

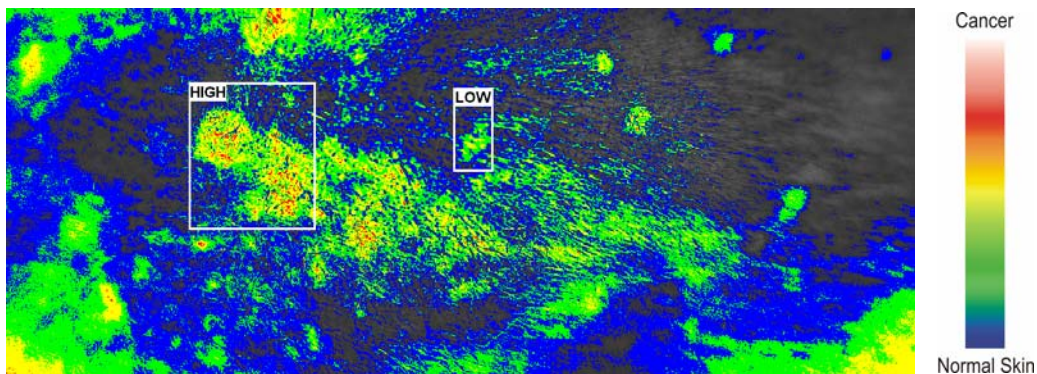
ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ & ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ



Μεταπτυχιακή Διατριβή

‘Υπερφασματική Απεικόνιση για τη Διάγνωση του
Καρκίνου του Δέρματος σε Πειραματόζωα’



Τερζάκης Εμμανουήλ

Εξεταστική Επιτροπή : Μπάλας Κωνσταντίνος (Επιβλέπων)
Καλαϊτζάκης Κωνσταντίνος
Ζερβάκης Μιχαήλ

Χανιά, Οκτώβριος 2007

...στην οικογένεια μου

Ευχαριστίες

Κατά την ενασχόληση μου με την απεικονιστική φασματοσκοπία και τις εφαρμογές της στην ιατρική, μια νέα «εκκολαπτόμενη» τεχνολογία, παρουσιάστηκαν διάφορες δυσκολίες, οι οποίες δεν θα είχαν επιλυθεί χωρίς την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια κάποιων ανθρώπων που νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω.

Για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής, αλλά και για την ανάθεση του θέματος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μπάλα ο οποίος με την κατάλληλη επίβλεψη και συμπαράσταση, διευκόλυνε το έργο μου.

Επίσης, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον βιολόγο και καθηγητή του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων (Μ.Α.Ι.Χ), κ. Αντώνιο Μακρή, καθώς και τον καθηγητή Φυσικής, κ. Εμμανουήλ Παπαδάκη με τους οποίους συνεργάστηκα, για την ανάπτυξη και την μελέτη, του βιολογικού μοντέλου που ερεύνησα, στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, θα πρέπει επίσης να απευθύνω, στον μετά – διδακτορικό ερευνητή του τμήματος Ηλεκτρονικών Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Πολυτεχνείου Κρήτης, κ. Εμμανουήλ Παπαγιαννάκη, του οποίου οι κατευθυντήριες συμβουλές για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, ήταν απαραίτητες και εξαιρετικά χρήσιμες για την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου.

Τέλος, πολύ σημαντικές ήταν οι συμβουλές, η βοήθεια και η συμπαράσταση, των μεταπτυχιακών συναδέλφων, Τσάπρα Αθανάσιου, Παπουτσόγλου Γεώργιου,

Ποτηράκη Αντώνιου και Μανίκη Γεώργιου, μερικοί εκ των οποίων, είναι μέλη του “Ερευνητικού Εργαστηρίου Οπτοηλεκτρονικής και Μικροηλεκτρονικής” του Πολυτεχνείου Κρήτης, τους οποίους ευχαριστώ και τους εύχομαι καλή συνέχεια στις σπουδές τους.

Όσον αφορά την οικογένεια μου, και τους ανθρώπους που νοιώθω δίπλα μου, τα αισθήματά μου και οι ευχαριστίες μου προς αυτούς, είναι αδύνατο να εκφραστούν, μέσα σε λίγες γραμμές κειμένου...

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	1
Περιεχόμενα	3
Εισαγωγή	5
Μακροσκοπική Δομή του Δέρματος	8
2.1 Ανατομία του Δέρματος	8
2.1.1 Επιδερμίδα - Στρώματα Επιδερμίδας	9
2.1.1.1 Βασική Στιβάδα	9
2.1.1.2 Μαλπιγιανή ή Ακανθωτή Στιβάδα	10
2.1.1.3 Κοκκώδης Στιβάδα	10
2.1.1.4 Κερατίνη Στιβάδα	10
2.1.2 Κυτταρικά Συστατικά Επιδερμίδας	11
2.1.2.1 Κερατινοκύτταρα (Keratinocytes)	11
2.1.2.2 Μελανοκύτταρα	11
2.1.2.3 Κύτταρα του Langerhans	14
2.1.3 Χόριο	14
2.1.3.1 Στρώματα του Χορίου - Βασική Μembrάνη	14
2.1.3.2 Συστατικά του Χορίου	15
2.2 Καλοήθεις Νεοπλασίες (Σπίλοι)	16
2.2.1 Σύνθετοι – Μεικτοί Σπίλοι (Compound Nevus)	16
2.2.2 Δυσπλαστικοί ή Άτυποι Σπίλοι (Dysplastic Nevus)	20
2.2.6.1 Ιστολογικά Κριτήρια για Διάγνωση Δυσπλαστικών Σπίλων	26
2.3 Κακοήθεις Νεοπλασίες – Μελάνωμα	28
2.3.1 Αιτιολογία – Παθογένεση	28
2.3.2 Τρόπος Ανάπτυξης Μελανώματος – Μορφολογία	30
2.3.3 Πρόγνωση Μελανώματος με Βάση την Ιστοπαθολογία της Βλάβης	31
Αλληλεπίδραση Ακτινοβολίας με Ύλη και Αρχές Φασματοσκοπίας	34
3.1 Αλληλεπίδραση Ακτινοβολίας με Ύλη	35
3.1.1 Απορρόφηση	36
3.1.2 Εκπομπή	37
3.1.3 Σκέδαση	38
3.1.3.1 Σκέδαση Rayleigh	40
3.1.3.2 Σκέδαση Raman	41
3.2 Φασματοσκοπία	41

3.2.1	Φασματοσκοπία Απορρόφησης-----	42
3.2.2	Φασματοσκοπία Εκπομπής-----	44
3.2.3	Φασματοσκοπία Σκέδασης -----	45
3.3	Μέθοδοι Φασματοσκοπίας -----	45
3.3.1	Πολυφασματική και Υπερφασματική Απεικόνιση -----	46
Πειραματική Διαδικασία-----		50
4.1	Ανάπτυξη και Μελέτη Μελανώματος σε Ποντίκια -----	50
4.1.1	Προηγούμενες Μελέτες-----	53
4.1.2	Ανάλυση Βιολογικού Μοντέλου της Συγκεκριμένης Διατριβής -----	55
4.2	Σύστημα Υπερφασματικής Απεικόνισης (HySI) -----	59
4.3	Μεθοδολογία -----	62
Ανάλυση Μετρήσεων -----		72
5.1	Αναγνώριση Προτύπων (Pattern Recognition) -----	75
5.1.1	Data Clustering-----	77
5.1.1.1	k-means Algorithm-----	79
5.1.1.2	Hierarchical Algorithm-----	80
5.1.2	Data Segmentation-----	81
5.1.3	Spectral Angle Mapper-----	83
5.2	Texture Analysis -----	87
5.2.1	Statistical Method of Texture Analysis -----	89
Αποτελέσματα -----		94
Προβλήματα – Συμπεράσματα – Εξέλιξη-----		99
Αναφορές -----		103

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εισαγωγή

Το μελάνωμα είναι μία κακοήθης μετάλλαξη των κυττάρων, τα οποία παράγουν τις χρωστικές ουσίες στον οργανισμό και ονομάζονται μελανοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά, παρουσιάζονται συνήθως στο δέρμα, και προέρχονται από τη διαφοροποίηση των προγεννητικών κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου.

Το κακοήθες μελάνωμα του δέρματος, υπολογίζεται ότι ευθύνεται για περίπου 160.000 νέα περιστατικά καρκίνου, κάθε χρόνο [1]. Είναι ένας όγκος, ο οποίος σχετίζεται απόλυτα και επηρεάζεται από το χρώμα του δέρματος, ενώ παρουσιάζεται συχνά σε πληθυσμούς λευκών ανθρώπων που ζουν σε ιδιαίτερα ηλιόλουστα κλίματα. Ο πιο σημαντικός περιβαλλοντολογικός παράγοντας, που επηρεάζει την ανάπτυξη μελανωμάτων, είναι η έκθεση στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία (UV solar radiation). Σύμφωνα δε με στατιστικά στοιχεία, η θνησιμότητα στον άνθρωπο, λόγω τέτοιου είδους καρκινικών αλλοιώσεων, ανερχόταν περίπου σε 41.000 θανάτων για το 2002 με τάσεις αύξησης των περιστατικών [1].

Η προοπτική αυτή, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι, τα τελευταία χρόνια έχει προκύψει ένα αυξανόμενο πλήθος πληροφοριών, το οποίο αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντολογικών παραγόντων ως προς την ανάπτυξη και την εξέλιξη της ασθένειας, ώθησε πολλές ερευνητικές ομάδες, προς την μελέτη και

ανάπτυξη κατάλληλων *in vivo* διαγνωστικών μεθόδων για την έγκαιρη αντιμετώπιση της νόσου.

Η διάγνωση όμως του ανθρώπινου μελανώματος, απαιτεί ένα σύστημα διαδοχικών καταστάσεων, το οποίο ακολουθεί συγκεκριμένα κριτήρια πρόγνωσης που έχουν επιβεβαιωθεί από τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών. Έτσι, μέχρι σήμερα, τα πιο ισχυρά κριτήρια πρόγνωσης, όσον αφορά την επιβίωση ενός ασθενή που έχει μελάνωμα, είναι το πάχος και οι διαστάσεις του όγκου, η έκταση της πληγής που ενδεχομένως έχει προκληθεί και ο αριθμός των μεταστατικών όζων που υπάρχουν [2].

Μία προσφάτως αναπτυγμένη μέθοδος οπτικής βιοψίας, βασισμένη στην υπερφασματική απεικόνιση, παρουσίασε υψηλή διαγνωστική ικανότητα στην έγκαιρη ανίχνευση και χαρτογράφηση προκαρκινικών και καρκινικών αλλοιώσεων του τραχήλου της μήτρας [3,4]. Η εφαρμογή της ίδιας μεθόδου, στην περίπτωση περιστατικών με αλλοιώσεις του δέρματος, θα μπορούσε ενδεχομένως να έχει εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα, και να αποτελέσει εν τέλει μια έγκυρη *in vivo* μέθοδο πρόγνωσης.

Σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής, είναι η κατανόηση και αποκρυπτογράφηση, των μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη μελανωμάτων στο δέρμα, αλλά και η εύρεση κατάλληλων διαγνωστικών κριτηρίων τα οποία θα βασίζονται αποκλειστικά στα φασματικά χαρακτηριστικά του ιστού. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η υπερφασματική απεικόνιση του φαινομένου, καθ' όλη την διάρκεια της εξέλιξης του, από το στάδιο δημιουργίας των σπύλων, τη μετέπειτα μετάλλαξη τους σε μεικτούς και δυσπλαστικούς, αλλά και την τελική εμφάνιση του μελανώματος, προκειμένου να εξαχθούν πιθανές φασματικές διαφορές μεταξύ αυτών των σταδίων της καρκινογένεσης. Προκειμένου να υλοποιηθούν οι στόχοι αυτοί, εφαρμόστηκε κατάλληλο πρωτόκολλο χημικής καρκινογένεσης, σε ένα πλήθος

ποντικίων, και έπειτα έγινε εκτεταμένη μελέτη των ερευνητικών δεδομένων που προέκυψαν.

Όσον αφορά το κείμενο της διατριβής, στο κεφάλαιο 2, παρουσιάζεται μια αναλυτική περιγραφή της δομής του δέρματος καθώς και τα κύρια είδη των αλλοιώσεων που μπορούν να αναπτυχθούν, ενώ στο κεφάλαιο 3, περιγράφονται οι βασικές αρχές της αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη, καθώς και της φασματοσκοπίας αντίστοιχα. Εν συνεχεία, στο κεφάλαιο 4, γίνεται μια εκτενής περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας, που αφορά τόσο την ανάλυση του βιολογικού μοντέλου, όσο και την διεξαγωγή των πειραματικών μετρήσεων. Στο κεφάλαιο 5, αναλύονται οι μέθοδοι μελέτης των δεδομένων που προέκυψαν από το πείραμα, ενώ στο κεφάλαιο 6, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η αξιολόγηση της μεθόδου που ακολουθήθηκε. Τέλος στο κεφάλαιο 7, γίνεται μια αναφορά στα προβλήματα που παρουσιάστηκαν, στα συμπεράσματα που εξήχθησαν και στην προοπτική πιθανής εξέλιξης της μελέτης αυτής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

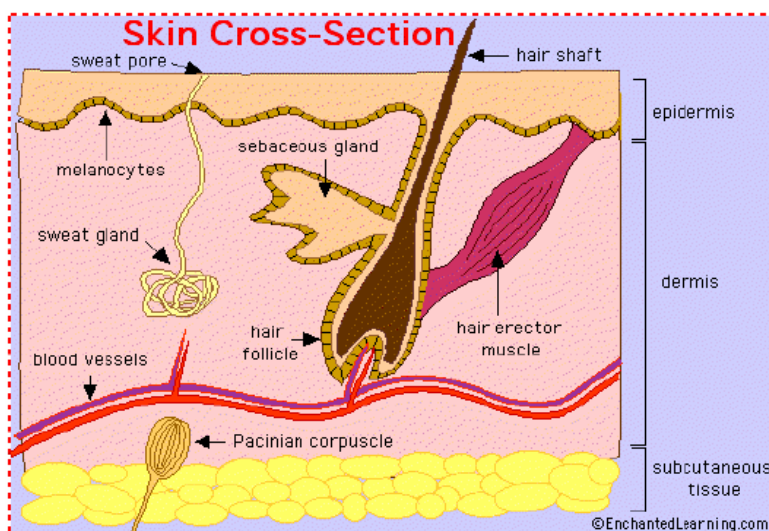
Μακροσκοπική Δομή του Δέρματος

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος. Αποτελείται από εξειδικευμένα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και κύτταρα συνδετικού ιστού, και έχει πολλές προστατευτικές και συνθετικές λειτουργίες.

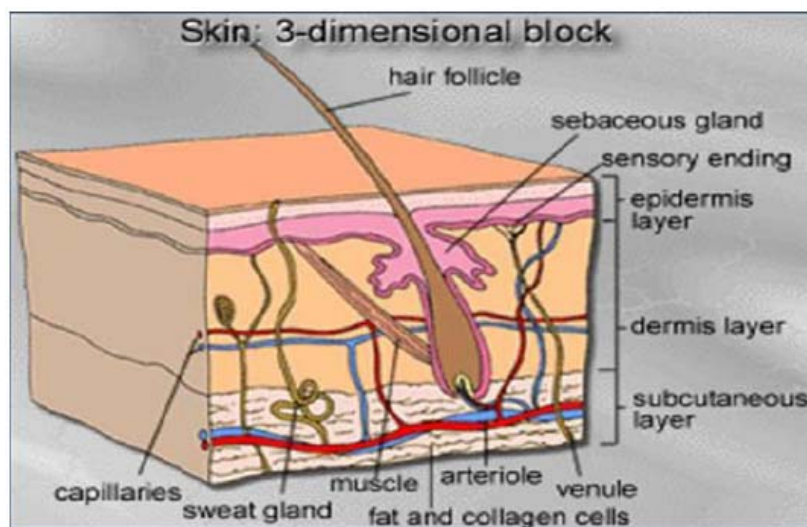
2.1 Ανατομία του Δέρματος

Το δέρμα διακρίνεται σε τρεις στιβάδες:

- a. επιδερμίδα (epidermis)
- b. χόριο (dermis)
- c. υπόδερμα (subcutaneous tissue)



Εικόνα 2.1 Λυσδιάστατη μακροσκοπική δομή του δέρματος.



Εικόνα 2.2 Τρισδιάστατη μακροσκοπική δομή του δέρματος.

2.1.1 Επιδερμίδα - Στρώματα Επιδερμίδας

Η επιδερμίδα είναι η εξωτερική επιφάνεια του δέρματος και αποτελείται κυρίως από κερατινοκύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται για να σχηματίσουν τις τέσσερις στιβάδες, οι οποίες από κάτω προς τα πάνω είναι:

- η βασική στιβάδα (basal cell layer)
- η μαλπιγιανή ή ακανθωτή στιβάδα (malpighian layer or prickle cell layer)
- η κοκκώδης στιβάδα (granular layer)
- η κερατίνη στιβάδα (surface layer)

Επιπλέον στην επιδερμίδα ανευρίσκονται τα μελανοκύτταρα και τα κύτταρα του Langerhans.

2.1.1.1 Βασική Στιβάδα

Από αυτή τη στιβάδα σχηματίζεται όλος ο πληθυσμός των κερατινοκυττάρων. Αποτελείται από ένα στοίχο κυλινδρικών κυττάρων με τον επιμήκη άξονά τους κάθετα προς την επιφάνεια του χορίου. Τα βασικά κύτταρα, έχουν βαθυχρωματικό

ωοειδή ή επιμήκη πυρήνα και ένα βαθέως βασεόφιλο πρωτόπλασμα. Τα κύτταρα της βασικής στιβάδας, συνδέονται μεταξύ τους με μεσοκυττάρια γέφυρες. Η κυτταρική διαίρεση των επιδερμικών κυττάρων, συμβαίνει μόνο στη βασική στιβάδα, προς αντικατάσταση των κυττάρων που χάνονται στην επιφάνεια του δέρματος με την απολέπιση. Την ικανότητα για μιτώσεις έχει και ο υπόλοιπος επιδερμικός πληθυσμός, όπως φαίνεται σε παθολογικές καταστάσεις της επιδερμίδας, χαρακτηριζόμενες από αυξημένο πολλαπλασιασμό ή κακοήθεια.

2.1.1.2 Μαλπιγιανή ή Ακανθωτή Στιβάδα

Πάνω από τη βασική στιβάδα βρίσκεται η ακανθωτή στιβάδα. Τα ακανθωτά κύτταρα είναι πολυγωνικά και συνδέονται με μεσοκυττάρια γέφυρες οι οποίες προσδίδουν σημαντική σταθερότητα και αντοχή στην επιδερμίδα. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, οι περιοχές αυτές της σύνδεσης (δεσμοσωμάτια), φαίνονται σαν δύο πλάκες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις κυτταρικές μεμβράνες των γειτονικών κυττάρων και στις οποίες τα τονοϊνίδια των κυττάρων έρχονται σε επαφή με την πλευρά του κυττάρου.

2.1.1.3 Κοκκώδης Στιβάδα

Πάνω από την ακανθωτή στιβάδα βρίσκεται η κοκκώδης στιβάδα η οποία αποτελείται από 1 έως 4 στίχους ρομβοειδών κυττάρων που έχουν βαθέως βασεόφιλα κοκκία.

2.1.1.4 Κερατίνη Στιβάδα

Αποτελείται από πυρήνα και από πεπλατυσμένα κερατινοκύτταρα, ενωμένα μεταξύ τους με λιπίδια, που συνθέτονται στην κοκκώδη στιβάδα. Η πρωτεΐνη ινβολουκρίνη, παράγεται στην κοκκώδη και στην κερατίνη στιβάδα και σχηματίζει ένα λεπτό πρωτεϊνικό στρώμα στην εσωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Η στιβάδα αυτή είναι σημαντική για την άμυνα του δέρματος, καθώς διαθέτει

ελαστικότητα, μηχανική αντοχή και ανθεκτικότητα στις χημικές αντιδράσεις του περιβάλλοντος, λόγω της κερατίνης που περιέχουν τα αφυδατωμένα κερατινοκύτταρα. Από την επιφάνεια της κερατίνης, συνεχώς απολεπίζονται κερατινοκύτταρα. Η ομαλή λειτουργία της απολέπισης, συμβάλλει στην ανανέωση της στιβάδας της κερατίνης, καθώς και στην απομάκρυνση μικροβίων και ουσιών. Οι διαταραχές αντίθετα της απολέπισης συνδέονται με παθολογικές καταστάσεις.

Το πάχος της κερατίνης στιβάδας, εξαρτάται από τη δερματική περιοχή. Στο όσχεο το πάχος της κερατίνης ανέρχεται σε 5-9μm, στις παλάμες και στα πέλματα σε 400-600μm και στην υπόλοιπη επιφάνεια του δέρματος σε 8-15μm.

Στην περιοχή των πελμάτων και των παλαμών, μεταξύ της κοκκώδους και της κερατίνης στιβάδας παρεμβάλλεται η διαυγής στιβάδα (lucid layer).

2.1.2 Κυτταρικά Συστατικά Επιδερμίδας

Η επιδερμίδα αποτελείται από τα εξής κυτταρικά συστατικά:

- a. Κερατινοκύτταρα
- b. Μελανοκύτταρα
- c. Κύτταρα του Langerhans

2.1.2.1 Κερατινοκύτταρα (Keratinocytes)

Το κερατινοκύτταρο της βασικής στιβάδας, είναι ένα μιτωτικά ενεργό κύτταρο, το οποίο διαφοροποιείται βαθμιαία καθώς μεταναστεύει από τη βασική στιβάδα προς τα ανώτερα στρώματα με παράλληλη αύξηση στην παραγωγή πρωτεϊνών κερατίνης. Η διαδικασία της μετανάστευσης διαρκεί 28 ημέρες κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

2.1.2.2 Μελανοκύτταρα

Στα πρώτα στάδια της ζωής του εμβρύου, μελανοκύτταρα που προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία, μεταναστεύουν και εγκαθίστανται στο δέρμα, τον

οφθαλμό και τη λεπτή μήνιγγα. Φαίνονται ως κύτταρα με σκούρο πυρήνα και καθαρό κυτταρόπλασμα. Στο

δέρμα εγκαθίστανται ανάμεσα στα κύτταρα της βασικής στιβάδας σε μια αναλογία με αυτά 1/10 έως 1/5 που εξαρτάται από την περιοχή. Ο αριθμός τους



Εικόνα 2.3 Μελανοκύτταρα

είναι σταθερός και ανεξάρτητος από το χρώμα ή τη φυλή. Η διαφορά του χρώματος οφείλεται στην παραγωγή της μελανίνης. Αν διαταραχθεί σε κάποια θέση η σχέση μελανοκυττάρων, προς τα κύτταρα της βασικής στιβάδας, τότε στη θέση αυτή τα μελανοκύτταρα αθροίζονται και σχηματίζουν ένα σπίλο.

Τα μελανοκύτταρα, είναι δενδριτικά κύτταρα που περιορίζονται στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας, ανάμεσα στα κερατινοκύτταρα. Τα μελανοκύτταρα μπορεί να είναι σε επαφή μεταξύ τους μέσω των άκρων των δενδριτικών τους. Ένα μόνο μελανοκύτταρο και τα περιβάλλοντά του κερατινοκύτταρα αποτελούν μια «επιδερμική μελανομονάδα». Αν και τα φυσιολογικά μελανοκύτταρα, έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται, ιδιαίτερα με την επίδραση του υπεριώδους φωτός, είναι σπάνιο να βρεθούν σε επαφή δύο ή περισσότερα φυσιολογικά μελανοκύτταρα, ίσως λόγω της ύπαρξης ενός μηχανισμού αμοιβαίας άπωσης. Τα μελανοκύτταρα, έχουν την τάση να σχηματίζουν ένα «κάλυμμα», γύρω από τον πυρήνα των κερατινοκυττάρων, για να τα προστατεύσουν από την υπεριώδη ακτινοβολία. Οι διαταραχές τους προκαλούν αρκετές καλοήθειες και κακοήθειες βλάβες.

Τα μελανοκύτταρα, διαθέτουν μελανοσώματα (οργανίδια με διάμετρο το πολύ 1μm που βρίσκονται μέσα στα μελανοκύτταρα και παράγουν χρωστική). Τα φυσιολογικά μελανοκύτταρα, παράγουν και ταχέως μεταφέρουν χρωστική στα κερατινοκύτταρα, πιθανότατα μέσω φαγοκυττάρωσης των κερατινοκυττάρων από τμήματα των δενδριτικών τους.

Τα μελανοκύτταρα, δεν περιέχουν ενδοκυτταρικές συνδέσεις ή δεσμοσωμάτια, αλλά περιέχουν διαφορετικό αριθμό μελανοσωμάτων σε ποικίλα στάδια της διαδικασίας παραγωγής μελανίνης. Η περιεκτικότητα των μελανοσωμάτων σε μελανίνη ποικίλει. Τα άωρα μελανοσώματα εμφανίζονται ως μικρά, μεμβρανώδη, ελλειπτικά, με σχεδόν άδειο κυτταρόπλασμα και συχνά με εσωτερικές φολίδες που εμφανίζουν εξαιρετική περιοδικότητα. Μετά τη διαδικασία της παραγωγής μελανίνης αυτές οι δομές γίνονται πυκνά αδιαφανείς. Αυτά τα ώριμα μελανοκύτταρα μεταφέρονται φυσιολογικά στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα.

Τα μελανοσώματα του επιθηλίου του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του ματιού, έχουν μεγάλη συγκέντρωση μελανίνης. Τα μελανοσώματα που υπάρχουν στην επιδερμίδα, έχουν συγκέντρωση μελανίνης, ίση με το $1/4 - 1/10$, της συγκέντρωσής της μελανίνης που υπάρχει στον αμφιβληστροειδή. Υπάρχουν και ορισμένα μελανοσώματα χωρίς μελανίνη. Επίσης ποικίλει και η κατ' όγκο συγκέντρωση των μελανοσωμάτων στην επιδερμίδα (f_v). Ο μέσος συντελεστής απορρόφησης της επιδερμίδας, εξαρτάται τόσο από το συντελεστή απορρόφησης των μελανοσωμάτων μ_a όσο και από την κατ' όγκον συγκέντρωση των μελανοσωμάτων στην επιδερμίδα. Στο δέρμα, η κατ' όγκον συγκέντρωση των μελανοσωμάτων υπολογίζεται να ποικίλει ως εξής [5]:

- για ανοιχτόχρωμους καυκάσιους, $f_v = 1-3\%$
- για περισσότερο σκουρόχρωμους καυκάσιους και μεσογειακούς,

$$f_v = 11-16\%$$

- για σκουρόχρωμους αφρικανούς, $f_v = 18-43\%$

Η μελανίνη απορροφά τις υπεριώδεις ακτίνες (UV-B) μήκους κύματος 290 - 320nm, ασκώντας έτσι φωτοπροστατευτική λειτουργία για τα κύτταρα της επιδερμίδας.

Η παραγωγή της μελανίνης ελέγχεται από την ορμόνη MSH η οποία εκκρίνεται από τον αδένα της υπόφυσης.

2.1.2.3 Κύτταρα του Langerhans

Τα κύτταρα του Langerhans βρίσκονται μεταξύ των επιδερμικών κυττάρων (το 3% του επιδερμικού πληθυσμού) και είναι δενδριτικά. Αυτά προέρχονται από πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών. Τα κύτταρα του Langerhans, αποτελούν κύτταρα που παρουσιάζουν το αντιγόνο στα αρμόδια κύτταρα (T – λεμφοκύτταρα) κατά την αλλεργική δερματίτιδα.

2.1.3 Χόριο

Το χόριο έχει πάχος 1 - 4 mm και διακρίνεται στο θηλώδες και στο δικτυωτό χόριο.

Το θηλώδες χόριο, σχηματίζεται λόγω των αντίστοιχων καταδύσεων της επιδερμίδας. Στις παλάμες και στα πόδια, η διάταξη των θηλών είναι γραμμοειδής, με αποτέλεσμα να παράγονται τα γνωστά δερματογλυφικά. Οι θηλές του χορίου περιέχουν αιμοφόρα αγγεία και ορισμένα νευρικά στοιχεία. Το δικτυωτό χόριο περιέχει δεσμίδες συνεκτικού ιστού κάτω από το οποίο εκτείνεται το υπόδερμα.

2.1.3.1 Στρώματα του Χορίου - Βασική Μεμβράνη

Η επιδερμίδα χωρίζεται από το χόριο με τη βασική μεμβράνη. Το δερμοεπιδερμικό όριο, σε κάθετη τομή, είναι συνήθως κυματοειδές και μάλιστα ο κυματισμός αυτός είναι εντονότερος εκεί που το δέρμα είναι παχύτερο. Η

κυματοειδής αυτή διαμόρφωση, οφείλεται στις καταδύσεις της επιδερμίδας και τις αντίστοιχες αναδύσεις του θηλώδους χορίου. Η διαμόρφωση αυτή παρέχει σημαντικές εφεδρείες ιστού κατά τις εκτατικές ανάγκες της επιδερμίδας.

Η βασική μεμβράνη φαίνεται στη χρώση PAS ως μια ομοιογενής ζώνη πάχους 0,5-1,0μm κατά τη δερμοεπιδερμидική συνένωση. Το είδος της χρώσης αυτής δείχνει ότι η βασική μεμβράνη περιέχει μεγάλα ποσά ουδέτερων βλεννοπολυσακχαριτών. Η ζώνη αυτή συμβάλλει στη συνοχή της επιδερμίδας με το χόριο.

2.1.3.2 Συστατικά του Χορίου

Το φυσιολογικό χόριο έχει πολύ λίγα κυτταρικά στοιχεία, τα οποία είναι εμφανέστερα στο θηλώδες κυρίως μέρος.

Οι ινοβλάστες οι οποίοι σχηματίζουν ίνες είναι διεσπαρμένοι μεταξύ των κολλαγόνων δεσμίδων. Εντοπίζονται επίσης λίγα ιστιοκύτταρα - μακροφάγα (τα οποία θεωρούνται ότι σχηματίζουν τις δικτυωτές ίνες) κυρίως γύρω από τα αγγεία. Τα ιστιοκύτταρα – μακροφάγα, φαγοκυττώνουν μικροοργανισμούς, μελανίνη, μελάνη τατουάζ κ.λ.π. και ορισμένες φορές μετασχηματίζονται σε επιθηλιοειδή κύτταρα κάτω από ορισμένες συνθήκες. Τα μαστοκύτταρα τα οποία παράγουν και αποθηκεύουν ισταμίνη – ηπαρίνη βρίσκονται σε μικρό αριθμό και γύρω από τα αγγεία. Τέλος μερικές φορές εντοπίζονται λεμφοκύτταρα και άλλα λευκοκύτταρα παροδικά.

Εντοπίζονται επίσης αγγεία και λεμφαγγεία. Τα αγγεία ανευρίσκονται σε δύο επίπεδα δημιουργώντας έτσι αγγειακά πλέγματα. Το βαθύτερο «υποδερματικό πλέγμα» βρίσκεται κοντά στο όριο χορίου – υποδέρματος και επικοινωνεί με το επιπολής «υποθηλώδες πλέγμα». Τέλος στο χόριο εντοπίζονται νεύρα, μύες και τρίχες.

2.2 Καλοήθεις Νεοπλασίες (Σπίλοι)

Με τον όρο σπίλος χαρακτηρίζεται μια μελανή κηλίδα ή ένα μελανό έπαρμα της επιδερμίδας. Αρχικά υπάρχει πολλαπλασιασμός των μελανοκυττάρων και διαταραχή της σχέσης αναλογίας 1/10 – 1/5 ανάμεσα στα μελανοκύτταρα και τα κύτταρα της βασικής στιβάδας. Οι γνήσιοι σπίλοι διαθέτουν κύτταρα που αποτελούν εξέλιξη μελανοκυττάρων (σπιλοκύτταρα), και που σχηματίζουν αθροίσεις οι οποίες ονομάζονται σπιλοσωμάτια. Στο δέρμα κάθε ανθρώπου, παρατηρούνται άφθονοι σπίλοι, που άλλοι υπάρχουν κατά τη γέννηση (συγγενείς), ενώ άλλοι εμφανίζονται μετά.

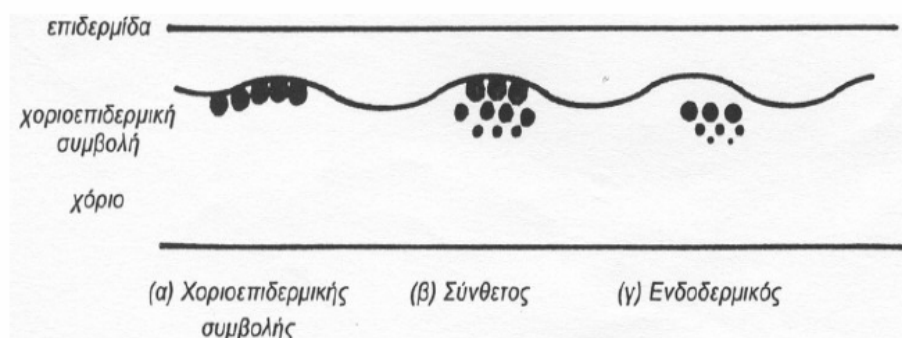
Οι πρώτες αθροίσεις των σπιλοκυττάρων, γίνονται στη βασική στιβάδα στο όριο μεταξύ της επιδερμίδας και του χορίου (εμφάνιση δραστηριότητας στη συμβολή, συνδεσμικός σπίλος). Τα κύτταρα αυτά, μεταφέρονται στη συνέχεια στο χόριο. Στη φάση αυτή υπάρχει δραστηριότητα τόσο στη συμβολή όσο και στο χόριο (σύνθετος σπίλος). Τέλος σταματά η δραστηριότητα στη συμβολή, και παραμένουν μόνο τα κύτταρα του χορίου (ενδοδερμικός σπίλος – του χορίου).

2.2.1 Σύνθετοι – Μεικτοί Σπίλοι (Compound Nevus)

Ένας μεικτός μελανοκυτταρικός σπίλος, είναι μια μελαχρωματική βλάβη, στην οποία τα σπιλοκύτταρα εντοπίζονται τόσο στην επιδερμίδα όσο και στο χόριο.

Κλινικά Χαρακτηριστικά: Οι μεικτοί σπίλοι έχουν διάμετρο 1 – 7 mm. Υπάρχει μεγάλη ποικιλότητα στο μέγεθος, την έπαρση και την επιφανειακή τους υφή. Η διαμόρφωσή τους ποικίλει και μπορεί να είναι επηρμένοι ή οζώδεις (nodule). Η οζώδης εμφάνισή τους μπορεί να συγχύσει με μελάνωμα. Η επιφάνειά τους κυμαίνεται από λεία σε ανάγλυφη. Το χρώμα ποικίλει από καφέ σε ροζ. Οι συνηθισμένοι σπίλοι είναι σπάνια μαύροι και συνήθως τριχωτοί.

Ιστολογικά Χαρακτηριστικά: Οι περισσότεροι μεικτοί σπίλοι είναι σχετικά μικρές, καλά περιγεγραμμένες, συμμετρικές βλάβες. Η ποσότητα της χρωστικής ποικίλει αρκετά και εντοπίζεται τόσο στα κερατινοκύτταρα όσο και στα επιφανειακά και ιδιαίτερα στα χοριακά σπιλοκύτταρα.

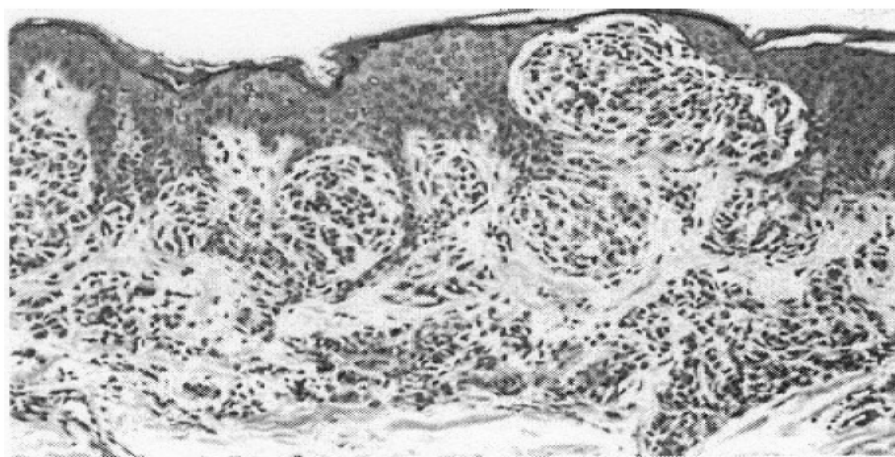


Εικόνα 2.4 Φυσική εξέλιξη επίκτυτου σπύλου.

Εξ' ορισμού τα σπιλοκύτταρα είναι παρόντα τόσο στην επιδερμίδα όσο και στο χόριο. Όσο βαθύτερα κατεβαίνουν τα κύτταρα, τόσο μικρότερα γίνονται (εικόνα 2.4β). Η λειτουργία αυτή ονομάζεται ωρίμανση και είναι ισχυρό στοιχείο καλοήθειας του σπύλου. Το κερατινοκυτταρικό επιθήλιο εμφανίζει μια τυπική επιμήκυνση των μεσοθήλαιων καταδύσεων.

Στους μεικτούς σπίλους απουσιάζουν τα στοιχεία που συνιστούν έστω και μικρή κυτταρική ατυπία: μεγάλη ιωσινόφιλη νουκλεοτίδη καθώς και μιτώσεις. Στους περισσότερους μεικτούς σπίλους τα κύτταρα της βλάβης έχουν μικρό πυρήνα ο οποίος είτε δεν περιέχει αρκετή νουκλεοτίδη είτε έχει μικρή έως μέτρια ποσότητα μπλε νουκλεοτίδης. Η πυρηνική μεμβράνη ίσως είναι κανονική ή κάπως συσπειρωμένη, ιδιαίτερα στα μεγαλύτερα επιφανειακά σπιλοκύτταρα και ίσως υπάρχει σημαντική διακύμανση στο μέγεθος και το σχήμα του πυρήνα σε κάποιες βλάβες. Αν και οι περισσότεροι σπίλοι εμφανίζονται να αποτελούνται από ένα μόνο είδος κυττάρων, υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μοντέλο ωρίμανσης από τον επιφανειακό κυτταρικό τύπο Α (μεγάλα, στρογγυλά, κεχρωσμένα κύτταρα), σε ένα

άλλο βαθύτερο τύπο κυττάρων Β (μικρότερα, στρογγυλά, αχρωστικά κύτταρα). Σε κάποιες παλιές βλάβες εντοπίζεται και ένας τρίτος τύπος κυττάρων, C, στη βάση της βλάβης. Λόγω μιας μικρής αύξησης της ηωσινοφιλικής στρωματικής ουσίας, ανάμεσα στα μεμονωμένα σπιλοκύτταρα που ακολουθούν αυτή τη διαδικασία της ωρίμανσης, τα κύτταρα τύπου C ίσως εμφανιστούν σημαντικά απομακρυσμένα το ένα από το άλλο. Αυτά τα κύτταρα τύπου C είναι διατεταγμένα ως ανακατεμένες δεσμίδες σε ένα χαρακτηριστικό μοντέλο. Ο τύπος Α των κυττάρων αναδεικνύεται περισσότερο με την πρωτεΐνη S-100, σε αντίθεση με τα κύτταρα C. Από την άλλη τα κύτταρα C αντιδρούν με το αντιγόνο ΑΗΜΥ1.



Εικόνα 2.8 Μεικτός σπίλος. Εμφανίζονται σπιλοκύτταρα τόσο στην δερμο – επιδερμική περιοχή όσο και μέσα στο δέρμα.

Διαφορική Διάγνωση: Οι περισσότεροι μεικτοί σπίλοι αποτελούνται από σχετικά μεγάλα επιθηλιοειδή κύτταρα τύπου Α, τα οποία έχουν επιφανειακά χοντρόκκοκη μελανίνη και από μικρότερα κύτταρα τύπου Β, τα οποία έχουν λίγη ή και καθόλου μελανίνη στη βάση της βλάβης κοντά στο όριο του θηλώδους και του δικτυωτού χορίου. Τα σπιλοκύτταρα που εντοπίζονται στο χόριο, δηλαδή στη βάση της βλάβης, είναι πιο παλιά από εκείνα της επιδερμίδας και επομένως πιο ώριμα. Η διαδικασία αυτή της ωρίμανσης από τα μεγαλύτερα με περισσότερη χρωστική κύτταρα στα μικρότερα με λιγότερη χρωστική κύτταρα αποτελεί ένα σημαντικότερο

χαρακτηριστικό διάκρισης των κοινών σπύλων από το οζώδες κακοήθες μελάνωμα. Στο μελάνωμα τα κύτταρα είναι λιγότερο πιθανό να μικρύνουν και να περισσότερο πιθανό να διατηρήσουν τη χρωστική τους με την κάθοδό τους στο χόριο. Αυτό συμβαίνει ίσως γιατί στο μελάνωμα γίνεται πολλαπλασιασμός μελανοκυττάρων και είναι σχεδόν απίθανο τα βαθύτερα κύτταρα να είναι πιο ώριμα από τα επιφανειακά.

Στην βιβλιογραφία [5] αναφέρεται ότι οι βλάβες είναι συνήθως καλοήθεις αν τα επιφανειακά αλλά όχι και τα βαθύτερα κύτταρα έχουν χρωστική, ενώ οι



Εικόνα 2.5 Μεικτός Σπίλος.

περισσότεροι όγκοι είναι κακοήθεις αν υπάρχουν σποραδικά και απομονωμένα με χρωστική κύτταρα ή αν υπάρχουν ακανόνιστα τοποθετημένες μικρές ομάδες κυττάρων με χρωστική μέσα στη βλάβη.

Αν και η γενικότερη ομολογία συμφωνεί ότι η παρουσία χρωστικής στο βαθύτερο τμήμα ενός όζου μελανοκυττάρων αποτελεί μια σημαντική ενδεικτική παράμετρο κακοήθειας, υπάρχουν σπύλοι στους οποίους εμφανίζεται ο επονομαζόμενος «αντίστροφος τύπος μοντέλου κυττάρων Α», με τη χρωστική να αυξάνεται στη βάση της βλάβης σε ένα παράδοξο αλλά καλοήθες μοντέλο. Κάποιοι από αυτούς τους σπύλους είναι δυσπλαστικοί σπύλοι.

Η χρωστική στους σπύλους είναι συνήθως χοντρόκκοκη, ενώ η ταυτόχρονη παρουσία λεπτής με τη μορφή σκόνης και χοντρόκκοκης χρωστικής είναι ενδεικτική μελανώματος. Επίσης η χοντρόκκοκη χρωστική σημαίνει συμπαγή μελανοσώματα, τα οποία είναι περισσότερο χαρακτηριστικά των σπύλων, αλλά μπορούν να εντοπιστούν και σε μελανώματα, ενώ η χρωστική με τη μορφή σκόνης των μελανοσωμάτων

εντοπίζεται σε κάποιο πληθυσμό μεμονωμένων, ανεπαρκώς χρωματισμένων προ-μελανοσωμάτων.

Επίσης στους μεικτούς σπίλους δεν υπάρχει σχεδόν καθόλου ανοσολογική αντίδραση του περιβάλλοντα στη βλάβη υγιούς ιστού. Ακόμα, δεν υπάρχει καμία ένδειξη αυτόματης νέκρωσης του εκτός από κάποιες εξαιρετικές περιπτώσεις πολυποειδών σπύλων. Οι περισσότεροι μεικτοί σπίλοι περιέχουν πολύ λίγα λεμφοκύτταρα ενώ ο εντοπισμός πολυάριθμων λεμφοκυττάρων είναι ενδεικτικός της ύπαρξης δυσπλαστικού σπύλου ή και μελανώματος.

2.2.2 Δυσπλαστικοί ή Άτυποι Σπίλοι (Dysplastic Nevus)

Ένας σπίλος που αναπτύσσεται ενδοεπιδερμικά μπορεί να παρουσιάζει στοιχεία κυτταρικής ατυπίας οπότε και η διαφορική του διάγνωση από ένα κακοήθες μελάνωμα που αναπτύσσεται επίσης ενδοεπιδερμικά είναι πολύ δύσκολη. Οι σπίλοι αυτοί ονομάζονται άτυποι (παλιότερα δυσπλαστικοί) και θεωρείται ότι σε ποσοστό 30% αποτελούν προστάδιο κακοηθών μελανωμάτων. Οι δυσπλαστικοί σπίλοι αποτελούν παρέκκλιση των επίκτητων σπύλων που περιγράφηκαν αρχικά το 1978 σε οικογένειες με μεγάλο αριθμό κλινικώς άτυπων σπύλων και αυξημένη επίπτωση μελανώματος (τουλάχιστον δύο μέλη της οικογένειας είχαν εμφανίσει μελάνωμα). Σε αντίθεση με τους συνήθεις επίκτητους σπίλους, οι δυσπλαστικοί σπίλοι μπορούν να εμφανιστούν σε οποιαδήποτε ηλικία και έχουν κλινικά χαρακτηριστικά ανάλογα του μελανώματος. Προφανώς οι δυσπλαστικοί σπίλοι ταξινομήθηκαν κλινικώς ως άτυποι σπίλοι με την καθιέρωση δύο κύριων και τεσσάρων δευτερευόντων ιστολογικών χαρακτηριστικών για την ακριβή και αναπαραγώγιμη διάγνυσή τους (US Dept of Health 1992).

Ασθενείς με το σύνδρομο του οικογενούς άτυπου σπύλου – μελανώματος (FAMM – familial atypical mole – melanoma), γνωστού μέχρι πρότινος ως σύνδρομο

των οικογενώς δυσπλαστικών σπύλων, βρίσκονται σε σημαντικά αυξημένο κίνδυνο αναπτύξης τόσο μελανώματος όσο και πολλαπλών πρωτοπαθών μελανωμάτων και σε νεαρότερη ηλικία. Ο συνολικός κίνδυνος μέχρι την ηλικία των 70 ετών στα μέλη οικογενειών με FAMM [5,8], ανέρχεται σχεδόν στο 100%. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι αυτό το σύνδρομο σχετίζεται με το γονίδιο που βρίσκεται στο μικρό κομμάτι του χρωμοσώματος 1 και κληρονομείται κατά τον επικρατούντα τρόπο. Υπάρχουν όμως και άτομα με μη οικογενείς, δυσπλαστικούς (άτυπους) σπύλους. Οι σπύλοι αυτοί μπορεί να συνυπάρχουν με κοινούς σπύλους. Σποραδικώς άτυποι σπύλοι απαντούν στο 10% του γενικού πληθυσμού. Ο κίνδυνος εξαλλαγής τους σε μελάνωμα δεν μπορεί να καθοριστεί.

Κλινικά Χαρακτηριστικά: Οι άτυποι σπύλοι (συνδεσμικοί και μικτοί) εμφανίζουν κλινικά χαρακτηριστικά ανάλογα του μελανώματος όπως διάμετρο μεγαλύτερη των 6-8mm, ανώμαλο όριο (περίμετρο), τοπογραφική ασυμμετρία, ακανόνιστη χρώση (καφεδοειδείς, ερυθροί και σαρκώδεις τόνοι) και συχνά η χρωστική φαίνεται να διεισδύει στο φυσιολογικό τριγύρω δέρμα. Η φυσική διαμόρφωση επίσης μπορεί να είναι ακανόνιστη, π.χ. σε ορισμένα σημεία υπερυψωμένη και σε άλλα επίπεδη. Επίσης είναι πιθανό οι βλάβες να είναι επίπεδες και να έχουν μια λεπτή στρώση που περιβάλλει μια κεντρική επηρμένη περιοχή. Ιστολογικά ένας ώριμος χοριακός ή μεικτός σπύλος συχνά εντοπίζεται σε αυτή την κεντρικά επηρμένη περιοχή, πράγμα που δημιουργεί την εντύπωση ότι οι ατυπία έχει ξεκινήσει από την περιφέρεια ενός προϋπάρχοντος καλοήθους σπύλου. Οι εντελώς επίπεδες βλάβες πιθανότατα ξεκίνησαν χωρίς την ύπαρξη κάποιου προηγούμενου σπύλου.

Οι βλάβες που εμφανίζουν προοδευτικά αλλαγές στο μέγεθος, στο σχήμα και στο χρώμα πρέπει να εξαιρεθούν ως ύποπτες για μελάνωμα. Οι δυσπλαστικοί σπύλοι

με μέγεθος μικρότερο από 3-4mm είναι δύσκολο να διακριθούν από τους κοινούς σπίλους.

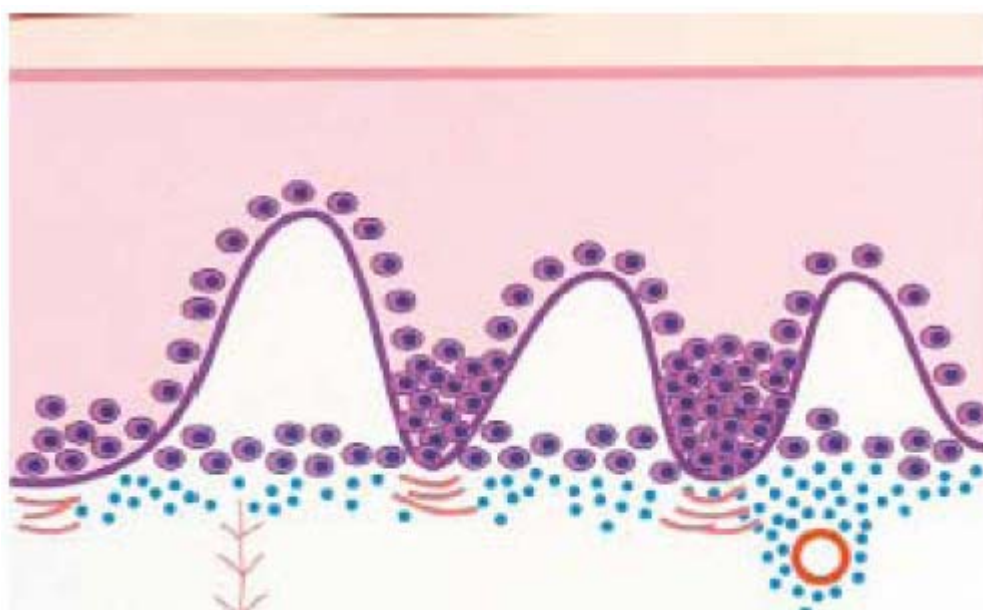
Ιστολογικά Χαρακτηριστικά: Ιστολογικά οι δυσπλαστικοί σπίλοι διαφέρουν από τους κοινούς σπίλους στα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά τους, στην παρουσία κυτταρικής ατυπίας και στην παρουσία φλεγμονής της γύρω περιοχής η οποία περιλαμβάνει χαρακτηριστικά ίνωσης και ανομοιογενή λεμφοκυτταρική διήθηση.

Η αρχιτεκτονική διαφοροποίηση αναγνωρίζεται από την εμφάνιση ενός μοτίβου επιμηκυμένου στις δερματικές πτυχές και με ένα αυξημένο αριθμό μεμονωμένων ή ομαδικών σπιλοκυττάρων στη βασική επιδερμίδα. Τυπικά, τα σπιλοκύτταρα ποικίλουν στο μέγεθος και στο σχήμα, είναι συνήθως τοποθετημένα με το μεγάλο τους άξονα παράλληλο προς την επιφάνεια του δέρματος. Υπάρχουν κάποιες φωλιές σπιλοκυττάρων που εμφανίζονται να ξεπερνούν ή να ενώνονται με τις γειτονικές δερματικές καταδύσεις ή να περιορίζονται ανάμεσα στις πτυχές των μεσοθήλαιων δερματικών καταδύσεων.

Ιστολογικά οι δυσπλαστικοί σπίλοι ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: τους Φακοειδείς και τους Επιθηλιοειδείς. Οι πρώτοι και συχνότεροι παρουσιάζουν αυξημένα μελανοκύτταρα στη βασική στιβάδα με ποικίλο βαθμό ατυπίας δηλαδή πυρηνικό πολεομορφισμό, υπερχρωμία και σαφή κυτταρική άλω. Ένα χαρακτηριστικό είναι η δεσμοπλασία στο θηλώδες χόριο (φυλλώδης ινοπλασία). Οι επιθηλιοειδείς συνίστανται από μεγαλύτερα κύτταρα με ηωσινόφιλο πρωτόπλασμα και κοκκώδη εναπόθεση μελανίνης, φυσαλιδώδης πυρήνες και μερικές φορές εμφανείς πυρηνίσκους. Και στους δύο τύπους παρατηρείται λεμφοκυτταρική διήθηση στο άνω χόριο.

Τόσο η ιστολογική όσο και η αρχιτεκτονική ατυπία είναι αναγκαίες για μια περισσότερο ειδική διάγνωση. Αν δεν εμφανίζεται ατυπία σε μια βλάβη που έχει λίγα

ή περισσότερα χαρακτηριστικά που συνιστούν το μοντέλο του δυσπλαστικού σπίλου, πιθανότατα η βλάβη να πρέπει να ταξινομηθεί ως φακοειδής σπίλος (μη δυσπλαστικός, συνδεσμικός ή μεικτός). Αυτές οι βλάβες με αρχιτεκτονική αλλά όχι κυτταρική ατυπία είναι γενικά μικρότερες και με μικρή παρουσία κυττάρων σε σχέση με τους κλασικούς δυσπλαστικούς σπίλους.



Εικόνα 2.6 Σχηματισμός σπίλου με αρχιτεκτονική ατυπία. Παρατηρείται η δημιουργία «φωλιών» παρουσία σπιλοκυττάρων, και η διήθηση λεμφοκυττάρων [6]

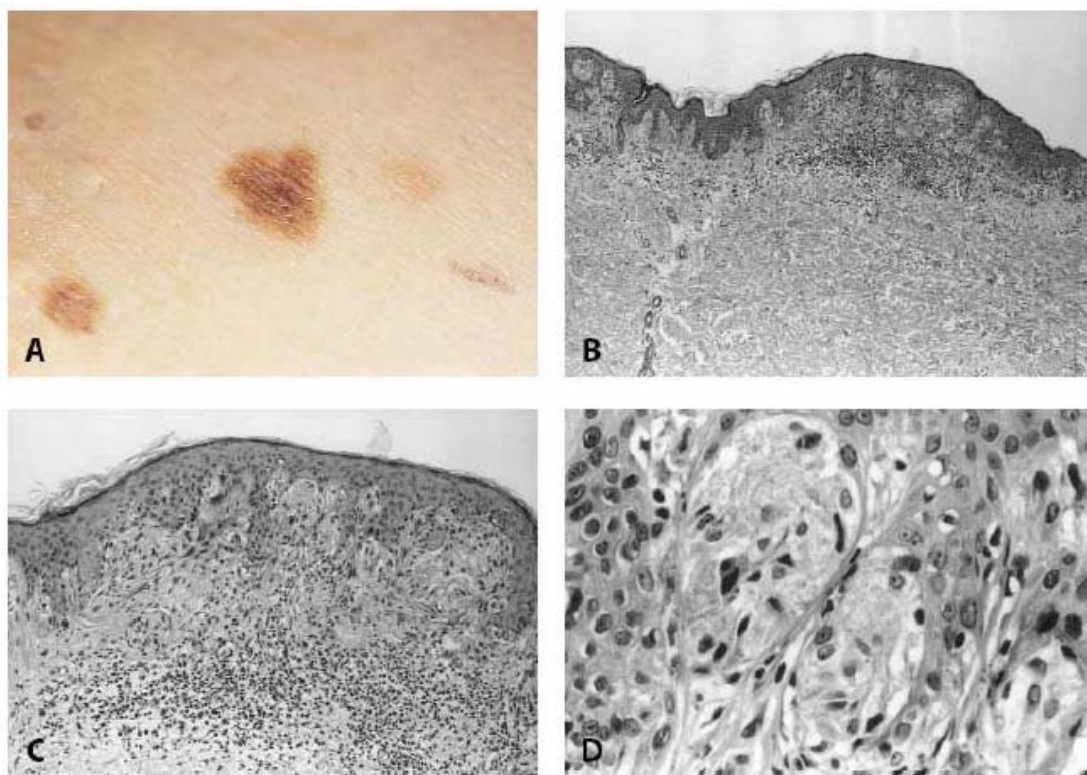
Άσχετα με την παρουσία χοριακής συνιστώσας οι αρχικές διαγνωστικές αλλαγές της μελανοκυτταρικής δυσπλασίας εντοπίζονται στη φακοειδή συνδεσμική συνιστώσα της βλάβης (δηλαδή η δυσπλασία μπορεί να ξεκινήσει από το όριο της βασικής μεμβράνης και να επεκταθεί προς τα κάτω). Η δυσπλασία μπορεί να επεκταθεί στην επιδερμίδα πάνω από το θηλώδες χόριο, αλλά περισσότερο χαρακτηριστικά, εντοπίζεται στην επιδερμίδα με επέκταση σε μια μεικτή βλάβη με δύο ή και τρεις δερματικές καταδύσεις και συνήθως πολύ πιο κάτω από το πιο τελευταίο χοριακό σπιλοκύτταρο.

Σε ένα συνδεδεσμένο δυσπλαστικό σπίλο, οι αλλαγές είναι εντελώς ενδοεπιδερμικές. Ο προϋπάρχοντας κυρίαρχος κυτταρικός τύπος στις περισσότερες βλάβες είναι ίδιος με αυτόν του κοινού σπίλου, με σχετικά αραιό αλλά αναγνωρίσιμο κυτταρόπλασμα, λιγοστή χοντρόκκοκη μελανίνη και συχνά με ένα βαθμό κυτταροπλασματικής συστολής συγκρίσιμο με αυτόν που παρατηρείται στα φυσιολογικά μελανοκύτταρα. Επίσης στους δυσπλαστικούς σπίλους παρατηρείται και ένας ακόμα τύπος κυττάρων εκτός από τα φυσιολογικά σπιλοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα που συνήθως αποτελούν μειοψηφία και κάποιες φορές επικρατούσα μορφή του ολικού πληθυσμού είναι μεγαλύτερα από τα πιο πολλά κοινά σπιλοκύτταρα και έχουν πιο άφθονο κυτταρόπλασμα (π.χ. είναι επιθηλιοειδή κύτταρα). Το κυτταρόπλασμα μπορεί να περιέχει σχετικά αραιή, με «λεπτό» τρόπο κατανεμημένη, κονιορτοποιημένη μελανίνη (οι δυσπλαστικοί σπίλοι δεν είναι τόσο πολύ μελαχρωματικοί όσο οι κοινόι σπίλοι). Οι πυρήνες αυτών των επιθηλιοειδών κυττάρων ποικίλουν περισσότερο από των κοινών σπιλοκυττάρων. Κάποιοι είναι μεγαλύτεροι με κάπως ακανόνιστες και μη στρογγυλές πυρηνικές μεμβράνες, ενώ κάποιοι άλλοι έχουν εμφανώς μεγάλη ιωσινόφιλη ή αμφίφιλη νουκλεοτίδη. Αυτός ο τύπος κυττάρων των δυσπλαστικών σπίλων εμφανίζουν τόσο πυρηνική όσο και κυτταροπλασματική ατυπία.

Η εμφάνιση ανωμαλιών στο DNA σε συνδυασμό με άτυπα μοντέλα ανάπτυξης είναι συμβατά με το μοντέλο ανάπτυξης του όγκου που ξεκινά από ένα απλό μελανοκύτταρο και εξελίσσεται σε ένα κακοήθες μελάνωμα με ενδιάμεσο στάδιο εκείνο του δυσπλαστικού σπίλου. Αυτό επιβεβαιώνεται από την ιστολογική εξέταση των μελανωμάτων, όπου ένας θεωρούμενος πρόδρομος δυσπλαστικός σπίλος είναι εμφανής γειτονικά (εφαπτομενικά) με το μελάνωμα σε περίπου 30% των περιπτώσεων.

Τα κύτταρα του δυσπλαστικού σπίλου μπορούν να διαφοροποιηθούν ανοσοϊστοχημικά από εκείνα του απλού σπίλου και του μελανώματος. Πρόσφατα βρέθηκε δραστικότητα του αντιγόνου HMB-45 στα σπιλοκύτταρα του χορίου δυσπλαστικών σπλών με μέτρια και σημαντική μορφή ατυπίας. Αυτό το αντιγόνο δε δρα με τα κύτταρα που βρίσκονται στο χόριο ενός φυσιολογικού σπίλου. Επίσης με χρήση ενός συνόλου από 16 μονόκλωνων αντισωμάτων επιτεύχθηκε διάκριση ανάμεσα στην ακτινική και κατακόρυφη φάση ανάπτυξης των μελανωμάτων, πράγμα που απέτυχε ανάμεσα στους δυσπλαστικούς σπύλους και στα μελανώματα με ακτινική φάση ανάπτυξης. Αυτά τα αποτελέσματα ενισχύουν τη θεωρία ότι οι δυσπλαστικοί σπύλοι αποτελούν μια ενδιάμεση κατάσταση στην ανάπτυξη μελανοκυτταρικού όγκου ανάμεσα στους κοινούς σπύλους και στην ακτινική φάση ανάπτυξης του μελανώματος.

Η ατυπία στους δυσπλαστικούς σπύλους μπορεί να διαβαθμιστεί από ήπια έως σοβαρή για παραστατικούς λόγους. Η ήπια ατυπία συνίσταται σε ένα αυξημένο σε



Εικόνα 2.7 Δυσπλαστικός σπίλος. Κλινική ατυπία με ιστολογική δυσπλασία [6].

μέγεθος πυρήνα και κάποιες φορές εντυπωσιακή υπερχρωμία. Η μέτρια και η σοβαρή ατυπία σχετίζεται με την προοδευτική μεγέθυνση του πυρήνα ο οποίος αποκτά ακανόνιστο και μη στρογγυλό σχήμα, τον περισσότερο έντονο πολεομορφισμό, και με την ηωνοσινοφιλική νουκλεοτίδη σε κάποιες σοβαρές μορφές ατυπίας. Τα κύτταρα έχουν περισσότερο ευδιάκριτο κυτταρόπλασμα το οποίο είναι γεμάτο μελανοκύτταρα.

Οι μιτώσεις οι οποίες σε ποσοστό 30% γίνονται στην επιδερμίδα στα μελανώματα, είναι πολύ σπάνιες στους δυσπλαστικούς σπίλους. Στο μελάνωμα αυτά τα άτυπα κύτταρα κυριαρχούν σε ένα διαρκή σχεδόν πανομοιότυπο πολλαπλασιασμό στην επιδερμίδα και στο θηλώδες χόριο (ομοιόμορφη κυτταρική ατυπία). Όταν η σοβαρή πυρηνική ατυπία σχετίζεται με την τάση για ενδοεπιδερμική διάχυση η οποία δεν εκτείνεται πιο πέρα από τα κατώτερα 2/3 της επιδερμίδας (και δεν υπάρχουν κάποια άλλα στοιχεία που να υποδεικνύουν κακοήθεια), τότε χρησιμοποιείται ο όρος «σοβαρή μελανοκυτταρική ατυπία» ως ένδειξη ότι η βλάβη έχει κάποια χαρακτηριστικά που υποθέτουν ξεκίνημα μελανώματος. Όταν αυτές οι ομαδικές αλλαγές εκτείνονται μέχρι την κοκκώδη και κερατίνη στιβάδα τότε η πιθανή διάγνωση είναι ένα *in situ* μελάνωμα.

2.2.6.1 Ιστολογικά Κριτήρια για Διάγνωση Δυσπλαστικών Σπίλων

- Αρχιτεκτονική
 - ✓ Μέγεθος συνήθως μεγαλύτερο από 4mm (κλινικά 5mm)
 - ✓ Επιφανειακή μόνο πλάκα (συνδεσμικός) ή πλάκα που περιβάλλει το θηλώδες χόριο (μεικτός)
 - ✓ Δικτυωτές γέφυρες
 - ✓ Φωλιές στις άκρες της δερματικής κατάδυσης
 - ✓ Μεμονωμένα κύτταρα ανάμεσα στις φωλιές οι οποίες υπερέχουν
 - ✓ Φακοειδής ανάπτυξη της δερματικής κατάδυσης

- ✓ Συνένωση των δερματικών καταδύσεων
- Κυτταρολογία
 - ✓ Ελαφριά έως μέτρια ατυπία
 - ✓ Μεγαλονουκλεοτίδη (κάποιες φορές)
 - ✓ Σκεδασμένα επιθηλιοειδή σπιλοκύτταρα
 - ✓ Σκεδασμένα κύτταρα με κονιορτοποιημένη μελανίνη
 - ✓ Καθόλου εντυπωσιακή ατυπία, λίγες μιτώσεις, μικρή ή καθόλου ομαδική διάχυση
 - ✓ Η εμφάνιση λεμφοκυτταρικής απόκρισης σε μια συγκεκριμένη περιοχή (band – like) υποθέτει μελάνωμα
 - ✓ Οι δυσπλαστικοί σπίλοι δεν μπορούν να αναγνωριστούν αξιόπιστα όταν είναι μικρότεροι από 2mm

ΜΕΙΚΤΟΙ ΣΠΙΛΟΙ	ΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΟΙ ΣΠΙΛΟΙ
ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	
Διάμετρος 4mm ή και λιγότερο	Διάμετρος συνήθως μεγαλύτερη από 4mm και σπάνια μεγαλύτερη από 10mm
Εξολοκλήρου θηλωματώδης βλάβη	Είτε εξολοκλήρου macular, είτε η macular συνιστώσα περιβάλλει το θηλώδες χόριο
Αρκετά συμμετρική	Ελαφρώς συμμετρική
Ανυπαρξία φακοειδούς συνδεσμικού τμήματος	Εξολοκλήρου φακοειδής ή φακοειδές κομμάτι στα άκρα του θηλώδους χορίου
Απουσία επιμήκυνσης, συμπίεσης ή κάποιας δικτυωτής γέφυρας στα άκρα του χοριακού τμήματος	Ομοιόμορφη ελαφριά επιμήκυνση της δερματικής πτυχής στο φακοειδές τμήμα με συμπίεσμένες φωλιές.
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	
Απουσία λεμφοκυττάρων	Ανομοιογενή λεμφοκύτταρα στο χόριο
Απουσία ηωσινοφιλικής και διάχυτης ινοπλασίας	Συνήθως υπάρχει ηωσινοφιλική ινοπλασία ενώ σπάνια συναντάται διάχυτη ινοπλασία
Μικρός ή ανύπαρκτος αγγειακός πολλαπλασιασμός ή ενδοθηλιακή υπερτροφία στο θηλώδες χόριο	Πιθανή ύπαρξη μέτριας υπερτροφίας των ενδοθηλιακών κυττάρων και ελαφριά αύξηση στα αγγεία
ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	
Ανυπαρξία άτυπων σπιλοκυττάρων στην επιδερμίδα	Μέτρια και σποραδική κυτταρική ατυπία στην επιδερμίδα
Απουσία μακρονουκλεοτίδης	Συχνότατη παρουσία μακρονουκλεοτίδης στη μειοψηφία των κυττάρων της βλάβης στην επιδερμίδα
Επιθηλιοειδή κύτταρα συνήθως χωρίς ομοιόμορφα κατανεμημένη κυτταροπλασματική χρωστική	Σκεδασμένα άτυπα επιθηλιοειδή κύτταρα με κονιορτοποιημένη χρωστική, νουκλεοτίδη ανισοκαρύωση
Ύπαρξη χρωστικής επιφανειακά κυρίως	Η χρωστική μπορεί να εντοπίζεται επιφανειακά αλλά και βαθύτερα στα χοριακά σπιλοκύτταρα

2.3 Κακοήθεις Νεοπλασίες – Μελάνωμα

Το μελάνωμα είναι κακοήθης όγκος των μελανοκυττάρων. Αποτελεί το 1% - 3% όλων των κακοηθών όγκων και η συχνότητά του αυξάνεται σε όλο τον κόσμο κατά 4% - 7% ετησίως, ενώ η ετήσια αύξηση του πληθυσμού είναι 1.17%. Η θνησιμότητά του έχει διπλασιαστεί τα τελευταία 35 χρόνια. Η αύξηση αυτή αφορά μόνο το μελάνωμα του δέρματος και όχι το εξωδερματικό (σπλαχνικό) μελάνωμα.

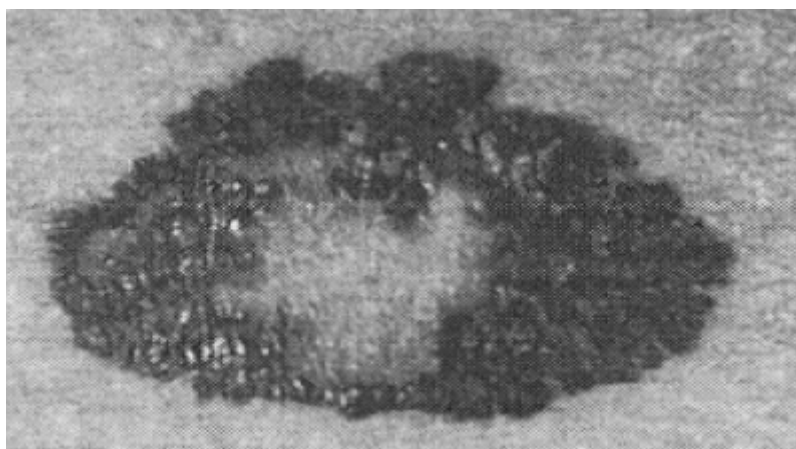
2.3.1 Αιτιολογία – Παθογένεση

Αρκετοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί στην αιτιολογία και παθογένεση. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι η υπεριώδης ακτινοβολία και η γενετική προδιάθεση του ατόμου για την ανάπτυξη μελανώματος όπως αυτή εκφράζεται με την εμφάνιση μορφών σπίλων που έχουν αυξημένο ποσοστό μελανωματικής εξαλλαγής.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που ενοχοποιούν την έκθεση στο ηλιακό φως για την ανάπτυξη μελανώματος ανάλογα με την ευαισθησία του κάθε ατόμου σ' αυτή. Για παράδειγμα το φακοειδές μελάνωμα αναπτύσσεται στο εκτεθειμένο δέρμα του προσώπου. Η δράση της ηλιακής ακτινοβολίας δεν είναι αθροιστική στο χρόνο, αλλά χρειάζονται βραχύχρονες έντονες εκθέσεις που συνοδεύονται από ηλιακά εγκαύματα. Στο λόγο αυτό οφείλεται και η αύξηση της συχνότητας σε βόρειους που κάνουν διακοπές στις μεσογειακές ακτές ή που έχουν εγκατασταθεί σε χώρες με αυξημένη ηλιοφάνεια.

Είναι γνωστή από παλιά η οικογενής εμφάνιση μελανώματος. Το 5% - 10% των ασθενών με μελάνωμα έχουν οικογενές ιστορικό. Ο σχετικός κίνδυνος μελανώματος είναι 2.3 σε άτομα με συγγενή με μελάνωμα και 5.0 σε αυτούς με δύο συγγενείς. Τα άτομα με οικογενές μελάνωμα έχουν νεαρότερη ηλικία κατά την προσβολή και το μελάνωμα στην περίπτωση αυτή συχνά εμφανίζεται επί

προϋπαρχόντων σπύλων (π.χ. .δυσπλαστικοί σπίλοι) οπότε και οι πρωτοπαθείς όγκοι είναι πολλαπλοί.



Εικόνα 2.8 Μελάνωμα

Το μελάνωμα μπορεί να αναπτυχθεί de novo, σε έδαφος προϋπάρχοντος σπίλου ή σε έδαφος κακοήθους φακής. Όταν προϋπάρχει σπίλος το μελάνωμα αναπτύσσεται από το συνδεσμικό συντελεστή του μελανοχρωματικού σπίλου (συνδεσμικός και μεικτός σπίλος) με εξαίρεση τους γιγαντιαίους συγγενείς μελανοχρωματικούς σπίλους όπου αναπτύσσεται και από ενδοδερμικά στοιχεία [6].

Η σχέση μεταξύ σπύλων και μελανώματος είναι άγνωστη. Εφόσον οι σπίλοι είναι πολύ κοινό φαινόμενο και το μελάνωμα σπάνιο συμπεραίνουμε ότι οι σπίλοι σπάνια εξαλλάσσονται παρ' ότι αντιθέτως το 20% των μελανωμάτων αναπτύσσεται σε προϋπάρχοντες σπίλους. Οι σπίλοι της χοριοεπιδερμικής συμβολής και οι σύνθετοι είναι πιθανότερο να εξαλλάγουν επειδή υπάρχει ακόμα κυτταρική δραστηριότητα σε αντίθεση με τους χοριακούς (ενδοδερμικούς) που δεν εξαλλάσσονται ποτέ (ώριμοι σπίλοι).

Τα χαρακτηριστικά ενός σπίλου που τον κάνουν ύποπτο για κακοήθη εξαλλαγή είναι:

- Μέγεθος: Αυξάνει
- Περίγραμμα: Γίνεται ακανόνιστο - οδοντωτό

- Χρώμα: Γίνεται περισσότερο σκούρο, αποκτά αποχρώσεις του καφέ, μαύρου ή ροζ
- Έπαρση: Παχύτερος και οζώδης
- Επιφάνεια: Χάνονται οι δερματικές γραμμές
- Περιβάλλον δέρμα: Εμφανίζει δορυφόρα οζίδια από διασπορά του όγκου
- Συμπτώματα: αιμορραγία, κνησμός

Στην αγγλοσαξονική βιβλιογραφία τα προειδοποιητικά αυτά σημεία αναφέρονται μνημονοτεχνικώς ως ABCD (A=asymmetry, B=border irregularity, C=color variation, D=diameter enlargement) [5].

Το βάθος της διείσδυσης του (ή το πάχος του όγκου) αποτελεί το μοναδικό προγνωστικό παράγοντα. Η πεντάχρονη επιβίωση σε σχέση με το πάχος της βλάβης σε χιλιοστά είναι: <0,76 mm, 99%, 0,76 – 1,49 mm, 95%, 1,5 – 2,49 mm, 84%, 2,5 – 3,99 mm, 70% και >4 mm, 44%. Με προσβολή λεμφογαγγλίων η πεντάχρονη επιβίωση είναι 30% και με απομακρυσμένες μεταστάσεις είναι μικρότερη από 10%. Τα κύτταρα του μελανώματος μπορεί να έχουν λιγότερη ή περισσότερη ατυπία, πολλές ή λίγες πυρηνοκινήσεις, να περιέχουν επίσης πολλή, λίγη ή και καθόλου μελανίνη ορατή με το κοινό μικροσκόπιο. Τα παραπάνω δεν παίζουν προγνωστικό ρόλο.

2.3.2 Τρόπος Ανάπτυξης Μελανώματος – Μορφολογία

Τα περισσότερα μελανώματα στο μεγαλύτερο ποσοστό τους αναπτύσσονται απευθείας από μελανοκύτταρα της βασικής στιβάδας της επιδερμίδας και σε μικρότερο ποσοστό (30%) από προϋπάρχοντα σπίλο. Παρουσιάζουν τυπικώς δύο φάσεις ανάπτυξης οι οποίες είναι δυνατό σε μερικές περιπτώσεις να επικαλύπτονται αλλά συνήθως η δεύτερη ακολουθεί την πρώτη και είναι η φάση της οριζόντιας και η

φάση της κάθετης επέκτασης. Οι σπίλοι που εξαλλάσσονται σε κακόηθες μελάνωμα παρουσιάζουν μια φάση δυσπλασίας (άτυπος σπίλος) και στη συνέχεια τα δύο παραπάνω στάδια ανάπτυξης.

Στη φάση της οριζόντιας ανάπτυξης τα μελανοκύτταρα εξαπλώνονται ακτινωτά μέσα στην επιδερμίδα (ξεκινώντας από το όριο επιδερμίδας – χορίου) καταλαμβάνοντας μεγαλύτερη έκταση. Η φάση αυτή είναι προ-διηθητική ή κατά Clark επίπεδο I (in situ).

Στη φάση της κάθετης ανάπτυξης η βλάβη είναι διηθητική και διηθεί προς το χόριο οπότε και μετατρέπεται σε αμιγές κακόηθες μελάνωμα. Ακολουθεί έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση και πιθανόν και ανοσολογική αντίδραση των διηθούμενων ιστών.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η διαφορική διάγνωση ανάμεσα σε άτυπο σπίλο και σε ενδοεπιδερμικό κακόηθες μελάνωμα είναι πολύ δύσκολη και υποκειμενική.

Το κακόηθες μελάνωμα ιστογενετικώς διακρίνεται σε τέσσερις τύπους επί τη βάση ιστολογικών αλλά και κλινικών χαρακτηριστικών [7]:

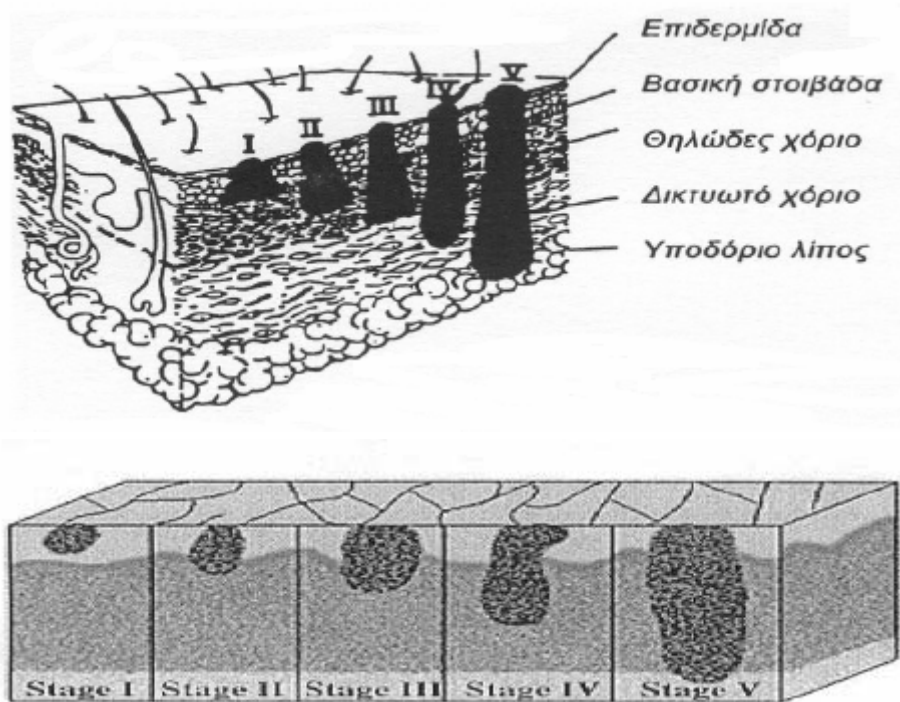
- Επιπολής εξαπλούμενο μελάνωμα (superficial spreading melanoma)
- Οζώδες μελάνωμα (Nodular malignant melanoma)
- Φακιδοειδές μελάνωμα (Lentigo malignant melanoma)
- Μελάνωμα των άκρων (Acral lentiginous melanoma).

2.3.3 Πρόγνωση Μελανώματος με Βάση την Ιστοπαθολογία της Βλάβης

Η πρόγνωση του μελανώματος εκτιμάται [5,8] με βάση:

- a) το ανατομικό επίπεδο διήθησης από τα άτυπα κύτταρα

b) το πάχος της βλάβης



Εικόνα 2.9 Η κατά Clark μικροσκοπική σταδιοποίηση του μελανώματος

Γεγονός είναι ότι επειδή η πρόγνωση εξαρτάται από την κατά βάθος διήθηση έχει προταθεί και τείνει να επικρατήσει η άποψη ότι η αναφορά στους τύπους είναι χωρίς πρακτική σημασία και πρέπει να διακρίνονται δύο τύποι:

- a) το ενδοεπιδερμικό μελάνωμα, με άριστη πρόγνωση
- b) το διηθητικό μελάνωμα

Βάση του ανατομικού επιπέδου διήθησης, υπάρχουν πέντε διαφορετικά επίπεδα (Επίπεδα κατά Clark):

Επίπεδο 1: τα άτυπα κύτταρα βρίσκονται στην επιδερμίδα (melanoma in situ)

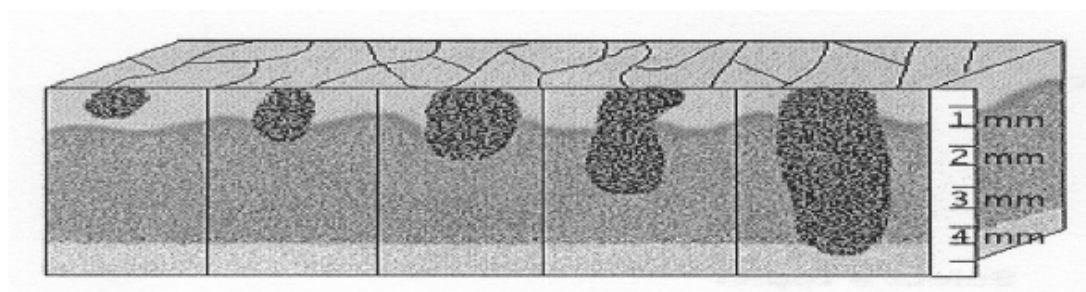
Επίπεδο 2: διήθηση του θηλώδους χορίου, χωρίς όμως να πληρούται. Είναι η πλέον επιπολής διήθηση του μελανώματος

Επίπεδο 3: πλήρωση του θηλώδους χορίου

Επίπεδο 4: είσοδος στο δικτυωτό χόριο

Επίπεδο 5: διείσδυση στο υποδερματικό λίπος

Το πάχος της βλάβης μετράται από την κοκκώδη στιβάδα ή σε περιπτώσεις εξέλκωσης από τον πυθμένα αυτής μέχρι το βαθύτερο καρκινικό κύτταρο. Το πάχος της βλάβης υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός μικρομετρικού φακού σε χιλιοστά. Ασθενείς με βλάβες σχετικά λεπτές λ.χ. 0,75 mm έχουν 5ετή επιβίωση που φθάνει το 100%. Βλάβες μεγαλύτερες από τα 3 mm έχουν κακή πρόγνωση. Η παράμετρος του πάχους της βλάβης έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο ακριβής και σχετίζεται καλύτερα με την επιβίωση από ότι το επίπεδο της διήθησης.

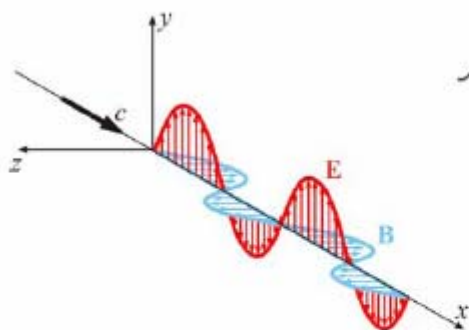


Εικόνα 2.10 Πάχος βλάβης (Breslow's thickness)

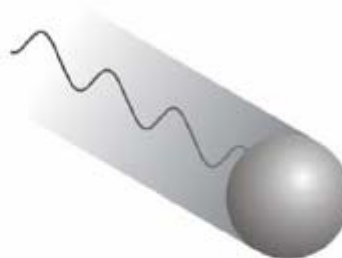
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Αλληλεπίδραση Ακτινοβολίας με Ύλη και Αρχές Φασματοσκοπίας

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία είναι ένας τύπος ενέργειας, ο οποίος μεταδίδεται στο χώρο με τεράστια ταχύτητα. Μπορεί να πάρει πολλές μορφές και οι πιο εύκολα αναγνωρίσιμες από αυτές, είναι το φως και η ακτινοβολούμενη θερμότητα. Λιγότερο αναγνωρίσιμες μορφές της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι οι ακτίνες X, η υπεριώδης ακτινοβολία, τα μικροκύματα κτλ.



**Κλασική θεώρηση:
Ηλεκτρομαγνητικό κύμα**



**Κβαντική θεώρηση:
Σώμα και κύμα**

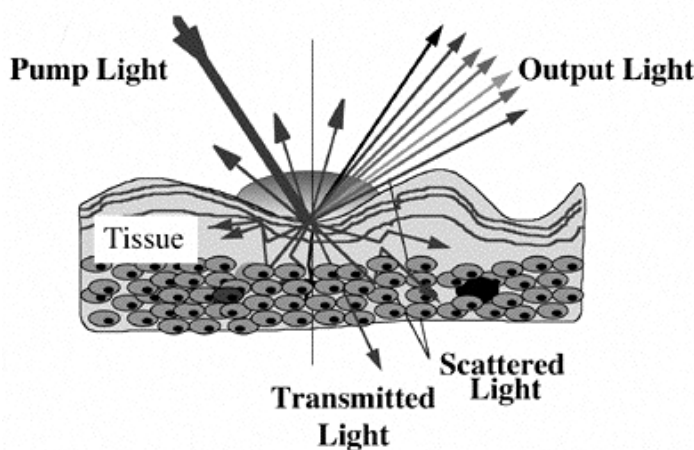
Εικόνα 3.1 Κλασική και κβαντική θεώρηση της μετάδοσης της ακτινοβολίας

Πολλές από τις ιδιότητες της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μπορούν να περιγραφούν, με τη βοήθεια του κυματικού μοντέλου, το οποίο περιλαμβάνει τις εξής παραμέτρους: μήκος κύματος, συχνότητα, ταχύτητα και πλάτος. Σε αντίθεση με άλλα κυματικά φαινόμενα, όπως για παράδειγμα ο ήχος, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία

δεν χρειάζεται κανένα μέσο για τη μετάδοση της, και έτσι μπορεί εύκολα να περάσει μέσα από το κενό [9,10].

Το κυματικό μοντέλο, δεν μπορεί να ερμηνεύσει φαινόμενα που έχουν να κάνουν με την απορρόφηση και την εκπομπή της ακτινοβολούμενης ενέργειας. Για αυτόν τον λόγο, είναι απαραίτητο να αντιληφθούμε την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, σαν μια συνεχή ροή διακριτών σωματιδίων ή κυματικών ενεργειακών «πακέτων», τα οποία ονομάζονται φωτόνια. Η ενέργεια ενός φωτονίου, είναι ανάλογη με την συχνότητα της ακτινοβολίας. Αυτή η δυική φύση της ακτινοβολίας, η σωματιδιακή και η κυματική, δεν αποκλείουν η μία την άλλη, αλλά αλληλοσυμπληρώνονται. Πράγματι, ο δισμός αυτός αποδεικνύεται ότι εφαρμόζεται στην συμπεριφορά της ροής των ηλεκτρονίων ή άλλων βασικών σωματιδίων, όπως τα πρωτόνια, και είναι πλήρως εναρμονισμένος με την κυματική μηχανική [9,10].

3.1 Αλληλεπίδραση Ακτινοβολίας με Ύλη



Εικόνα 3.2 Αλληλεπίδραση φωτός με ύλη

Η φυσική βάση της φασματοσκοπίας είναι η αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη, πράγμα το οποίο εντοπίστηκε από τον Hertz κατά την διάρκεια ενός πειράματος, ανακαλύπτοντας τυχαία το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο.

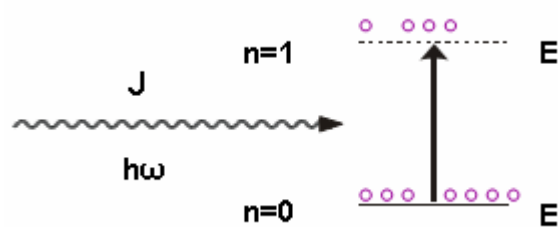
Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη μπορεί να διαχωριστεί σε τρία βασικά φαινόμενα:

- Απορρόφησης
- Εκπομπής
- Σκέδασης

3.1.1 Απορρόφηση

Όταν η ακτινοβολία περάσει μέσα από ένα στρώμα στερεού, υγρού ή αερίου, συγκεκριμένες συχνότητες μπορεί επιλεκτικά να αφαιρεθούν, εξαιτίας της απορρόφησης της ακτινοβολίας αυτής.

Η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια, μεταφέρεται στα άτομα ή στα μόρια που σχηματίζουν το δείγμα, και έτσι σαν αποτέλεσμα, αυτά τα σωματίδια



Εικόνα 3.3 Σχηματική αναπαράσταση απορρόφησης

μεταφέρονται από μια χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη σε μια υψηλότερη ενεργειακή στάθμη, ή αλλιώς διεγερμένη κατάσταση [9-11].

Σε θερμοκρασία δωματίου, οι περισσότερες ουσίες βρίσκονται στην χαμηλότερη ενεργειακή τους στάθμη ή αλλιώς στην αρχική τους κατάσταση. Η απορρόφηση συνήθως οδηγεί σε μετάβαση από την αρχική κατάσταση σε μια υψηλότερη ενεργειακή στάθμη ή αλλιώς κατάσταση.

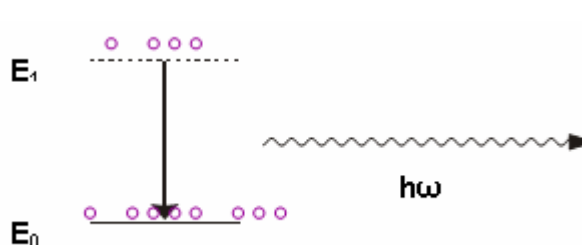
Τα άτομα, μόρια, ή ιόντα έχουν ένα περιορισμένο αριθμό διακριτών ενεργειακών καταστάσεων. Για να μπορέσει να λάβει χώρα η απορρόφηση, η ενέργεια του διεγερμένου φωτονίου, πρέπει να ισούται ακριβώς με την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στην αρχική κατάσταση και στην υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση του σωματιδίου που θα απορροφήσει την ενέργεια. Αφού αυτές οι ενεργειακές διαφορές, είναι μοναδικές για κάθε σωματίδιο, η μελέτη των συχνοτήτων

απορρόφησης της ακτινοβολίας, παρέχει ένα μέσο για τον χαρακτηρισμό των συστατικών ενός δείγματος υλικού. Για αυτόν τον λόγο, η γραφική παράσταση της απορροφητικότητας σαν συνάρτηση του μήκους κύματος απορρέει πειραματικά [9-11].

3.1.2 Εκπομπή

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία παράγεται όταν διεγερμένα σωματίδια (ιόντα, άτομα, μόρια) επιστρέφουν σε χαμηλότερα επίπεδα ενέργειας ή στην αρχική τους κατάσταση. Η διέγερση μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους όπως: βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια ή άλλα σωματίδια, έκθεση σε μεγάλη θερμοκρασία, απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας [9-11].

Τα ακτινοβολούντα σωματίδια που είναι πλήρως διαχωρισμένα το ένα από το άλλο, συμπεριφέροντε σαν ανεξάρτητα σώματα και συχνά παράγουν ακτινοβολία που περιέχει μόνο συγκεκριμένα μήκη κύματος. Έτσι το παραγόμενο φάσμα είναι



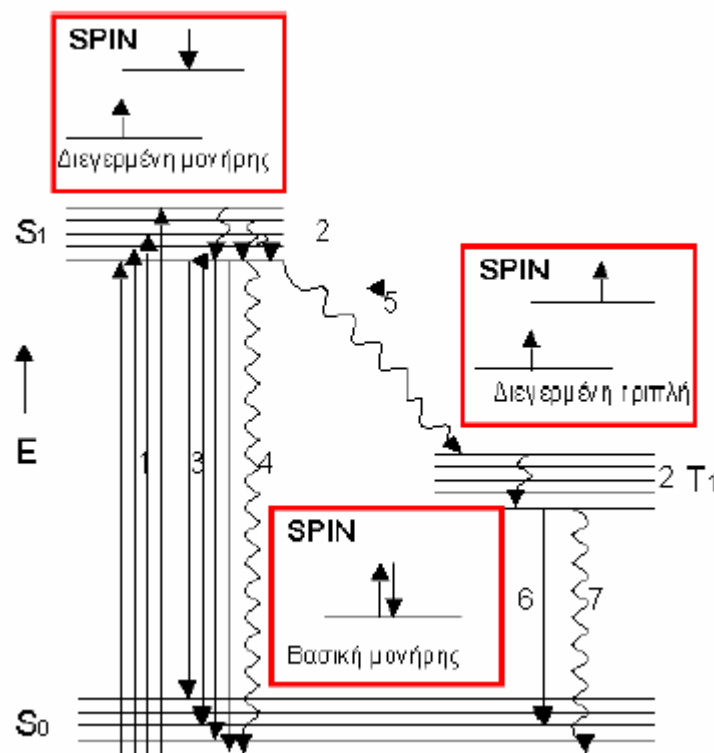
Εικόνα 3.4 Σχηματική αναπαράσταση εκπομπής

ασυνεχές και ονομάζεται line spectrum. Από την άλλη πλευρά, το συνεχές φάσμα είναι αυτό στο οποίο αναπαριστούμε όλα τα μήκη κύματος. Συνεχή φάσματα

παράγονται από την διέγερση α) στερεών ή υγρών, στα οποία τα άτομα είναι τόσο κοντά ώστε να μην μπορούν να έχουν ανεξάρτητη συμπεριφορά β)πολύπλοκων μορίων τα οποία έχουν πολλές στενά συνδεδεμένες ενεργειακές καταστάσεις [9-11].

Τόσο τα line spectrum όσο και τα συνεχή φάσματα είναι ιδιαίτερα σημαντικά. Τα συνεχή φάσματα βρίσκουν εφαρμογές στην φασματοφωτομετρία και τα line spectrums επιτρέπουν τον καθορισμό και την αναγνώριση των ακτινοβολούντων υλικών.

Στην περίπτωση της εκπομπής έχουμε δύο διαφορετικές διεργασίες με διαφορετικά χαρακτηριστικά: τον φθορισμό (fluorescence) και τον φωσφορισμό (phosphorescence). Η βασική διαφορά μεταξύ φθορισμού και φωσφορισμού είναι ο χρόνος που διαρκεί η ακτινοβολία μετά την διέγερση. Στην πρώτη περίπτωση ο χρόνος αυτός είναι της τάξης των 10^{-8} sec ενώ στην δεύτερη από 10^{-5} sec έως 10 sec. Η ερμηνεία των δυο φαινομένων δίνεται σχηματικά με το γνωστό ως διάγραμμα Jablonski, όπου με παράλληλες γραμμές συμβολίζονται η βασική και οι διάφορες διεγερμένες ενεργειακές στάθμες [9-11].



Εικόνα 3.5 Σχηματική αναπαράσταση φαινομένων φθορισμού και φωσφορισμού αντίστοιχα

3.1.3 Σκέδαση

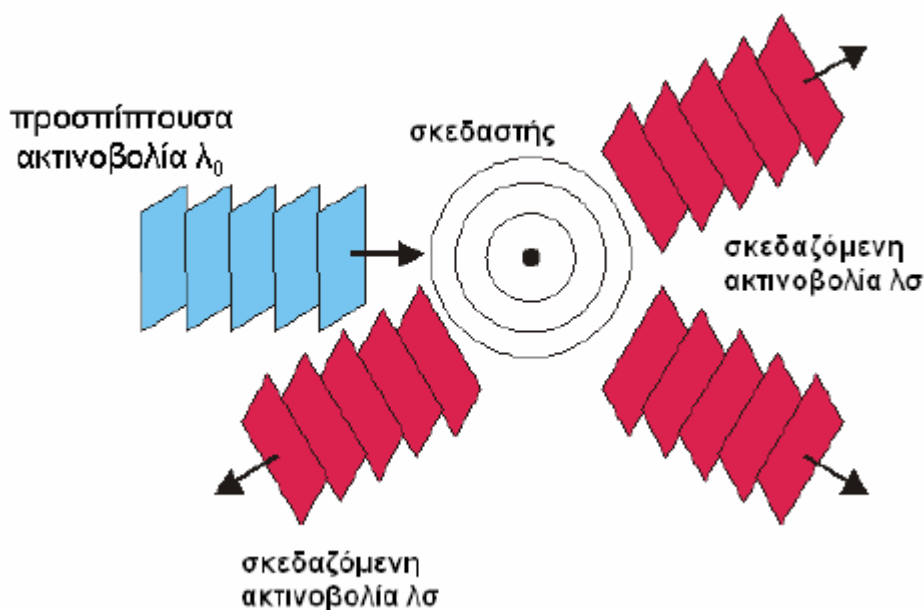
Όταν η ακτινοβολία περνά από ένα μέσο αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε ουσίες με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης, παρατηρούμε το φαινόμενο της ανάκλασης. Το ποσοστό της ανάκλασης αυξάνεται με την αύξηση της διαφοράς στους δείκτες

διάθλασης. Για μια δέσμη που ταξιδεύει κανονικά σε μια επιφάνεια αλληλεπίδρασης, το ανακλώμενο ποσό δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{I_r}{I_o} = \frac{(n_2 - n_1)^2}{(n_2 + n_1)^2}, (3.1)$$

Όπου I_o είναι η ένταση της ακτίνας και I_r είναι η ανακλώμενη ένταση. Τα n_1 και n_2 είναι οι συντελεστές διάθλασης των δύο υλικών [9-11].

Η απορρόφηση ενέργειας από ένα σύστημα (σκεδαστής) από ένα προσπίπτον φωτόνιο και η επανεκπομπή μέρους της ενέργειας του παραπάνω φωτονίου από το ίδιο σύστημα ορίζεται σαν σκέδαση. Το φαινόμενο της σκέδασης εξαρτάται από την φύση του σκεδαστή (υλικό, μέγεθος) και την διάταξη του στο χώρο (τυχαία ή



Εικόνα 3.6 Σχηματική αναπαράσταση φαινομένου σκέδασης

κατανεμημένη). Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία δύναται να έχει διαφορετικό μήκος κύματος λ_o , ένταση, φάση, διεύθυνση διάδοσης και πόλωση από την προσπίπτουσα ακτινοβολία [9-11].

Η ενέργεια του σκεδασθέντος φωτός προέρχεται από την ενέργεια του αρχικού φωτός το οποίο εξασθενεί. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός ακολουθεί διαφορετικούς νόμους ανάλογα με τις διαστάσεις των σωματίων σε σχέση με το

μήκος κύματος. Όταν οι διαστάσεις των σωματιδίων είναι μεγαλύτερες από το μήκος κύματος, η σκεδαζόμενη ένταση είναι σχεδόν ανεξάρτητη από αυτό και συνεπώς, το φως που προκύπτει από την σκέδαση του λευκού φωτός εξακολουθεί να είναι λευκό. Τέτοια περίπτωση έχουμε για παράδειγμα κατά την σκέδαση λευκού φωτός πάνω σε γαλακτώματα ή σε σκόνη κιμωλίας(σκέδαση Tundall) [9-11]

3.1.3.1 Σκέδαση Rayleigh

Η σκέδαση φωτός Rayleigh παρατηρείται για σκεδαστές με μέγεθος μικρότερο του μήκους κύματος λ_0 της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σκέδαση Rayleigh έχει ημιελαστική φύση, διότι το εκπεμπόμενο φωτόνιο μπορεί να έχει την ίδια ή μικρότερη ενέργεια σε σχέση με το προσπίπτον φωτόνιο. Η ένταση IR της Rayleigh-σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με την τέταρτη δύναμη του μήκους κύματος της ακτινοβολίας [9-11]:

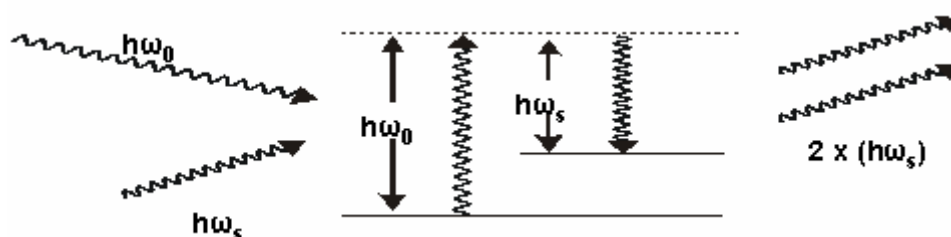
$$I_R \propto \frac{1}{\lambda_o^4}, (3.2)$$

Παραδείγματα φαινομένων σχετιζόμενων με τη σκέδαση Rayleigh:

- Κυανό χρώμα ουρανού, αλλαγή χρωματισμού ουρανού κατά τη δύση και ανατολή του ηλίου.(Οι ιώδεις ακτίνες θα σκεδάζονται πολύ εντονότερα από τις ερυθρές)
- Ο καπνός των τσιγάρων που φαίνεται γαλάζιος από το αναμμένο τσιγάρο ενώ φαίνεται λευκός όταν βγαίνει από το στόμα καθώς η πρόσπτωση του φωτός γίνεται σε εκπεμπόμενα υδρογονοσταγονίδια.
- Απώλειες ενέργειας κατά τη διάδοση ακτινοβολίας σε διάφανα στερεά (οπτικά στοιχεία, κρυστάλλους, οπτικές ίνες).

3.1.3.2 Σκέδαση Raman

Η σκέδαση Raman παρατηρείται κατά την ταυτόχρονη διέλευση δύο φωτονίων συχνοτήτων ω_0 και ω_s ($\omega_s < \omega_0$) από το οπτικό μέσο, όπου το φωτόνιο ω_0 απορροφάται και ένα μέρος του επανεκπέμπεται με την συχνότητα ω_s , του αρχικού συνοδεύοντος φωτονίου. Η σκέδαση Raman παρατηρείται σε στερεά, υγρά και αέρια μέσα διάδοσης. Η ενέργεια $h(\omega_0 - \omega_s)$ εκπέμπεται ως φωτόνιο [9-11].



Εικόνα 3.7 Σχηματική αναπαράσταση σκέδασης Raman

Η σκέδαση Raman παρατηρείται σε στερεά, υγρά και αέρια μέσα διάδοσης.

3.2 Φασματοσκοπία

Η φασματοσκοπία είναι ο επιστημονικός τομέας που ασχολείται με τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη, οι αρχές τις οποίας παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Η φασματομετρία, είναι η μέτρηση αυτής της αλληλεπίδρασης και το απλούστερο όργανο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό, είναι το φασματόμετρο. Η γραφική αναπαράσταση των μετρήσεων αυτών, ονομάζεται φάσμα.

Εφόσον λοιπόν η φασματοσκοπία είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη, είναι απόλυτα λογικό να διαχωρίζεται σε επιμέρους είδη ανάλογα με το φαινόμενο το οποίο μελετά.

Έτσι έχουμε:

- Φασματοσκοπία απορρόφησης
- Φασματοσκοπία εκπομπής

- Φασματοσκοπία σκέδασης

3.2.1 Φασματοσκοπία Απορρόφησης

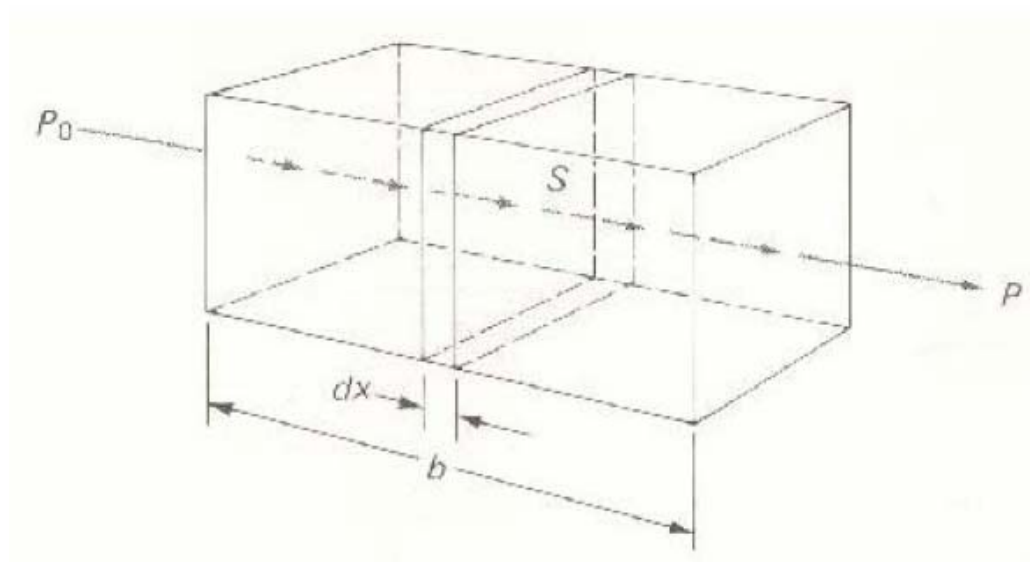
Λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των φωτονίων και των μορίων απορρόφησης, η δύναμη της δέσμης μειώνεται από P_0 σε P . Η μετάδοση (transmittance) T δίνεται από την παρακάτω σχέση [11-13]:

$$T = P / P_0 \text{ , (3.3)}$$

- Η μετάδοση εκφράζεται συχνά ως ποσοστό επί της εκατό(σαν καθαρός αριθμός).
- Η απορροφητικότητα καθορίζεται από την εξίσωση:

$$A = -\log(T) = \log(P / P_0) \text{ , (3.4)}$$

- Σε αντίθεση με την εκπομπή, η απορροφητικότητα αυξάνεται καθώς η εξασθένηση της δέσμης φωτός γίνεται μεγαλύτερη.



Εικόνα 3.8 Εξασθένηση της ακτινοβολίας κατά την διέλευση της από την ύλη

Η απορροφητικότητα ενός διαλύματος είναι ανάλογη με το μήκος που διανύει το φως μέσα στο διάλυμα και την συγκέντρωση του διαλύματος σε συστατικά που απορροφούν την ακτινοβολούμενη ενέργεια [11-13]. Άρα έχουμε:

$$A = abc \text{ , (3.5)}$$

Όπου το a είναι μια σταθερά που ονομάζεται απορροφητική ικανότητα (absorptivity), b είναι το μήκος και c η συγκέντρωση του διαλύματος. Η παραπάνω μαθηματική έκφραση αποτελεί τον νόμο του Beer. Ας πάρουμε σαν παράδειγμα το παραπάνω σχήμα. Μια δέσμη παράλληλης μονοχρωματικής ακτινοβολίας με ενέργεια P_0 πέφτει πάνω στην επιφάνεια του παραλληλεπιπέδου. Αφού διανύσει μήκος b του υλικού, το οποίο περιέχει n σωματίδια που απορροφούν ακτινοβολία (άτομα, ιόντα, μόρια), η ενέργεια της δέσμης ελλατώνεται σε P σαν αποτέλεσμα της απορρόφησης μέρους της ακτινοβολίας. Ας θεωρήσουμε μια διατομή του παραλληλεπιπέδου με εμβαδό S και απειροελάχιστη πυκνότητα dx . Στο εσωτερικό αυτής της επιφάνειας περιέχονται dn σωματίδια που απορροφούν, στα οποία αντιστοιχεί μια περιοχή όπου εγκλωβίζονται φωτόνια. Αυτό σημαίνει ότι μόλις ένα φωτόνιο πλησιάσει μια τέτοια περιοχή, αμέσως θα έχουμε απορρόφηση ακτινοβολίας. Η συνολική προβαλλόμενη περιοχή αυτών των υποπεριοχών που εγκλωβίζουν φωτόνια ορίζεται ως dS . Η αναλογία αυτής της περιοχής σε σχέση με την συνολική επιφάνεια είναι dS/S [11-13].

Η ενέργεια της δέσμης (P_x) που εισέρχεται στο υλικό είναι ανάλογη με τον αριθμό των φωτονίων ανά τετραγωνικό εκατοστό ανά δευτερόλεπτο, και dP_x αναπαριστά την ποσότητα που εξέρχεται ανά δευτερόλεπτο από τη διατομή. Άρα το κλάσμα που απορροφάται είναι dP_x / P_x και ισούται με την μέση πιθανότητα εγκλωβισμού φωτονίων [11-13]. Συνεπώς:

$$-dP_x / P_x = dS / S \quad , (3.6)$$

Το πρόσημο υποδηλώνει ότι το P μειώνεται.

Το dS δίνεται από τη σχέση: $dS = an dx$

Από τις παραπάνω σχέσεις έχουμε, μετά από ολοκλήρωση:

$$-\ln(P / P_0) = an / S \quad , (3.7)$$

η οποία τελικά καταλήγει ύστερα από απλοποιήσεις μονάδων σε

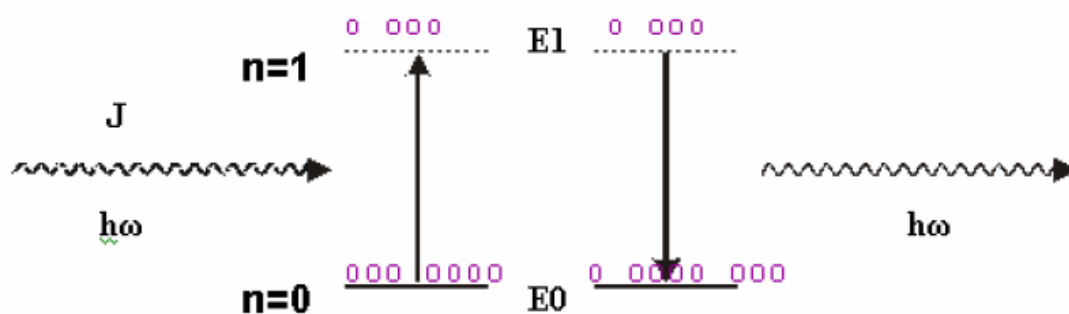
$$A = -\log(P_o / P) \text{ , (3.8) νόμος του BEER.}$$

Ο παραδοσιακός τρόπος για τη μελέτη της φασματοσκοπίας απορρόφησης στην περιοχή της συχνότητας είναι η ομαλή μεταβολή της συχνότητας ή του μήκους κύματος μιας προσπίπτουσας ακτίνας(π.χ. με την περιστροφή ενός πρίσματος), και η καταγραφή των συχνοτήτων που απορροφώνται [11-13]. Το φως διαδίδεται μέσω ενός δείγματος και το ποσό της απορρόφησης εξαρτάται από το μήκος του δείγματος (l), και τη συγκέντρωση του απορροφητή (c), σύμφωνα με τον τύπο

$$I = I_o \exp(-a / c) \text{ , (3.9)}$$

όπου I_o είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτίνας και το I είναι η ένταση της ανακλώμενης ακτίνας. Η προσπίπτουσα ακτίνα συνήθως χωρίζεται στα δύο έτσι ώστε μια ακτίνα μπορεί να θεωρηθεί ως αναφορά, και το I και I_o να μετριοούνται από κοινού. Η παραπάνω έκφραση καλείται νόμος των Beer - Lambert, και το a είναι ο συντελεστής απορρόφησης [11-13].

3.2.2 Φασματοσκοπία Εκπομπής



Εικόνα 3.9 Μετάπτωση ηλεκτρονίου από υψηλή σε χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη, με παράλληλη εκπομπή φωτονίου

Η φασματοσκοπία εκπομπής (emission spectroscopy) διαφέρει από τους υπόλοιπους τύπους διότι δεν απαιτούνται εξωγενείς πηγές ακτινοβολίας. Το ίδιο το δείγμα είναι ο εκπομπός. Η μετάβαση των ηλεκτρονίων του ατόμου από την αρχική κατάσταση $n=0$ στην διεγερμένη κατάσταση $n=1$, με αλληλεπίδραση θερμικής

ακτινοβολίας πυκνότητας ενέργειας J και συχνότητας ω όπου $h\omega = E_1 - E_0$, ονομάζεται απορρόφηση (absorption). Η μετάπτωση από τη διεγερμένη κατάσταση $n=1$ στην αρχική κατάσταση $n=0$, με την ταυτόχρονη εκπομπή ενός φωτονίου με συχνότητα ω , όπου $h\omega = E_1 - E_0$, ονομάζεται εκπομπή (emission) [11-13].

3.2.3 Φασματοσκοπία Σκέδασης

Η φασματοσκοπία σκέδασης, μετράει το ποσοστό της ακτινοβολίας που σκεδάζεται από την ύλη σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και υπό μια καθορισμένη γωνία. Η διαδικασία της σκέδασης, είναι αρκετά πιο γρήγορη από τις διαδικασίες εκπομπής και απορρόφησης αντίστοιχα. Μία από τις πιο ευρέως διαδεδομένες μορφές φασματοσκοπίας σκέδασης είναι η φασματοσκοπία Raman [11-13].

3.3 Μέθοδοι Φασματοσκοπίας

Οι μέθοδοι φασματοσκοπίας, δηλαδή οι διατάξεις και οι διαδικασίες που ακολουθούνται προκειμένου να μελετηθεί η αλληλεπίδραση του φωτός με την ύλη, μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες σύμφωνα με την ιδιότητα του αντικειμένου το οποίο θα μελετηθεί.

Συγκεκριμένα, η πιο απλή μορφή φασματοσκοπίας, είναι αυτή που αφορά τη μέτρηση για ένα μοναδικό σημείο, και ονομάζεται αντίστοιχα φασματοσκοπία σημείου. Στην περίπτωση αυτή, οι διατάξεις που χρησιμοποιούνται, είναι πολύ απλές και συνήθως αποτελούνται από ένα φασματόμετρο και μία οπτική ίνα.

Στην περίπτωση, που η μέτρηση πρέπει να γίνει σε δυσδιάστατες εικόνες, τότε χρησιμοποιούνται πιο πολύπλοκες διατάξεις, και οι μέθοδοι που εφαρμόζονται συνήθως είναι η πολυφασματική ή η υπέρφασματική απεικόνιση.

3.3.1 Πολυφασματική και Υπερφασματική Απεικόνιση

Η ανάλυση δομικά ανομοιογενών φυσικών αντικειμένων, όπως είναι οι ανθρώπινοι ιστοί, απαιτεί την ανάπτυξη απεικονιστικών συστημάτων ικανών να παράσχουν πληροφορίες για την σύσταση και την δομή τους σε κάθε χωρικό σημείο της υπό ανάλυση περιοχής. Ουσιαστικά το ζητούμενο στις εφαρμογές αυτές είναι η ανάπτυξη μιας νέας τεχνολογίας μέσω της οποίας θα καθίσταται δυνατή η μέτρηση των φασματικών χαρακτηριστικών ενός μεγάλου αριθμού σημείων του υπό εξέταση ανομοιογενούς πεδίου, ταυτόχρονα και εξ αποστάσεως. Αντίστοιχο αποτέλεσμα με την συμβατική τεχνολογία θα μπορούσε να επιτευχθεί με την χρήση ενός μεγάλου αριθμού φασματόμετρων (πάνω από 500.000) σε παράλληλη διάταξη, όπου κάθε ένα από αυτά καταγράφει φασματική πληροφορία από ένα επιμέρους χωρικό σημείο [14]. Είναι προφανές ότι η προσέγγιση αυτή είναι ασύμφορη και πρακτικά μη υλοποιήσιμη.

Η προσπάθεια συνδυασμένης καταγραφής χωρικής και φασματικής πληροφορίας ξεκίνησε εδώ και αρκετά χρόνια με κύριο πεδίο εφαρμογής τις επιστήμες περιβάλλοντος και της δορυφορικής παρατήρησης. Οι πρώτες προσεγγίσεις βασίζονταν στην χρήση δέσμης οπτικών ινών σε γραμμική διάταξη η οποία μετέφερε το ανακλώμενο φως από μια διαμήκη περιοχή του εξεταζόμενου πεδίου σε έναν μονοχρωμάτορα. Η διάταξη αυτή επιτρέπει την καταγραφή φασματικής πληροφορίας κατά μήκος της μίας χωρικής διάστασης. Η καταγραφή 2-διάστατης πληροφορίας απαιτεί σάρωση του πεδίου κατά μήκος της άλλης διάστασής του, η οποία στις προαναφερθείσες εφαρμογές εξασφαλίζεται με την κίνηση της φέρουσας το σύστημα πλατφόρμας (π.χ. δορυφόρος).

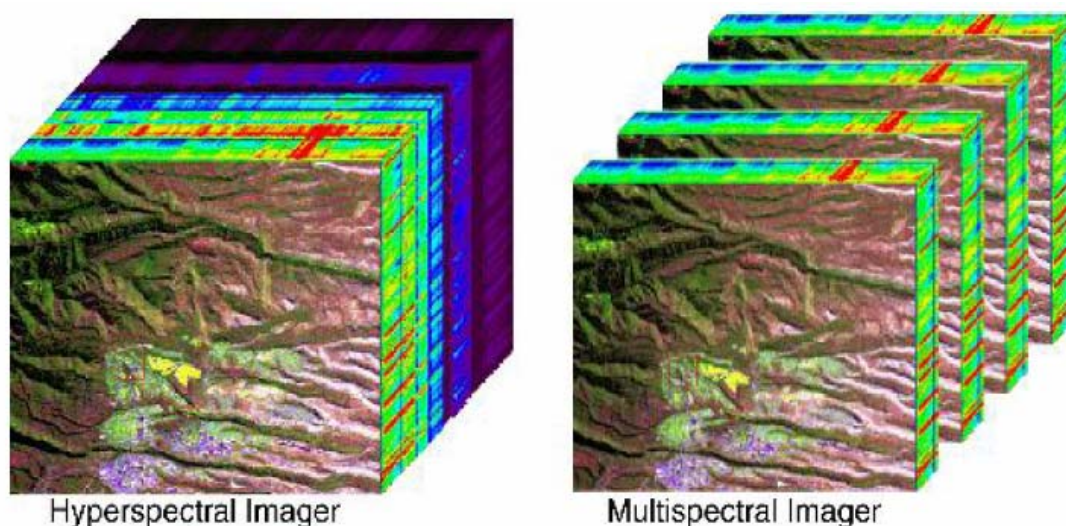
Είναι προφανές ότι η τεχνολογία αυτή απαιτεί απόλυτη σταθερότητα σχετικής θέσης της μετρητικής διάταξης, σε σχέση με την μετρούμενη περιοχή. Ένας άλλος περιορισμός είναι ότι δεν είναι δυνατή η σε πραγματικό χρόνο παρατήρηση και η

καταγραφή της εικόνας του αντικειμένου μια και αυτή μπορεί να κατασκευαστεί από την χωρική κατανομή των φασματικών εντάσεων και μόνο μετά την ολοκλήρωση της χωρικής σάρωσης. Πέραν του κόστους και της απαιτούμενης υπολογιστικής ισχύος τα προαναφερθέντα τεχνικά χαρακτηριστικά δεν ικανοποιούν τις απαιτήσεις ενός μεγάλου αριθμού δυνητικών εφαρμογών. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια άρχισε να διερευνάται η δυνατότητα χρήσης 2-διάστατων απεικονιστικών ανιχνευτών για την καταγραφή διακεκριμένων φασμάτων σε κάθε εικονοστοιχείο τους. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη απεικονιστικών μονοχρωμάτορων οριοθετώντας την σύνθεση διαφόρων μεθόδων και τεχνολογιών απεικόνισης και φασματοσκοπίας και την ανάπτυξη συστημάτων Πολυφασματικής και Υπερφασματικής Απεικόνισης με σαφώς αναβαθμισμένες διαγνωστικές δυνατότητες [14]. Στα συστήματα Πολυφασματικής απεικόνισης, οι απεικονιστικοί μονοχρωμάτορες, οι σχετικά απλές διατάξεις και επιτρέπουν την λήψη εικόνων σε δέκα ή λιγότερες διαφορετικές περιοχές του οπτικού φάσματος. Αντίθετα στην περίπτωση της Υπερφασματικής απεικόνισης οι μονοχρωμάτορες επιτρέπουν την λήψη διαδοχικών εικόνων σε 30-100 διαφορετικές περιοχές του οπτικού φάσματος και ως εν τούτου η τεχνολογία τους είναι πολύ υψηλού επιπέδου και σε αρκετές περιπτώσεις εμπιστευτική.

Η υπάρχουσα τεχνολογία συστημάτων Υπερφασματικής Απεικόνισης συνίσταται ουσιαστικά σε ειδικά φίλτρα τα οποία συζευγνύονται οπτικά με απεικονιστικούς ανιχνευτές οι οποίοι καταγράφουν τις διερχόμενες από το φίλτρο στενές φασματικά εικόνες. Τα εν λόγω φίλτρα έχουν την ιδιότητα να αλλάζουν την φασματική περιοχή στα οποία αυτά είναι διαπερατά, κάτω από την επίδραση μεταβαλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου [14]. Έτσι, αντί της χωρικής σάρωσης η τεχνολογία αυτή βασίζεται στην φασματική σάρωση, η οποία επιτρέπει την παρατήρηση σε πραγματικό χρόνο και την καταγραφή στενών φασματικά εικόνων με

την δυνατότητα άμεσης επιλογής του μήκους κύματος απεικόνισης. Ακόμη, παρέχεται η δυνατότητα αποθήκευσης διαδοχικών εικόνων κατά μήκος του φάσματος με αρκετά μεγάλη ταχύτητα και δυνητικά ο μετέπειτα υπολογισμός των φασμάτων σε διάφορα χωρικά σημεία από τις καταχωρημένες εικόνες .

Οι μονοχρωμάτορες είναι ταξινομημένοι βάση της τεχνολογίας που εφαρμόζουν. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες μονοχρωμάτορων απεικόνισης: τα ακουστικοοπτικά μεταβλητά φίλτρα (AOTF), τα μεταβλητά φίλτρα υγρών κρυστάλλων (LCTF) και τα μετασχηματισμένα Fourier παρεμβαλλόμετρα (FTI) [14].



Εικόνα 3.10 Υπερφασματική και Πολυφασματική απεικόνιση

Η ολοκλήρωση των υπερφασματικών τεχνολογιών στα κοινά οπτικά μικροσκόπια, οδηγούν στην ανάπτυξη ενός πολύτιμου διαγνωστικού εργαλείου και τα πρόσφατα ερευνητικά αποτελέσματα έχουν καταδείξει τη μεγάλη δυνατότητα της φασματικής απεικόνισης στη μικροσκοπία. Αφ' ετέρου διάφοροι περιορισμοί αυτών των συσκευών έχουν αναφερθεί όπως η περιορισμένη φασματική έκταση (AOTFs, LCTFs), χαμηλή ρυθμοαπόδοση (AOTFs, LCTFs), εικόνα που μετατοπίζεται κατά τη διάρκεια ρύθμισης του μήκους κύματος (AOTFs), μη-πραγματική χρονική φασματική απεικόνιση (FTI), χρονοβόρα απόκτηση (FTI).

Επιπλέον τα σχετικά εξαρτήματα-όργανα είναι σε όλες τις περιπτώσεις ακριβά, λεπτά και περίπλοκα. Αυτοί οι τεχνολογικοί περιορισμοί αποτρέπουν τη δυνατότητα εφαρμογής αυτών των συστημάτων στην *in vivo* (εντός του οργανισμού), μη καταστρεπτική ανάλυση των ζωντανών ιστών. Σε αυτόν τον τομέα εφαρμογής, οι απαιτήσεις για την απόδοση συστημάτων είναι υψηλές, επειδή, σε αντίθεση με αυτό που συμβαίνει στη μικροσκοπία, η γεωμετρία φωτισμός-απεικόνισης δεν μπορεί να ελεγχθεί με μεγάλη ακρίβεια.

Η φασματική ανάλυση των ζωντανών ιστών απαιτεί την ανάπτυξη προηγμένων μονοχρωμάτορων απεικόνισης που πρέπει να συνδυάζουν τα ακόλουθα τεχνικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα:

- A. φασματική απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο για την επιθεώρηση και την εστίαση
- B. υψηλή φασματική ανάλυση και ευρεία φασματική έκταση
- C. υψηλή ρυθμοαπόδοση προκειμένου να αποφευχθούν η μακροχρόνια έκθεση και έντονη διέγερση από το φως,
- D. γρήγορη σύλληψη των ακολουθιών εικόνας έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επιρροή των μικροκινήσεων στην εγγραφή της εικόνας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πειραματική Διαδικασία

Πολλές ερευνητικές ομάδες διεθνώς, θέλοντας να μελετήσουν εξελικτικά διάφορες ασθένειες του ανθρώπινου οργανισμού, προσανατολίστηκαν στην χρήση ζωικών πειραματικών μοντέλων, ανάλογα με την παθογένεια της νόσου.

Στην περίπτωση της μελέτης διάφορων καρκινικών αλλοιώσεων, αλλά και της κατανόησης των μηχανισμών ογκογένεσης που διέπουν την καρκινική νόσο, το πιο ευρέως διαδεδομένο ζωικό μοντέλο για πολλές πειραματικές μεθόδους, είναι το ποντίκι. Οι ιδιότητες του συγκεκριμένου ζώου, το οποίο είναι θηλαστικό με ιδιαίτερα ομοιογενές γενετικό υπόβαθρο, λόγω της ύπαρξης πληθυσμιακών σειρών με έντονα στοιχεία κληρονομικότητας, καθώς και το γεγονός ότι, διαθέτει παρόμοιους βιολογικούς μηχανισμούς και ανοσοποιητικό σύστημα με τον ανθρώπινο οργανισμό, είναι οι βασικές αιτίες που καθιστούν το ποντίκι ως το πλέον αξιόπιστο πειραματικό μοντέλο μελέτης [15].

4.1 Ανάπτυξη και Μελέτη Μελανώματος σε Ποντίκια

Σε αντίθεση με τα προηγούμενα, και όσον αφορά την μελέτη των καρκινικών αλλοιώσεων του δέρματος αλλά και την εν γένει ανάπτυξη μελανωμάτων στον οργανισμό, τα ποντίκια παρουσιάζουν ιδιαίτερα σημαντικά προβλήματα, αφού, ακόμα και έπειτα από μακροχρόνια έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV - radiation), η οποία σύμφωνα με μελέτες είναι ο σημαντικότερος παράγοντας

δερματικών καρκινωμάτων στον άνθρωπο, δεν είναι εφικτό να παρουσιάσουν αντίστοιχες δερματικές αλλοιώσεις [15,56].

Για το λόγο αυτό, και προκειμένου να γίνει εφικτή η μελέτη και η ανάπτυξη μελανωμάτων στο δέρμα των ποντικών, θα πρέπει να αναπτυχθούν κατάλληλα βιολογικά μοντέλα, τα οποία θα εξασφαλίζουν την δημιουργία δερματικών αλλοιώσεων με έναν απόλυτα ελεγχόμενο ρυθμό.

Κατευθυνόμενοι προς αυτό το σκοπό, πολλοί επιστήμονες σε διάφορα ερευνητικά κέντρα του κόσμου, προσπάθησαν να επιτύχουν την ανάπτυξη τέτοιου είδους καρκινωμάτων, μέσω της εφαρμογής κατάλληλων πρωτοκόλλων καρκινογένεσης, με τελικά ποσοστά επιτυχίας τα οποία κυμαίνονται μεταξύ του 5 - 40% επί του συνόλου των περιπτώσεων, και έπειτα από την πάροδο μιας μεγάλης λανθάνουσας περιόδου [15-19].

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η πιο επιτυχημένη μέθοδος από τα διάφορα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν, είναι αυτή που στηρίζεται στην διοχέτευση της χημικής ουσίας DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene), η οποία μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη μελανωμάτων σε ένα ποσοστό 30 – 35%, εφόσον εφαρμοστεί σε νεογέννητα ποντίκια ηλικίας 4 – 7 ημερών που ανήκουν στον γενετικό τύπο C57/BL. Ο ηλικιακός περιορισμός που ισχύει σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να οφείλεται ενδεχομένως σε μία ιδιαιτερότητα που παρουσιάζουν τα ποντίκια σε σχέση με τον άνθρωπο, αφού το ανοσοποιητικό τους σύστημα, δεν είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένο όταν είναι νεογέννητα, γεγονός που τα κάνει ιδιαίτερα ευαίσθητα. Έχει δε αποδειχθεί πειραματικά, ότι αν διοχετευθεί η συγκεκριμένη ουσία (DMBA) σε ποντίκια ηλικίας άνω των 15 ημερών, τότε τα ποντίκια αυτά θα παρουσιάσουν κονδυλώματα, τα οποία είτε θα καταπολεμηθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα, είτε

σε μικρότερο ποσοστό, θα εξελιχθούν σε καρκίνο αρχικού σταδίου χωρίς ιδιαίτερη σημασία [15,19,55,56].

Τα τελευταία χρόνια, ένα αυξανόμενο πλήθος πληροφοριών έχει προκύψει που αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων που επιδρούν στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου. Επίσης, η διαθεσιμότητα γενετικά και μη γενετικά τροποποιημένων ζώων, στην προσπάθεια καρκινογένεσης αλλά και γονιδιακής καταστολής των όγκων, επέτρεψε στους επιστήμονες την *in vivo* μελέτη και την αξιοποίηση των πληροφοριών από τις γενετικές μεταβολές κατά την ανάπτυξη μελανωμάτων.

Συγκεκριμένα, γενετική ανάλυση παθολογοανατομικών δειγμάτων, από έναν αριθμό περιστατικών με έντονες καρκινικές αλλοιώσεις, είχε ως αποτέλεσμα την παρατήρηση της ύπαρξης μετάλλαξης στο CDKN2A χρωμόσωμα, σε ένα ποσοστό της τάξης του 10% επί του συνόλου αυτών των περιστατικών. Το συγκεκριμένο χρωμόσωμα περιέχει δύο πρωτεΐνες, γνωστές ως INK4a (ή p16) και ARF. Η πρωτεΐνη INK4a είναι ένας αναστολέας Κινάσης εξαρτωμένης από Κυκλίνες (cyclin-dependent kinase, CDK), η οποία συγκεκριμένα αναστέλλει και εμποδίζει τις CDK4 και CDK6 Κινάσες. Αυτές οι Κινάσες, δημιουργούν ένα σύμπλεγμα δεσμών με τις Κυκλίνες D-τύπου (D-type cyclins), με αποτέλεσμα να ελέγχουν τις εισόδους του κυτταρικού κύκλου μέσω φωσφορυλίωσης και αδρανοποίησης της πρωτεΐνης ρετινοβλαστόματος Rb. Επιπλέον μοριακή ανάλυση δειγμάτων ανθρώπινου μελανώματος, είχε ως αποτέλεσμα την παρουσίαση διάφορων γονιδίων με εναλλακτικούς τύπους έκφρασης. Το μεταβολικό μονοπάτι της MAP Κινάσης, που είναι μία διακλάδωση στο μεταβολικό μονοπάτι της MAPK, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη μελανώματος, μέσω της ανακάλυψης υψηλής συχνότητας μεταλλάξεων του BRAF που οδηγεί σε ενεργοποίηση του ERK σήματος [15,16].

Στην περίπτωση των ποντικών, έχει παρατηρηθεί ότι τα ζώα που παρουσιάζουν ανεπάρκεια του γονιδίου καταστολής των όγκων, *Ink4a*, και είναι ετεροζυγωτά στο *Arf* (*Ink4a*^{-/-} : *Arf*^{+/-}), αναπτύσσουν μελανώματα με μία συχνότητα της τάξης του 50%, έπειτα από τη χορήγηση της ουσίας DMBA για εννέα μήνες. Τα γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, που έχουν μετάλλαξη στην Κινάση 4 (*cdk4* R24C) μπορούν να αναπτύξουν μελανώματα σε ένα ποσοστό της τάξης του 70%, έπειτα από 20 εβδομάδες κατάλληλης αγωγής [15,19,55,56].

4.1.1 Προηγούμενες Μελέτες

Όπως μπορεί να γίνει κατανοητό, μέχρι σήμερα πολλοί μελετητές έχουν ασχοληθεί με τον τομέα της ανάλυσης και της κατανόησης των μηχανισμών ανάπτυξης και εξέλιξης των μελανωμάτων σε οργανισμούς ποντικών, με διάφορα αποτελέσματα.

Συγκεκριμένα οι *Berkelhammer* και συν.[20], μελέτησαν την δημιουργία καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων του δέρματος, μέσω της εφαρμογή του καρκινογόνου χημικού DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) καθώς και ενός εκχυλίσματος που εμπεριέχει μείγμα εστέρων το οποίο δρα ως επαγωγέας κυτταρικής διαίρεσης (croton oil) σε εργαστηριακά ποντίκια C57BL/6. Στην συγκεκριμένη έρευνα, εξετάστηκαν 70 ποντίκια εκ των οποίων τα 17 μετά την θεραπεία με τα προαναφερθέντα χημικά, εμφάνισαν κακοήρεις όγκους. Η εφαρμογή του croton oil πραγματοποιήθηκε σε εβδομαδιαία βάση και το διάστημα που απαιτήθηκε για την εμφάνιση των όγκων ήταν 11 μήνες περίπου.

Παράλληλα με την εμφάνιση μελανωμάτων, στα ζώα αναπτύχθηκαν και άλλες αλλοιώσεις του δέρματος, όπως μαικτοί και δυσπλαστικοί σπίλοι, στοιχείο ιδιαίτερα σημαντικό καθώς μπορούν να ερευνηθούν οι αλλοιώσεις συνολικά και να εξαχθούν συμπεράσματα όσον αφορά τις διαφορές στην ανάπτυξη τους.

Στην συνέχεια οι *Junko S. Suzuki και συν.*[21], επιχείρησαν να ερμηνεύσουν τον ρόλο που διαδραματίζει η πρωτεΐνη μεταλλοθειονίνη (MT) στην καρκινογένεση. Για τον σκοπό αυτό μελέτησαν την δράση της χημικής ουσίας DMBA σε συνδυασμό με κατάλληλο μείγμα εστέρων (TPA), ώστε να επιτευχθεί κυτταρική διαίρεση, όχι μόνο σε απλά εργαστηριακά ποντίκια (Wild-Type) αλλά και σε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια απουσία της πρωτεΐνης μεταλλοθειονίνης (MT - null). Η χορήγηση του (TPA) γινόταν σε εβδομαδιαία βάση και με συνολική διάρκεια 20 εβδομάδων. Μετά τις 20 εβδομάδες το σύνολο των γενετικά τροποποιημένων ποντικίων, παρουσίασαν δερματικές αλλοιώσεις, σε αντίθεση με τα Wild-Type ποντίκια τα οποία παρουσίασαν αλλοιώσεις μόνο σε ποσοστό 10 - 40%. Η συγκεκριμένη έρευνα αποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη μεταλλοθειονίνη δρα αποτρεπτικά στην δημιουργία όγκων τόσο σε αρχικά όσο και σε επόμενα στάδια.

Διάφορες άλλες ερευνητικές ομάδες, όπως οι *Eva Gonzales-Suares και συν.*[22] αλλά και οι *Bai Y. και συν.*[23], τα τελευταία χρόνια προσπάθησαν με την χορήγηση διάφορων χημικών ουσιών να προκαλέσουν δερματικές αλλοιώσεις σε ποντίκια είτε Wild-Type είτε γενετικά τροποποιημένα. Σκοπός των ερευνών τους, ήταν να μελετηθεί η διαδικασία που ακολουθείται κατά την διάρκεια της δημιουργίας μιας αλλοίωσης καθώς και η επίδραση κάποιων πρωτεϊνών στην δημιουργία αλλοιώσεων στο δέρμα.

Η επαγωγή της χημικής καρκινογένεσης στο ποντίκι, είναι ένα από τα πλέον καθιερωμένα πρωτόκολλα για τον χαρακτηρισμό των μοριακών διαδικασιών που συμμετέχουν σε αυτή. Στη βιομηχανία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση προστατευτικών ουσιών με αντικαρκινική δράση.

4.1.2 Ανάλυση Βιολογικού Μοντέλου της Συγκεκριμένης Διατριβής

Στην παρούσα διατριβή, της οποίας σκοπός ήταν η κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης και εξέλιξης του καρκίνου του δέρματος αλλά και η ανάπτυξη κατάλληλης μεθόδου για την *in vivo* έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση των καρκινικών αλλοιώσεων, περιγράφεται η επιτυχής εφαρμογή του πρωτοκόλλου χημικής καρκινογένεσης στο δέρμα των ποντικών, και η χρήση των πειραματόζωων για την μελέτη των αλλαγών που παρατηρούνται στο δερματικό ιστό, κατά την εξέλιξη της νόσου, μέσω μέθοδο φασματικής απεικόνισης. Έτσι δίδεται η δυνατότητα παρακολούθησης της αλλοίωσης από τα αρχικά στάδια δημιουργίας της, μέχρι την τελική της κατάληξη.

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο Πολυτεχνείο Κρήτης και συγκεκριμένα στο τμήμα Ηλεκτρονικών Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών. Κατά τη διάρκεια της μελέτης υπήρχε ιδιαίτερη συνεργασία με το Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων (Μ.Α.Ι.Χ.) και τους εκεί καθηγητές κ. Μακρή Αντώνιο και κ. Καμπράνη Σωτήριο, καθώς και με την Ιατρική Σχολή Ηρακλείου και ειδικότερα τον Λέκτορα κ. Χρήστο Τσατσάνη. Τηρήθηκαν δε στο ακέραιο, όλα τα απαραίτητα πρωτόκολλα της Ιατρικής Σχολής, που διασφαλίζουν τις σωστές συνθήκες διαβίωσης στα πειραματόζωα, ενώ είχαν τεθεί στην διάθεση μας 21 εργαστηριακά ποντίκια τύπου C57/BL.

Στα ζώα, εμπεριέχονταν και αρσενικά και θηλυκά ενώ οι λόγοι για τους οποίους οδηγηθήκαμε στην επιλογή του συγκεκριμένου τύπου, είναι καταρχάς το γεγονός ότι ο συγκεκριμένος γενότυπος είναι ευρέως διαδεδομένος και επομένως ιδιαίτερα καλοχαρακτηρισμένος, παρουσιάζει δε έντονη ευαισθησία στην ανάπτυξη καρκινικών αλλοιώσεων και επιτρέπει την γενετική τροποποίηση του. Το τελευταίο, κρίνεται ιδιαίτερα σημαντικό, αφού από τη δεκαετία του '80 περίπου, έχουμε τη

δυνατότητα να μεταλλάσουμε γενετικά ποντίκια, προκαλώντας απουσία κάποιων πρωτεϊνών από τον οργανισμό τους, και επομένως είναι δυνατό να παρατηρηθεί στη συνέχεια, η συμπεριφορά της πρωτεΐνης αυτής στην καρκινογένεση.

Σύμφωνα με μέχρι τώρα μελέτες, τα αναμενόμενα ποσοστά καρκινογένεσης στο δέρμα των Wild-Type ποντικών του τύπου C57/BL, κυμαίνεται περίπου στο 30% των συνολικών περιπτώσεων. Με βάση αυτή τη θεώρηση και λόγω διαθεσιμότητας αλλά και επιστημονικού ενδιαφέροντος, αποφασίσαμε εκτός από τα wild-Type ποντίκια, να μελετήσουμε και μια σειρά ποντικών που είχαν δεχτεί αδρανοποίηση (Knockouts) και στα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου Trp12 (Trp12^{-/-}). Το Trp12 είναι μία Κινάση Σερίνης Θρεονίνης, πρωτεΐνη η οποία φαίνεται να συμμετέχει σε ένα μεγαλομοριακό σύμπλεγμα πρωτεϊνών που συμμετέχουν καθοριστικά στην επαγωγή μηνυμάτων καρκινογένεσης στο κύτταρο.

Συγκεκριμένα προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι το Trp12, ενεργοποιεί τα μεταβολικά μονοπάτια των ERK, JNK και p38. Η έλλειψη της πρωτεΐνης Trp12, διακόπτει την ενεργοποίηση των ERK1 και ERK2 και επιδρά αρνητικά στην παραγωγή του TNF – α (Tumor Necrosis Factor – α) [24-27]. Η απουσία δηλαδή της πρωτεΐνης αυτής, θα μπορούσε δυνητικά να προκαλέσει ή τουλάχιστον να διευκολύνει την ανάπτυξη μελανωμάτων στον οργανισμό. Η μελέτη αυτής της συμπεριφοράς και τα αποτελέσματα της, που θα αναλυθούν ακολούθως, αποτελεί το καινοτόμο στοιχείο της συγκεκριμένης διατριβής από την σκοπιά της βιολογικής προσέγγισης του πειράματος.

Εν τέλει, και σύμφωνα με τα παραπάνω, από τα 21 ποντίκια που τέθηκαν στη διάθεση μας, 15 εξ αυτών ήταν Trp12^{-/-} ενώ τα υπόλοιπα 6 ήταν Wild-Type C57/BL. Στο σύνολο των ποντικών, έγινε κατάλληλη θεραπεία με σκοπό την εμφάνιση

καρκινικών αλλοιώσεων (μελανώματα) στη ράχη τους, ενώ η συνολική διάρκεια της μελέτης ήταν περίπου 18 μήνες.

Όσον αφορά τη διαδικασία της καρκινογένεσης, σε όλα τα ζώα εφαρμόστηκε ένα διάλυμα DMBA, σε συνδυασμό με ένα φυτικό εκχύλισμα που περιέχει μείγμα εστέρων και που δρα ως παράγοντας κυτταρικής διαίρεσης (croton oil). Η χρήση του croton oil, στηρίζεται στα διάφορα πρωτόκολλα καρκινογένεσης, χωρίς όμως να είμαστε 100% σίγουροι για τη σημαντικότητα του. Η λογική πάντως της χορήγησης του, στηρίζεται στην θεώρηση ότι, εφόσον έχουν αναπτυχθεί μεταλλαγμένα κύτταρα στο δέρμα λόγω του DMBA, μπορεί να βοηθηθεί η εξάπλωση τους, και επομένως η ανάπτυξη όγκων, μέσω συστατικών κυτταρικής διαίρεσης. Όσον αφορά την επιλογή φυτικού μείγματος εστέρων, αντί για καθαρό εστέρα, οι λόγοι αφορούσαν το χρηματικό κόστος αλλά και την εικασία ότι το μείγμα ίσως να είναι πιο αποτελεσματικό από την καθαρή ουσία.

Η χορήγηση του DMBA, έγινε αποκλειστικά σε μία δόση, ενώ ανά 10 ημέρες πραγματοποιούνταν επάλειψη με croton oil, στην ίδια περιοχή, που όπως αναφέρθηκε είχε ως στόχο την περαιτέρω διαίρεση των κυττάρων.

Συγκεκριμένα, και στα 21 συνολικά ποντίκια, ηλικίας 2 – 6 ημερών, χορηγήθηκαν 50μl περιεκτικότητας 0,4% σε DMBA, με επάλειψη στην επιλεγμένη περιοχή, πάνω στην ξυρισμένη πλάτη των ζώων. Δέκα ημέρες αργότερα, 25μl περιεκτικότητας 2,5% σε croton oil, εφαρμόστηκε στην ίδια περιοχή επάλειψης. Η διαδικασία εφαρμογής του croton oil συνεχίστηκε ανά κάθε 10 ημέρες έπειτα από την πρώτη εφαρμογή του, για ένα διάστημα 5 μηνών περίπου [46,47], όταν και δύο ποντίκια από την κάθε ομάδα, θυσιάστηκαν προκειμένου να ληφθούν βιοψίες για να εξεταστεί ο ρυθμός ανάπτυξης και εξέλιξης της νόσου. Πρέπει να σημειωθεί ότι για την καλύτερη εφαρμογή του croton oil στα ζώα, μετά το πέρας του πρώτου μήνα της

ζωής τους, ξυρίζονταν η περιοχή της επάλειψης, διαδικασία που ακολουθήθηκε μέχρι την δωδέκατη εβδομάδα εφαρμογής του.

Τα εναπομείναντα ζώα, οδηγήθηκαν σε συνέχιση της εν λόγω θεραπείας για περίπου 12 μήνες ακόμα. Στο διάστημα αυτό, το σύνολο των ποντικών απεικονίζονταν από το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης, διαδικασία που θα αναλυθεί πλήρως σε επόμενες ενότητες, ενώ μερικά εξ' αυτών (των ποντικών) θυσιάστηκαν επιλεκτικά και σε τυχαία χρονικά διαστήματα προκειμένου να εξαχθούν παθολογοανατομικά ιατρικά συμπεράσματα.

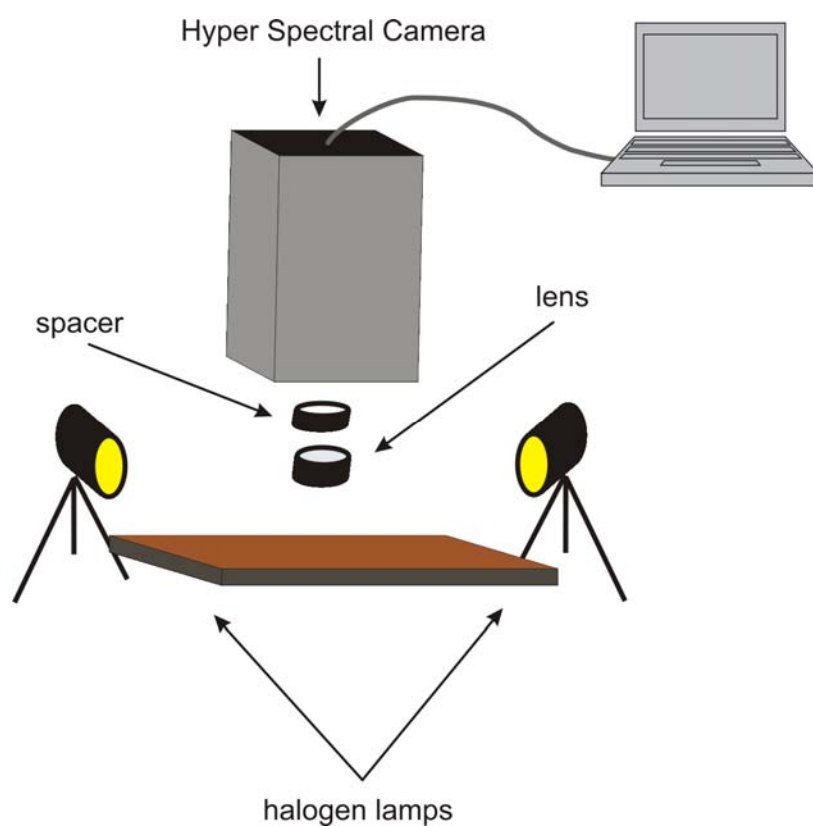
Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι, έπειτα από την πάροδο 15 ημερών από την έναρξη της διαδικασίας, λόγω της επάλειψης με DMBA, η περιοχή εφαρμογής γίνεται υπερμελανωτική (δηλαδή μαύρη) φαινόμενο απόλυτα φυσιολογικό και αναμενόμενο βάση της βιβλιογραφίας, αφού υπάρχει βιολογική αντίδραση εξαιτίας της χημικής ουσίας, το οποίο σταδιακά θα πρέπει να υποχωρήσει και να παραμείνουν οι σπίλοι που έχουν δημιουργηθεί. Πέρα όμως από αυτό, στην συγκεκριμένη μελέτη, σχεδόν όλα τα ζώα παρουσίασαν έντονη ανοσολογική απάντηση στην εφαρμογή του DMBA, με αποτέλεσμα την πρόκληση εκτεταμένης φλεγμονής στη περιοχή της επάλειψης, λόγω της κερατινοποίησης του ιστού.

Αυτό καθιστούσε αδύνατη την υπερφασματική μελέτη των σημείων καθώς οι εικόνες που λαμβάναμε μέσω του συστήματος της οπτικής βιοψίας περιείχαν υπερβολικό θόρυβο. Επομένως, εφόσον η φλεγμονή, δεν ήταν δυνατόν να αφαιρεθεί με οποιοδήποτε τρόπο, το αποτέλεσμα ήταν να καθυστερήσει η διεξαγωγή των μετρήσεων για το χρονικό διάστημα που απαιτούνταν μέχρι τη φυσιολογική απομάκρυνση και αυτοίωση της. Βεβαίως κατά τη διάρκεια αυτή συνεχίστηκε κανονικά η φαρμακευτική αγωγή (επάλειψη με croton oil), και 3 ακόμη ποντίκια

στάλθηκαν στον παθολογοανατόμο για εργαστηριακή μελέτη μέσω μεθόδων δειγματοληπτικής βιοψίας.

4.2 Σύστημα Υπερφασματικής Απεικόνισης (HySI)

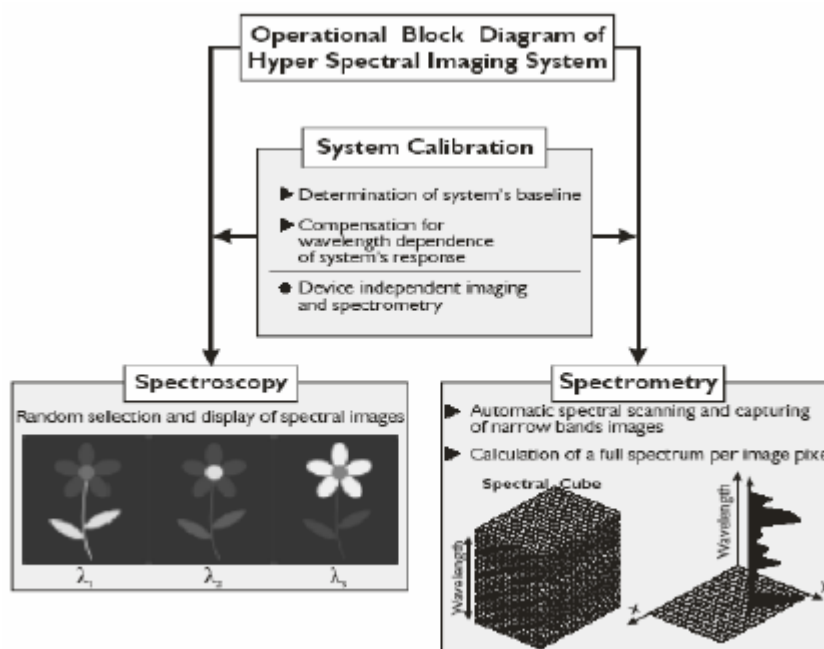
Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν από ένα υπερφασματικό σύστημα απεικόνισης και η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στην εικόνα 4.1.



Εικόνα 4.1 Πειραματική διάταξη για τη διεξαγωγή μετρήσεων

Το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης που χρησιμοποιήθηκε, είναι βασισμένο σε έναν όλο-οπτικό μονοχρωμάτορα απεικόνισης. Η μετατόπιση των οπτικών στοιχείων των πιο πρόσφατων αποτελεσμάτων στο συντονισμό του μήκους κύματος απεικόνισης εκτελείται με τη βοήθεια μηχανικών χειρισμών που ελέγχονται από τον Η/Υ μέσω ενός μικροελεγκτή. Το σύστημα είναι σε θέση να παράγει φασματικές εικόνες 5nm Full Width Half Maximum (FWHM), με βήμα ρύθμισης

3nm, στη φασματική ζώνη 420-1000nm [3,14]. Ο φωτισμός πραγματοποιείται από 2 λάμπες αλογόνου 250W. Ο συντονισμός του φασματικού εύρους ταιριάζει με το φασματικό εύρος της δυνατότητας απόκρισης (responsivity) του CCD (Charge Couple Device) αλλά μπορεί να επεκταθεί και σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, μέχρι τη μέση-υπέρυθρη περιοχή. Το παραγόμενο σήμα ανατροφοδότησης του μονοχρωμάτορα φέρει τις πληροφορίες για την κατάσταση του μεταβλητού φίλτρου, επιτρέποντας κατά συνέπεια το συγχρονισμό του με τη διαδικασία σύλληψης της εικόνας. Ο μονοχρωμάτορας είναι συνδεδεμένος με μια ασπρόμαυρη CCD κάμερα,



Εικόνα 4.2 Αρχή λειτουργίας συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης

βασισμένη στο πρωτόκολλο μετάδοσης δεδομένων 1394 της IEEE, το οποίο δύναται να παράγει τις εικόνες σε ένα ποσοστό 15 frames/s σε πλήρη ανάλυση και περισσότερων από 30 frames/s σε ανάλυση VGA. Ένα ειδικά αναπτυγμένο λογισμικό χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του συστήματος και του μονοχρωμάτορα καθώς επίσης και για τη φασματική ανάλυση της εικόνας. Το σύστημα λειτουργεί σε δύο καταστάσεις: την κατάσταση της φασματοσκοπίας και την κατάσταση της φασματομετρίας [3,14]. Η πρώτη επιτρέπει την τυχαία επιλογή και την απεικόνιση,

σε πραγματικό χρόνο, των επιθυμητών φασματικών εικόνων, ενώ η κατάσταση της φασματομετρίας εκτελεί συγχρονισμένα τη φασματική σύλληψη και ανίχνευση της εικόνας και, τελικά, τον υπολογισμό ενός πλήρους φάσματος ανά εικονοστοιχείο εικόνας.

Και στις δύο περιπτώσεις, μια ειδική διαδικασία βαθμονόμησης εκτελείται πριν από αυτές τις διαδικασίες απεικόνισης, προκειμένου να αντισταθμιστεί η εξάρτηση μήκους κύματος της απόκρισης των ηλεκτροπτικών μερών του συστήματος, όπως το CCD, ο φωτισμός, κτλ..

Μια πλάκα $Ba_2 SO_4$ με ενιαίο συντελεστή ανάκλασης στη φασματική ζώνη 380-1000 nm χρησιμοποιείται ως δείγμα βαθμολόγησης. Το δείγμα τοποθετείται στο οπτικό πεδίο του φακού και η γκρίζα αξία του κεντρικού τομέα της εικόνας αναπαρίσταται σε πραγματικό χρόνο. Κατόπιν ο μονοχρωμάτορας ανιχνεύει τη συνολική φασματική ζώνη και σε κάθε βήμα το διάφραγμα (shutter) και το gain της κάμερας ρυθμίζονται έτσι ώστε να επιτυγχάνεται τιμή λίγο κάτω από 255. Αυτό εξασφαλίζει ότι η δυναμική περιοχή του CCD αξιοποιείται πλήρως. Οι τιμές των shutter και gain, που χρησιμοποιούνται για να λάβουν το γκρίζο 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, η οποία αυξάνεται όσο το μήκος κύματος απεικόνισης συντονίζεται σε μικρότερα ή μεγαλύτερα μήκη κύματος από τη ζώνη μηκών κύματος στην οποία η μέγιστη ρυθμοαπόδοση του φωτός και η αποδοτικότητα του συστήματος λαμβάνονται. Αυτό καθιστά την απόκριση του συστήματος 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 (flat field correction, επίπεδη διόρθωση τομέων).

Με το τρέξιμο του τμήματος κώδικα για την κατάσταση της φασματομετρίας, που ακολουθεί τη διαδικασία βαθμονόμησης, 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.

Από το σύνολο των φασματικών εικόνων, ένα φάσμα μπορεί να υπολογιστεί και να επιδειχθεί σε οποιοδήποτε επιλεγμένο από το χρήστη χωρικό σημείο της εικόνας. Τα φάσματα υπολογίζονται από τις γκρίζες τιμές της επιλεγμένης φασματικής στήλης εικονοκυττάρου. 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. Το σύστημα ενσωματώνει επίσης μια γρήγορη διαδικασία αποταμίευσης σε μικρότερη ανάλυση (VGA).

4.3 Μεθοδολογία

Σε αρχικό στάδιο, και αφού είχε περάσει ένας μήνας περίπου από την επάλειψη των ποντικών με DMBA, όπως άλλωστε έχει αναφερθεί στην ενότητα της ανάλυσης του βιολογικού μοντέλου, έγιναν κάποιες δοκιμαστικές μετρήσεις, προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα αναφορικά με τη λειτουργία του συστήματος και με την διαδικασία που θα ακολουθηθεί μετέπειτα.

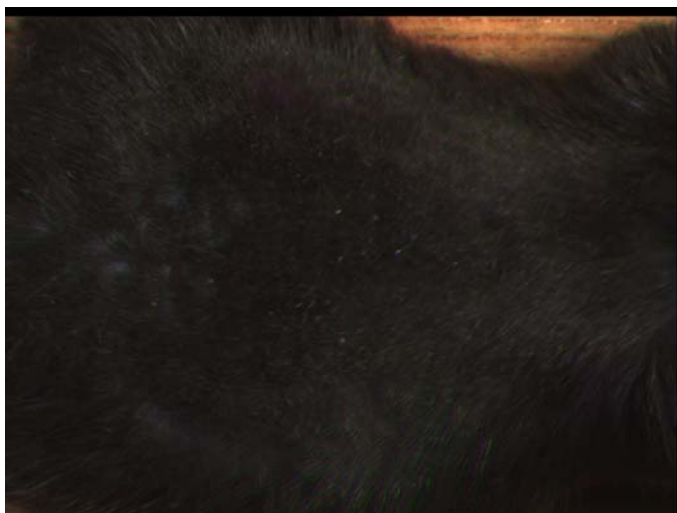
Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν πειραματικά δύο ποντίκια, χρησιμοποιώντας το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη

ενότητα, με τις ρυθμίσεις που υποδεικνύονται από τον κατασκευαστή. Λόγω όμως της ιδιαιτερότητας του πειράματος, παρατηρήθηκαν ορισμένα προβλήματα τα οποία επηρέαζαν την ποιότητα των μετρήσεων, και προκειμένου να λυθούν αυτά, αναγκαστήκαμε να αλλάξουμε τις συγκεκριμένες ρυθμίσεις του απεικονιστικού συστήματος.

Ειδικότερα, ρυθμίσαμε την ίριδα του φακού του οπτικού συστήματος, σε όσο το δυνατόν πιο κλειστή θέση, διότι η απόσταση της κάμερας από τις λάμπες ήταν αρκετά μικρή, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται φαινόμενα κορεσμού (saturation) κατά την απεικονιστική διαδικασία. Επίσης, αντιμετωπίσαμε προβλήματα εστίασης, λόγω της μη επίπεδης επιφάνειας που θέλαμε να απεικονίσουμε (ράχη ποντικίου), γεγονός του οποίου η λύση ανάγεται στην αύξηση του βάθους πεδίου του συστήματος μας. Προκειμένου να λυθεί το συγκεκριμένο ζήτημα, τοποθετήσαμε ανάμεσα στο φακό και το CCD, ένα μεταλλικό δακτύλιο (spacer), το οποίο αυξάνει την απόσταση αυτών των δύο (φακού – CCD) με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μεγαλύτερο βάθος πεδίου και επομένως η εικόνα που παίρνουμε να είναι εστιασμένη σε όλα της τα σημεία.

Τέλος, ιδιαίτερο πρόβλημα παρουσιάστηκε αναφορικά με τη βαθμονόμηση της υπερφασματικής κάμερας. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, πριν την πρώτη χρήση του συστήματος, θα πρέπει να γίνει βαθμονόμηση του με τη χρήση ενός λευκού χαρτιού, και την μετέπειτα ρύθμιση του gain και του shutter, έτσι ώστε σε κάθε μήκος κύματος, το άνω κατώφλι των τιμών των εντάσεων του κάθε pixel να έχει οριστεί στο 255. Στη δική μας περίπτωση, η ρύθμιση αυτή αποδείχθηκε απόλυτα δυσλειτουργική, αφού λόγω της σκούρας επιφάνειας που απεικονίζαμε (το δέρμα των ζώων ήταν σκούρο καφέ προς μαύρο – εικόνα 4.3), δεν γινόταν πρακτική αξιοποίηση όλου του εύρους τιμών (0 – 255) με αποτέλεσμα μικρές

διαφορές στις εντάσεις γειτονικών περιοχών, να μην μπορούν να απεικονιστούν αποτελεσματικά. Έτσι, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε σαν μέσω βαθμονόμησης του συστήματος μας, ένα χαρτί του οποίου το χρώμα σε κλίμακα του γκρι, πλησίαζε όσο το δυνατόν περισσότερο το χρώμα του δέρματος των ποντικών, αλλά και να ρυθμίσουμε τις τιμές των gain και shutter, έτσι ώστε το εύρος τιμών να είναι μικρότερο αλλά να δίνει πλέον τη δυνατότητα να τονιστούν και να γίνουν αισθητές οι διαφορές στις εντάσεις που έχουμε ήδη αναφέρει. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε εν τέλει, ένα χαρτί χρώματος γκρι, του οποίου η ένταση σε όλα τα μήκη κύματος



Εικόνα 4.3 Το χρώμα των ποντικών C57/BL, είναι πολύ σκούρο και δημιουργήθηκε πρόβλημα στη βαθμονόμηση του συστήματος

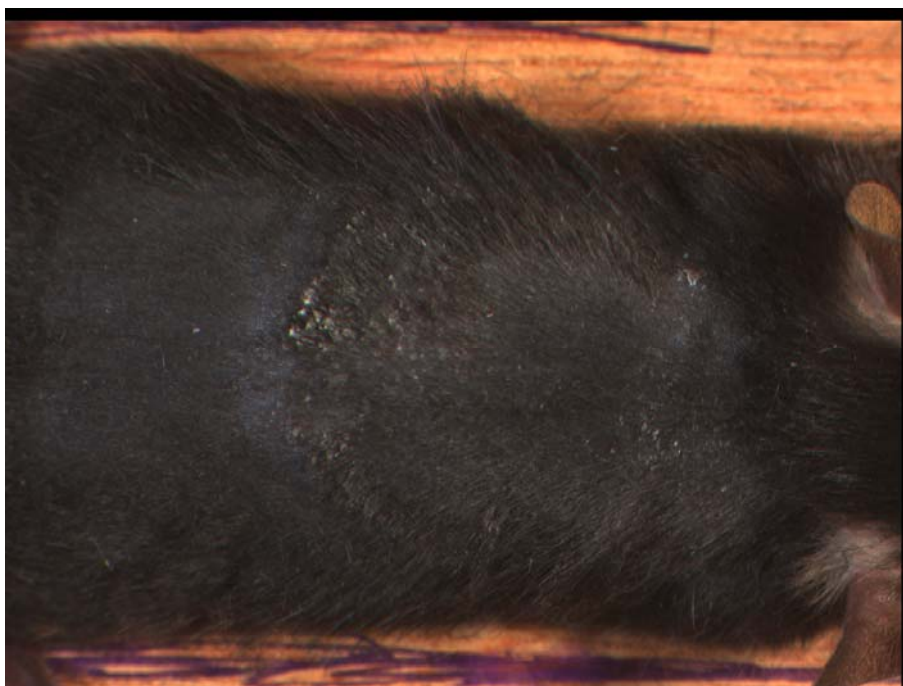
καθορίστηκε να είναι γύρω στο 120. Οι ρυθμίσεις αυτές παρέμειναν ως είχαν για όλη τη χρονική περίοδο του πειράματος, και η αναγωγή των τιμών των αποτελεσμάτων, στο λευκό (στο 255) έγινε εύκολα αφού ήταν πλέον γνωστή η σχέση μεταξύ των δύο χρωμάτων βαθμονόμησης.

Η διαδικασία των μετρήσεων, που ακολουθήθηκε από αυτό το σημείο και έπειτα, ήταν απόλυτα συγκεκριμένη και περιλάμβανε ουσιαστικά τέσσερα διαδοχικά βήματα. Αρχικά, το κάθε ποντίκι που είχε αποφασιστεί να απεικονιστεί, έπρεπε να αναισθητοποιηθεί προκειμένου να παραμείνει ακίνητο κατά τη διάρκεια της απεικόνισης αλλά και όλης της διαδικασίας γενικότερα. Για το λόγο αυτό, σε πρώτη φάση χρησιμοποιήθηκε αιθέρας, ο οποίος όμως κρίθηκε αναποτελεσματικός αφού η αναισθησία του ζώου διαρκούσε για λίγα λεπτά σε σύγκριση με τη διάρκεια της

μέτρησης. Προκειμένου λοιπόν, να ξεπεράσουμε το θέμα αυτό, αποφασίστηκε σε επόμενες μετρήσεις να χρησιμοποιούνται κατάλληλες αναισθητοποιητικές ουσίες, αντίστοιχες με αυτές των χειρουργικών επεμβάσεων, σε πολύ μικρότερη όμως δοσολογία προκειμένου να διασφαλιστεί η επιβίωση του ζώου.

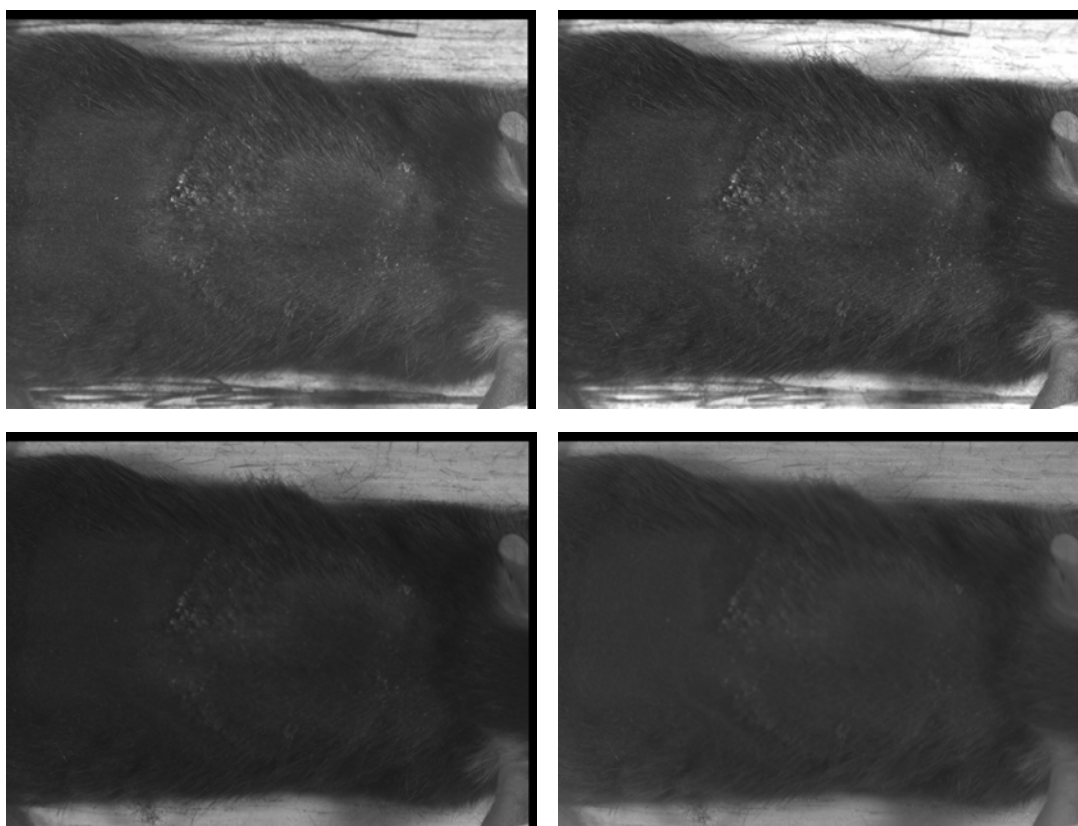
Έπειτα από την επιτυχή αναισθησία του ζώου, ξυριζόταν η περιοχή ενδιαφέροντος, προκειμένου να μην προστίθεται θόρυβος κατά την διαδικασία απεικόνισης από την ύπαρξη τριχών. Στη συνέχεια το ποντίκι, τοποθετούνταν σε κατάλληλη κατασκευή για να απεικονιστεί, και έπειτα αφού γινόταν επάλειψη της περιοχής που μελετούσαμε με croton oil, σύμφωνα πάντα με το βιολογικό πρωτόκολλο, η διαδικασία της πειραματικής μέτρησης είχε ολοκληρωθεί.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι, σύμφωνα με τον αρχικό σχεδιασμό του πειράματος, η παραπάνω διαδικασία των μετρήσεων, θα επαναλαμβανόταν κάθε ένα μήνα περίπου, προκειμένου να παρατηρηθεί όλη η εξελικτική πορεία της καρκινογένεσης, από το στάδιο της εμφάνισης απλών σπύλων μέχρι την τελική τους μετάλλαξη σε μελάνωμα.



Εικόνα 4.4 Είναι εμφανής η υπερμελάνωση που έχει προκληθεί στην περιοχή επάλειψης από την εφαρμογή του DMBA καθώς και η φλεγμονή που έχει αρχίσει να δημιουργείται

Δυστυχώς, αυτό δεν έγινε εφικτό, γιατί όπως έχει ήδη αναφερθεί, έπειτα από την επάλειψη των ζώων με DMBA, παρουσιάστηκε έντονη φλεγμονή στην υπό εξέταση περιοχή, γεγονός που έκανε αδύνατη την πρόσβαση στο δέρμα και επομένως την επιτυχή απεικόνιση του. Για το λόγο αυτό, και αφού προηγήθηκαν κάποιες ενδεικτικές μετρήσεις (εικόνες 4.4, 4.5) διακόπηκε η διαδικασία μετρήσεων (και όχι η διαδικασία θεραπείας), μέχρις ότου απορροφηθεί η φλεγμονή αυτή από τον οργανισμό.

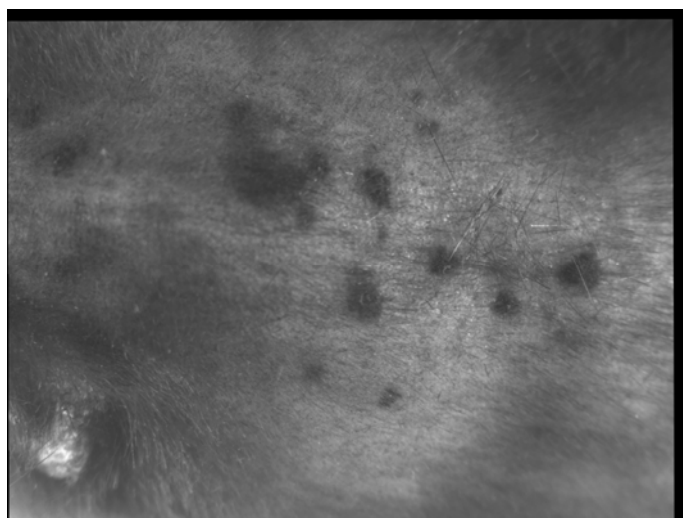


Εικόνα 4.5 Χαρακτηριστικές φασματικές απεικονίσεις του ποντικιού της εικόνας 4.4 στα 600, 640, 760 και 960nm αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις είναι εμφανές ότι λόγω της φλεγμονής δεν είναι δυνατόν να απεικονιστεί το δέρμα

Πέρα όμως από το συγκεκριμένο πρόβλημα που αντιμετωπίσαμε, η διαδικασία των μετρήσεων καθυστέρησε σημαντικά λόγω και ενός τεχνικού προβλήματος που παρουσίασε το σύστημα υπερφασματικής απεικόνισης, γεγονός το οποίο απαιτούσε την επισκευή της κάμερας από τον κατασκευαστή.

Κατά τη διάρκεια αυτή, όπου για τους παραπάνω λόγους, δεν ήταν δυνατόν να γίνουν μετρήσεις, η πειραματική διαδικασία επικεντρώθηκε στην μελέτη των βιολογικών μηχανισμών που διέπουν την ανάπτυξη μελανωμάτων στον οργανισμό των ποντικών. Για το λόγο αυτό, συνεχίστηκε με βάση το καθορισμένο πρωτόκολλο καρκινογένεσης η κατάλληλη χημική αγωγή στα ζώα, και σε τυχαία χρονικά διαστήματα ορισμένα εξ' αυτών θανατώθηκαν, προκειμένου να γίνουν εργαστηριακές μελέτες αναφορικά με την επιτυχή έκβαση του πειράματος από βιολογικής άποψης, την εξέλιξη της παθήσεως και την πιθανή εξάπλωση της (μεταστάσεις) σε άλλα όργανα του ποντικίου.

Όλη αυτή η καθυστέρηση, είχε σαν αποτέλεσμα να αποκλίνουμε από τον αρχικό στόχο της διαδικασίας, αφού δεν έγινε εφικτό να απεικονίσουμε την εξέλιξη της μετάλλαξης των σπύλων σε μελανώματα. Αντίθετα, όταν πλέον ήμασταν σε θέση



Εικόνα 4.6 Απεικόνιση ποντικιού στα 680nm. Είναι εμφανής η πολυάριθμη παρουσία σπύλων

να ξεκινήσουμε ξανά τις μετρήσεις, τα εναπομείναντα ποντίκια (14 συνολικά) είχαν αναπτύξει πολυάριθμες μελανωτικές περιοχές στην ράχη τους (εικόνα 4.6), και έτσι ο στόχος μας αναπροσδιορίστηκε με σκοπό πλέον την υπερφασματική

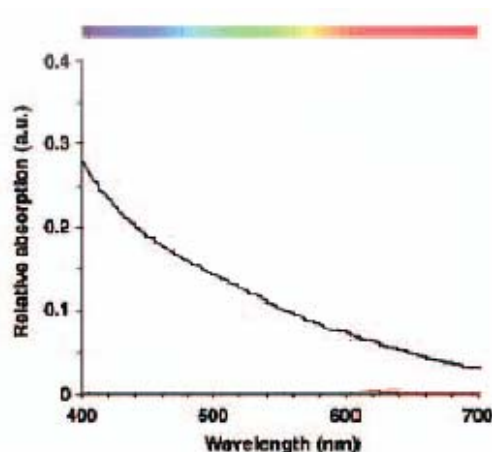
μελέτη και τον καθορισμό κατάλληλων κριτηρίων που θα δίνουν τη δυνατότητα της διάκρισης μεταξύ των απλών σπύλων και των μελανωμάτων.

Επομένως, για τον παραπάνω λόγο και σε τελική πλέον φάση ακολουθήθηκε η διαδικασία μετρήσεων που παρουσιάστηκε στην αρχή της συγκεκριμένης ενότητας.

Έγινε δηλαδή βαθμονόμηση του συστήματος από την αρχή (λόγω της επισκευής είχαν χαθεί οι ρυθμίσεις που είχαμε κάνει), τα ποντίκια ένα προς ένα αναισθητοποιήθηκαν, ξυρίστηκε η προς εξέταση περιοχή και εν συνεχεία απεικονίστηκαν από το σύστημα μας. Σε αυτό το σημείο, εφαρμόστηκε το πρώτο διαγνωστικό κριτήριο που θέλαμε να μελετήσουμε, προκειμένου να καθοριστούν συγκεκριμένες δερματικές περιοχές, από τις οποίες στην συνέχεια, και αφού θυσιάστηκαν όλα τα ποντίκια, πάρθηκαν δείγματα για περαιτέρω εργαστηριακό έλεγχο.

Αναλυτικότερα, έπειτα από τη λήψη του υπερφασματικού κύβου δεδομένων μέσω του απεικονιστικού συστήματος, έγινε σε πραγματικό χρόνο εφαρμογή μίας θεώρησης η οποία σχετίζεται με το φαινόμενο της διαφανοσκόπησης ή μη, ενός σπίλου στο υπέρυθρο φάσμα, γεγονός που ενδέχεται να μπορεί να αποτελέσει διαγνωστικό κριτήριο. Το επιστημονικό υπόβαθρο, πάνω στο οποίο στηρίχτηκε η εν λόγω προσπάθεια αναλύεται στη συνέχεια.

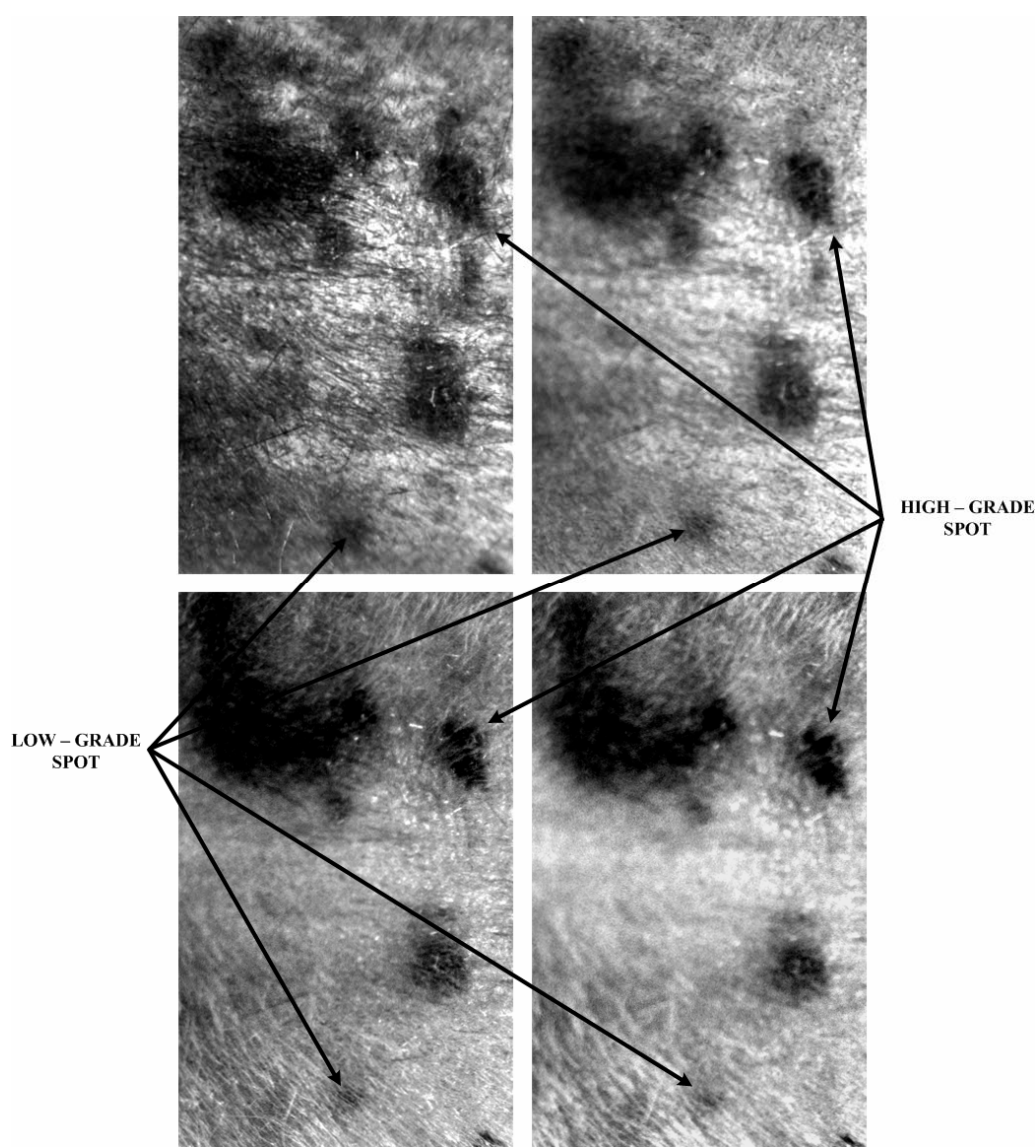
Συγκεκριμένα, όπως άλλωστε αναφέρθηκε στο 2^ο κεφάλαιο της διατριβής, ο βαθμός μιας δερματικής αλλοίωσης είναι απόλυτα συνδεδεμένος και ανάλογος με το βαθμό συγκέντρωσης μελανοκυττάρων στον δερματικό ιστό. Πέρα από αυτό, όσον αφορά τη φασματοσκοπική προσέγγιση του θέματος, είναι γνωστό ότι η μελανίνη, η οποία αποτελεί το κύριο συστατικό των μελανοκυττάρων, απορροφά στο υπέρυθρο (εικόνα 4.7), με αποτέλεσμα τα μελανοκύτταρα να παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαμηλά ποσοστά ανάκλασης στο φάσμα αυτό. Εάν



Εικόνα 4.7 Φάσμα απορρόφησης μελανίνης

συνδυάσουμε αυτές τις δύο παρατηρήσεις, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι δυνητικά, ο βαθμός της δερματικής αλλοίωσης μίας περιοχής, θα μπορούσε να είναι αντιστρόφως ανάλογος με τα ποσοστά ανάκλασης του ιστού στο υπέρυθρο φάσμα.

Επομένως μπορούμε να θεωρήσουμε, ότι μία κακοήθης δερματική αλλοίωση, η οποία λογικά περιέχει μεγάλο αριθμό μελανοκυττάρων, και επομένως παρουσιάζει υψηλή συγκέντρωση μελανίνης, θα είναι ορατή στο υπέρυθρο φάσμα αφού ο ιστός θα απορροφά την ακτινοβολία. Αντίθετα ένας υγιής σπίλος, ο οποίος θα έχει σαφώς



Εικόνα 4.8 Απεικόνιση σπύλων high – grade και low – grade, στα 480, 720, 960 και 1000nm αντίστοιχα. Στα μήκη κύματος του υπέρυθρου φάσματος είναι εμφανής η διαφανοσκοπήση του low – grade σπύλου

μικρότερη περιεκτικότητα σε μελανοκύτταρα, λόγω της ανάκλασης της οπτικής ακτινοβολίας, θα διαφανοσκοπείται στο συγκεκριμένο φάσμα, και επομένως δεν θα είναι ορατός ή τουλάχιστον ιδιαίτερα διακριτός από το υπόλοιπο υγιές δέρμα.

Από τη φασματοσκοπική προσέγγιση του θέματος, η παραπάνω θεωρεία ισχύει, αφού όπως φαίνεται και στις εικόνες που παρουσιάστηκαν πιο πάνω (εικόνα 4.8), παρουσιάστηκε έντονα το φαινόμενο μερικοί εκ των σπύλων να μην είναι ορατοί στο υπέρυθρο φάσμα, και συγκεκριμένα από τα 940nm και έπειτα.

Αυτό που έμενε να αποδειχθεί, ήταν το κατά πόσο το συμβάν αυτό συνδέεται με το βιολογικό υπόβαθρο της ανάπτυξης των μελανωμάτων. Για το λόγο αυτό, όπως ήδη αναφέρθηκε, πάρθηκαν δείγματα από το κάθε ποντίκι προκειμένου να εξεταστούν πλέον μικροβιολογικά.

Η διαδικασία της δειγματοληψίας που ακολουθήθηκε, αποτελούνταν από τα παρακάτω στάδια. Σε πρώτη φάση, έπειτα από την απεικόνιση του κάθε ζώου, γινόταν προβολή των εικόνων του φασματικού κύβου, οπότε και καθορίζονταν δύο σπύλοι ανά περιστατικό, οι οποίοι σύμφωνα με το αν διαφανοσκοπούνταν ή όχι στο υπέρυθρο, χαρακτηρίζονταν ως high ή low grade αντίστοιχα. Εν συνεχεία, το ποντίκι θυσιαζόταν και έπειτα γινόταν η δειγματοληψία ιστού από το δέρμα του, και συγκεκριμένα από τις περιοχές που είχαν καθοριστεί. Πρέπει να αναφερθεί, ότι λόγω έλλειψης κατάλληλου εξοπλισμού (πιπέτα – κατάλληλο εργαλείο σαν στυλό για λήψη ιστολογικών δειγμάτων), οι τομές έγιναν με χρήση χειρουργικού νυστεριού, με αποτέλεσμα να μην ήταν απόλυτα ακριβής (συνήθως γινόταν μεγαλύτερη τομή από την απαιτούμενη). Αυτό αποτελεί μικρής σημαντικότητας πρόβλημα, αφού μπορεί να δυσκολέψει την εξέταση του ιστού από τον παθολογοανατόμο (η τομή τεμαχίζεται σε μικρότερα κομμάτια και στη συνέχεια εξετάζονται τυχαία κάποια εξ αυτών –

επομένως μπορεί στην περίπτωση μας να εξεταστεί ιστός που δεν συμμετέχει στην πραγματική αλλοίωση).

Έπειτα από την προηγούμενη διαδικασία, τα δείγματα τοποθετούνταν σε διάλυμα φορμόλης, προκειμένου να διατηρηθούν και να αποσταλούν στη συνέχεια στην Ιατρική Σχολή Ηρακλείου, προκειμένου να εξεταστούν από παθολογοανατόμους. Το νεκρό πλέον ποντίκι, απεικονίζονταν (εικόνα 4.9) προκειμένου να υπάρχει απεικόνιση των τομών, ως σημείο αναφοράς για την περαιτέρω μελέτη των μετρήσεων.



Εικόνα 4.9 Έγχρωμη απεικόνιση ζώου με τις τομές της δειγματοληψίας

Σε αυτό ακριβώς το σημείο, η πειραματική διαδικασία είχε ολοκληρωθεί, και ο συνολικός χρόνος που διήρκεσε ήταν περίπου 18 μήνες. Τα δείγματα που στάλθηκαν για βιοψία ήταν 26 και όπως ήδη αναφέρθηκε πάρθηκαν δύο από κάθε ποντίκι, σε σύνολο 14 ζώων. Δύο ποντίκια όμως, Wild-Type C57/BL, δεν παρουσίασαν σαφείς μελανωτικές περιοχές, και για αυτό το λόγο, από τα ζώα αυτά πάρθηκε μόνο ένα δείγμα ανά περιστατικό, καθαρά για ερευνητικούς λόγους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ανάλυση Μετρήσεων

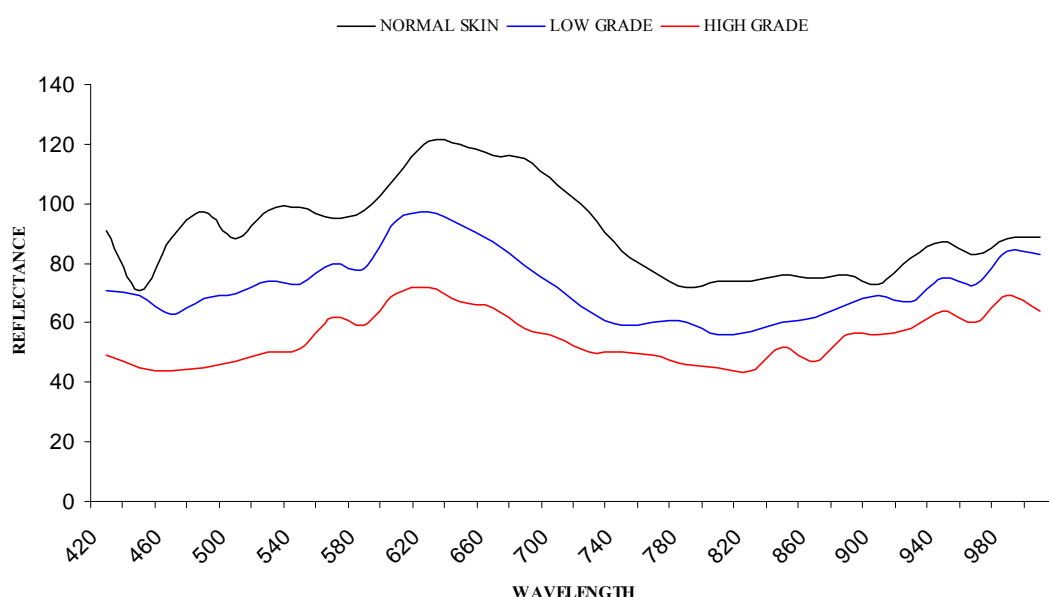
Έπειτα από την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας και των απεικονιστικών μετρήσεων μέσω του συστήματος υπερφασματικής απεικόνισης, είχαμε στη διάθεση μας ένα σύνολο από 14 φασματικούς κύβους, κάθε ένας εκ των οποίων αντιστοιχούσε και σε ένα ποντίκι, από το σύνολο των 14 ποντικιών που θυσιάστηκαν κατά το τέλος της διαδικασίας.

Η συνέχιση αυτής της μελέτης, σύμφωνα με τον αρχικό στόχο της διατριβής, επικεντρώθηκε σε αυτό το σημείο, στην ανάλυση των συγκεκριμένων μετρήσεων, προκειμένου να καθοριστεί ένα διαγνωστικό κριτήριο, βασισμένο αποκλειστικά στις φασματικές ιδιότητες του ιστού, για την διάκριση μεταξύ των μελανωτικών και μη μελανωτικών περιοχών του δέρματος.

Για το λόγο αυτό, σε αρχικό στάδιο, μελετήθηκε ένας μεγάλος όγκος δεδομένων, που αποτελούνταν από φάσματα των περιοχών ενδιαφέροντος. Από την πρώτη στιγμή της συγκεκριμένης προσέγγισης, έγινε εμφανές ότι υπήρχε σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των φασμάτων αυτών, αναλογικά με το βαθμό της αλλοίωσης, που εμείς είχαμε χαρακτηρίσει, σύμφωνα πάντα με τη θεώρηση που αφορούσε το ποσοστό διαφανοσκόπισης, και την οποία χρησιμοποιήσαμε κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

Συγκεκριμένα, σύμφωνα με το χαρακτηρισμό που έγινε κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, η απεικονιζόμενη επιφάνεια του δέρματος του ποντικιού, μπορεί να

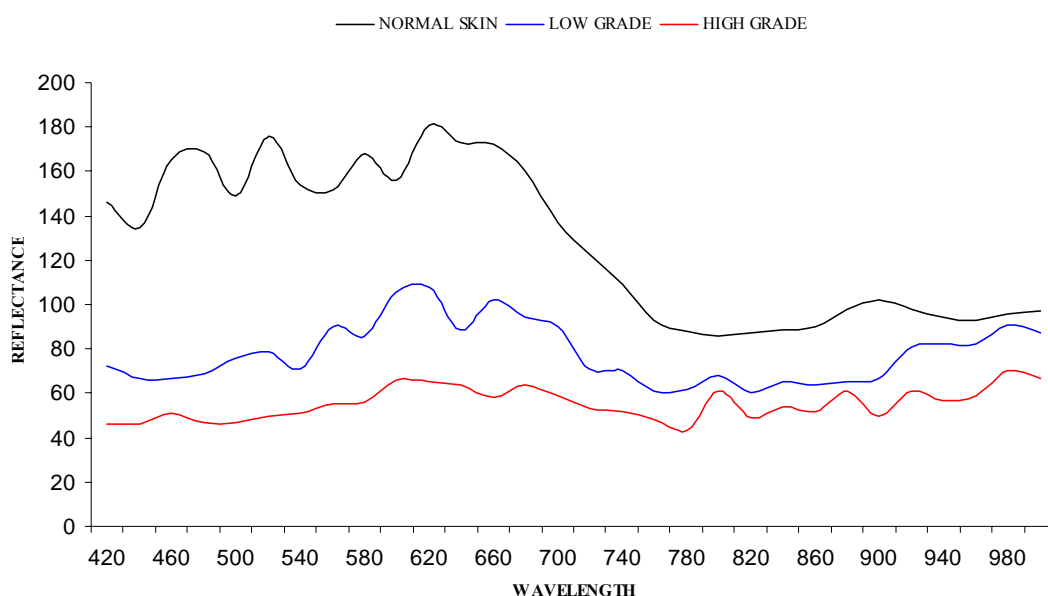
θεωρηθεί ότι περιέχει τρεις βαθμούς αλλοίωσης, normal skin – low grade και high grade αντίστοιχα. Για κάθε ένα είδος από τα παραπάνω, μελετήθηκαν πάρα πολλά



Εικόνα 5.1 Απεικόνιση φασμάτων ποντικίου No2, KO, ηλικίας 15 μηνών και γένους θηλυκού φάσματα, και τα αποτελέσματα που εξήχθησαν αναφέρονται στη συνέχεια.

Καταρχάς, είναι σαφές ότι, το φάσμα του δέρματος του ποντικίου, ακολουθεί μία συγκεκριμένη καμπύλη μορφή, η οποία παρουσιάζει μία έντονη καμπή στο εύρος ζώνης μεταξύ των 640 και 760nm αντίστοιχα. Επίσης, όπως άλλωστε φαίνεται και από τις εικόνες 5.1 και 5.2, η κλίση της καμπής αυτής τήνει να γίνει μηδενική, στις περιπτώσεις κατά τις οποίες ο ιστός έχει χαρακτηριστεί σαν high grade αλλοίωση. Μπορούμε δηλαδή να παρατηρήσουμε, ότι η μεταβολή που παρουσιάζει η κλίση του φάσματος στην περιοχή μεταξύ των 640 και 760nm, είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον βαθμό αλλοίωσης του ιστού (η κλίση μειώνεται όσο ο βαθμός αλλοίωσης της περιοχής αυξάνει). Το γεγονός αυτό, πέρα από τη συνολική συμπεριφορά του φάσματος, αποτελεί το βασικό χαρακτηριστικό διαφοροποίησης των φασμάτων, και με βάση την προοπτική ότι η ιδιότητα αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει κατάλληλο

διαγνωστικό κριτήριο, η περεταίρω μελέτη και επεξεργασία των δεδομένων επικεντρώθηκε σε αυτόν τον παράγοντα.



Εικόνα 5.2 Απεικόνιση φασμάτων ποντικού Νο14, WT, ηλικίας 12 μηνών και γένους αρσενικού

Συγκεκριμένα, ο στόχος ο οποίος τέθηκε έπειτα από τις προηγούμενες παρατηρήσεις, ήταν η εύρεση μιας μεθόδου, βάση της οποίας μέσω κατάλληλου λογισμικού, θα προέκυπτε μια ψευδοχρωματική εικόνα (pseudo color image). Στην εικόνα αυτή, της οποίας ο χρωματισμός θα βασιζόταν στις κλίσεις των φασμάτων όλων των εικονοστοιχείων, θα παρουσιαζόταν ο βαθμός της αλλοίωσης μίας περιοχής σύμφωνα με το χρώμα που θα περιείχε, σε σχέση πάντα με το χρωματικό κώδικα που θα χρησιμοποιούσαμε. Για παράδειγμα, οι περιοχές με μελάνωμα, θα απεικονίζονταν με κόκκινο χρώμα, ενώ όσο ο βαθμός της αλλοίωσης θα πλησίαζε προς το φυσιολογικό ιστό, το χρώμα θα πλησίαζε προς το μπλε.

Για αυτό το λόγο, σε αρχικό στάδιο, αναπτύχθηκε αλγόριθμος σε Matlab, ο οποίος υλοποιούσε τις παραπάνω απαιτήσεις. Συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος υπολόγιζε τις κλίσεις του φάσματος για το κάθε εικονοστοιχείο των δεδομένων μας, και έπειτα ανάλογα με κάποιες τιμές κατωφλίων που ορίστηκαν, γινόταν ο χρωματισμός των

αντίστοιχων pixel. Αυτό το οποίο παρουσιάζει κάποιο σχετικό ενδιαφέρον στη συγκεκριμένη μέθοδο, είναι ο υπολογισμός της κλίσης ο οποίος γινόταν ως εξής: Είναι εμφανές ότι το εύρος ζώνης για την κλίση που παρουσιάζουν τα φάσματα, είναι σταθερό, και όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, είναι μεταξύ των 640 και 760nm αντίστοιχα. Επομένως, προκειμένου να υπολογίσουμε την κλίση του φάσματος σε αυτή την περιοχή, αρκεί να αφαιρέσουμε τις τιμές των εντάσεων των εικονοστοιχείων στα αντίστοιχα μήκη κύματος. Έτσι, προκειμένου να υπολογιστούν οι κλίσεις για όλα τα pixel του φασματικού μας κύβου, αρκούσε να αφαιρεθούν μεταξύ τους, οι εικόνες που αντιστοιχούν στα 640 και στα 760nm. Ο μετέπειτα χρωματισμός, γινόταν βάση του αποτελέσματος της αφαίρεσης αυτής.

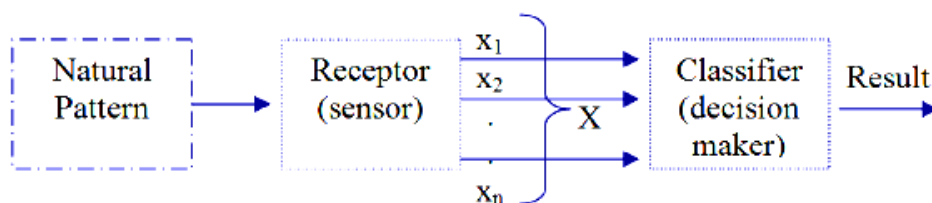
Ο αλγόριθμος αυτός ήταν καθαρά εμπειρικός, και υλοποιήθηκε αποκλειστικά για διερευνητικούς λόγους. Το βασικό αποτέλεσμα από τη μελέτη του, ήταν το συμπέρασμα που προέκυψε ότι η ανάλυση που θέλαμε να κάνουμε στις μετρήσεις μας, αναγόταν πλέον στον τομέα της αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition).

5.1 Αναγνώριση Προτύπων (Pattern Recognition)

Η αναγνώριση προτύπων, είναι ο επιστημονικός τομέας που ασχολείται με την ταξινόμηση δεδομένων (patterns) σύμφωνα με μία προϋπάρχουσα γνώση (priori knowledge) ή μία στατιστική προσέγγιση των πληροφοριών που εξάγονται από τα δεδομένα. Τα δεδομένα που πρέπει να ταξινομηθούν είναι συνήθως σύνολα μετρήσεων ή παρατηρήσεων και μπορούν να αναπαρασταθούν σαν σημεία σε ένα κατάλληλο πολυδιάστατο χώρο [28-34].

Ένα πλήρες σύστημα αναγνώρισης προτύπων, όπως φαίνεται σχηματικά στην εικόνα 5.3, αποτελείται συνήθως από ένα αισθητήριο όργανο (sensor) που συλλέγει τα δεδομένα τα οποία πρέπει να ταξινομηθούν, από έναν μηχανισμό εξαγωγής ιδιοτήτων (feature extraction mechanism) ο οποίος υπολογίζει αριθμητικές ή

συμβολικές πληροφορίες για τα δεδομένα, και τέλος από έναν ταξινομητή ο οποίος κάνει την ταξινόμηση των δεδομένων βάση των ιδιοτήτων που ήδη έχουν εξαχθεί [28-34].



Εικόνα 5.3 Σχηματική αναπαράσταση ενός πλήρους συστήματος αναγνώρισης προτύπων

Η διαδικασία της ταξινόμησης ή της περιγραφής των δεδομένων, στηρίζεται συνήθως στην διαθεσιμότητα κάποιων προτύπων, τα οποία έχουν ήδη ταξινομηθεί ή τουλάχιστον περιγραφθεί. Το σύνολο αυτό των προτύπων, εκπαιδεύει το σύστημα της αναγνώρισης των δεδομένων και το αποτέλεσμα της μεθόδου αποκαλείται supervised learning. Η διαδικασία αυτή, μπορεί να είναι και unsupervised, εφόσον δεν είναι διαθέσιμη για το σύστημα μας προϋπάρχουσα γνώση (priori knowledge), και στην περίπτωση αυτή γίνεται επιλογή των κλάσεων της ταξινόμησης με βάση την στατιστική ακρίβεια των προτύπων [28-34].

Σύμφωνα λοιπόν με την προηγούμενη παρατήρηση, μπορούμε να διαχωρίσουμε τις μεθόδους ταξινόμησης σε δύο βασικές κατηγορίες: τις supervised μεθόδους και τις unsupervised αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση μπορούμε να κατατάξουμε τον τομέα του classification ενώ στην δεύτερη τους τομείς του clustering και του segmentation αντίστοιχα.

Όσον αφορά την ανάλυση και την επεξεργασία των δικών μας δεδομένων (υπερφασματικές απεικονίσεις ποντικών), οι μέθοδοι που στηρίζονται στην supervised λογική, δεν μπορούν να εφαρμοστούν, αφού δεν είναι διαθέσιμη πληροφορία σχετικά με ήδη υπάρχουσα ταξινόμηση αντίστοιχων φασματικών δεδομένων. Επομένως, αλγόριθμοι που αφορούν αποκλειστικά classification δεν είναι

κατάλληλοι για τη δικιά μας διαδικασία. Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε η μελέτη μας να κατευθυνθεί προς την υλοποίηση αλγορίθμων που πραγματοποιούν data clustering ή data segmentation αντίστοιχα.

5.1.1 Data Clustering

Το clustering είναι μία μέθοδος ταξινόμησης αντικειμένων σε διαφορετικά σύνολα, ή πιο συγκεκριμένα, είναι μία μέθοδος διαχωρισμού ενός μεγάλου συνόλου δεδομένων, σε μικρότερα υποσύνολα, έτσι ώστε τα δεδομένα του κάθε υποσυνόλου να περιέχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Το κριτήριο της ταξινόμησης, συνήθως στηρίζεται στην μέτρηση κάποιου είδους «απόστασης» μεταξύ των δεδομένων. Το data clustering είναι μια συνηθισμένη τεχνική για στατιστική ανάλυση δεδομένων, η οποία εφαρμόζεται σε πολλούς τομείς, όπως οι τομείς του pattern recognition, image analysis και bioinformatics [35-41].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, ένα από τα σημαντικότερα βήματα της διαδικασίας του clustering είναι η επιλογή του κατάλληλου κριτηρίου απόστασης, το οποίο θα καθορίσει τον τρόπο με τον οποίο θα υπολογιστεί η ομοιότητα δύο αντικειμένων. Αυτό μπορεί να επηρεάσει το σχήμα των clusters αφού κάποια στοιχεία μπορεί να είναι αρκετά κοντά το ένα με το άλλο, σύμφωνα με κάποιο κριτήριο απόστασης, και αρκετά μακριά σύμφωνα με κάποιο άλλο. Για παράδειγμα, σε ένα δυσδιάστατο διάστημα, η απόσταση μεταξύ του σημείου $(x=1, y=0)$ και του σημείου αναφοράς $(x=0, y=0)$ είναι πάντα 1, σύμφωνα με τον υπολογισμό της συνηθισμένης νόρμας. Στην περίπτωση όμως της απόστασης μεταξύ του σημείου $(x=1, y=1)$ και του σημείου αναφοράς, η απόσταση αυτή μπορεί να είναι 2 ή $\sqrt{2}$ ή 1, ανάλογα με το αν χρησιμοποιήσουμε για τον υπολογισμό την 1-νόρμα ή τη 2-νόρμα ή την άπειρη-νόρμα αντίστοιχα [35-41].

Για το λόγο αυτό υπάρχουν πολλοί τρόποι υπολογισμού της απόστασης που υποστηρίζονται από τους αλγορίθμους για data clustering, όπως για παράδειγμα οι Euclidian distance, Manhattan distance και maximum norm [35-41].

Όσον αφορά τους αλγορίθμους του data clustering, αυτοί μπορεί να είναι hierarchical ή partitional. Οι hierarchical αλγόριθμοι δημιουργούν τα clusters σειριακά, στηριζόμενοι σε clusters που έχουν ήδη δημιουργηθεί, ενώ οι partitional αλγόριθμοι δημιουργούν όλα τα clusters μαζί, ταυτόχρονα [35-41].

Στο συγκεκριμένο σημείο, πρέπει να αναφερθεί ότι όσον αφορά τη δικιά μας μελέτη, τα δεδομένα που πρέπει να ταξινομηθούν και να χωριστούν σε κατηγορίες, είναι τα pixel ενός ευρύτερου φασματικού κύβου. Ο κύβος αυτός αποτελείται από 30 εικόνες, κάθε μια εκ των οποίων αντιστοιχεί σε ένα ξεχωριστό μήκος κύματος, μεταξύ των 400 και 1000nm αντίστοιχα. Επομένως το κάθε ένα από τα pixels του υπερφασματικού κύβου, μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα μονοδιάστατο διάνυσμα X με τιμές $[x_1, x_2, x_3, \dots, x_n]$ τις τιμές των εντάσεων στις αντίστοιχες φασματικές περιοχές. Είναι σαφές λοιπόν, ότι κάθε ένα από τα αντικείμενα προς ταξινόμηση, περιέχουν περισσότερα του ενός χαρακτηριστικά. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι δεν υπάρχει, όπως έχει ήδη αναφερθεί, κάποια βάση ταξινόμησης αντίστοιχων δεδομένων, στην οποία να μπορούμε να στηριχτούμε, κάνουν την ταξινόμηση των συγκεκριμένων δεδομένων μέσω της χρήσης αλγορίθμων για data clustering, ιδανική λύση.

Για το λόγο αυτό, εφαρμόστηκαν δύο clustering αλγόριθμοι, και συγκεκριμένα οι hierarchical και k-means, οι οποίοι έπειτα από βιβλιογραφική διερεύνηση αποδείχτηκαν οι πιο ευρέως διαδεδομένοι αλγόριθμοι αυτού του είδους. Η υλοποίηση και τα αποτελέσματά τους, περιγράφονται πιο κάτω.

5.1.1.1 k-means Algorithm

Ο αλγόριθμος k-means, τοποθετεί το κάθε αντικείμενο προς ταξινόμηση, στο αντίστοιχο cluster, του οποίου το κέντρο (που συνήθως αποκαλείται centroid), απέχει τη μικρότερη απόσταση από το αντικείμενο αυτό. Το κέντρο του κάθε cluster, είναι ο μέσος όρος όλων των σημείων που αποτελούν το cluster αυτό. Επομένως, οι συντεταγμένες του centroid, θα είναι το αριθμητικό μέσο, των διαφορετικών συντεταγμένων, κάθε ενός από τα επιμέρους στοιχεία του cluster. Για παράδειγμα, αν σε έναν τρισδιάστατο χώρο, υπάρχει ένα cluster το οποίο περιέχει δύο αντικείμενα, τα $X = (x_1, x_2, x_3)$ και $Y = (y_1, y_2, y_3)$, τότε το κέντρο $Z = (z_1, z_2, z_3)$ του cluster αυτού προκύπτει με $z_1 = (x_1 + y_1) / 2$, $z_2 = (x_2 + y_2) / 2$ και $z_3 = (x_3 + y_3) / 2$, αντίστοιχα.

Ο αλγόριθμος αυτός, υλοποιήθηκε σε Matlab, με κριτήριο την Euclidian distance των δεδομένων και με είσοδο έναν πίνακα του οποίου οι γραμμές αναπαριστούσαν τα pixels του φασματικού κύβου, ενώ οι στήλες τις 30 εντάσεις των pixel αυτών στις αντίστοιχες φασματικές περιοχές.

Τα βήματα του αλγορίθμου ήταν τα εξής:

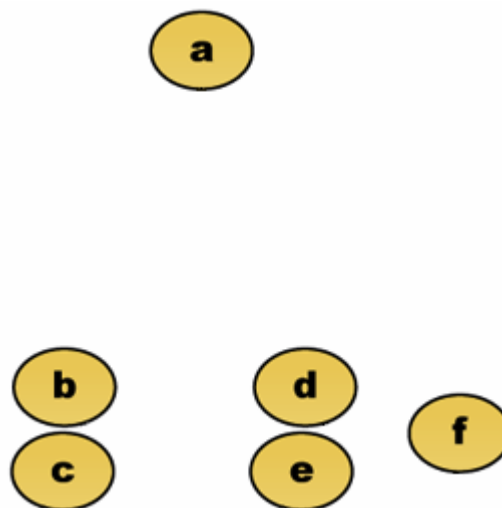
1. Επιλογή του αριθμού των clusters, k , ο οποίος δίνεται από τον χρήστη (6).
2. Τυχαία δημιουργία k clusters και υπολογισμός των centroid σημείων για το κάθε ένα cluster από αυτά.
3. Αντιστοίχιση του κάθε σημείου με το cluster του οποίου το κέντρο απέχει τη μικρότερη απόσταση.
4. Υπολογισμός των νέων centroid σημείων για τα clusters.
5. Επανάληψη των δύο προηγούμενων βημάτων μέχρι να επιτευχθεί κάποιο κατάλληλο κριτήριο σύγκλισης (συνήθως να μην αλλάζουν οι καταχωρήσεις).

Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτού του αλγορίθμου, είναι η απλότητα και η ταχύτητα του. Παρόλα αυτά, στην δικιά μας μελέτη δεν έγινε δυνατή η εφαρμογή του (παρά την υλοποίηση του), καθώς λόγω του πολύ μεγάλου όγκου δεδομένων το πρόγραμμα που δημιουργήθηκε κόλλαγε λόγω ανεπάρκειας χώρου μνήμης. Συγκεκριμένα, οι διαστάσεις του πίνακα των δεδομένων ήταν περίπου 1.228.800x30 και ο αλγόριθμος δοκιμάστηκε να «τρέξει» σε υπολογιστές με 1GB μνήμη χωρίς επιτυχία.

Πιθανή λύση για το συγκεκριμένο πρόβλημα, θα αποτελούσε η ύπαρξη κατάλληλης συνδεσμολογίας clustering σε υπολογιστές, προκειμένου να τρέχουν παράλληλα την συγκεκριμένη εφαρμογή. Το μέσο αυτό δεν διατίθεται στο Πολυτεχνείο Κρήτης, οπότε η εφαρμογή του αλγορίθμου ήταν αδύνατη.

5.1.1.2 Hierarchical Algorithm

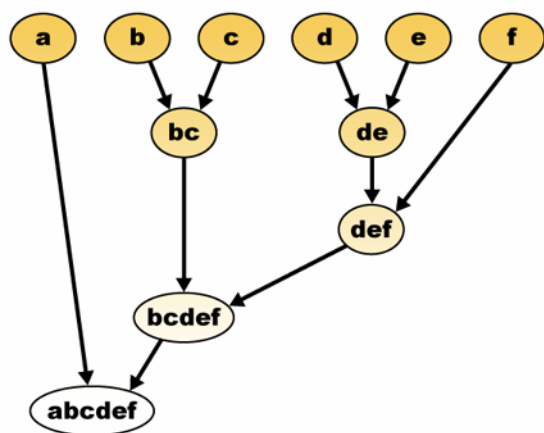
Ο hierarchical αλγόριθμος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατηγοριοποιεί τα δεδομένα σε clusters, σύμφωνα με πληροφορία που επεξεργάζεται από clusters τα οποία έχουν ήδη δημιουργηθεί, σε προηγούμενα βήματα του αλγορίθμου. Ο αλγόριθμος αυτός μπορεί να λειτουργήσει με συγχώνευση δεδομένων ή, αντίστροφα, με διαίρεση clusters. Στην πρώτη περίπτωση, κάθε ένα από τα προς ταξινόμηση αντικείμενα, θεωρούνται σαν ένα μοναδικό cluster, και εν συνεχεία γίνεται συγχώνευση αυτών σε μεγαλύτερα,



Εικόνα 5.4 Έστω δυοδιάστατος χώρος με αντικείμενα προς ταξινόμηση

κατά την εξέλιξη του αλγορίθμου, ενώ στην δεύτερη περίπτωση, το σύνολο των αντικειμένων θεωρείται ότι αποτελούν ένα cluster το οποίο διασπάται σε μικρότερα.

Η παραδοσιακή αναπαράσταση αυτής της ιεραρχικής δομής του αλγορίθμου, επιτυγχάνεται μέσω ενός δέντρου (δενδροειδές διάγραμμα) στο οποίο τη μία μεριά



Εικόνα 5.5 Δενδροειδές διάγραμμα hierarchical αλγορίθμου

παρουσιάζονται όλα τα μεμονωμένα αντικείμενα, ενώ στην άλλη ένα μοναδικό cluster το οποίο περιέχει όλα τα αντικείμενα αυτά (εικόνα 5.4, 5.5). Ο αλγόριθμος συγχώνευσης ξεκινάει από το επάνω μέρος αυτού του δέντρου, ενώ ο αλγόριθμος διαίρεσης από το κάτω μέρος αντίστοιχα.

Εάν διακοπεί ή σταματήσει η εξέλιξη του αλγορίθμου, σε κάποια γραμμή του προαναφερθέντος δενδροειδούς διαγράμματος, θα έχουμε επιτύχει ολοκλήρωση της διαδικασίας clustering με συγκεκριμένα ποσοστά ακρίβειας (αριθμό clusters που ο χρήστης επιθυμεί να δημιουργηθούν).

Στην δικιά μας μελέτη, ο αλγόριθμος αυτός υλοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου toolbox kit, έχοντας τις ίδιες ρυθμίσεις με τον αλγόριθμο k-means που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Δυστυχώς όμως, είχε ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα, αφού λόγω του όγκου δεδομένων, ήταν αδύνατη η εφαρμογή του.

5.1.2 Data Segmentation

Έπειτα από την ανεπιτυχή προσπάθεια εφαρμογής μεθόδων data clustering, λόγω της ανεπάρκειας των μέσων που αντιμετωπίσαμε, η λύση της εφαρμογής αλγορίθμων που υλοποιούν μεθόδους για data segmentation, αποτελούσε μονόδρομο για την επιτυχή ταξινόμηση των δεδομένων μας.

Στον τομέα της επεξεργασίας εικόνας, το segmentation, αναφέρεται στην διαδικασία διαχωρισμού μιας ψηφιακής εικόνας σε περιοχές (σύνολα από pixel). Ο

στόχος του segmentation είναι να απλοποιήσει μία εικόνα και να μετατρέψει την αναπαράσταση της σε ένα τύπο δεδομένων που είναι πιο εύκολο να αναλυθούν. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για τον καθορισμό αντικειμένων και ορίων σε μια εικόνα [42-43].

Το αποτέλεσμα του image segmentation, είναι ένα σύνολο περιοχών, οι οποίες καλύπτουν συνολικά όλη την έκταση της ψηφιακής εικόνας. Τα pixel μίας τέτοιας περιοχής, παρουσιάζουν ομοιότητα σε κάποια χαρακτηριστικά, όπως το χρώμα, το intensity ή το texture [42-43].

Είναι κατανοητό δηλαδή, ότι η ταξινόμηση δεδομένων μέσω αλγορίθμων για segmentation, θα πρέπει να βασίζεται σε ένα μοναδικό χαρακτηριστικό και να εφαρμοστεί στα πλαίσια μιας δυσδιάστατης εικόνας. Στην περίπτωση μας όμως, όπως έχει αναφερθεί, τα δεδομένα μας είναι φασματικοί κύβοι που αποτελούνται από 30 συνολικά εικόνες και επομένως η απλή εφαρμογή αυτής της μεθόδου δεν συνίσταται.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, μοναδικός τρόπος για να μπορέσουμε να ταξινομήσουμε τα δεδομένα μας χρησιμοποιώντας κάποιον αλγόριθμο αυτού του είδους, είναι ενδεχομένως, να κάνουμε 30 διαφορετικά segmentation σε κάθε μία από τις 30 εικόνες που έχουμε, και έπειτα εφαρμόζοντας κάποιον αλγόριθμο για segmentation fusion, να πάρουμε το τελικό αποτέλεσμα της διαδικασίας.

Η μεθοδολογία αυτή προφανώς θα έχει αποτέλεσμα, και θα καταφέρει επιτυχώς να ταξινομήσει τις μετρήσεις μας. Παρόλα αυτά, δεν εφαρμόστηκε, γιατί θα είχε σαν αποτέλεσμα να αποκλίνουμε τελείως από τον αρχικό σκοπό της πειραματικής διαδικασίας. Συγκεκριμένα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, σκοπός μας ήταν η εύρεση κατάλληλου διαγνωστικού κριτηρίου, το οποίο θα βασίζεται εξολοκλήρου στις φασματικές ιδιότητες του ιστού. Εάν εμείς, επιλέξουμε βάσει των παραπάνω, να επεξεργαστούμε με αλγορίθμους segmentation, τις φασματικές εικόνες ξεχωριστά,

χάνουμε ουσιαστικά τη φασματική πληροφορία και εφαρμόζουμε απλά μεθόδους για επεξεργασία εικόνας σε ένα μεγάλο όγκο δεδομένων. Με απλά λόγια δεν χρησιμοποιούμε στην επεξεργασία των δεδομένων μας, το φάσμα του κάθε pixel ενιαία.

Για το λόγο αυτό, η μέθοδος αυτή δεν εφαρμόστηκε και αναζητήθηκαν εναλλακτικές λύσεις.

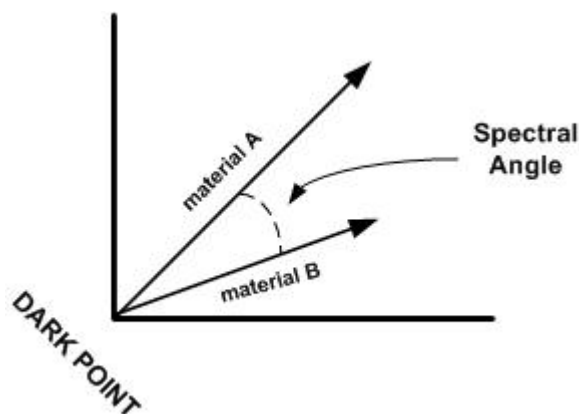
5.1.3 Spectral Angle Mapper

Στο σημείο αυτό, και έπειτα από τις αποτυχημένες προσπάθειες για την ταξινόμηση των δεδομένων μας, βάση του φάσματος τους, μέσω της χρήσης των μεθόδων που αναλύθηκαν μέχρι τώρα, έγινε μια εκτεταμένη διερεύνηση για την εύρεση αλγορίθμων που υλοποιούν τέτοιου είδους ή αντίστοιχες ταξινομήσεις.

Έπειτα από αυτή την εκτενή διερεύνηση, καταλήξαμε στο συμπέρασμα, ότι ο πιο ευρέως διαδεδομένος αλγόριθμος για τις περιπτώσεις φασματικής ταξινόμησης δεδομένων, και επομένως ίσως ο καταλληλότερος και αποδοτικότερος για τη μελέτη μας, είναι ο **Spectral Angle Mapper**

(SAM).

Ο **SAM** είναι μια μέθοδος ταξινόμησης, η οποία επιτρέπει την γρήγορη χαρτογράφηση ενός υπερφασματικού κύβου, μέσω του υπολογισμού της ομοιότητας μεταξύ



Εικόνα 5.6 Η λογική του αλγορίθμου Spectral Angle Mapper

των φασμάτων της δοθείσας εικόνας και κάποιων φασμάτων αναφοράς. Τα φάσματα αναφοράς αυτά, μπορούν να δοθούν είτε από κάποιες βιβλιοθήκες, είτε να υπολογίζονται από τον αλγόριθμο τον ίδιο βάση της εικόνας που επεξεργάζεται [44-46].

Ο αλγόριθμος υπολογίζει την φασματική ομοιότητα μετρώντας την γωνία μεταξύ των φασμάτων που συγκρίνει, αφού τους χρησιμοποιεί όμως σαν δύο n-διάστατους πίνακες. Μικρές γωνίες μεταξύ των φασμάτων υποδηλώνουν υψηλή ομοιότητα και αντίστροφα [44-46].

Το βασικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι δεν επηρεάζεται από τη φωτεινότητα των pixel αφού η γωνία μεταξύ των διανυσμάτων δεν εξαρτάται από το μέτρο τους [44-46].

Η υλοποίηση των παραπάνω, βασίζεται στη χρήση του τόξου μεταξύ του πειραματικού φάσματος “t” και του φάσματος αναφοράς “r”, μέσω της εξίσωσης:

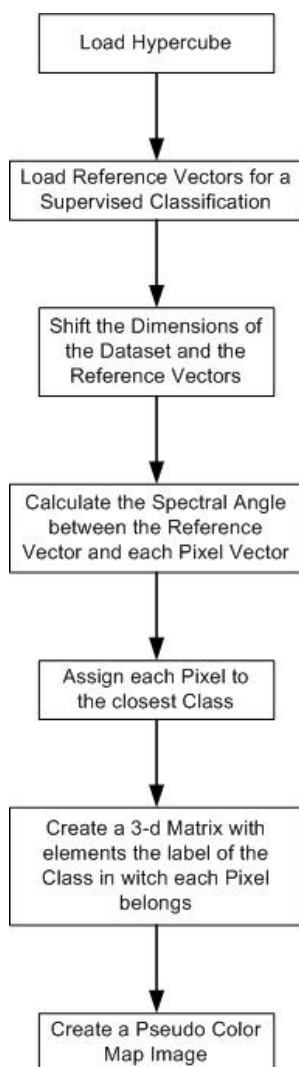
$$a = \cos^{-1} \left(\frac{\sum_{i=1}^{nb} t_i r_i}{\left(\sum_{i=1}^{nb} t_i^2 \right)^{1/2} \left(\sum_{i=1}^{nb} r_i^2 \right)^{1/2}} \right), (5,1)$$

- nb = ο αριθμός των μηκών κύματος
- t_i = το πειραματικό φάσμα
- r_i = το φάσμα αναφοράς

Όσον αφορά τη συγκεκριμένη μελέτη, ο αλγόριθμος αυτός υλοποιήθηκε σε Matlab και το διάγραμμα ενοτήτων που παρουσιάζει την εξέλιξη του απεικονίζεται στην εικόνα 5.7.

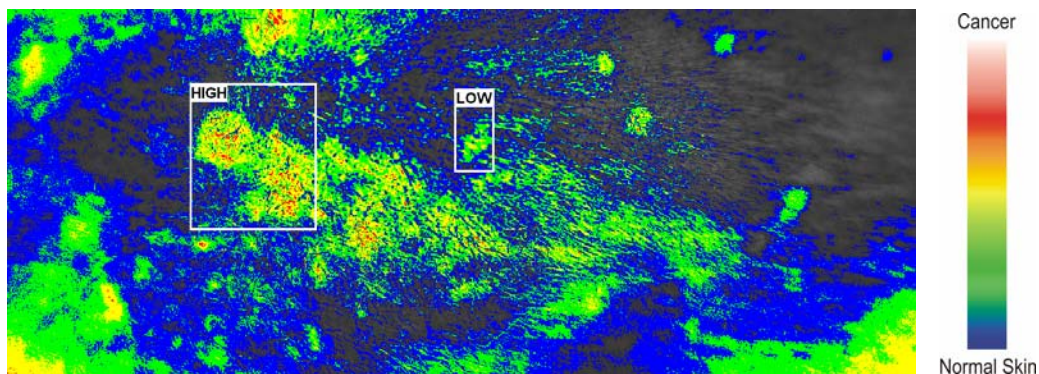
Συγκεκριμένα, αρχικά «φορτώνονται» στον αλγόριθμο τα δεδομένα που πρέπει να ταξινομηθούν υπό τη μορφή τρισδιάστατου πίνακα με διαστάσεις 960x1280x30. Το κάθε pixel του φασματικού κύβου δηλαδή, αναπαρίσταται ουσιαστικά σαν ένα μονοδιάστατο διάνυσμα του οποίου τα περιεχόμενα είναι οι εντάσεις του pixel στις διαφορετικές φασματικές περιοχές. Έπειτα, λαμβάνονται τυχαία σημεία από τον πίνακα αυτόν, το πλήθος των οποίων καθορίζεται από τον αριθμό των κλάσεων που θέλουμε να δημιουργήσουμε (6 για την ακρίβεια), τα οποία

θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια σαν φάσματα αναφοράς για την ταξινόμηση. Σε αυτό το σημείο, αρχίζει η ταξινόμηση των δεδομένων σειριακά, από την αρχή έως το τέλος του κύβου. Ειδικότερα, κατά την εξέλιξη του προγράμματος, διαβάζεται ένα διάνυσμα τη φορά, και αφού υπολογιστούν οι γωνίες μεταξύ αυτού και των φασμάτων αναφοράς, το στοιχείο αυτό κατατάσσεται στην κλάση του διανύσματος αναφοράς με το οποίο σχηματίζει τη μικρότερη γωνία. Στο τέλος, όλα τα δεδομένα έχουν ταξινομηθεί και το αποτέλεσμα είναι μια εικόνα σε κλίμακα του γκρι, όπου τα pixel που ανήκουν σε κοινή κλάση, έχουν την ίδια ένταση.



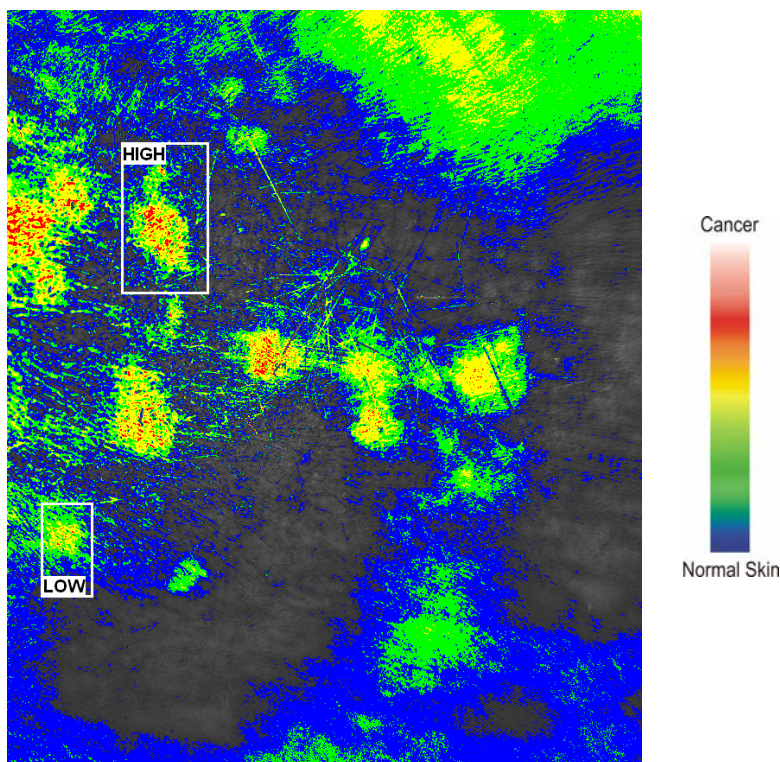
Εικόνα 5.7 Διάγραμμα ενοτήτων που παρουσιάζει την λειτουργία του αλγορίθμου Spectral Angle Mapper

Αφού ολοκληρωθεί η προηγούμενη διαδικασία, η εικόνα που προέκυψε, χρωματίζεται, βάσει κατάλληλης κλίμακας χρωμάτων που χρησιμοποιείται στις απεικονίσεις ιατρικών δεδομένων.



Εικόνα 5.8 Ψευδοχρωματική εικόνα ποντικίου No 5, KO, ηλικίας 15 μηνών και γένους θηλυκού. Στην εικόνα φαίνονται τα σημεία που εστάλησαν για βιοψία και η εκτίμηση μας για το βαθμό της αλλοίωσης τους

Το τελικό αποτέλεσμα ολόκληρης της διαδικασίας είναι ψευδοχρωματικές απεικονίσεις (pseudo color images) όπως αυτές που παρουσιάζονται στις εικόνες 5.8 και 5.9 αντίστοιχα.



Εικόνα 5.9 Ψευδοχρωματική εικόνα ποντικίου No 14, WT, ηλικίας 12 μηνών και γένους αρσενικού. Στην εικόνα φαίνονται τα σημεία που εστάλησαν για βιοψία και η εκτίμηση μας για το βαθμό της αλλοίωσης τους

Είναι εμφανές, ότι αυτή η ψευδοχρωματική απεικόνιση του δέρματος του ποντικιού, δίνει τη δυνατότητα του υπολογισμού του βαθμού της αλλοίωσης αλλά και της πλήρους χαρτογράφησης της έκτασης της. Συγκεκριμένα, βάση της κλίμακας των χρωμάτων που χρησιμοποιείται, με αποχρώσεις από το μπλε προς το κόκκινο, γίνεται αντιστοίχιση της σοβαρότητας του περιστατικού με κάποιο χρώμα. Έτσι το μπλε αντιστοιχεί στον υγιή ιστό και το κόκκινο στον καρκινικό αντίστοιχα. Επίσης, όπως αναφέρθηκε, μέσω της απεικόνισης του ιστού με τη χρήση αυτού του χρωματικού κώδικα, είναι σαφές ότι καθορίζονται επακριβώς τα όρια και η περιοχή της βλάβης. Έτσι, ακόμα και μέσα σε ένα σπίλο που οπτικά μπορεί να φαίνεται φυσιολογικός, είναι δυνατόν να υπάρχουν περιοχές με έντονα σημάδια διήθησης, τα οποία να μην είναι ορατά δια γυμνού οφθαλμού, και τα οποία όμως λόγω των φασματικών τους χαρακτηριστικών, να μπορούν να απεικονιστούν και να επισημανθούν στις εν λόγω απεικονίσεις, μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας.

Στις εικόνες 5.8 και 5.9, έχει γίνει επισημάνση των σημείων από τα οποία πάρθηκαν βιοψίες. Η αποτελεσματικότητα και η εγκυρότητα της ανάλυσης αυτής, θα επιβεβαιωθεί στη συνέχεια από τις απαντήσεις αυτών των βιοψιών. Τα αποτελέσματα αυτά, και η αξιολόγηση της μεθόδου παρουσιάζονται στη συνέχεια της διατριβής σε αντίστοιχο κεφάλαιο.

5.2 Texture Analysis

Σύμφωνα με την παραδοσιακή ιατρική αλλά και την βιολογία, όπως άλλωστε αναφέρθηκε και στο δεύτερο κεφάλαιο της συγκεκριμένης μελέτης, τα κριτήρια που καθορίζουν οπτικά την υποψία ύπαρξης μελανώματος στο δέρμα είναι οι χαρακτηριστικές ιδιότητες της μορφολογίας του σπίλου, και ουσιαστικά αφορούν την ανομοιογένεια που μπορεί να παρουσιάζει, το χρώμα και το μέγεθος.

Τα κριτήρια αυτά, μπορούν να λαμβάνονται υπόψη και στην περίπτωση διαγνωστικών μεθόδων που χρησιμοποιούν τεχνολογικά εργαλεία, κάτι που προσπαθούμε να εφαρμόσουμε στη συγκεκριμένη διατριβή, μέσω της ανάλυσης του texture μίας ψηφιακής εικόνας του εν λόγω σπίλου.

Συγκεκριμένα, ο τομέας του texture analysis αναφέρεται στον χαρακτηρισμό και τον καθορισμό περιοχών κάποιας εικόνας, βάσει των ιδιοτήτων του texture της. Ο τομέας αυτός δηλαδή, προσπαθεί να ποσοτικοποιήσει κάποιες χαρακτηριστικές ιδιότητες μιας εικόνας που συνδέονται άμεσα με τα φυσικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του αντικειμένου που απεικονίζεται, όπως για παράδειγμα η ομαλότητα ή όχι μιας επιφάνειας. Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται η προσέγγιση αυτή, είναι η επεξεργασία κάποιων ιδιοτήτων της εικόνας όπως το ποσοστό φωτεινότητας, οι εντάσεις των pixel της κτλ [43].

Προκειμένου να εφαρμοστεί το texture analysis σε μια εικόνα, υπάρχουν αρκετές μέθοδοι, οι οποίες μπορούν όμως να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: την κατηγορία των statistical methods και την κατηγορία του structural analysis. Στην πρώτη περίπτωση, ο υπολογισμός του texture γίνεται μέσω 5 συγκεκριμένων παραμέτρων, ενώ στην δεύτερη εφαρμόζονται μέθοδοι επεξεργασίας εικόνας με αποτέλεσμα την δημιουργία μιας νέας απεικόνισης στην οποία τονίζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της περιοχής [43].

Όσον αφορά τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, υπήρξε εξ αρχής πρόβλημα με την εφαρμογή της συγκεκριμένης προσέγγισης, αφού δεν είχε προβλεφθεί κάτι τέτοιο κατά τη διεξαγωγή των μετρήσεων, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ικανοποιητική απεικόνιση των αλλοιώσεων από κατάλληλο απεικονιστικό σύστημα. Συγκεκριμένα, η ανάλυση του texture, θα πρέπει να γίνει αποκλειστικά σε εικόνες που απεικονίζουν μόνο τον προς εξέταση σπίλο, προκειμένου να

διαπιστωθούν τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά. Τέτοιες κατάλληλες εικόνες, που να απεικονίζουν το σπίλο με υψηλή ανάλυση δεν υπήρχαν, και επομένως αποφασίστηκε να εφαρμοστεί η μέθοδος αυτή, εντελώς διερευνητικά, σε εικόνες που αποκόπηκαν από τις υπάρχουσες μετρήσεις, με αποτέλεσμα η ανάλυση τους να είναι της τάξης των 10x10 pixels για κάθε περιστατικό.

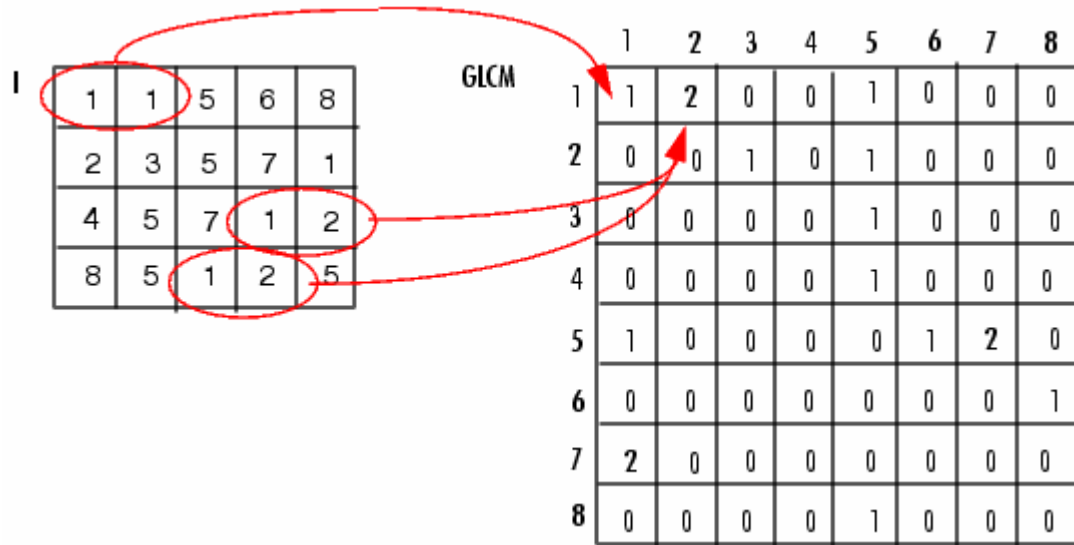
Από αυτά είναι σαφές, ότι η εφαρμογή αλγορίθμων που ανήκουν στον τομέα του structural analysis προκειμένου να καθοριστεί το texture, δεν είχε κανένα νόημα να εφαρμοστεί. Έτσι αποφασίστηκε, η μελέτη των μετρήσεων να επικεντρωθεί στην περίπτωση μεθόδων που αφορούν το statistical measurement of texture.

5.2.1 Statistical Method of Texture Analysis

Εφόσον το texture είναι μία χωρική ιδιότητα, ένα απλό μονοδιάστατο ιστόγραμμα, δεν θα είναι χρήσιμο για τον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση της ιδιότητας αυτής. Γι' αυτό, προκειμένου να ποσοτικοποιήσουμε τις χωρικές παραμέτρους, των τιμών σε κλίμακα του γκρι (gray – level values) μίας εικόνας, ένας δυσδιάστατος πίνακας, γνωστός ως **gray – level co – occurrence matrix**, χρησιμοποιείται εκτεταμένα στον τομέα της ανάλυσης του texture. Πέρα από αυτό, μία άλλη μέτρηση που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η συνάρτηση του **autocorrelation** [43].

Ο **gray – level co – occurrence matrix** $P[i,j]$ προκύπτει, έπειτα από τον υπολογισμό του πόσο συχνά ένα pixel με μια τιμή έντασης i συνδέεται μέσω μίας καθορισμένης χωρικής σχέσης, με ένα pixel με τιμή έντασης j (εικόνα 5.10). Για το λόγο αυτό θα πρέπει πρώτα να καθορίσουμε έναν βοηθητικό πίνακα $\mathbf{d} = (\mathbf{dx}, \mathbf{dy})$, ο οποίος αποτελεί ουσιαστικά τη χωρική συνθήκη μεταξύ των pixel, και αφού μετρήσουμε όλα τα ζεύγη εικονοστοιχείων που απέχουν μεταξύ τους κατά \mathbf{d} και έχουν τιμές σε κλίμακα του γκρι, i και j αντίστοιχα, να υπολογίσουμε αλγοριθμικά

τον πίνακα $P[i,j]$. Τα στοιχεία του πίνακα αυτού, κανονικοποιούνται έπειτα αφού διαιρεθούν με το σύνολο των ζευγαριών των εικονοστοιχείων που υπάρχουν [43].



Εικόνα 5.10 Δημιουργία gray – level co – occurrence matrix $P[i,j]$

Με βάση τα παραπάνω, και έπειτα από τη δημιουργία του πίνακα $P[i,j]$, μία παράμετρος που ποσοτικοποιεί την τυχαιότητα της κατανομής των τιμών των εικονοστοιχείων, ορίζεται ως **Entropy** και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$Entropy = -\sum_i \sum_j P[i,j] \log P[i,j], \quad (5.2)$$

Οι τρεις άλλοι παράμετροι, που ποσοτικοποιούν το **texture** μίας εικόνας, καθορίζονται επίσης από την χρησιμοποίηση του πίνακα $P[i,j]$ και υπολογίζονται από τους παρακάτω τύπους:

$$Energy = \sum_i \sum_j P^2[i,j], \quad (5.3)$$

$$Contrast = \sum_i \sum_j (i-j)^2 P[i,j], \quad (5.4)$$

$$Homogeneity = \sum_i \sum_j \frac{P[i,j]}{1+|i-j|}, \quad (5.5)$$

Συγκεκριμένα:

- Το contrast υπολογίζει την αντίθεση μεταξύ της έντασης ενός pixel και των εντάσεων της γειτονιάς του, κατά μήκος όλης της εικόνας.
- Το homogeneity υπολογίζει την πυκνότητα της κατανομής των στοιχείων του πίνακα $\mathbf{P}[\mathbf{i},\mathbf{j}]$ ως προς τη διαγώνιο του.
- Το energy υπολογίζει το άθροισμα των τετραγώνων των στοιχείων του $\mathbf{P}[\mathbf{i},\mathbf{j}]$

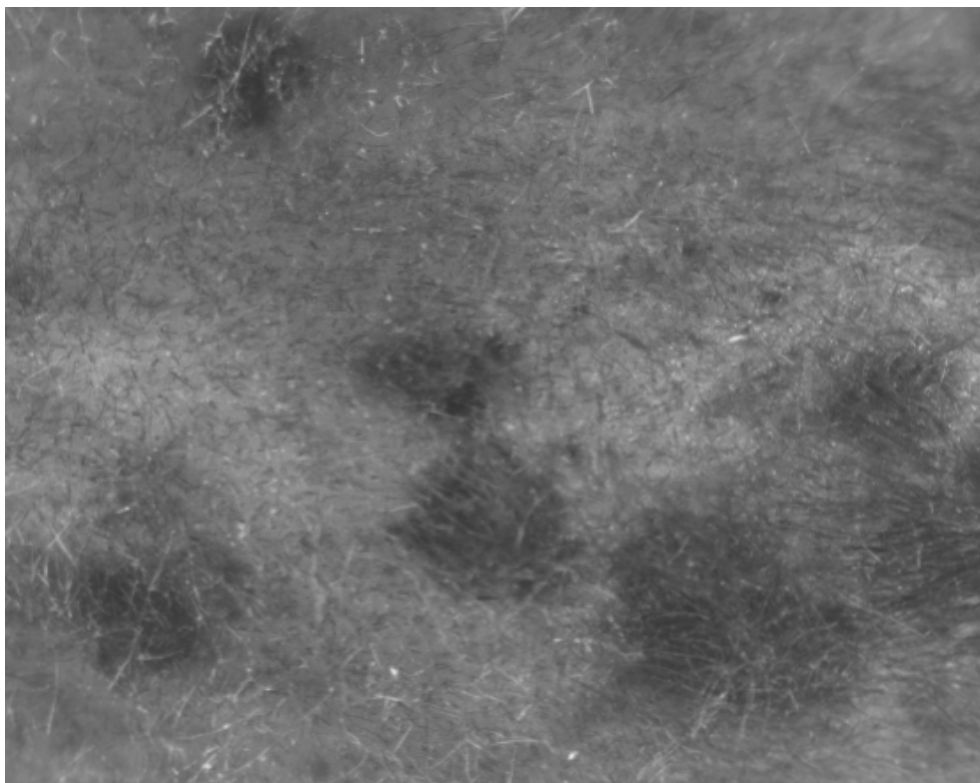
Η επιλογή του βοηθητικού πίνακα \mathbf{d} , είναι πολύ σημαντική για τον υπολογισμό του πίνακα $\mathbf{P}[\mathbf{i},\mathbf{j}]$. Για το λόγο αυτό συνήθως, ο **co – occurrence matrix** υπολογίζεται για διάφορες τιμές του \mathbf{d} και έπειτα επιλέγεται αυτή που δίνει τα καλύτερα στατιστικά αποτελέσματα.

Τέλος, η συνάρτηση του **autocorrelation**, που και αυτή αποτελεί βασική παράμετρο του **texture** δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$p[k,l] = \frac{\frac{1}{(N-k)(N-l)} \sum_{i=1}^{(N-k)} \sum_{j=1}^{(N-l)} f[i,j]f(i+k,j+l)}{\frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f^2[i,j]}, \quad (5.6)$$

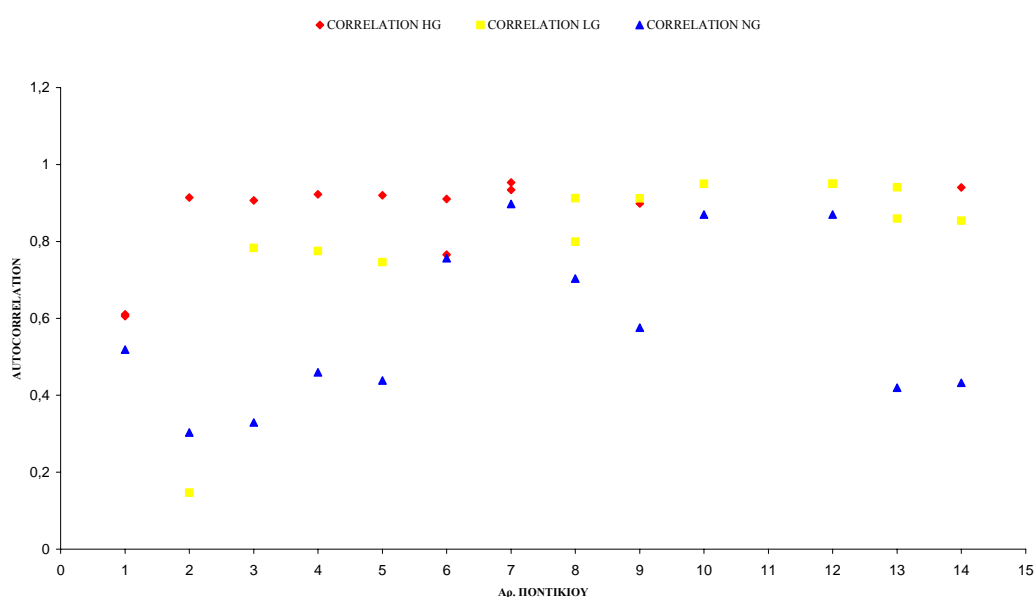
Η μέτρηση αυτή επιστρέφει το πόσο συσχετισμένο είναι pixel με τη γειτονιά του κατά μήκος όλης της εικόνας.

Στη συγκεκριμένη διατριβή, για την υλοποίηση όλων των παραπάνω και τον υπολογισμό των πέντε αυτών παραμέτρων, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για τη χρήση του **texture** ως διαγνωστικού κριτηρίου, δημιουργήθηκε κατάλληλο λογισμικό σε Matlab, μέσω έτοιμων συναρτήσεων που υποστηρίζει το συγκεκριμένο εργαλείο, το οποίο ποσοτικοποιούσε τις παραμέτρους αυτές. Η εικόνα από την οποία «κόψαμε» τις απεικονίσεις των σπύλων, πάρθηκε από το σύστημα της υπερφασματικής



Εικόνα 5.11 Μέρος της ράχης ποντικίου απεικονισμένη στα 740nm απεικόνισης και συγκεκριμένα στο μήκος κύματος των 740nm, όπου τα οπτικά χαρακτηριστικά του texture είναι πιο εμφανή (εικόνα 5.11).

Έπειτα από τον υπολογισμό και των πέντε παραμέτρων, ακολούθησε γραφική αναπαράσταση και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, με σκοπό να



Εικόνα 5.12 Τιμές του autocorrelation για το σύνολο των σπύλων που εξετάστηκαν

διαπιστωθεί ποια από τις παραμέτρους αυτές είναι πιο αποτελεσματική. Το συμπέρασμα ήταν ότι η συνάρτηση του **autocorrelation** δείχνει τα περισσότερα ικανοποιητικά αποτελέσματα, αφού όπως φαίνεται και στην εικόνα 5.12 υπάρχει η τάση οι τιμές της παραμέτρου για τους high – grade σπίλους να είναι εμφανώς μεγαλύτερες από αυτές των low – grade και από αυτές του υγιούς ιστού αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

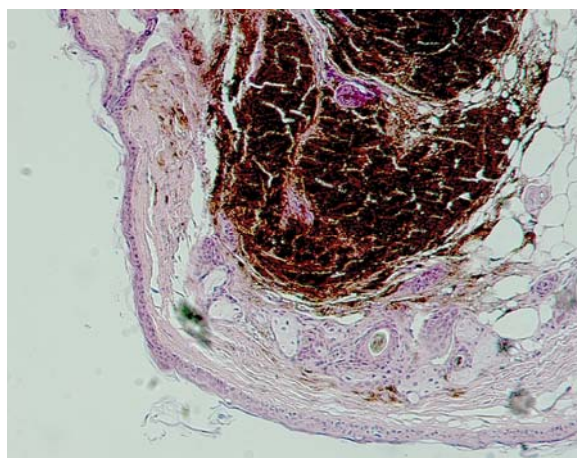
Αποτελέσματα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα που περιγράφει την πειραματική διαδικασία, έπειτα από την λήψη των τελικών υπερφασματικών εικόνων από το σύνολο των 14 ποντικών, που απέμειναν μέχρι το τέλος του πειράματος, πάρθηκαν δείγματα δερματικού ιστού τα οποία και εστάλησαν για εργαστηριακό έλεγχο σε παθολογοανατόμο. Οι απαντήσεις από τις συγκεκριμένες βιοψίες, οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1, αποτελούν το αποκλειστικό και αδιαμφισβήτητο κριτήριο, βάση του οποίου μπορεί να γίνει η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ορθότητας της συγκεκριμένης διατριβής.

BIOPSY RESULTS		
A = High Grade, B = Low Grade		
Mice Number	Genotype / Age / Sex	Diagnosis
1	KO / 15m / F	A:melanoma, B:melanoma
2	KO / 15m / F	A:melanoma, B:normal
3	KO / 15m / F	A:melanoma, B:normal
4	KO / 15m / F	A:melanoma, B:normal
5	KO / 12m / F	A:melanoma, B:normal
6	KO / 12m / F	A:melanoma, B:melanoma
7	KO / 12m / F	A:melanoma, B:melanoma
8	KO / 12m / F	A:normal, B:normal
9	KO / 12m / F	A:melanoma, B:normal
10	WT / 12m / M	B:normal
11	WT / 12m / F	A:neoplasm
12	WT / 12m / M	A:normal, B:normal
13	WT / 12m / F	A:normal, B:normal
14	WT / 12m / M	A:melanoma, B:normal

Πίνακας 6.1 Αποτελέσματα βιοψίας

Συνολικά λοιπόν, όπως είναι εμφανές, ελήφθησαν 26 βιοψίες, και η γνωμάτευση των ιατρών από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου,

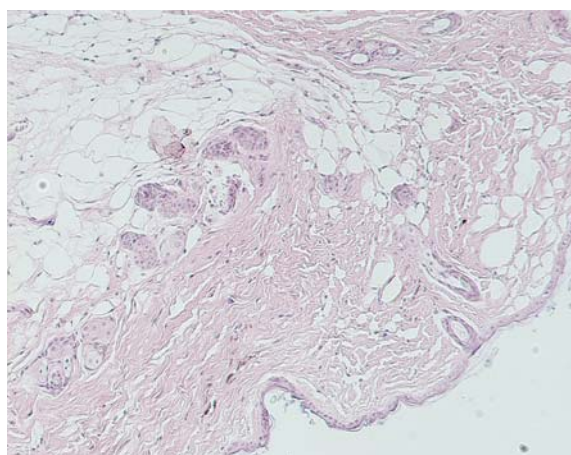


Εικόνα 6.1 Εγκάρσια τομή δέρματος θηλυκού, ΚΟ, ηλικίας 15 μηνών. Στον ιστό είναι εμφανής η ύπαρξη μελανώματος και η διάχυση μελανίνης σε γειτονικά κύτταρα

επιβεβαίωσε σε πρώτο στάδιο τις πρωταρχικές μας παρατηρήσεις, που αφορούσαν την έκβαση της ανάπτυξης του βιολογικού μοντέλου.

Συγκεκριμένα, και τα 9 ζώα, τύπου Trp12^{-/-}, παρουσίασαν μελανώματα, ενώ ένα εξ' αυτών παρουσίασε μετάσταση σε κάποιο άλλο όργανο και συγκεκριμένα στη σπλήνα.

Αντίθετα, στην περίπτωση των μη γενετικά τροποποιημένων ποντικών, μόλις ένα ζώο από τα 5 συνολικά, παρουσίασε ανάπτυξη μελανωμάτων, γεγονός που επιβεβαιώνει και συμφωνεί απόλυτα με τις αρχικές μας υποθέσεις που αναλύθηκαν στην ενότητα που περιγράφει την ανάπτυξη του βιολογικού μοντέλου. Επίσης τα αποτελέσματα αυτά δικαιολογούνται απόλυτα, αφού από βιολογικής άποψης, η αδρανοποίηση του γονιδίου Trp12 οδηγεί σε απορρύθμιση του ανοσολογικού συστήματος και σε μείωση του ελέγχου του οργανισμού απέναντι σε αλλοιωμένα και επικίνδυνα καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 6.2 Εγκάρσια τομή δέρματος θηλυκού, ΚΟ, ηλικίας 15 μηνών. Στον ιστό είναι εμφανής η απουσία αλλοιώσεων

Το γεγονός δε, της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων στην σπλήνα ενός γενετικά τροποποιημένου ζώου, όπως άλλωστε ήδη αναφέρθηκε, παρουσιάζει

ιδιαίτερο ενδιαφέρον από βιοϊατρικής πλευράς, καθώς μόνο ακόμα μία αντίστοιχη περίπτωση έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία όπου τα μελανώματα αυτά να αποκτούν μεταστατικό χαρακτήρα.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρουμε ότι στη συγκεκριμένη διατριβή, έχουν ουσιαστικά αναλυθεί και χρησιμοποιηθεί τρεις διαγνωστικές μέθοδοι για τις δερματικές αλλοιώσεις:

1. Η εμπειρική μέθοδος της διαφανοσκόπησης
2. Η υπερφασματική μέθοδος που έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία της ψευδοχρωματικής εικόνας
3. Η βιοψία μέσω τις οποίας θα αξιολογήσουμε ουσιαστικά και τις δύο άλλες μεθόδους

Για να μπορέσει να γίνει η προαναφερθείσα αξιολόγηση του πειράματος, θα πρέπει βάση της βιοψίας να υπολογιστεί η ακρίβεια και η ορθότητα των διαγνωστικών προγνωστικών των μεθόδων που αναλύθηκαν. Αυτό παρουσιάζεται στον πίνακα 6.2 που ακολουθεί.

	BIOPSY	
	TRUE	FALSE
EMPIRICAL METHOD		
POSITIVES	10	2
NEGATIVES	11	3
PSEUDO COLOR MAP METHOD		
POSITIVES	9	6
NEGATIVES	8	3

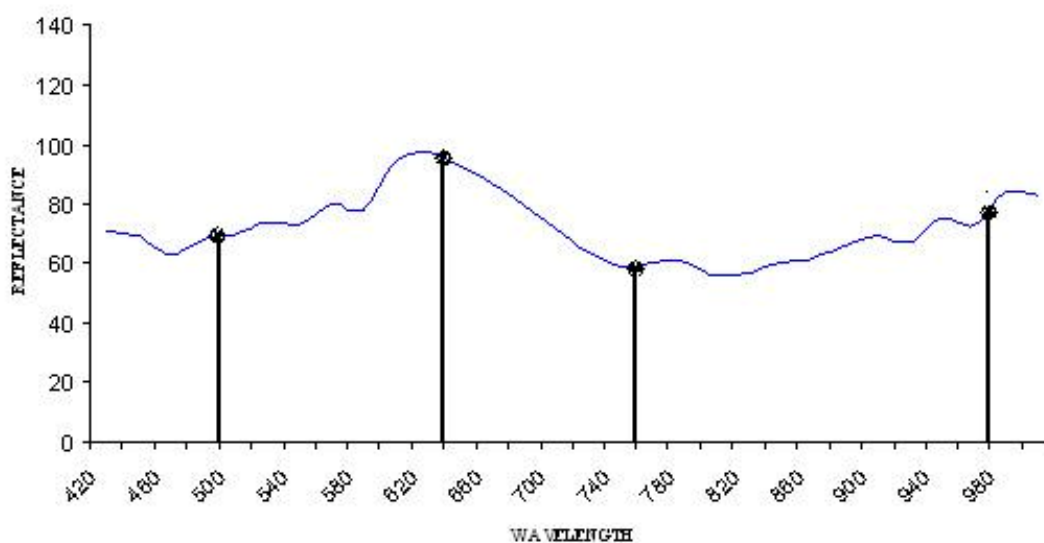
Πίνακας 6.2 Ακρίβεια διαγνωστικών μεθόδων

Επομένως από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι η εμπειρική μέθοδος που στηρίζεται στο κριτήριο της διαφανοσκόπησης, έχει ένα ποσοστό επιτυχίας περίπου 84% ενώ αντίστοιχα η μέθοδος του χάρτη ένα ποσοστό ίσο με 65%, γεγονός που

κρίνεται απολύτως ικανοποιητικό, αν σκεφτούμε ότι άλλες επίσημες διαγνωστικές μέθοδοι, έχουν σαφώς μικρότερα ποσοστά επιτυχίας.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι ένα πολύ σημαντικό αποτέλεσμα που προήλθε από τη συγκεκριμένη μελέτη, είναι ο καθορισμός ενός αριθμού φασματικών περιοχών οι οποίες μπορούν να μας δώσουν από μόνες όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για τις φασματικές ιδιότητες του δερματικού ιστού του ποντικίου αλλά και για την εν γένει ανάλυση των ιδιοτήτων αυτών και την τελική εφαρμογή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν.

Συγκεκριμένα, όπως είναι κατανοητό από όλη την περιγραφή της μελέτης αυτής, το φάσμα του δέρματος του ιστού, ακολουθεί την καμπύλη μορφή που παρουσιάζεται στην εικόνα 6.3. Είναι εμφανές λοιπόν, ότι το φάσμα αυτό μπορεί να



Εικόνα 6.3 Το φάσμα του δέρματος του ποντικίου μπορεί να χαρακτηριστεί πλήρως από τέσσερα επιλεγμένα σημεία

χαρακτηριστεί πλήρως από 4 το πολύ σημεία. Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι, η διαφορά στις κλίσεις του φάσματος, όπως άλλωστε αναφέρθηκε στην ενότητα της ανάλυσης των μετρήσεων, είναι μεταξύ των 640 και 760nm, καθώς και με το ότι το κριτήριο της διαφανοσκόπησης, αφορά τα 980nm αποκλειστικά, καθορίζουν αυτά τα

τρία σημεία σαν τα πλέον σημαντικά για την ανάλυση τέτοιων και αντίστοιχων δεδομένων.

Ένα σύστημα δηλαδή, το οποίο θα μπορεί να απεικονίζει σε αυτά τα μήκη κύματος αποκλειστικά, καθώς και σε ένα ακόμα γύρω στα 500nm, θα παρέχει στο χρήστη όλη την απαραίτητη πληροφορία προκειμένου να εφαρμόσει τις μεθόδους που αναλύθηκαν μέχρι τώρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Προβλήματα – Συμπεράσματα – Εξέλιξη

Είναι προφανές το γεγονός ότι, κατά την εξέλιξη μιας πειραματικής διαδικασίας, είναι πολύ πιθανό να παρουσιαστούν διάφορα προβλήματα τα οποία θα πρέπει να αντιμετωπιστούν. Όταν μάλιστα, η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει και αφορά έμβιους οργανισμούς, η πιθανότητα να παρουσιασθούν τέτοιου είδους προβλήματα αυξάνει αρκετά. Παρόλα αυτά όμως, και άσχετα με το αν τελικά ξεπεράστηκαν τέτοιου είδους θέματα, η εμπειρία που προκύπτει για την ερευνητική ομάδα, είναι ίσως ένα από τα σημαντικότερα αποτελέσματα της όλης διαδικασίας. Η καταγραφή δε, όλων αυτών των δυσκολιών, θεωρείται απαραίτητη, προκειμένου να παρουσιαστεί και να διαμορφωθεί πλήρως, όλο το πρωτόκολλο της διαδικασίας, έτσι ώστε σε ενδεχόμενη παρόμοια μελέτη, τα θέματα αυτά να προβλεφθούν και να ξεπεραστούν αντίστοιχα.

Έτσι λοιπόν, στη συγκεκριμένη διατριβή, πέραν κάποιων μικροδυσκολιών που αντιμετωπίσαμε με επιτυχία, προέκυψαν ορισμένα βασικά προβλήματα, που έχουν ήδη αναφερθεί στις προηγούμενες ενότητες, και τα οποία αναπόφευκτα, επηρεάζουν τα αποτελέσματα μας.

Ένα εξ' αυτών των θεμάτων, και ουσιαστικά το σημαντικότερο, ήταν η ανάπτυξη της φλεγμονής στη ράχη των ποντικών, η οποία προκλήθηκε από την αντίδραση των χημικών με το δέρμα των ζώων, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του βιολογικού μοντέλου. Η «κρούστα» αυτή δεν επέτρεπε την απεικόνιση του δέρματος

του ποντικιού, και το πραγματικό πρόβλημα είναι πως δεν υπάρχει μέθοδος απομάκρυνσης της πέραν της απορρόφησης της από τον οργανισμό. Θα πρέπει λοιπόν στο μέλλον, οποιοσδήποτε ασχοληθεί με αντίστοιχη μελέτη, να γνωρίζει ότι η αποτελεσματική απεικόνιση του δέρματος των ποντικών, είναι δυνατή έπειτα από την πάροδο του χρονικού διαστήματος που απαιτείται για την ίαση της συγκεκριμένης φλεγμονής.

Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα, ήταν ο τρόπος της δειγματοληψίας αφού λόγω έλλειψης κατάλληλου εξοπλισμού, η τομή που γινόταν ήταν μεγαλύτερη από την περιοχή της αλλοίωσης. Αυτό σε συνδυασμό με τον τρόπο που διενεργούνται οι βιοψίες εργαστηριακά (τεμαχισμός του δείγματος και τυχαία μικροσκόπηση επιμέρους δειγμάτων ιστού), αυξάνουν την πιθανότητα λάθους γνωμάτευσης για τον υπό εξέταση ιστό. Θα πρέπει λοιπόν, η λήψη των δειγμάτων να γίνεται με πιπέτα, προκειμένου να υπάρχει πλήρης ακρίβεια για το δείγμα μας, και έτσι να μειώνεται η πιθανότητα λάθους.

Επίσης, όπως αναφέρθηκε στην ενότητα για το texture analysis, κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών μετρήσεων δεν υπήρχε η πρόβλεψη ότι θα χρησιμοποιηθεί η μέθοδος αυτή σαν διαγνωστικό κριτήριο και για το λόγο αυτό δεν έγινε μικροσκοπική απεικόνιση των σπύλων. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα η εικόνα την οποία διοχετεύσαμε στο λογισμικό που αναπτύχθηκε για την προσέγγιση αυτή, να έχει πολύ μικρό μέγεθος και ουσιαστικά ελάχιστη πληροφορία για τη χωρική και δομική κατάσταση της περιοχής.

Τέλος, θα ήταν καλό, σε ενδεχόμενη επανάληψη της μελέτης αυτής, να χρησιμοποιηθούν ποντίκια λευκού χρώματος, προκειμένου τα ποσοστά αντίθεσης μεταξύ του φυσιολογικού δέρματος και των αλλοιώσεων, να είναι αρκετά υψηλή και

να μπορεί έτσι να αξιοποιηθεί όλη η δυναμική περιοχή του υπερφασματικού απεικονιστικού συστήματος.

Όλα τα παραπάνω, όπως άλλωστε είναι φυσικό και αναμενόμενο, επηρέασαν την πειραματική διαδικασία και την ανάλυση των μετρήσεων. Παρόλα αυτά όμως, όπως έγινε εμφανές από την ενότητα που παρουσιάστηκαν οι απαντήσεις των βιοψιών, τα αποτελέσματα της μελέτης, ήταν απολύτως ικανοποιητικά. Αυτό σημαίνει ότι ο βασικός στόχος της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής, επετεύχθει, αφού έγιναν κατανοητοί κάποιοι από τους βιολογικούς μηχανισμούς οι οποίοι διέπουν την ανάπτυξη καρκινικών αλλοιώσεων στο δέρμα των ποντικών, αλλά και πέρα από αυτό, αφού αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και της οποίας η εξέλιξη είναι δυνατόν να οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας έγκυρης και κατάλληλης διαγνωστικής μεθόδου για την συγκεκριμένη πάθηση.

Η μέθοδος αυτή, μπορεί ήδη να χρησιμοποιηθεί σε ανάλογες πειραματικές διαδικασίες, κάνοντας έτσι εφικτή την έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση μελανωτικών σπύλων σε ζωικούς οργανισμούς.

Όσον αφορά δε την εξέλιξη της μελέτης αυτής, θα ήταν καλό, να επαναληφθεί όλη η διαδικασία από την αρχή, σε ένα μεγαλύτερο αριθμό ποντικών (προκειμένου να υπάρχει μεγαλύτερο στατιστικό δείγμα), και αφού πρώτα έχουν προβλεφθεί όλα τα προβλήματα που παρουσιάστηκαν και καταγράφηκαν παραπάνω, έτσι ώστε να βελτιωθούν κατά το δυνατόν τα αποτελέσματα, αλλά και προκειμένου, να υλοποιηθούν κάποιες μέθοδοι ανάλυσης των μετρήσεων, ο οποίος στη συγκεκριμένη διατριβή δεν ήταν δυνατόν να εφαρμοστούν.

Τέλος, όσον αφορά το μακρινό μέλλον, και έπειτα από τη βελτίωση της μελέτης αυτής, μέσω της δυνατότητας καθορισμού συγκεκριμένων φασματικών

περιοχών, οι οποίες θα περιέχουν ουσιαστικά όλη την απαραίτητη φασματική πληροφορία, όπως άλλωστε αναφέρθηκε στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, είναι δυνατή η ανάπτυξη κατάλληλου οπτικού συστήματος, το οποίο θα απεικονίζει στα συγκεκριμένα μήκη κύματος και θα μπορεί να βγάζει τα απαραίτητα αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Αναφορές

- [1] Parkin, DM, Bray, F, Ferlay, J and Pisani, P, (2005) "Global cancer statistics" 2002. CA Cancer J Clin 55: 74-108
- [2] Balch, CM, Soong, SJ, Atkins, MB, Buzaid, AC, Cascinelli, N, Coit, DG et al., (2004) "An evidence-based staging system for cutaneous melanoma" CA Cancer J Clin 54: 131-49; quiz 182-4
- [3] 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
- [4] Stefanaki, IM, Tosca, AD, Themelis, GC, Vazgiouraki, EM, Dokianakis, DN, Panayiotidis, JG et al., (2001) "In vivo detection of human papilloma virus-induced lesions of anogenital area after application of acetic acid: a novel and accurate approach to a trivial method" J Photochem Photobiol B 65: 115-21
- [5] D. Elder, G. Murphy, "Atlas of Tumor Pathology. Melanocytic Tumors of the Skin"
- [6] Jane L. Rozycki, MD, and Terry L. Barrett, MD, "The Dysplastic Nevus. Curr Probl Dermatol, September/October 2003
- [7] Jimbow K, Roth SI, Fitzpatrick TB, Szabo G, "Mitotic activity in non-neoplastic melanocytes in vivo as determined by histochemical,

autoradiographic, and electron microscopic studies", J. Cell Biol. 1975; 66: 663-70

- [8] Δ. Α. Τσιφτσής, "Σύγχρονη γενική χειρουργική", Κεφ. 24
- [9] Atmazoglou B, Giova D, and Ouzounoglou (2001) "Development of spectral imaging fluorescence techniques for cancer detection"
- [10] Μπάλας Κ., "Σημειώσεις Οπτοηλεκτρονικής 2003"
- [11] Douglas A. Skong, "Principles of Instrumental Analysis"
- [12] J. Michael Hollas, "Modern Spectroscopy" (Paperback)
- [13] Daniel C. Harris, Michael D. Bertolucci, "Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy" (Paperback)
- [14] 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"
- [15] Chin, L, (2003) "The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man" Nat Rev Cancer 3: 559-70
- [16] Kabbarah, O and Chin, L, (2006) "Advances in malignant melanoma: genetic insights from mouse and man" Front Biosci 11: 928-42
- [17] Broome Powell, M, Gause, PR, Hyman, P, Gregus, J, Lluria-Prevatt, M, Nagle, R et al., (1999) "Induction of melanoma in TPras transgenic mice. Carcinogenesis" 20: 1747-53
- [18] Kannan, K, Sharpless, NE, Xu, J, O'Hagan, RC, Bosenberg, M and Chin, L, (2003) "Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model" Proc Natl Acad Sci U S A 100: 1221-5

- [19] Krimpenfort, P, Quon, KC, Mooi, WJ, Loonstra, A and Berns, A, (2001)
"Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice"
Nature 413: 83-86
- [20] Berkelhammer, J and Oxenhandler, RW, (1987) "Evaluation of
pre-malignant and malignant lesions during the induction of mouse
melanomas" Cancer Res 47: 1251-4
- [21] Eva Gonzalez Suarez, Enrique Samper, Juana M. Flores & María A.
Blasco. "Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to
skin tumorigenesis" (2000) Nature America Inc
- [22] Junko S.Suzuki, Noriko Nishimura, Baoxu Zhang, Yoko Nakatsuru,
Shizuko Kobayashi, Masahiko Satoh and Chiharu Tohyama.
"Mettallothionein deficiency enhances skin carcinogenesis induced by
7,12-dimethylbenz[a] anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-
acetate in mettallothionein-null mice" Carcinogenesis vol.24 (2003)
- [23] Bai Y, Edamatsu H, Maeda S, Saito H, Suzuki N, Satoh T, Kataoka T.
"Crucial role of phospholipase Cepsilon in chemical carcinogen-induced
skin tumor development" Cancer Res. (2004)
- [24] Dumitru, CD, Ceci, JD, Tsatsanis, C, Kontoyiannis, D, Stamatakis, K, Lin,
JH et al., (2000) "TNF-alpha induction by LPS is regulated
posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway" Cell 103: 1071-
83
- [25] Patriotis, C, Makris, A, Bear, SE and Tschlis, PN, (1993) "Tumor
progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the
progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation" Proc Natl
Acad Sci U S A 90: 2251-5

- [26] Patriotis, C, Makris, A, Chernoff, J and Tsihchlis, PN, (1994) "Tpl-2 acts in concert with Ras and Raf-1 to activate mitogen-activated protein kinase" Proc Natl Acad Sci U S A 91: 9755-9
- [27] Patriotis, C, Russeva, MG, Lin, JH, Srinivasula, SM, Markova, DZ, Tsatsanis, C et al., (2001) "Tpl-2 induces apoptosis by promoting the assembly of protein complexes that contain caspase-9, the adapter protein Tvl-1, and procaspase-3" J Cell Physiol 187: 176-87
- [28] Christopher M. Bishop, (2006) "Pattern Recognition and Machine Learning", Springer
- [29] Sergios Theodoridis, Konstantinos Koutroumbas, (2006) "Pattern Recognition" (3rd edition), Elsevier
- [30] Phiroz Bhagat, (2005) "Pattern Recognition in Industry", Elsevier
- [31] Richard O. Duda, Peter E. Hart, David G. Stork (2001) "Pattern classification" (2nd edition), Wiley, New York
- [32] Dietrich Paulus and Joachim Hornegger (1998) "Applied Pattern Recognition" (2nd edition), Vieweg
- [33] J. Schuermann, "Pattern Classification: A Unified View of Statistical and Neural Approaches", Wiley&Sons, 1996
- [34] Sholom Weiss and Casimir Kulikowski (1991) "Computer Systems That Learn", Morgan Kaufmann
- [35] E. B. Fowlkes & C. L. Mallows (September 1983). "A Method for Comparing Two Hierarchical Clusterings". Journal of the American Statistical Association 78 (383): 553–584

- [36] Clatworthy, J., Buick, D., Hankins, M., Weinman, J., & Horne, R. (2005).
"The use and reporting of cluster analysis in health psychology: A review."
British Journal of Health Psychology 10: 329-358
- [37] Cole, A. J. & Wishart, D. (1970). "An improved algorithm for the Jardine-
Sibson method of generating overlapping clusters." The Computer Journal
13(2):156-163
- [38] Huang, Z. (1998). "Extensions to the K-means Algorithm for Clustering
Large Datasets with Categorical Values." Data Mining and Knowledge
Discovery, 2, p. 283-304
- [39] Jardine, N. & Sibson, R. (1968). "The construction of hierarchic and non-
hierarchic classifications." The Computer Journal 11:177
- [40] Romesburg, H. Clarles, "Cluster Analysis for Researchers"
- [41] Zhang, T., Ramakrishnan, R., and Livny, M. 1996. BIRCH: "An efficient
data clustering method for very large databases." Proceedings of ACM
SIGMOD Conference, Montreal, Canada, pp. 103–114
- [42] Linda G. Shapiro and George C. Stockman (2001): "Computer Vision", pp
279-325, New Jersey, Prentice-Hall
- [43] Ramesh Jain, Rangachar Kasturi, Brian G. Schunck "Machine Vision"
- [44] Helmi Zulhaidi, Mohd Shafri , Affendi Suhaili, Shattri Mansor "The
Performance of Maximum Likelihood, Spectral Angle Mapper, Neural
Network and Decision Tree Classifiers in Hyperspectral Image Analysis"
- [45] J. H. Lumme "Classification of Vegetarian and Soil Using Imaging
Spectrometer Data"

- [46] Berkelhammer, J and Oxenhandler, RW, (1987) "Evaluation of premalignant and malignant lesions during the induction of mouse melanomas." Cancer Res 47: 1251-4
- [47] Berkelhammer, J, Oxenhandler, RW, Hook, RR, Jr. and Hennessy, JM, (1982) "Development of a new melanoma model in C57BL/6 mice. Cancer Res 42: 3157-63
- [48] D.Farkas, C.Du, G.Fisher, C.Lau, W.Niu, E.Wachman, R.Levenson, "Non-invasive image acquisition and advanced processing in optical bioimaging," Computerized Medical Imaging and Graphics, 22, 89-102, (1998)
- [49] R.Ornberg, B.Worner, D.Edwards, "Analysis of stained objects in histological sections by spectral imaging and differential absorption," J. Histochem. Cytochem., 47, 1307- 1313, (1999)
- [50] D.Soenksen, G.McNamara, Y.Garini, N.Katzir, "Method of cancer cell detection", US Patent: 5,995,645, (1999)
- [51] C.Rothmann, I.Bar-Am, Z.Malik, "Spectral imaging for quantitative histology and cytogenetics", Histology and Histopathology, 13, 921-926, (1998)
- [52] D.Cabib,R.Buckwald, Z.Malik, N.Ben-Yosef, "Spectral Bioimaging methods for cell classification", US Patent: 5,991,028, (1999)
- [53] C. Balas, G. Themelis, E. Prokopakis, I. Orfanudaki, E. Koumandakis, E. Helidonis, "In vivo detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid tissue interaction kinetics", J. Photoch. Photob., vol. 53/1-3, pp. 153-157 (1999)

- [54] G. Girouard, A. Bannari, A. El Harti, A. Desrochers "Validated Spectral Angle Mapper Algorithm for Geological Mapping: Comparative Study between Quickbird and Landsat-TM"
- [55] Sotillo, R., Garcia, J. F., Ortega, S., Martin, J., Dubus, P., Barbacid, M., and Malumbres, M. (2001). "Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice.", *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13312-13317.
- [56] Walker, G. J., and Hayward, N. K. (2002). "Pathways to melanoma development: lessons from the mouse.", *J Invest Dermatol* 119, 783-792.