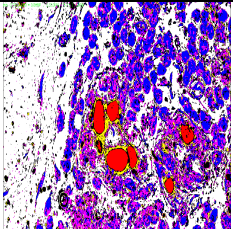
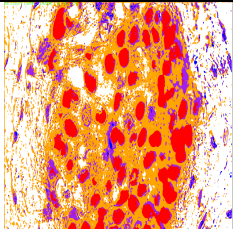
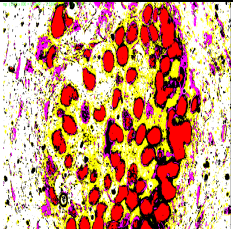
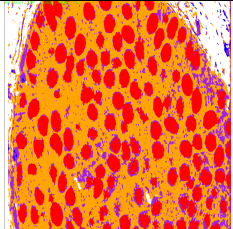
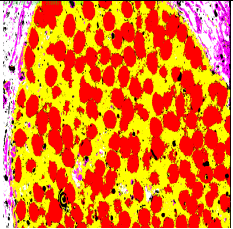
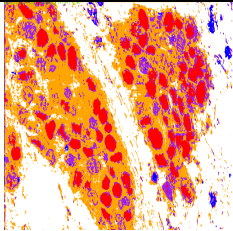
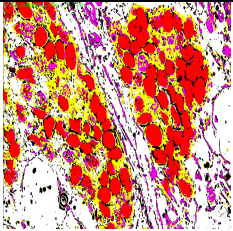
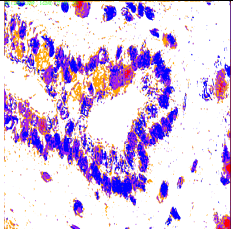
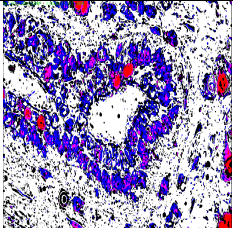
Στο τελευταίο αυτό βήμα της εργασίας μας χρησιμοποιήσαμε μια εφαρμογή που μας παρέχει το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και αφορά την επεξεργασία της εικόνας και συγκεκριμένα την χρωματική ταξινόμηση (color segmentation). Η επιλογή ‘Color Analysis’ του MuSIS υπολογίζει τις παραμέτρους ‘Hue’(απόχρωση), ‘Saturation’(κορεσμός), και ‘Intensity’ (ένταση). Ο υπολογισμός αυτών των παραμέτρων γίνεται για κάθε pixel της εικόνας και οι τιμές που δίνονται σε αυτούς ρυθμίζονται από τον χρήστη. Οι παράμετροι αυτοί εμφανίζονται με την μορφή ιστογραμμάτων των οποίων ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει τον αριθμό των pixels ενώ ο οριζόντιος τις τιμές που αντιστοιχούν σε κάθε μια από αυτές τις παραμέτρους αντίστοιχα. Η παράμετρος που αντιστοιχεί στην απόχρωση (Hue) παίρνει τιμές μεταξύ 0 και 360, ενώ οι άλλες δυο μεταξύ 0% και 100%. Ο χρήστης κάθε φορά επιλέγει έναν αριθμό pixels και τα ιστογράμματα που αντιστοιχούν σε αυτές τις τρεις παραμέτρους υπολογίζονται για τον αριθμό αυτόν. Ταυτόχρονα η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή που μπορεί να πάρει κάθε παράμετρος απεικονίζεται γραφικά με τρεις κάθετες κίτρινες γραμμές που αντιστοιχούν στην ελάχιστη, μέση και μέγιστη τιμή της κάθε παραμέτρου. Στην συνέχεια υλοποιήσαμε έναν αλγόριθμο που είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας μοναδικής εικόνας βασισμένη στις επιμέρους εικόνες που προέκυψαν για κάθε κλάση μέσω του ‘Color Analysis’. Ο κώδικας αυτός εξετάζει την συνύπαρξη του κόκκινου και μπλέ χρώματος και αυτό το pixel το ταξινομεί στην μωβ (PURPLE) κλάση. Οι υπόλοιπες συνυπάρχουσες χρωμάτων δεν εξετάζονται και όταν ένα pixel εμφανίζει περισσότερο από ένα χρώμα χρωματίζεται μαύρο. Οι πίνακες που ακολουθούν συγκρίνουν τα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ της εικόνας που αντιστοιχεί στον χρωματικό χάρτη του SAM 20 μπαντών και της εικόνας που είναι αποτέλεσμα του κώδικα που υλοποιήσαμε και βασίζεται στις εικόνες που προκύπτουν για κάθε κλάση μέσω της λειτουργίας του MuSIS για χρωματική ταξινόμηση. (πίνακας 6.28.6.29)

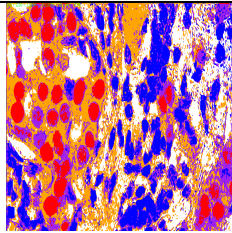
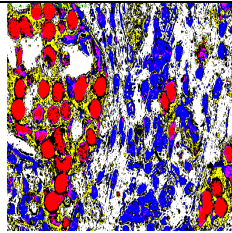
	SAM 20 BANDS	COLOR_SEGM	ΠΟΣΟΣΤΟ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο			51.9127
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο			62.4213

ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο			55.0952
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο			69.5592
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο			46.2071
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο			48.5794

Πίνακας 6.28 Δείχνει τους χρωματικούς χάρτες που αντιστοιχούν στον SAM20 με φάσματα αναφοράς από το κάθε πλακίδιο μόνο σε κάθε περίπτωση και στο αποτέλεσμα του color segmentation καθώς και το ποσοστό ομοιότητας τους.

	SAM 20 BANDS	COLOR_SEGM	ΠΟΣΟΣΤΟ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 1ο			57.3269
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 2ο			57.7189

ΠΛΑΚΙΔΙΟ 3ο			53.3787
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 4ο			57.3620
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 5ο			48.8960
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 6ο			48.2810
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 7ο			62.3234
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 8ο			50.1604
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 9ο			56.1938

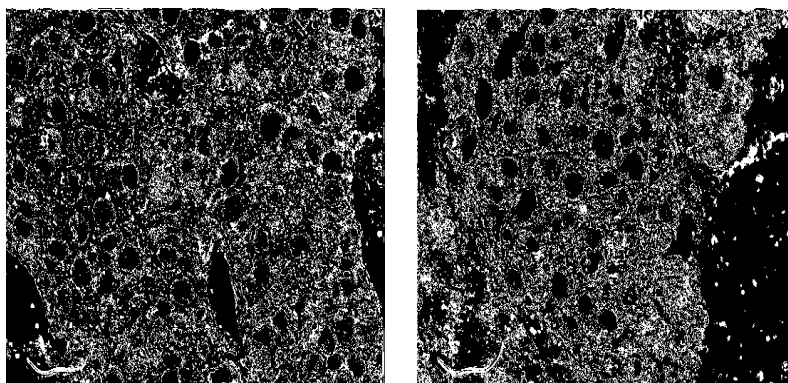
ΠΛΑΚΙΔΙΟ 10			32.6933
-------------	---	--	---------

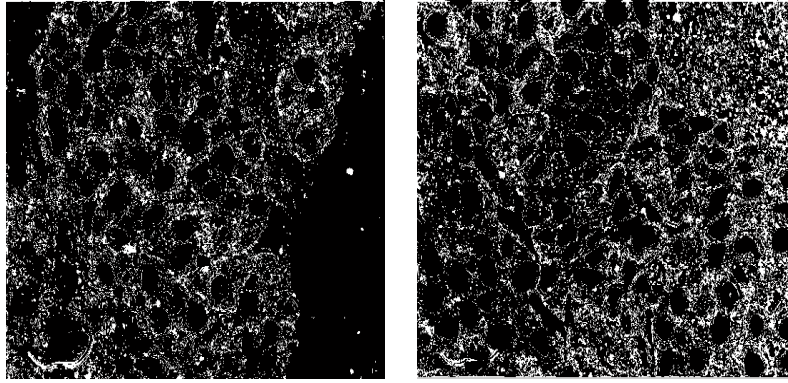
Πίνακας 6.29 Δείχνει τους χρωματικούς χάρτες που αντιστοιχούν στον SAM20 με φάσματα αναφοράς από όλα τα πλακίδια και το αποτέλεσμα του color segmentation καθώς και το ποσοστό ομοιότητας τους.

Παρατηρώντας τόσο τους χρωματικούς χάρτες όσο και τα αριθμητικά αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι το color segmentation δηλαδή η χρωματική ταξινόμηση δεν μας δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα και επομένως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας τρόπος για την αξιολόγηση των δειγμάτων βιοψίας μας.

- ΒΗΜΑ 12ο

Τα ποσοστά ακρίβειας του αλγορίθμου που παρουσιάσαμε στους παραπάνω πίνακες, υπολογίστηκαν συγκρίνοντας τα pixel μιας εικόνας που είχε δημιουργηθεί χρησιμοποιώντας και τις 20 μπάντες, με τα pixel εικόνων που είχαν δημιουργηθεί από διάφορους συνδυασμούς 3 και 4 μπαντών. Σε περίπτωση που τα pixel ήταν ίδια, δίνουμε μαύρο χρώμα στο pixel που βρισκόταν στην αντίστοιχη θέση μιας καινούργιας εικόνας που δημιουργήσαμε. Αντίθετα, δίνουμε άσπρο χρώμα στο pixel. Έτσι, μετρώντας τελικά τον αριθμό των μαύρων pixel, τα οποία ήταν τα pixel που είχαν ίδια τιμή για τις εικόνες που συγκρίναμε, υπολογίζαμε το ποσοστό (%) του βαθμού ομοιότητας των δύο εικόνων. Παρακάτω δίνονται παράδειγματα κάποιων εικόνων που προέκυψαν από αυτή την διαδικασία για κάποιο πλακίδιο.(εικόνα 6.14)





Εικόνα 6.14 Ασπρόμαυροι χάρτες που προκύπτουν κατά την σύγκριση ομοιότητας δυο εικόνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : Συμπεράσματα και προοπτική εξέλιξης της εργασίας

Ανακεφαλαιώνοντας, συμπεραίνουμε ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε, δηλαδή ο συνδυασμός της υπερφασματικής απεικόνισης και μικροσκοπίας , μαζί με την εφαρμογή διαφόρων αλγορίθμων ταξινόμησης μας προσέφερε μια νέα τεχνική ανίχνευσης και χαρτογράφησης των χρωστικών οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκίνο του μαστού.

Μέχρι σήμερα, κάθε μέθοδος και τεχνική που είχε εφαρμοστεί στον τομέα αυτό είχε τουλάχιστον και ένα ευδιάκριτο μειονέκτημα, που ωστόσο είναι αρκετό για να μην μπορεί καμία από αυτές να καλύψει όλα τα ενδεχόμενα διάγνωσης στον βαθμό ακρίβειας που απαιτείται. Έτσι, παρ'όλο που οι διαθέσιμες τεχνολογίες προσφέρουν κάποιου είδους ποσοτικοποίηση των οιστρογονικών υποδοχέων στα δείγματα βιοψίας του καρκίνου , δεν υπάρχουν αρκετές αποδείξεις για αντικειμενικά αποτελέσματα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να συσταθούν σαν διαγνωστικές μέθοδοι. Η υπερφασματική απεικόνιση είναι η πλέον ελπιδοφόρα επιλογή που συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων διαγνωστικών μεθόδων και συστημάτων στην παθολογία, ενώ ταυτόχρονα ανοίγει νέες κατευθύνσεις που πρέπει να διερευνηθούν.

Στην παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε ένα αυτοματοποιημένο σύστημα ποσοτικοποίησης της κατάστασης ER προκειμένου να επιτύχουμε όσο πιο αντικειμενική και ακριβή πληροφόρηση ήταν δυνατόν. Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των χρωστικών και κατ'επέκταση των ER στα κύτταρα δείγματος είναι βαρυσήμαντη δεδομένου ότι βάση αυτής επιτυγχάνεται έγκυρη διάγνωση της νόσου και προσδιορίζεται η κατάλληλη θεραπευτική αγωγή που θα πρέπει να ακολουθηθεί σε κάθε περίπτωση, χημειοθεραπεία ή ορμονική θεραπεία. Μια λάθος όμως εκτίμηση της κατάστασης των ER συνεπάγεται και πιθανώς λανθασμένη θεραπευτική αγωγή. Κάτι τέτοιο, πέρα από το πιθανό οικονομικό κόστος που συνεπάγεται μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω επιβάρυνση του οργανισμού του ασθενή καθώς οι θεραπείες κρύβουν πολλές παρενέργειες. Από την άλλη, σε περίπτωση λανθασμένης διάγνωσης μπορεί να ακολουθήσει ακατάλληλη θεραπεία απορρίπτοντας κάποια άλλη που θα μπορούσε να είναι σωτήρια για αυτόν. Η εισαγωγή του ασθενούς σε ένα τέτοιο φαύλο κύκλο θεραπευτικών αγωγών, που στην ουσία δεν μπορούν να τον βοηθήσουν ή να τον ανακουφίσουν, τον αποδυναμώνει τελείως σωματικά αλλά κυρίως ψυχολογικά. Ας μην ξεχνάμε ότι ο ψυχολογικός παράγοντας είναι αυτός που παίζει, μεταξύ άλλων, καταλυτικό ρόλο στην αποθεραπεία του ασθενούς. Ιδιαίτερα για τους καρκινοπαθείς ασθενείς όπου η πλήρης αποθεραπεία είναι πολύ σπάνια, αυτό που έχει σημασία για τον ασθενή δεν είναι τόσο η παράταση του χρόνου ζωής του όσο η εξασφάλιση ποιοτικής ζωής. Γι' αυτούς όλους τους λόγους κρίνεται σημαντική η ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ER στα δείγματα βιοψίας.

Αναλυτικότερα, δικό μας ζητούμενο στην έρευνα αυτή ήταν η ανάπτυξη μίας τεχνολογίας, βασιζόμενη στην μελέτη των φασματικών χαρακτηριστικών ενός μεγάλου αριθμού σημείων του υπό εξέταση δείγματος βιοψίας που θα μας έδινε ποιο αντικειμενικά αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση της μεθόδου υπερφασματικής απεικόνισης και μικροσκοπίας. Οι πρώτες μέθοδοι που είχαν εφαρμοστεί για την ποσοτικοποίηση δεικτών σε καρκινικά κύτταρα βασίζονταν σε βιοχημικές τεχνικές που όμως συνδέονταν με έναν μεγάλο αριθμό προαπαιτούμενων παραγόντων και συνθηκών. Ακόμη και οι μέθοδοι που κατά καιρούς εφαρμόστηκαν για την ποσοτικοποίηση

χρωσμένων HIC δειγμάτων βιοψίας υστερούσαν σε αντικειμενικότητα και αναπαραγωγή. Η χρήση όμως της υπερφασματικής απεικόνισης μας έδωσε το πλεονέκτημα να μελετήσουμε την φασματική πληροφορία κάθε σημείου του δείγματος, καθώς και να εντοπίσουμε συγκεντρώσεις των οιστρογονικών υποδοχέων που δεν φαίνονταν με γυμνό μάτι. Άρα η μέθοδος που εφαρμόσαμε δίνει το πλεονέκτημα εντοπισμού υποδοχέων που δεν είναι ορατοί διαφορετικά καθώς και τον διαχωρισμό χρωστικών που μπορεί να συνυπάρχουν ταυτόχρονα στο ίδιο σημείο του δείγματος. Αντίθετα, όλες οι υπόλοιπες έρευνες που έγιναν στο παρελθόν και βασίζονταν στην φασματική απεικόνιση, σημειωτέον ότι είναι ελάχιστες, δεν χρησιμοποιούσαν καθόλου φάσματα του δείγματος βιοψίας, είτε χρησιμοποιούσαν μεγάλο αριθμό μπαντών του φάσματος (π.χ. η μελέτη του κ.Μπάλα), οπότε απαιτούσαν περισσότερο χρόνο. Επιπλέον, η εφαρμογή των αλγορίθμων Normalized Euclidean Distance (NEUC), Spectral Correlation Mapper (SCM), Spectral Angle Mapper (SAM), Spectral Information Divergence (SID), Spectral Gradient Angle (SGA), μας βοήθησε να ταξινομήσουμε με πιο αντικειμενικά κριτήρια τις συγκεντρώσεις των οιστρογονικών υποδοχέων σε κύτταρα καρκίνου του μαστού. Τελικά, καταλήξαμε ότι ο SAM δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα κατηγοριοποίησης σε σχέση με τους υπόλοιπους και μάλιστα με χρήση μόλις τριών μπαντών στο ορατό και κοντινό υπέρυθρο φάσμα. Επομένως, η καινοτομία της έρευνας μας εντοπίζεται στην χρήση μόλις τριών μπαντών ικανών να μας δώσουν χρήσιμη πληροφόρηση όσον αφορά την ποσοτικοποίηση των χρωσμένων οιστρογονικών υποδοχέων και άρα την γρήγορη και αποτελεσματική διάγνωση και επιλογή της θεραπείας.

Όσον αφορά κάποια μελλοντική επέκταση της έρευνας μας, θα ήταν δυνατό να υλοποιηθεί κάποια συσκευή, εκμεταλλευόμενη τον συνδυασμό 3 μπαντών στο φάσμα του ορατού και του κοντινού υπέρυθρου που δίνει καλά αποτελέσματα για ανίχνευση και χαρτογράφηση χρωστικών οιστρογονικών υποδοχέων σε καρκίνο του μαστού. Βέβαια, θα πρέπει να γίνουν επαναληπτικές δοκιμές και κάποιες ακόμη μελέτες που ήταν πέρα από τα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, προκειμένου να υπάρχει μεγαλύτερη ββαιότητα για το αποτέλεσμα αυτό. Χρήσιμη επίσης κρίνεται η εφαρμογή της διαδικασίας που ακολουθήσαμε σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να επιτύχουμε αξιόπιστα και αντικειμενικά αποτελέσματα όσο αφορά την ποσοτικοποίηση των ER. Επίσης, η εφαρμογή ακόμα περισσότερων αλγορίθμων, ίσως αποκαλύψει νέα δεδομένα στην ήδη υπάρχουσα μελέτη.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] <http://www.mayoclinic.com/health/breast-cancer-early-stage/BC00001&slide=3>
- [2] http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/what_is_bc.jsp
- [3] www.cancernews.com/data/Article/202.asp
- [4] <http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/staging.jsp>
- [5] <http://www.nationalbreastcancer.org/About-Breast-Cancer/Stages.aspx>
- [6] http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics.jsp
- [7] <http://www.nci.nih.gov/cancertopics/understandingcancer/estrogenreceptors>
- [8] <http://esperia.iesl.forth.gr/~kafesaki/Modern-Physics/various/emspectrum.html>
- [9] http://esperia.iesl.forth.gr/~kafesaki/Modern-Physics/various/spectrum_chart.html
- [10] <http://en.wikipedia.org/wiki/Spectroscopy>
- [11] http://loke.as.arizona.edu/~ckulesa/camp/spectroscopy_intro.html
- [12] http://books.google.gr/books?id=ZFf1r8E6gH8C&pg=PA1623&lpg=PA1623&dq=interaction+tissue+and+light&source=bl&ots=4dfFFWpwpI&sig=7MXQxceSLNysmWNjyOK2QlxfnE&hl=el&ei=F KahSqyWCM2EsAbWwajSBA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5#v=onepage&q=interaction%20tissue%20and%20light&f=false
- [13] http://images.google.gr/imgres?imgurl=http://www.uam.es/docencia/quimcursos/Scimedia/chemed/spec/graphics/beersla1.gif&imgrefurl=http://www.uam.es/docencia/quimcursos/Scimedia/chemed/spec/beerslaw.htm&usq=__Uj71fWcDQ4GM4ABK6kwu3SG2dc=&h=160&w=336&sz=3&hl=el&start=13&um=1&tbnid=z8Z3oPLnaaUiJM:&tbnh=57&tbnw=119&prev=/images%3Fq%3DBeer-Lambert%2Blaw%26hl%3Del%26sa%3DX%26um%3D1
- [14] http://www.thermo.com/com/cda/resources/resources_detail/1,2166,13310,00.html
- [15] <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/beerlambert.html>
- [16] <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/spec/beerslaw.html>
- [17] <http://www.mayoclinic.com/health/stage-of-breast-cancer/BR00011&slide=7>
- [18] Lane-Claypon, Janet Elizabeth (1926). A further report on cancer of the breast, with special reference to its associated antecedent conditions. London, OCLC 14713036
- [19] Stewart B. W. and Kleihues P. (Eds): World Cancer Report. IARC Press. Lyon 2003
- [20] Breast Cancer: Breast Cancer in Young Women WebMD. Retrieved on September 9, 2009
- [21] http://en.wikipedia.org/wiki/Breast_cancer
- [21] http://en.wikipedia.org/wiki/Breast_cancer_chemotherapy
- [22] http://en.wikipedia.org/wiki/Breast_cancer_treatment
- [23] Libyan J Med, AOP: 060911 (20 September 2006) Quantitative Pathology: Historical Background, Clinical Research and Application of Nuclear Morphometry and DNA Image Cytometry
- [24] Darryl J. Bornhop, Christopher H. Contag, Licha, Catherine J. Murphy: Advances in contrast agents, reporters, and detection. Paper JBO-200102
- [25] R A Walker. 'Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer' J. Clin. Pathol. 2008; 61; 689-696; original published online 23 Nov 2007; doi:10.1136/jcp.2006.041830

- [26] C.Balas, A.Papadakis, E.Stathopoulos, G.Delides, K.Berberides, G.Nikiforidis.'A Novel Spectral Microscope System: Application in Quantitative Pathology' IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING, VOL 50,No 2, FEBRUARY 2003
- [27] S.Bacus, R.Goldschmidt, D.Chin, G.Moran, D.Weinberg, and J.Bacus,'Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and others markers', Anner: J.Pathol, vol.135,pp.783-792,1989
- [28] R.McClelland, U.Berger, L.Miller, 'Immunocytochemical assay for estrogen receptor in patients with breast cancer: Relationship to a biochemical assay and to outcome of therapy,'J.Clin.Oncol,vol.4, pp.1171-1176,1986
- [29] http://en.wikipedia.org/wiki/Multi-spectral_image
- [30] http://en.wikipedia.org/wiki/Hyperspectral_imaging
- [31] <http://en.wikipedia.org/wiki/Microscopy>
- [32] <http://en.wikipedia.org/wiki/Microscope>
- [33] http://en.wikipedia.org/wiki/History_of_optics
- [34] http://en.wikipedia.org/wiki/Optical_microscope
- [35] Michael W. Davidson¹ and Mortimer Abramowitz²¹ National High Magnetic Field Laboratory, The Florida State University, 1800 E. Paul Dirac Dr., Tallahassee, Florida 32306, Davidson @magnet.fsu.edu, <http://microscopy.fsu.edu>
- [36] <http://www.microscope-microscope.org/basic/microscope-parts.htm>
- [37] <http://www.cas.muohio.edu/mbi-ws/microscopes/fathers.html>
- [38] G. Girouand, A.Bannari, A. El. Harti and A. Descrochers (2004), Validated Spectral Angle Mapper Algorithm for Geological Mapping: Comparative study between Quickbird and Landsat-TM, Geo-Imagery Bridging Continents, Istanbul, 599-604
- [39]Carvalho Junior, O.A. and Menezes, P.R. 2000, "Spectral Correlation Mapper (SCM):an Improving Spectral Angle Mapper (SAM)". Proceedings of the Nineth JPL Airborne Earth Science Workshop, JPL Publication 00-18, pp 65-74]
- [40] H. Du, C.-I. Chang, H. Ren, C-C Chang, J. O. Jensen, and F. M.D'Amico, "New hyperspectral discrimination measure for spectral characterization", Optical Engineering, 43, no 8, 2004, 1777–1786
- [41] E. Angelopoulou, S. W. Lee, R. Bajcsy, "Spectral gradients: A material descriptor invariant to geometry and incident illumination", Proc IEEE Int Conf on Comp Vision. IEEE Computer Society Press, 1999, 861-867
- [42] C. Balas, G. Themelis, A. Papadakis, E. Vasgiouraki, A. Argyros, E.Koumantakis, A. Tosca, E. Helidonis "A Novel Hyper-Spectral Imaging System : Application on in-vivo Detection and Grading of Cervical Precancers and of Pigmented Skin Lesions"
- [43]Balas, C, (2001) "A novel optical imaging method for the early detection, quantitative grading, and mapping of cancerous and precancerous lesions of cervix" IEEE Trans Biomed Eng 48: 96-104
- [44] James R. Mansfield, Clifford Hoyt, and Richard M. Levenson 'Visualization of Microscopy-Based Spectral Imaging Data from Multi-Label Tissue Sections' UNIT 14.19
- [45] Speirs V, Walker RA (2007).New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast, J Pathol, pp. 211:499-506.

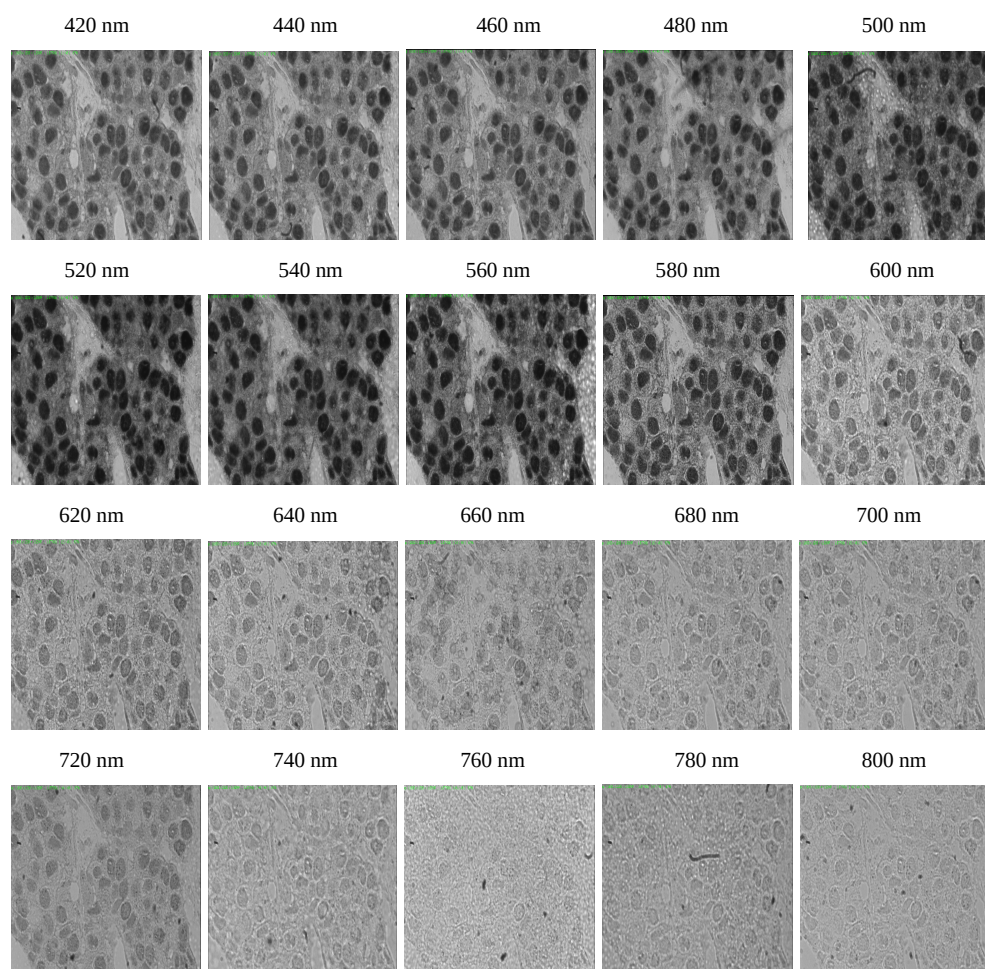
- [46] Louis P.Pertschuk, DO and Constantine A.Axiotis, MD ‘Steroid Hormone Receptor Immunohistochemistry in Breast Cancer : Past, Present, and Future’ Department of Pathology, State University of New York Health Science Center at Brooklyn and the Kings County Hospital Center, Brooklyn, New York
- [47] Louis P.Pertschuk, DO , Ellis H.Tobin ,BA, Danid J.Brigati ‘Immunofluorescent Detection Of Estrogen Receptors In breast Cancer’ Comparison with Dextran-coated Charcoal and Sucrose Gradient Assays, *Cancer* 41:907-911,1978
- [48] R A Walker‘Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer’
- [49] Spiros Kostopoulos, Dionisis Cavouras, Antonis Daskalakis, Panagiota Ravazoula,George Nikiforidis ‘Image Analysis System For Assessing The Estrogen Receptor’s Positive Status In Breast Tissue Carcinomas’
- [50] Bonnie H Hall, Monica Ianosi-Irimie, Parisa Javidian, Wenjin Chen, Shridar Ganesan and David J Foran ‘Computer-assisted assessment of the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 immuno-histochemical assay in imaged histologic sections using a membrane isolation algorithm and quantitative analysis of positive controls’ *BMC Medical Imaging* 2008, 8:11 doi:10.1186/1471-2342-8-11
- [51] Spiros Kostopoulos, Dionisis Cavouras, Antonis Daskalakis, Ioannis Kalatzis, Panagiotis Bougioukos, George Kagadis, Panagiota Ravazoula, and George Nikiforidis ‘Assessing Estrogen Receptors’ status by texture analysis of breast tissue specimens and pattern recogni r Estrogen Receptor Measurement in Mammary Carcinoma: the Need for Quality Assurance’
- [53] James R. Mansfield, Clifford Hoyt, Richard M. Levenson ‘Visualization of Microscopy-Based Spectral Imaging Data from Multi-Label Tissue Sections’ UNIT 14.19
- [54] Antonis Papadakis, Efstathios Stathopoulos, George Delides, Konstantinos Berberides, George Nikiforidis, Costas Balas ‘A Novel Spectral Microscope System: Application in Quantitative Pathology’
- [55] P R Barber, P R Barber, B Vojnovic, G Atkin, F M Daley, S A Everett, G D Wilson, J D Gilbey ‘Applications of cost-effective spectral imaging microscopy in cancer research’ 2003 *J.Phys.D:Appl.Phys.*36 1729
- [56] Gary Atkina, Paul R. Barber, Boris Vojnovic, Frances M. Daley, Rob Glynne-Jones, George D. Wilson ‘Correlation of spectral imaging and visual grading for the quantification of thymidylate synthase protein expression in rectal cancerB’ *Human Pathology* (2005) 36, 1302– 1308
- [57] Rothmann C, Barshack I, Gil A, et al. ‘Potential use of spectral image analysis for the quantitative evaluation of estrogen receptors in breast cancer.’ *Histol Histopathol* 2000;15:1051- 7.
- [58] Richard M. Levenson, James R. Mansfield ‘Multispectral Imaging in Biology and Medicine: Slices of Life’ *Cytometry Part A* 69A:748–758 (2006)
- [59] Laura E Boucheron, Zhiqiang Bi, Neal R Harvey, BS Manjunath, David L Rimm: Utility of multispectral imaging for nuclear classification of routine clinical histopathology imagery. *BMC Cell Biology* 2007, 8(Suppl 1):S8 doi:10.1186/1471-2121-8-S1-S8
- [60] Sokol Petushi, Fernando U Garcia, Marian M Haber, Constantine Katsinis, Aydin Tozeren: Large-scale computations on histology images reveal grade-differentiating parameters for breast cancer. *BMC Medical Imaging* 2006, 6:14

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

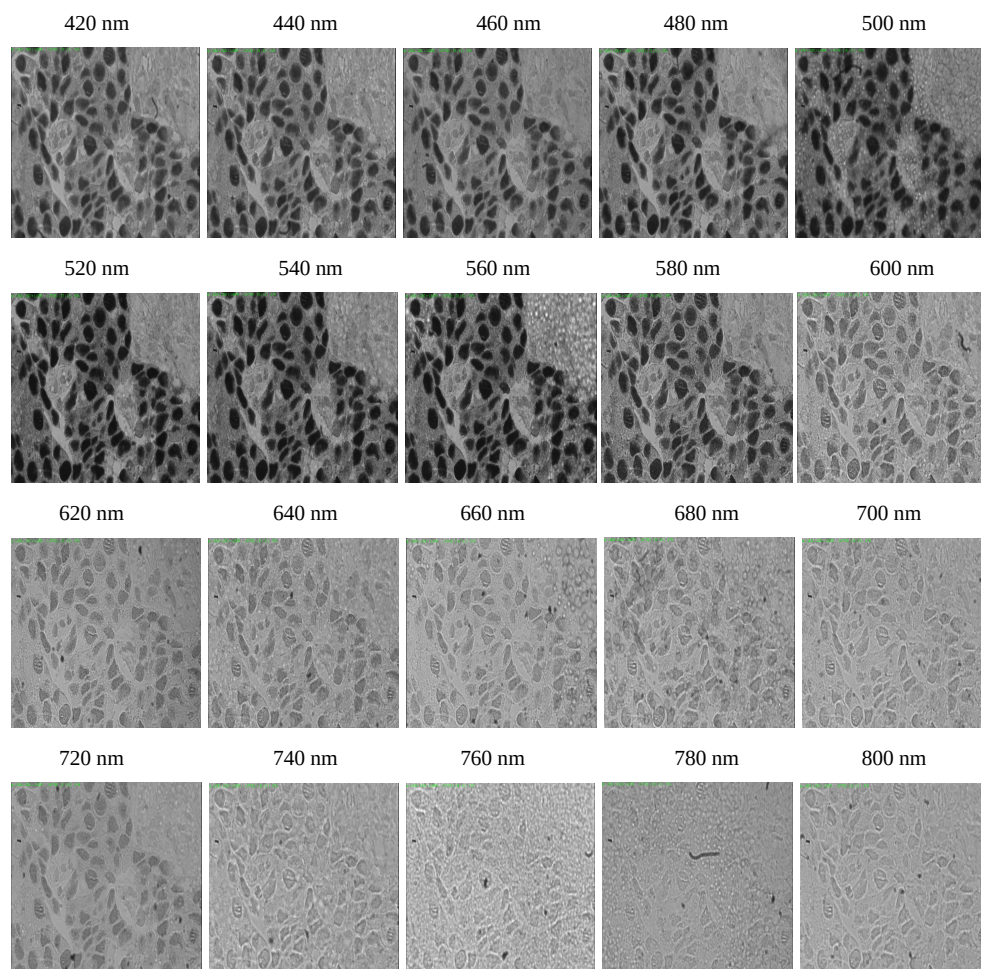
Το Παράρτημα αυτό περιέχει εικόνες που ανήκουν αποκλειστικά στο Κεφάλαιο 5 για εξοικονόμηση χώρου. Οι εικόνες παρουσιάζονται ανάλογα με το βήμα στο οποίο ανήκουν.

▪ ΒΗΜΑ 1^ο

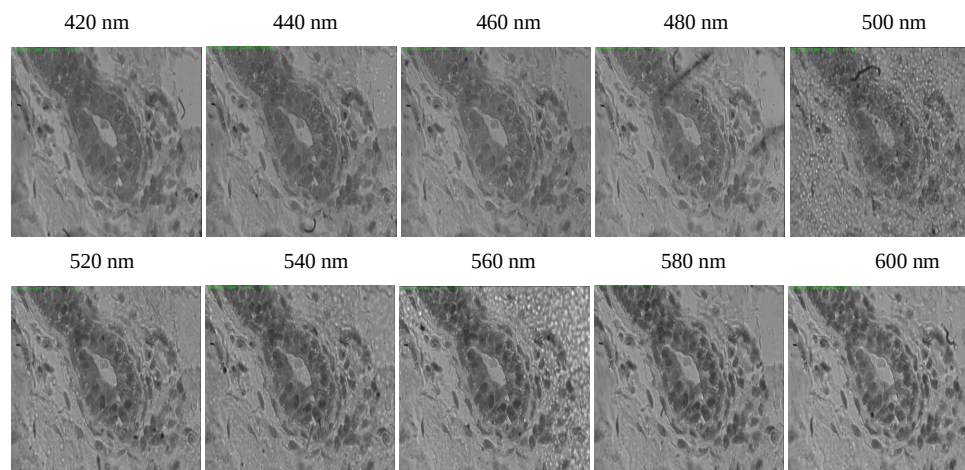
Ακολουθούν οι φασματικοί κύβοι για τα υπόλοιπα 5 πλακίδια όπως προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία.

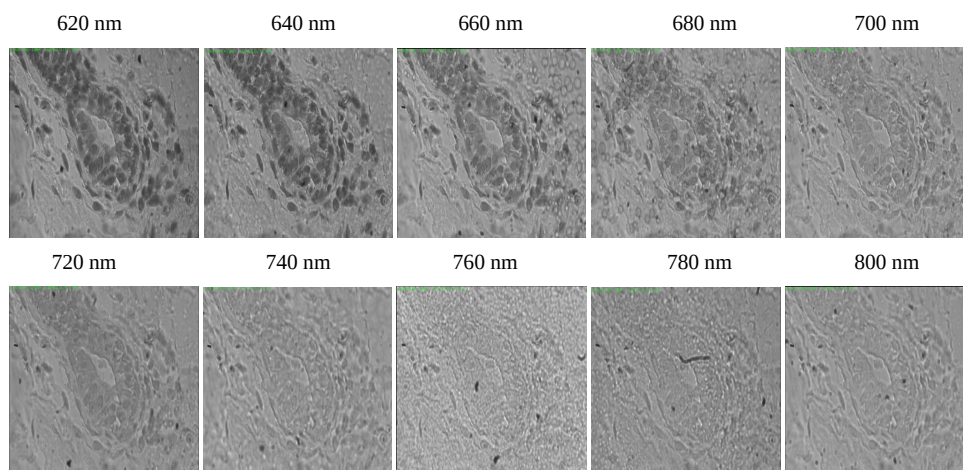


Εικόνα1.Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας(121588.2.32), κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.

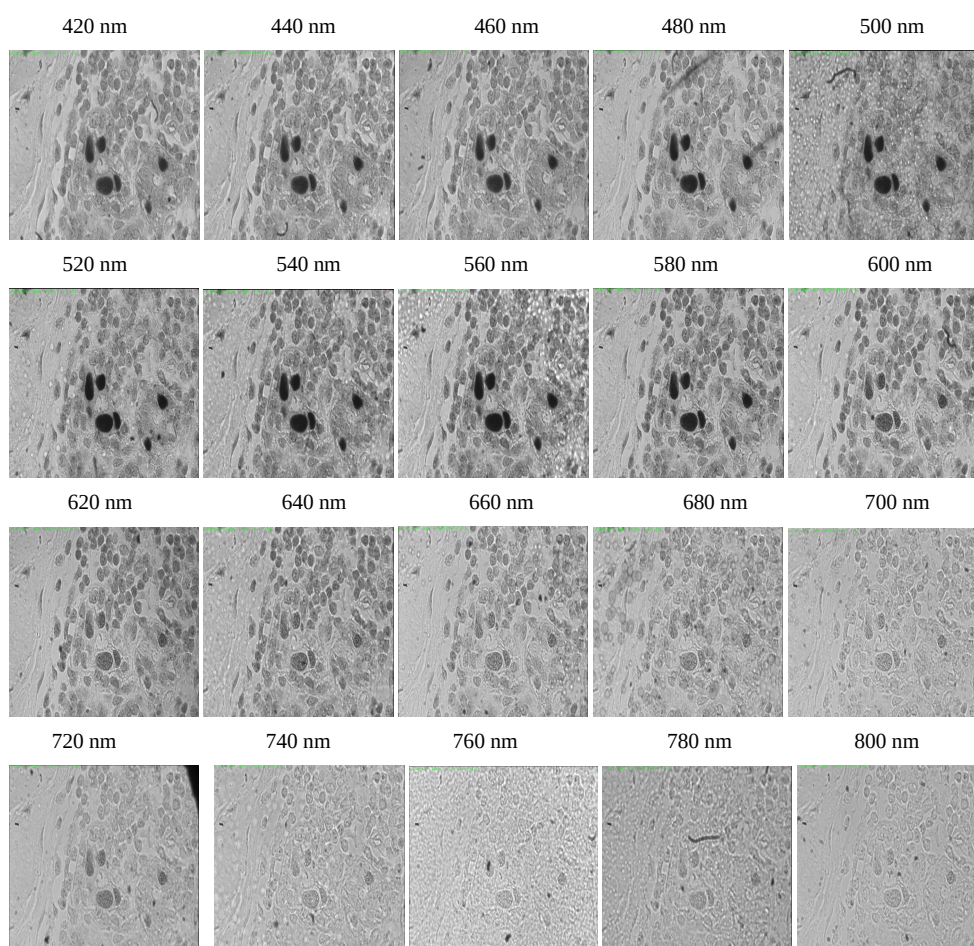


Εικόνα 2. Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας (121588.2.B.31), κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.

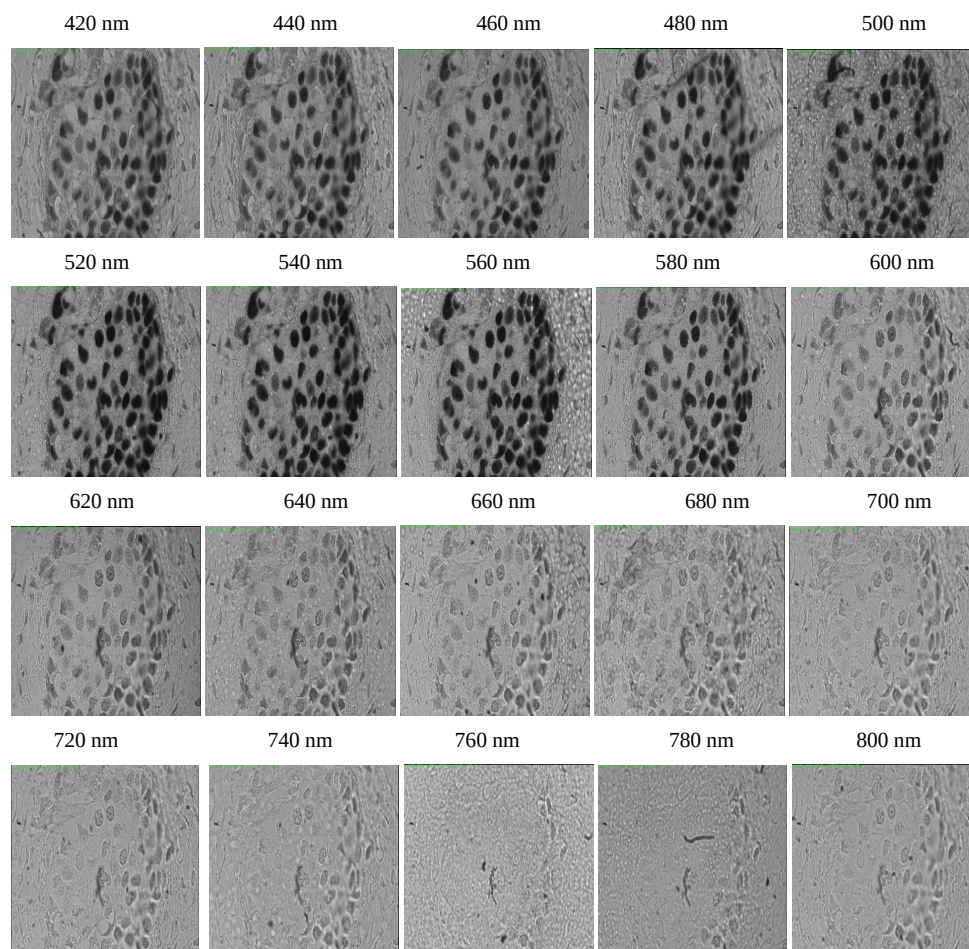




Εικόνα3. Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας(122108.2.17) , κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.



Εικόνα4. Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας(122182.2.25) , κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου.



Εικόνα 5. Φασματικός κύβος για ένα δείγμα βιοψίας (122182.2.26), κάνοντας χρήση του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης MuSIS και του οπτικού μικροσκοπίου

- BHMA 6°

Παρακάτω παραθέτουμε για το κάθε πλακίδιο τον πίνακα που δείχνει τα ποσοστά απόκλισης (διαφοράς) του αριθμού των pixels κάθε κλάσης με τα αντίστοιχα του SAM 20 προς τα συνολικά pixels της εικόνας.

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	-0.5850	0	-3.0701	-2.5446	6.3653
20 bands_460-580-620-740	-0.7196	0	2.4294	0.8651	-2.3251

20 bands_480-500-640-740	-0.5059	0	4.7417	-5.6901	1.0612
20 bands_480-520-580-740	0.1160	0	-0.3134	1.5369	-0.8202
20 bands_480-520-600-700	1.0865	0	-1.3578	-4.7843	4.9940
20 bands_480-540-600-740	0.9706	0	3.0787	-0.8422	-2.7713
20 bands_480-540-620-700	1.0730	0	1.4433	-4.6952	1.9312
20 bands_480-560-600-680	2.6247	0	3.5186	-3.7961	-2.2646
20 bands_480-560-640-700	0.8035	0	-2.7547	-3.2972	4.9170
20 bands_480-580-640-740	-0.4378	0	1.7788	1.1063	-2.7788
20 bands_480-580-700-800	0.0136	0	3.1497	0.0611	-3.2245
20 bands_480-600-640-740	0.5488	0	3.0590	-2.0186	-1.9206
20 bands_480-600-640-800	1.1201	0	5.3404	-2.3837	-4.4089
20 bands_500-520-640-740	-1.1450	0	1.9453	-2.9263	1.7310
20 bands_500-540-580-700	0.1715	0	2.6624	-1.8712	-1.0256
20 bands_500-540-620-740	-0.3728	0	3.4229	-2.7871	-0.3439
20 bands_500-580-640-700	-0.3345	0	1.4370	-2.0305	0.5964
20 bands_500-580-640-740	-0.8664	0	2.5971	0.1671	-2.2296
20 bands_520-580-640-740	-0.4477	0	0.4953	0.7173	-1.0966
20 bands_520-580-700-740	-0.2650	0	0.1022	0.3863	-0.2229
20 bands_540-580-620-740	0.0327	0	0.2607	2.0758	-2.1193
20 bands_540-600-640-740	0.6444	0	2.5950	-0.5687	-3.0027

Πίνακας1.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.32 (πλακίδιο2).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	-1.7986	0	-7.0673	7.8679	1.2297
20 bands_460-580-620-740	1.1349	0	-9.2616	2.7148	5.7695
20 bands_480-500-640-740	0.0535	0	-4.6239	-1.3529	5.5749
20 bands_480-520-580-740	0.8634	0	-2.0427	-1.0950	3.0053
20 bands_480-520-600-700	-0.7681	0	8.3969	-7.2952	-0.4334
20 bands_480-540-600-740	-0.3606	0	3.6897	-5.0612	2.2965
20 bands_480-540-620-700	-0.0235	0	-3.0691	0.9137	1.9549
20 bands_480-560-600-680	-0.6293	0	2.5202	0.4260	-2.2506
20 bands_480-560-640-700	-0.9187	0	-3.3523	3.1583	0.8880
20 bands_480-580-640-740	-0.1122	0	-4.9324	2.4698	2.2266
20 bands_480-580-700-800	-1.1914	0	-11.4254	10.5167	2.0009
20 bands_480-600-640-740	-0.5517	0	-1.6082	1.1473	0.6643
20 bands_480-600-640-800	0.0847	0	6.7407	-2.8331	-4.3406
20 bands_500-520-640-740	-0.6960	0	-4.9201	0.3103	5.1426
20 bands_500-540-580-700	-0.3943	0	-5.6301	5.4626	0.4621
20 bands_500-540-620-740	0.6262	0	-4.7869	-0.5271	4.8806
20 bands_500-580-640-700	-0.7246	0	-2.6211	0.6197	2.3776
20 bands_500-580-640-740	1.3051	0	-4.3286	-2.4495	5.1246
20 bands_520-580-640-740	-0.2616	0	-3.7995	0.7833	3.1148
20 bands_520-580-700-740	-1.3756	0	-6.9791	5.5989	2.8420
20 bands_540-580-620-740	-0.0043	0	-6.4128	3.5275	3.2473

20 bands_540-600-640-740	-1.6940	0	-1.6641	2.2563	0.9387
--------------------------	---------	---	---------	--------	--------

Πίνακας 2. Ποσοστά διαφορές των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 4 μπαντών για το πλακίδιο. 121588.2.B.31 (πλακίδιο 3).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	0	5.5357	0.1616	-27.4418	21.8271
20 bands_460-580-620-740	0	10.0566	0.1800	-4.1572	-5.7481
20 bands_480-500-640-740	0	-11.6999	-1.8879	-2.1463	15.4910
20 bands_480-520-580-740	0	8.8535	-0.0822	-3.8858	-4.3672
20 bands_480-520-600-700	0	6.3472	-1.4082	-22.4666	17.2172
20 bands_480-540-600-740	0	6.8419	-0.2275	-2.9426	-3.2569
20 bands_480-540-620-700	0	2.5665	-0.4909	-13.2501	10.7402
20 bands_480-560-600-680	0	6.5901	0.1805	-7.1440	0.3745
20 bands_480-560-640-700	0	0.7689	-0.8348	-5.1659	4.9834
20 bands_480-580-640-740	0	8.5117	-0.0445	-3.5193	-4.3056
20 bands_480-580-700-800	0	7.2395	0.2049	-7.7497	0.1187
20 bands_480-600-640-740	0	8.1573	-1.0205	-5.0630	-1.4733
20 bands_480-600-640-800	0	8.3204	-0.8368	-9.0460	2.1629

20 bands_500-520-640-740	0	-5.1643	-1.3346	-1.2087	7.6456
20 bands_500-540-580-700	0	4.9299	-0.0481	-6.8371	1.7064
20 bands_500-540-620-740	0	1.5997	-0.8958	-1.3911	0.5022
20 bands_500-580-640-700	0	5.8531	-1.7815	-5.9809	1.7235
20 bands_500-580-640-740	0	7.8083	-0.7636	-2.4870	-4.4920
20 bands_520-580-640-740	0	7.4417	-0.3647	-3.3280	-3.6035
20 bands_520-580-700-740	0	5.5853	0.1853	-4.9470	-1.0102
20 bands_540-580-620-740	0	4.8035	0.0153	-0.0589	-4.4285
20 bands_540-600-640-740	0	7.4182	-0.2308	-3.3642	-3.6365

Πίνακας 3.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122108.2.17 (πλακίδιο4).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	-0.4266	-2.5512	-8.5012	-1.1583	12.6573
20 bands_460-580-620-740	-0.2446	4.4570	-12.4267	-1.0183	9.4618
20 bands_480-500-640-740	-0.5443	-1.3968	-2.7070	4.4835	-0.1454
20 bands_480-520-580-740	0.0381	2.8566	-0.8770	-5.4336	4.0809
20 bands_480-520-600-700	-0.5159	-0.8285	-3.6104	7.6258	-2.9200
20 bands_480-540-600-740	-0.0348	4.3030	-6.9260	3.2499	-0.0939
20 bands_480-540-620-700	-0.8438	-0.1297	-14.1320	16.1303	-1.4607
20 bands_480-560-600-680	-0.8477	0.6581	-4.7247	11.6685	-6.6711
20 bands_480-560-640-700	-1.2607	3.1753	-7.6259	10.5311	-5.0070

20 bands_480-580-640-740	-1.1680	4.3468	-5.6587	-1.5322	3.7640
20 bands_480-580-700-800	-1.1221	7.2183	-8.4183	2.1384	-0.0655
20 bands_480-600-640-740	-1.1161	4.5332	-11.1766	2.7726	4.7386
20 bands_480-600-640-800	-1.0295	4.0170	-11.9758	5.4772	3.2626
20 bands_500-520-640-740	-0.2830	-3.7341	1.4620	-1.4395	3.9316
20 bands_500-540-580-700	-0.4437	1.4085	-6.9372	8.0908	-2.3680
20 bands_500-540-620-740	-0.0403	-7.8882	-0.5130	9.2787	-0.8560
20 bands_500-580-640-700	-0.9345	0.3741	-4.4536	-0.5098	5.2756
20 bands_500-580-640-740	-0.3690	-0.8524	-0.3721	-8.3696	9.7144
20 bands_520-580-640-740	-0.2775	-0.5349	1.4921	-5.6473	4.9047
20 bands_520-580-700-740	-0.2851	2.2568	0.1548	-6.1888	3.9369
20 bands_540-580-620-740	-0.1977	0.3481	-4.2834	4.6849	-0.3228
20 bands_540-600-640-740	-0.6006	3.3273	-5.9928	1.6709	1.4081

Πίνακας4.Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.25 (πλακίδιο5).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	-0.1942	0	-1.9982	-11.7291	14.1080
20 bands_460-580-620-740	-0.4383	0	-2.2801	-3.6455	6.5929
20 bands_480-500-640-740	-3.2764	0	2.4501	-4.0944	4.3816
20 bands_480-520-580-740	0.0467	0	-6.3080	6.2672	0.5135
20 bands_480-520-600-700	-1.4292	0	-1.4526	2.8838	-0.3144

20 bands_480-540-600-740	-0.3721	0	-5.0777	2.1134	3.6889
20 bands_480-540-620-700	-2.2483	0	-1.6291	6.4272	-2.9862
20 bands_480-560-600-680	-1.2921	0	1.0919	8.5893	-8.4521
20 bands_480-560-640-700	-3.4416	0	0.4038	2.7967	-0.1135
20 bands_480-580-640-740	-1.7878	0	-1.6314	2.7184	0.2234
20 bands_480-580-700-800	0.1282	0	-7.1013	3.9492	2.7119
20 bands_480-600-640-740	-2.1937	0	-0.7414	1.1305	1.3272
20 bands_480-600-640-800	-1.7483	0	-1.7369	-2.2775	5.2853
20 bands_500-520-640-740	-2.2164	0	-0.6451	-0.8047	3.2496
20 bands_500-540-580-700	-0.3823	0	-2.6672	-1.8232	4.5606
20 bands_500-540-620-740	-1.7647	0	-0.8431	-1.5343	4.1235
20 bands_500-580-640-700	-2.4461	0	2.6762	-3.9140	3.2057
20 bands_500-580-640-740	-2.5482	0	2.4476	-8.4890	8.1118
20 bands_520-580-640-740	-0.7283	0	-5.7610	6.4167	-0.3433
20 bands_520-580-700-740	-0.4159	0	-5.5748	6.9624	-1.2219
20 bands_540-580-620-740	-0.4335	0	-4.5386	6.9054	-1.7042
20 bands_540-600-640-740	-1.7396	0	-2.7949	1.6060	2.6362

Πίνακας 5. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.26 (πλακίδιο 6).

■ ΒΗΜΑ 7^ο

Παρακάτω παραθέτουμε για το κάθε πλακίδιο τον πίνακα που δείχνει τα ποσοστά απόκλισης (διαφοράς) του αριθμού των pixels κάθε κλάσης με τα αντίστοιχα του SAM 20 προς τα συνολικά pixels της εικόνας.

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	0.9002	0	1.5969	-1.4826	-1.0757
20 bands_480-580-740	0.2455	0	0.5631	2.8374	-3.1266
20 bands_480-600-700	1.7770	0	3.0050	-6.1333	1.2897
20 bands_480-600-740	1.6566	0	3.1492	-1.8897	-2.4802
20 bands_480-640-700	1.6018	0	2.2031	-8.4712	4.2732
20 bands_480-640-720	0.4873	0	6.5817	-6.6414	-0.8212
20 bands_480-640-800	0.5633	0	6.4126	-5.7074	-1.6624
20 bands_500-580-700	-0.2245	0	2.7704	-2.1104	-0.6857
20 bands_500-600-700	0.1581	0	3.1490	-7.8399	4.2826
20 bands_500-600-740	-0.9570	0	3.7323	-2.5267	-0.4961
20 bands_500-620-740	-1.6911	0	5.3002	-8.1544	4.2980
20 bands_520-580-700	-0.1553	0	-1.3729	-0.9131	2.3781
20 bands_520-580-740	-0.1031	0	-0.3723	1.8471	-1.3519
20 bands_520-600-700	0.5918	0	-1.7737	-3.5264	4.6452
20 bands_540-580-700	0.2931	0	0.6331	-0.2145	-0.7746
20 bands_540-600-740	0.8293	0	2.4930	0.1766	-3.3959
20 bands_560-600-680	1.9560	0	3.1657	-2.9865	-2.0527
20 bands_640-720-800	1.6961	0	4.8981	-14.1429	7.2164

Πίνακας6. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.32 (πλακίδιο 2).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	-1.0146	0	-8.7471	9.1026	0.5597
20 bands_480-580-740	1.2392	0	-8.2047	4.4672	3.2291
20 bands_480-600-700	-0.2643	0	9.5444	-4.7614	-4.6185
20 bands_480-600-740	-0.0425	0	2.4186	-4.9933	3.1816
20 bands_480-640-700	-0.0133	0	-2.1342	1.0408	0.7585
20 bands_480-640-720	0.8017	0	-3.1052	0.1133	1.8418
20 bands_480-640-800	0.0565	0	-0.1216	-1.6103	1.3271
20 bands_500-580-700	-1.0872	0	-2.5285	2.6295	0.8868
20 bands_500-600-700	-2.6947	0	10.3348	-6.7224	-1.0176
20 bands_500-600-740	-3.8284	0	6.4090	-7.5445	5.5283
20 bands_500-620-740	0.6753	0	-6.4239	-2.2702	8.3765
20 bands_520-580-700	-1.7163	0	-4.6371	3.1342	3.1195
20 bands_520-580-740	0.3840	0	0.1651	-2.9748	2.5751
20 bands_520-600-700	-2.3467	0	9.7581	-7.4202	-0.0912
20 bands_540-580-700	-1.3004	0	-4.5421	5.0960	0.6469
20 bands_540-600-740	-1.8027	0	4.2226	-3.8646	1.7599
20 bands_560-600-680	-2.1431	0	10.8049	-7.1848	-1.4107
20 bands_640-720-800	-2.6949	0	-0.0408	6.0605	-3.6114

Πίνακας 7. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.31 (πλακίδιο 3).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	0	7.2414	0.1674	-12.5505	4.6457
20 bands_480-580-740	0	8.9909	0.2179	-3.5288	-5.3473
20 bands_480-600-700	0	7.4911	-2.5203	-31.2395	25.7728
20 bands_480-600-740	0	7.7435	-1.0269	-5.5610	-0.9881
20 bands_480-640-700	0	-3.1007	-3.3573	-15.0269	20.9890
20 bands_480-640-720	0	-4.9299	-2.5484	-6.5968	13.5805
20 bands_480-640-800	0	-5.8798	-1.2359	-1.6203	8.2414
20 bands_500-580-700	0	5.3365	-0.7227	-6.1079	0.7465
20 bands_500-600-700	0	7.8319	-3.7845	-20.6462	15.8512
20 bands_500-600-740	0	8.1724	-2.0327	-9.3339	2.6972
20 bands_500-620-740	0	4.4440	-2.5448	-9.5489	7.1524
20 bands_520-580-700	0	8.6184	-0.3630	-15.5962	7.0296
20 bands_520-580-740	0	7.0449	0.1423	-2.4038	-4.7631
20 bands_520-600-700	0	6.7567	-1.3901	-22.7602	17.0824
20 bands_540-580-700	0	8.5284	0.0553	-14.5072	5.6746
20 bands_540-600-740	0	6.1554	-0.1768	-2.3851	-3.5939
20 bands_560-600-680	0	5.4287	0.2536	-9.7410	4.0592
20 bands_640-720-800	0	-3.0497	-3.8545	-0.5940	7.4366

Πίνακας8. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122108.2.17 (πλακίδιο4).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	-1.1767	6.7401	-11.5928	8.9103	-3.1920
20 bands_480-580-740	-0.0707	8.8406	-8.3361	-4.5683	4.7373
20 bands_480-600-700	-0.5492	6.8183	-14.5800	10.5612	-2.4999
20 bands_480-600-740	-0.2988	5.4796	-11.6092	2.5511	4.3136
20 bands_480-640-700	-1.5690	1.2256	-10.4511	10.8564	-0.3726
20 bands_480-640-720	-1.5109	-1.9256	-5.7909	6.0189	2.8981
20 bands_480-640-800	-1.2783	2.4309	-8.2620	5.3290	1.4701
20 bands_500-580-700	-0.6216	1.9790	-4.8930	-2.5501	-2.5501
20 bands_500-600-700	-1.1432	-1.3049	-5.9436	0.6182	7.3366
20 bands_500-600-740	-1.1767	6.7401	-11.5928	8.9103	-3.1920
20 bands_500-620-740	-0.8085	-9.5867	-2.6810	-2.5313	15.5053
20 bands_520-580-700	-0.3896	3.8708	-3.2186	0.6605	-1.1723
20 bands_520-580-740	-0.0014	1.1220	1.1507	-8.2717	6.0007
20 bands_520-600-700	-0.4371	-1.1868	-1.3339	3.3800	-0.6717
20 bands_540-580-700	-0.5492	6.8183	-14.5800	10.5612	-2.4999
20 bands_540-600-740	-0.1420	3.5068	-4.2864	-0.7333	1.8206
20 bands_560-600-680	-0.7719	1.3927	-3.4635	8.4682	-5.5424
20 bands_640-720-800	-3.0231	-4.3131	-9.4511	9.1712	7.4293

Πίνακας 9. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.25 (πλακίδιο 5).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	-0.2352	0	-6.0621	6.6285	-0.7051
20 bands_480-580-740	0.6243	0	-6.3174	7.7258	-1.5751
20 bands_480-600-700	-1.5362	0	-2.5766	2.2970	1.4417
20 bands_480-600-740	-0.3626	0	-4.4556	3.7028	1.4063
20 bands_480-640-700	-5.3035	0	3.3082	1.1892	0.2664
20 bands_480-640-720	-5.7815	0	-0.9469	4.3676	1.8213
20 bands_480-640-800	-2.7493	0	-0.2056	-1.8130	4.2287
20 bands_500-580-700	-1.5208	0	0.0830	-1.6345	2.6349
20 bands_500-600-700	-2.0644	0	0.9891	-6.1401	6.7779
20 bands_500-600-740	-2.3494	0	1.6411	-9.2057	10.2666
20 bands_500-620-740	-2.5904	0	-8.1621	-4.4902	15.4716
20 bands_520-580-700	0.4860	0	-5.7910	4.0842	0.9083
20 bands_520-580-740	-0.4183	0	-5.3173	8.5792	-2.8235
20 bands_520-600-700	-1.2087	0	-3.0446	3.5375	0.4031
20 bands_540-580-700	0.0124	0	-6.3722	6.8306	-0.7830
20 bands_540-600-740	-1.4228	0	-2.0995	0.6859	2.9398
20 bands_560-600-680	-1.4574	0	-1.6557	11.2444	-8.1944
20 bands_640-720-800	-21.7158	0	2.7800	15.4931	3.0266

Πίνακας10. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.26 (πλακίδιο 6).

▪ *BHMA 8^ο*

Παρακάτω παραθέτουμε για το κάθε πλακίδιο τον πίνακα που δείχνει τα ποσοστά απόκλισης (διαφοράς) του αριθμού των pixels κάθε κλάσης με τα αντίστοιχα του SAM 20 προς τα συνολικά pixels της εικόνας.

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	3.2677	0.2059	-3.9152	-5.8209	6.4898
20 bands_460-580-620-740	0.5333	0.6366	-1.5833	0.5603	0.1647
20 bands_480-500-640-740	-0.2937	-0.9716	1.2721	-3.6517	3.3135
20 bands_480-520-580-740	0.4785	-1.9336	-3.5473	4.4369	1.1466
20 bands_480-520-600-700	0.7269	0.3862	-4.8576	0.5411	3.2035
20 bands_480-540-600-740	0.3444	0.0177	0.7771	-1.0883	0.4468
20 bands_480-540-620-700	1.0584	-0.2356	-1.4151	-0.1982	0.6046
20 bands_480-560-600-680	1.8979	0.5378	-2.8166	1.2252	-0.6999
20 bands_480-560-640-700	-0.6668	0.2422	-0.9278	2.0254	-0.9430
20 bands_480-580-640-740	-1.1289	-1.3635	1.6861	-0.8116	1.3482
20 bands_480-580-700-800	0.8535	-6.0905	-1.3966	4.8443	1.8510
20 bands_480-600-640-740	-0.7406	0.0828	1.5283	-1.2347	0.0940
20 bands_480-600-640-800	-0.9360	0.3890	1.4439	-1.7342	0.5670
20 bands_500-520-640-740	-0.4651	-0.5202	1.6030	-5.4206	4.4697
20 bands_500-540-580-700	1.7173	-1.5938	-4.5297	0.0147	4.3903
20 bands_500-540-620-740	2.4486	-0.7161	-1.7754	-3.6811	3.7047

20 bands_500-580-640-700	0.3156	-0.2021	-4.2557	-2.6274	6.4997
20 bands_500-580-640-740	-0.3085	-1.3397	0.6832	-6.4107	7.1058
20 bands_520-580-640-740	0.3427	-1.1041	-0.0451	-2.4002	2.9368
20 bands_520-580-700-740	1.6609	-1.5035	-4.4065	1.6096	2.7018
20 bands_540-580-620-740	1.2309	-0.5861	-0.9582	-0.7495	1.3746
20 bands_540-600-640-740	-0.7711	-0.0715	1.5127	-3.0944	2.1541

Πίνακας11. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 4 μπαντών για το πλακίδιο. 121588.2.B.32 (πλακίδιο 2).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	1.3302	-0.1448	-3.9652	-0.6331	3.6529
20 bands_460-580-620-740	-0.9888	0.1997	-3.8596	7.6443	-2.6296
20 bands_480-500-640-740	-0.6328	-1.3696	-1.3541	0.4844	2.5322
20 bands_480-520-580-740	1.1767	-0.9691	-9.4893	10.5982	-0.5772
20 bands_480-520-600-700	0.9472	-0.0178	-5.2053	2.5450	1.6394
20 bands_480-540-600-740	1.2782	0.0158	0.4983	-1.1592	-0.0604
20 bands_480-540-620-700	1.2923	-0.8587	-4.4378	4.8770	-1.0884
20 bands_480-560-600-680	1.6780	0.1507	-5.2666	7.6474	-4.1349
20 bands_480-560-640-700	-0.2161	-0.4146	-4.4079	7.0561	-2.2341
20 bands_480-580-640-740	-0.4324	-1.1259	-2.0185	2.9368	0.3001
20 bands_480-580-700-800	2.4433	-7.5897	-7.0209	10.9459	1.1306
20 bands_480-600-640-740	-0.6858	0.0047	0.7723	-0.3679	-0.0639

20 bands_480-600-640-800	-0.6282	0.0133	1.4434	-1.2391	0.0699
20 bands_500-520-640-740	-1.1198	-0.9528	-1.4407	0.1719	3.1865
20 bands_500-540-580-700	2.1811	-2.2099	-11.5898	10.0280	1.4993
20 bands_500-540-620-740	2.0670	-1.5923	-6.6364	4.6286	1.7343
20 bands_500-580-640-700	0.4461	-0.7798	-7.2803	4.6484	2.6256
20 bands_500-580-640-740	0.2616	-2.9123	-3.0065	1.2068	4.1104
20 bands_520-580-640-740	0.3909	-0.5980	-5.0617	3.6165	1.4976
20 bands_520-580-700-740	1.7958	-0.9690	-10.9678	8.9343	1.3010
20 bands_540-580-620-740	1.5784	-0.5377	-7.8170	9.0830	-1.9407
20 bands_540-600-640-740	-0.2107	-0.2021	-2.0944	2.0973	0.0694

Πίνακας12. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 4 μπαντών για το πλακίδιο. 121588.2.B.31 (πλακίδιο3).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	-0.0037	2.0251	1.2646	-1.7982	-1.2621
20 bands_460-580-620-740	-0.2483	3.9474	-7.0192	5.7241	-2.1159
20 bands_480-500-640-740	-0.3833	-5.3812	-4.8267	-0.9954	11.2351
20 bands_480-520-580-740	-0.0256	4.0702	0.7043	-0.2282	-3.8592
20 bands_480-520-600-700	-0.6047	3.7037	-2.9115	-0.5244	0.1697
20 bands_480-540-600-740	-0.0797	1.0230	1.9316	5.6460	-7.9628
20 bands_480-540-620-700	-0.6051	-0.7015	-0.5236	7.4258	-5.8876
20 bands_480-560-600-680	-0.6723	4.6090	1.7153	8.0140	-13.5217

20 bands_480-560-640-700	-0.9455	2.5710	0.1516	4.1983	-6.0809
20 bands_480-580-640-740	-1.0428	1.4196	1.5064	-4.6222	2.6969
20 bands_480-580-700-800	-1.1126	9.4078	-4.0530	-16.2983	12.0127
20 bands_480-600-640-740	-1.2839	1.0259	-5.0061	1.5314	3.8143
20 bands_480-600-640-800	-1.2726	2.0526	-5.8853	-3.7944	8.9813
20 bands_500-520-640-740	-0.2859	-3.0308	1.4519	0.2912	1.4059
20 bands_500-540-580-700	-0.3445	6.2590	0.3739	-7.8834	1.4893
20 bands_500-540-620-740	-0.1710	-3.6110	0.4943	4.7464	-1.5006
20 bands_500-580-640-700	-1.2268	5.7433	-4.7177	-8.6167	8.7744
20 bands_500-580-640-740	-0.7847	2.8913	-1.6246	-13.0289	12.5045
20 bands_520-580-640-740	-0.3773	1.5066	1.1825	0.9527	-3.3068
20 bands_520-580-700-740	-0.3292	4.2958	1.5287	-5.4665	-0.0722
20 bands_540-580-620-740	-0.1768	-1.5213	1.2206	9.5530	-8.7874
20 bands_540-600-640-740	-0.3493	-0.8393	3.9560	4.3243	-7.0101

Πίνακας13. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122108.2.17 (πλακίδιο4).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	-0.1863	4.8280	-2.0520	-6.9445	4.4530
20 bands_460-580-620-740	-0.2233	3.1996	-6.4638	1.5374	2.2574
20 bands_480-500-640-740	-0.5849	1.2386	-0.8408	-3.8046	3.7598

20 bands_480-520-580-740	0.0066	1.0184	1.2055	-4.6513	3.1640
20 bands_480-520-600-700	-0.5061	5.1382	-3.8620	-3.4483	2.5069
20 bands_480-540-600-740	-0.2341	2.1905	0.1967	-0.9766	-0.6002
20 bands_480-540-620-700	-0.9389	0.8384	-3.1077	1.5160	1.3345
20 bands_480-560-600-680	-0.7261	2.7797	1.1631	-0.7407	-2.3147
20 bands_480-560-640-700	-1.1266	4.4004	-2.4760	-0.9242	0.0172
20 bands_480-580-640-740	-1.2651	3.3857	2.2845	-5.5634	0.9883
20 bands_480-580-700-800	-1.2075	7.7084	-1.9549	-8.9524	4.2355
20 bands_480-600-640-740	-1.3952	4.4367	-5.5564	1.2954	1.0488
20 bands_480-600-640-800	-1.3485	5.5795	-4.3599	1.6538	-1.6957
20 bands_500-520-640-740	-0.1687	2.3684	2.1943	-8.6801	4.3013
20 bands_500-540-580-700	-0.2446	6.8483	-0.9176	-16.4660	10.6084
20 bands_500-540-620-740	0.1749	-2.1593	2.1998	-4.8868	4.7308
20 bands_500-580-640-700	-1.0996	7.0289	-5.1959	-14.7149	13.8105
20 bands_500-580-640-740	-0.8195	5.4975	-0.8212	-17.3596	13.3324
20 bands_520-580-640-740	-0.1215	3.7624	1.0929	-7.9964	3.2778
20 bands_520-580-700-740	-0.0906	4.4758	0.5977	-10.2191	5.1891
20 bands_540-580-620-740	-0.0011	-0.1826	0.3856	-1.6472	1.7528
20 bands_540-600-640-740	-0.4587	4.0130	2.6670	-7.0610	0.6688

Πίνακας14. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.25 (πλακίδιο5).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	-0.4905	-0.6405	-0.1074	-0.2789	1.7656
20 bands_460-580-620-740	-1.6715	0.2370	-0.2476	2.3316	-0.3587
20 bands_480-500-640-740	-1.7614	-2.8679	-0.0648	-3.5519	7.7688
20 bands_480-520-580-740	-0.1002	-0.7511	1.5230	0.9552	-1.0456
20 bands_480-520-600-700	-0.0691	-0.1246	-4.7384	-0.2481	4.9296
20 bands_480-540-600-740	-0.1471	-0.5905	1.6793	-2.5543	2.0270
20 bands_480-540-620-700	-0.0251	-1.6144	-4.5563	4.6170	1.2042
20 bands_480-560-600-680	-0.0570	-1.1189	0.2907	4.4741	-3.5901
20 bands_480-560-640-700	-1.3915	-0.6543	-1.1083	5.5762	-2.7149
20 bands_480-580-640-740	-1.6712	-1.3464	2.5273	-2.9418	3.0165
20 bands_480-580-700-800	-0.4203	-1.9518	-0.1812	0.5523	1.7509
20 bands_480-600-640-740	-2.5316	-0.6973	1.1613	-2.6668	4.3181
20 bands_480-600-640-800	-2.0066	-0.8520	-2.8928	0.4825	4.8526
20 bands_500-520-640-740	-0.2916	-2.9077	-0.6764	-2.3729	5.8939
20 bands_500-540-580-700	1.0040	-0.2288	-2.8708	-0.0922	1.9376
20 bands_500-540-620-740	1.6446	-3.7621	-2.3652	1.1627	3.3633
20 bands_500-580-640-700	-0.4543	0.1743	-5.0898	0.5134	4.4400
20 bands_500-580-640-740	-0.3373	-0.7217	-0.5878	-6.1486	7.3796
20 bands_520-580-640-740	0.9324	-0.7247	-1.3167	-0.3474	1.1023
20 bands_520-580-700-740	1.3006	-0.2210	-1.0210	-1.3692	1.1222
20 bands_540-580-620-740	1.6573	-1.6071	-1.7088	6.4272	-4.4777

20 bands_540-600-640-740	0.2860	-1.0779	-0.7695	1.3857	-0.2406
--------------------------	--------	---------	---------	--------	---------

Πίνακας15. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.26 (πλακίδιο 6).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	0.1351	-0.0885	-7.3280	5.7782	2.0014
20 bands_460-580-620-740	-0.7568	0.0536	-2.1864	4.1276	-0.7612
20 bands_480-500-640-740	-4.7515	-1.2286	-0.2146	3.7957	2.2347
20 bands_480-520-580-740	-3.1029	-0.0724	6.4939	-3.6479	0.8286
20 bands_480-520-600-700	-0.3333	-0.3693	-1.9884	0.4923	2.2182
20 bands_480-540-600-740	-3.9392	-0.2608	4.8971	-0.9597	0.7604
20 bands_480-540-620-700	-0.9827	-0.9508	-1.8968	2.6219	1.0414
20 bands_480-560-600-680	2.5693	-0.0465	4.7967	-6.0342	-1.0997
20 bands_480-560-640-700	-4.2926	-0.3612	1.9144	2.7801	-0.0211
20 bands_480-580-640-740	-1.4170	-0.8511	3.0203	-1.7636	0.8449
20 bands_480-580-700-800	4.0048	-12.3069	6.8547	0.7308	0.5514
20 bands_480-600-640-740	-4.3789	-0.6483	0.3181	2.9936	1.5487
20 bands_480-600-640-800	-3.8816	-0.5036	1.8723	0.9077	1.4395
20 bands_500-520-640-740	-2.1307	-1.0337	-3.4096	4.6409	1.7691
20 bands_500-540-580-700	1.5410	-0.1970	-1.7638	-1.1743	1.4896
20 bands_500-540-620-740	5.3706	-1.1414	-12.2005	7.0861	1.2382

20 bands_500-580-640-700	2.5519	-0.1020	-11.4243	7.0543	1.8160
20 bands_500-580-640-740	4.2223	-0.8384	-8.0635	2.9976	1.5179
20 bands_520-580-640-740	10.0807	-0.6393	-10.0205	-0.4886	0.9012
20 bands_520-580-700-740	2.7070	-0.3757	-3.9352	0.1715	1.2658
20 bands_540-580-620-740	12.1247	-0.4378	-15.1333	4.5943	-0.6710
20 bands_540-600-640-740	6.7885	-0.7448	-12.2495	5.5097	0.5293

Πίνακας με τα ποσοστά διαφορές των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 124358.2.27 (πλακίδιο 7).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	1.8876	-0.0499	-4.5866	-4.8132	7.8889
20 bands_460-580-620-740	0.2570	-0.3381	-1.8077	2.9962	-0.6544
20 bands_480-500-640-740	-2.0275	-1.5254	-0.6609	-2.5971	6.4956
20 bands_480-520-580-740	-0.8053	-0.1470	2.1420	-1.4828	1.0360
20 bands_480-520-600-700	-0.0592	-0.0416	-3.9087	-1.0452	4.9667
20 bands_480-540-600-740	-0.9735	-0.3039	2.0173	-1.6185	1.4551
20 bands_480-540-620-700	-0.5089	-1.4620	-1.8186	2.8122	0.7654
20 bands_480-560-600-680	0.6328	0.1420	0.2121	1.9828	-2.8085
20 bands_480-560-640-700	-2.3530	0.1387	-2.4547	5.8436	-1.3667
20 bands_480-580-640-740	-1.9771	-0.2116	1.7972	-3.0468	3.1846
20 bands_480-580-700-800	0.0464	-4.4988	1.8110	-0.6974	3.2511
20 bands_480-600-640-740	-2.3373	-0.0462	0.0970	-0.9605	2.9928

20 bands_480-600-640-800	-1.8686	0.2934	-0.7223	-1.2511	3.2944
20 bands_500-520-640-740	-1.2195	-1.4416	-1.2929	-2.7700	6.5311
20 bands_500-540-580-700	1.3234	0.0876	-4.2745	-0.3111	3.0856
20 bands_500-540-620-740	2.4128	-2.2776	-5.5751	0.2433	5.2363
20 bands_500-580-640-700	0.4244	0.6733	-7.1823	2.1634	3.6672
20 bands_500-580-640-740	0.6712	-0.0112	-3.3209	-4.9655	7.3724
20 bands_520-580-640-740	2.7637	-0.0020	-3.8579	-2.9396	3.8436
20 bands_520-580-700-740	1.9202	0.0090	-3.0194	-2.0346	3.0989
20 bands_540-580-620-740	3.6535	-0.6561	-5.6097	3.0240	0.0415
20 bands_540-600-640-740	1.2048	-0.2888	-3.3507	-0.3483	2.5286

Πίνακας16. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 124358.2.20 (πλακίδιο 8).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_460-540-600-760	-0.3539	3.0200	-2.3676	-3.9863	3.8742
20 bands_460-580-620-740	-0.3060	-0.2474	-2.4636	1.1634	2.0829
20 bands_480-500-640-740	-0.2590	-0.6755	1.1011	-3.2517	2.9596
20 bands_480-520-580-740	0.0428	-2.4321	3.0461	-1.2212	1.3529
20 bands_480-520-600-700	-0.4402	3.5521	-0.8675	-2.2803	-0.1520
20 bands_480-540-600-740	-0.1065	0.7301	1.3840	-1.7365	0.2892
20 bands_480-540-620-700	-0.8820	2.9687	-1.7683	0.4693	-1.2239
20 bands_480-560-600-680	-0.6963	1.4561	2.5514	-2.5300	-0.7191

20 bands_480-560-640-700	-1.0677	3.6574	-0.8107	-0.5099	-1.4569
20 bands_480-580-640-740	-1.0171	0.4110	2.3943	-4.1327	2.2192
20 bands_480-580-700-800	-1.0052	4.9996	-0.7043	-7.4429	3.9030
20 bands_480-600-640-740	-1.2046	2.1120	-2.7276	-0.7824	2.4153
20 bands_480-600-640-800	-1.2212	2.8403	-3.2188	-1.4494	2.7999
20 bands_500-520-640-740	-0.3132	0.3056	3.6914	-4.6695	0.8606
20 bands_500-540-580-700	-0.3432	3.9840	0.8866	-10.5152	5.7380
20 bands_500-540-620-740	0.0560	-1.0555	2.1842	-3.4463	2.2432
20 bands_500-580-640-700	-0.8954	4.7196	-2.0049	-11.1266	9.0575
20 bands_500-580-640-740	-0.6132	2.3540	0.6947	-13.4131	10.7284
20 bands_520-580-640-740	-0.2538	0.0891	3.4462	-4.5987	1.1921
20 bands_520-580-700-740	-0.2746	2.6649	3.2642	-8.7804	2.9382
20 bands_540-580-620-740	-0.0313	-0.8054	1.5188	-2.1266	1.6737
20 bands_540-600-640-740	-0.6225	2.4268	2.9368	-5.2935	0.3649

Πίνακας 17. Ποσοστά διαφορές των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο. 122182.2.21 (πλακίδιο 9).

▪ BHMA 9^ο

Παρακάτω παραθέτουμε για το κάθε πλακίδιο τον πίνακα που δείχνει τα ποσοστά απόκλισης (διαφορές) του αριθμού των pixels κάθε κλάσης με τα αντίστοιχα του SAM 20 προς τα συνολικά pixels της εικόνας.

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφορές 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφορές 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφορές 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφορές 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφορές 20 bands-3 bands για white
-----------------------	---	--	--	--	---

20 bands_480-580-700	1.1797	-4.8451	-4.9875	7.4782	1.1753
20 bands_480-580-740	1.6112	-6.0993	-2.5942	8.9080	-1.2447
20 bands_480-600-700	0.8485	0.3683	-3.5322	1.2013	1.1143
20 bands_480-600-740	1.1922	-0.0133	-0.1132	0.3686	-0.9368
20 bands_480-640-700	0.4453	0.0901	-2.7618	-0.3339	2.2289
20 bands_480-640-720	-0.6256	-0.1461	2.3859	-7.5507	5.6046
20 bands_480-640-800	-0.9690	-0.5743	2.4279	-2.2548	1.0380
20 bands_500-580-700	1.4147	-1.5677	-5.7846	0.0315	5.7177
20 bands_500-600-700	1.3105	-0.1212	-5.5347	-7.8942	12.0511
20 bands_500-600-740	1.1371	-0.0289	-0.8787	-10.9542	10.5390
20 bands_500-620-740	1.4241	-0.6795	-3.6517	-7.0993	9.8208
20 bands_520-580-700	1.4124	-0.5776	-6.1006	1.2517	4.0127
20 bands_520-580-740	1.0330	-1.6645	-3.3331	3.1721	0.8741
20 bands_520-600-700	1.8773	0.4491	-4.5841	-1.8678	4.1240
20 bands_540-580-700	1.6109	-2.0316	-3.4546	1.3443	2.5299
20 bands_540-600-740	2.2359	-0.0519	-0.1957	-3.5082	1.6847
20 bands_560-600-680	2.0045	0.3830	-4.5713	3.6053	-1.2772
20 bands_640-720-800	-4.6108	-0.8512	-0.3915	-0.5730	6.1561

Πίνακας18. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.32 (πλακίδιο 2).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	2.5030	-6.8837	-9.3235	14.7340	-1.1208
20 bands_480-580-740	3.0421	-6.8121	-8.2726	15.2076	-2.4258
20 bands_480-600-700	0.5236	0.2780	0.4272	0.3768	-1.6970
20 bands_480-600-740	0.3672	0.0546	2.3811	-1.5707	-0.6595
20 bands_480-640-700	0.0920	-0.2185	-3.3624	3.6635	-0.5145
20 bands_480-640-720	-1.3135	-0.3841	1.9306	-0.8056	0.2327
20 bands_480-640-800	-0.8779	-0.8665	1.4629	-0.3927	0.3343
20 bands_500-580-700	2.6295	-3.2233	-11.9002	9.9938	2.2827
20 bands_500-600-700	1.8346	-0.3516	-8.2057	4.8668	1.6384
20 bands_500-600-740	0.3347	-0.2699	-0.9728	-0.6589	1.4364
20 bands_500-620-740	1.4382	-0.8372	-7.5477	5.5822	1.2341
20 bands_520-580-700	1.4875	-0.3902	-12.6208	9.8259	1.6062
20 bands_520-580-740	1.6468	-0.7917	-10.2383	10.6303	-1.0894
20 bands_520-600-700	2.2012	-0.0165	-7.4881	3.4552	1.7565
20 bands_540-580-700	2.0283	-1.4309	-9.0242	9.1409	-0.8054
20 bands_540-600-740	2.3203	-0.0964	-0.9049	-0.6931	-0.3024
20 bands_560-600-680	1.8500	-0.1380	-11.9523	16.7252	-6.4104
20 bands_640-720-800	-6.4070	-0.9167	0.5413	22.7489	-16.2447

Πίνακας19. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 121588.2.B.31 (πλακίδιο 3).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	-1.1226	9.0106	-5.3049	-6.5746	3.6388
20 bands_480-580-740	-0.1735	6.6143	-1.7672	-7.2818	3.0841
20 bands_480-600-700	-1.2440	4.3272	-11.3380	-0.0710	7.9730
20 bands_480-600-740	-0.5724	2.1635	-3.6821	0.7972	1.6044
20 bands_480-640-700	-1.2348	0.7589	-11.2589	1.6156	9.7663
20 bands_480-640-720	-1.3534	-0.5769	-2.6021	-4.4164	8.5972
20 bands_480-640-800	-1.2319	-3.4182	-4.0882	-2.6964	11.0832
20 bands_500-580-700	-1.0071	7.5049	-1.3045	-13.7928	7.9948
20 bands_500-600-700	-0.9999	4.3877	-6.1713	-13.8499	16.0289
20 bands_500-600-740	-0.7958	1.5610	-0.6833	-15.3410	14.9053
20 bands_500-620-740	-0.7066	-1.1233	-8.3832	-2.6177	12.4766
20 bands_520-580-700	-0.3592	5.9455	-0.3059	-7.5797	2.1312
20 bands_520-580-740	-0.0440	3.2868	2.2970	-1.1387	-4.2376
20 bands_520-600-700	-0.3532	3.7453	-2.4338	-0.8505	-0.2758
20 bands_540-580-700	-0.3091	5.4207	2.2808	-5.9093	-1.5890
20 bands_540-600-740	-0.1103	0.0690	3.3682	4.4744	-7.6585
20 bands_560-600-680	-0.4334	2.2899	3.9806	8.9884	-14.6819
20 bands_640-720-800	-5.1270	1.0901	-10.3430	-10.8128	25.2743

Πίνακας 20. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122108.2.17 (πλακίδιο 4).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	-1.2432	9.1472	-8.3779	-5.4446	5.6857
20 bands_480-580-740	-0.2348	1.4235	0.0269	-0.9529	0.4183
20 bands_480-600-700	-1.3424	5.4832	-5.8405	0.9912	0.4755
20 bands_480-600-740	-0.5467	2.9031	-2.1013	1.2591	-0.9996
20 bands_480-640-700	-1.3155	4.0249	-7.8119	-0.2060	5.0759
20 bands_480-640-720	-1.4320	0.2258	-3.7826	-6.1021	10.8586
20 bands_480-640-800	-1.3095	3.5478	-1.7240	0.9414	-1.6878
20 bands_500-580-700	-0.8994	7.7928	-2.1646	-18.4832	13.3957
20 bands_500-600-700	-0.9852	5.6048	-4.7416	-17.5076	17.2707
20 bands_500-600-740	-0.6719	3.8483	-0.6142	-16.7311	14.1448
20 bands_500-620-740	-0.5802	1.1023	-3.8524	-10.2584	13.5646
20 bands_520-580-700	-0.1828	6.9021	-0.4183	-13.5390	7.0669
20 bands_520-580-740	0.0356	2.1938	2.6089	-7.4025	2.6428
20 bands_520-600-700	-0.3579	6.3008	-2.8496	-7.1799	3.9154
20 bands_540-580-700	-0.3080	7.6103	-0.4258	-14.5182	7.4703
20 bands_540-600-740	0.0556	3.6817	1.8729	-6.3372	0.9709
20 bands_560-600-680	-0.4527	3.9406	1.7366	-2.2971	-2.7661

20 bands_640-720-800	-3.5958	-3.7769	-5.6370	-4.9595	17.8605
----------------------	---------	---------	---------	---------	---------

Πίνακας21 Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.25 (πλακίδιο 5).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	-0.2295	-2.2902	0.4472	1.2738	0.4867
20 bands_480-580-740	0.1645	-3.7548	4.3653	-0.7576	0.5020
20 bands_480-600-700	-1.5725	0.1214	-1.5273	-1.2432	3.9094
20 bands_480-600-740	-1.4854	-0.5565	2.5134	-3.6154	3.4966
20 bands_480-640-700	-1.6156	-0.8015	-5.6462	1.4253	6.1601
20 bands_480-640-720	-2.4402	-1.4383	-1.5445	-4.5106	9.4559
20 bands_480-640-800	-1.7012	-2.6031	-1.8215	0.9959	4.6527
20 bands_500-580-700	0.2829	-0.3121	-3.3080	-0.3891	3.3508
20 bands_500-600-700	0.0274	-0.2548	-5.1097	-5.6972	10.6588
20 bands_500-600-740	-0.1758	-0.3321	0.6846	-10.2841	9.9837
20 bands_500-620-740	0.3310	-2.5700	-6.9414	-0.8286	9.8858
20 bands_520-580-700	1.2040	0.1191	-3.8460	-0.3865	2.6587
20 bands_520-580-740	1.1341	-0.4876	0.3021	1.2315	-2.0982
20 bands_520-600-700	1.6452	0.1021	-4.5427	-0.7461	3.2907
20 bands_540-580-700	1.1177	-0.2963	-0.6201	2.1267	-2.5782
20 bands_540-600-740	1.9263	-0.7640	0.7682	-0.8796	-0.8857

20 bands_560-600-680	1.2547	-1.1036	-3.9729	11.7656	-7.9450
20 bands_640-720-800	-11.3834	-2.0571	-1.0769	14.2376	-0.0744

Πίνακας22. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.26 (πλακίδιο 6).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	4.8570	-12.7992	9.0990	-1.9222	0.6610
20 bands_480-580-740	1.1758	-8.7365	9.2410	-1.2775	0.0965
20 bands_480-600-700	-2.8049	0.0052	5.3398	-4.2409	1.6585
20 bands_480-600-740	-4.7462	-0.2292	6.1448	-1.8082	1.1367
20 bands_480-640-700	-3.5693	-0.4071	-3.2585	5.1734	2.0197
20 bands_480-640-720	-4.9486	-34.3252	3.9329	-1.6973	3.5200
20 bands_480-640-800	-4.6937	-1.1242	2.8330	1.4655	1.3542
20 bands_500-580-700	0.2145	-29.1621	-4.3434	2.5734	1.4469
20 bands_500-600-700	0.9231	-0.2796	-16.3022	12.1593	3.3316
20 bands_500-600-740	-2.4619	-0.3366	-3.1971	3.3496	2.8126
20 bands_500-620-740	0.7989	-0.8063	-10.3172	7.8120	2.8651
20 bands_520-580-700	-0.5742	-0.1745	-1.2695	0.2444	1.6695
20 bands_520-580-740	-1.4958	0.0069	-0.3143	1.5585	0.2444
20 bands_520-600-700	9.2844	-0.4349	-21.0396	9.9732	2.2364
20 bands_540-580-700	4.4579	-0.2520	-4.2796	-0.3964	0.3656

20 bands_540-600-740	8.1378	-0.3633	-9.2908	1.4074	0.2742
20 bands_560-600-680	12.7889	-0.2483	-25.0804	16.3778	-3.6523
20 bands_640-720-800	-7.8181	-1.0864	-0.7027	27.4799	-18.0379

Πίνακας23. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 124358.2.27 (πλακίδιο 7).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	0.2942	-4.9582	2.1119	1.9372	0.4653
20 bands_480-580-740	0.6086	-5.0405	4.2209	1.5785	-0.6864
20 bands_480-600-700	-1.1926	0.3448	-2.3202	0.9790	2.0391
20 bands_480-600-740	-1.2274	-0.1894	1.4079	-2.1313	2.6550
20 bands_480-640-700	-1.6328	0.0468	-5.5067	3.6431	3.1342
20 bands_480-640-720	-2.4032	-11.4968	-2.3345	-4.0214	9.3865
20 bands_480-640-800	-2.2396	-0.4074	0.6076	-2.0650	3.7889
20 bands_500-580-700	0.8937	-8.1999	-4.6741	0.1531	3.3417
20 bands_500-600-700	1.1246	-0.0232	-7.0543	-3.3712	9.1105
20 bands_500-600-740	0.6201	0.1891	-2.0291	-9.3281	10.5037
20 bands_500-620-740	1.0518	-1.5551	-7.3783	-2.9539	10.7918
20 bands_520-580-700	1.7284	0.2622	-4.6475	-1.7144	4.2827
20 bands_520-580-740	1.5356	0.1698	-1.2809	-0.6343	0.3705
20 bands_520-600-700	2.9011	0.0957	-7.0183	-1.1984	5.1313

20 bands_540-580-700	2.0322	-0.1229	-2.6683	0.9273	-0.2573
20 bands_540-600-740	3.5752	-0.3289	-2.8725	-2.2255	2.0120
20 bands_560-600-680	3.7744	0.1020	-7.2801	9.1151	-5.5503
20 bands_640-720-800	-6.7238	-2.5437	-0.7686	8.5212	1.3227

Πίνακας24. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 124358.2.20 (πλακίδιο 8).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	-1.0722	5.4858	-4.3881	-4.0409	3.7657
20 bands_480-580-740	0.0574	-1.1974	0.8956	-0.7559	1.6648
20 bands_480-600-700	-1.1244	3.9479	-1.6240	-0.7107	-0.6766
20 bands_480-600-740	-0.3291	1.1458	-0.2399	-1.1025	1.0859
20 bands_480-640-700	-1.1396	3.4641	-4.0559	-1.0174	2.5611
20 bands_480-640-720	-1.1855	-1.8988	-2.5963	-6.3301	11.8232
20 bands_480-640-800	-1.1925	0.3955	-1.1187	-0.7752	2.4420
20 bands_500-580-700	-0.6182	4.3996	-0.2107	-12.8922	8.8842
20 bands_500-600-700	-0.7027	3.9988	-1.8239	-12.5045	10.5951
20 bands_500-600-740	-0.5941	2.2910	0.3170	-12.4088	10.2092
20 bands_500-620-740	-0.4244	0.8732	-2.7150	-7.1673	9.2483
20 bands_520-580-700	-0.3371	3.6672	1.8496	-9.3356	3.9061
20 bands_520-580-740	0.0415	-1.9318	4.1388	-3.2041	1.0391
20 bands_520-600-700	-0.2916	4.7158	-0.6169	-4.7298	0.7347
20 bands_540-580-700	-0.4795	4.2491	1.8299	-10.4833	4.6340

20 bands_540-600-740	-0.1645	2.3464	2.1387	-4.5761	0.4836
20 bands_560-600-680	-0.5068	3.0068	2.5144	-3.3128	-1.6395
20 bands_640-720-800	-5.0368	-3.4010	-5.0493	-9.1077	22.3456

Πίνακας 25. Ποσοστά διαφοράς των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 122182.2.21 (πλακίδιο 9).

Συνδυασμός μπαντών	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για red	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για blue	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για purple	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για orange	Ποσοστό διαφοράς 20 bands-3 bands για white
20 bands_480-580-700	-1.6691	14.2594	-5.3795	-7.8249	0.0782
20 bands_480-580-740	-1.3212	1.6594	-1.3994	-0.0029	1.1084
20 bands_480-600-700	-1.5864	-3.8374	10.6470	1.6556	-7.4148
20 bands_480-600-740	-1.2831	-13.5446	11.1222	1.5415	2.0420
20 bands_480-640-700	-1.3717	-0.4998	6.9527	0.9374	-6.5573
20 bands_480-640-720	-0.9963	-12.2111	7.6210	-0.6548	5.7026
20 bands_480-640-800	-1.3904	-2.4578	7.5643	1.1817	-5.4364
20 bands_500-580-700	-1.8744	7.3162	5.6535	-18.5641	6.6821
20 bands_500-600-700	-1.8845	-2.5994	6.5130	-11.7878	8.9720
20 bands_500-600-740	-1.7371	-8.2076	7.7162	-5.3132	7.1688
20 bands_500-620-740	-1.2421	-10.8428	8.6116	-1.7648	5.0308
20 bands_520-580-700	-1.5481	8.8823	4.3835	-13.6676	1.5362
20 bands_520-580-740	-1.3417	6.4352	0.0429	-7.4849	2.5144
20 bands_520-600-700	-1.9610	0.1502	6.9611	-3.0689	-2.4950

20 bands_540-580-700	-1.3417	6.4352	0.0429	-7.4849	2.5144
20 bands_540-600-740	-1.8382	-7.8190	9.9022	-4.1748	3.9295
20 bands_560-600-680	-1.3889	-0.8788	10.4913	-1.2438	-7.0422
20 bands_640-720-800	-1.7860	-17.1594	0.5760	-9.2522	27.2688

Πίνακας 26. Ποσοστά διαφορές των pixels για κάθε χρώμα μεταξύ του SAM 20 μπαντών και 3 μπαντών για το πλακίδιο 123493.18.1 (πλακίδιο 10).

▪ ΒΗΜΑ 10^ο

Σε αυτό το βήμα παρουσιάζονται τα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ των 20 και 3 μπαντών σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς:

3 μπάντες (nm)	Πλακίδιο 11 ^ο (Φως 1)	Πλακίδιο 11 ^ο (Φως 2)	Πλακίδιο 11 ^ο (Φως 3)	Πλακίδιο 11 ^ο (Φως 4)	Πλακίδιο 11 ^ο (Φως 5)
480-580-700	54.9166	49.1926	47.1163	43.6017	43.8310
480-580-740	58.2989	53.0684	49.1757	43.9395	44.9143
480-600-700	65.3524	61.3565	58.1303	58.8099	60.0302
480-600-740	64.5413	62.3990	60.3731	59.5888	60.2038
480-640-700	62.6952	59.8956	53.3281	57.7074	60.7685
480-640-720	59.9945	59.5829	54.1233	58.4353	60.6211
480-640-800	65.3998	61.0973	56.4273	60.0659	63.1706
500-580-700	52.4047	49.4887	46.7113	48.5379	46.7586
500-600-700	54.3720	54.5242	51.6717	56.3617	55.1508
500-600-740	61.6558	58.3846	56.0889	60.1199	58.3224
500-620-740	61.4344	69.7883	68.7039	67.6097	66.4237
520-580-700	58.4722	51.6633	47.5018	50.1208	49.6173
520-580-740	60.9087	53.2099	48.4057	51.7460	50.5525
520-600-700	65.5693	61.0407	56.2180	60.2599	60.6826
540-580-700	53.5017	47.4304	46.0383	45.1974	47.0371
540-600-740	76.3213	60.2278	56.8114	53.8399	54.4008
560-600-680	62.6434	54.1588	51.0560	50.6484	45.2515
640-720-800	40.4732	46.1582	44.0811	48.7388	49.2475

Πλακίδιο 27. 123493.20 σε διάφορες συνθήκες φωτισμού χρησιμοποιώντας όλα τα φάσματα αναφοράς.

