

Περιεχόμενα

Περίληψη

Abstract

Εισαγωγή

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Βασικές αρχές των λέιζερ και η αλληλεπίδραση τους με τον ιστό.

1.1 Εισαγωγή

1.2 Λείζερ

Αρχές Λειτουργίας των Λείζερ

Λείζερ ιόντων αργού (Ar^+ laser)

Λείζερ Ηλίου-Καδμίου (He-Cd laser)

1.3 Αλληλεπίδραση λέιζερ ιστού

Φθορισμός Βιομορίων

Χρόνος ζωής και κβαντική απόδοση φθορισμού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας και ανίχνευση της με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού.

2.1 Εισαγωγή

2.2 Δημιουργία αθηρωματικής πλάκας

Προδιαθεσιακοί παράγοντες της αθηροσκλήρωσης

2.3 Ανίχνευση αθηρωματικής πλάκας με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού

Εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης και φασματοσκοπικές διαγνωστικές τεχνικές

Ο ρόλος της αιμοσφαιρίνης

Εισαγωγή στο πειραματικό μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Η επίδραση στο φθορισμό περιφερειακών αγγείων της συντήρησης σε φορμόλη και σε υγρό άζωτο.

- 3.1 Εισαγωγή
- 3.2 Πειραματική διάταξη
 - Δείγματα
 - Καταγραφή του φθορισμού
 - Δημιουργία αλγεβρικών αλγορίθμων
- 3.3 Αποτελέσματα
 - Ανάλυση αποτελεσμάτων
 - Εφαρμογή των αλγορίθμων
- 3.4 Συμπεράσματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Διαχωρισμός περιφερειακών αγγείων *in vitro* και *in vivo* με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού.

- 4.1 Εισαγωγή
- 4-2 Πειραματική διάταξη
 - Δείγματα
 - Καταγραφή του φθορισμού
- 4.3 Αποτελέσματα
 - Ανάλυση αποτελεσμάτων
 - Επεξεργασία φασμάτων με νευρωνικά δίκτυα
- 4.4 *In vivo* μετρήσεις
- 4.5 Συμπεράσματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

In vitro και *in vivo* μετρήσεις φθορισμού σε καρδιές ανθρώπων και αμνών

- 5.1 Εισαγωγή
- 5.2 Πειραματική διάταξη
 - Δείγματα
 - Καταγραφή του φθορισμού
- 5.3 Αποτελέσματα
 - Ανάλυση αποτελεσμάτων
 - Επίδραση της συντήρησης σε φορμόλη
- 5.4 *In vivo* μετρήσεις
- 5.5 Συμπεράσματα

Μελλοντικοί στόχοι

Βιβλιογραφία

Περίληψη Διδακτορικής Διατριβής

Ο πρώτος στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης της συντήρησης σε φορμόλη και υγρό άζωτο στο φάσμα φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ των περιφερειακών αγγείων.

Για την διέγερση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm) και ιόντων Αργού (457.9, 476.5, 488, 496.5, και 501.7nm) σε ξεχωριστές σειρές μετρήσεων. Όλα τα δείγματα πάρθηκαν από εγχειρήσεις by-pass και ακρωτηριασμούς που έγιναν στην Αγγειοχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Κρήτης και ακτινοβολήθηκαν περίπου μία ώρα μετά την εκτομή τους. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φασμάτων φθορισμού των ιστών όταν ήταν νωποί και μετά τη συντήρησή τους σε φορμόλη ή υγρό άζωτο για 24 και 48 ώρες. Η σύγκριση των σημάτων φθορισμού έγινε με την εφαρμογή δώδεκα (12) απλών αλγεβρικών αλγορίθμων, οι οποίοι ήταν βασισμένοι στις διαφορές της έντασης των καταγραφόμενων φασμάτων.

Όλες οι *in vitro* μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ πάνω σε ανθρώπινους ιστούς πραγματοποιήθηκαν κατόπιν συντήρησης των δειγμάτων για κάποιο χρονικό διάστημα σε φορμόλη ή υγρό άζωτο. Μέχρι τώρα δεν υπήρξε καμία εκτεταμένη μελέτη για το ρόλο της συντήρησης σε φορμόλη ή υγρό άζωτο στα σήματα φθορισμού. Η έλλειψη στη διεθνή βιβλιογραφία μίας τέτοιας έρευνας έκανε επιτακτική την ανάγκη υλοποίησης της. Οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν: η διερεύνηση των αλλοιώσεων στα φάσματα που οφείλονται αποκλειστικά στην συντήρηση, η μελέτη του χρόνου που απαιτείται για τη δημιουργία αυτών των αλλοιώσεων και η ανάδειξη του τρόπου συντήρησης που επιφέρει τις λιγότερες δυνατές αλλαγές στην κατανομή των συλλεγόμενων σημάτων φθορισμού.

Οι αλγόριθμοι εμφάνισαν καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά τη διάκριση των ιστών, για συντήρηση σε φορμόλη σε σχέση με το υγρό άζωτο. Μερικοί από τους αλγόριθμους κατάφεραν να ανιχνεύσουν αλλαγές στα σήματα φθορισμού των δειγμάτων όταν ήταν νωπά και μετά τη συντήρησή τους για ένα εικοσιτετράωρο σε φορμόλη ή υγρό άζωτο. Όμως για το χρονικό διάστημα μεταξύ 24 και 48 ωρών όλοι οι αλγόριθμοι παρουσίασαν πολύ

χαμηλά ποσοστά επιτυχίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρές ενδείξεις ότι η συντήρηση σε υγρό άζωτο δεν αλλάζει σημαντικά τα φασματικά χαρακτηριστικά των ιστών. Αντίθετα, η συντήρηση σε φορμόλη φαίνεται να επηρεάζει και να αλλοιώνει την κατανομή των φασμάτων φθορισμού των περιφερειακών αγγείων, μέσα στις πρώτες 24 ώρες.

Η διερεύνηση των πιθανοτήτων για την επίτευξη της διάκρισης μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών περιφερειακών αγγείων (in vitro), με τη χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ αποτέλεσε το δεύτερο στόχο αυτής της εργασίας.

Για την ακτινοβολία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πάλι τα λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm) και ιόντων Αργού (457.9, 476.5, 488 και 496.5nm). Οι ιστοί διεγέρθηκαν με τη χρήση ενός ή δύο διαφορετικών μηκών κύματος ταυτόχρονα. Τα δείγματα (λαγόνιες, μηριαίες, ιγνυακές, κνημιαίες περονιαίες αρτηρίες, κοιλιακές αορτές) προέρχονταν και σε αυτή την περίπτωση από εγχειρήσεις by-pass και ακρωτηριασμούς που έγιναν στην προαναφερθείσα Κλινική. Ο διαχωρισμός και η ταξινόμηση των διαφορετικών τύπων ιστών (φυσιολογική αρτηρία, ινώδη πλάκα, ασβεστοποιημένη πλάκα) πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή 12 απλών αλγεβρικών αλγορίθμων που σχετίζονταν με τα συλλεγόμενα φάσματα, καθώς και με τη μελέτη του μέγιστου πλάτους στο μισό του ύψους. Επίσης, ένας αριθμός από τα φάσματα φθορισμού που εξήχθησαν επεξεργάστηκαν με τη χρήση τεχνητού νευρωνικού δικτύου, έχοντας ως στόχο την πιο λεπτομερειακή ανάλυση των καταγραφόμενων σημάτων. Επιπλέον, ερευνήθηκε ο τρόπος διέγερσης (ένα ή δύο διαφορετικά μήκη κύματος) των περιφερειακών αγγείων που αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά τη διάκριση τους. Τέλος, μελετήθηκε ένας περιορισμένος αριθμός *in vivo* μετρήσεων φθορισμού που πάρθηκαν από εγχειρήσεις by-pass, με γραμμή εκπομπής στα 442nm (Ηλιο-Κάδμιο). Οι *in vivo* μετρήσεις έγιναν στο The Royal London Hospital στο Whitechapel του Λονδίνου.

Ο κυριότερος στόχος της συγκεκριμένης μελέτης, ήταν η διερεύνηση των πιθανοτήτων για την κλινική χρήση αυτής της σχετικά καινούργιας ελάχιστα επεμβατικής τεχνικής (φασματοσκοπία φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ), ως διαγνωστικού μέσου για την έγκαιρη ανίχνευση νοσηρών

περιφερειακών αγγείων. Η συλλογή των δεδομένων και η ανάλυση τους πραγματοποιήθηκε σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα (μερικά δευτερόλεπτα), έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η χρήση αυτής της τεχνικής και σε *in vivo* μετρήσεις. Το βασικό πλάνο είναι η χρησιμοποίηση αυτής της μεθόδου, σε συνεργασία με τις υπάρχουσες διαγνωστικές τεχνικές, για την εξαγωγή όσο το δυνατόν πιο βελτιωμένων αποτελεσμάτων που αφορούν στην έγκαιρη και αξιόπιστη ανίχνευση παθήσεων των περιφερειακών αγγείων.

Στις *in vitro* μετρήσεις, με τους αλγόριθμους έγινε δυνατή η διαχώριση τόσο του φυσιολογικού από τον ινώδη ιστό, όσο και του φυσιολογικού από τον ασβεστοποιημένο αρτηριακό ιστό. Η χρήση δύο διαφορετικών μηκών κύματος ταυτόχρονα για διέγερση φαίνεται να αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα στην εφαρμογή των αλγόριθμων για τη διάκριση των διαφορετικών τύπων ιστών. Αυτό ήταν πιο εμφανές στην περίπτωση σύγκρισης φυσιολογικού και ινώδους ιστού. Κατά την ακτινοβολία των δειγμάτων με τις γραμμές στα 442nm+488nm και στα 442nm+496.5nm εξήχθησαν τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς την ταξινόμηση των διαφορετικών τύπων ιστών. Επίσης, μερικά από τα συλλεγόμενα φάσματα φθορισμού αναλύθηκαν με τη χρήση νευρωνικών δικτύων. Η επεξεργασία με νευρωνικά δίκτυα επέτρεψε, εκτός από τη διάκριση φυσιολογικού από ινώδη ή ασβεστοποιημένο ιστό και τη διάκριση της ινώδους από την ασβεστοποιημένη πλάκα. Στις *in vivo* μετρήσεις για τη διέγερση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μόνο η γραμμή στα 442nm (λέιζερ Ηλίου-Καδμίου). Τα αρχικά αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά σε ότι αφορά τη διάκριση φυσιολογικών από παθολογικά περιφερειακά αγγεία. Ωστόσο, περαιτέρω πειράματα (*in vivo*) είναι αναγκαία για να υποστηρίξουν και να επιβεβαιώσουν αυτές τις πρωταρχικές παρατηρήσεις.

Η μελέτη φασμάτων φθορισμού από καρδιές ανθρώπων και αμνών (in vitro) συνιστά τον τρίτο στόχο αυτής της μελέτης.

Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού, με γραμμή εκπομπής στα 457.9nm. Τα δείγματα των αμνών συλλέχτηκαν αμέσως μετά την σφαγή των ζώων και εκτέθηκαν σε ακτινοβολία μέσα στις δύο πρώτες ώρες από την εκτομή τους. Οι ανθρώπινες καρδιές προήλθαν από το νεκροτομείο και εξετάστηκαν μία ώρα μετά την εκτομή τους. Σήματα

φθορισμού καταγράφηκαν από διάφορα καρδιακά τμήματα (αριστερό και δεξιό κόλπο και κοιλία, αορτή, μυοκάρδιο, επικάρδιο). Ερευνήθηκε η σταθερότητα των μετρήσεων μέσα σε κάθε ανατομική περιοχή της καρδιάς και έγινε προσπάθεια να διαχωριστούν με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού τα διάφορα καρδιακά τμήματα (με τη σύγκριση του ύψους της φασματικής έντασης, με την εφαρμογή αλγορίθμων). Επίσης, μελετήθηκαν οι διαφορές στην κατανομή των σημάτων φθορισμού που οφείλονταν στην επίδραση της συντήρησης των δειγμάτων σε φορμόλη (για 48 ώρες). Τέλος, αναλύθηκε ένας αριθμός από *in vivo* μετρήσεις που συλλέχθηκαν κατά την διάρκεια εγχειρήσεων ανοιχτής καρδιάς σε νοσοκομείο του Λονδίνου (Saint Bartholomew Hospital). Στα συγκεκριμένα πειράματα, για καθαρά πρακτικούς λόγους, ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm).

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν ολόκληρες και, κατά τεκμήριο, φυσιολογικές καρδιές. Με αυτό τον τρόπο μελετήθηκε ολοκληρωμένα το φάσμα εκπομπής του μυοκαρδιακού ιστού και έγινε προσπάθεια ανίχνευσης παθολογικών καταστάσεων του μυοκαρδίου. Ο απώτερος στόχος είναι η χρησιμοποίηση αυτής της διαγνωστικής μεθόδου, σε συνεργασία με τη συνήθη βιοψία, για την εξαγωγή βελτιωμένων αποτελεσμάτων.

Τόσο στις καρδιές των ανθρώπων όσο και των αμνών παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη σταθερότητα των μετρήσεων μέσα σε κάθε κοιλότητα (κόλπος, κοιλία). Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως υγιή. Επομένως αναμένεται μία διαφοροποίηση στα σήματα φθορισμού που θα ληφθούν από νοσηρές περιοχές. Επιπλέον, σε όλες τις καρδιές (ανθρώπων και αμνών) που μελετήθηκαν, κυρίως η αορτή αλλά και οι κόλποι (ιδίως ο αριστερός), εμφάνισαν υψηλότερης έντασης σήματα φθορισμού συγκριτικά με άλλες ανατομικές περιοχές (π.χ. κοιλίες). Ακόμη, ανιχνεύτηκαν σημαντικές αλλαγές στην κατανομή των φασμάτων φθορισμού που εξήχθησαν (*in vitro*) από το μυοκάρδιο ανθρώπινων καρδιών, σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές της καρδιάς. Μετά τη συντήρηση των δειγμάτων σε φορμόλη για 48 ώρες, ανιχνεύτηκαν αλλαγές στη φασματική τους κατανομή παρόμοιες με αυτές που διαπιστώθηκαν και στην περίπτωση συντήρησης σε φορμόλη περιφερειακών αγγείων. Τα σήματα φθορισμού που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των *in vivo*

μετρήσεων σε ανθρώπινες καρδιές παρουσίασαν αρκετές ομοιότητες, τόσο στην μεταβολή της έντασης του σήματος στις διαφορετικές ανατομικές περιοχές όσο και στη μορφολογία, με τα φάσματα που καταγράφηκαν *in vitro*.

Η μεθοδολογία και τα αποτελέσματα των ανωτέρω μελετών προσδοκείται να έχουν στο μέλλον κλινικές εφαρμογές στην διάγνωση των καρδιαγγειακών παθήσεων.

ABSTRACT

The first scope of this work was to investigate the effects of liquid nitrogen and formalin-based conservation in the laser-induced fluorescence spectra taken from peripheral vascular tissue.

A He-Cd laser emitting at 442nm and an Ar⁺ laser emitting at 457.9nm, 476.5nm, 488nm, 496.5nm and 501.7nm were used as excitation sources. Separate sets of measurements were made for all samples at each of these wavelengths. All samples were obtained from by-pass operations and amputations performed at the Vascular Surgery Clinic of the University of Crete. The samples were irradiated one hour after the excision. The fluorescence spectra from fresh tissues were compared to those taken after the tissues were stored in liquid nitrogen or formalin for 24 and 48 hours. The comparison of the fluorescence signals was made with the implementation of twelve (12) simple algebraic algorithms which were based on the intensity difference of the recorded spectra.

All the *in vitro* laser induced fluorescence spectroscopy studies were performed after the conservation of the specimens for a certain time in formalin or in liquid nitrogen. So far the effects of the liquid nitrogen or formalin-based conservation in the fluorescence spectra of the tissues have not been extensively studied. The lack of this kind of study in the international literature made its realization a necessity. The aims of this study were: the investigation of the changes in the fluorescence spectra due to conservation, the study of the time required for the generation of such changes and the selection of a way of conservation which induces the less changes in the distribution of the recorded fluorescence signals.

The algorithms seemed to give better results in the discrimination of the tissues, for formalin than for liquid nitrogen conservation. Some of the algorithms succeeded to detect changes in the fluorescence signal of tissue samples obtained directly after excision from those stored in liquid nitrogen or formalin for 24 hours, but usually failed to detect any variations between 24 and 48 hours. The results suggest that liquid nitrogen conservation does not seriously alter the spectral features of excised tissue whereas formalin

conservation seem to affect the distribution of the laser induced fluorescence spectra within the first 24 hours.

The second scope of this work was to investigate the feasibility of application of laser induced fluorescence spectroscopy (in vitro) in order to discriminate between normal and pathologic peripheral vascular tissue.

A He-Cd laser emitting at 442nm and an Ar⁺ laser emitting at 457.9nm, 476.5nm, 488nm, 496.5nm were again used as excitation sources. All samples were subjected to either single or dual wavelength excitation from the He-Cd laser and one of the Ar⁺ laser emission lines. All the samples (abdominal aortas, as well as flank, femoral, tibial, fibular and ham artery tissues) were obtained from by-pass operations and amputations performed at the aforementioned Clinic. The discrimination and the classification of different types of tissue (normal artery, fibrous plaque, calcified plaque) was done with: i) the implementation of twelve (12) simple algebraic algorithms, which were related to the recorded spectra and ii) study of the full width at half maximum (FWHM) of the spectra. In addition, a number of the obtained fluorescence spectra was processed with the use of Artificial Neural Networks (ANN) in order to analyze them in a more detailed way. Furthermore, the way of excitation (single or dual wavelength) which gives the best results in terms of discrimination of tissues was investigated. Finally, a number of *in vivo* fluorescence measurements was taken during by-pass operations using as an excitation source a He-Cd laser. The *in vivo* measurements were performed at The Royal London Hospital, Whitechapel, London.

The primary aim of this study, was to investigate the possibility for the clinical use of this relatively new, minimally invasive technique (laser-induced fluorescence spectroscopy), as a diagnostic tool for the early detection of diseased peripheral vascular tissues. The collection and the analysis of the data was made in a relatively small time interval (a few seconds), in order to make possible the application of this technique to *in vivo* measurements too. The intention is to use this technique in conjunction with the existing diagnostic methods, in order to obtain more accurate and reliable information about diseased peripheral vascular tissues at an early stage.

In the case of *in vitro* measurements, the use of algorithms made possible the discrimination between normal and fibrous or calcified tissue. The application of the algorithms seemed to be more efficient regarding the discrimination of tissues in the case of dual wavelength excitation. This was more profound in the discrimination between normal and fibrous tissue. The best results were obtained when the combination of wavelengths 442nm + 488nm and 442nm + 496.5nm were used for the excitation of the samples. The analysis of the fluorescence spectra with Artificial Neural Networks (ANN) allowed not only the discrimination between normal and fibrous and normal and calcified tissue, but the discrimination between fibrous and calcified plaque as well. For the *in vivo* measurements the samples were subjected only to single wavelength excitation with the use of the He-Cd laser (442nm). Initial results were promising with respect to the discrimination between normal and abnormal vessels. Nevertheless, further studies are needed to support the preliminary observations.

The third scope of this work was to investigate fluorescence spectra taken from lamb and human hearts (in vitro).

An Ar⁺ laser emitting at 457.9nm was used for excitation. The lamb hearts were irradiated within the first two hours after the excision. The human hearts were obtained from the morgue and were irradiated one hour after the excision. Spectra from different cardiac compartments (the left and right atria and ventricles, the myocardium, the epicardium, the aorta and the fat deposits) were recorded. It was investigated whether each chamber exhibited constant spectral response. Efforts were also made to discriminate the different cardiac compartments, using laser-induced fluorescence spectroscopy, by comparing the spectral intensity and by using simple algorithms based on the spectral intensity variation. The alterations in the fluorescence spectra due to the conservation of the samples in formalin for 48 hours were also investigated. Finally, a number of *in vivo* measurements was taken during open heart operations at the Saint Bartholomew Hospital, London. Due to technical reasons, these measurements were performed using the He-Cd laser.

In the present work healthy hearts were examined. In this way the emission spectrum of the myocardial tissue was investigated and an effort was

made to detect any pathologic state of the myocardium. The aim is to use this diagnostic technique along with the ordinary biopsy, for the extraction of better results.

It was observed that both in human and in lamb heart tissue all the measurements that were taken from the same chamber were remarkably constant. Since the samples were characterized as healthy, it is expected that there will be alterations in the fluorescence signals recorded from diseased parts. In all the hearts that were investigated (both human and lamb), the fluorescence spectra obtained from the aortas and the atria (in particular the left atrium) were more intense than the ones obtained from other parts (e.g. ventricles). The fluorescence spectra recorded from the myocardium of the human heart (*in vitro*) exhibited significant spectral differences from the ones recorded from other compartments of the heart. After the conservation of the human and lamb hearts in formalin for 48 hours, changes were observed in their spectral response, similar to those observed in the case of the peripheral vascular tissues. The fluorescence signals that were obtained during the *in vivo* measurements in human hearts presented a lot of similarities (in the morphology and in the change of the intensity of the signal from different cardiac compartments) with the spectra that were recorded *in vitro*.

The methodology and the results of this work are expected to have clinical applications in the future of the diagnosis of cardiovascular diseases.

Εισαγωγή

Στις οικονομικά προηγμένες χώρες τα καρδιαγγειακά νοσήματα εμφανίζονται σε επιδημική μορφή και αποτελούν μία από τις κύριες αιτίες θνησιμότητας και νοσηρότητας. Αναμενόμενη επομένως θεωρείται και η βελτίωση των διαγνωστικών και θεραπευτικών τεχνικών στο σχετικό πεδίο.

Ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο στη βιολογία και την ιατρική αποτελεί σήμερα η ανάπτυξη διαγνωστικών τεχνικών βασισμένων σε λέιζερ καθώς έχει αποδειχθεί ότι προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες στην κατεύθυνση της αναγνώρισης νοσηρών ιστών. Στην καρδιολογία, για παράδειγμα τέτοιοι ιστοί μπορεί να είναι:

- Αρτηριοσκληρωτικές πλάκες των στεφανιαίων αρτηριών
- Αρρυθμογενείς περιοχές του μυοκαρδίου
- Υπό απόρριψη μεταμοσχευθείσα καρδιά

Για την οπτική αναγνώριση των μη υγιών ιστών χρησιμοποιείται ένας αριθμός από τεχνικές φασματοσκοπίας με λέιζερ όπως:

1. Φθορισμός επαγόμενος από Laser (Laser Induced Fluorescence L.I.F.)

Η τεχνική έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να επιτρέπει απευθείας κλινικές μελέτες. Επίσης είναι αρκετά ευαίσθητη, μειώνοντας το χρόνο εφαρμογής και επομένως και το χρόνο εξέτασης.

2. Ανάκλαση διαχεόμενης ακτινοβολίας (Diffused reflection)

Μέθοδος πολύ καλή στο να εξετάζει αλλαγές πυκνότητας στον ιστό. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να οφείλονται είτε στα διαφορετικά συστατικά των φυσιολογικών ιστών, είτε σε αλλαγές της γεωμετρίας τους.

3. Φασματοσκοπία Raman (Raman spectroscopy)

4. Φασματοσκοπία υπερόθρου (Infrared spectroscopy I.R.)

Οι παραπάνω δύο τεχνικές παρέχουν συγκριτικά περισσότερες πληροφορίες για τα μόρια που περιέχονται στο δείγμα. Από την άλλη μεριά δεν έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό όσον αφορά τη διάγνωση ιστών και παρουσιάζουν κάποια προβλήματα στις "in vivo" μετρήσεις. Ωστόσο οι δυνατότητες τους είναι μεγάλες.

Για την παρούσα έρευνα επιλέχτηκε φασματοσκοπία με λέιζερ λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει. Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι να διερευνηθούν οι πιθανότητες να αναπτυχθούν ελάχιστα επεμβατικές διαγνωστικές τεχνικές, βασισμένες σε λέιζερ. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού. Η ανάπτυξη αξιόπιστων τεχνικών αναγνώρισης νοσηρών ιστών με χρήση ακτινοβολίας λέιζερ, με μια εξέταση δηλαδή χωρίς την ανάγκη βιοψίας, αποτελεί αναμφισβήτητα μια μεγάλη πρόοδο στο τομέα διάγνωσης για την καρδιολογία και την αγγειοχειρουργική. Αυτό σημαίνει ότι μεγαλύτερες περιοχές ιστών μπορούν να εξεταστούν αποδίδοντας βελτιωμένα διαγνωστικά αποτελέσματα. Επιπλέον, μπορούν πλέον να εξετάζονται περιοχές όπου δεν μπορούσαν να εφαρμοστούν οι συνήθεις βιοψίες εξαιτίας του κινδύνου για τυχόν επιπλοκές. Η ανάπτυξη νέων ελάχιστα επεμβατικών διαδικασιών πλεονεκτεί στη φροντίδα των μελλοντικών ασθενών, αλλά και στο ίδιο το σύστημα υγείας καθώς αναμένεται να μειώσει το κόστος των εγχειρήσεων ανοιχτής καρδιάς.

Όλη αυτή η μελέτη έχει ως απώτερο σκοπό την ανάπτυξη μιας νέας τεχνικής, η οποία θα δρα συνεργατικά με τις υπάρχουσες καθιερωμένες διαγνωστικές τεχνικές, για τη έγκαιρη αναγνώριση νοσηρών ιστών (περιφερειακών αγγείων, περιοχών του μυοκαρδίου). Ένα λέιζερ χαμηλής ισχύος (π.χ. He-Cd) θα χρησιμοποιείται για την ακτινοβολία του αρτηριακού τοιχώματος ή του μυοκαρδίου. Η μεταφορά της δέσμης του λέιζερ στον ιστό επιτυγχάνεται με τη χρήση οπτικών ινών. Η ισχύς του λέιζερ θα είναι πάρα πολύ χαμηλή και ουσιαστικά τελείως αβλαβής για τον ασθενή. Ο συλλεγόμενος φθορισμός θα παρέχει την απαραίτητη πληροφορία για το αν ο στόχος είναι υγιής ή όχι. Έτσι αυτή η σχετικά νέα ελάχιστα επεμβατική τεχνική δρώντας πάντα συνεργατικά με τις υπάρχουσες τεχνικές θα μπορεί να προσφέρει κάποιες επιπλέον πληροφορίες για την έγκαιρη και αξιόπιστη διάγνωση ορισμένων παθήσεων. Αυτό μπορεί να αποτελέσει ένα πλεονέκτημα στο τομέα της πρόληψης για τους μελλοντικούς ασθενείς.

Βασικές αρχές των λέιζερ και η αλληλεπίδραση τους με τον ιστό.

- 1.1 *Εισαγωγή*
- 1.2 *Λείζερ*
 - Αρχές Λειτουργίας των Λείζερ*
 - Λείζερ ιόντων αργού (Ar^+ laser)*
 - Λείζερ Ηλίου-Καδμίου (He-Cd laser)*
- 1.3 *Αλληλεπίδραση λέιζερ ιστού*
 - Φθορισμός Βιομορίων*
 - Χρόνος ζωής και κβαντική απόδοση φθορισμού*

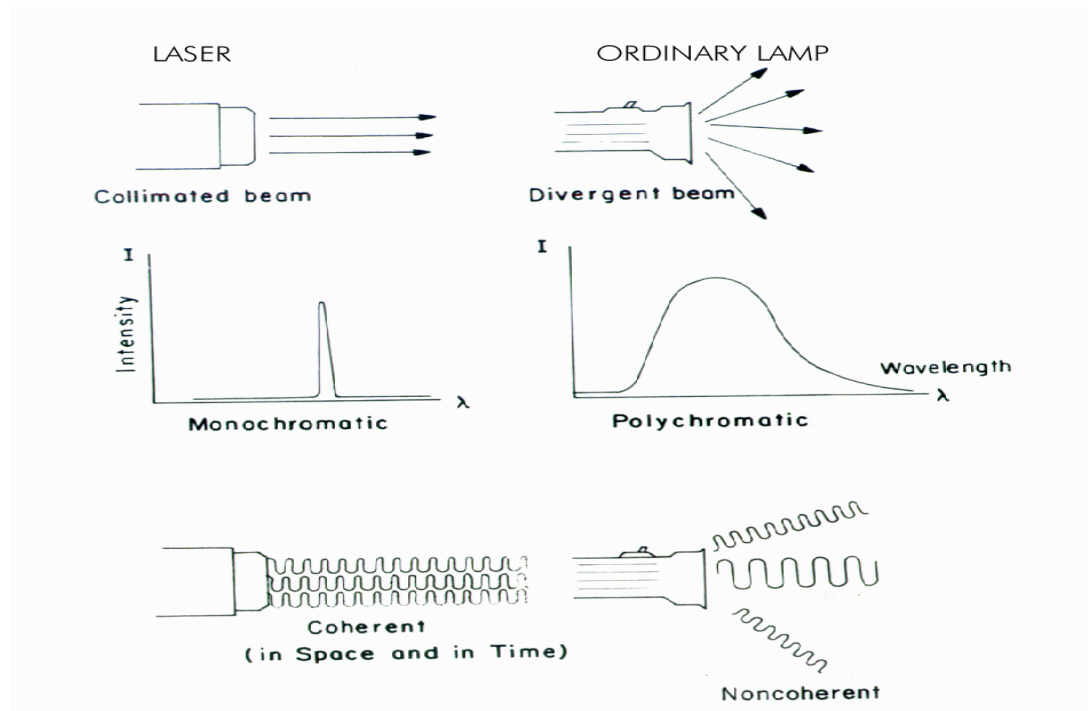
1.1 Εισαγωγή

Σε αυτό το πρώτο κεφάλαιο θα αναπτυχθούν περιληπτικά οι βασικές αρχές της λειτουργίας των λέιζερ. Μεγαλύτερη βαρύτητα θα δοθεί στην περιγραφή της λειτουργίας των δύο λέιζερ που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές διέγερσης κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας. Αυτά ήταν τα λέιζερ ιόντων Αργού και Ηλίου-Καδμίου. Επίσης θα μελετηθεί η αλληλεπίδραση του λέιζερ με τα βιολογικά μόρια και τα διάφορα φαινόμενα που παρατηρούνται κατά την πρόσπτωση της δέσμης στον ιστό. Λεπτομερειακά θα αναλυθεί η φασματοσκοπία φθορισμού των βιομορίων που επάγεται από λέιζερ. Η χρήση αυτής της φασματοσκοπικής τεχνικής, ως πιθανό διαγνωστικό εργαλείο για τη διάκριση ιστών (περιφερειακών αγγείων, τμημάτων της καρδιάς), θα αναπτυχθεί στα κεφάλαια που ακολουθούν.

1.2 Λείζερ

Η λέξη λέιζερ προέρχεται από την αγγλική ακρωνύμια Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), δηλαδή ενίσχυση του φωτός μέσω εξαναγκασμένης εκπομπής της ακτινοβολίας. Σήμερα τα λέιζερ χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ πεδίο φασματοσκοπικών εφαρμογών (στη φυσική, στη χημεία, στη βιολογία, στην ιατρική). Μια σειρά από μοναδικές ιδιότητες που έχουν τα κάνουν απαραίτητα. Σαφώς υπερτερούν σε σχέση με τις συμβατικές πηγές φωτός. Τα βασικά χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας των λέιζερ είναι η μονοχρωματικότητα τους, η μεγάλη ένταση τους, η κατευθυντικότητα τους, και η χωρική και χρονική συμφωνία τους. Στον πίνακα 1-1 και στο σχήμα 1-1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι διαφορές μεταξύ των λέιζερ και των κοινών πηγών φωτός [1].

Ιδιότητες	Λείζερ	Κοινή πηγή φωτός
<i>Κατευθυντικότητα</i>	Παράλληλη δέσμη (collimated beam).	Το φως εκπέμπεται προς όλες τις διευθύνσεις.
<i>Χρώμα</i>	Μονοχρωματικότητα. Σύμφωνη χρονικά και χωρικά δέσμη (coherent beam).	Πολυχρωματικό. Μη σύμφωνη δέσμη (non coherent beam).
<i>Ισχύς εξόδου</i>	Υψηλή.	Μέτρια ή χαμηλή.
<i>Χρονική σύγκριση</i>	Μπορούν να παραχθούν πολύ στενοί παλμοί ($\sim 10^{-15}$ sec) μεγάλης ενέργειας.	Μεγάλοι χρονικά και μικρής ενέργειας παλμοί.
<i>Ποκνότητα ισχύος</i>	Υψηλή. Η δέσμη μπορεί να εστιαστεί σε ένα πολύ μικρό σημείο διαμέτρου περίπου ίσης με το μήκος κύματος του λέιζερ ($d=\lambda$).	Χαμηλή. Δεν είναι δυνατή η εστίαση τους σε τόσο μικρά σημεία, συγκριτικά με τα λέιζερ.



Πιν.1-1 Διαφορές λέιζερ με κοινές πηγές φωτός.

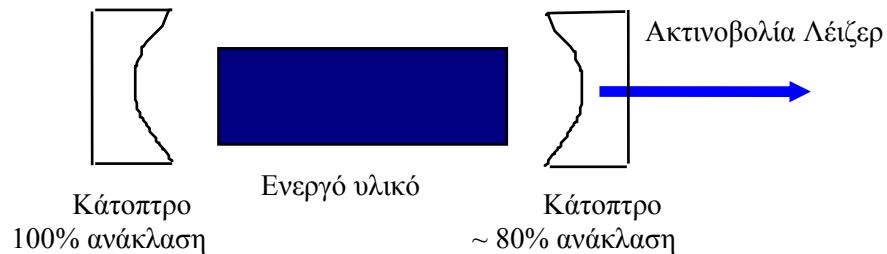
Σχ. 1-1 Σύγκριση λέιζερ με κοινές πηγές φωτός

Όλες αυτές οι μοναδικές ιδιότητες των λέιζερ τα καταστούν κατάλληλα για μια σειρά από βιοιατρικές εφαρμογές [1]. Η υψηλή τους ενέργεια και η μονοχρωματικότητα τους τα κάνουν πολύ χρήσιμα εργαλεία για φασματοσκοπικές μελέτες. Ειδικά για μετρήσεις φθορισμού, όπου έχουμε γενικά χαμηλές κβαντικές αποδόσεις, προσφέρουν υψηλή φασματική ανάλυση. Επίσης εκτός του φθορισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε άλλες φασματοσκοπικές μελέτες όπως στη φασματοσκοπία Raman, και στη μελέτη πολυφωτονικών διαδικασιών. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν λέιζερ με γραμμές εκπομπής που καλύπτουν όλο το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, από το υπεριώδες, το ορατό έως το υπέρυθρο. Έτσι καθίσταται δυνατή η επιλογή κάθε φορά της κατάλληλης πηγής διέγερσης (δηλαδή του κατάλληλου λέιζερ) ανάλογα με το δείγμα που υπόκειται σε ακτινοβολία. Επιπλέον με τα λέιζερ στενών παλμών (~50 fs) μπορούν να παρατηρηθούν χρόνοι ζωής και γρήγορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιομορίων, με τη χρήση βέβαια κατάλληλων ανιχνευτικών οργάνων (π.χ. Streak Camera), της τάξης των μερικών ps. Τέλος με τη βοήθεια συγκεντρωτικών φακών μπορούμε να εστιάσουμε τη δέσμη σε

λιγότερο από 1μm. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η επιλεκτική ακτινοβολία πολύ μικρών τμημάτων του ιστού.

Αρχές Λειτουργίας των Λείζερ

Η κοιλότητα του λέιζερ [2-6] μέσα στην οποία επιτυγχάνεται η αναστροφή των πληθυσμών αποτελείται από το ενεργό υλικό και τα κάτοπτρα όπως φαίνεται και στο σχήμα 1-2:



Σχ. 1-2 Κοιλότητα Λείζερ

Το ενεργό υλικό μπορεί να είναι στερεό, υγρό, ή αέριο. Το ενεργό υλικό αντλείται με διάφορους τρόπους, έχοντας πάντα ως στόχο την επίτευξη της αναστροφής των πληθυσμών. Οι κυριότεροι τρόποι άντλησης είναι είτε με ηλεκτρική εκκένωση (κρούσεις με ηλεκτρόνια), είτε οπτικά (με χρήση λυχνιών ή άλλων λέιζερ), είτε χημικά (εκμεταλλευόμενοι την ενέργεια που εκλύεται κατά τη διάρκεια κάποιων εξωθερμικών χημικών αντιδράσεων).

Μέσω της διαδικασίας της άντλησης τα περισσότερα άτομα ή μόρια του ενεργού υλικού διεγείρονται. Όταν περισσότερα άτομα ή μόρια βρίσκονται σε μια ανώτερη διεγερμένη κατάσταση σε σχέση με μια χαμηλότερη κατάσταση, τότε έχει πραγματοποιηθεί η αναστροφή των πληθυσμών στο ενεργό υλικό. Καθώς φωτόνια περνούν μέσα από το διεγερμένο υλικό θα προκαλέσουν την εξαναγκασμένη αποδιέγερση των ατόμων ή των μορίων του. Αυτό σημαίνει ότι τα άτομα ή τα μόρια αποδιεγειρόμενα εξαναγκασμένα θα εκπέμψουν φωτόνια της ίδιας φάσης, ενέργειας και διεύθυνσης με τα εισερχόμενα (αυτά που προκάλεσαν την εξαναγκασμένη εκπομπή). Πάνω σε

αυτή την αρχή της εξαναγκασμένης εκπομπής είναι βασισμένη όλη η φιλοσοφία για τη δράση λέιζερ.

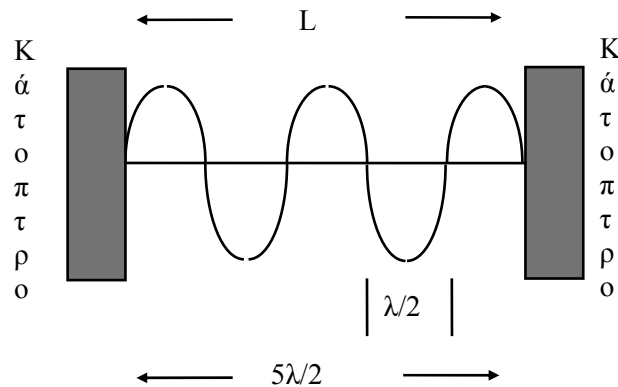
Πρέπει συνεχώς το ενεργό υλικό να αντλείται ώστε να διατηρείται η αναστροφή των πληθυσμών μεταξύ δύο ενεργειακών επιπέδων. Σε οποιαδήποτε άλλη περίπτωση, η δράση λέιζερ θα τερματιστεί. Σαφώς είναι ευκολότερο να δημιουργηθεί και να διατηρηθεί αναστροφή πληθυσμών σε ένα σύστημα πολλών σταθμών παρά σε ένα σύστημα δύο σταθμών. Σε ένα σύστημα δύο επιπέδων η κατώτερη στάθμη του λέιζερ είναι η θεμελιώδης στάθμη που είναι πυκνά κατοικημένη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αναστροφή των πληθυσμών να είναι πάρα πολύ δύσκολη (ουσιαστικά ανέφικτη).

Τα κάτοπτρα χρησιμοποιούνται για να επιτευχθεί η πολλαπλή διέλευση της ακτινοβολίας μέσα από το ενεργό υλικό. Για να έχουμε λήψη δράσης λέιζερ πρέπει η ενίσχυση ανά μονάδα μήκους μέσα στη κοιλότητα να είναι μεγαλύτερη από τις απώλειες. Η συνολική ενίσχυση ορίζεται ως:

$$G = R_1 R_2 \exp[2(\beta - \alpha)L]$$

Όπου G η συνολική ενίσχυση, R_1, R_2 η ανακλαστικότητα των κατόπτρων, α οι απώλειες ανά μονάδα μήκους, β ο συντελεστής ενίσχυσης ανά μονάδα μήκους, L το μήκος της κοιλότητας. Διαδικασίες όπως η σκέδαση και η αυθόρμητη εκπομπή μέσα στην κοιλότητα εισάγουν απώλειες στη δράση λέιζερ. Για να έχουμε δράση λέιζερ πρέπει να ισχύει ότι $G \geq 1$ ($G=1$ συνθήκη κατοφλίου).

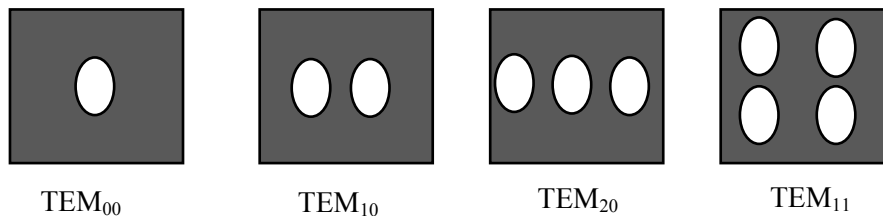
Ανάμεσα στα κάτοπτρα έχουμε τη δημιουργία στάσιμων κυμάτων (σχήμα 1-3). Το μήκος της κοιλότητας πρέπει πάντα να είναι ίσο με έναν ακέραιο αριθμό μισών μηκών κύματος ($\lambda/2$).



Σχ. 1-3 Διαμήκεις ρυθμοί ταλάντωσης (longitudinal modes) στην κοιλότητα.

Έτσι ισχύει ότι: $\frac{q\lambda}{2} = L$ όπου L ο μήκος της κοιλότητας, q ένας θετικός ακέραιος αριθμός. Όσον αφορά στη συχνότητα από την προηγούμενη σχέση προκύπτει ότι $\nu = \frac{qc}{2L}$. Βέβαια οι γραμμές εκπομπής του λέιζερ εξαρτώνται τόσο από το ενεργό υλικό (τις ενεργειακές του στάθμες), όσο και από τα στάσιμα κύματα που δημιουργούνται μέσα στη κοιλότητα και έχουν άμεση εξάρτηση από το μήκος της L .

Εκτός από τους διαμήκεις ρυθμούς μέσα στην οπτική κοιλότητα έχουμε και τη δημιουργία εγκάρσιων ρυθμών ταλάντωσης. Δηλαδή, στο λέιζερ, εκτός από τις ταλαντώσεις επάνω στον οπτικό άξονα, έχουμε και τη δημιουργία ταλαντώσεων σε κοντινούς παράλληλους άξονες ως προς τον οπτικό άξονα της κοιλότητας του λέιζερ. Οι εγκάρσιοι ρυθμοί (transverse mode) καθορίζουν τη χωρική κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας. Αυτοί οι ρυθμοί ταλάντωσης μπορούν να εμφανιστούν σε ένα λευκό χαρτί καθώς αυτό φωτίζεται από τη δέσμη του λέιζερ (σχήμα 1-4).



Σχ. 1-4 Εγκάρσιοι ρυθμοί ταλάντωσης. Οι αριθμητικοί δείκτες αναφέρονται στον αριθμό των κόμβων ή των μηδενικών της έντασης στον οριζόντιο και στο κάθετο άξονα αντίστοιχα.

Για κάθε διαμήκη ρυθμό αντιστοιχεί ένας αριθμός εγκάρσιων ρυθμών ταλάντωσης με ελαφρώς διαφορετικές συχνότητες. Αυτή η ελαφρά μετατόπιση στις συχνότητες εξαρτάται από το μήκος της κοιλότητας και τη καμπυλότητα των κατόπτρων. Όταν η καμπυλότητα των καθρεπτών είναι μεγάλη συγκρινόμενη με το μήκος της κοιλότητας, τότε αυτές οι εγκάρσιες συχνότητες εντοπίζονται γύρω από τη διαμήκη συχνότητα. Η συνθήκη που πρέπει να ικανοποιείται για να είναι η οπτική κοιλότητα του λέιζερ "ευσταθής" είναι η εξής:

$$0 < \left(1 - \frac{L}{F_1}\right) \left(1 - \frac{L}{F_2}\right) < 1$$

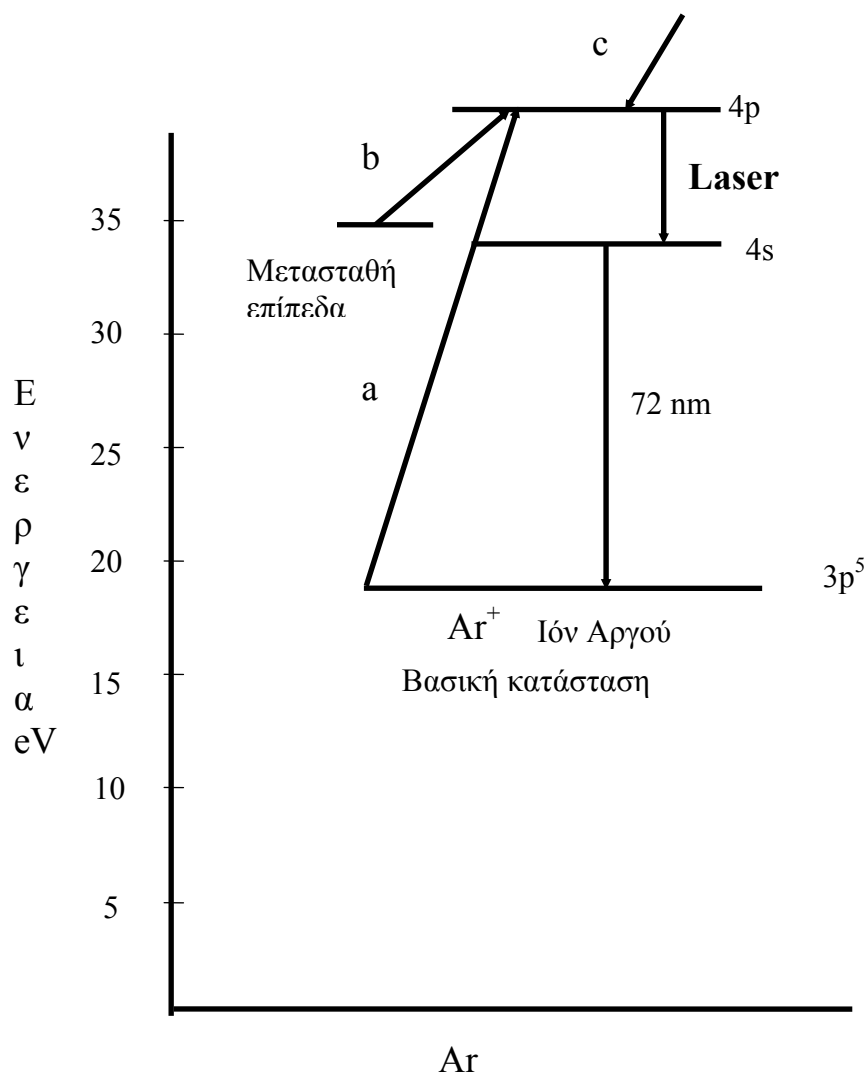
Όπου L είναι το μήκος της κοιλότητας και F_1 , F_2 είναι οι ακτίνες καμπυλότητας των δύο κατόπτρων που βρίσκονται μέσα στο οπτικό αντηχείο.

Στα παλμικά λέιζερ χρησιμοποιούμε συχνά κάποιες τεχνικές που έχουν ως στόχο να προκύψουν παλμοί μεγάλης έντασης και πολύ μικρής χρονικής διάρκειας. Τεχνικές διαμόρφωσης των παλμών του λέιζερ είναι η μέθοδος Q switching και η μέθοδος της εγκλειδωσης των παλμών (mode locking).

Ας δούμε τώρα με λίγη περισσότερη λεπτομέρεια τα δύο λέιζερ που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές διέγερσης κατά τη διάρκεια αυτής της έρευνας.

Λείζερ ιόντων αργού (Ar^+ laser)

Το λέιζερ ιόντων αργού ανήκει στη κατηγορία των λέιζερ αερίων ιόντων [7,8]. Σε ένα λέιζερ αερίων ιόντων ο πληθυσμός του ανώτερου επιπέδου λέιζερ αυξάνει μέσω διαδοχικών συγκρούσεων με τα ηλεκτρόνια της εκκένωσης. Η πρώτη παράγει ένα ιόν από το ουδέτερο άτομο ενώ η δεύτερη διεγείρει το ιόν αυτό. Ένα διάγραμμα επιπέδων που δείχνει τα κύρια ενεργειακά επίπεδα του λέιζερ αργού φαίνεται στο σχήμα 1-5:



Σχ. 1-5 Διάγραμμα λέιζερ Ar^+

Η αύξηση του πληθυσμού του ανώτερου επιπέδου (4p) της μετάπτωσης λέιζερ πραγματοποιείται με τρεις διεργασίες.

- i) ηλεκτρονικές κρούσεις με ιόντα αργού που είναι στη βασική τους κατάσταση (διεργασία a).
- ii) ηλεκτρονικές κρούσεις με ιόντα αργού που είναι σε μετασταθή επίπεδα (διεργασία b).
- iii) ακτινοβολική κλιμακωτή αποδιέγερση από υψηλότερα επίπεδα (διεργασία c).

Ο χρόνος ζωής του ανώτερου επιπέδου λέιζερ (4p) είναι της τάξης $\sim 10^8$ sec. Το κατώτερο επίπεδο λέιζερ (4s) συνδέεται με τη βασική κατάσταση ($3p^5$) μέσω μιας ακτινοβολικής αποδιέγερσης με πολύ μικρότερο χρόνο ζωής (10^{-9} sec). Άρα, εφόσον η αποδιέγερση του υψηλότερου επιπέδου λέιζερ είναι

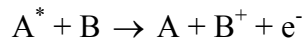
αργότερη από εκείνη του χαμηλότερου επιπέδου λέιζερ, ικανοποιείται η αναγκαία συνθήκη για συνεχή (cw) λειτουργία.

Απο ένα λέιζερ ιόντων αργού μπορεί να έχουμε πολλές γραμμές εκπομπής (457.9nm, 472nm, 476.5nm, 488nm, 496.5nm, 501.7nm, 514nm). Οι δύο πιο ισχυρές γραμμές είναι η 488nm, και η 514nm. Επιπλέον, ένα σπουδαίο χαρακτηριστικό του λέιζερ ιόντων αργού είναι ότι η ισχύς εξόδου αυξάνει γρήγορα με την αύξηση του ρεύματος εκκένωσης. Αυτό συμβαίνει επειδή η διαδικασία κορεσμού της αντιστροφής γίνεται σημαντική μόνο για πυκνότητες ρεύματος πολύ υψηλότερες από εκείνες που μπορούν να επιτευχθούν στη πράξη. Έτσι είναι δυνατό να επιτευχθούν πολύ υψηλές ισχύεις εξόδου από τα λέιζερ ιόντων αργού (μέχρι μερικές εκατοντάδες mWatt ανά γραμμή).

Λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (He-Cd laser)

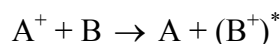
Το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου ανήκει στη κατηγορία των λέιζερ μεταλλικών ατμών [7]. Υπάρχουν δύο διαφορετικές διεργασίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προκαλέσουν άντληση.

i) ιονισμός Penning



Το ιόν B^+ στη τελική του κατάσταση μπορεί να είναι και διεγερμένο. Η ενέργεια διέγερσης του ατόμου A^* είναι μεγαλύτερη ή ίση με την ενέργεια που απαιτείται για τον ιονισμό του ατόμου B . Ο ιονισμός Penning είναι μια μη συντονιστική διεργασία. Η ενέργεια διέγερσης του A^* χρειάζεται απλώς να είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια ιονισμού και την ενέργεια διέγερσης του ατόμου B (εφόσον το άτομο B είναι διεγερμένο). Η επιπλέον ενέργεια του A μετασχηματίζεται σε κινητική ενέργεια του εξερχόμενου ηλεκτρονίου (e^-).

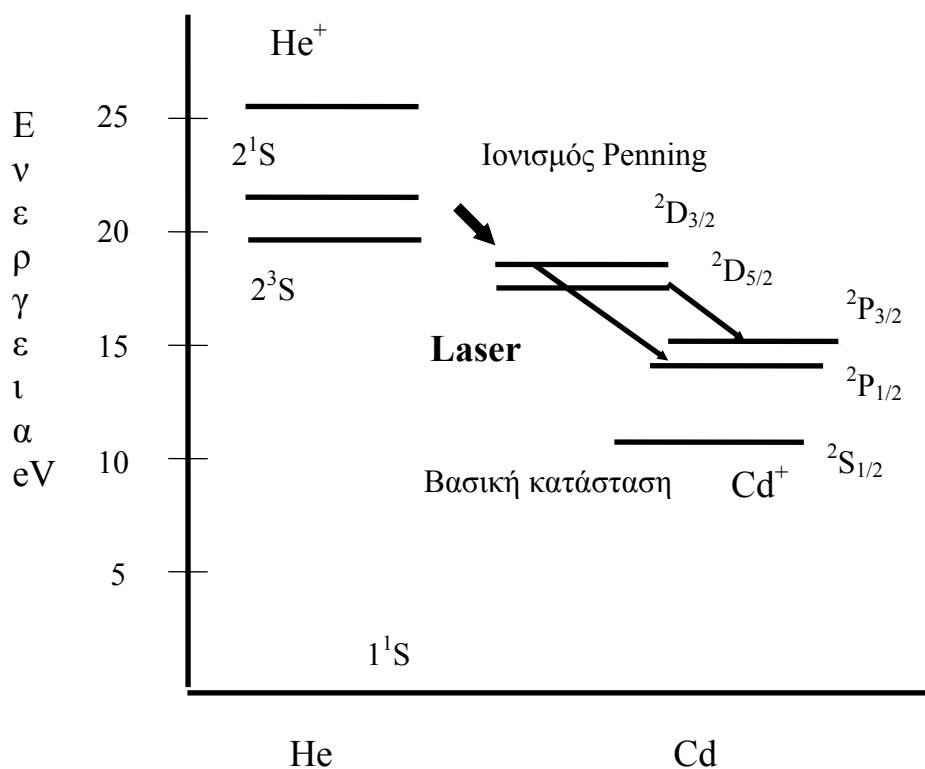
ii) ιονισμός μεταφοράς φορτίου



Η ενέργεια ιονισμού του A μετατρέπεται σε ενέργεια ιονισμού και διέγερσης του ατόμου B . Σε αυτή τη περίπτωση δεν έχουμε εξερχόμενα ηλεκτρόνια, άρα είναι μια συντονιστική διεργασία. Δηλαδή η ενέργεια ιονισμού του A πρέπει να είναι ακριβώς ίση με την ενέργεια ιονισμού και την ενέργεια διέγερσης του ατόμου B . Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι στα λέιζερ αερίων ιόντων (π.χ. λέιζερ

ιόντων αργού) δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτές οι δύο διεργασίες για άντληση, διότι έχουν επίπεδα λέιζερ υψηλά σε ενέργεια.

Τα ενεργειακά επίπεδα του λέιζερ Ηλίου-Καδμίου φαίνονται στο σχήμα 1-6:



Σχ. 1-6 Διάγραμμα λέιζερ Ηλίου-Καδμίου

Το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου αντλείται κυρίως μέσω του ιονισμού Penning. Οι 2^1S και 2^3S μετασταθείς καταστάσεις του Ηλίου μπορούν να διεγείρουν (μέσω ιονισμού Penning) είτε τις $2^2D_{3/2}$ και $2^2D_{5/2}$ καταστάσεις, είτε τις $2^2P_{3/2}$ και $2^2P_{1/2}$ καταστάσεις του ιόντος Καδμίου. Παρόλο που ο ιονισμός Penning είναι μια μη συντονιστική διεργασία έχει βρεθεί ότι η ενεργός διατομή για διεγερση των καταστάσεων D είναι τρεις φορές μεγαλύτερη από εκείνη των P καταστάσεων. Ο χρόνος ζωής των D καταστάσεων είναι της τάξης των 10^{-7} sec και είναι πολύ μεγαλύτερος από το χρόνο ζωής των P καταστάσεων του ιόντος καδμίου ($\sim 10^{-9}$ sec). Άρα η αντιστροφή πληθυσμών έχει επιτευχθεί μεταξύ των D και P καταστάσεων. Επιπλέον και εδώ η αποδιέγερση του υψηλότερου επιπέδου λέιζερ είναι σαφώς αργότερη από εκείνη του

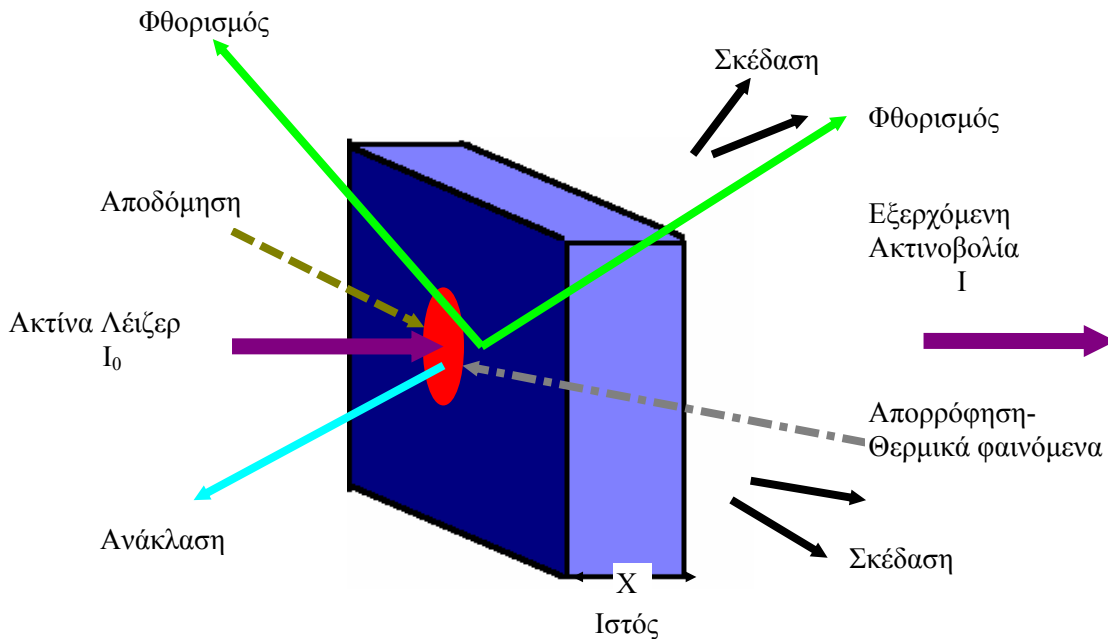
χαμηλότερου επιπέδου άρα ικανοποιείται η αναγκαία συνθήκη για συνεχή (cw) λειτουργία.

Οι γραμμές εκπομπής ενός λέιζερ Ηλίου-Καδμίου είναι δύο. Η $\lambda_1=325\text{nm}$ (μετάβαση $^2D_{3/2} \rightarrow ^2P_{1/2}$) και η $\lambda_2=441.6\text{nm}$ (μετάβαση $^2D_{5/2} \rightarrow ^2P_{3/2}$). Τα ιόντα καδμίου μεταπίπτουν στη βασική κατάσταση ($^2S_{1/2}$) με ακτινοβόλα αποδιέγερση. Οι ισχείς εξόδου από τα λέιζερ Ηλίου-Καδμίου είναι της τάξης των μερικών δεκάδων mWatt.

1.3 Αλληλεπίδραση λέιζερ ιστού

Όταν μια δέσμη φωτός προσπίπτει σε ένα ιστό παρατηρείται έντονη αλληλεπίδραση των εισερχομένων φωτονίων με τα μόρια του ιστού [9]. Ένα μέρος της ακτινοβολίας θα απορροφηθεί από τα μόρια του ιστού. Κάποιο άλλο μέρος του φωτός θα ανακλαστεί. Σημαντικό μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας θα σκεδαστεί, μιά και ο ιστός είναι ένα έντονα σκεδαστικό μέσο (σκέδαση Mie, σκέδαση Rayleigh). Η δέσμη του λέιζερ θα προκαλέσει τη θέρμανση των βιολογικών μορίων, όπως και φωτοχημικά φαινόμενα. Μπορεί ακόμη όταν μεγάλες εντάσεις εισέρθουν στον ιστό να επιτευχθεί η ακτινοβολική αποδόμηση του (ablation). Τα διεγερμένα μόρια του ιστού (λόγω της απορρόφησης της ακτινοβολίας) αποδιεγειρόμενα θα αποδώσουν φθορισμό.

Όλα αυτά τα φαινόμενα εξαρτώνται από το μήκος κύματος και την ένταση του λέιζερ όπως επίσης και από το χρόνο έκθεσης και το είδος του ιστού που υπόκειται σε ακτινοβολήση. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις φαίνονται στο σχήμα 1-7:



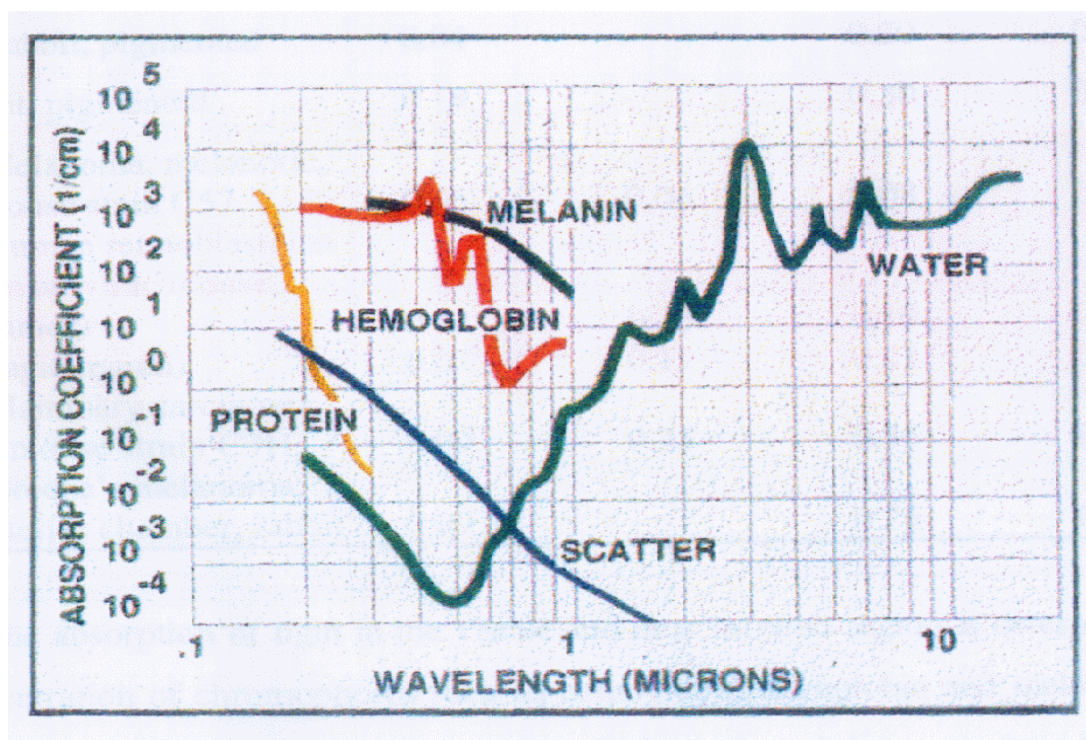
Σχ. 1-7 Αλληλεπίδραση λέιζερ με βιολογικό ιστό

Η απορρόφηση της ακτινοβολίας στον ιστό εξαρτάται από το νόμο του Beer:

$$I = I_0 \exp(-kx)$$

Όπου I_0 η ένταση της εισερχόμενης ακτινοβολίας του λέιζερ, I η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας, k σταθερά, και x το πάχος του ιστού. Δηλαδή η ένταση της ακτινοβολίας πέφτει εκθετικά καθώς εισέρχεται στον ιστό. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση από τα βιολογικά μόρια τόσο μικρότερο είναι το βάθος διείσδυσης της δέσμης του λέιζερ στον ιστό. Οι συντελεστές απορρόφησης μπορούν να υπολογιστούν εμμέσως, με τη καταγραφή και τον υπολογισμό των συντελεστών (coefficients) της διαχεόμενης ανάκλασης (diffuse reflectance).

Στο σχήμα 1-8 παρουσιάζονται τα διαγράμματα απορρόφησης για μερικές από τις πιο σημαντικές χρωμοφόρες, και τα πιο σπουδαία βιολογικά συστατικά του ανθρώπινου ιστού (νερό, μελανίνη, αιμοσφαιρίνη, πρωτεΐνες).



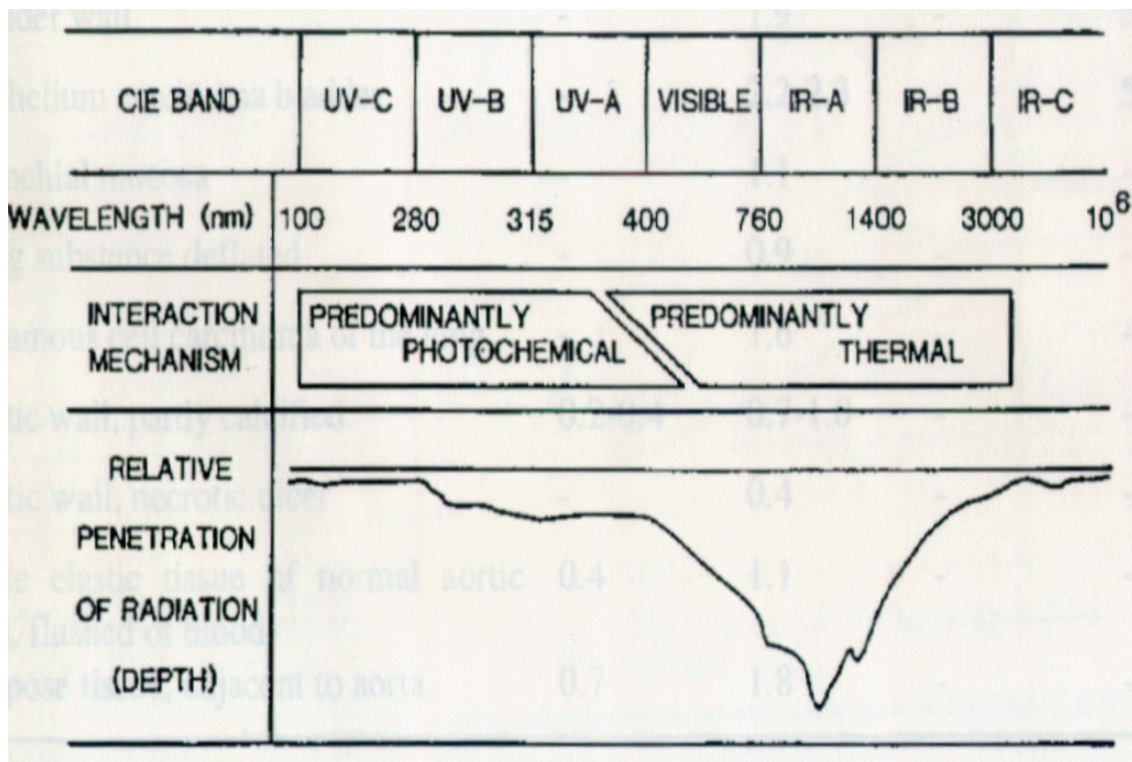
Σχ. 1-8 Απορρόφηση βιομορίων. Αιμοσφαιρίνη, νερό, μελανίνη, πρωτεΐνες.

Είναι εμφανές ότι τα μέγιστα της απορρόφησης για τους αρωματικούς δακτυλίους των πρωτεϊνών (κολλαγόνο, ελαστίνη) εντοπίζονται στην υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Όσο αφορά το νερό που είναι το κυριότερο συστατικό του ανθρώπινου ιστού, στην ορατή και τη κοντινή υπέρυθρη περιοχή του φάσματος απορροφά ελάχιστα. Όμως για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 1400nm η απορρόφηση από το νερό αυξάνει δραματικά και κυριαρχεί στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούμε ως πηγές διέγερσης λέιζερ τα οποία εκπέμπουν στην μεσαία και μακρινή υπέρυθρη περιοχή του φάσματος (πέρα από τα 1400 nm). Η απορρόφηση της μελανίνης μειώνεται περίπου γραμμικά όσο αυξάνει το μήκος κύματος. Η αιμοσφαιρίνη απορροφά έντονα στο κοντινό υπεριώδες και στο ορατό (κυρίως μεταξύ 400-500nm). Σε μεγαλύτερα μήκη κύματος η απορρόφηση της μειώνεται σημαντικά (με μια κορυφή απορρόφησης γύρω στα 550nm).

Η μετατροπή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας της δέσμης του λέιζερ σε θερμική ενέργεια, επιφέρει την θέρμανση του ιστού. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας προκαλεί τη διέγερση των βιομορίων. Όταν τα βιομόρια αποδιεγερθούν μη ακτινοβολικά στη θεμελιώδη στάθμη μεταφέρουν την ενέργεια τους στον ιστό (κυρίως μέσω κρούσεων). Αυτό επιφέρει τη

δημιουργία θερμικών φαινομένων στον ιστό. Τα θερμικά φαινόμενα εξαρτώνται από το μέγεθος της δέσμης του λέιζερ (spot size), το χρόνο ακτινοβολήσης, το βάθος διείσδυσης της δέσμης, το είδος του ιστού και το μήκος κύματος του λέιζερ.

Στα φωτοχημικά φαινόμενα έχουμε σπάσιμο των δεσμών των μορίων. Στην ακτινοβολήση του ιστού με μεγάλα μήκη κύματος (υπέρυθρο) κυριαρχούν τα θερμικά φαινόμενα, ενώ με μικρά μήκη κύματος (υπεριώδες, ιώδες) τα φωτοχημικά [9]. Αυτό φαίνεται και στο σχήμα 1-9:



Σχ. 1-9 Διάγραμμα όπου εμφανίζονται οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης και το βάθος διείσδυσης της δέσμης στον ιστό. Οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης στον ιστό είναι κυρίως θερμικοί για μεγάλα μήκη κύματος και φωτοχημικοί για μικρότερα μήκη κύματος. Το βάθος διείσδυσης εξαρτάται τόσο από την απορρόφηση όσο και από την σκέδαση της δέσμης στον ιστό.

Η σκέδαση των φωτονίων από τον ιστό είναι άλλο ένα φαινόμενο που παρατηρείται. Στον ιστό κυριαρχεί η σκέδαση Mie. Όσο πιο έντονη είναι η σκέδαση των φωτονίων τόσο πιο μικρό θα είναι το βάθος διείσδυσης της δέσμης στον ιστό. Με ανίχνευση των σκεδαζόμενων από τους ιστούς φωτονίων, μπορούν να υπολογιστούν με ακρίβεια οι συντελεστές σκέδασης

και απορρόφησης των ιστών και να μελετηθούν αναλυτικά οι οπτικές τους ιδιότητες.

Φθορισμός Βιομορίων

Η θεμελιώδης ηλεκτρονική ενεργειακή στάθμη του μορίου, καθώς και η πρώτη και η δεύτερη ενεργειακή στάθμη του συμβολίζονται με S_0 , S_1 , S_2 , αντίστοιχα, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1-10 (Διάγραμμα Jablonski). Σε αντίθεση με τα άτομα, στα μόρια κάθε ηλεκτρονική στάθμη χωρίζεται σε πολλές ταλαντωτικές στάθμες, που με τη σειρά τους μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε περιστροφικές στάθμες [10-12]. Για πολύ μεγάλα οργανικά μόρια οι αποστάσεις μεταξύ των επιπέδων είναι μικρές και υπάρχει μεγάλη αλληλοεπικάλυψη των σταθμών λόγω των μοριακών αλληλεπιδράσεων.

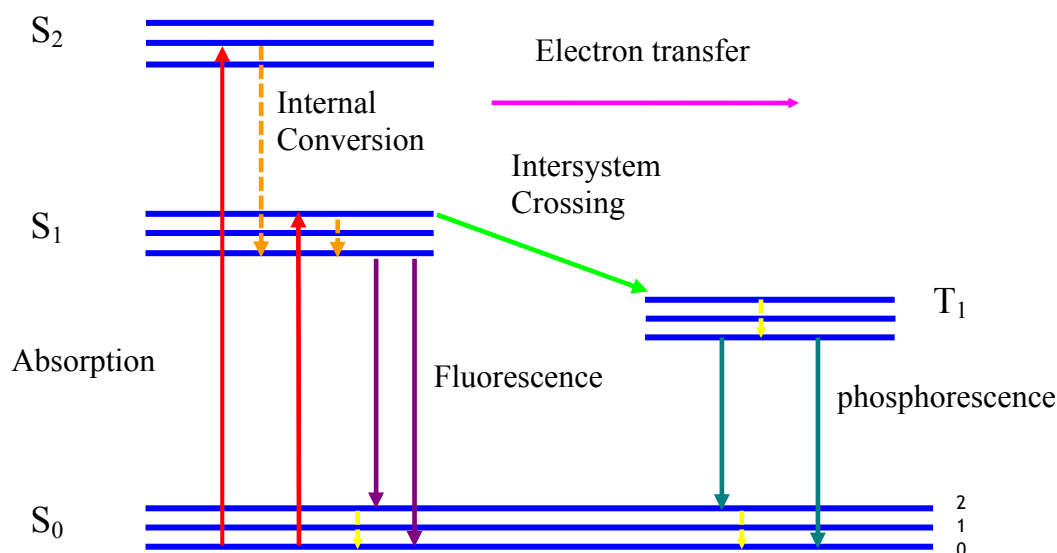
Όπου T_1 , στο σχήμα συμβολίζεται η τριπλή (triplet) κατάσταση του μορίου, ενώ οι S_0 , S_1 , S_2 είναι οι μονήρεις (singlet) καταστάσεις του. Η διαφορά αυτών των δύο καταστάσεων έγκειται στο γεγονός ότι στη μονήρη κατάσταση τα ηλεκτρόνια έχουν αντιπαράλληλη ιδιοστροφομή ($2S+1=1$), ενώ στη τριπλή έχουν παράλληλη ιδιοστροφομή ($2S+1=3$).

Επομένως η αποδιέγερση του ηλεκτρονίου από μία διεγερμένη μονήρη κατάσταση στη θεμελιώδη δεν απαιτεί αλλαγή της ιδιοστροφομής του (spin), κάτι που είναι απαραίτητο για την αποδιέγερση από μία τριπλή κατάσταση.

Σε θερμική ισορροπία ο πληθυσμός των ενεργειακών επιπέδων S_0 , S_1 , S_2 , του μορίου δίνεται προσεγγιστικά από τη κατανομή Boltzman. Δηλαδή, ο λόγος των πληθυσμών δυο ενεργειακών επιπέδων είναι $R = \exp\left(-\frac{\Delta E}{KT}\right)$, όπου ΔE η ενεργειακή διαφορά των σταθμών, K η σταθερά του Boltzman, και T η θερμοκρασία. Όμως, πρέπει να σημειωθεί, ότι η ενεργειακή διαφορά μεταξύ S_0 και S_1 είναι μεγάλη. Αυτό έχει ως συνέπεια ο πληθυσμός της S_1 , λόγω θερμικής διέγερσης ηλεκτρονίων, να είναι πολύ μικρός και ουσιαστικά να θεωρείται αμελητέος.

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα Jablonski, όλες οι μεταπτώσεις είναι κατακόρυφες. Η διαδικασία απορρόφησης του φωτός από το μόριο είναι

πάρα πολύ γρήγορη ($\sim 10^{-15}$ sec). Αυτό το χρονικό διάστημα είναι πολύ μικρό και έτσι μπορεί να θεωρηθεί ότι οι πυρήνες του μορίου δεν έχουν αλλάξει θέση, δηλαδή δεν έχουν μετακινηθεί. (Αρχή Frank-Gondon)



Σχ. 1-10 Διάγραμμα Jablonski

Όταν ένα φωτόνιο προσπίπτει στο μόριο, το οποίο βρίσκεται στη θεμελιώδη στάθμη, και δεν υπάρχει διεγερμένη κατάσταση του μορίου που να αντιστοιχεί στην ενέργεια του εισερχομένου φωτονίου, τότε το φωτόνιο απλώς σκεδάζεται. Το μόριο έχει παραμείνει στη θεμελιώδη στάθμη, ενώ το φωτόνιο έχει αλλάξει την διεύθυνση του, αλλά έχει την ίδια ενέργεια και πόλωση.

Όμως, όταν το προσπίπτον φωτόνιο έχει ενέργεια που να αντιστοιχεί στην ενεργειακή διαφορά μεταξύ της θεμελιώδους και μιας διεγερμένης κατάστασης του μορίου, τότε έχουμε απορρόφηση του προσπίπτοντος φωτονίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μόριο να βρεθεί σε μια διεγερμένη κατάσταση. Από εκεί μπορεί να αποδιεγερθεί και να επιστρέψει στη θεμελιώδη κατάσταση με διάφορους τρόπους, όπως φαίνεται και στο σχήμα 1-10.

Όταν το μόριο βρεθεί σε μία διεγερμένη δονητική-περιστροφική κατάσταση της S₁ ή της S₂ θα αποδιεγερθεί μη ακτινοβολικά, κυρίως μέσω

κρούσεων, στη χαμηλότερη δονητική κατάσταση της S_1 . Αυτό ονομάζεται μη ακτινοβολική εσωτερική μετατροπή (internal conversion) και είναι της τάξης των psec. Η μεγάλη πυκνότητα ταλαντωτικών και περιστροφικών επιπέδων των ηλεκτρονικών σταθμών (S_0 , S_1 , S_2) προκαλεί αυτή τη πολύ γρήγορη αποδιέγερση ≈ 1 psec. Από την S_1 υπάρχει μία πιθανότητα να αποδιεγερθεί πάλι μη ακτινοβολικά στην S_0 (internal conversion). Από την άλλη μεριά όμως, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να αποδιεγερθεί αυθόρμητα, με την εκπομπή ενός φωτονίου (ακτινοβολικά) στην S_0 . Αυτή η διαδικασία ονομάζεται φθορισμός. Ο φθορισμός ανιχνεύεται συνήθως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος εν σχέση με την απορρόφηση (μετατόπιση Stokes). Η χρονική διάρκεια του είναι της τάξης των 10^{-8} sec. Αυτή η αποδιέγερση μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε ταλαντωτικό ή περιστροφικό επίπεδο της S_0 . Συνεπώς, τα εκπεμπόμενα φωτόνια θα έχουν μία πλατιά φασματική κατανομή. Τέλος, θα ακολουθήσει μία θερμική αποδιέγερση του μορίου στη χαμηλότερη δονητική κατάσταση της S_0 . Αυτή η μετάβαση είναι χρονικής διάρκειας psec.

Η μετάβαση από μία διεγερμένη μονήρη (singlet) κατάσταση σε μια τριπλή (triplet) κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί, έστω και αν είναι κβαντικά απαγορευμένη λόγω ιδιοστροφορμής (spin). Η μετάβαση αυτή από την S_1 στην T_1 ονομάζεται διασυστηματική μετάπτωση (intersystem crossing). Στη τριπλή κατάσταση γίνεται επίσης, μια γρήγορη μη ακτινοβολική αποδιέγερση (internal conversion) στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της T_1 . Η αυθόρμητη ακτινοβολική αποδιέγερση από την T_1 στην S_0 καλείται φωσφορισμός. Η μετάβαση από την T_1 στην S_0 είναι κβαντικά απαγορευμένη, για αυτό και ο χρόνος ζωής είναι πολύ μεγάλος (από 10^{-6} έως 1sec). Γενικότερα, ο ρυθμός με τον οποίο συμβαίνει ο φωσφορισμός είναι σαφώς πολύ μικρότερος συγκριτικά με το φθορισμό. Επιπλέον, η εκπομπή ακτινοβολίας λόγω φωσφορισμού είναι συνήθως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (μικρότερη ενεργειακή διαφορά μεταξύ T_1 και S_0).

Υπάρχουν βέβαια και άλλοι πιθανοί τρόποι αποδιέγερσης του διεγερμένου μορίου, όπως η μεταφορά της ενέργειας του σε άλλα γειτονικά μόρια (electron transfer).

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που μπορεί να γίνει με βάση τα προαναφερόμενα είναι ότι, ενώ το φάσμα απορρόφησης ενός μορίου περιέχει

πληροφορίες για τα δονητικά και περιστροφικά επίπεδα των διεγερμένων σταθμών του, το φάσμα εκπομπής του (π.χ. φθορισμός, Raman) δίνει πληροφορίες για τις δονητικές και περιστροφικές καταστάσεις της θεμελιώδους στάθμης του.

Χρόνος ζωής και κβαντική απόδοση φθορισμού

Ο χρόνος ζωής μίας διεγερμένης κατάστασης είναι ο μέσος χρόνος που το μόριο παραμένει σε αυτή πριν αποδιεγερθεί και γυρίσει στη θεμελιώδη [10].

Ο χρόνος ζωής μίας κατάστασης δίνεται από τη σχέση :

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + \Sigma K} \quad (1)$$

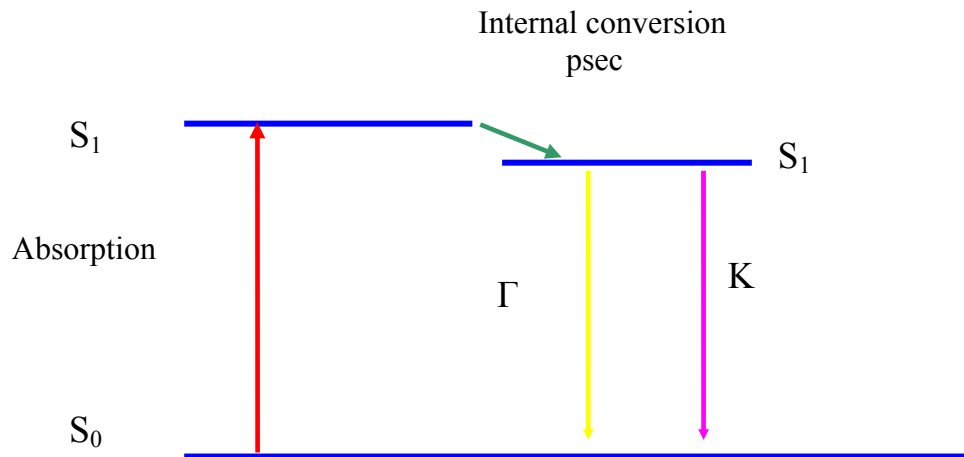
Όπου ΣK είναι το άθροισμα όλων των μη ακτινοβολικών αποδιεγέρσεων που πραγματοποιούνται στο μόριο, και δρουν ανταγωνιστικά με το φθορισμό (σχήμα 1-11). Ο χρόνος ζωής του φθορισμού, απουσία μη-ακτινοβολικών αποδιεγέρσεων, ονομάζεται ενδογενής φθορισμός (intrinsic fluorescence) και ορίζεται ως:

$$\tau_0 = \frac{1}{\Gamma} \quad (2)$$

Άρα η σχέση (1) γίνεται:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + \Sigma K \quad (3)$$

Η παραπάνω σχέση μας δίνει το μέσο χρόνο ζωής που το μόριο μένει στη διεγερμένη κατάσταση S_1 και ονομάζεται χρόνος ζωής φθορισμού. Τυπικοί χρόνοι ζωής φθορισμού είναι της τάξης των 10^{-8} sec για οργανικά μόρια.



Σχ. 1-11 Μέρος του διαγράμματος Jablonski

Η κβαντική απόδοση του φθορισμού μπορεί να ορισθεί ως ο λόγος του αριθμού των φωτονίων που εκπέμπονται κατά το φθορισμό σε όλες τις διευθύνσεις, προς τον αριθμό των φωτονίων που απορροφούνται. Η κβαντική απόδοση του φθορισμού είναι:

$$A = \frac{\Gamma}{\Gamma + \Sigma K} \quad (4)$$

Όταν $\Sigma K \ll \Gamma$, τότε η κβαντική απόδοση του φθορισμού είναι $A \approx 1$. Συνήθως, η κβαντική απόδοση του φθορισμού είναι αρκετά μικρότερη από την μονάδα, λόγω των πολλών μη ακτινοβολικών αποδιεγέρσεων που λαμβάνουν χώρα στο μόριο.

Από τις σχέσεις (1), (2) η εξίσωση (4) γίνεται

$$A = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (5)$$

Αυτή είναι μια σχέση που συνδυάζει την κβαντική απόδοση με το χρόνο ζωής.

Ένα φαινόμενο που επηρεάζει το φθορισμό είναι αυτό της απόσβεσης (quenching) [11]. Αρκετές διαδικασίες μπορεί να οδηγήσουν στην απόσβεση όπως, η μεταφορά ενέργειας, αλλά κυρίως η κρουστική απόσβεση με γειτονικά μόρια. Αυτό επιφέρει μία σημαντική μείωση της απόδοσης του φθορισμού. Τα παραπάνω εκφράζονται μέσω της εξίσωσης Stern-Volmer :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q [Q] \quad (6)$$

Όπου F και F_0 είναι οι εντάσεις φθορισμού με, και χωρίς αποσβεστικά (quenching) μόρια, K_q είναι η σταθερά απόσβεσης και Q είναι η συγκέντρωση των αποσβεστικών μορίων. Εναλλακτικά χρησιμοποιώντας τους χρόνους ζωής του φθορισμού αντί των εντάσεων η εξίσωση (6) γράφεται ως :

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_q [Q] \quad (7)$$

Από τις εξισώσεις (6), (7) είναι φανερό ότι τόσο η απόδοση του φθορισμού όσο και ο χρόνος ζωής μειώνονται με την απόσβεση. Η σταθερά K_q εξαρτάται από τη σταθερά διάχυσης, που με τη σειρά της συνδέεται με τη θερμοκρασία. Έτσι, η απόδοση του φθορισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η φασματική κατανομή του φθορισμού δεν επηρεάζεται συνήθως από την απόσβεση, εκτός και αν ο πληθυσμός των μορίων που αποδίδει φθορισμό είναι τελείως ανομοιογενείς, με διαφορετικές κορυφές μηκών κυμάτων φθορισμού για δύο πληθυσμούς. Ο πιο σημαντικός αποσβέστης (quencher) στα βιολογικά συστήματα είναι τα μόρια του οξυγόνου, τα οποία είναι πολύ αποδοτικοί αποσβέστες για τις περισσότερες χρωμοφόρες.

Ένα άλλο σημαντικό ζήτημα για το φθορισμό είναι η γρήγορη αποδιέγερση του μορίου στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης στάθμης του [11]. Αν θεωρήσουμε μία χρωμοφόρα του ιστού (π.χ. κολλαγόνο, ελαστίνη, φλαβίνες) σε ένα διάλυμα, τότε τα μόρια της χρωμοφόρας χάνουν κάποια από την ενέργεια διέγερσης λόγω αυτής της γρήγορης αποδιέγερσης. Επιπλέον, μία ανακατανομή των διπόλων του διαλύτη γύρω από τη χρωμοφόρα και κάποιες άλλες συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις (π.χ. με δεσμούς υδρογόνου) συνεισφέρουν σε αυτή τη διαδικασία αποδιέγερσης. Άρα η ενέργεια των φωτονίων φθορισμού είναι μικρότερη από αυτή των φωτονίων διέγερσης, ή μιλώντας με μήκη κύματος ο φθορισμός εντοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με την απορρόφηση. Αυτό καλείται μετατόπιση Stokes και εξαρτάται από το περιβάλλον του μορίου. Το μέρος της μετατόπισης Stokes που προκύπτει από αυτό τον επαναπροσδιορισμό των διπόλων του διαλύτη εκφράζεται από την εξίσωση Lippert :

$$\Delta\nu = \bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f \approx \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu^* - \mu)^2}{\alpha^3} + \text{σταθερά}$$

Όπου ϵ είναι η διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη, n ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη, μ^* , μ οι διπολικές ροπές της διεγερμένης και θεμελιώδους κατάστασης του μορίου αντίστοιχα, a η ακτίνα της κοιλότητας που βρίσκεται η χρωμοφόρα, h η σταθερά του Planck, c η ταχύτητα του φωτός, ν_a και ν_f συχνότητες απορρόφησης και εκπομπής αντίστοιχα. Μία χρωμοφόρα μπορεί να έχει μία μετατόπιση Stokes λίγων nm σε ένα μη πολικό διάλυμα. Από την άλλη μεριά, μπορεί να έχει μια μετατόπιση (Stokes shift) πάνω από 100nm όταν βρίσκεται σε ένα πολικό διάλυμα (π.χ. H₂O). Γενικότερα, για τη χρησιμοποίηση του φθορισμού ως διαγνωστικού εργαλείου είναι απαραίτητη η καλή γνώση του περιβάλλοντος των μορίων που αποδίδουν φθορισμό.

Δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας και ανίχνευση της με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού.

- 2.1 *Εισαγωγή*
- 2.2 *Δημιουργία αθηρωματικής πλάκας
Προδιαθεσιακοί παράγοντες της αθηροσκλήρωσης*
- 2.3 *Ανίχνευση αθηρωματικής πλάκας με χρήση
φασματοσκοπίας φθορισμού
Εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης και
φασματοσκοπικές διαγνωστικές τεχνικές
Ο ρόλος της αιμοσφαιρίνης*

2.1 Εισαγωγή

Στο δεύτερο κεφάλαιο θα αναπτυχθούν τα στάδια σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας και θα περιγραφεί αναλυτικά ο τρόπος δημιουργίας του αθηρώματος. Οι κυριότεροι προδιαθεσιακοί παράγοντες, που συμβάλουν στην αθηροσκλήρωση, θα αναφερθούν λεπτομερειακά. Θα παρουσιαστούν τα μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής των χρωμοφόρων του ιστού. Επιπλέον, θα γίνει λόγος για τις δυσκολίες που εμφανίζονται κατά την προσπάθεια διάκρισης της αθηρωματικής πλάκας από τη φυσιολογική αρτηρία με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ (λόγω σκέδασης, απορρόφησης, γεωμετρίας). Ιδιαίτερη βαρύτητα θα δοθεί στην επαναπορρόφηση του φθορισμού από την αιμοσφαιρίνη και την παραμόρφωση που επιφέρει το γεγονός αυτό στο συλλεγόμενο φάσμα φθορισμού.

2.2 Δημιουργία αθηρωματικής πλάκας

Τα μεγάλα περιφερειακά αγγεία [1] αποτελούνται από τρεις χιτώνες, τον έσω, τον μέσο και τον έξω χιτώνα (Intima, Media, Adventitia). Ο έσω χιτώνας αποτελείται από το ενδοθήλιο και από λίγο συνδετικό ιστό που βρίσκεται κάτω από αυτό. Ο μέσος χιτώνας περιέχει κυκλοτερείς λείες μυϊκές και ελαστικές ίνες όπως επίσης και κάποια ινοκυτταρικά στοιχεία, που αυξάνονται με τη πάροδο της ηλικίας. Ο έξω χιτώνας αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό.

Ο όρος αθηροσκλήρωση [2] υποδηλώνει τη νόσο που χαρακτηρίζεται από δημιουργία πλακών στον έσω χιτώνα των αρτηριών. Αυτές οι πλάκες προέρχονται από συσσώρευση λιπιδίων, στοιχείων αίματος και παραγώγων τους, συμπλοκών σακχάρων, ινώδη ιστού και αλάτων ασβεστίου.

Πρέπει να τονιστεί η διαφορά μεταξύ αθηροσκλήρωσης και γεροντικής αρτηριοσκλήρωσης. Η γεροντική αρτηριοσκλήρωση αποτελεί σημείο γήρανσης του αγγείου και όχι κατά ανάγκη δημιουργία αθηρώματος. Χαρακτηρίζεται από εναποθέσεις ινώδη συνδετικού ιστού (κολλαγόνου) και αλάτων ασβεστίου στο έσω και μέσο χιτώνα, αντικαθιστώντας τα μυϊκά και ελαστικά συστατικά και εξασθενώντας το τοίχωμα των αρτηριών. Δηλαδή η γεροντική αρτηριοσκλήρωση είναι κάτι το "φυσιολογικό" για άτομα μεγάλης ηλικίας (60 ετών και άνω), θεωρείται πάντως παθολογικό όταν εμφανίζεται σε μικρότερες ηλικίες. Στις περισσότερες των περιπτώσεων σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 60 ετών οι αθηρωματικές και αρτηριοσκληρωτικές βλάβες συνυπάρχουν. Η αθηροσκλήρωση αφορά κυρίως τις αρτηρίες μεγάλου και μέσου διαμετρήματος, ενώ η αρτηριοσκλήρωση εντοπίζεται σε όλα τα σημεία του αρτηριακού δέντρου.

Εκτός από τη γεροντική αρτηριοσκλήρωση [1] υπάρχουν:

- Η υπερτασική αρτηριοσκλήρωση και αρτηριδιοσκλήρυνση. Αντιπροσωπεύει τις αλλοιώσεις του αρτηριακού τοιχώματος εξαιτίας της υπέρτασης. Στη καλοήγη υπέρταση παρατηρείται υπερπλασία λείων μυϊκών ινών στον έσω και μέσο χιτώνα και αύξηση των ελαστικών ινών. Στη κακοήγη υπέρταση τα υπερτροφικά φαινόμενα δεν προλαβαίνουν να αναπτυχθούν.

Αντίθετα λαμβάνουν χώρα καταστρεπτικές αλλοιώσεις κυρίως στα τοιχώματα των αρτηριδίων (π.χ. νέκρωση).

- Η αρτηριοσκλήρωση τύπου Mockenberg. Χαρακτηρίζεται από μαζική ασβέστωση του μέσου χιτώνα. Συνήθως είναι αβλαβής.
- Η αθηροσκλήρωση η οποία είναι η πιο σημαντική από όλες και θα αναπτυχθεί με περισσότερες λεπτομέρειες παρακάτω.

Οι πρώιμες αθηρωματικές βλάβες παρατηρούνται κυρίως στην αορτή, όμως είναι πιθανό να εντοπιστούν και σε μικρότερες αρτηρίες, με τη μορφή λιπωδών γραμμώσεων (fatty streaks). Αυτές οι γραμμώσεις εμφανίζονται ως ωχρές κιτρινωπές γραμμές πάχους 2mm. Ιστολογικά αποτελούνται από αφρώδη ιστιοκύτταρα (foam cells). Τα αφρώδη κύτταρα προέρχονται είτε από υπερπλαστικές λείες μυϊκές ίνες, είτε από ιστιοκύτταρα που έχουν αθροίσει λιποειδή στο κυτταρόπλασμα τους. Οι λιπώδεις γραμμώσεις στη πλειοψηφία τους είναι αβλαβείς. Παρατηρούνται σχεδόν από τη παιδική ηλικία, είναι αναστρέψιμες και μπορούν να εξαφανιστούν. Εν τούτης με την επίδραση κάποιων παραγόντων είναι δυνατό να εξελιχθούν σε αθηροσκληρωτικές βλάβες [2].

Ένα δεύτερο στάδιο είναι η δημιουργία λιποειδούς και ινολιποειδούς πλάκας. Η μετάπτωση των λιποειδών γραμμώσεων σε πλάκες αρχίζει με τη διάσπαση των μυϊκών κυττάρων που περιέχουν άφθονα λιποειδή και τη δημιουργία μιας "λίμνης λίπους" στο κέντρο της βλάβης. Έτσι σχηματίζεται η λιπώδης πλάκα. Η λιπώδης πλάκα αποτελείται από λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια, και εστέρες χοληστερόλης. Εν συνεχεία ως αντίδραση έρχεται η υπερπλαστική ανάπτυξη συνδετικού ιστού γύρω από τη λιπώδη πλάκα. Αυτό επιφέρει τη μεγέθυνση της πλάκας και τη προβολή της προς τον αρτηριακό αυλό, λόγω παρεμβολής συνδετικού ιστού μεταξύ "λίμνης λίπους" και αυλού. Οπότε σχηματίζονται ινολιπώδεις πλάκες που είναι πιθανό να εξελιχθούν και σε αποκλειστικά ινώδεις [2].

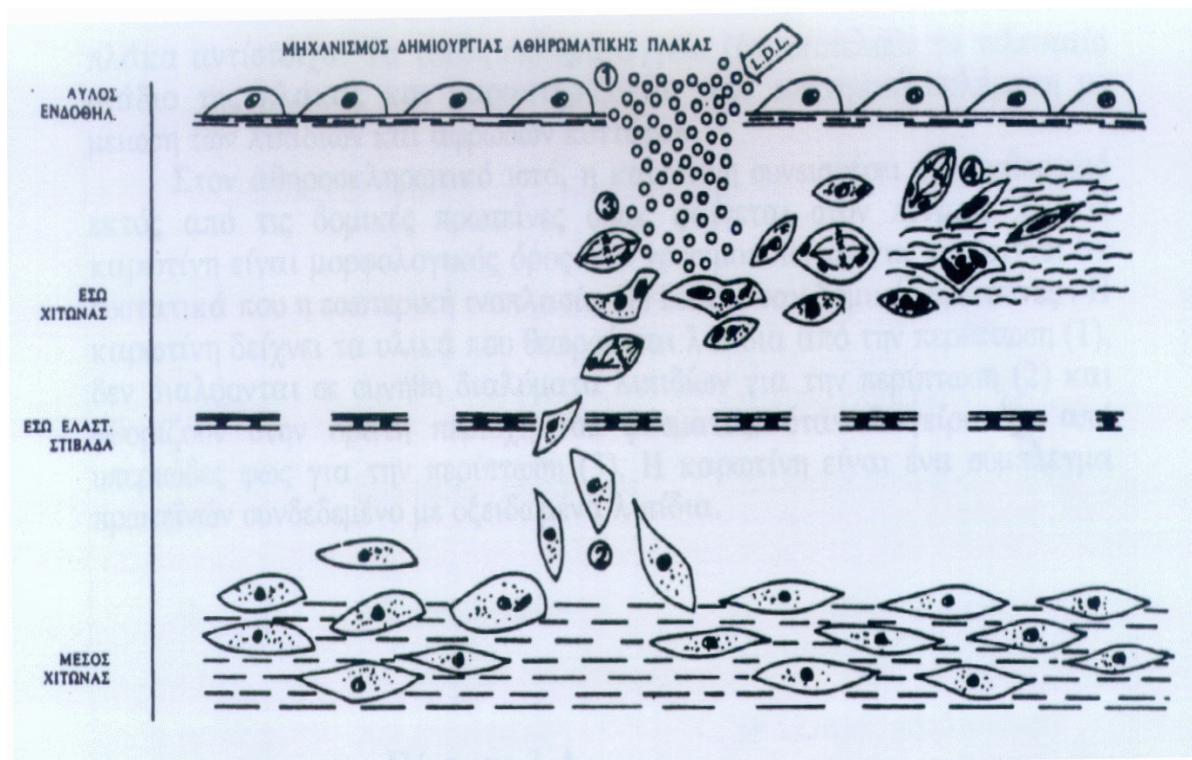
Έχουν διατυπωθεί πολλές θεωρίες για την ερμηνεία του παθογενετικού μηχανισμού της αθηρωματικής βλάβης. Μία από τις επικρατέστερες υποθέσεις [2] είναι η θεωρία της ενδοθηλιακής βλάβης και της μετανάστευσης, πολλαπλασιασμού και μετάλλαξης των λείων μυϊκών κυττάρων από τον μέσο προς τον έσω χιτώνα. Την απαρχή της δημιουργίας αθηρώματος αποτελεί ο

τραυματισμός του ενδοθηλίου του αγγείου. Στο σημείο της βλάβης παρατηρείται συσσώρευση αιμοπεταλίων και δημιουργία αιμοπεταλιακού μικροθρόμβου. Η αδρεναλίνη, οι προσταγλανδίνες, οι πρωτεϊνικές ουσίες, καθώς και η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτείνες (LDL) κυκλοφορούν στο πλάσμα και έρχονται σε επαφή με τις υπενδοθηλιακές στιβάδες του αγγείου. Στο μέσο χιτώνα του αγγείου υπάρχουν γραμμοειδώς διαταγμένα τα λεία μυϊκά κύτταρα (smooth muscle cells).

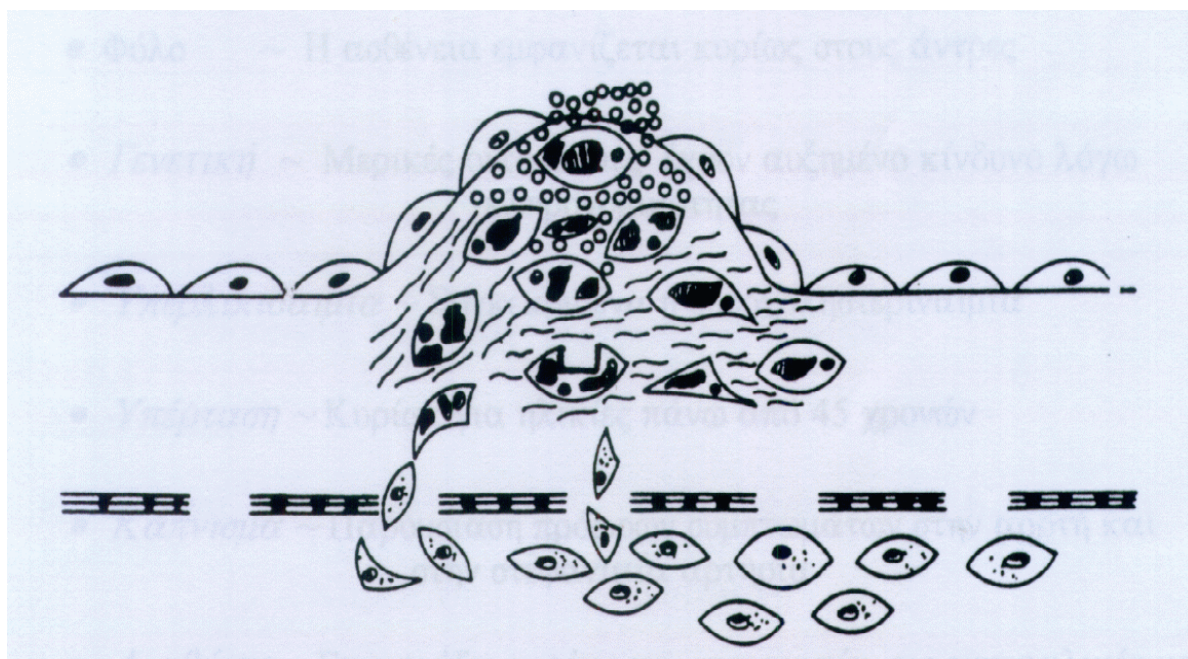
Κάτω από την επίδραση των παραπάνω ουσιών, τα μυϊκά κύτταρα αρχίζουν να μεταναστεύουν από το μέσο προς τον έσω χιτώνα του αγγείου, όπου και πολλαπλασιάζονται. Συντελούνται ταυτόχρονα και μεταβολές των μυϊκών κυττάρων, με τη συσσώρευση μέσα στο κυτταρόπλασμα τους λιπιδίων και ιδίως εστέρων χοληστερίνης.

Σήμερα γνωρίζουμε ότι η χοληστερίνη και τα τριγλυκερίδια δεν κυκλοφορούν στον ορό του αίματος ελεύθερα, αλλά ως εστέρες, συνδεδεμένα με πρωτείνες με μορφή λιποπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Οι μεταβολές των μυϊκών κυττάρων προκαλούνται από μία διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ εξωγενώς προσαγόμενων ή ενδογενώς παραγόμενων εστέρων χοληστερίνης. Οι εστέρες της χοληστερίνης δεν υδρολύονται από τα λυσοσώματα των λείων μυϊκών κυττάρων. Αυτό έχει ως συνέπεια τη συσσώρευση μέσα στο κυτταροπλάσμα των λείων μυϊκών κυττάρων ποσότητας εστέρων χοληστερίνης. Τα διογκωμένα από τη συσσώρευση των λιπιδίων λεία μυϊκά κύτταρα απωθούν τα υπερκείμενα κύτταρα του έσω χιτώνα και προβάλλουν μέσα στον αυλό του αγγείου σχηματίζοντας την αθηρωματική πλάκα. Όλα αυτά φαίνονται καλύτερα και στις δύο εικόνες που ακολουθούν (Σχήματα 2-1, 2-2).

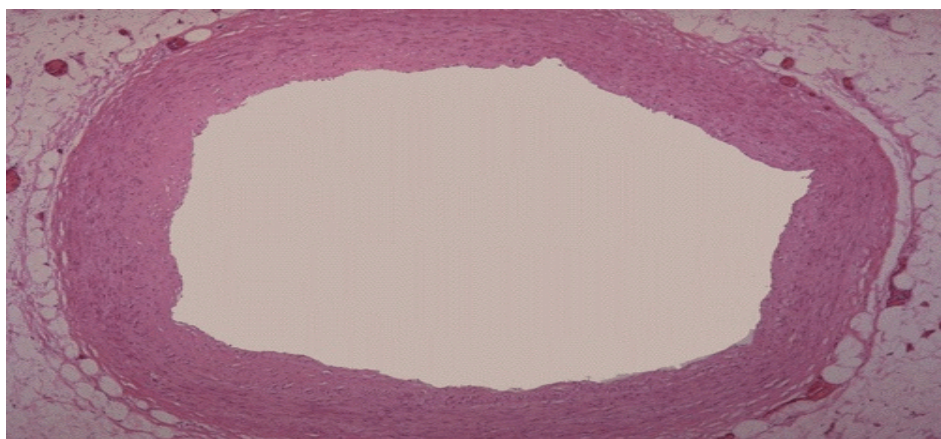
Στα σχήματα 2-1 και 2-2 (τομή αρτηρίας) ακόμη, παρατηρούμε και το σχετικό πάχος του έσω χιτώνα σε σχέση με το μέσο. Η σχέση αυτή αλλάζει δραματικά σε προχωρημένες καταστάσεις αθηρωματικής βλάβης. Ο μέσος χιτώνας λεπτύνεται κατά το μισό ή και περισσότερο του κανονικού. Αυτό οφείλεται στη προοδευτική αύξηση της πλάκας που πιέζοντας το μέσο χιτώνα προκαλεί την ατροφία του. Ταυτόχρονα διασπάται το έσω ελαστικό πέταλο κατατεμαχίζεται και μπορεί να είναι ελλειμματικό σε μεγάλη περιοχή. Αυτό συμβαίνει συνήθως κάτω από εκτεταμένες αθηρωματικές αλλοιώσεις.



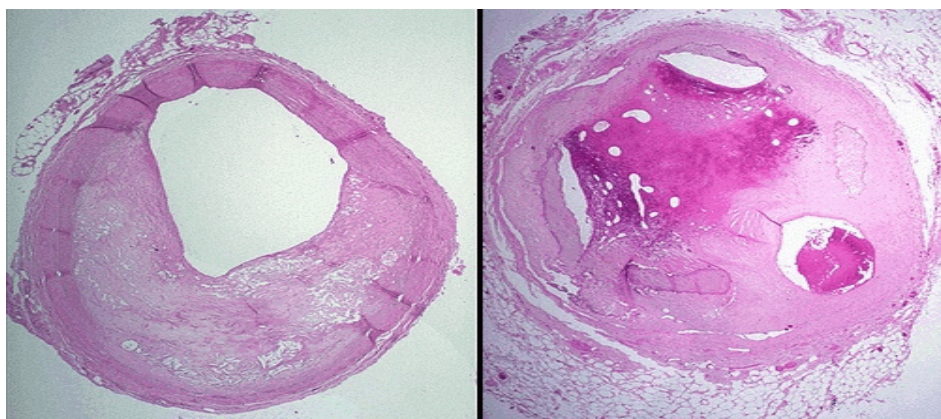
Σχ. 2-1 Μηχανισμός δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας. 1. Ενδοθηλιακή βλάβη. Συσώρευση αιμοπεταλίων-θρόμβος. Λιποπρωτεΐνες (LDL) του πλάσματος έρχονται σε επαφή με τους εσωτερικούς χιτώνες. 2. Τα λεία μυϊκά κύτταρα από το μέσο χιτώνα μεταναστεύουν διαμέσου της έσω ελαστικής στιβάδας προς τον έσω χιτώνα του αγγείου. 3. Πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων με έντονες πυρηνοκινησίες και μιτωτικές δραστηριότητες υπό την επίδραση ουσιών που εκκρίνονται από τα κύτταρα του αιμοπεταλιακού θρόμβου. 4. Τα λεία μυϊκά κύτταρα "φορτωμένα" με εστέρες της χοληστερίνης (σκιαγραμμένες νησίδες στο κυτταρόπλασμα) συνθέτουν ινώδη ιστό και κολλαγόνες ίνες (κυματοειδείς γραμμές).



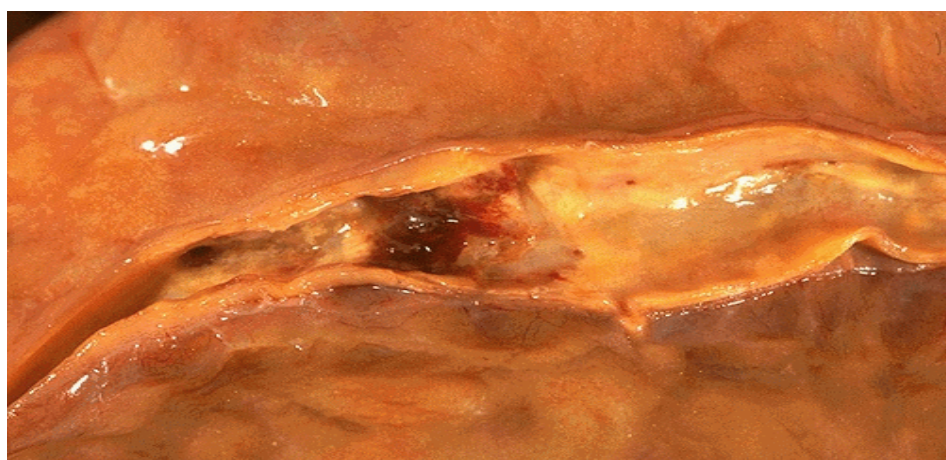
Σχ. 2-2 Μηχανισμός δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας



Σχ. 2-3 Φυσιολογική στεφανιαία αρτηρία (μικροσκοπικά), χωρίς σημάδια αθηροσκλήρωσης. Ο εντελώς ανοιχτός (μη αποπεφραγμένος) αυλός μπορεί να μεταφέρει τόσο αίμα όσο είναι αναγκαίο για τη σωστή λειτουργία του μυοκαρδίου.



Σχ. 2-4 Παρουσιάζονται αθηροσκληρωτικές στεφανιαίες αρτηρίες (μικροσκοπικά). Η στεφανιαία αρτηρία στα αριστερά εμφανίζει στένωση γύρω στο 60 με 70%. Η στεφανιαία αρτηρία στα δεξιά βρίσκεται σε ακόμη χειρότερη κατάσταση. Υπάρχουν ενδείξεις για προηγούμενη θρόμβωση, με κατανομή του θρόμβου και δημιουργία καναλιών έτσι ώστε έχουν εναπομείνει μόνο τρεις πολύ μικροί αυλοί.



Σχ. 2-5 Στεφανιαία αρτηρία με αθηροσκληρωτικές πλάκες (μακροσκοπικά). Υπάρχει αιμορραγία στη πλάκα στη μέση της φωτογραφίας. Αυτή είναι μία από τις επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης. Αυτού του είδους οι αιμορραγίες είναι δυνατό να προκαλέσουν οξεία απόφραξη του αυλού.

Επίσης, παρουσιάζονται (Σχ. 2-3 και 2-4) φωτογραφίες από φυσιολογική και αθηροσκληρωτικές στεφανιαίες αρτηρίες (μικροσκοπικά). Στο σχήμα 2-5 απεικονίζεται αθηροσκληρωτική στεφανιαία αρτηρία με αιμορραγία στη πλάκα (μακροσκοπικά) [3].

Οι αθηρωματικές πλάκες αναπτύσσονται κυρίως στις μεγάλες και μέσου μεγέθους αρτηρίες και ελαττώνονται βαθμιαία σε βαρύτητα και αριθμό προς τις μικρές αρτηρίες. Παύουν να υφίστανται λίγο πριν τα αρτηρίδια. Για αιμοδυναμικούς κυρίως λόγους οι αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις εντοπίζονται περισσότερο στα σημεία διχασμού του αρτηριακού δέντρου [4].

Η δημιουργία αθηρωματικών πλακών [1] έχει ως συνέπεια τη στένωση ή και την απόφραξη του αρτηριακού αυλού. Στις μεγάλες βασικές αρτηρίες όπως είναι η κοιλιακή αορτή, οι αθηρωματικές εκφυλιστικές αλλοιώσεις μπορεί να εξασθενήσουν το μέσο χιτώνα, να προκαλέσουν ατροφία των ελαστικών ινών και να προκληθεί διάταση του αγγείου μέχρι σχηματισμού ανευρύσματος.

Εξέλιξη των αθηρωματικών πλακών αποτελεί και η εναπόθεση αλάτων ασβεστίου, η νέκρωση των κυττάρων και η απελευθέρωση τοξικών ουσιών, η εξέλκωση της πλάκας (κυρίως στη κοιλιακή αορτή και στις λαγόνιες αρτηρίες) και η αιμορραγία του έσω χιτώνα (συνηθισμένη επιπλοκή στις στεφανιαίες και καρωτίδες αρτηρίες).

Προδιαθεσιακοί παράγοντες της αθηροσκλήρωσης

Οι κύριοι αναγνωρισμένοι προδιαθεσιακοί παράγοντες [1,2] για τη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας είναι οι εξής:

- ♦ Γεωγραφικοί παράγοντες. Η κατανομή της νόσου παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις από ήπειρο σε ήπειρο, με σαφώς αυξημένα ποσοστά σε Αμερική και Ευρώπη. Επίσης, διαφορές υπάρχουν και μεταξύ των κρατών. Η νόσος φαίνεται να έχει ιδιαίτερη "προτίμηση" στα αναπτυγμένα βιομηχανικά κράτη, με μοναδική εξαίρεση την Ιαπωνία. Αυτές οι δημογραφικές μελέτες οδήγησαν στην ενοχοποίηση πλήθους περιβαλλοντολογικών παραγόντων.

- ♦ Ηλικία, φύλλο. Όσο μεγαλύτερο ηλικιακά είναι το άτομο τόσο περισσότερες και βαρύτερες είναι οι αλλοιώσεις. Η νόσος προσβάλλει

συχνότερα τους άνδρες από ότι τις γυναίκες. Μετά την ηλικία των 60 ετών πάντως δεν υπάρχει ουσιαστική διαφορά.

♦ Λιπίδια του αίματος. Έχει διαπιστωθεί η στενή σχέση της νόσου και των υψηλών τιμών χοληστερίνης και τριγλυκεριδίων στον ορό του αίματος των αρρώστων. Οι λιποπρωτείνες (εστέρες χοληστερίνης και τριγλυκεριδίων συνδεδεμένα με πρωτείνες) και ιδίως η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτείνες (LDL) όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας. Τα άτομα με υψηλές τιμές LDL έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν συχνότερα εμφάνιση αθηροσκληρωτικής αρτηριοπάθειας.

♦ Διαβήτης. Άνδρες με σακχαρώδη διαβήτη έχουν 50% περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν τη νόσο σε σχέση με μη διαβητικούς. Για τις γυναίκες ο κίνδυνος φαίνεται να είναι μικρότερος. Στο σακχαρώδη διαβήτη η αυξημένη συχνότητα αθηροσκλήρωσης οφείλεται κυρίως στη διαταραχή του μεταβολισμού των λιπών.

♦ Αρτηριακή πίεση. Η αρτηριακή πίεση είναι συνάρτηση των περιφερικών αντιστάσεων, της ελαστικότητας των αγγείων, της συσταλτικής ικανότητας της καρδιάς και της γλοιότητας του αίματος. Η υπέρταση έχει αποδειχθεί ότι συμβάλει ουσιαστικά στη πρόκληση της νόσου. Ο μηχανισμός δράσης της υπέρτασης σχετίζεται με τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου των υπερτασικών ασθενών στη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτείνη (LDL), καθώς και στην ευπάθεια του αρτηριακού τοιχώματος σε εξωτερικούς βλαπτικούς παράγοντες.

♦ Παχυσαρκία. Η καθιστική ζωή καθώς και η παχυσαρκία αποτελούν επίσης προδιαθεσικούς παράγοντες. Ο μηχανισμός τους φαίνεται να σχετίζεται με τις υψηλές τιμές LDL στον ορό του αίματος, την αυξημένη πιθανότητα για εμφάνιση διαβήτη, και τις φτωχές καρδιαγγειακές εφεδρείες.

♦ Μηχανικοί λόγοι. Συνήθως τα αθηρώματα εντοπίζονται ή είναι βαρύτερα στις εκφύσεις των αρτηριών και στους διχασμούς τους. Φαίνεται ότι σημαντικό παθογενετικό ρόλο διαδραματίζουν οι τοπικές συνθήκες ροής, όπως ο διαχωρισμός ροής, υψηλές ή χαμηλές διατμητικές τάσεις και προσκρούσεις κυμάτων πίεσης και ροής με διαφορετική φάση [4].

♦ Κάπνισμα. Το κάπνισμα έχει άμεση αθηρωματογόνο δράση με τη πρόκληση υποмикροσκοπικών αλλοιώσεων στο ενδοθήλιο των αγγείων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία αιμοπεταλιακών θρόμβων, την υπερπλασία των λείων μυϊκών ινών και τελικά το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας. Το κάπνισμα μπορεί ακόμη να επιτείνει τις ισχαιμικές επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης. Έχει διαπιστωθεί ότι η διακοπή του καπνίσματος μειώνει σε μεγάλο βαθμό το κίνδυνο εκδήλωσης της νόσου.

2.3 Ανίχνευση αθηρωματικής πλάκας με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού

Οι πιο αξιόπιστες καθιερωμένες παρακλινικές εξετάσεις για την ανίχνευση και καταγραφή της αθηρωματικής πλάκας, θεωρούνται σήμερα, η υπερηχογραφία (Doppler) και η αγγειογραφία [2,5].

Η υπερηχογραφία βασίζεται στον έλεγχο της ταχύτητας της μετακίνησης της μάζας του αίματος στον αυλό του αγγείου και στη διάκριση της «υφής» του αρτηριακού τοιχώματος. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μία αλματώδη εξέλιξη στη τεχνολογία των υπερήχων. Με την εισαγωγή του Doppler διακεκομμένης εκπομπής, του Doppler διπλής κατεύθυνσης, καθώς και του συνδυασμού Doppler και υπερηχοτομογραφίας, καθίσταται πλέον δυνατή η συλλογή πιο αξιόπιστων πληροφοριών για τον εντοπισμό αθηρωματικών πλακών καθώς και για τη διάκριση της υφής τους [5].

Η αγγειογραφία συμβατική ή ψηφιακή ή μαγνητική, δίνει επίσης πολύτιμες πληροφορίες για τον ακριβή εντοπισμό, την έκταση και τη βαρύτητα των αθηρωματικών αλλοιώσεων. Βασίζεται στην ακτινολογική σκιαγράφιση του αρτηριακού δέντρου μετά από έγχυση σκιεράς ουσίας.

Στη παρούσα έρευνα εξετάζεται το κατά πόσο ο φθορισμός του ίδιου του ιστού -ο αυτοφθορισμός (autofluorescence)- μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό εργαλείο, για τη διάκριση μεταξύ αθηρωματικής πλάκας και φυσιολογικής αρτηρίας. Η αλλαγή στη χημική σύσταση της αθηρωματικής πλάκας σε σχέση με τη φυσιολογική αρτηρία αποτελεί το βασικό στοιχείο για την ανίχνευση της. Η ανίχνευση αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση

φασματοσκοπίας φθορισμού. Αλλαγές στη φασματική κατανομή και στην ένταση του συλλεγόμενου φθορισμού μπορούν να συνδεθούν με την παρουσία ή όχι αθηροσκληρωτικής βλάβης. Η φασματική περιοχή εκπομπής και η ένταση του καταγραφόμενου φθορισμού περιέχουν πληροφορίες για τις διάφορες χρωμοφόρες που υπάρχουν στον υπό ακτινοβολία ιστό.

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται [6] τα μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής μερικών σημαντικών βιολογικών μορίων.

Χρωμοφόρες		Διέγερση/Απορρόφηση	
		λ_{exc} maximum	λ_{em} maximum
Τρυπτοφάνη	solution	275nm	350nm
NADH*	solution	350nm	460nm
NADPH	solution	350nm	460nm
Ελαστίνη	powder	260nm	410nm
		360nm	410nm
		425nm	490nm
Κολλαγόνο	powder	370nm	450nm
		330nm	390nm
		340nm	395nm
		280nm	310nm
		270nm	395nm
Φλαβίνες	powder	450nm	550nm
Πρωτοπορφυρίνη IX	solution	407nm	606nm, 662nm

*NADH: nicotinamide adenine dinucleotide.

Πιν. 2-1 Πίνακας με τα μέγιστα απορρόφησης και εκπομπής σημαντικών βιομορίων.

Οι πρωτεΐνες, όπως έχει αναφερθεί και προηγούμενα, έχουν μέγιστο απορρόφησης γύρω στα 280 nm και εκπέμπουν στη περιοχή από 320-350nm. Τα νουκλεοτίδια και τα νουκλεϊκά οξέα γενικώς δε φθορίζουν. Ωστόσο το NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) φθορίζει έντονα στη φασματική περιοχή των 460nm. Το κολλαγόνο και η ελαστίνη κατά τη διέγερση τους με

υπεριώδη ακτινοβολία (UV) αποδίδουν φθορισμό μεταξύ 350-450nm (UV-μπλέ). Οι φλαβίνες απορροφούν έντονα στα 450nm και εκπέμπουν στα 550nm (πράσινο). Οι πορφυρίνες που ανιχνεύονται στην αιμοσφαιρίνη φθορίζουν ισχυρά στη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 600-700nm (κόκκινο). Άλλες χρωμοφόρες του ιστού είναι η κερατίνη, η μελανίνη και οι καρωτίνες (η β-καρωτίνη έχει μέγιστο εκπομπής στα 540nm). Ωστόσο πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι, κατά τη διάρκεια του αυτοφθορισμού της αθηροσκληρωτικής αρτηρίας μέρος του καταγραφόμενου σήματος προέρχεται και από τις εναποθέσεις λιπιδίων και ασβεστίου στο πυρήνα του αθηρώματος.

Η δομή των φασμάτων φθορισμού των ιστών είναι αρκετά περίπλοκη. Είναι δύσκολο να καταγραφεί ο ενδογενής φθορισμός (intrinsic fluorescence) των χρωμοφόρων του ιστού. Παράγοντες όπως η σκέδαση, η απορρόφηση, η αιμοσφαιρίνη, η γεωμετρία και οι συνοριακές συνθήκες του υπό ακτινοβολία ιστού προκαλούν παραμόρφωση του συλλεγόμενου σήματος [7]. Ωστόσο πολλές μελέτες καταγράφουν το φθορισμό μεμονωμένων χρωμοφόρων του ιστού [8-10]. Επίσης, έχει επιτευχθεί η μέτρηση του ενδογενή φθορισμού ή της απορρόφησης έντονα σκεδαστικών μέσων (turbid media) [11,12]. Αυτά τα μέσα προσομοιάζουν πάρα πολύ καλά τις συνθήκες που υπάρχουν στον ιστό.

Οι πίο πολλές χρωμοφόρες του ιστού έχουν μπάντες απορρόφησης και εκπομπής με μεγάλο εύρος. Αυτό έχει ως συνέπεια τα φάσματα εκπομπής των χρωμοφόρων του ιστού να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να υπάρχει έντονη αλληλοεπικάλυψη. Βέβαια, είναι δυνατό κάποιο μέρος του φθορισμού του ιστού (μία κορυφή) να αποδοθεί κυρίως στην εκπομπή μιάς συγκεκριμένης χρωμοφόρας, χωρίς όμως να μπορεί να αποκλειστεί και η όχι και τόσο έντονη συμβολή και κάποιων άλλων χρωμοφόρων. Το συλλεγόμενο φάσμα φθορισμού του ιστού δηλαδή, είναι μιά συνεισφορά όλων των χρωμοφόρων του.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για το χαρακτηρισμό του αρτηριακού τοιχώματος με τη χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ [13-17]. Για τον οπτικό χαρακτηρισμό των αγγείων έχουν χρησιμοποιηθεί λέιζερ διαφόρων μηκών κύματος, όπως Ar^+ (ιόντων αργού 476.5nm) [14,18,19], $XeCl$ (χλωριούχου ξένου 308nm) [20-22],

XeF (φθοριούχου ξένου 351nm) [23], He-Cd (ηλίου-καδμίου 442nm) [24-27] και N₂ (αζώτου 337nm) [13,28].

Το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον ιστό αυξάνει με την αύξηση του μήκους κύματος (Σχήμα 1-8). Με τη χρησιμοποίηση μικρών μηκών κύματος για τη διέγερση των μορίων αποφεύγεται η βαθύτερη διείσδυση της ακτινοβολίας στον ιστό. Με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η φασματική συνεισφορά από βαθύτερα στρώματα του ιστού, τα οποία βρίσκονται πέρα από την προς διερεύνηση περιοχή [29]. Ακόμη, με τη χρήση μικρών κύματος για διέγερση σε μικρό βάθος διείσδυσης επιτυγχάνεται η μείωση του διαχεόμενου φωτός λόγω σκέδασης σε περιοχές του ιστού πέραν του καθορισμένου στόχου.

Εκτός από τη χρήση του αυτοφθορισμού για την ανίχνευση των αθηρωματικών αλλοιώσεων, έχουν γίνει αρκετές φασματικές μελέτες με τη χορήγηση εξωγενών ουσιών που επιλεκτικά προσκολλούνται στις αθηρωματικές πλάκες. Εκτεταμένες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί με τη χορήγηση διαφόρων ουσιών *in vitro* (chlorotetracycline CTC-HCL [30,31], hematoporphyrin derivative HpD [32], hypocrellin HA [24]). Ο σκοπός όλων αυτών των μελετών είναι η απόκτηση βελτιωμένων αποτελεσμάτων για τη διάκριση της αθηρωματικής πλάκας από τη φυσιολογική αρτηρία, με τη χρησιμοποίηση φασματοσκοπικών μεθόδων.

Είναι δύσκολο να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα και να γίνουν απευθείας συγκρίσεις μεταξύ φασματικών χαρακτηριστικών των ιστών που μετρήθηκαν σε διαφορετικές έρευνες και κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Ακόμη, και για τον ίδιο τύπο αθηρωματικής πλάκας το φάσμα φθορισμού αλλάζει για διαφορετικό μήκος κύματος διέγερσης. Σημαντικό ρόλο στο καταγραφόμενο σήμα παίζει και η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιείται (απόκριση ανιχνευτικού συστήματος, διαπερατότητα καθρεπτών).

Εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης και φασματοσκοπικές διαγνωστικές τεχνικές

Οι βαριάς μορφής αθηρωματικές αλλοιώσεις έχει αποδειχθεί (από βιοψίες) ότι περιέχουν μεγάλες ποσότητες κολλαγόνου και σχετικά λίγα

λιπίδια [33]. Ο φθορισμός αυτών των αλλοιώσεων προέρχεται κυρίως από τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν την ινώδη επίστρωση που καλύπτει την πλάκα [27].

Σε αντίθεση στα πρώτα στάδια της αθηροσκλήρωσης η περιοχή κάτω από το ενδοθήλιο καλύπτεται από μακροφάγα κύτταρα φορτωμένα με λιπίδια ή από αφρώδη κύτταρα. Αυτά άλλωστε είναι και τα κύρια συστατικά των λιπωδών γραμμώσεων (fatty streaks) [34,35]. Σύμφωνα με κάποιες ερμηνείες, οι λιποπρωτεΐνες που συγκεντρώνονται στα αφρώδη κύτταρα υφίστανται υδρολυτικές και υπεροξειδιακές μεταβολές [36-38]. Έχει προταθεί ότι αυτές οι αλλαγές στις λιποπρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην έλξη μονοκυττάρων και στη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα φορτωμένα με λιπίδια (lipid-laden foam cells) [36].

Στα πρώτα στάδια της αθηροσκλήρωσης παρατηρείται συγκέντρωση κολλαγόνου, λιπιδίων και αφρωδών κυττάρων. Στα τελευταία στάδια της, εκτός από την ασβεστοποίηση, είναι εμφανής η επιπλέον αύξηση του κολλαγόνου καθώς και η αισθητή μείωση των λιπιδίων. Αυτό έχει ως συνέπεια την εμφάνιση φασματικών αλλαγών στα συλλεγόμενα σήματα φθορισμού.

Έχει διατυπωθεί ότι, οι διαφορετικές σχετικές συγκεντρώσεις κολλαγόνου και ελαστίνης, μεταξύ αθηροσκληρωτικής και φυσιολογικής αρτηρίας, βοηθούν στη διάκριση τους με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού [39]. Επίσης, έχει γίνει η υπόθεση ότι, συνδέονται άμεσα με την αποσύνθεση της ελαστίνης τα συστατικά που αποδίδουν φθορισμό, τα οποία συσσωρεύονται στις ανθρώπινες αθηροσκληρωτικές αρτηρίες και είναι συγκεντρωμένα στον έσω χιτώνα της πλάκας ως χρωμοφόρες (atherofluorescent component pigments) [40]. Ακόμη, υπάρχει η θεωρία του “φιλτραρίσματος” από το υπερκείμενο αθήρωμα το οποίο δρα ως εσωτερικό φίλτρο τόσο για τη διέγερση όσο και για τον επαγόμενο φθορισμό [41]. Επιπλέον, έχει προταθεί η ελαστίνη ως η κυριότερη χρωμοφόρα στις αθηροσκληρωτικές αρτηρίες και ότι αποτελούν στοιχείο κλειδί για την αξιόπιστη διάγνωση οι σχετικές συγκεντρώσεις χρωμοφόρων στον ιστό [27]. Τέλος, έχει αποδειχθεί η ύπαρξη αλλαγών στον αυτοφθορισμό μεταξύ στεφανιαίων αρτηριών και αορτών [42,43]. Οι στεφανιαίες αρτηρίες εκπέμπουν μικρότερης

έντασης σήματα φθορισμού συγκριτικά με τις αρτητές. Ο κυριότερος λόγος για αυτό είναι η έλλειψη ελαστικών ινών σε αυτά τα μέσα (στεφανιαίες αρτηρίες).

Όσο αφορά τη διάγνωση, αρκετές φασματοσκοπικές τεχνικές (*in vitro*) έχουν δοκιμασθεί με στόχο την επίτευξη της διάκρισης μεταξύ αθηροσκληρωτικού και φυσιολογικού αρτηριακού ιστού. Για τη διάκριση των ιστών έχει χρησιμοποιηθεί ο λόγος των εντάσεων δύο ή περισσότερων περιοχών του συλλεγόμενου φάσματος φθορισμού [29,44,45]. Εκτός αυτού, τέθηκε σε εφαρμογή και η πολλαπλή και βηματική ανάλυση (multiple and stepwise regression analysis) για την επεξεργασία των λόγων των εντάσεων των φασμάτων [46]. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση παθολογικών από φυσιολογικά αγγεία η σύγκριση μεταξύ των φασμάτων φθορισμού των αρτηριών και των ξεχωριστών συστατικών τους (κολλαγόνο, ελαστίνη, λιπίδια) [27]. Ακόμη, μία σχετικά σύγχρονη τεχνική είναι η ανάλυση βασικών συστατικών του ιστού (principal component analysis) που χρησιμοποιείται για την εμφάνιση φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών που βοηθούν στη ταξινόμηση των δειγμάτων [13,45,47].

Αξίζει τέλος να σημειωθεί ότι, στη παρούσα εργασία θα παρουσιαστεί (Κεφάλαιο 4) και επεξεργασία των καταγραφόμενων φασμάτων φθορισμού από τα περιφερειακά αγγεία, με τη χρήση τεχνητού νευρωνικού δικτύου (Artificial Neural Network). Είναι η πρώτη φορά που γίνεται επεξεργασία δεδομένων προερχόμενα από βιολογικούς ιστούς, με τη βοήθεια νευρωνικού δικτύου και όπως θα αναφερθεί και παρακάτω αναλυτικά, τα αποτελέσματα είναι πολύ ενθαρρυντικά (100% επιτυχία σε ότι αφορά τη διάκριση των ιστών).

Ο ρόλος της αιμοσφαιρίνης

Στον ιστό περιέχονται χρωμοφόρες όπως η αιμοσφαιρίνη. Στους ανθρώπους η αιμοσφαιρίνη εμφανίζεται κυρίως με δύο διαφορετικές μορφές την οξυ-αιμοσφαιρίνη (oxy-hemoglobin) και τη διοξυ-αιμοσφαιρίνη (deoxy-hemoglobin). Ο διαχωρισμός εξαρτάται από το οξυγόνο που συνδέεται στις ομάδες αιματίνης [29].

Η αιμοσφαιρίνη έχει την ιδιότητα να απορροφά, εκτός από την εισερχόμενη ακτινοβολία διέγερσης και το εκπεμπόμενο φώς (φθορισμός) από

τις υπόλοιπες χρωμοφόρες του ιστού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα "φιλτράρισμα" στα φάσματα φθορισμού, οδηγώντας σε τεχνητές "κορυφές" και "κοιλιάδες".

Ο ακόλουθος πίνακας (Πιν. 2-2) παρουσιάζει τα μέγιστα της απορρόφησης της οξυ και διοξυ-αιμοσφαιρίνης στην ορατή και την υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (η κύρια κορυφή απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης εντοπίζεται στα 420nm).

Χρωμοφόρες	Απορρόφηση στο ορατό	Απορρόφηση στο υπέρυθρο
Οξυ-αιμοσφαιρίνη	415nm, 540nm, 575nm	910nm
Διοξυ-αιμοσφαιρίνη	430nm, 555nm	740nm, 910nm

Πιν. 2-2 Πίνακας με τα μέγιστα απορρόφησης της οξυ και διοξυ-αιμοσφαιρίνης

Έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός από τεχνικές για τη λήψη φασμάτων φθορισμού, τα οποία θα είναι απαλλαγμένα από την επίδραση της αιμοσφαιρίνης.

Μια τεχνική είναι η χρησιμοποίηση δύο μηκών κύματος με ίδια απορρόφηση από το αίμα [44]. Τέτοια ζευγάρια μηκών κύματος είναι τα 380 και 437nm, και 390 και 431nm. Ο λόγος των εντάσεων αυτών των μηκών κύματος παρουσιάζει πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα για τη διάκριση μεταξύ πλάκας και φυσιολογικού ιστού.

Μια άλλη τεχνική βασίζεται στους διαφορετικούς χρόνους ζωής φθορισμού του αθηρώματος σε σχέση με το φυσιολογικό αγγείο (time resolved fluorescence spectroscopy) [48-51]. Αυτή η τεχνική στηρίζεται στους διαφορετικούς χρόνους ζωής φθορισμού των χρωμοφόρων του ιστού και είναι ανεξάρτητη από την επαναπορρόφηση του εκπεμπόμενου φθορισμού από το αίμα.

Εισαγωγή στο πειραματικό μέρος

Μία εισαγωγή στο πειραματικό μέρος που έπεται θα παρουσιαστεί σε αυτό το σημείο. Δηλαδή, θα αναπτυχθεί περιληπτικά ο τρόπος πραγματοποίησης και οι κυριότεροι στόχοι της κάθε σειράς πειραμάτων.

Αρχικά, στο τρίτο κεφάλαιο θα μελετηθεί η επίδραση της συντήρησης σε φορμόλη και υγρό άζωτο στο φάσμα φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ των περιφερειακών αγγείων. Για την διέγερση των δειγμάτων θα χρησιμοποιηθούν τα λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm) και ιόντων Αργού (457.9, 476.5, 488, 496.5, και 501.7nm) σε ξεχωριστές σειρές μετρήσεων. Όλα τα δείγματα έχουν αποκτηθεί από εγχειρήσεις by-pass και ακρωτηριασμούς και υπόκεινται σε ακτινοβολήση περίπου μία ώρα μετά την εκτομή τους. Θα πραγματοποιηθεί σύγκριση των φασμάτων φθορισμού των ιστών όταν είναι νωποί και μετά την συντήρησή τους σε φορμόλη ή υγρό άζωτο για 24 και 48 ώρες. Η σύγκριση των σημάτων φθορισμού θα επιτευχθεί με την εφαρμογή δώδεκα (12) απλών αλγεβρικών αλγορίθμων, οι οποίοι είναι βασισμένοι στις διαφορές της έντασης των καταγραφόμενων φασμάτων.

Όλες οι *in vitro* μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ πάνω σε ανθρώπινους ιστούς πραγματοποιούνται κατόπιν συντήρησης των δειγμάτων για κάποιο χρονικό διάστημα σε φορμόλη ή υγρό άζωτο. Παρόλα αυτά όμως, μέχρι τώρα δεν υπήρξε καμία εκτεταμένη μελέτη για το ρόλο της συντήρησης σε φορμόλη ή υγρό άζωτο στα σήματα φθορισμού. Η έλλειψη στη διεθνή βιβλιογραφία μίας τέτοιας έρευνας έκανε επιτακτική την ανάγκη πραγματοποίησης της. Οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι: η διερεύνηση των αλλοιώσεων στα φάσματα που οφείλονται αποκλειστικά στην συντήρηση, η μελέτη του χρόνου που απαιτείται για τη δημιουργία αυτών των αλλοιώσεων και η ανάδειξη του τρόπου συντήρησης που επιφέρει τις λιγότερες δυνατές αλλαγές στην κατανομή των συλλεγόμενων σημάτων φθορισμού.

Στο τέταρτο κεφάλαιο θα ερευνηθούν οι πιθανότητες για την επίτευξη της διάκρισης μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών

περιφερειακών αγγείων (*in vitro*), με τη χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ. Για την ακτινοβολήση των δειγμάτων θα χρησιμοποιηθούν πάλι τα λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm) και ιόντων Αργού (457.9, 476.5, 488 και 496.5nm). Οι ιστοί θα διεγερθούν με τη χρήση ενός ή δύο διαφορετικών μηκών κύματος ταυτόχρονα. Τα δείγματα (μηριαίες, ιγνυακές, κνημιαίες περνιαίες αρτηρίες, κοιλιακές αορτές) προέρχονται και σε αυτή την περίπτωση από εγχειρήσεις by-pass και ακρωτηριασμούς. Η διάκριση και η ταξινόμηση των διαφορετικών τύπων ιστών (φυσιολογική αρτηρία, ινώδη, ασβεστοποιημένη πλάκα) θα πραγματοποιηθεί με την εφαρμογή 12 απλών αλγεβρικών αλγορίθμων που σχετίζονται με τα συλλεγόμενα φάσματα, καθώς και με την μελέτη του μέγιστου πλάτους στο μισό του ύψους (full width at half maximum F.W.H.M.). Επίσης, ένας αριθμός από τα φάσματα φθορισμού που εξήχθησαν θα επεξεργαστούν με τη χρήση τεχνητού νευρωνικού δικτύου, έχοντας ως στόχο την πιο λεπτομερειακή ανάλυση των καταγραφόμενων σημάτων. Επιπλέον, θα ερευνηθεί ο τρόπος διέγερσης (ένα ή δύο διαφορετικά μήκη κύματος) των περιφερειακών αγγείων που αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά τη διάκριση τους. **Τέλος, θα παρουσιαστεί ένας περιορισμένος αριθμός *in vivo* μετρήσεων που πάρθηκαν από εγχειρήσεις by-pass, με γραμμή διέγερσης την 442nm (Ηλιο-Κάδμιο).**

Ο κυριότερος στόχος της συγκεκριμένης μελέτης, είναι η διερεύνηση των πιθανοτήτων για την κλινική χρήση αυτής της σχετικά καινούργιας ελάχιστα επεμβατικής τεχνικής (φασματοσκοπία φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ), ως διαγνωστικού μέσου για την έγκαιρη ανίχνευση νοσηρών περιφερειακών αγγείων. Η απόκτηση των δεδομένων και η ανάλυση τους πραγματοποιούνται σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα (μερικά δευτερόλεπτα), έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η χρήση αυτής της τεχνικής και σε *in vivo* μετρήσεις. Το βασικό πλάνο είναι η χρησιμοποίηση αυτής της μεθόδου, σε συνεργασία με τις υπάρχουσες διαγνωστικές τεχνικές, για την εξαγωγή όσο το δυνατό πιο βελτιωμένων αποτελεσμάτων που αφορούν την έγκαιρη και αξιόπιστη ανίχνευση παθήσεων των περιφερειακών αγγείων.

Στο πέμπτο κεφάλαιο θα μελετηθούν φάσματα φθορισμού από καρδιές ανθρώπων και αμνών (*in vitro*). Ως πηγή διέγερσης θα χρησιμοποιηθεί το λέιζερ ιόντων Αργού, με γραμμή εκπομπής στα 457.9nm. Τα δείγματα των αμνών συλλέχτηκαν αμέσως μετά την σφαγή των ζώων και υπόκεινταν σε ακτινοβολήση μέσα στις δύο πρώτες ώρες από την εκτομή τους. Όσο αφορά στις ανθρώπινες καρδιές προήλθαν από το νεκροτομείο μία ώρα μετά την εκτομή τους. Σήματα φθορισμού θα καταγραφούν από διάφορα καρδιακά τμήματα (αριστερό και δεξιό κόλπο και κοιλία, αορτή, μυοκάρδιο, επικάρδιο). Θα ερευνηθεί η σταθερότητα των μετρήσεων μέσα σε κάθε ανατομική περιοχή της καρδιάς και θα γίνει προσπάθεια να διαχωριστούν με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού τα διάφορα καρδιακά τμήματα (με τη σύγκριση του ύψους της φασματικής έντασης, με την εφαρμογή αλγορίθμων). Επίσης, θα μελετηθούν οι διαφορές στη κατανομή των σημάτων φθορισμού που οφείλονται στην επίδραση της συντήρησης των δειγμάτων σε φορμόλη (για 48 ώρες). Στο τέλος του κεφαλαίου θα παρουσιαστεί ένας αριθμός από *in vivo* μετρήσεις που συλλέχτηκαν κατά την διάρκεια εγχειρήσεων ανοιχτής καρδιάς. Στα συγκεκριμένα πειράματα, για καθαρά πρακτικούς λόγους, ως πηγή διέγερσης θα χρησιμοποιηθεί το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm).

Στη παρούσα εργασία θα εξεταστούν ολόκληρες και κατά τεκμήριο φυσιολογικές καρδιές. Με αυτό τον τρόπο θα μελετηθεί ολοκληρωμένα το φάσμα εκπομπής του μυοκαρδιακού ιστού και θα γίνει προσπάθεια ανίχνευσης παθολογικών καταστάσεων του μυοκαρδίου. Ο απώτερος στόχος είναι η χρησιμοποίηση αυτής της διαγνωστικής μεθόδου, σε συνεργασία με τη συνήθη βιοψία, για την εξαγωγή βελτιωμένων αποτελεσμάτων. Ένας άλλος τομέας που θα ήταν χρήσιμη η φασματοσκοπία φθορισμού επαγομένη από λέιζερ, είναι η ηλεκτροφυσιολογία για την χαρτογράφηση του μυοκαρδίου και την ανίχνευση ινωτικών αρρυθμιογόνων περιοχών. Με τη βοήθεια της (έστω και σαν συμπληρωματική εξέταση) είναι πιθανό να αυξηθεί η ευαισθησία που προσφέρουν τα διάφορα ηλεκτροφυσιολογικά τεστ (~50-90%).

Η επίδραση στο φθορισμό περιφερειακών αγγείων της συντήρησης σε φορμόλη και σε υγρό άζωτο.

- 3.1 *Εισαγωγή*
- 3.2 *Πειραματική διάταξη*
 - Δείγματα*
 - Καταγραφή του φθορισμού*
 - Δημιουργία αλγεβρικών αλγορίθμων*
- 3.3 *Αποτελέσματα*
 - Ανάλυση αποτελεσμάτων*
 - Εφαρμογή των αλγορίθμων*
- 3.4 *Συμπεράσματα*

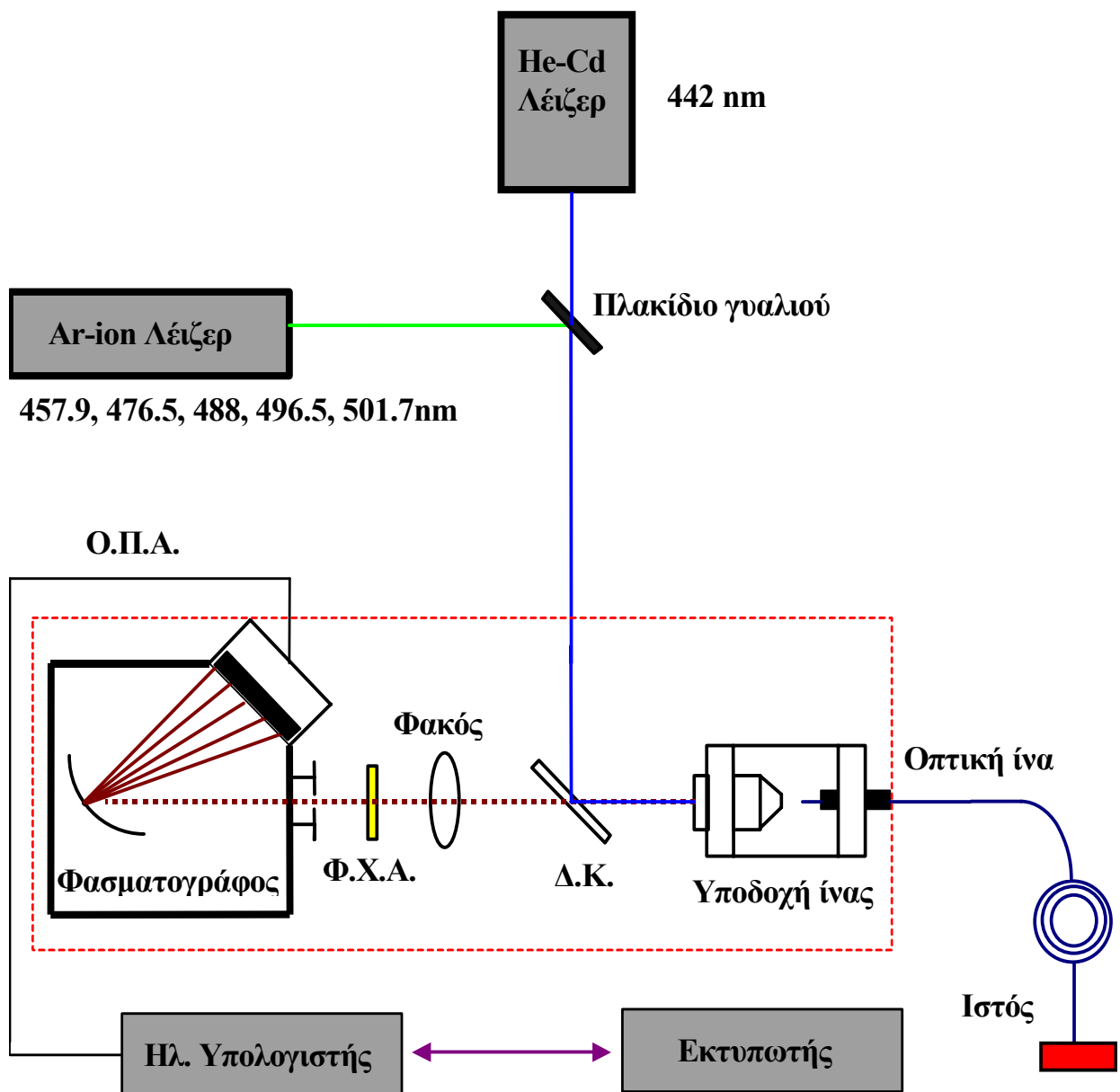
3.1 Εισαγωγή

Στο τρίτο κεφάλαιο θα μελετηθεί η επίδραση της συντήρησης σε φορμόλη και σε υγρό άζωτο στο φάσμα φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ των περιφερειακών αγγείων. Θα αναλυθούν λεπτομερειακά, η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε, τα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν και ο τρόπος καταγραφής του φθορισμού. Η φασματική κατανομή του φθορισμού των ιστών επέτρεψε τη δημιουργία απλών αλγεβρικών αλγορίθμων που βασίζονται στις διαφορές έντασης. Με τη βοήθεια αυτών των αλγορίθμων θα γίνει προσπάθεια διάκρισης των δειγμάτων, όταν είναι φρέσκα και μετά την συντήρησή τους για 24 και 48 ώρες σε φορμόλη ή υγρό άζωτο. **Ο απότερος στόχος είναι να καταδειχθεί πειραματικά ο τρόπος συντήρησης (για τις**

μελέτες in vitro), που επιφέρει τις λιγότερες δυνατές φασματικές αλλοιώσεις στο συλλεγόμενο φθορισμό των ιστών.

3.2 Πειραματική διάταξη

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των μετρήσεων παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί:



Σχ.3-1 Πειραματική διάταξη για τη καταγραφή φασμάτων φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ, από περιφερειακά αγγεία. ΔΚ, διχροϊκός καθρέπτης, ΦΧΑ, φίλτρο αποκλεισμού χαμηλών μηκών κύματος, ΟΠΑ οπτικός πολυκαναλικός αναλυτής.

Το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου που εκπέμπει στα 442nm και το λέιζερ ιόντων Αργού με γραμμές εκπομπής στα 457.9, 476.5, 488, 496.5, και 501.7nm χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές διέγερσης. Τα δείγματα ακτινοβολούνταν με κάθε ένα από αυτά τα μήκη κύματος σε ξεχωριστές σειρές μετρήσεων.

Η ισχύς της ακτινοβολίας στην έξοδο των λέιζερ ήταν, 15mWatt για το Ήλιο-Κάδμιο και 150 έως 200 mWatt για καθεμία από τις γραμμές εκπομπής του Αργού. Η μέση ισχύς της δέσμης στην άκρη της ίνας, που ερχόταν σε επαφή με το δείγμα, ήταν της τάξης των 5-10mWatt κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, για κάθε μήκος κύματος. Το γυάλινο πλακίδιο (glass plate) χρησιμοποιήθηκε μόνο στην περίπτωση του λέιζερ ιόντων Αργού. Χρησιμοποιώντας για διέγερση μόνο την ανάκλαση από το γυαλί (4% της αρχικής δέσμης του λέιζερ), μειωνόταν η ισχύ που προσέπιπτε στο δείγμα.

Η δέσμη του λέιζερ κατευθυνόταν κατάλληλα με τη βοήθεια διχροϊκών καθρεπτών (99% στις 45⁰ στα 441.6nm, ή 99% στις 45⁰ στα 457-528nm ανάλογα με το λέιζερ που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά για τη διέγερση). Κατόπιν, η δέσμη εστιαζόταν στην είσοδο μίας ίνας πολλών ρυθμών ταλάντωσης (step-index multimode fiber). Η διάμετρος του πυρήνα αυτής της ίνας ήταν 560μm. Η άλλη άκρη της ίνας βρισκόταν σε επαφή με το δείγμα.

Ο φθορισμός συλλεγόταν από την ίδια ίνα και περνούσε ξανά από το διχροϊκό καθρέπτη χωρίς να επηρεάζεται έντονα, αφού εντοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το μήκος κύματος διέγερσης. Ο φθορισμός εστιαζόταν στη σχισμή εισόδου (άνοιγμα 100μm) του φασματογράφου (0.10m). Ο φασματογράφος περιείχε ένα ολογραφικό φράγμα περίθλασης (450 groove mm⁻¹ holographic grating). Η λήψη των δεδομένων και η ανάλυση τους πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια ενός οπτικού πολυκαναλικού αναλυτή (Ο.Π.Α.) που είχε ως ανιχνευτικό σύστημα μία συστοιχία φωτοδιόδων (diode array detector, Biospec). Το συλλεγόμενο σήμα κατευθυνόταν σε ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή (Pentium) για τη μετατροπή του

από αναλογικό σε ψηφιακό (A/D conversion) και για την περαιτέρω επεξεργασία του.

Η βαθμονόμηση των μηκών κύματος πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια μιάς λάμπας υδραργύρου. Μπροστά από την είσοδο του φασματογράφου τοποθετήθηκε ένα φίλτρο αποκλεισμού των μικρών μηκών κύματος (Φ.Χ.Α., Schott CG 490nm) με σκοπό να απομονώσει το συλλεγόμενο φθορισμό από την ανακλώμενη από την επιφάνεια του δείγματος ακτινοβολία του λέιζερ.

Το ανιχνευτικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε (φασματογράφος, συστοιχία φωτοδιόδων, οπτική ίνα) δεν μας παρείχε ομοιόμορφη φασματική απόκριση. Αυτό ωστόσο δεν επηρεάζει καθόλου την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μας από τη χρήση αλγορίθμων, καθώς όλα αυτά βασίστηκαν σε σχετικές εντάσεις. Τα φάσματα που πάρθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αναπαριστούν το χρονικά ολοκληρωμένο φθορισμό του εκτιθέμενου δείγματος. Τέλος ο οπτικός πολυκαναλικός αναλυτής λειτουργούσε σε ελεύθερη σάρωση (free scanning mode).

Δείγματα

Μελετήθηκαν δείγματα από εικοσιέξι (26) ασθενείς (21 άντρες και 5 γυναίκες). Το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου χρησιμοποιήθηκε ως πηγή διέγερσης σε 18 περιπτώσεις. Ακτινοβολήθηκαν τρεις κοιλιακές αρτές, τρεις λαγόνιες, δέκα μηριαίες, και δύο ιγνυακές αρτηρίες. Όλα τα δείγματα προήλθαν από εγχειρήσεις by-pass ή ακρωτηριασμούς που έγιναν στην Αγγειοχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Το λέιζερ ιόντων Αργού χρησιμοποιήθηκε σε οκτώ ασθενείς (σε δύο περιπτώσεις by-pass, και σε έξι ακρωτηριασμούς). Ακτινοβολήθηκαν τέσσερις ιγνυακές, τρεις κνημιαίες, τρεις περνιαίες, και μια μηριαία αρτηρία.

Όλα τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν περίπου μία ώρα μετά την εκτομή τους. Τα αγγεία ανοίχτηκαν κατά μήκος με σκοπό να εκτεθεί στην ακτινοβολία του λέιζερ, η εσωτερική τους επιφάνεια. Μετά τη μακροσκοπική εξέταση από τους γιατρούς, μερικά από τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως φυσιολογικά και τα υπόλοιπα με διάφορους βαθμούς αθηροσκλήρωσης (ινώδη πλάκα,

ασβεστοποιημένη πλάκα, ανεύρυσμα). Σε κάποια από τα δείγματα συνυπήρχαν ινώδη και ασβεστοποιημένη πλάκα.

Τα δείγματα καθαρίστηκαν και ξεπλύθηκαν με φυσιολογικό ορό. Κατά την διάρκεια της ακτινοβόλησης τους τοποθετήθηκαν σε μία γάζα ποτισμένη με φυσιολογικό ορό με σκοπό να διατηρήσουν την υγρασία τους. Μετά το τέλος του κάθε πειράματος τα δείγματα συντηρούνταν σε φορμόλη (10%) ή σε υγρό άζωτο. Ακτινοβολούνταν ξανά μετά από εικοσιτέσσερις (24) και σαρανταοχτώ (48) ώρες. Όσον αφορά στα παγωμένα δείγματα (αυτά που συντηρούνταν σε υγρό άζωτο), πριν την ακτινοβόληση τους αφήνονταν να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Καταγραφή του φθορισμού

Η καταγραφή του θορύβου (background) πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης του λέιζερ σε φυσιολογικό ορό. Το σήμα που συλλέχτηκε θεωρήθηκε ως ο φθορισμός από την οπτική ίνα, το φυσιολογικό ορό και τις υπόλοιπες πηγές θορύβου (τα φώτα από τον περιβάλλοντα χώρο, τη γάζα πάνω στην οποία ήταν τοποθετημένος ο ιστός). Αυτό το φάσμα θορύβου (background spectrum) αφαιρούνταν αυτομάτως από κάθε φάσμα που καταγραφόταν από τα δείγματα. Για κάθε μία σειρά μετρήσεων και ένα νέο φάσμα θορύβου συλλεγόταν και αφαιρούνταν αυτομάτως. Με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε η απόκτηση φασμάτων φθορισμού από τα δείγματα, απαλλαγμένα από το θόρυβο.

Δημιουργία αλγεβρικών αλγορίθμων

Η διέγερση των ιστών επιτεύχθηκε με τη χρήση δύο λέιζερ, με διαφορετικά μήκη κύματος (ανάλογα την περίπτωση). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί διχροϊκοί καθρέπτες για την καθοδήγηση των δεσμών (99% στις 45⁰ στα 441.6nm, για το Ήλιο-Κάδμιο, 99% στις 45⁰ στα 457-528nm για το Αργό). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να ληφθούν υπόψη διαφορετικές φασματικές περιοχές για την δημιουργία των αλγορίθμων [1,2].

Κάθε φάσμα που καταγράφηκε με το Ήλιο-Κάδμιο ως πηγή διέγερσης, αναλύθηκε με τον ακόλουθο τρόπο: υπολογίστηκαν οι μέσες εντάσεις των

φασματικών περιοχών 534-538nm (PE 1), 542-546nm (VA 1), 548-552nm (PE 2), 577-581nm (VA 2), 591-595nm (PE 3), 608-612nm (VA 3), και 663-667nm (PE 4).

Αυτές οι φασματικές περιοχές αντιστοιχούν σε "κορυφές" (peaks) και σε "κοιλιάδες" (valleys) των φασμάτων φθορισμού των ιστών. Αυτές οι "κορυφές" και οι "κοιλιάδες" σχετίζονται με την παρουσία (ή την απουσία) κάποιων χρωμοφόρων του ιστού. Σημαντικό ρόλο στη δημιουργία τους παίζει ακόμη και η επαναπορρόφηση του φθορισμού από την αιμοσφαιρίνη. Επιπλέον, η απόκριση της ανιχνευτικής διάταξης (κυρίως οι διχροϊκοί καθρέπτες) θεωρείται υπεύθυνη για το σχηματισμό κάποιων τεχνητών "κορυφών" και "κοιλιάδων". Όλα αυτά βέβαια θα αναλυθούν λεπτομερειακά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των αποτελεσμάτων (στις επόμενες σελίδες).

Με τη χρησιμοποίηση όλων αυτών των παραμέτρων, δημιουργήθηκαν δώδεκα (12) διαφορετικοί, απλοί, αλγεβρικοί αλγόριθμοι. Αυτοί οι δώδεκα αλγόριθμοι σχετίζονται με το συλλεγόμενο φάσμα. Για κάθε δείγμα καταγράφονταν τρία ή τέσσερα φάσματα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας πειραματικής τυπικής απόκλισης (standard experimental deviation) στην εφαρμογή των αλγόριθμων (γύρω από τη μέση τιμή τους). Όλοι οι αλγόριθμοι (και οι δώδεκα) βασίζονται στη σύγκριση των προαναφερόμενων φασματικών περιοχών. Οι αλγόριθμοι παρουσιάζονται στο πίνακα 3-1:

$A1=PE1-PE2/ VA1$	$A7=PE3 / PE4$
$A2=PE1-PE2/ VA2$	$A8=PE2 / PE4$
$A3=PE3-PE4/ VA3$	$A9=PE1-PE3 / VA2$
$A4=PE1/ PE2$	$A10=PE2-PE4/ VA3$
$A5=PE1/ PE3$	$A11=(PE1-VA1) / (PE2 -VA2)$
$A6=PE2 / PE3$	$A12=(PE2-VA2) / (PE3-VA3)$

Πιν 3-1 Οι 12 αλγόριθμοι (με πηγή διέγερσης το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου).

Η ίδια στρατηγική ανάλυσης των δεδομένων εφαρμόστηκε και στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού ως πηγή διέγερσης. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση οι ανάλογες φασματικές περιοχές (που αντιστοιχούν σε "κορυφές" και "κοιλιάδες") είναι διαφορετικές. Επομένως,

δημιουργήθηκαν διαφορετικοί αλγόριθμοι. Οι μέσες εντάσεις από τις ακόλουθες φασματικές περιοχές υπολογίστηκαν: 572-576nm (PE 1), 588-592nm (VA 1), 604-608nm (PE 2), 615-619nm (VA 2), 708-712nm (PE 3). Οι δώδεκα αλγόριθμοι παρουσιάζονται στον πίνακα 3-2:

$A1=PE1-PE2/ VA1$	$A7= PE2-PE3/ VA1$
$A2=PE1-PE2/ VA2$	$A8= PE1-PE3/ VA2$
$A3= PE1/ PE2$	$A9= PE2-PE3/ VA2$
$A4= PE1/ PE3$	$A10=(PE1-VA1) / (PE2 -VA2)$
$A5= PE2 / PE3$	$A11=(PE2-VA2) / (PE3-VA1)$
$A6= PE1-PE3/ VA1$	$A12=(PE1-VA1) / (PE3-VA2)$

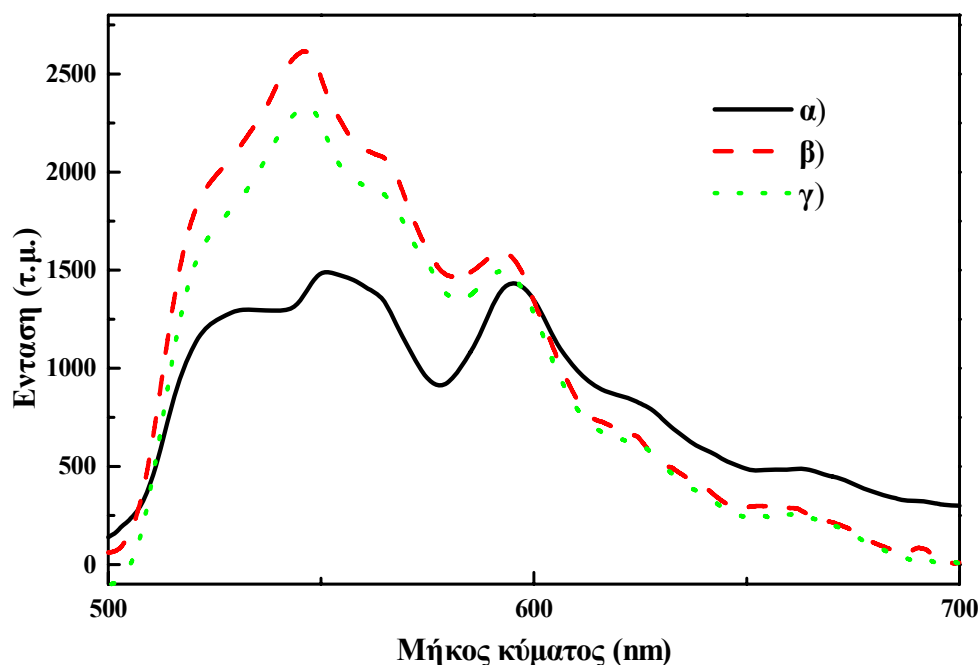
Πιν 3-2 Οι 12 αλγόριθμοι (με πηγή διέγερσης το λέιζερ ιόντων Αργού).

3.3

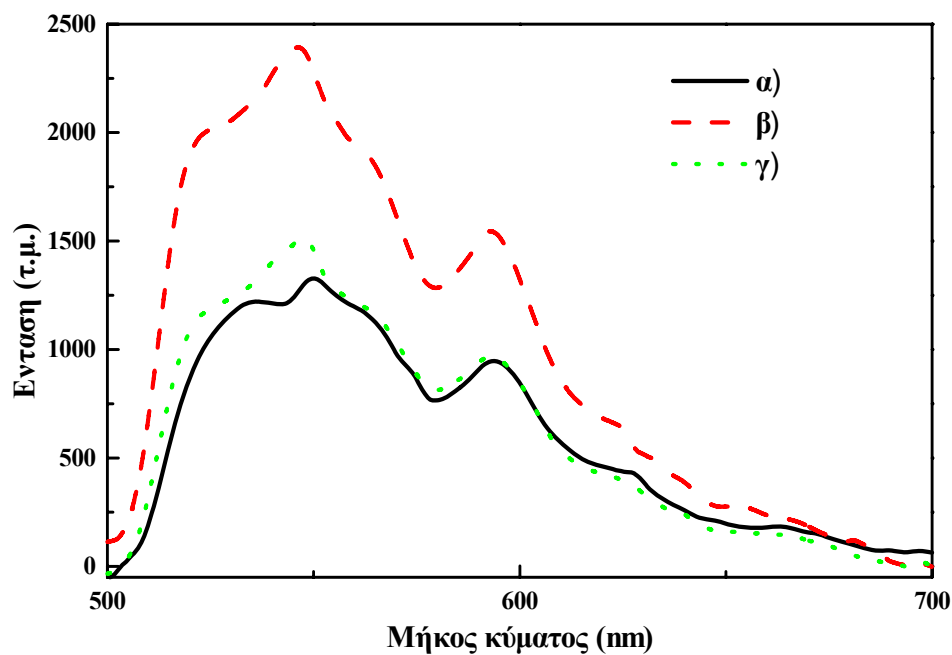
Αποτελέσματα

Σε όλες τις *in vitro* μελέτες που είχαν γίνει μέχρι σήμερα δεν είχε ληφθεί καθόλου υπόψη ο ρόλος της συντήρησης και η τυχόν επίδραση της στη μορφολογία των συλλεγομένων σημάτων. Παρ' όλα αυτά, οι περισσότερες φασματοσκοπικές μελέτες τέτοιου είδους είχαν πραγματοποιηθεί μετά από συντήρηση των δειγμάτων για κάποιο χρονικό διάστημα είτε σε φορμόλη, είτε σε υγρό άζωτο. Τα δύο τελευταία αποτελούν τα πιο διαδεδομένα μέσα συντήρησης δειγμάτων ιστών και γι' αυτό το λόγο άλλωστε χρησιμοποιήθηκαν και στη παρούσα έρευνα. Επιπλέον, στην έως τώρα βιβλιογραφία, δεν υπήρχε κάποια εκτενής και συστηματική έρευνα για την επίδραση της συντήρησης. Όλα αυτά τα στοιχεία μας οδήγησαν στη πραγματοποίηση μιάς εκτεταμένης μελέτης για τις τυχόν επιδράσεις της συντήρησης στο φάσμα φθορισμού των ιστών (περιφερειακά αγγεία) [3,4]. Έγινε προσπάθεια να ανιχνευτούν διαφορές στα φάσματα φθορισμού των νωπών ιστών σε σχέση με αυτά που καταγράφηκαν μετά από συντήρηση για 24 και 48 ώρες. Για το λόγο αυτό ακτινοβολήθηκαν ιστοί μία ώρα μετά την εκτομή τους και ύστερα από συντήρηση για 24 και 48 ώρες σε φορμόλη ή υγρό άζωτο.

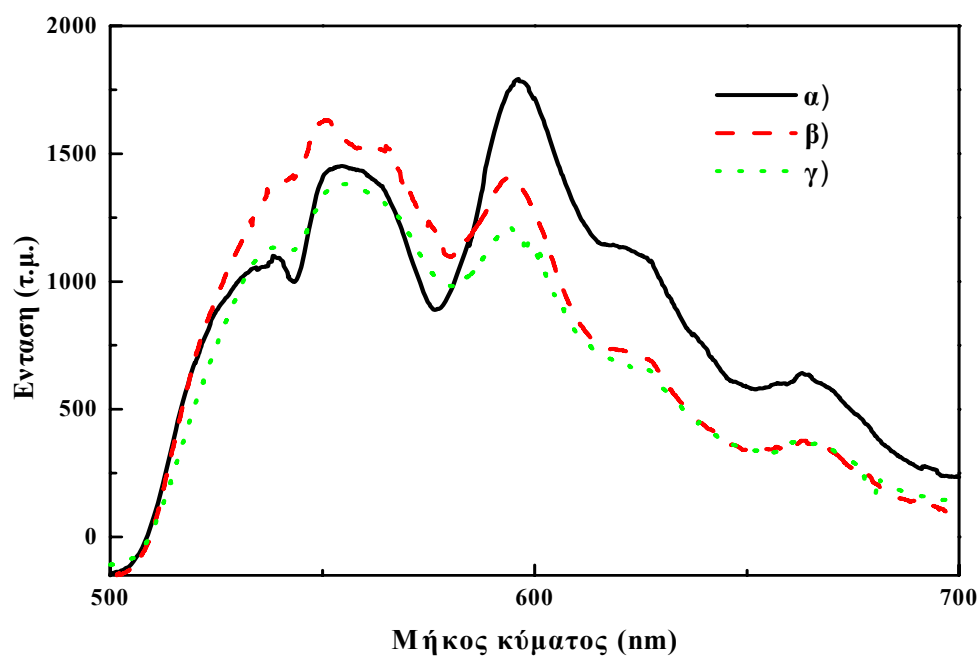
Τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε φορμόλη φαίνεται να παρουσιάζουν περισσότερες και πιο εμφανής αλλαγές στην φασματική τους κατανομή συγκριτικά με αυτά που τοποθετήθηκαν για συντήρηση σε υγρό άζωτο. Στα τέσσερα διαγράμματα που ακολουθούν εκτίθενται τα φάσματα φθορισμού περιφερειακών αγγείων. Τα φάσματα αυτά καταγράφηκαν όταν τα δείγματα ήταν νωπά (μία ώρα από την εκτομή τους) και μετά τη συντήρησή τους για 24 και 48 ώρες σε υγρό άζωτο ή φορμόλη. Ως πηγή διέγερσης, σε όλες αυτές τις περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (He-Cd) με γραμμή



Σχ. 3-2 Φάσματα φθορισμού από ασβεστοποιημένη πλάκα (από μηριαία αρτηρία) : α) νωπό β) και γ) μετά από συντήρηση σε φορμόλη για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. εκμομπής στα 442nm (μπλέ).



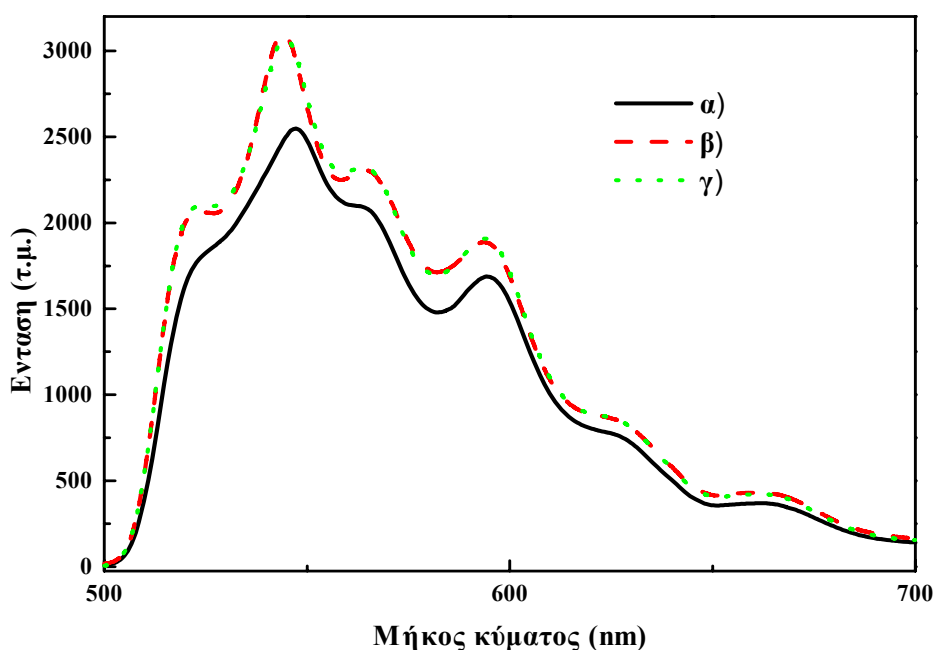
Σχ. 3-4 Φάσματα φθορισμού από ινώδη πλάκα (από μηριαία αρτηρία) : α) νωπό β) και γ) μετά από συντήρηση σε υγρό άζωτο για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα.



Σχ. 3-3 Φάσματα φθορισμού από τοίχωμα ανευρύσματος κοιλιακής αορτής: α) νωπό β) και γ) μετά από συντήρηση σε φορμόλη για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα.

Από τα σχήματα 3-2, 3-3 (συντήρηση σε φορμόλη) φαίνεται καθαρά μία σημαντική αλλαγή στη σχετική ένταση των φασμάτων φθορισμού στην περιοχή των 600nm καθώς και σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Αυτή η αλλαγή συμβαίνει τις πρώτες 24 ώρες. Κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε στα φάσματα φθορισμού που καταγράφηκαν μετά από συντήρηση σε υγρό άζωτο (σχήματα 3-4, 3-5). Σημαντικές αλλαγές στην φασματική κατανομή μεταξύ 24 και 48 ωρών δεν παρατηρούνται τόσο για συντήρηση σε φορμόλη όσο και για υγρό άζωτο.

Επιπλέον, κατά την ακτινοβολήση των δειγμάτων με το λέιζερ ιόντων Αργού (Ar^+) εξήχθησαν κάποια επιπρόσθετα συμπεράσματα. Οι φασματικές διαφορές των ιστών, όταν ήταν νωποί και μετά την συντήρηση τους για 24 ώρες σε φορμόλη, είναι εμφανείς. Οι διαφορές είναι περισσότερες συγκριτικά με αυτές που παρατηρήθηκαν κατά την διάρκεια ακτινοβολήσης παρόμοιων δειγμάτων με το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου. Όλες οι μεταβολές στην κατανομή

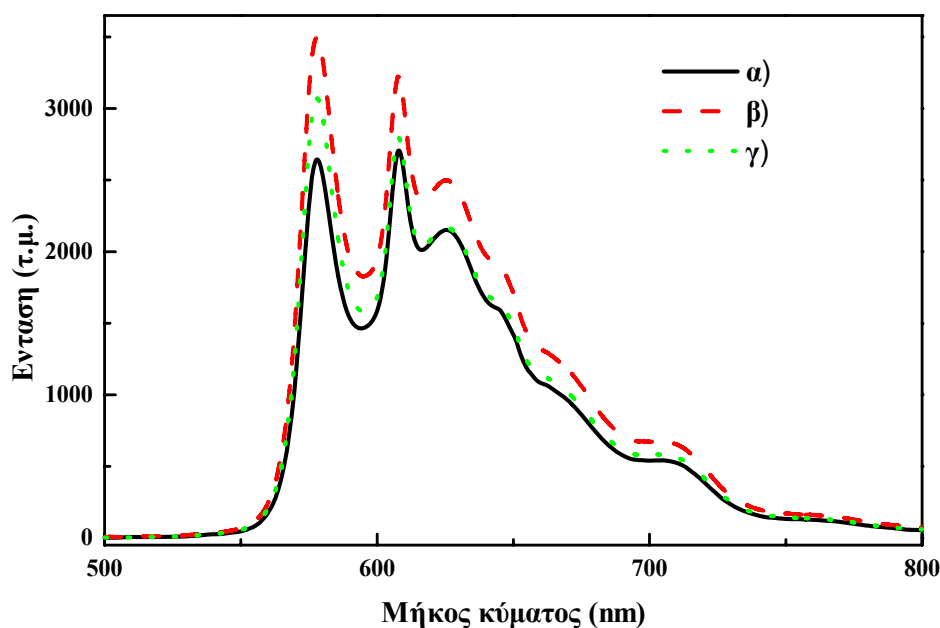


Σχ. 3-5 Φάσματα φθορισμού από ινώδη πλάκα (από ιγνυακή αρτηρία) : α) νωπό β) και γ) μετά από συντήρηση σε υγρό άζωτο για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα.

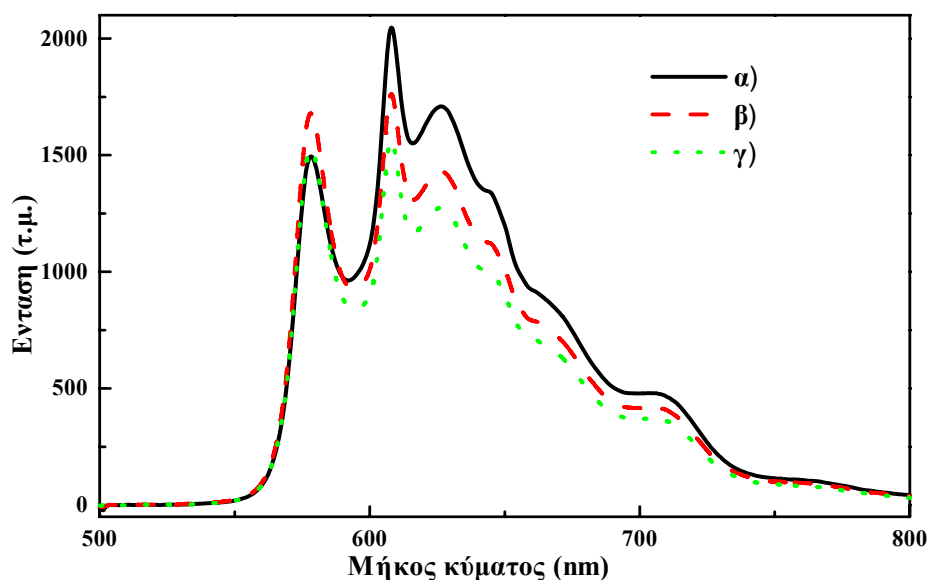
των φασμάτων φθορισμού λαμβάνουν χώρα το πρώτο εικοσιτετράωρο. Μεταξύ 24 και 48 ωρών τα καταγραφόμενα σήματα παρουσιάζουν μικρές

αλλαγές. Η επίδραση στα φάσματα φθορισμού των ιστών είναι σαφώς περιορισμένη για την περίπτωση της συντήρησης σε υγρό άζωτο.

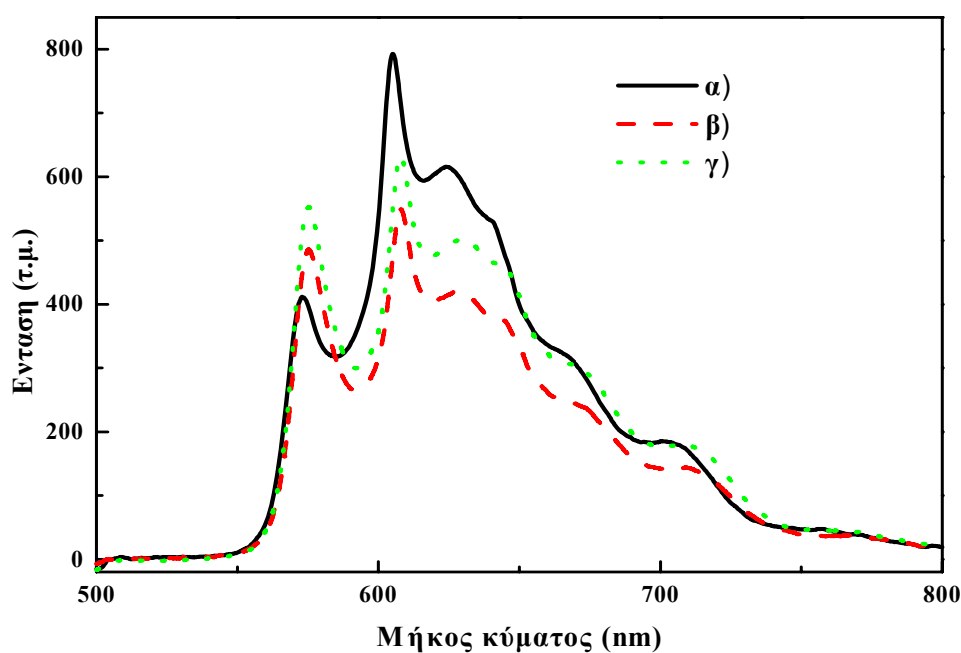
Η ακτινοβολήση των δειγμάτων με δύο διαφορετικά μήκη κύματος από το λέιζερ ιόντων Αργού οδήγησε σε σημαντικές διαφορές στα συλλεγόμενα φάσματα φθορισμού. Αυτές οι αλλαγές εντοπίζονται στις μέσες σχετικές εντάσεις της "κορυφής" στα 575nm (PE 1 572-576nm). Η ένταση αυτής της "κορυφής" εξαρτάται από το μήκος κύματος που χρησιμοποιήθηκε για διέγερση. Όλα αυτά παρουσιάζονται αναλυτικά στα τέσσερα διαγράμματα που ακολουθούν. Σε αυτά εκτίθενται τα φάσματα φθορισμού περιφερειακών αγγείων, όταν ήταν νωπά και μετά τη συντήρηση τους για 24 και 48 ώρες σε φορμόλη ή σε υγρό άζωτο. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού με διάφορες γραμμές εκπομπής 457.9, 476.5, 488, 496.5, 501.7nm (μπλέ-πράσινο).



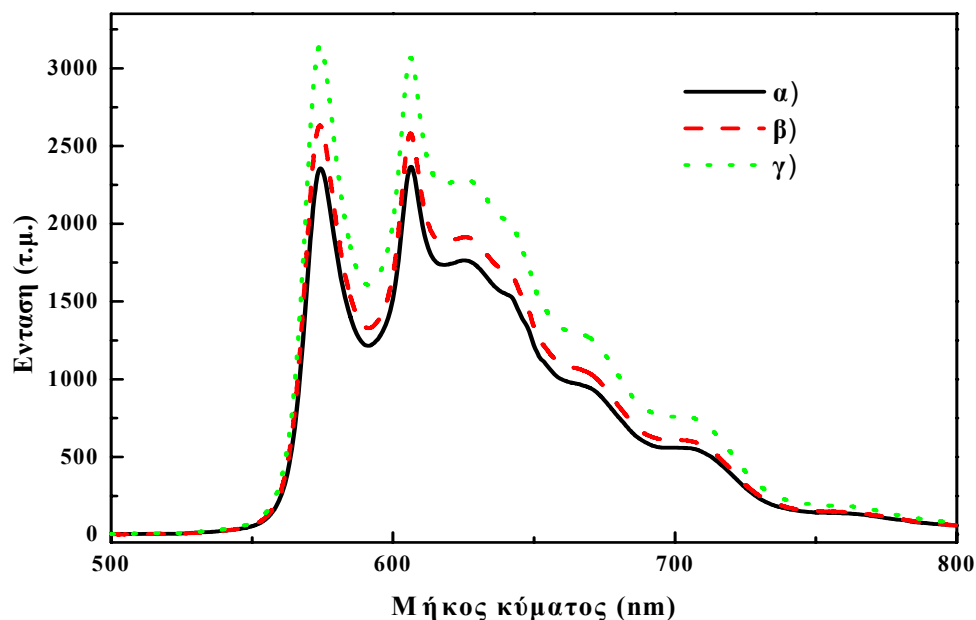
Σχ. 3-6 Φάσματα φθορισμού από ινώδη πλάκα (από ιγννακή αρτηρία) : α) νωπό β) και γ) μετά από συντήρηση σε φορμόλη για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε η γραμμή εκπομπής 457.9nm του λέιζερ ιόντων Αργού.



Σχ. 3-7 Φάσματα φθορισμού από την ίδια ινώδη πλάκα όπως στο σχήμα 3-6 (από ιγννακή αρτηρία) : α) νωπό β) και γ) μετά από συντήρηση σε φορμόλη για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε αυτή την φορά η γραμμή εκπομπής 501.7nm του λέιζερ ιόντων Αργού.



Σχ. 3-8 Φάσματα φθορισμού από φυσιολογικό δείγμα (από ιγννακή αρτηρία) : α) νωπό β) και γ) μετά από συντήρηση σε φορμόλη για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε η γραμμή εκπομπής 501.7nm του λέιζερ ιόντων Αργού.

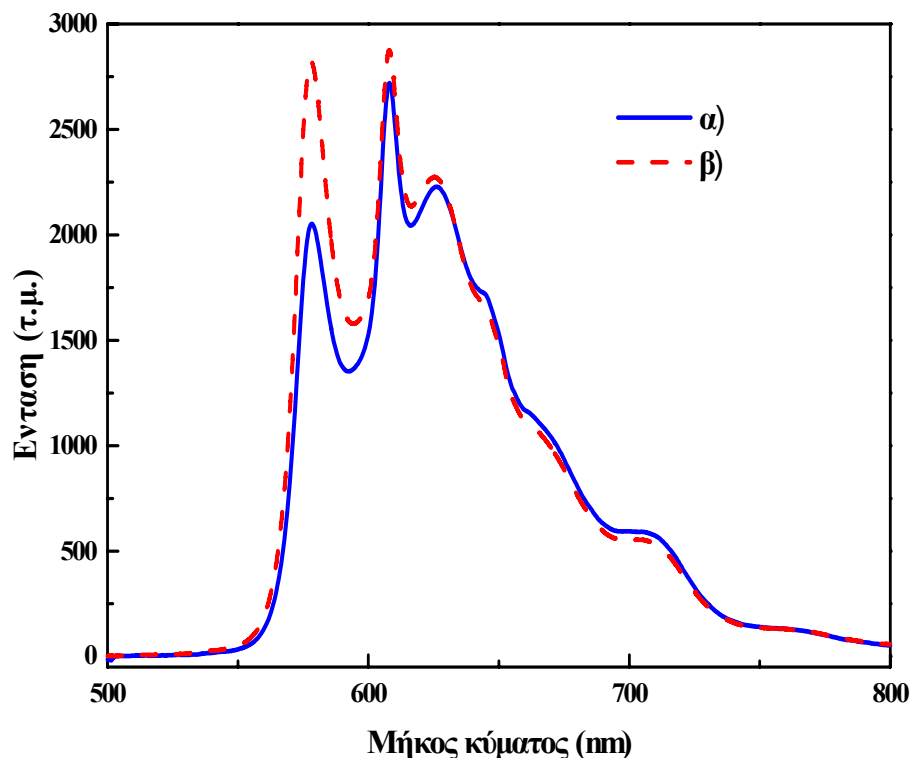


Σχ. 3-9 Φάσματα φθορισμού από ασβεστοποιημένη πλάκα (από ιγννακή αρτηρία) : α) νωπό β) και γ) μετά από συντήρηση σε υγρό άζωτο για 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε η γραμμή εκπομπής 476.5nm του λέιζερ ιόντων Αργού.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η φασματική κατανομή του φθορισμού των ιστών που ακτινοβολήθηκαν με το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου διαφέρει αρκετά συγκριτικά με αυτή των ιστών που διεγέρθηκαν με το λέιζερ ιόντων Αργού. Η εξήγηση για αυτή την διαφοροποίηση αποδίδεται εν μέρει στο γεγονός ότι, με τη χρησιμοποίηση διαφορετικών μηκών κύματος για ακτινοβολήση, επιτυγχάνεται η διέγερση κάθε φορά και διαφορετικών χρωμοφώρων του ιστού. Όμως σημαντικότερο ρόλο σε αυτή την διαφοροποίηση παίζουν και οι διχροϊκοί καθρέπτες που χρησιμοποιήθηκαν. Όπως εξηγήθηκε και προηγούμενα (πειραματική διάταξη) ο φθορισμός πριν την καταγραφή του στο ανιχνευτικό σύστημα περνάει ξανά από το διχροϊκό καθρέπτη. Στη περίπτωση του Ηλίου-Καδμίου χρησιμοποιήθηκε ένας διχροϊκός καθρέπτης με ανακλαστικότητα 99% στα 441.6nm υπό γωνία πρόσπτωσης 45 μοιρών, ενώ για το λέιζερ ιόντων Αργού χρησιμοποιήθηκε ένας διχροϊκός καθρέπτης με ανακλαστικότητα 99% στα μήκη κύματος 457-528nm υπό γωνία πρόσπτωσης 45 μοιρών. Η διαφορετική διαπερατότητα και απόκριση αυτών των καθρεπτών είναι βέβαιο ότι επηρεάζει το συλλεγόμενο σήμα. Ελέγχθηκε και διαπιστώθηκε πειραματικά ότι, ο διχροϊκός καθρέπτης που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση των ιστών με το λέιζερ ιόντων Αργού, είναι υπεύθυνος για τη μετατόπιση του φάσματος σε μεγαλύτερα μήκη κύματος και για τις πιο οξείες "κορυφές" που παρατηρούνται στο καταγραφόμενο φάσμα. **Οι "κοιλιάδες" που εμφανίζονται στα φάσματα φθορισμού στα 545nm και στα 580nm για το Ήλιο-Κάδμιο και στα 590nm για το Αργό οφείλονται τόσο στην επαναπορρόφηση του φθορισμού από την αιμοσφαιρίνη όσο και στην απόκριση των διχροϊκών καθρεπτών. Πρέπει να τονιστεί όμως ότι, όλα τα αποτελέσματα που εξήχθησαν βασίστηκαν στις σχετικές εντάσεις των φασμάτων φθορισμού. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίστηκε η εγκυρότητα και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Τέλος έγιναν συγκρίσεις μόνο μεταξύ φασμάτων που καταγράφηκαν κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες (ίδιοι διχροϊκοί καθρέπτες, ίδιο μήκος κύματος διέγερσης).**

Παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στην φασματική κατανομή του καταγραφόμενου φθορισμού κατά την ακτινοβόληση των δειγμάτων με το λέιζερ ιόντων Αργού και με τη χρήση δύο διαφορετικών μηκών κύματος. Αυτές οι διαφοροποιήσεις παρουσιάζονται στο επόμενο διάγραμμα (σχήμα 3-10):



Σχ. 3-10 Φάσματα φθορισμού από ινώδη πλάκα (από μηριαία αρτηρία) α) χρησιμοποιώντας ως πηγή διέγερσης τη γραμμή 501.7nm του λέιζερ ιόντων Αργού, β) χρησιμοποιώντας ως πηγή διέγερσης τη γραμμή 457.9nm του ίδιου λέιζερ.

Είναι γνωστό ότι το μέγιστο απορρόφησης για τις φλαβίνες είναι γύρω στα 450nm, ενώ αποδίδουν φθορισμό στα 550nm. Με τη χρησιμοποίηση της γραμμής 457.9nm του λέιζερ ιόντων Αργού επιτυγχάνεται η καλύτερη διέγερση των φλαβινών. Πηγαίνοντας σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (488nm, 496.5nm, 501.7nm) έχουμε όλο και μικρότερη διέγερση των φλαβινών, αφού απομακρυνόμαστε από το μέγιστο απορρόφησης τους. Η "κορυφή" του συλλεγόμενου φάσματος στα 575nm (σχήμα 3-10) οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στη συνεισφορά από το φθορισμό των φλαβινών. Οι

φλαβίνες έχουν μέγιστο εκπομπής στα 550nm, αλλά στη περίπτωση μας πρέπει να ληφθεί υπόψη και η μετατόπιση του καταγραφόμενου φάσματος σε μεγαλύτερα μήκη κύματος λόγω του διχροϊκού καθρέπτη (99% στις 45⁰ στα 457-528nm). Επομένως, είναι λογικό η ένταση της "κορυφής" στα 575nm να εξαρτάται έντονα από το μήκος κύματος που χρησιμοποιήθηκε για διέγερση. Όπως φαίνεται και από το σχήμα 3-10 η ένταση αυτής της "κορυφής" είναι μεγαλύτερη για ακτινοβολήση με τη γραμμή 457.9nm (καλύτερη διέγερση φλαβινών), από ότι με τη γραμμή 501.7nm (απομάκρυνση από το μέγιστο απορρόφησης των φλαβινών).

Η επαναπορρόφηση του φθορισμού από την αιμοσφαιρίνη προκαλεί μιά παραμόρφωση στο συλλεγόμενο σήμα. Η οξυ-αιμοσφαιρίνη παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 540 και 575nm, ενώ η διοξυ-αιμοσφαιρίνη στα 555nm. Εξαιτίας αυτής της απορρόφησης αναμένονται κάποιες αλλαγές σε αυτές τις περιοχές στα καταγραφόμενα φάσματα. Στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν με το Ήλιο-Κάδμιο οι "κοιλιάδες" στις περιοχές 542-546nm (VA 1 μικρή "κοιλιάδα") και στα 577-581nm (VA 2) αναπαριστούν αυτές τις κορυφές απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης. Όσον αφορά το λέιζερ ιόντων Αργού αυτές οι κορυφές απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης αντιστοιχούν στην "κοιλιάδα" στη περιοχή μεταξύ 588-592nm (VA 1). Βέβαια, εκτός από την αιμοσφαιρίνη για την δημιουργία αυτών των "κοιλιάδων" σημαντικό ρόλο παίζουν και οι διχροϊκοί καθρέπτες. Επιπλέον, η απορρόφηση του φθορισμού από την αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη (μαζί με τις φλαβίνες) για την εξάρτηση της έντασης της "κορυφής" στη φασματική περιοχή 572-576nm (PE 1) από τα διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης (για το λέιζερ ιόντων Αργού).

Τα αθηροσκληρωτικά δείγματα, όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα, απορροφούν λιγότερη αιμοσφαιρίνη συγκριτικά με τα φυσιολογικά μεταθανάτια (post-mortem) αορτικά δείγματα. Επιπρόσθετα, σε *ex-vivo* (περιορισμένη αιμοσφαιρίνη) και σε *in-vitro* (διάχυση της αιμοσφαιρίνης) συνθήκες, έχουν παρατηρηθεί ίδια φασματικά χαρακτηριστικά. Όλα αυτά καταδεικνύουν ότι η φασματική παραμόρφωση εξαιτίας της αιμοσφαιρίνης είναι περιορισμένη για τα δείγματα ιστών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την έρευνα. Επιπλέον, κατά τη συντήρηση των ιστών σε φορμόλη για 24 και 48 ώρες αναμένεται περαιτέρω μείωση της

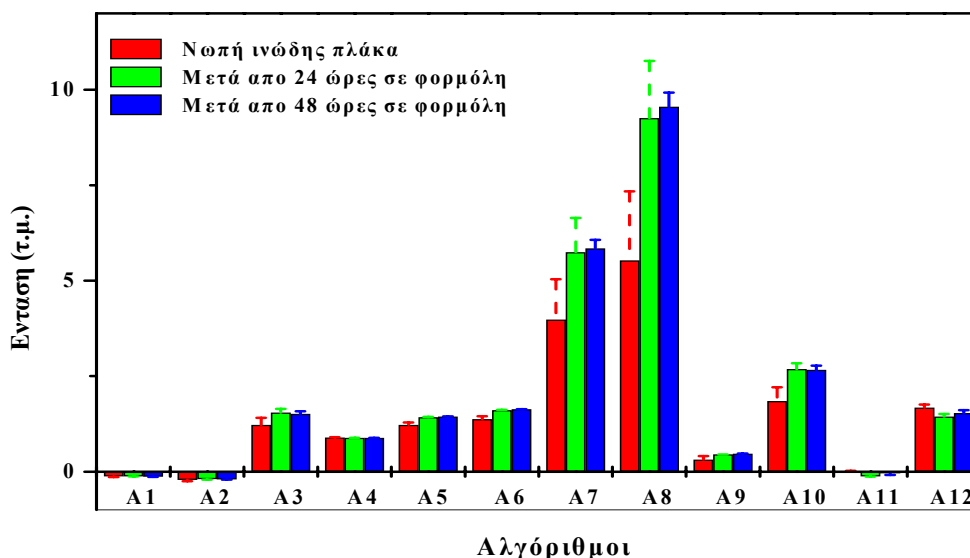
επίδρασης της αιμοσφαιρίνης. Τέλος, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η διέγερση και η συλλογή του φθορισμού μέσω της ίδιας ίνας μειώνει και άλλο την επίδραση της αιμοσφαιρίνης στα συλλεγόμενα φάσματα. Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα (περιγραφή πειραματικής διάταξης), στη παρούσα έρευνα η συλλογή του φθορισμού έγινε μέσω της ίνας που προκαλούσε τη διέγερση, άρα ο ρόλος της αιμοσφαιρίνης αναμένεται να μειωθεί ακόμη περισσότερο.

Εφαρμογή των αλγόριθμων

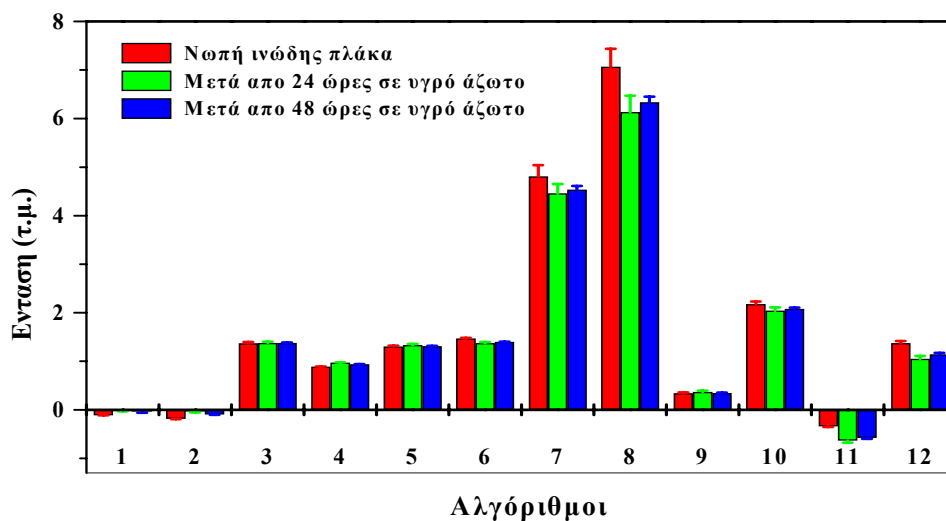
Ο στόχος αυτής της μελέτης είναι να καταγράψει τις διαφορές στα σήματα φθορισμού από δείγματα ιστών μετά την συντήρηση τους για 24 και 48 ώρες σε φορμόλη ή υγρό άζωτο. Η προσπάθεια ανίχνευσης των διαφορών έγινε με τη χρησιμοποίηση δώδεκα απλών αλγεβρικών αλγόριθμων. Αυτοί οι αλγόριθμοι βασίζονται στη σύγκριση φασματικών περιοχών ("κοιλιάδων" και "κορυφών" του συλλεγόμενου φθορισμού). Έχουμε να κάνουμε δηλαδή με σχετικές εντάσεις. Οι φασματικές περιοχές που επιλέχτηκαν και οι αλγόριθμοι που κατασκευάστηκαν έχουν άμεση εξάρτηση και από το λέιζερ που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή διέγερσης. Οι αλγόριθμοι που δημιουργήθηκαν για την ακτινοβολία με το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου και αυτοί για το λέιζερ ιόντων Αργού παρουσιάστηκαν αναλυτικά προηγούμενα (Δημιουργία αλγεβρικών αλγορίθμων).

Στα διαγράμματα που ακολουθούν εμφανίζεται η εφαρμογή των δώδεκα αλγεβρικών αλγορίθμων στα φάσματα φθορισμού. Τα φάσματα αυτά καταγράφηκαν όταν τα δείγματα ήταν νωπά και μετά την συντήρηση τους για 24 και 48 ώρες σε φορμόλη ή υγρό άζωτο. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές καθώς και οι τυπικές πειραματικές αποκλίσεις των αλγόριθμων.

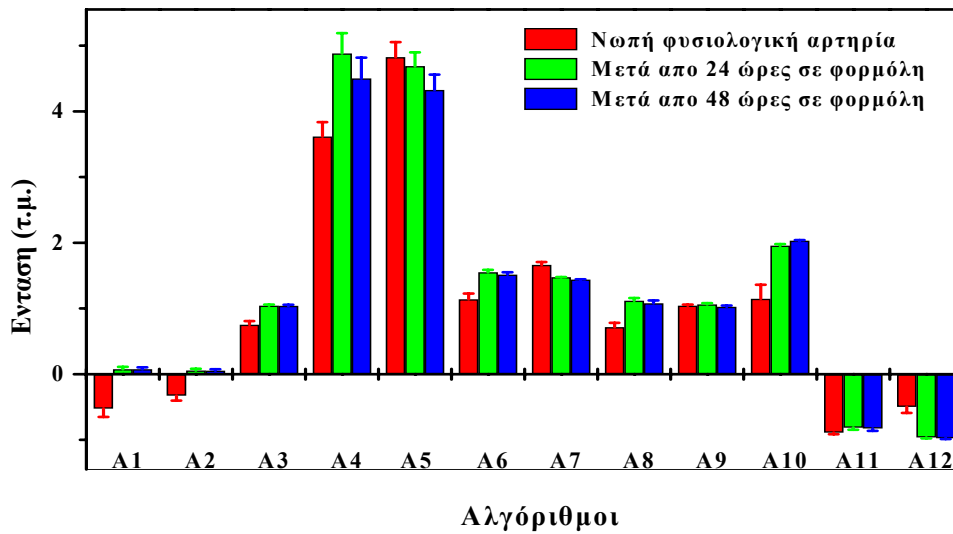
Στα σχήματα 3-11, 3-12 ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm). Οι δώδεκα αλγόριθμοι είναι αυτοί του πίνακα 3-1. Στα σχήματα 3-13, 3-14 ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού (με γραμμή εκπομπής στα 476.5nm). Σε αυτή την περίπτωση οι δώδεκα αλγόριθμοι προέρχονται από τον πίνακα 3-2.



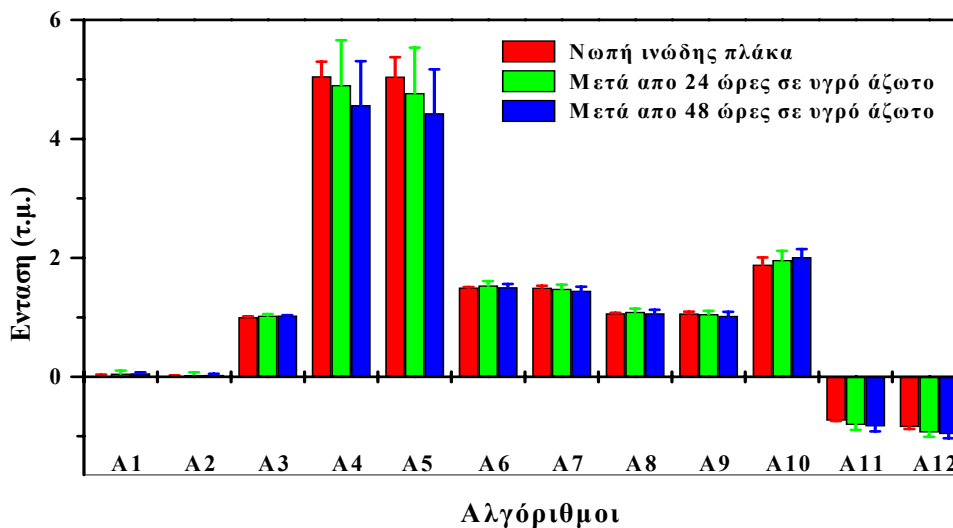
Σχ. 3-11 Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των 12 αλγορίθμων (για ινώδη πλάκα) που αντιστοιχούν σε μετρήσεις που πάρθηκαν αμέσως μετά την εκτομή και ύστερα από συντήρηση για 24 και 48 ώρες σε φορμόλη. Το Ήλιο-Κάδμιο χρησιμοποιήθηκε ως πηγή διέγερσης (442nm).



Σχ. 3-12 Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των 12 αλγορίθμων (για ινώδη πλάκα) που αντιστοιχούν σε μετρήσεις που πάρθηκαν αμέσως μετά την εκτομή και ύστερα από συντήρηση για 24 και 48 ώρες σε υγρό άζωτο. Το Ήλιο-Κάδμιο χρησιμοποιήθηκε ως πηγή διέγερσης (442nm).



Σχ. 3-13 Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των 12 αλγορίθμων (για φυσιολογική αρτηρία) που αντιστοιχούν σε μετρήσεις που πάρθηκαν αμέσως μετά την εκτομή και ύστερα από συντήρηση για 24 και 48 ώρες σε φορμόλη. Το λέιζερ ιόντων Αργού χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση (με γραμμή εκπομπής στα 476.5nm).



Σχ. 3-14 Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των 12 αλγορίθμων (για ινώδη πλάκα) που αντιστοιχούν σε μετρήσεις που πάρθηκαν αμέσως μετά την εκτομή και ύστερα από συντήρηση για 24 και 48 ώρες σε υγρό άζωτο. Το λέιζερ ιόντων Αργού χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση (με γραμμή εκπομπής στα 476.5nm).

Για τα φάσματα φθορισμού που καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας ως πηγή διέγερσης το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου μερικοί από τους δώδεκα αλγόριθμους κατάφεραν να ανιχνεύσουν φασματικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων όταν ήταν νωπά και μετά την συντήρησή τους. Αυτό ισχύει τόσο για συντήρηση σε φορμόλη όσο και για υγρό άζωτο. Πρέπει όμως να τονιστεί ότι οι διαφορές στην περίπτωση της φορμόλης ήταν πιο έντονες. Ενώ κάποιοι από τους αλγόριθμους κατάφεραν να διαχωρίσουν τα περισσότερα δείγματα για το πρώτο εικοσιτετράωρο συντήρησης (σε φορμόλη ή υγρό άζωτο), όλοι τους εμφανίζουν πολύ μικρά ποσοστά επιτυχίας για το χρονικό διάστημα μεταξύ 24 και 48 ωρών. Τέλος, καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για ινώδη πλάκα σε σχέση με την ασβεστοποιημένη.

Όπως φαίνεται και από τα σχήματα 3-11, 3-12 οι αλγόριθμοι που επέτυχαν καλύτερα αποτελέσματα στη διάκριση είναι οι : A3, A6, A7, A8, A10, A11 και A12 (τόσο για φορμόλη όσο και για υγρό άζωτο). Αυτοί οι αλγόριθμοι περιέχουν κυρίως πληροφορίες που σχετίζονται με τη κόκκινη περιοχή του φάσματος φθορισμού (πέρα από τα 600nm).

Για το λέιζερ ιόντων Αργού (σχήματα 3-13, 3-14) σχεδόν όλοι οι αλγόριθμοι κατάφεραν να ανιχνεύσουν φασματικές διαφορές στα δείγματα όταν ήταν νωπά και μετά την συντήρησή τους σε φορμόλη για ένα εικοσιτετράωρο. Από την άλλη μεριά όμως, απέτυχαν στη διάκριση για το διάστημα μεταξύ 24 και 48 ωρών. Επιπλέον, όλοι οι αλγόριθμοι εμφανίζουν πολύ μικρό ποσοστό επιτυχίας για τη συντήρηση σε υγρό άζωτο (τόσο για το πρώτο εικοσιτετράωρο όσο και για το διάστημα μεταξύ 24 και 48 ωρών).

Από τα προηγούμενα είναι φανερό ότι η επίδραση της συντήρησης σε φορμόλη στα φάσματα φθορισμού των ιστών είναι αρκετά έντονη και οι φασματικές αλλαγές συντελούνται το πρώτο εικοσιτετράωρο. Αυτές οι φασματικές αλλαγές προέρχονται κυρίως από την μείωση της κορυφής απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης γύρω στα 550nm. Οι αλλαγές στη δεξιά περιοχή του φάσματος φθορισμού (μετά τα 600nm) πρέπει να οφείλονται κυρίως στις πορφυρίνες και στην αλλαγή της χημικής τους σύστασης μετά από συντήρηση σε φορμόλη για 24 ώρες. Όσο αφορά το χρονικό διάστημα μεταξύ 24 και 48 ωρών, δεν παρατηρήθηκε καμία αξιόλογη φασματική αλλαγή στο συλλεγόμενο φθορισμό. Επομένως, οι όποιες διαφοροποιήσεις,

λαμβάνουν χώρα το πρώτο εικοσιτετράωρο της συντήρησης σε φορμόλη. Η περαιτέρω αποθήκευση δεν δημιουργεί επιπλέον αλλαγές στο καταγραφόμενο φθορισμό. Ουσιαστικά δηλαδή δεν αλλοιώνονται και άλλο οι χρωμοφόρες του ιστού.

Η συντήρηση σε υγρό άζωτο δεν επιφέρει τόσο δραματικές φασματικές αλλαγές στο φθορισμό. Κάποιες μικρές αλλαγές εντοπίστηκαν κατά την διάρκεια του πρώτου εικοσιτετράωρου συντήρησης (ιδίως για το Ήλιο-Κάδμιο). Δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες διαφορές ιδίως στη κόκκινη περιοχή του φάσματος (πορφυρίνες). Και σε αυτή την περίπτωση οι όποιες μικρές αλλαγές στις χρωμοφόρες του ιστού πραγματοποιήθηκαν στις πρώτες 24 ώρες της συντήρησης.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι και ένας περιορισμένος αριθμός μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ανάκλασης διαχεόμενης ακτινοβολίας (Diffused reflection) πάνω στα ίδια δείγματα, κατέληξε στα ίδια συμπεράσματα.

3.4 Συμπεράσματα

Φάσματα φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ καταγράφηκαν κατά την διάρκεια ακτινοβολήσης φυσιολογικών και αθηροσκληρωτικών περιφερειακών αγγείων. Όλα τα δείγματα προέρχονταν από εγχειρήσεις bypass ή από ακρωτηριασμούς. Ως πηγές διέγερσης χρησιμοποιήθηκαν τα λέιζερ Ηλίου-Καδμίου και ιόντων Αργού. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν όταν ήταν νωπά (μία ώρα μετά την εκτομή τους) και ύστερα από συντήρηση για 24 και 48 ώρες σε φορμόλη ή υγρό άζωτο. Δημιουργήθηκαν δώδεκα (12) απλοί αλγεβρικοί αλγόριθμοι (διαφορετικοί για κάθε λέιζερ) με σκοπό να ανιχνεύσουν τις φασματικές αλλαγές στο συλλεγόμενο φθορισμό από τα δείγματα όταν ήταν νωπά και μετά την συντήρηση τους για 24 και 48 ώρες.

Οι αλγόριθμοι εμφανίζουν καλύτερα αποτελέσματα για συντήρηση σε φορμόλη και για ινώδεις πλάκες (σε σχέση με τις ασβεστοποιημένες). Μερικοί από τους αλγόριθμους κατάφεραν να ανιχνεύσουν αλλαγές στα σήματα φθορισμού των δειγμάτων, όταν ήταν νωπά και μετά τη συντήρηση τους για ένα εικοσιτετράωρο σε φορμόλη ή υγρό άζωτο. Όμως για το χρονικό διάστημα

μεταξύ 24 και 48 ωρών όλοι οι αλγόριθμοι παρουσιάζουν πολύ χαμηλά ποσοστά επιτυχίας. Γενικά για την περίπτωση της συντήρησης σε φορμόλη οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν, έχοντας ως πηγή διέγερσης το λέιζερ ιόντων Αργού, εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση φασματικών αλλαγών κατά την διάρκεια του πρώτου εικοσιτετραώρου. Όλα αυτά βέβαια συγκρινόμενοι με αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια ακτινοβολήσης των δειγμάτων με το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου.

Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν παρέχουν μία ισχυρή ένδειξη ότι η συντήρηση σε υγρό άζωτο δεν αλλάζει σημαντικά τα φασματικά χαρακτηριστικά των ιστών. Από την άλλη μεριά όμως, η συντήρηση σε φορμόλη φαίνεται να επηρεάζει και να αλλοιώνει την κατανομή των φασμάτων φθορισμού των περιφερειακών αγγείων (μέσα στις πρώτες 24 ώρες).

Διάκριση περιφερειακών αγγείων *in vitro* και *in vivo* με χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού.

- 4.1 Εισαγωγή
- 4.2 Πειραματική διάταξη
 - Δείγματα
 - Καταγραφή του φθορισμού
- 4.3 Αποτελέσματα
 - Ανάλυση αποτελεσμάτων
 - Επεξεργασία φασμάτων με νευρωνικά δίκτυα
- 4.4 *In vivo* μετρήσεις
- 4.5 Συμπεράσματα

4.1 Εισαγωγή

Στο τέταρτο κεφάλαιο θα παρουσιαστούν φάσματα φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ *in vitro*, από περιφερειακά αγγεία. Θα περιγραφούν, η πειραματική διάταξη, τα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν με ένα ή δύο διαφορετικά μήκη κύματος, καθώς και ο τρόπος καταγραφής του φθορισμού. Για την ανάλυση των φασμάτων θα δημιουργηθούν δώδεκα απλοί αλγεβρικοί αλγόριθμοι βασισμένοι στις διαφορές έντασης. Με τη βοήθεια των αλγορίθμων θα γίνει προσπάθεια να επιτευχθεί η διάκριση των διαφορετικών τύπων ιστών (φυσιολογικού, ινώδους, ασβεστοποιημένου). Επιπλέον, κάποια από τα φάσματα θα αναλυθούν και με τη χρήση νευρωνικών δικτύων, για την απόκτηση όσο το δυνατό βελτιωμένων αποτελεσμάτων σε ότι αφορά στην ταξινόμηση των ιστών. Τέλος, θα παρουσιαστεί ένας περιορισμένος αριθμός από φάσματα φθορισμού που καταγράφηκαν *in vivo* από περιφερειακά αγγεία, κατά την διάρκεια εγχειρήσεων by-pass.

4.2 Πειραματική διάταξη

Η πειραματική διάταξη είναι η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε και στις προηγούμενες σειρές μετρήσεων (σχήμα 3-1). Όλα τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν είτε με ένα, είτε με δύο διαφορετικά μήκη κύματος. Για κάθε σειρά μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm) και μία από τις γραμμές εκπομπής (457.9, 476.5, 488 και 496.5nm) του λέιζερ ιόντων Αργού. Για τη διέγερση με δύο μήκη κύματος η δέσμη του λέιζερ Ηλίου-Καδμίου διαπερνούσε το γυάλινο πλακίδιο (~90% της αρχικής δέσμης), ενώ από τη δέσμη του Αργού χρησιμοποιούνταν μόνο η ανάκλαση από το γυαλί (~4% της αρχικής δέσμης). Η μέση ισχύς στην άκρη της ίνας κατά την διάρκεια των πειραμάτων ήταν της τάξης των 5mWatt για κάθε δέσμη (~10mWatt για ταυτόχρονη διέγερση με δύο μήκη κύματος). Ο διχροϊκός καθρέπτης που τοποθετήθηκε για τη σωστή καθοδήγηση των δεσμών είχε 99% ανακλαστικότητα στα 441.6nm υπό γωνία πρόσπτωσης 45 μοιρών. Τέλος, η διάμετρος του πυρήνα της ίνας, που χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση και την συλλογή του εκπεμπόμενου φθορισμού, ήταν 560μm.

Δείγματα

Μελετήθηκαν δείγματα από τριανταοκτώ (38) ασθενείς *in vitro* (32 άντρες και 6 γυναίκες). Σε δώδεκα (12) περιπτώσεις επιτεύχθηκε και η πλήρης ιστολογική εξέταση των δειγμάτων. Όλα τα δείγματα προήλθαν από εγχειρήσεις by-pass (27) και από ακρωτηριασμούς (11) που έγιναν στην Αγγειοχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Κρήτης. Ακτινοβολήθηκαν δεκατρείς κοιλιακές αορτές, δεκατρείς μηριαίες, εννέα ιγνυακές, τρεις κνημιαίες και τρεις περνιαίες αρτηρίες.

Όλοι οι ιστοί ακτινοβολήθηκαν περίπου μία ώρα μετά την εκτομή τους. Τα αγγεία ανοίχτηκαν κατά μήκος με σκοπό να εκτεθεί στην ακτινοβολία των λέιζερ, η εσωτερική τους επιφάνεια. Μετά την εξέταση από τους γιατρούς, μερικά από τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως φυσιολογικά και τα υπόλοιπα ως

περιέχοντα ινώδη πλάκα, ασβεστοποιημένη πλάκα ή αντιστοιχούσαν σε ανεύρυσμα. Σε κάποια από τα δείγματα συνυπήρχαν ινώδη και ασβεστοποιημένη πλάκα. Τα δείγματα καθαρίστηκαν και ξεπλύθηκαν με φυσιολογικό ορό. Κατά την διάρκεια της ακτινοβόλησης τους τοποθετήθηκαν σε μία γάζα ποτισμένη με φυσιολογικό ορό με σκοπό να παραμείνουν υγρά.

Όσο αφορά τα δείγματα που στάλθηκαν για ιστολογική ανάλυση (12 περιπτώσεις), μετά το τέλος των μετρήσεων αποθηκεύτηκαν σε φορμόλη (10%). Κατόπιν, τα δείγματα βαπτίσθηκαν σε παραφίνη Επίσης, "σημαδεύτηκαν" με αιματοξυλική-ηωζίνη (hematoxylic-eosin). Η ιστοχημεία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η τρίχρωμη Masson. Τα αποτελέσματα των ιστολογικών εξετάσεων συγκρίθηκαν με τις αντίστοιχες μετρήσεις φθορισμού που πάρθηκαν από τα ίδια δείγματα.

Καταγραφή του φθορισμού

Και σε αυτή τη σειρά πειραμάτων ο στόχος μας ήταν να ληφθούν φάσματα φθορισμού, για κάθε δείγμα απαλλαγμένα από θόρυβο (background). Η καταγραφή του θορύβου πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης των λέιζερ (He-Cd, Ar⁺) σε φυσιολογικό ορό. Το σήμα που συλλέχτηκε θεωρήθηκε ως ο φθορισμός από την οπτική ίνα, το φυσιολογικό ορό και τις υπόλοιπες πηγές θορύβου (τη γάζα πάνω στην οποία ήταν τοποθετημένος ο ιστός, τα φώτα από τον περιβάλλοντα χώρο). Αυτό το φάσμα θορύβου (background spectrum) αφαιρούνταν αυτομάτως από κάθε φάσμα που καταγραφόταν από τα δείγματα. Για κάθε μία σειρά μετρήσεων και ένα νέο φάσμα θορύβου συλλεγόταν και αφαιρούνταν αυτομάτως.

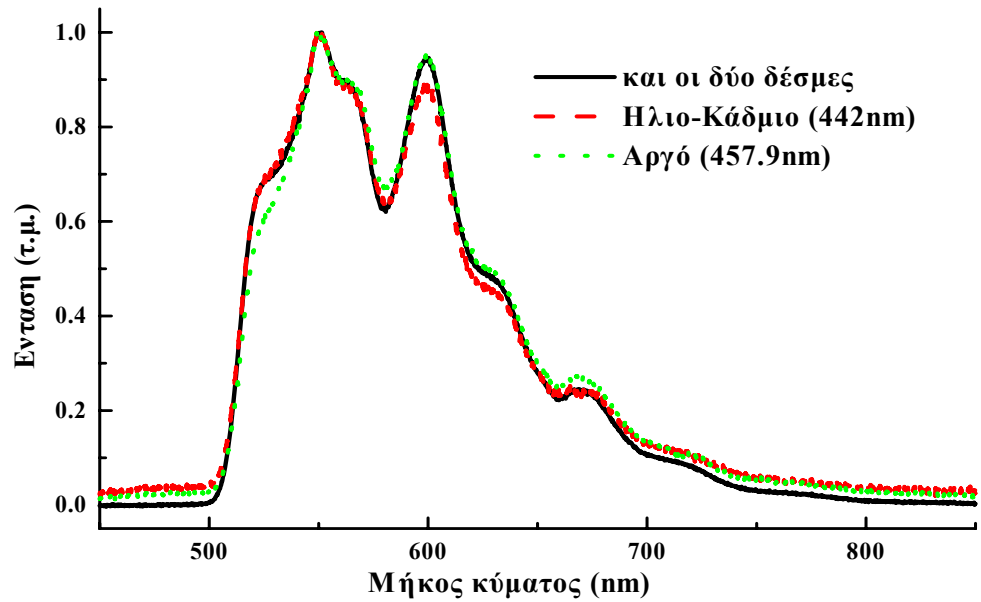
4.3

Αποτελέσματα

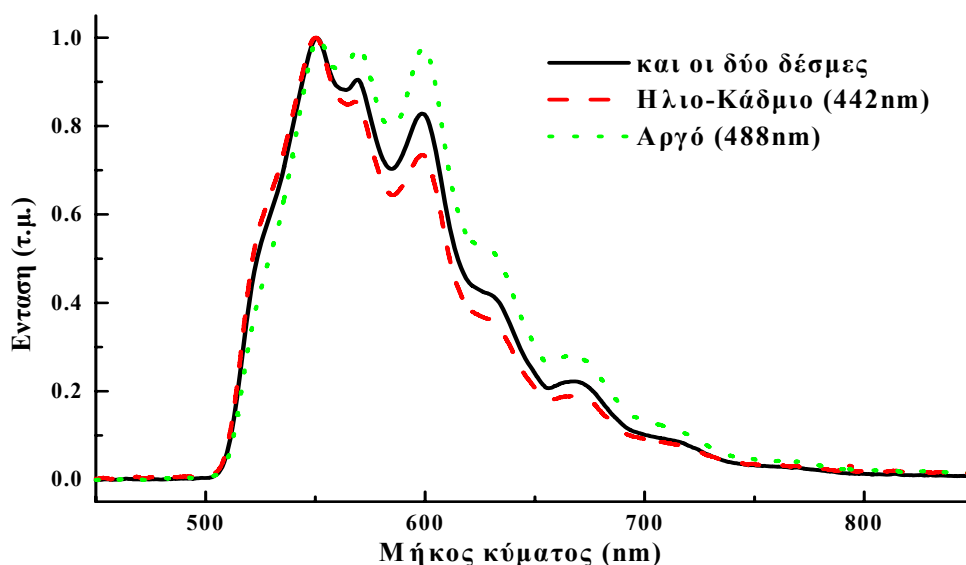
Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι να ερευνηθούν οι πιθανότητες για τη διάκριση μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών περιφερειακών αγγείων (*in vitro*) με τη χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού [1-3]. Η διέγερση των ιστών επιτεύχθηκε με τη χρήση ενός, ή δύο διαφορετικών

μηκών κύματος. Έγινε δηλαδή προσπάθεια για την ανάπτυξη μίας νέας διαγνωστικής, ελάχιστα επεμβατικής τεχνικής για την έγκαιρη διάγνωση νοσηρών ιστών (περιφερειακών αγγείων). Ο απώτερος στόχος είναι αυτή η τεχνική φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ, δρώντας πάντα συνεργατικά με τις υπάρχουσες καθιερωμένες τεχνικές, να προσφέρει κάποιες επιπλέον πληροφορίες για την αξιόπιστη αναγνώριση των μη υγιών ιστών.

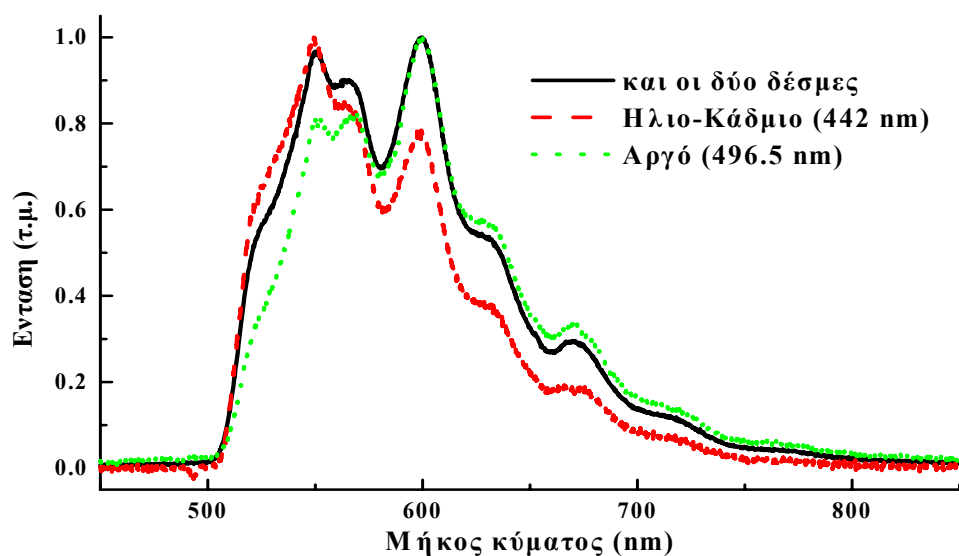
Φάσματα φθορισμού από ινώδη πλάκα παρουσιάζονται στα τρία διαγράμματα που ακολουθούν. Είναι εμφανές ότι όταν το δεύτερο μήκος κύματος, για τη διέγερση του ιστού με δύο δέσμες, είναι σχετικά κοντά στο πρώτο (442 και 457.9nm) δεν παρατηρείται καμία ιδιαίτερη φασματική αλλαγή στο συλλεγόμενο φθορισμό (Σχήμα 4-1). Από την άλλη μεριά όταν τα δύο μήκη κύματος διέγερσης έχουν μεγάλη διαφορά (442 και 488nm, 442 και 496.5nm) διαπιστώνεται μία αύξηση του σήματος φθορισμού προς την περιοχή των μεγαλύτερων μηκών κύματος (Σχήματα 4-2, 4-3). Αυτό οφείλεται στην διέγερση των δειγμάτων με τις γραμμές 488 και 496.5nm αντίστοιχα. Αυτές οι γραμμές είναι υπεύθυνες για την αύξηση του καταγραφόμενου φθορισμού στην κόκκινη περιοχή του φάσματος (μετά τα 650nm).



Σχ. 4-1 Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού από ινώδη πλάκα από μηριαία αρτηρία. Όλες οι μετρήσεις πάρθηκαν από το ίδιο σημείο του ιστού. Η συνεχόμενη μαύρη γραμμή αναπαριστά το φθορισμό όταν οι γραμμές των λέιζερ 442 και 457.9nm χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση του ιστού. Οι διακεκομμένες γραμμές αναπαριστούν το φθορισμό για κάθε μία από τις γραμμές των λέιζερ ξεχωριστά.

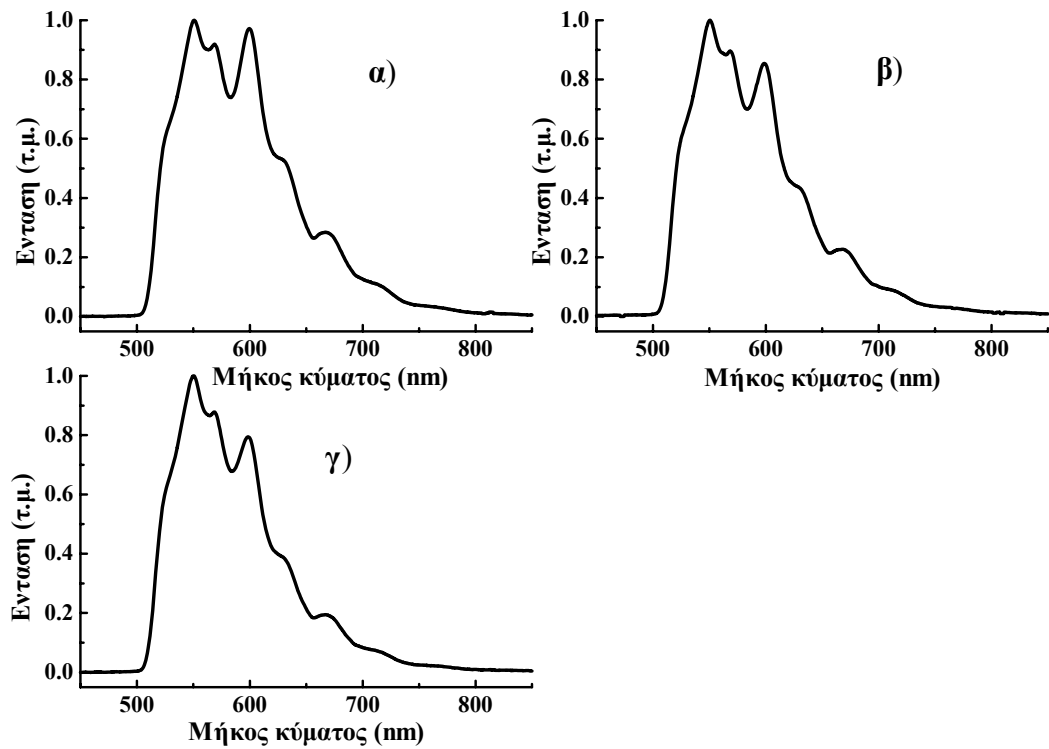


Σχ. 4-2 Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού από ινώδη πλάκα από μηριαία αρτηρία. Όλες οι μετρήσεις πάρθηκαν από το ίδιο σημείο του ιστού. Η συνεχόμενη μαύρη γραμμή αναπαριστά το φθορισμό όταν οι γραμμές των λέιζερ 442 και 488nm χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση του ιστού. Οι διακεκομμένες γραμμές αναπαριστούν το φθορισμό για κάθε μία από τις γραμμές των λέιζερ ξεχωριστά.

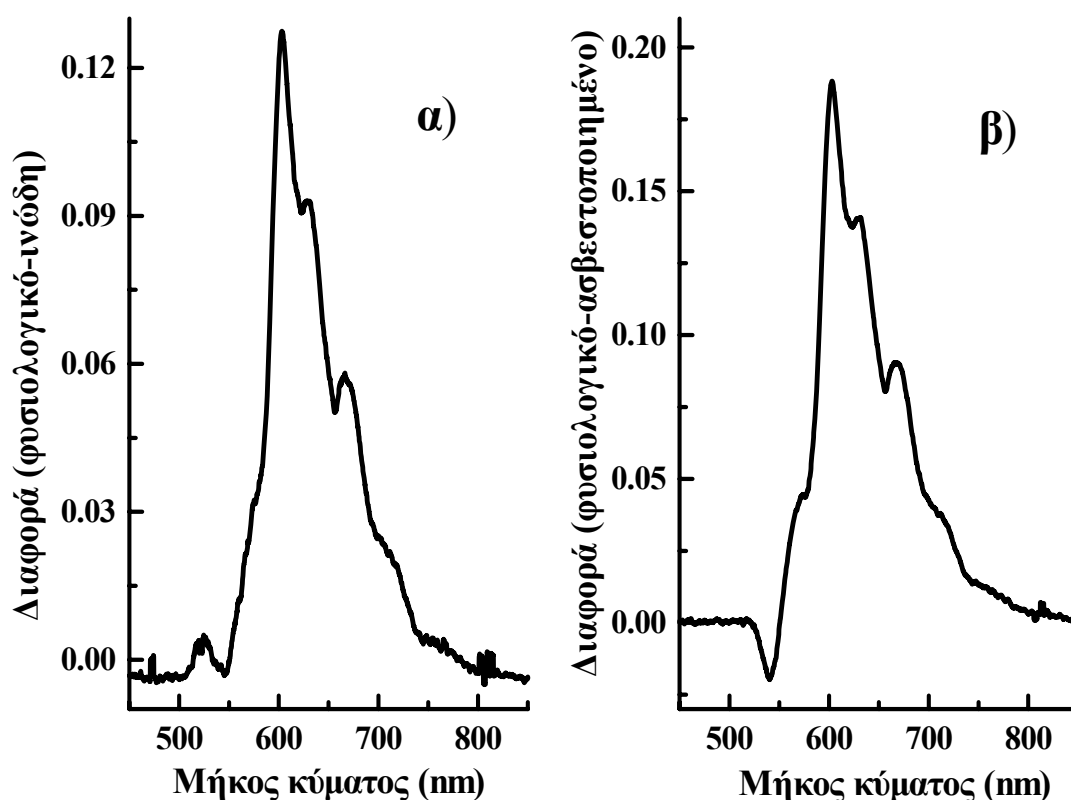


Σχ. 4-3 Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού από ινώδη πλάκα από γιγνακή αρτηρία. Όλες οι μετρήσεις πάρθηκαν από το ίδιο σημείο του ιστού. Η συνεχόμενη μαύρη γραμμή αναπαριστά το φθορισμό όταν οι γραμμές των λέιζερ 442 και 496.5nm χρησιμοποιήθηκαν για τη διέγερση του ιστού. Οι διακεκομμένες γραμμές αναπαριστούν το φθορισμό για κάθε μία από τις γραμμές των λέιζερ ξεχωριστά.

Η σύγκριση φασμάτων φθορισμού ποικίλων τύπων περιφερειακών αγγείων, ανέδειξε διαφορές που σχετίζονται κυρίως με αλλαγές στην κόκκινη περιοχή του φάσματος. Αυτές οι διαφορές είναι πιο εμφανείς όταν χρησιμοποιήθηκαν για διέγερση ταυτόχρονα δύο διαφορετικά μήκη κύματος. Στο σχήμα 4-4 παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού που συλλέχτηκαν από φυσιολογικά, ινώδη και ασβεστοποιημένα δείγματα, με πηγές διέγερσης τις γραμμές 442 και 488nm. Πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχει μία μετατόπιση (shift) των σημάτων φθορισμού προς τα μεγαλύτερα μήκη κύματος στις περιπτώσεις της ινώδους και ασβεστοποιημένης πλάκας. Η αφαίρεση των προηγούμενων κανονικοποιημένων φασμάτων φθορισμού φέρει ως αποτέλεσμα μία πιο καθαρή ποσοτική εκτίμηση των διαφορών μεταξύ φυσιολογικών και ινώδη φασμάτων και φυσιολογικών και ασβεστοποιημένων φασμάτων (σχήμα 4-5). Είναι εμφανές ότι οι κυριότερες διαφορές εντοπίζονται στην περιοχή μεταξύ 600-700nm.

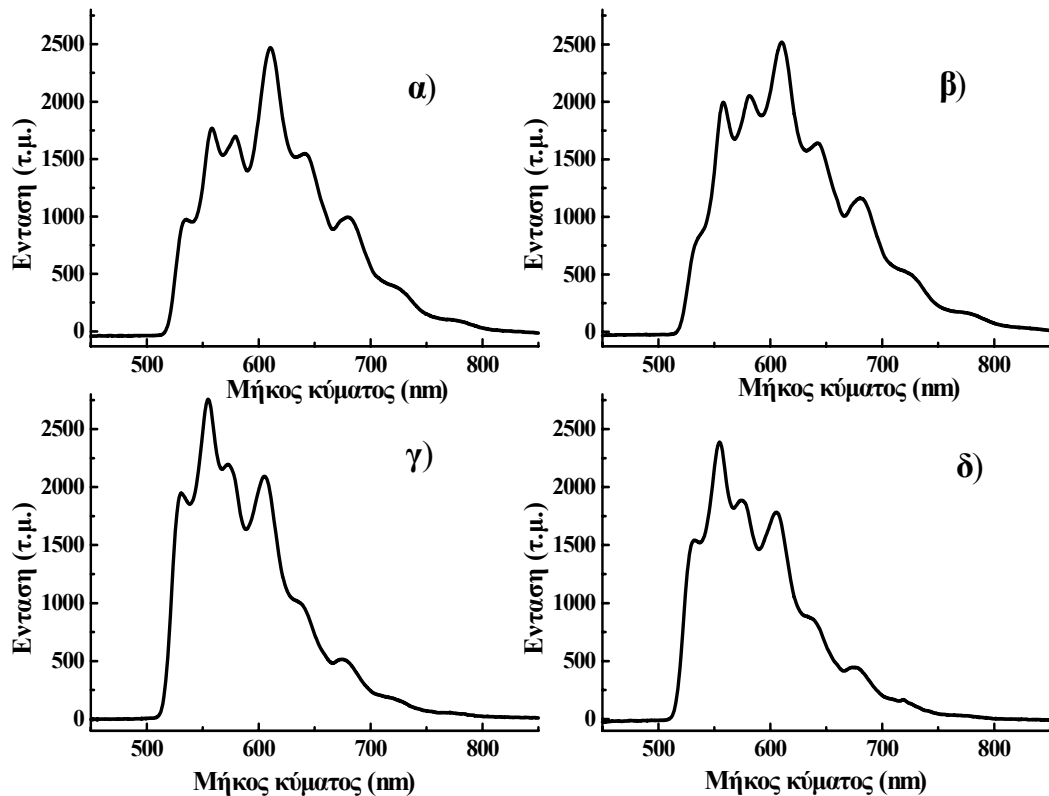


Σχ. 4-4 Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού από ιγννακή αρτηρία. Τα φάσματα προήλθαν από φυσιολογικό δείγμα (α), από ινώδη (β) και από ασβεστοποιημένη (γ) πλάκα. Ως πηγές διέγερσης χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα οι γραμμές 442 και 488nm των λέιζερ Ηλίου-Καδμίου και ιόντων Αργού αντίστοιχα.



Σχ. 4-5 Αφαίρεση κανονικοποιημένων φασμάτων φθορισμού από ιγνυακή αρτηρία, α) φυσιολογικό-ινώδη, β) φυσιολογικό-αβεστοποιημένο. Τα λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm) και ιόντων Αργού (488nm) χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα ως πηγές διέγερσης.

Επίσης, παρατηρήθηκαν διαφορές στα φάσματα φθορισμού που καταγράφηκαν από κοιλιακή αορτή σε σχέση με τις άλλες περιφερειακές αρτηρίες (μηριαία, ιγνυακή, κνημιαία). Η αορτή είναι περισσότερο ελαστική από τις περιφερικές αρτηρίες. Αυτό αποτελεί ένα λόγο για την διαφοροποίηση των συλλεγόμενων φασμάτων. Επιπλέον, στα δείγματα που προήλθαν από κοιλιακή αορτή, η παγίδευση της αιμοσφαιρίνης ήταν εμφανής (από μία πρώτη εξέταση). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η κορυφή στα 550nm να μειωθεί περισσότερο από την κορυφή στα 600nm, λόγω της απορρόφησης από το αίμα. Όλα αυτά παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα (σχήμα 4-6). Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές φασματικές αλλαγές μεταξύ του ίδιου τύπου αρτηριών που πάρθηκαν όμως από διαφορετικούς δότες.



Σχ. 4-6 Φάσματα φθορισμού α) και β) από κοιλιακή αορτή γ) και δ) από ινώδη πλάκα από μηριαία αρτηρία. Τα λέιζερ ιόντων Αργού (476.5nm) και Ηλίου-Καδμίου (442nm) χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα για τη διέγερση των ιστών.

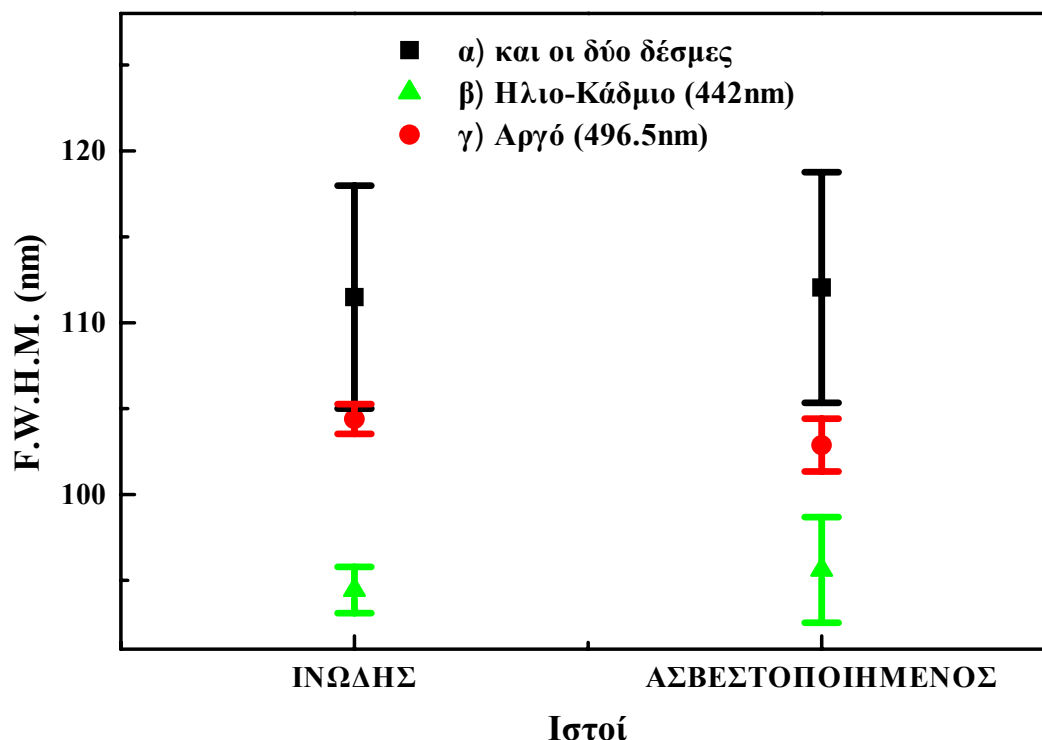
Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η παρουσία παγιδευμένης οξυ και διοξυ-αιμοσφαιρίνης ήταν εμφανής σε όλα τα νωπά δείγματα που ακτινοβολήθηκαν μία ώρα μετά την εκτομή τους. Η οξυ-αιμοσφαιρίνη παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 415nm, ενώ η διοξυ-αιμοσφαιρίνη έχει μέγιστο απορρόφησης στα 430nm. Δηλαδή εμφανίζεται μίας τάξης μεγέθους διαφορά στην απορρόφηση αυτών των χρωμοφώρων, μεταξύ των γραμμών 442 και 488nm και 442 και 496.5nm. Το γεγονός αυτό σχετίζεται έντονα με το βάθος διείσδυσης στον ιστό των γραμμών των λέιζερ.

Αφενός με το λέιζερ ιόντων Αργού (και ιδιαίτερα με τις γραμμές εκπομπής 488 και 496.5nm) επιτυγχάνεται η διείσδυση σε βαθύτερα στρώματα

του ιστού. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα βασικό στοιχείο για καλύτερη διάκριση των ιστών. Ακόμη, με τη χρήση αυτών των γραμμών πραγματοποιείται η καλύτερη διέγερση κάποιων πορφυρινών που βρίσκονται στον ιστό. Όμως, από την άλλη μεριά, με την ταυτόχρονη χρησιμοποίηση και του λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm) για την διέγερση των δειγμάτων δεν απομακρυνόμαστε από το μέγιστο απορρόφησης των φλαβινών (~450nm). Αυτοί είναι οι κυριότεροι λόγοι που οδήγησαν στην απόκτηση καλύτερων αποτελεσμάτων στη διάκριση των ιστών με την ταυτόχρονη χρήση δύο διαφορετικών μηκών κύματος για διέγερση, συγκριτικά πάντα με τα αποτελέσματα της διέγερσης με ένα μήκος κύματος.

Επιπλέον, με τη χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών μηκών κύματος για ακτινοβολία των δειγμάτων, επιτυγχάνεται η διέγερση περισσότερων χρωμοφόρων του ιστού. Αυτό έχει ως συνέπεια την καταγραφή ευρύτερων φασμάτων φθορισμού για διπλή διέγερση, συγκριτικά πάντα με φάσματα που συλλέχτηκαν κατά την ακτινοβολία με ένα μόνο μήκος κύματος. Στο διάγραμμα που ακολουθεί (σχήμα 4-7) παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις του μέγιστου πλάτους στο μισό του ύψους (full width at half maximum F.W.H.M.) για φάσματα που προήλθαν από ινώδη και ασβεστοποιημένη πλάκα. **Όπως αναμενόταν οι μέσες τιμές του F.W.H.M. για διπλή διέγερση είναι αισθητά υψηλότερες συγκριτικά με αυτές για μονή διέγερση.** Τέλος, παρατηρήθηκε ότι οι τιμές του F.W.H.M. για διέγερση με την γραμμή 488nm ή την 496.5nm, είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές για ακτινοβολία με την γραμμή 442nm (Ηλιο-Κάδμιο). Παρόμοια διαφοροποίηση στις τιμές του F.W.H.M. δεν διαπιστώθηκε όταν συγκρίθηκαν φάσματα που πάρθηκαν με πηγή διέγερσης τις γραμμές 457.9nm και 442nm αντίστοιχα. Η εξήγηση αποδίδεται στο γεγονός ότι, κατά την ακτινοβολία των δειγμάτων με την γραμμή 488nm ή 496.5nm επιτυγχάνεται καλύτερη διέγερση σε κάποιες από τις πορφυρίνες του ιστού. Αυτό επιφέρει μία αύξηση του σήματος φθορισμού στην κόκκινη περιοχή του φάσματος (μετά τα 650nm) και οδηγεί στην καταγραφή ευρύτερων φασμάτων (broad fluorescence spectra).



Σχ. 4-7 Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις του μέγιστου πλάτους στο μισό του ύψους (F.W.H.M.), από φάσματα φθορισμού ευρείας ζώνης (broad band), που προήλθαν από ινώδη και ασβεστοποιημένη πλάκα. Τα δείγματα διεγέρθηκαν, α) με δύο γραμμές ταυτόχρονα (442 και 496.5nm), β) με τη γραμμή 442nm και γ) με τη γραμμή 496.5nm.

Με την εφαρμογή δώδεκα (12) απλών αλγεβρικών αλγορίθμων, οι οποίοι είναι ευαίσθητοι σε διαφορετικές φασματικές περιοχές, ερευνήθηκαν περαιτέρω τα φάσματα φθορισμού που καταγράφηκαν από τα δείγματα. Κάθε φάσμα αναλύθηκε με τον ακόλουθο τρόπο: υπολογίστηκαν οι μέσες εντάσεις των φασματικών περιοχών 545-550nm (PE 1), 578-582nm (VA 1), 596-601nm (PE 2), 618-622nm (VA 2), 666-670nm (PE 3). Χρησιμοποιώντας αυτές τις παραμέτρους δημιουργήθηκαν οι δώδεκα διαφορετικοί απλοί αλγεβρικοί αλγόριθμοι. Αυτοί παρουσιάζονται στον πίνακα 4-1.

$A1=PE1-PE2/ VA1$	$A7= PE2-PE3/ VA1$
$A2=PE1-PE2/ VA2$	$A8= PE1-PE3/ VA2$
$A3= PE1/ PE2$	$A9= PE2-PE3/ VA2$
$A4= PE1/ PE3$	$A10=(PE1-VA1) / (PE2 -VA2)$
$A5= PE2 / PE3$	$A11=(PE2-VA2) / (PE3-VA1)$
$A6= PE1-PE3/ VA1$	$A12=(PE1-VA1) / (PE3-VA2)$

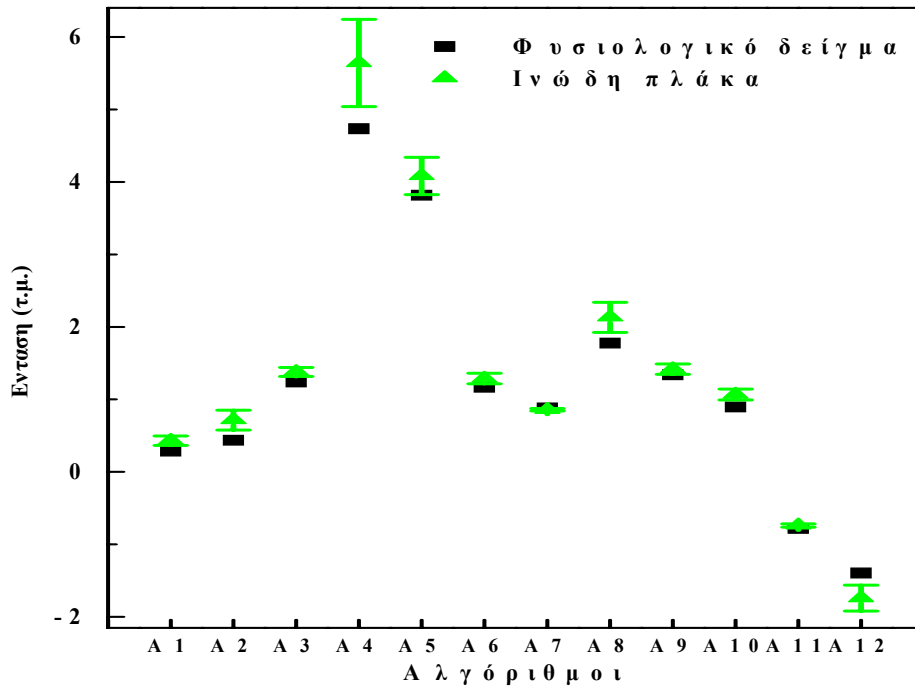
Πιν 4-1 Οι 12 αλγόριθμοι.

Για κάθε δείγμα συλλέχτηκαν τρία ή τέσσερα φάσματα, με σκοπό την δημιουργία μίας πειραματικής τυπικής απόκλισης γύρω από την μέση τιμή των αλγορίθμων. Όπως αναμενόταν από την προηγούμενη συζήτηση, οι αλγόριθμοι A4, A8 και A12 εμφάνισαν μεγάλο ποσοστό επιτυχίας στη διάκριση φυσιολογικού από ινώδη και φυσιολογικού από ασβεστοποιημένο ιστό. Αυτοί οι αλγόριθμοι βασίζονται στην σύγκριση της κόκκινης περιοχής του φάσματος (μετά τα 600nm) με την πρώτη κύρια "κορυφή" του καταγραφόμενου φθορισμού στα 550nm. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης μεταξύ φυσιολογικής ιγνυακής αρτηρίας και ινώδους πλάκας παρουσιάζονται στα σχήματα 4-8, 4-9. Η διέγερση των δειγμάτων επιτεύχθηκε με την χρήση ενός ή δύο διαφορετικών μηκών κύματος (442nm και 442+488nm). Η ίδια σύγκριση μεταξύ φυσιολογικής και ασβεστοποιημένης ιγνυακής αρτηρίας εμφανίζεται στα σχήματα 4-10, 4-11 (488nm και 442+488nm).

Στο διάγραμμα 4-12 παρουσιάζεται η ποσοστιαία κατανομή των τιμών, για τρεις αλγόριθμους (A4, A8, A7). Όλες οι τιμές και για τους τρεις αλγόριθμους, προέρχονται από ένα ασθενή (ιγνυακή αρτηρία). Υπολογίστηκαν οι τιμές από έξι (6) φυσιολογικά, εννέα (9) ινώδη και δώδεκα (12) ασβεστοποιημένα δείγματα.

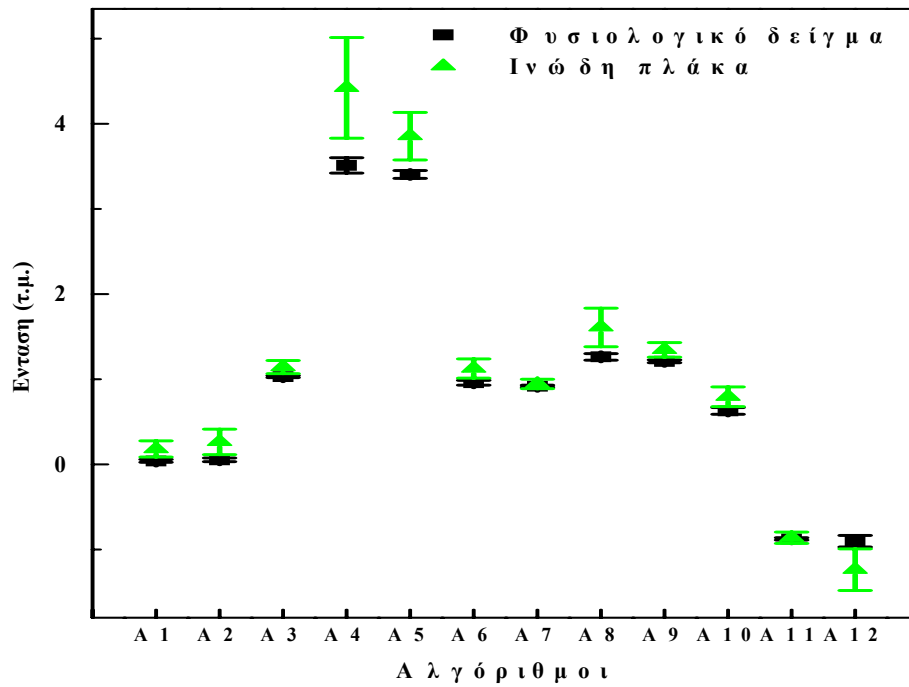
Οι αλγόριθμοι A4, A8 βασίζονται στην σύγκριση της κόκκινης φασματικής περιοχής με την πρώτη κύρια "κορυφή" του φθορισμού στα 550nm. Είναι εμφανές ότι οι αλγόριθμοι A4, A8 είχαν μεγάλη επιτυχία στη διάκριση μεταξύ φυσιολογικού και ινώδη και μεταξύ φυσιολογικού και ασβεστοποιημένου ιστού. Όμως από την άλλη μεριά, ο αλγόριθμος A7 δεν κατάφερε να εμφανίσει το ίδιο καλά αποτελέσματα όσο αφορά τη διάκριση

των δειγμάτων. Επιπλέον, όλοι οι αλγόριθμοι (A4, A8, A7) παρουσιάζουν πολύ μικρά ποσοστά επιτυχίας στην αναγνώριση μεταξύ ινώδους και

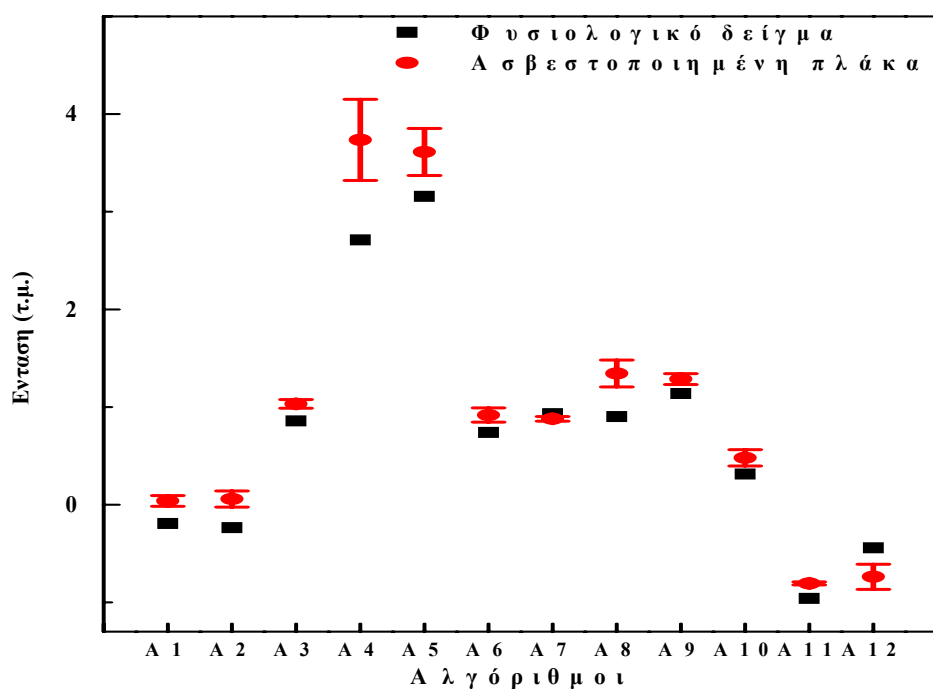


Σχ. 4-8 Τα αποτελέσματα της εφαρμογής των δώδεκα αλγεβρικών αλγορίθμων σε φυσιολογική και ινώδη ιγνυακή αρτηρία. Τα δείγματα διεγέρθηκαν με την γραμμή 442nm του λέιζερ Ηλίου-Καδμίου.

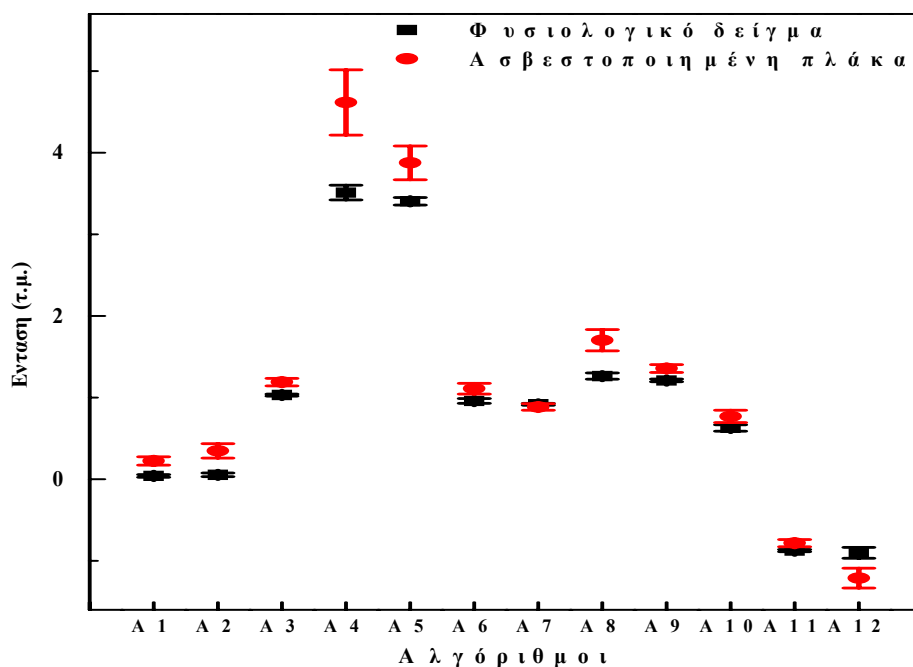
ασβεστοποιημένης πλάκας.



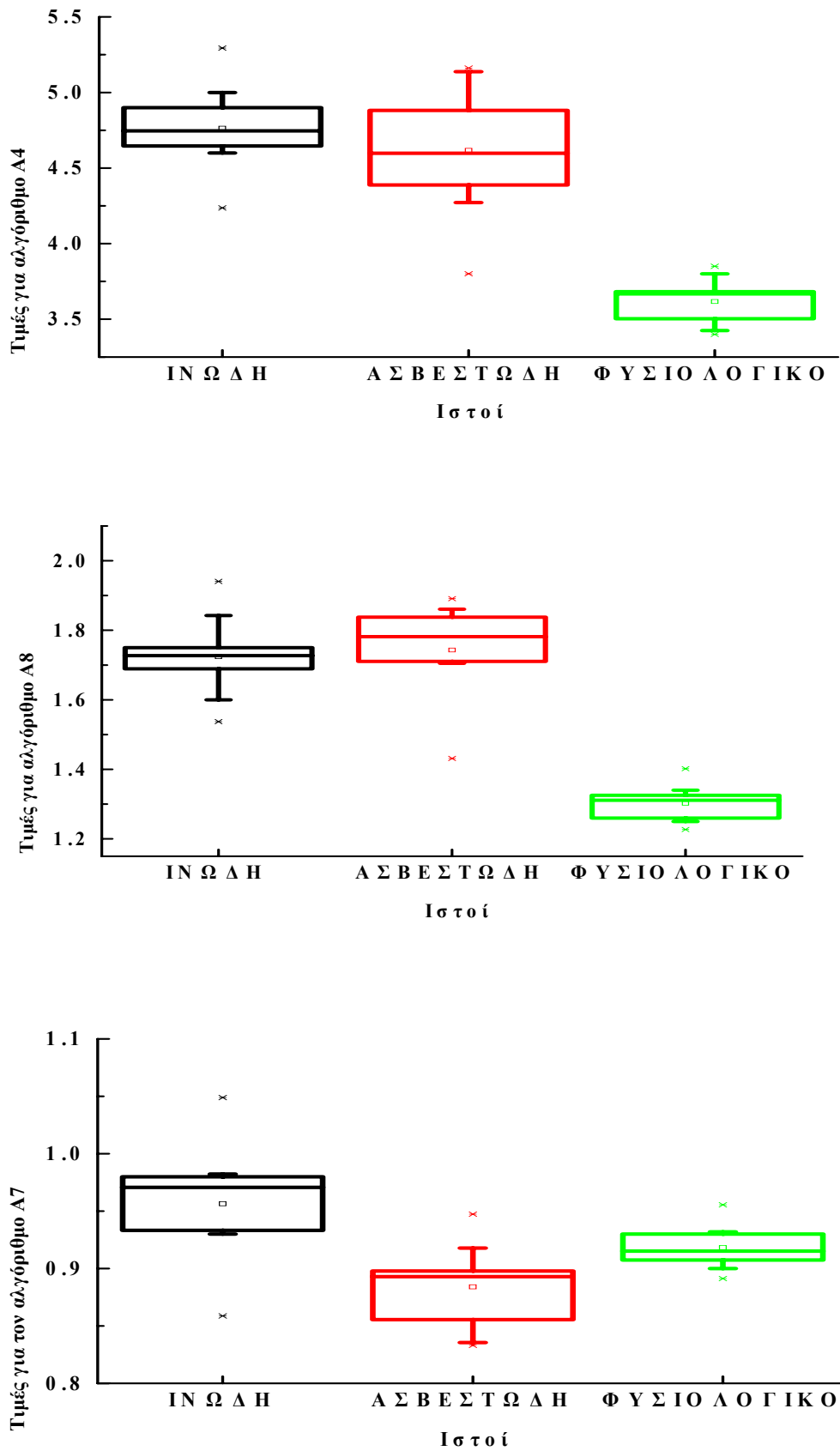
Σχ. 4-9 Τα αποτελέσματα της εφαρμογής των δώδεκα αλγορίθμων σε φυσιολογική και ινώδη ιγννακή αρτηρία. Τα δείγματα διεγέρθηκαν ταυτόχρονα με δύο διαφορετικά μήκη κύματος (442 και 488nm)



Σχ. 4-10 Τα αποτελέσματα της εφαρμογής των δώδεκα αλγορίθμων σε φυσιολογική και ασβεστοποιημένη ιγνυακή αρτηρία. Οι ιστοί ακτινοβολήθηκαν με την γραμμή 488nm του λέιζερ ιόντων Αργού.



Σχ. 4-11 Τα αποτελέσματα της εφαρμογής των δώδεκα αλγορίθμων σε φυσιολογική και ασβεστοποιημένη ιγνυακή αρτηρία. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν ταυτόχρονα με δύο μήκη κύματος (442 και 488nm)



Σχ. 4-12 Ποσοστιαία κατανομή των τιμών για τρεις αλγόριθμους, τους A4, A8 και A7. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα οι γραμμές 442 και 488nm.

Στο προηγούμενο διάγραμμα (σχήμα 4-12), οι οριζόντιες γραμμές κάθε κουτιού υποδηλώνουν ότι, οι τιμές που βρίσκονται πάνω από την πρώτη γραμμή έχουν αριθμητική τιμή μεγαλύτερη από το 25% των μετρήσεων, όσες βρίσκονται πάνω από τη δεύτερη γραμμή έχουν αριθμητική τιμή μεγαλύτερη από το 50% των μετρήσεων και η τελευταία δηλώνει το 75%. Οι δείκτες σφάλματος (error-bars) κάτω και πάνω από το κουτί υποδηλώνουν το 5% και το 95% των τιμών αντίστοιχα. Τέλος, οι αστερίσκοι αναφέρονται στις ακραίες τιμές. Το τετράγωνο σύμβολο αντιστοιχεί στη μέση τιμή της κατανομής.

Τα καταγραφόμενα φάσματα φθορισμού των ιστών αποτελούν μία συνεισφορά όλων των χρωμοφόρων του και περιέχουν πολύτιμες πληροφορίες για αυτές. Ωστόσο, η πρώτη κύρια "κορυφή" του συλλεγόμενου φάσματος γύρω στα 550nm οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος στο φθορισμό των φλαβινών ($\lambda_{εκπ.} \sim 550\text{nm}$) του ιστού και ίσως και σε κάποια σαφώς μικρότερη συνεισφορά από το κολλαγόνο. Όσο όμως προχωράμε σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (μετά τα 600nm) αυξάνεται η συνεισφορά στο φάσμα από τον φθορισμό των πορφυρινών που βρίσκονται στον ιστό. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 4-5 οι φασματικές διαφορές μεταξύ φυσιολογικού ιστού και ινώδους ή ασβεστοποιημένης πλάκας εντοπίζονται στην κόκκινη περιοχή (600-750nm). Σημαντικές διαφορές στην περιοχή μεταξύ 520-600nm δεν παρατηρήθηκαν. Η διαφοροποίηση μετά τα 600nm ίσως να οφείλεται στη διαφορετική συγκέντρωση πορφυρινών μεταξύ φυσιολογικής και παθολογικής αρτηρίας. **Όπως αναφέρθηκε, οι αλγόριθμοι που κατάφεραν να διακρίνουν τον φυσιολογικό ιστό από την ινώδη και την ασβεστοποιημένη πλάκα, βασίζονται κατά κύριο λόγο στη σύγκριση της πρώτης κύριας "κορυφής" του φθορισμού με την κόκκινη περιοχή του φάσματος.**

Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι, στην περίπτωση των ασβεστοποιημένων δειγμάτων εξήχθησαν καλύτερα αποτελέσματα όσο αφορά τη διάκριση. Μία πιθανή εξήγηση προέρχεται από το γεγονός ότι, ο φθορισμός από την ασβεστοποιημένη πλάκα επηρεάζεται έντονα από τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν την ινώδη επιστρώση που καλύπτει την πλάκα. Σε αυτή την περίπτωση οι χρωμοφόρες της πλάκας βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια και μπορούν να διεγερθούν από τις γραμμές εκπομπής και των δύο λέιζερ. Από την άλλη μεριά όμως, στην περίπτωση των πρώτων ινωδών αθηρωματικών

πλακών, οι κυριότερες χρωμοφόρες εντοπίζονται στην περιοχή υπό του ενδοθηλίου και συνεπώς είναι δυσκολότερο να διεγερθούν από τις γραμμές εκπομπής των λέιζερ. Επιπρόσθετα, τα υπερκείμενα στρώματα του αγγειακού τοιχώματος είναι πιθανό να επηρεάσουν έντονα τον επαγόμενο φθορισμό (filtering effect).

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι, δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερες φασματικές αλλαγές μεταξύ ινώδους και ασβεστοποιημένης πλάκας, τόσο για ακτινοβολία με ένα όσο και με δύο διαφορετικά μήκη κύματος. Αυτό είχε ως άμεση συνέπεια και όλοι οι αλγόριθμοι να εμφανίζουν πολύ χαμηλό ποσοστό επιτυχίας στη διάκριση αυτών των πλακών.

Επεξεργασία φασμάτων με νευρωνικά δίκτυα

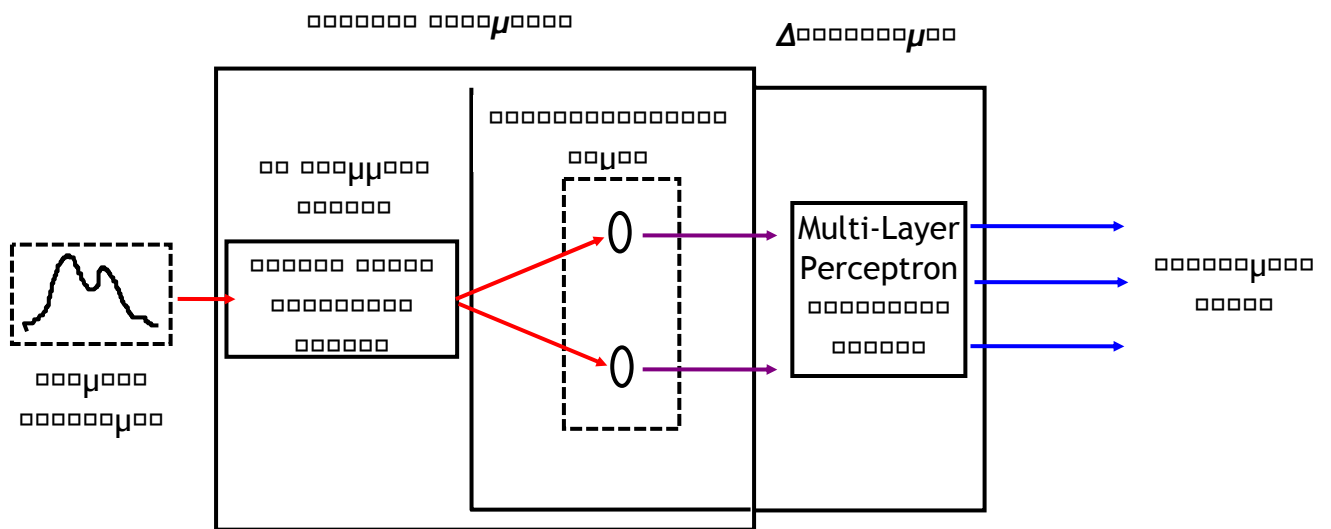
Σε μερικές περιπτώσεις τα φάσματα που συλλέχτηκαν αναλύθηκαν (εκτός από τους αλγόριθμους) και με την βοήθεια νευρωνικών δικτύων [4,5]. Αυτό έγινε σε συνεργασία με μία ομάδα από το Πολυτεχνείο των Χανίων. Μέχρι στιγμής ερευνήθηκαν φάσματα φθορισμού από δέκα (10) ασθενείς (6 άντρες και 4 γυναίκες). Τα δείγματα προήλθαν από εγχειρήσεις by-pass (7) και από ακρωτηριασμούς (3). Εξετάστηκαν με νευρωνικά δίκτυα φάσματα από επτά μηριαίες, μία ιγνυακή, δύο κνημιαίες και δύο περνιαίες αρτηρίες. Όπως είναι εμφανές σε πρώτη φάση αναλύθηκαν φάσματα φθορισμού μόνο από περιφερειακά αγγεία. Μερικοί από τους ιστούς χαρακτηρίστηκαν ως φυσιολογικοί και οι υπόλοιποι με διάφορους βαθμούς αθηροσκλήρωσης (ινώδης, ασβεστοποιημένη πλάκα). Σε πέντε (5) περιπτώσεις είχαμε πλήρη ιστολογική εξέταση των ιστών. Για την διέγερση χρησιμοποιήθηκαν ένα ή δύο διαφορετικά μήκη κύματος.

Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν είναι πάρα πολύ ενθαρρυντικά. Και σε αυτή την περίπτωση καλύτερα αποτελέσματα αποκτήθηκαν με την ταυτόχρονη χρήση δύο μηκών κύματος για την ακτινοβολία των δειγμάτων. **Με την επεξεργασία με νευρωνικά δίκτυα έγινε δυνατή η διάκριση όχι μόνο φυσιολογικού ιστού από ινώδη και ασβεστοποιημένη πλάκα, αλλά επιπλέον επιτεύχθηκε και η διάκριση ινώδους από ασβεστοποιημένη πλάκα.** Αυτή η διαφοροποίηση μεταξύ των πλακών δεν είχε παρατηρηθεί κατά

την ανάλυση των ίδιων φασμάτων με τη χρήση των δώδεκα απλών αλγεβρικών αλγορίθμων. Αυτό είναι λογικό διότι, με την επεξεργασία των δεδομένων με νευρωνικά δίκτυα αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου, καθώς η σύγκριση μεταξύ των φασμάτων βασίζεται σε περισσότερες πληροφορίες εν σχέση με τις πέντε ως επτά φασματικές περιοχές που λαμβάνουμε υπόψη μας κατά την ανάλυση με τους δώδεκα αλγόριθμους. **Ουσιαστικά δηλαδή, με τα νευρωνικά δίκτυα παίρνουμε πληροφορίες από όλη την δομή των καταγραφόμενων φασμάτων φθορισμού από τους ιστούς και δεν εστιάζομαστε απλά σε κάποιες επιλεγμένες περιοχές ("κορυφές" και "κοιλιάδες") εύρους μερικών nm, που είναι η τακτική που ακολουθείται κατά την επεξεργασία των σημάτων με τους αλγόριθμους.**

Η δομή του τεχνητού νευρωνικού δικτύου που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση των φασμάτων φθορισμού, που προήλθαν από την ακτινοβόληση των περιφερειακών αγγείων, παρουσιάζεται στο σχήμα 4-13. Αποτελούνταν από δύο μέρη. Στο πρώτο, ολόκληρες οι κατανομές των συλλεγόμενων φασμάτων από τους ιστούς λαμβάνονταν ως εισερχόμενα δεδομένα. Ένα μη γραμμικό φίλτρο (nonlinear filter) βασισμένο στο σχεδιασμό ενός υψηλής τάξης νευρωνικού δικτύου (High Order Neural Network HONN) εκτελούσε την εξαγωγή των δεδομένων. Οι χαρακτηριστικές τιμές αντιστοιχούσαν στα υπό ακτινοβόληση δείγματα. Το δεύτερο μέρος αποτελούνταν από ένα κλασσικό πολλών επιπέδων νευρωνικό δίκτυο (Multi-Layer Perceptron Neural Network) με σιγμοειδείς συναρτήσεις (sigmoid activation functions). Με τη βοήθεια του επιτυγχάνονταν η διάκριση των δεδομένων σε μία από τις τρεις προκαθορισμένες κατηγορίες (φυσιολογική αρτηρία, ινώδη, ασβεστοποιημένη πλάκα).

Πρέπει να σημειωθεί ότι, πριν οποιαδήποτε διαδικασία ανάλυσης λάβει χώρα, τα εισερχόμενα δεδομένα και στα δύο μέρη είχαν γραμμικά κανονικοποιηθεί στη περιοχή μεταξύ 0 και 1. Αυτό έγινε έχοντας ως στόχο, την αποφυγή της εμφάνισης αποσταθεροποιητικών μηχανισμών που προέρχονταν από καθαρά αριθμητικούς λόγους (π.χ. πολύ υψηλές μεταβολές στις αριθμητικές τιμές των πραγματικών φασμάτων). Επομένως, και τα αποτελέσματα ήταν στην περιοχή από 0 έως 1.



Σχ. 4-13 Το μοντέλο της διάταξης του νευρωνικού δικτύου που χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση ανθρώπινων περιφερειακών αγγείων.

Ακολουθως, θα περιγραφεί περιληπτικά ο τρόπος επεξεργασίας των φασμάτων φθορισμού με τη χρήση του τεχνητού νευρωνικού δικτύου. Αρχικά, τα κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού πέρασαν μέσα από ένα μη γραμμικό φίλτρο βασισμένο σε μίας υψηλής τάξης νευρωνικό δίκτυο για την εξαγωγή των δεδομένων. Τα υψηλής τάξης νευρωνικά δίκτυα είναι ενός επιπέδου, τελείως διασυνδεδεμένα δίκτυα που περιέχουν υψηλής τάξης συνδέσεις από σιγμοειδείς συναρτήσεις στους νευρώνες τους. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε ένα νευρωνικό δίκτυο με πέντε όρους υψηλής τάξης. Τα βάρη του υψηλής τάξης νευρωνικού δικτύου ρυθμίζονταν μέσω σταθερών νόμων εκμάθησης (stable learning laws) που προέρχονταν από την θεωρία Lyapunov. Με τη βοήθεια αυτών των νόμων εκμάθησης, η έξοδος από το φίλτρο σύγκλινε στο μηδέν και αυτό εγγυούταν το μικρότερο δυνατό προσεγγιστικό σφάλμα.

Υπολογίστηκε για κάθε φάσμα ένα δυσδιάστατο χαρακτηριστικό διάνυσμα $F=[f_1, f_2]^T$ στο οποίο:

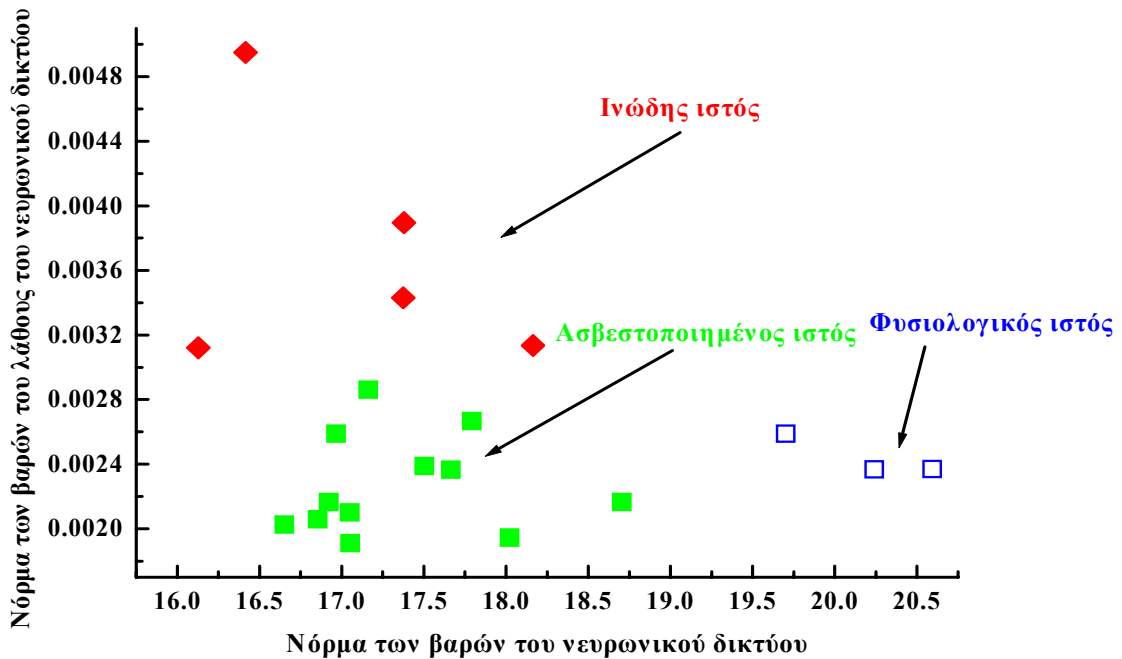
$$f_1 = \sum_{n=1}^N \left(\sum_{i=1}^5 w_i \right)$$

$$f_2 = \sum_{n=1}^N (y - \hat{y})^2$$

Όπου \hat{y} η έξοδος του υψηλής τάξης νευρωνικού δικτύου, N ο ολικός αριθμός δεδομένων που συμπεριλαμβάνονται σε κάθε συλλεγόμενο φάσμα, w_i , $i=1,2,\dots,5$ είναι τα βάρη του υψηλής τάξης νευρωνικού δικτύου (HONN), y η επιθυμητή τιμή για τα φάσματα.

Η διαδικασία εξαγωγής δεδομένων επαναλαμβάνονταν μέχρι η διαφορά στην Ευκλείδεια νόρμα των χαρακτηριστικών διανυσμάτων F , που προέρχονταν από δύο συνεχόμενες επαναλήψεις του ίδιου φάσματος φθορισμού, να είναι μικρότερη από 0.01. Τελικώς αποδείχθηκε ότι, δεκαπέντε (15) επαναλήψεις ήταν αρκετές. Στην τελευταία επανάληψη εξήχθησαν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα από το φάσμα. Όταν αποκτήθηκαν τα χαρακτηριστικά διανύσματα για όλα τα φάσματα, κανονικοποιήθηκαν ξανά σε κάθε διάσταση στην περιοχή από 0 έως 1

Στο παρακάτω διάγραμμα (σχήμα 4-14) ο χ άξονας αντιπροσωπεύει την νόρμα των βαρών του νευρωνικού δικτύου, ενώ ο ψ άξονας απεικονίζει την νόρμα των βαρών του λάθους (μετρούμενη προς την εκτιμώμενη από το νευρωνικό τιμή). Πρέπει να σημειωθεί ότι, όταν λέμε νόρμα, εννοούμε το άθροισμα των τετραγώνων των βαρών ή του λάθους αντίστοιχα. Είναι εμφανής, από το ακόλουθο σχήμα, η διάκριση των διαφορετικών τύπων ιστών.



Σχ. 4-14 Διάκριση διαφορετικών τύπων ιστών (φυσιολογικού, ινώδη, ασβεστοποιημένου) από ιγνυακή αρτηρία, κατόπιν επεξεργασίας των αντίστοιχων φασμάτων φθορισμού με τη χρήση νευρωνικών δικτύων. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα οι γραμμές 442nm (He-Cd) και 488nm (Ar⁺).

Κατόπιν, για τη διάκριση των ιστών τέθηκε σε εφαρμογή ένα πολλών επιπέδων νευρωνικό δίκτυο (MLP neural network) που εξασκήθηκε με τη χρήση ενός αλγόριθμου (backpropagation algorithm). Αυτά τα νευρωνικά δίκτυα πολλών επιπέδων (MLP) είναι στατικά μοντέλα συστημάτων του πραγματικού κόσμου, τα οποία χτίζονται ρυθμίζοντας μία ομάδα παραμέτρων. Οι παράμετροι, γνωστοί και ως βάρη, περιγράφουν ένα μοντέλο διαγράμματος μετασχηματισμού δεδομένων εισόδου σε τιμές εξόδου. Αυτού του είδους τα μη γραμμικά διαγράμματα ενσωματώνονται σε μία ομάδα επεξεργασίας κρυμμένων μονάδων. Το δίκτυο είναι κατανεμημένο σε επίπεδα μονάδων (perceptrons). Στη περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκε ένα MLP νευρωνικό δίκτυο με δύο κρυμμένα επίπεδα, που το καθένα περιείχε 8 μονάδες. Πριν τις τελικές ρυθμίσεις για το διαχωρισμό εφαρμόστηκε μία διαδικασία εκμάθησης και μία διαδικασία δοκιμής. Οι διαδικασίες εκμάθησης και διαχωρισμού ήταν

διαφορετικές (ο διαχωριστής μετά την εκμάθηση του διαχώριζε δεδομένα που δεν είχε ξαναεπεξεργαστεί). Τα σημεία που καθόριζαν τα όρια μεταξύ των διαφορετικών κατηγοριών (φυσιολογικό, ινώδη, ασβεστοποιημένο) χρησιμοποιούνταν στη διαδικασία εκμάθησης. Η διαδικασία δοκιμής δημιουργήθηκε τυχαία από τα υπόλοιπα σημεία. Η διαδικασία εκμάθησης δηλαδή, χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση του διαχωριστή (classifier), ενώ η διαδικασία δοκιμής εφαρμόστηκε για τον έλεγχο της λειτουργικότητας. Αφότου, ολοκληρώθηκε η διαδικασία εκμάθησης όλες οι σταθερές του MLP νευρωνικού δικτύου κρατήθηκαν σταθερές και ακολούθησε η διαδικασία δοκιμής. Η αποδοτικότητα του διαχωριστή υπολογίστηκε συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με τις επιθυμητές τιμές εξόδου για κάθε φάσμα φθορισμού.

Κάποια από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν παρουσιάζονται στο πίνακα που ακολουθεί (Πιν. 4-2). Οι πρώτες τρεις κολώνες αντιστοιχούν στις επιθυμητές τιμές εξόδου, οι επόμενες τρεις αντιστοιχούν στα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τη διαδικασία διαχωρισμού και η τελευταία είναι ο χαρακτηρισμός που δόθηκε στον υπό ακτινοβόληση ιστό από το διαγνωστικό σύστημα του τεχνητού νευρωνικού δικτύου. Παρατηρείται ότι, τα αποτελέσματα που εξήχθησαν εμφανίζουν 100% επιτυχία.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι, ο ολικός χρόνος που είναι απαραίτητος από το νευρωνικό δίκτυο (HONN και MLP) για την επεξεργασία του κάθε φάσματος φθορισμού του ιστού, είναι περίπου ένα δευτερόλεπτο (1 sec). Βεβαίως σε αυτόν τον χρόνο δεν υπολογίζεται το χρονικό διάστημα που είναι αναγκαίο για την εκμάθηση του διαχωριστή, η οποία όμως έχει πραγματοποιηθεί εκ των προτέρων. Αυτός ο πολύ μικρός χρόνος που απαιτείται για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων καθιστά χρήσιμη τη παρούσα τεχνική για εφαρμογές σε πραγματικό χρόνο (*in vivo* μετρήσεις).

Επιθυμητά αποτελέσματα			Αποτελέσματα διαχωριστή			Χαρακτηρισμός
0.0	1.0	0.0	0.000	1.000	0.004	ινώδη
1.0	0.0	0.0	0.999	0.000	0.022	ασβεστοποιημένο
0.0	0.0	1.0	0.013	0.005	0.963	φυσιολογικό
1.0	0.0	0.0	0.990	0.000	0.022	ασβεστοποιημένο
0.0	1.0	0.0	0.000	1.000	0.000	ινώδη

1.0	0.0	0.0	0.999	0.000	0.021	ασβεστοποιημένο
0.0	1.0	0.0	0.000	1.000	0.000	ινώδη
1.0	0.0	0.0	0.999	0.000	0.022	ασβεστοποιημένο
0.0	1.0	0.0	0.000	1.000	0.000	ινώδη
0.0	1.0	0.0	0.000	1.000	0.000	ινώδη
1.0	0.0	0.0	0.999	0.000	0.021	ασβεστοποιημένο

Πιν 4-2 Αποτελέσματα διάκρισης ιστών με χρήση τεχνητού νευρωνικού δικτύου.

Ως πηγή διέγερσης, για την απόκτηση των φασμάτων, χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα οι γραμμές 442nm (Ηλιο-Κάδμιο) και 488nm (ιόντων Αργού).

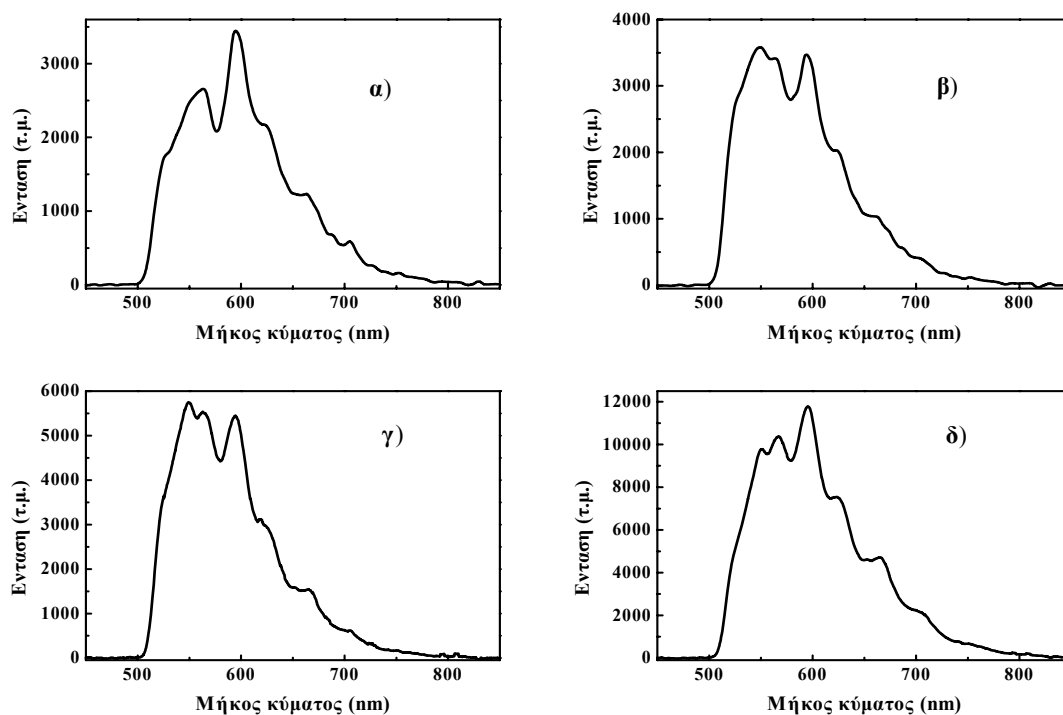
4.4

In vivo μετρήσεις

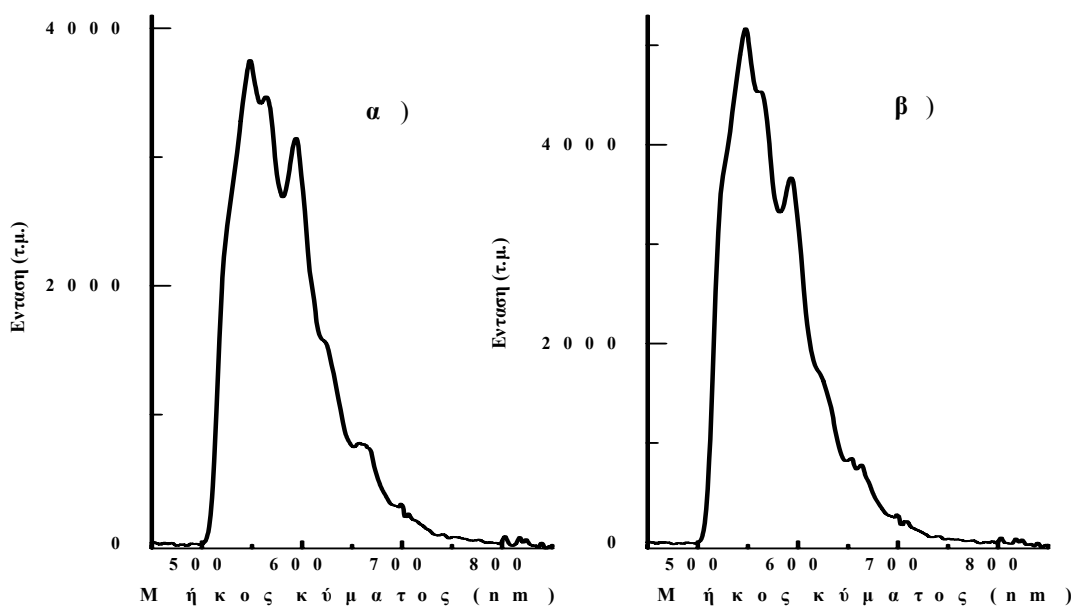
Εκτός από τις *in vitro* μετρήσεις συλλέχθηκε και ένας περιορισμένος αριθμός *in vivo* μετρήσεων. Αυτές πραγματοποιήθηκαν σε νοσοκομείο του Λονδίνου (The Royal London Hospital στο Whitechapel) κατά την διάρκεια εγχειρήσεων by-pass. Μελετήθηκαν *in vivo* δείγματα

από τέσσερις (4) ασθενείς (3 άντρες και μία γυναίκα). Ακτινοβολήθηκαν μία μασχालαία, δύο μηριαίες αρτηρίες και δύο κοιλιακές αορτές. Η πειραματική διάταξη είναι η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε και στα *in vitro* πειράματα (σχήμα 3-1). Η μόνη διαφορά είναι ότι, για τις *in vivo* μετρήσεις ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε μόνο το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου με γραμμική εκπομπής στα 442nm. Κατά την καταγραφή των φασμάτων φθορισμού από τους ιστούς τα φώτα στο θάλαμο του χειρουργείου παρέμεναν κλειστά με σκοπό να μειωθεί όσο το δυνατό περισσότερο το σήμα του θορύβου (background signal). Ο θόρυβος συλλεγόταν κατά την διάρκεια της ακτινοβολήσης του λέιζερ και ενώ η απόσταση της άκρης της ίνας από την αρτηρία ήταν περίπου ένα εκατοστό (1cm). Φάσματα φθορισμού πάρθηκαν όταν η άκρη της ίνας ήταν σε επαφή με την αρτηρία. Ακτινοβολήθηκαν φυσιολογικά δείγματα, αλλά και αθηροσκληρωτικές πλάκες. Ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων γινόταν κατόπιν εξέτασης από τους γιατρούς.

Κάποιες διαφοροποιήσεις στις κατανομές των συλλεγόμενων φασμάτων (*in vivo*) παρατηρήθηκαν μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού αρτηριακού ιστού. Αυτές οι διαφορές εντοπίζονται στην περιοχή μεταξύ 550-700nm και έχουν να κάνουν με τις σχετικές εντάσεις των δύο κύριων κορυφών των φασμάτων φθορισμού (στα 550 και 600nm). Όλα αυτά παρουσιάζονται αναλυτικά στα δύο επόμενα διαγράμματα (σχήματα 4-15, 4-16). Παρά το μικρό αριθμό των *in vivo* μετρήσεων τα αρχικά αποτελέσματα είναι πάρα πολύ ενθαρρυντικά σε ότι αφορά τη διάκριση του φυσιολογικού από τον παθολογικό ιστό. Επιπλέον φαίνεται αυτά τα αποτελέσματα να είναι σε συμφωνία και με τις *in vitro* μετρήσεις. Ωστόσο, επιπλέον μετρήσεις είναι απαραίτητες για να επιβεβαιώσουν αυτές τις παρατηρήσεις και να οδηγήσουν σε ασφαλή συμπεράσματα.



Σχ. 4-15 Φάσματα φθορισμού από *in vivo* μετρήσεις από κοιλιακή αορτή, α) παθολογικό (ασβεστοποιημένο), β) και γ) φυσιολογικό, δ) παθολογικό (ασβεστοποιημένο). Τα α) και β) είναι φάσματα που προήλθαν από την εξωτερική επιφάνεια της αορτής, ενώ τα γ) και δ) από την εσωτερική. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm).



Σχ. 4-16 Φάσματα φθορισμού (*in vivo*), α) από φυσιολογική μασχαλιαία αρτηρία, β) από αθηροσκληρωτική μηριαία αρτηρία. Όλα τα φάσματα αποκτήθηκαν από την εσωτερική επιφάνεια των αγγείων. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm).

4.5 Συμπεράσματα

Φάσματα φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια ακτινοβολήσης φυσιολογικών και αθηροσκληρωτικών περιφερειακών αγγείων. Όλα τα δείγματα προήλθαν από εγχειρήσεις by-pass ή από ακρωτηριασμούς. Σε δώδεκα περιπτώσεις υπήρξε πλήρης ιστολογική ανάλυση των δειγμάτων. **Όλα τα φάσματα φθορισμού που παρουσιάστηκαν σε αυτό το κεφάλαιο, προέρχονται από δείγματα των οποίων η ταξινόμηση βασίστηκε στα αποτελέσματα αυτών των ιστολογικών εξετάσεων.** Όμως πρέπει να τονιστεί ότι, σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα των ιστολογικών εξετάσεων συνέπιπταν με το χαρακτηρισμό των δειγμάτων που δόθηκε από τους γιατρούς (κατόπιν μακροσκοπικής εξέτασης). Ως πηγές διέγερσης χρησιμοποιήθηκαν τα λέιζερ Ηλίου-Καδμίου και ιόντων Αργού. Οι ιστοί ακτινοβολήθηκαν, μία ώρα περίπου μετά την εκτομή τους, είτε με ένα, είτε με δύο διαφορετικά μήκη κύματος.

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν να ερευνηθούν οι πιθανότητες διάκρισης των διαφορετικών τύπων ιστών (ινώδους, φυσιολογικού, ασβεστοποιημένου) με τη χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού. Δημιουργήθηκαν δώδεκα (12) απλοί αλγεβρικοί αλγόριθμοι με σκοπό να ανιχνεύσουν τυχόν φασματικές αλλαγές στα υπό ακτινοβολήση δείγματα και να τις συσχετίσουν με τους διάφορους βαθμούς αθηροσκλήρωσης. Επιπλέον, κάποια από τα φάσματα φθορισμού αναλύθηκαν και με την βοήθεια νευρωνικών δικτύων για την εξαγωγή όσο το δυνατό καλύτερων αποτελεσμάτων, σε ότι αφορά τη διάκριση των ιστών. Τέλος έγινε ένας περιορισμένος αριθμός *in vivo* μετρήσεων. Φάσματα φθορισμού συλλέχτηκαν κατά την διάρκεια εγχειρήσεων by-pass. Για πρακτικούς λόγους κατά την διάρκεια των *in vivo* πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ως πηγή διέγερσης μόνο το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm).

Στις *in vitro* μετρήσεις, με τους αλγόριθμους έγινε δυνατή η διάκριση τόσο του φυσιολογικού από τον ινώδη, όσο και του φυσιολογικού από τον ασβεστοποιημένο αρτηριακό ιστό. Οι αλγόριθμοι που εμφάνισαν τα

καλύτερα ποσοστά επιτυχίας στη διάκριση, ήταν αυτοί που σύγκριναν την πρώτη κύρια κορυφή του φθορισμού (στα 550nm) με την κόκκινη φασματική περιοχή (μετά τα 650nm). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένα, στη πρώτη κύρια κορυφή του καταγραφόμενου φάσματος μεγαλύτερη είναι η συμβολή από το φθορισμό των φλαβινών, ενώ όσο προχωράμε σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (κόκκινη περιοχή) αυξάνει η συνεισφορά από το φθορισμό των πορφυρινών του ιστού.

Η χρήση ταυτόχρονα δύο διαφορετικών μηκών κύματος για διέγερση φαίνεται να αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα στη εφαρμογή των αλγορίθμων για τη διάκριση των διαφορετικών τύπων ιστών. Αυτό είναι πιο εμφανές στη περίπτωση σύγκρισης φυσιολογικού και ινώδους ιστού. Όσον αφορά στη σύγκριση φυσιολογικού και ασβεστοποιημένου ιστού, τόσο η χρήση ενός, όσο και δύο διαφορετικών μηκών κύματος για διέγερση, απέδωσαν παρόμοια αποτελέσματα στο διαχωρισμό.

Κατά την ακτινοβολήση των δειγμάτων με τις γραμμές 442+488nm και 442+496.5nm εξήχθησαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά την ταξινόμηση των διαφορετικών τύπων ιστών. Με το συνδυασμό αυτών των γραμμών επιτυγχάνεται και η καλύτερη διέγερση των φλαβινών (με τη γραμμή 442nm), αλλά και η διέγερση ορισμένων από τις πορφυρίνες του ιστού (με την χρήση της γραμμής 488nm ή της 496.5nm).

Από όλα αυτά προκύπτει ότι ο συνδυασμός ενός και δύο διαφορετικών μηκών κύματος για την ακτινοβολήση των δειγμάτων μπορεί να δώσει επιπρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες που σχετίζονται με την εξέλιξη των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων.

Επίσης, αναλύθηκαν μερικά από τα συλλεγόμενα φάσματα φθορισμού με τη χρήση νευρωνικών δικτύων. **Η επεξεργασία με νευρωνικά δίκτυα επέτρεψε, εκτός από τη διάκριση φυσιολογικού από ινώδη ή ασβεστοποιημένο ιστό και τη διάκριση της ινώδους από την ασβεστοποιημένη πλάκα.** Με τη χρήση απλών αλγεβρικών αλγορίθμων λαμβάνονται υπόψη μόνο κάποιες περιοχές μερικών nm του φάσματος (κάποιες “κοιλιάδες” και “κορυφές”). Κατά την ανάλυση των ίδιων φασμάτων με την βοήθεια νευρωνικών δικτύων πληροφορίες εξάγονται από όλη την

κατανομή του φθορισμού. Αυτό έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου.

Στις *in vivo* μετρήσεις για την διέγερση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μόνο η γραμμή 442nm (λέιζερ Ηλίου-Καδμίου). Τα αρχικά αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά σε ότι αφορά τη διάκριση φυσιολογικών από παθολογικά περιφερειακά αγγεία. Ωστόσο, επιπλέον πειράματα (*in vivo*) είναι απαραίτητα για να υποστηρίξουν και να επιβεβαιώσουν αυτές τις πρωταρχικές παρατηρήσεις.

In vitro και *in vivo* μετρήσεις φθορισμού σε καρδιές ανθρώπων και αμνών

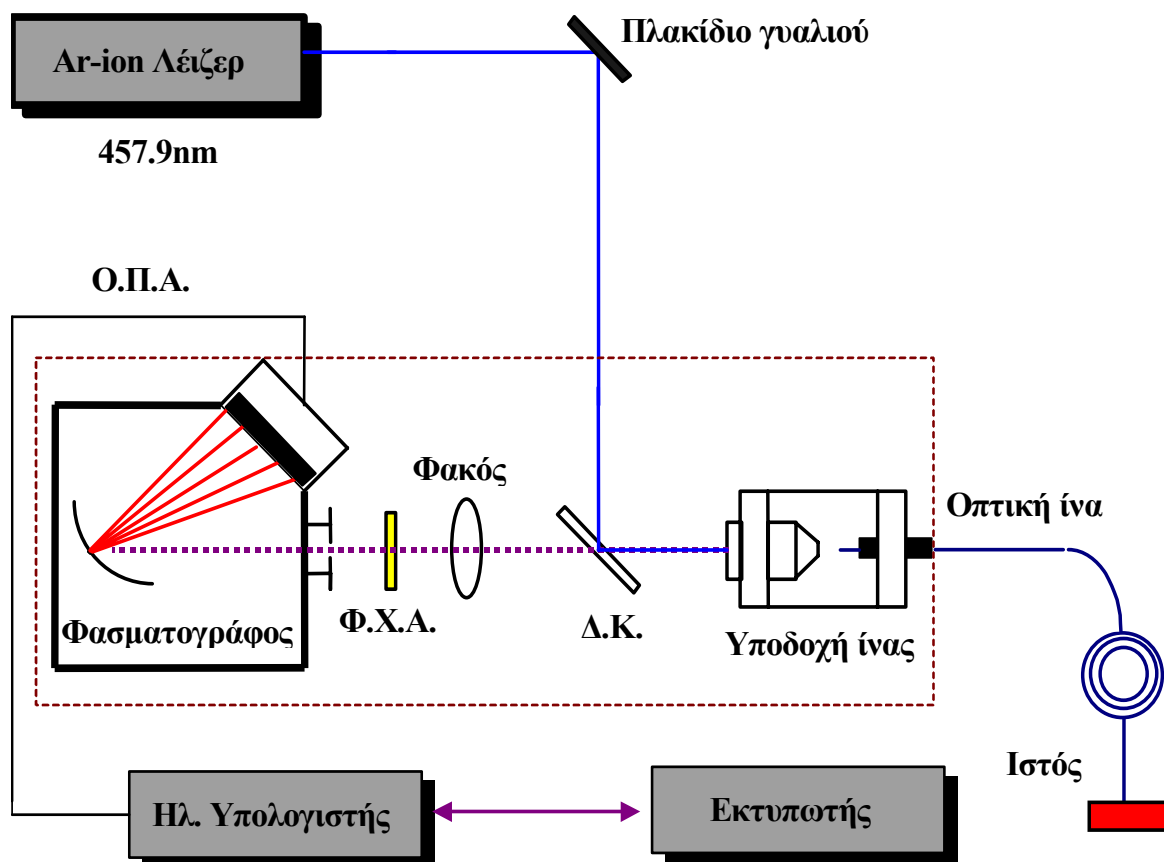
- 5.1 *Εισαγωγή*
- 5.2 *Πειραματική διάταξη*
 - Δείγματα*
 - Καταγραφή του φθορισμού*
- 5.3 *Αποτελέσματα*
 - Ανάλυση αποτελεσμάτων*
 - Επίδραση της συντήρησης σε φορμόλη*
- 5.4 *In vivo μετρήσεις*
- 5.5 *Συμπεράσματα*

5.1 Εισαγωγή

Στο πέμπτο κεφάλαιο θα μελετηθούν φάσματα φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ που καταγράφηκαν (*in vitro*) από καρδιές αμνών και ανθρώπων. Θα περιγραφεί η πειραματική διάταξη, τα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν και ο τρόπος καταγραφής του φθορισμού. Φάσματα που συλλέχτηκαν από διάφορες ανατομικές περιοχές (κόλπους, κοιλίες, αορτή, μυοκάρδιο) θα εκτεθούν και θα εξεταστεί η σταθερότητα των μετρήσεων σε κάθε κοιλότητα καθώς και οι μεταβολές της έντασης του σήματος σε διαφορετικές θέσεις της καρδιάς. Με τη χρήση δώδεκα αλγορίθμων, βασισμένων στις διαφορές της έντασης, θα γίνει προσπάθεια να εντοπιστούν τυχόν διαφορές στα σήματα φθορισμού που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της καρδιάς. Επίσης, θα μελετηθεί η επίδραση της συντήρησης (για 48 ώρες) σε φορμόλη στο φάσμα εκπομπής των ιστών. Τέλος, θα παρουσιαστεί ένας αριθμός *in vivo* μετρήσεων που πάρθηκαν κατά τη διάρκεια εγχειρήσεων ανοιχτής καρδιάς.

5.2 Πειραματική διάταξη

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για την απόκτηση των φασμάτων φθορισμού *in vitro* από καρδιές αμνών και ανθρώπων παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί:



Σχ.5-1 Πειραματική διάταξη για τη καταγραφή φασμάτων φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ, από καρδιές αμνών και ανθρώπων (in vitro). ΔΚ, διχροϊκός καθρέπτης, ΦΧΑ, φίλτρο αποκλεισμού χαμηλών μηκών κύματος, ΟΠΙΑ οπτικός πολυκαναλικός αναλυτής.

Όπως είναι εμφανές και από το σχήμα 5-1, η πειραματική διάταξη έχει αρκετές ομοιότητες με αυτή που χρησιμοποιήθηκε και στις προηγούμενες

σειρές μετρήσεων σε περιφερειακά αγγεία (σχήμα 3-1). Το λέιζερ ιόντων Αργού με γραμμή εκπομπής στα 457.9nm χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβόληση των καρδιών (στα *in vitro* πειράματα). Παρατηρήθηκε ότι, τα συλλεγόμενα φάσματα φθορισμού που προέρχονται από τις καρδιές εμφανίζουν σαφώς μικρότερη ένταση σε σχέση με αυτά που προήλθαν από περιφερειακά αγγεία. Έτσι η επιλογή του λέιζερ ιόντων Αργού βασίστηκε στο γεγονός ότι, απαιτήθηκε μεγαλύτερη ισχύ συγκριτικά με αυτή που μπορεί να αποδώσει το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου στην άκρη της ίνας για την διέγερση των δειγμάτων. Όσον αφορά τη γραμμή εκπομπής (457.9nm), επιλέχτηκε για την όσο δυνατό καλύτερη διέγερση των φλαβινών ($\lambda_{\text{απορ.}} \sim 450\text{nm}$) που περιέχονται στους υπό ακτινοβόληση ιστούς.

Απο τη δέσμη του λέιζερ ιόντων Αργού χρησιμοποιούνταν μόνο η ανάκλαση από το γυαλί (~4% της αρχικής δέσμης). Η δέσμη κατευθυνόταν κατάλληλα με τη βοήθεια διχροϊκού καθρέπτη (99% ανακλαστικότητα στα 441.6nm, υπό γωνία πρόσπτωσης 45 μοιρών). Η μέση ισχύς της δέσμης στην άκρη της ίνας κατά την διάρκεια των μετρήσεων ήταν της τάξης των 12~15mWatt. Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε, τόσο για την διέγερση όσο και για την συλλογή του φθορισμού, είχε διάμετρο πυρήνα 500μm.

Δείγματα

Μελετήθηκαν δείγματα από εικοσιπέντε (25) καρδιές αμνών. Όλες προήλθαν από πρόβατα ηλικίας κάτω των 6 μηνών. Τα δείγματα συλλέχτηκαν αμέσως μετά την σφαγή των ζώων και οι καρδιές αφαιρέθηκαν μαζί με τον περικαρδιακό σάκο. Μεταφέρθηκαν σε ισοθερμικά δοχεία, τυλιγμένες σε πλαστική μεμβράνη για να αποφευχθεί η αφυδάτωση τους. Όλες οι καρδιές ακτινοβολήθηκαν μέσα σε δύο ώρες από τη σφαγή του ζώου. Κατά την διάρκεια της εξέτασης η θερμοκρασία του δείγματος ήταν η θερμοκρασία του εργαστηρίου, που κυμαινόταν από 22 έως 24 βαθμούς Κελσίου. **Όλα τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν μακροσκοπικά ως υγιή και δεν αναγνωρίστηκαν περιοχές στο ενδοκάρδιο με ουλώδη συνδετικό ιστό (εμφραγματικές περιοχές).** Αυτό άλλωστε ήταν αναμενόμενο εξαιτίας του νεαρού της ηλικίας των ζώων.

Οι κοιλίες και οι κόλποι διανοίχτηκαν κατά μήκος του ελεύθερου τοιχώματος τους. Τα παρασκευάσματα καθαρίστηκαν και ξεπλύθηκαν με φυσιολογικό ορό. Κατά την διάρκεια της ακτινοβολήσής τους τοποθετήθηκαν σε μία γάζα ποτισμένη με φυσιολογικό ορό με σκοπό να παραμείνουν υγρά. Από κάθε κοιλότητα (αριστερή και δεξιά κοιλία, αριστερός και δεξιός κόλπος) πάρθηκαν τέσσερις μετρήσεις. Επίσης, εξήχθησαν δύο μετρήσεις από την αορτή, το μυοκάρδιο το επικάρδιο και τις εναποθέσεις λίπους. Οι μετρήσεις στις κοιλίες πάρθηκαν από την κορυφή (1), από την μεσότητα του μεσοκοιλιακού διαφράγματος (1), από την μεσότητα του πρόσθιου θηλοειδούς μυός (1) και από το ελεύθερο τοίχωμα της κοιλίας. Στους κόλπους, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο ελεύθερο τοίχωμα (1), στο ωτίο (2) και στο μεσοκολπικό διάφραγμα. Μετά το τέλος κάθε πειράματος τα δείγματα συντηρούνταν σε φορμόλη (10%). Ακτινοβολούνταν ξανά μετά από σαρανταοκτώ (48) ώρες.

Επιπλέον, ακτινοβολήθηκαν ιστοί από δύο (2) ανθρώπινες καρδιές. Τα δείγματα προήλθαν από το νεκροτομείο μία ώρα μετά την εκτομή τους. Υπολογίζεται ότι οι καρδιές ακτινοβολήθηκαν περίπου έξι (6) ώρες μετά το θάνατο του ασθενούς. Και σε αυτά τα πειράματα όμοια διαδικασία (όπως αυτή για τις καρδιές των αμνών) ακολουθήθηκε για την επεξεργασία των δειγμάτων.

Καταγραφή φθορισμού

Ο στόχος και σε αυτές τις σειρές μετρήσεων ήταν η λήψη φασμάτων φθορισμού από τις καρδιές, απαλλαγμένα από το θόρυβο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απόκτηση αυτών των “καθαρών” φασμάτων, ήταν όμοια με αυτή που εφαρμόστηκε και στα περιφερειακά αγγεία.

Ο θόρυβος καταγράφηκε κατά την διάρκεια ακτινοβολήσής σε φυσιολογικό ορό από το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm). Το συλλεγόμενο σήμα θεωρήθηκε ως ο φθορισμός από την οπτική ίνα, το φυσιολογικό ορό, το φωτισμό του εργαστηρίου, τη γάζα πάνω στην οποία ήταν τοποθετημένες οι καρδιές και όλες τις υπόλοιπες πηγές θορύβου. Το φάσμα θορύβου αφαιρούνταν αυτομάτως από κάθε φάσμα που καταγραφόταν από τα δείγματα.

Για κάθε μία σειρά μετρήσεων ένα νέο φάσμα θορύβου συλλέγονταν και αυτόματα αφαιρούνταν.

5.3 Αποτελέσματα

Για τους σκοπούς αυτής της έρευνας (για τις *in vitro* μελέτες) χρησιμοποιήθηκαν καρδιές αμνών και ανθρώπων. Η δυσκολία συλλογής ανθρώπινων καρδιών οδήγησε στο περιορισμένο αριθμό τους ($n=2$). Από την άλλη μεριά όμως, χρησιμοποιήθηκαν αρκετές καρδιές αμνών ($n=25$) για ακτινοβόληση, λόγω της ευκολίας συλλογής τους από νεαρά ζώα. Αυτές οι καρδιές κατά τεκμήριο χαρακτηρίστηκαν ως υγιείς. Ως πηγή διέγερσης σε όλες τις *in vitro* μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού με γραμμή εκπομπής στα 457.9nm (μπλέ).

Η φασματοσκοπία φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ θα μπορούσε να αποδειχθεί χρήσιμο εργαλείο στη προσπάθεια ανίχνευσης παθολογικών καταστάσεων του μυοκαρδίου (μυοκαρδιοπάθειες, ενδομυοκαρδιακή ίνωση, μυοκαρδίτιδες, δυσπλαστική δεξιά κοιλία κλπ) ή και απόρριψης μοσχεύματος σε μεταμοσχευμένη καρδιά.

Τα δύο βασικά της πλεονεκτήματα συγκριτικά με τη βιοψία είναι πρώτον η δυνατότητα πολλαπλών μετρήσεων από διαφορετικά σημεία σε μία συνεδρία και δεύτερον η δυνατότητα των άμεσων αποτελεσμάτων.

Οι περισσότερες μελέτες φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ σε καρδιές (*in vitro*), που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα, βασίζονται στην εξέταση μικρών ιστολογικών παρασκευασμάτων [1,2]. Ο στόχος των πιο πολλών ερευνών έγκειται στη προσπάθεια να δοθούν απαντήσεις σε συγκεκριμένα ερωτήματα.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν ολόκληρες και κατά τεκμήριο φυσιολογικές καρδιές [3-5]. Με αυτό τον τρόπο μελετήθηκε ολοκληρωμένα το φάσμα εκπομπής του μυοκαρδιακού ιστού.

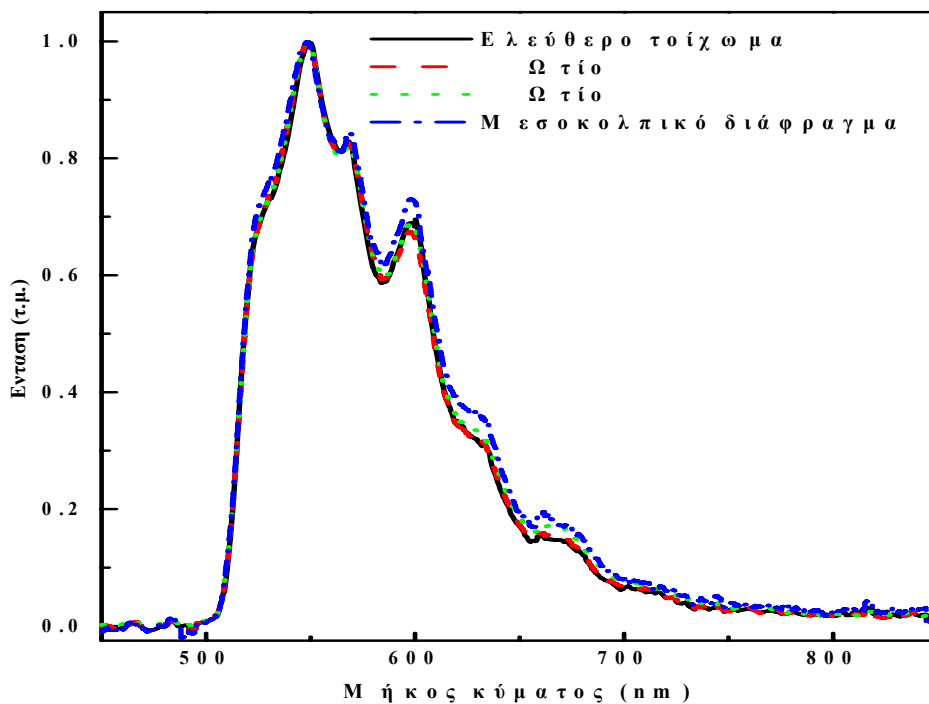
Ερευνήθηκαν τα βασικά χαρακτηριστικά του φθορισμού (ένταση, μορφολογία), αλλά έγινε και προσπάθεια να συσχετιστούν τα φάσματα φθορισμού με συγκεκριμένες ανατομικές θέσεις. Εξετάστηκε η σταθερότητα των φασμάτων φθορισμού μέσα σε μία κοιλότητα και ερευνήθηκαν οι πιθανότητες να εντοπιστούν τυχόν διαφορές στα φάσματα εκπομπής μεταξύ των διαφορετικών κοιλοτήτων της καρδιάς. Οι παρατηρήσεις και τα συμπεράσματα που εξήχθησαν, όπως είναι φυσικό, είναι αρκετά χρήσιμα στην περίπτωση χρησιμοποίησης της μεθόδου αυτής (φασματοσκοπία φθορισμού επαγομένη από λέιζερ), για καθαρά κλινικούς σκοπούς.

Παρατηρήθηκε λοιπόν, αξιοσημείωτη σταθερότητα των μετρήσεων μέσα σε κάθε ανατομική περιοχή (κόλπος ή κοιλία ή αορτή). Δεν εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των σημείων κάθε κοιλότητας (αριστερή και δεξιά κοιλία, αριστερός και δεξιός κόλπος), τόσο ως προς το ύψος της έντασης όσο και ως προς τη μορφολογία των φασμάτων φθορισμού. Δηλαδή μέσα σε κάθε κοιλότητα τα φάσματα φθορισμού ήταν σταθερά και ανεξάρτητα της ανατομικής θέσης από όπου λαμβάνονταν. Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι, η σταθερότητα των μετρήσεων εντός μίας ανατομικής περιοχής ήταν ανεξάρτητη από το είδος της καρδιάς (από αμνό ή άνθρωπο) που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα. Στο σχήμα 5-2 παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού από τέσσερα σημεία από τον αριστερό κόλπο μίας καρδιάς αμνού.

Οι ανθρώπινες καρδιές που ακτινοβολήθηκαν χαρακτηρίστηκαν από τους γιατρούς ως υγιείς. Επίσης, όλες οι καρδιές αμνών προήλθαν από νεαρά υγιή ζώα. Επομένως, μία αλλαγή τόσο στην μορφολογία όσο και στην ένταση των καταγραφόμενων φασμάτων φθορισμού είναι δυνατό να συνδεθεί με την ύπαρξη πιθανής αλλοίωσης και βλάβης στη συγκεκριμένη περιοχή.

Πέρα από τη σταθερότητα των μετρήσεων σε κάθε μία ανατομική περιοχή, διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των περιοχών (κόλπος, κοιλία, αορτή) σε ότι αφορά την ένταση των φασμάτων φθορισμού. Τα φάσματα φθορισμού, που προήλθαν από την αορτή, είχαν κατά πολύ υψηλότερη ένταση σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες κοιλότητες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι κόλποι εμφανίζουν υψηλότερη φασματική ένταση από τις κοιλίες. Επίσης, ο αριστερός κόλπος παρουσιάζει αισθητά

υψηλότερη ένταση φθορισμού από το δεξιό. Όσο αφορά τις δύο κοιλίες δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους ως προς το ύψος της έντασης των καταγραφόμενων φασμάτων φθορισμού αν και εμφανίζεται μία υπεροχή της αριστερής κοιλίας. Γενικότερα μπορεί να λεχθεί ότι, το αριστερό μέρος της καρδιάς αποδίδει υψηλότερης έντασης σήματα φθορισμού συγκριτικά με το δεξιό μέρος, τόσο στους κόλπους όσο και στις κοιλίες. Όλα αυτά παρατίθενται



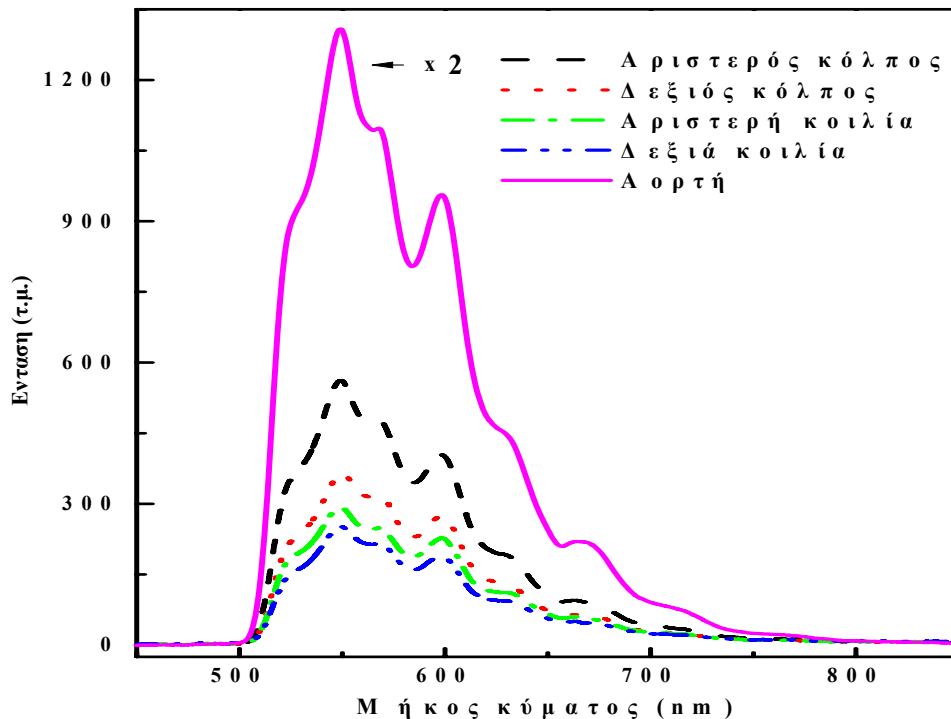
Σχ.5-2 Κανονικοποιημένα φάσματα φθορισμού από τέσσερα σημεία από τον αριστερό κόλπο μίας υγιούς καρδιάς αμνού. Το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm) χρησιμοποιήθηκε ως πηγή διέγερσης.

στο διάγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 5-3).

Τα φάσματα φθορισμού που καταγράφηκαν από εναποθέσεις λίπους από καρδιές αμνών εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία σε σχέση με τα φάσματα που συλλέχθηκαν από τις υπόλοιπες ανατομικές περιοχές (κόλπους, κοιλίες, αορτές). Αυτό είναι εμφανές και από το διάγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 5-4).

Επίσης παρατηρήθηκε ότι, τα σήματα φθορισμού που προήλθαν από εναποθέσεις λίπους δεν εμφανίζουν σταθερότητα, ούτε ως προς την ένταση τους ούτε ως προς την μορφολογία τους, κατά την διάρκεια ακτινοβόλησης διαφορετικών καρδιών από αμνούς. Οι εναποθέσεις λίπους στη καρδιά έχουν άμεση εξάρτηση από την τροφή του ζώου, άρα και τα φάσματα φθορισμού που προέρχονται από αυτές επηρεάζονται από την τροφή και για αυτό δεν παρουσιάζουν σταθερότητα.

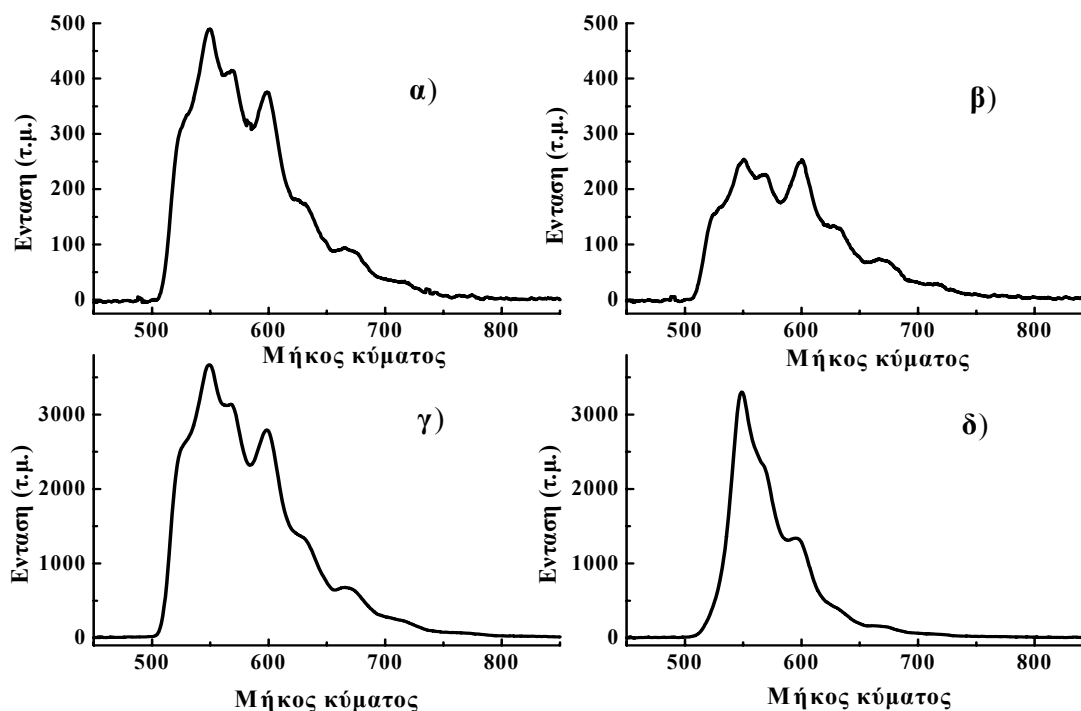
Σε ότι αφορά στις ανθρώπινες καρδιές, φαίνεται να εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες με τις αντίστοιχες των αμνών, τόσο στην σταθερότητα των μετρήσεων σε κάθε ανατομική περιοχή (κόλπος, κοιλία, αορτή), όσο και στις μεταβολές της έντασης των φασμάτων φθορισμού μεταξύ των



Σχ.5-3 Φάσματα φθορισμού από αορτή, αριστερό και δεξιό κόλπο, αριστερή και δεξιά κοιλία. Όλα τα φάσματα προήλθαν από καρδιά αμνού. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm).

διαφορετικών περιοχών. Έτσι και στις ανθρώπινες καρδιές, κυρίως η αορτή αλλά και οι κόλποι (ιδίως ο αριστερός), απέδωσαν υψηλότερης έντασης σήματα φθορισμού σε σχέση με τα υπόλοιπα μέρη της καρδιάς. Όλα αυτά βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με τα συμπεράσματα που εξήχθησαν και από τις καρδιές των αμνών.

Όμως διαπιστώθηκε ότι, τα φάσματα φθορισμού που καταγράφηκαν από το μυοκάρδιο της ανθρώπινης καρδιάς παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές στη φασματική τους κατανομή συγκριτικά με τα σήματα φθορισμού που προήλθαν από άλλες ανατομικές περιοχές (Σχήμα 5-5). Πρέπει να τονιστεί ότι, παρόμοιες φασματικές αλλαγές στο μυοκάρδιο δεν εμφανίστηκαν στην περίπτωση των καρδιών των αμνών. Πάντως, εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων (n=2) περαιτέρω μετρήσεις είναι αναγκαίες για την επιβεβαίωση αυτών των αρχικών παρατηρήσεων που αφορούν στο φθορισμό του ανθρώπινου μυοκαρδίου.

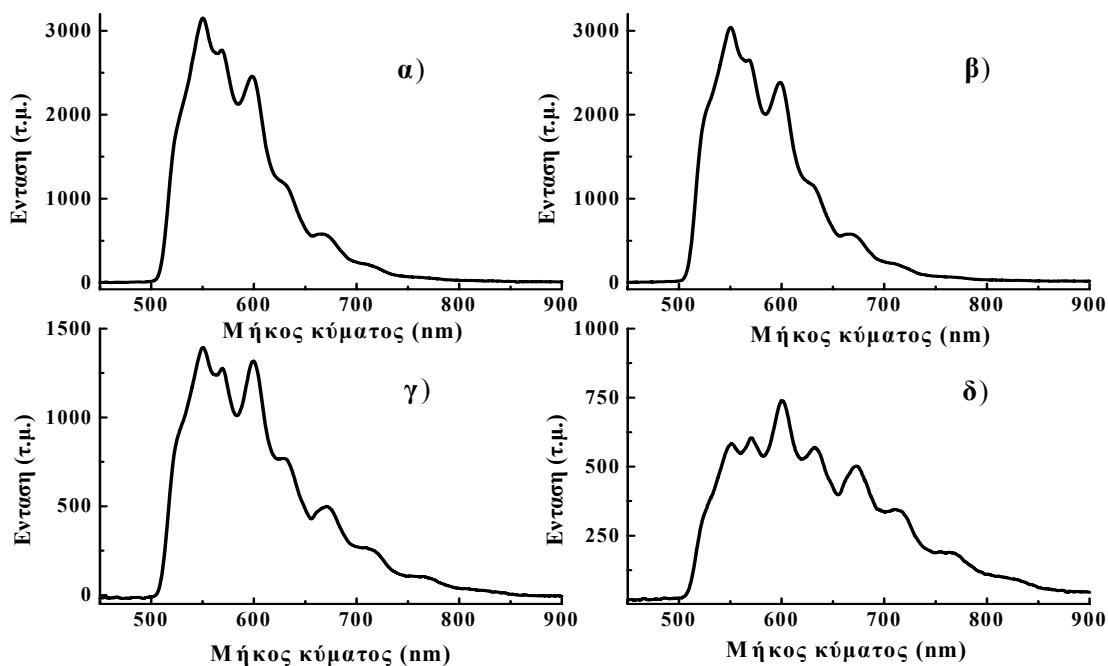


Σχ.5-4 Φάσματα φθορισμού από καρδιά αμνού α) από αριστερό κόλπο β) από δεξιό κόλπο γ) από αορτή δ) από εναποθέσεις λίπους. Για την ακτινοβολήση χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm).

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Και στη περίπτωση των καρδιών των αμνών, με την εφαρμογή δώδεκα (12) απλών αλγεβρικών αλγορίθμων αναλύθηκαν περαιτέρω τα φάσματα φθορισμού που συλλέχτηκαν από τα δείγματα. Με τη χρήση των αλγορίθμων έγινε προσπάθεια να εντοπιστούν μορφολογικές διαφορές μεταξύ φασμάτων που εξήχθησαν από διαφορετικές ανατομικές περιοχές της καρδιάς.

Κάθε φάσμα φθορισμού που καταγράφηκε από τις καρδιές των αμνών αναλύθηκε με τον ακόλουθο τρόπο: υπολογίστηκαν οι μέσες εντάσεις των φασματικών περιοχών 547-552nm (PE 1), 556-561nm (VA 1), 566-571nm (PE 2), 580-585nm (VA 2), 595-600nm (PE 3), 616-621nm (VA 3), και 666-671nm (PE 4). Με τη βοήθεια αυτών των παραμέτρων δημιουργήθηκαν οι δώδεκα διαφορετικοί αλγόριθμοι. Όλοι οι αλγόριθμοι βασίζονται στη σύγκριση των προαναφερόμενων φασματικών περιοχών (“κορυφών” και “κοιλιάδων”). Οι αλγόριθμοι εκτίθενται στον πίνακα 5-1.

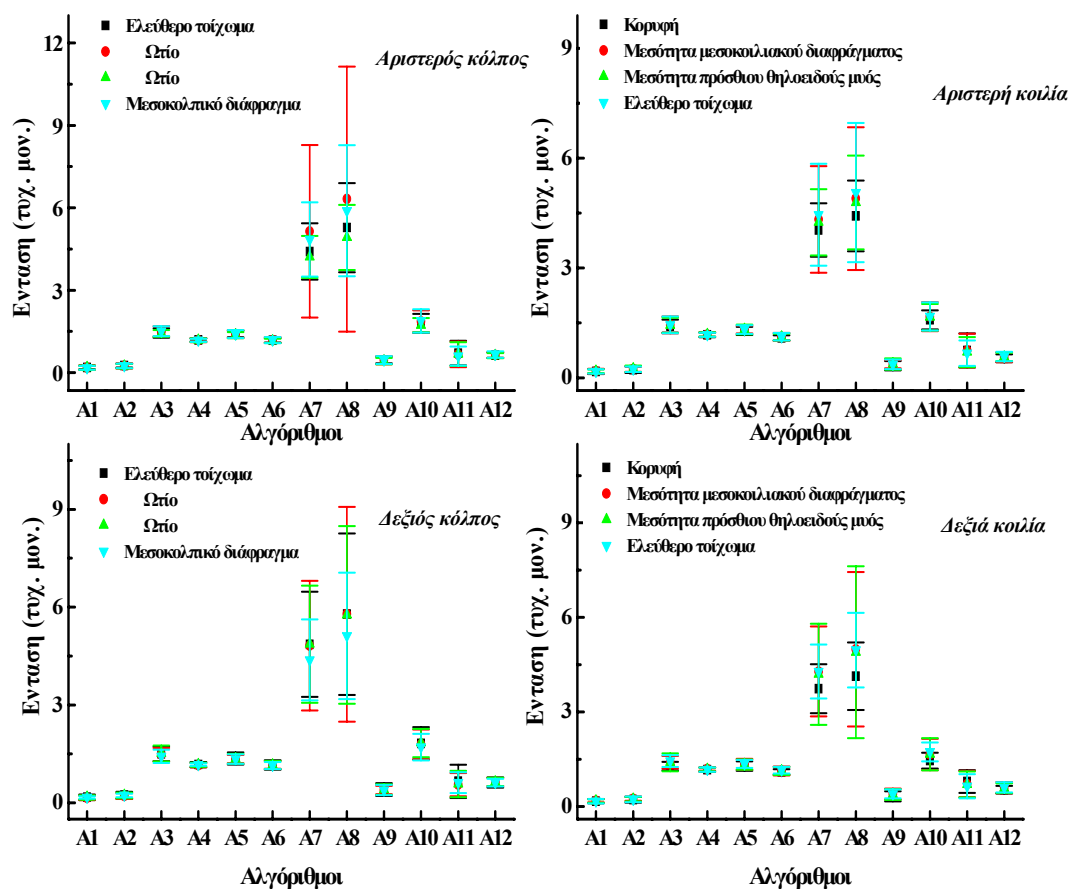


Σχ.5-5 Φάσματα φθορισμού από ανθρώπινη καρδιά, α) από αορτή β) από αριστερό κόλπο, γ) από αριστερή κοιλία δ) από μυοκάρδιο. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm).

$A1=PE1-PE2/VA1$	$A7=PE3/PE4$
$A2=PE1-PE2/VA2$	$A8=PE2/PE4$
$A3=PE3-PE4/VA3$	$A9=PE1-PE3/VA2$
$A4=PE1/PE2$	$A10=PE2-PE4/VA3$
$A5=PE1/PE3$	$A11=(PE1-VA1)/(PE2-VA2)$
$A6=PE2/PE3$	$A12=(PE2-VA2)/(PE3-VA3)$

Πιν 5-1 Οι 12 αλγόριθμοι (για καρδιές αμνών).

Παρατηρήθηκε ότι, όλοι οι αλγόριθμοι εμφάνισαν πάρα πολύ χαμηλά ποσοστά επιτυχίας στη διάκριση μεταξύ των διαφορετικών σημείων της κάθε κοιλότητας. **Ουσιαστικά δηλαδή δεν υπήρχαν σημαντικές ενδοκοιλιακές διαφορές.** Στο σχήμα 5-6 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές πειραματικές αποκλίσεις των δώδεκα αλγορίθμων στα τέσσερα σημεία κάθε κοιλότητας (αριστερής, δεξιάς κοιλίας, αριστερού, δεξιού κόλπου). Τα αποτελέσματα προέρχονται από την εφαρμογή των αλγορίθμων σε φάσματα φθορισμού που καταγράφηκαν από είκοσι (20) καρδιές αμνών.



Σχ.5-6 Οι μέσες τιμές και οι τυπικές πειραματικές αποκλίσεις της εφαρμογής των δώδεκα αλγορίθμων στα τέσσερα σημεία κάθε κοιλότητας (αριστερής και δεξιάς κοιλίας και κόλπου). Τα αποτελέσματα εξήχθησαν από είκοσι καρδιές αμνών. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm).

Όπως έχει αναφερθεί και προηγούμενα, διαπιστώθηκε ότι, το αριστερό μέρος της καρδιάς αποδίδει υψηλότερης έντασης σήματα φθορισμού συγκριτικά με το δεξιό, τόσο στους κόλπους όσο και στις κοιλίες. Ωστόσο, οι δώδεκα αλγόριθμοι δεν κατάφεραν, και σε αυτή την περίπτωση, να διαχωρίσουν το αριστερό από το δεξιό μέρος της καρδιάς. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα φάσματα που συλλέχτηκαν από τις δύο κοιλίες (ή από τους δύο κόλπους) να ενοποιηθούν στην περαιτέρω επεξεργασία τους με τη χρήση των δώδεκα ημι-εμπειρικών αλγορίθμων.

Οι αλγόριθμοι όμως φαίνεται να εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας στη διάκριση μεταξύ κόλπου και κοιλίας και μεταξύ αορτής και κοιλίας. Από την άλλη μεριά παρουσιάζουν σαφώς χαμηλότερα ποσοστά

επιτυχίας σε ότι αφορά τη διάκριση μεταξύ αορτής και κόλπου. Στο σχήμα 5-7 εκτίθενται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις της εφαρμογής των δώδεκα αλγορίθμων στην αορτή, στις δύο κοιλίες (αριστερή και δεξιά) και στους δύο κόλπους. Τα φάσματα που συλλέχθηκαν από τις δύο κοιλίες (ή από τους δύο κόλπους) έχουν ενοποιηθεί στη περαιτέρω επεξεργασία με τη χρήση των αλγορίθμων.

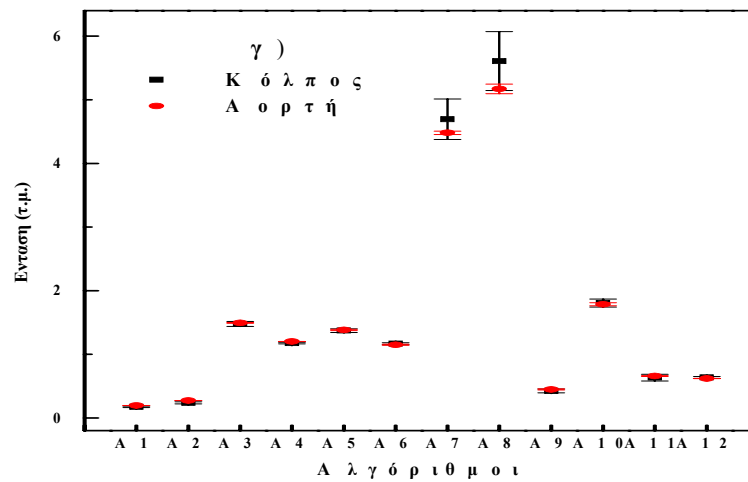
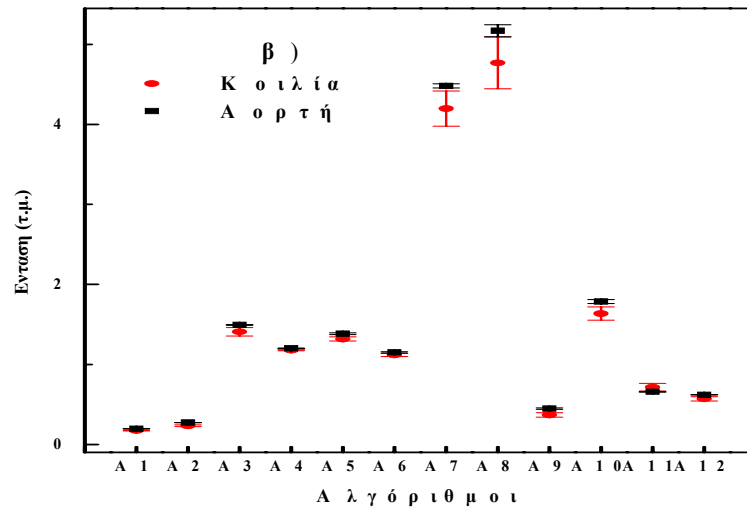
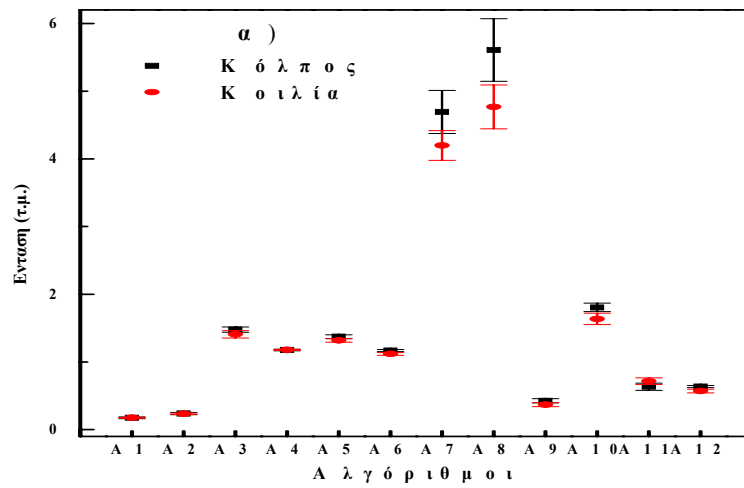
Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5-7 προέρχονται από την εφαρμογή των αλγορίθμων σε σήματα φθορισμού που εξήχθησαν από είκοσι καρδιές αμνών. Από κάθε δείγμα τέσσερα φάσματα καταγράφηκαν από κάθε κοιλότητα και δύο φάσματα συλλέχθηκαν από την αορτή. Όλα αυτά οδήγησαν στη δημιουργία πειραματικής τυπικής απόκλισης γύρω από τη μέση τιμή των αλγορίθμων.

Συγκεκριμένα οι αλγόριθμοι A8 και A10 παρουσίασαν υψηλότερες τιμές στους κόλπους και στις αορτές συγκριτικά με τις κοιλίες. Γενικότερα οι αλγόριθμοι που εμφάνισαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά τη διάκριση (εκτός από τους A8 και A10) ήταν οι A3, A7, A9 και A11. Οι περισσότεροι από αυτούς περιέχουν πληροφορίες που σχετίζονται με την κόκκινη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος ($\lambda \geq 665\text{nm}$).

Τόσο στην αορτή όσο και στους κόλπους υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση από ινώδη συνδετικό ιστό που περιέχει παρόμοιες χρωμοφόρες. Αυτή η μεγάλη συγκέντρωση ινώδη συνδετικού ιστού ευθύνεται για τα υψηλής έντασης σήματα φθορισμού που ελήφθησαν κυρίως από την αορτή αλλά και από τους κόλπους (ιδίως τον αριστερό), συγκριτικά με την ένταση των φασμάτων που καταγράφηκαν από τις κοιλίες.

Η διαφοροποίηση που παρουσιάστηκε στη μορφολογία των φασμάτων των κόλπων και των αορτών σε σχέση με τις κοιλίες, φαίνεται να οφείλεται στις διαφορετικές χρωμοφόρες που υπάρχουν σε αυτές τις ανατομικές περιοχές. Οι περισσότεροι αλγόριθμοι που εμφάνισαν υψηλά ποσοστά επιτυχίας στη διάκριση σχετίζονται με τη κόκκινη περιοχή του φάσματος. Επομένως, οι διαφοροποιήσεις στη μορφολογία των φασμάτων φθορισμού, που προήλθαν από αυτές τις ανατομικές περιοχές των καρδιών των αμνών,

πρέπει να σχετίζονται κατά κύριο λόγο με τη διαφοροποίηση του φθορισμού των πορφυρινών.



Σχ 5-7 Τα αποτελέσματα της εφαρμογής των δώδεκα αλγορίθμων (σε καρδιές αμνών), α) κόλπος και κοιλία β) κοιλία και αορτή γ) κόλπος και αορτή. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm).

Πέρα από τις καρδιές αμνών, ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν και ένας περιορισμένος αριθμός από ανθρώπινες καρδιές (n=2). Εν γένει παρουσιάστηκαν αρκετές ομοιότητες μεταξύ των φασμάτων φθορισμού που ελήφθησαν από ανθρώπινες καρδιές και αυτών που συλλέχτηκαν από τα ζώα (σταθερότητα μετρήσεων σε κάθε κοιλότητα, όμοιες μεταβολές της έντασης μεταξύ διαφορετικών ανατομικών περιοχών).

Επιπλέον, στις ανθρώπινες καρδιές παρατηρήθηκε ότι, σήματα φθορισμού που καταγράφηκαν από το μυοκάρδιο εμφανίζουν σημαντικές αλλαγές στην φασματική τους κατανομή (σχήμα 5-5). Στα φάσματα που εξήχθησαν από το ανθρώπινο μυοκάρδιο παρουσιάζεται μία αισθητή μείωση της έντασης της κορυφής του φθορισμού γύρω στα 550nm. Όπως έχει αναφερθεί και προηγούμενα, η κύρια συνεισφορά για τη δημιουργία αυτής της κορυφής προέρχεται από το φθορισμό των φλαβινών ($\lambda_{εκπ} \sim 550\text{nm}$) που βρίσκονται στον ιστό. Επίσης, εμφανίζεται μία σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού προς τα μεγαλύτερα μήκη κύματος (από τα 650 έως τα 800nm). Αυτή η αύξηση του σήματος στη κόκκινη και στη κοντινή υπέρυθρη περιοχή του φάσματος, πρέπει να προκαλείται κατά κύριο λόγο από το φθορισμό από τις πορφυρίνες του μυοκαρδίου.

Παρόλο τον περιορισμένο αριθμό των ανθρώπινων καρδιών που ακτινοβολήθηκαν, τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν ότι, στο ανθρώπινο μυοκάρδιο περιέχονται περισσότερες και διαφορετικές πορφυρίνες συγκριτικά με τις υπόλοιπες ανατομικές περιοχές της καρδιάς. Ο φθορισμός αυτών των πορφυρινών είναι υπεύθυνος κατά ένα μεγάλο ποσοστό για τη διαφοροποίηση που εμφανίζεται στη φασματική κατανομή των σημάτων που καταγράφηκαν από το μυοκάρδιο.

Επίδραση της συντήρησης σε φορμόλη

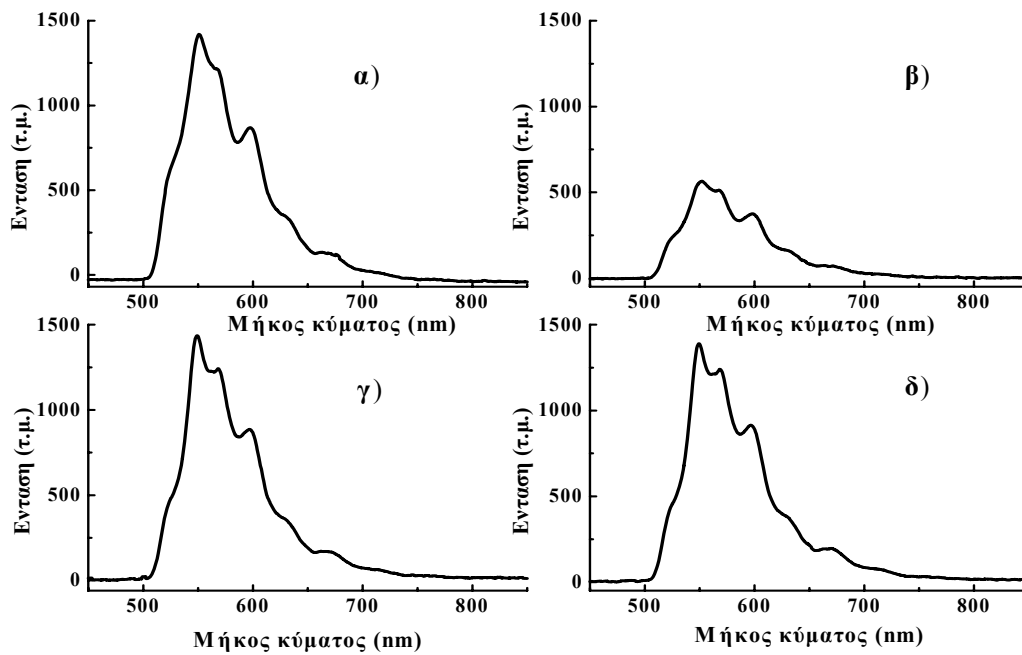
Επιπλέον, και στη περίπτωση των καρδιών (τόσο των αμνών όσο και των ανθρώπινων) μελετήθηκε η επίδραση της συντήρησης σε φορμόλη στο φάσμα φθορισμού των ιστών. Όλα τα δείγματα μετά το τέλος κάθε πειράματος συντηρούνταν σε φορμόλη (10%) και υπόκεινταν σε ακτινοβόληση ξανά μετά από σαρανταοκτώ (48) ώρες.

Στα διαγράμματα 5-8 και 5-9 παρουσιάζονται φάσματα φθορισμού από ανατομικές περιοχές των καρδιών (σχήμα 5-8 από αμνό, σχήμα 5-9 από άνθρωπο), όταν ήταν νωπές και μετά τη συντήρηση τους σε φορμόλη για 48 ώρες. Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού με γραμμή εκπομπής στα 457.9nm.

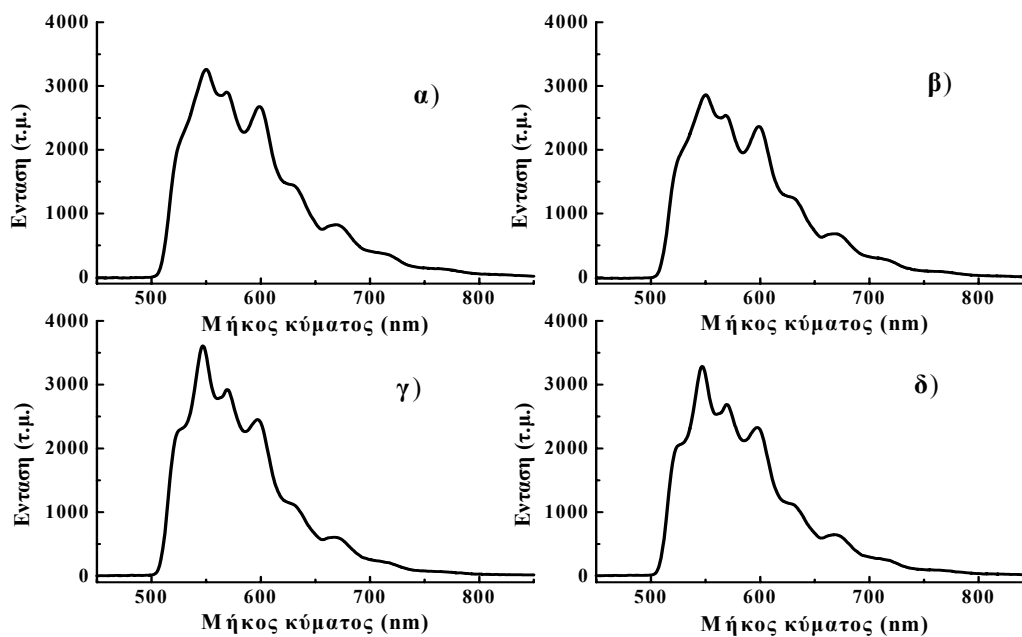
Όπως έχει αναφερθεί και προηγούμενα (Κεφάλαιο 3), οι κυριότερες φασματικές αλλαγές συντελούνται κατά την διάρκεια του πρώτου εικοσιτετραώρου της συντήρησης σε φορμόλη. Όλες οι καρδιές ακτινοβολήθηκαν μετά από συντήρηση σε φορμόλη για 48 ώρες, άρα περαιτέρω αλλαγές στο σήμα φθορισμού πέραν αυτών που καταγράφηκαν δεν αναμένονται.

Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν είναι παρόμοια με αυτά της συντήρησης σε φορμόλη περιφερειακών αγγείων (Κεφ. 3). Οι κυριότερες αλλαγές στη κατανομή του φάσματος φθορισμού προέρχονται από τη μείωση της επίδρασης (απορρόφηση) της αιμοσφαιρίνης γύρω στα 550nm. Οι αλλαγές που εμφανίζονται στα μεγαλύτερα μήκη κύματος (μετά τα 600nm) πρέπει να οφείλονται στην αλλαγή της χημικής σύστασης των πορφυρινών, μετά από τη συντήρηση του ιστού σε φορμόλη.

Τέλος παρατηρήθηκε, σε ορισμένες περιπτώσεις, μία αύξηση της έντασης των συλλεγόμενων σημάτων φθορισμού μετά τη συντήρηση των καρδιών για 48 ώρες σε φορμόλη (σχ. 5-8). Αυτή η αύξηση της έντασης του σήματος είναι πολύ πιθανό να έχει άμεση εξάρτηση με τη μείωση της επαναπορρόφησης του εκπεμπόμενου φθορισμού λόγω της αιμοσφαιρίνης.



Σχ. 5-8 Φάσματα φθορισμού από καρδιά αμνού. α), β), φάσματα από αριστερό κόλπο και κοιλία αντίστοιχα. γ), δ), φάσματα από αριστερό κόλπο και κοιλία μετά από συντήρηση σε φορμόλη για 48 ώρες. Το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm) χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση των δειγμάτων.



Σχ. 5-9 Φάσματα φθορισμού από ανθρώπινη καρδιά. α), β), φάσματα από δεξιό κόλπο. γ), δ), φάσματα από δεξιό κόλπο μετά από συντήρηση σε φορμόλη για 48 ώρες. Το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm) χρησιμοποιήθηκε ως πηγή διέγερσης.

5.4

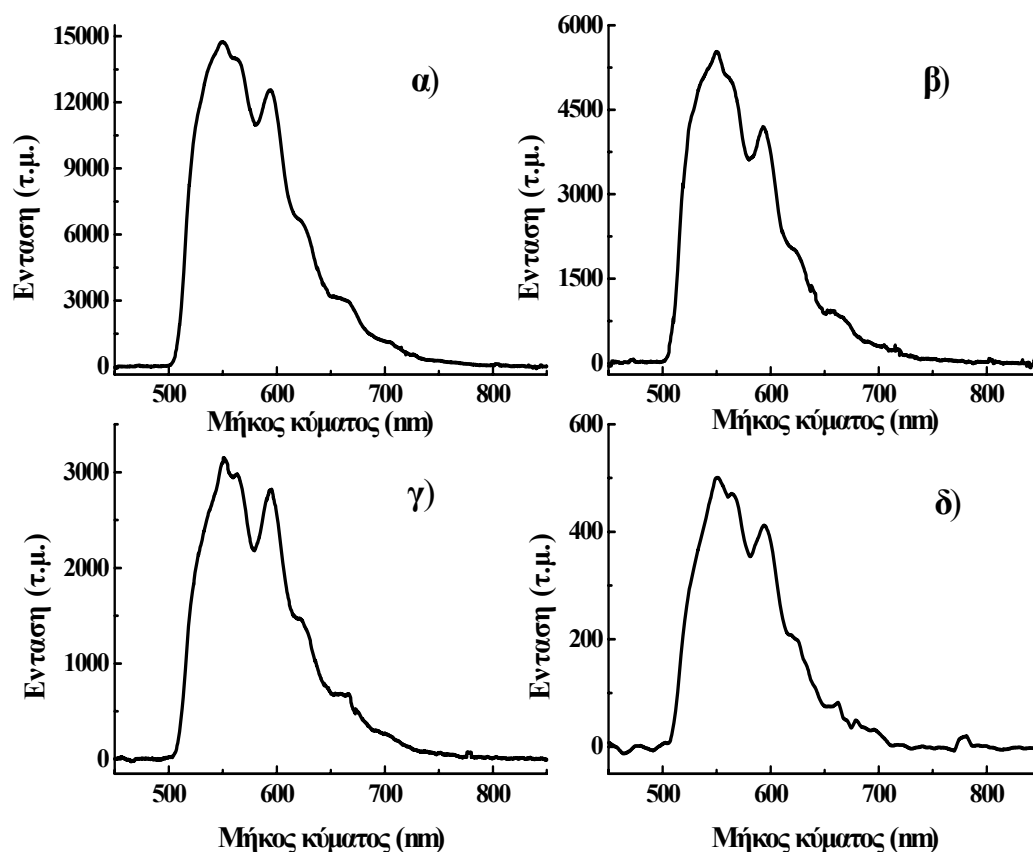
In vivo μετρήσεις

Εκτός από την ακτινοβόληση ανθρώπινων καρδιών *in vitro*, πραγματοποιήθηκε και ένας περιορισμένος αριθμός *in vivo* μετρήσεων κατά τη διάρκεια εγχειρήσεων ανοικτής καρδιάς. Αυτά τα πειράματα έλαβαν χώρα σε νοσοκομείο του Λονδίνου (Saint Bartholomew Hospital). Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν πέντε (5) ασθενείς (4 άντρες και μία γυναίκα). Φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν *in vivo* από την εξωτερική επιφάνεια της αορτής, του αριστερού και δεξιού κόλπου και κοιλίας και της αριστερής πρόσθιας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας (left anterior descending coronary artery). Η πειραματική διάταξη είναι όμοια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε και για τα *in vitro* πειράματα (σχήμα 5-1). Η μόνη διαφορά βρίσκεται στο γεγονός ότι, για πρακτικούς λόγους κατά την διάρκεια των *in vivo* μετρήσεων, ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου με γραμμή εκπομπής στα 442nm (αντί του λέιζερ ιόντων Αργού 457.9nm). Και σε αυτή την περίπτωση (όπως και στα *in vivo* πειράματα σε περιφερειακά αγγεία) κατά τη διάρκεια των μετρήσεων τα φώτα στο χειρουργικό θάλαμο παρέμειναν κλειστά, έχοντας ως στόχο τη μείωση του σήματος θορύβου από εξωτερικές πηγές. Ο θόρυβος καταγραφόταν κατά τη διάρκεια ακτινοβόλησης του λέιζερ και ενώ η απόσταση της άκρης της ίνας από το δείγμα ήταν περίπου ένα εκατοστό. Τα φάσματα φθορισμού συλλέχτηκαν όταν η άκρη της ίνας βρισκόταν σε επαφή με τον ιστό.

Παρατηρήθηκαν αρκετές δυσκολίες στη λήψη των φασμάτων *in vivo*, μιάς και σε ορισμένες περιπτώσεις το σήμα ήταν πολύ χαμηλό. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η ένταση μερικών από τα συλλεγόμενα φάσματα φθορισμού, από διάφορες ανατομικές περιοχές της ανθρώπινης καρδιάς, να είναι κοντά στο μηδέν.

Όσο αφορά στις *in vivo* μετρήσεις φαίνεται ότι, τα σήματα φθορισμού που καταγράφηκαν, κυρίως από την αορτή και σε μικρότερο βαθμό από τους κόλπους, παρουσιάζουν υψηλότερη ένταση σε σχέση με τα φάσματα που συλλέχτηκαν από τις κοιλίες. Αυτό βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με τα όσα διαπιστώθηκαν στις *in vitro* μελέτες, για τις καρδιές

τόσο των αμνών όσο και των ανθρώπων. Από τα αρχικά δηλαδή αυτά συμπεράσματα, παρουσιάζεται μία ομοιότητα μεταξύ των *in vitro* και *in vivo* μετρήσεων, σε ότι αφορά τουλάχιστον τις μεταβολές της έντασης του σήματος φθορισμού στις διαφορετικές ανατομικές περιοχές της ανθρώπινης καρδιάς. Στο διάγραμμα που ακολουθεί (σχήμα 5-10) εκτίθενται φάσματα φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ, που συλλέχτηκαν κατά τη διάρκεια *in vivo* μετρήσεων, από διαφορετικές περιοχές ανθρώπινων καρδιών.



Σχ. 5-10 Φάσματα φθορισμού από *in vivo* μετρήσεις από ανθρώπινες καρδιές. α) από αορτή, β) από δεξιό κόλπο, γ) από αορτή, δ) από αριστερή πρόσθια κατιούσα στεφανιαία αρτηρία (LAD). Ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm).

5.5 Συμπεράσματα

Φάσματα φθορισμού καταγράφηκαν κατά την διάρκεια έκθεσης καρδιών αμνών και ανθρώπων σε ακτινοβολία λέιζερ. Για τις *in vitro* μετρήσεις ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ ιόντων Αργού (457.9nm). Όσο αφορά στις καρδιές των αμνών, ακτινοβολήθηκαν περίπου δύο ώρες μετά τη σφαγή του ζώου, ενώ οι ανθρώπινες υπολογίζεται ότι ακτινοβολήθηκαν μέσα στο πρώτο εξάωρο από το θάνατο του ασθενούς. Εξετάστηκαν ολόκληρες και κατά τεκμήριο φυσιολογικές καρδιές. Σήματα φθορισμού συλλέχτηκαν από διάφορες ανατομικές περιοχές (κόλπους, κοιλίες, αορτή, μυοκάρδιο). Δημιουργήθηκαν και σε αυτή την περίπτωση (όπως και στα περιφερειακά αγγεία) δώδεκα (12) απλοί αλγεβρικοί αλγόριθμοι, βασισμένοι στις διαφορές της έντασης, έχοντας ως στόχο την περαιτέρω επεξεργασία των φασμάτων και τη διάκριση των διαφορετικών καρδιακών τμημάτων. Τα δείγματα μετά το τέλος κάθε πειράματος συντηρούνταν σε φορμόλη (10%) και ακτινοβολούνταν ξανά μετά από 48 ώρες. Επίσης, πραγματοποιήθηκε και ένας αριθμός *in vivo* μετρήσεων, κατά την διάρκεια εγχειρήσεων ανοιχτής καρδιάς. Σε αυτά τα *in vivo* πειράματα για πρακτικούς λόγους χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm) ως πηγή διέγερσης.

Σε όλες τις καρδιές, ανθρώπων και αμνών, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη σταθερότητα των μετρήσεων μέσα σε κάθε κοιλότητα (κόλπος, κοιλία). Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν χαρακτηρίστηκαν ως υγιή, επομένως αναμένεται μία διαφοροποίηση στα σήματα φθορισμού που θα ληφθούν από νοσηρές περιοχές. Επιπλέον, σε όλες τις καρδιές, κυρίως η αορτή αλλά και οι κόλποι (ιδίως ο αριστερός), εμφάνισαν υψηλότερης έντασης σήματα φθορισμού συγκριτικά με άλλες ανατομικές περιοχές (π.χ. κοιλίες).

Μερικοί από τους αλγόριθμους που εφαρμόστηκαν στα φάσματα που προήλθαν από τις καρδιές των αμνών, κατάφεραν να διαχωρίσουν τους κόλπους και τις αορτές από τις κοιλίες. Από την άλλη μεριά όμως, όλοι οι αλγόριθμοι παρουσίασαν πολύ χαμηλά ποσοστά επιτυχίας σε ότι αφορά τη διάκριση των αορτών από τους κόλπους.

Τα φάσματα φθορισμού που εξήχθησαν (*in vitro*) από το μυοκάρδιο ανθρώπινων καρδιών, εμφάνισαν σημαντικές αλλαγές στη φασματική τους κατανομή σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές της καρδιάς. Οι κυριότερες αλλαγές εντοπίζονται στην αύξηση του σήματος προς μεγαλύτερα μήκη κύματος ($\lambda \geq 650\text{nm}$, κόκκινο και κοντινό υπέρυθρο), λόγω του φθορισμού των πορφυρινών του μυοκαρδίου.

Μετά τη συντήρηση των δειγμάτων σε φορμόλη για 48 ώρες, ανιχνεύτηκαν αλλαγές στη φασματική τους κατανομή παρόμοιες με αυτές που διαπιστώθηκαν και στη περίπτωση συντήρησης σε φορμόλη περιφερειακών αγγείων (Κεφ. 3).

Τα σήματα φθορισμού που συλλέχτηκαν κατά τη διάρκεια των *in vivo* μετρήσεων σε ανθρώπινες καρδιές παρουσίασαν αρκετές ομοιότητες, τόσο στην μεταβολή της έντασης του σήματος στις διαφορετικές ανατομικές περιοχές όσο και στη μορφολογία, με τα φάσματα που καταγράφηκαν *in vitro*.

Μελλοντικοί στόχοι

Περιφερειακά αγγεία

Μέχρι στιγμής έχει διεξαχθεί ένας ικανοποιητικός αριθμός *in vitro* πειραμάτων. Σε πρώτη φάση όλα τα συλλεγόμενα φάσματα φθορισμού, που προήλθαν από την ακτινοβόληση των περιφερειακών αγγείων, επεξεργάστηκαν με την βοήθεια απλών αλγεβρικών αλγορίθμων. Η εφαρμογή των αλγορίθμων παρουσίασε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ότι αφορά τη διάκριση φυσιολογικού από παθολογικό αρτηριακό ιστό. Επιπλέον, ορισμένα φάσματα αναλύθηκαν με τη χρήση νευρωνικών δικτύων και επιτεύχθηκε ο πλήρης διαχωρισμός και η ταξινόμηση των διαφορετικών τύπων ιστών (φυσιολογικής, ινώδους, ασβεστοποιημένης αρτηρίας).

Τα έως τώρα αποτελέσματα των *in vivo* μετρήσεων, που έχουν πραγματοποιηθεί κατά την διάρκεια εγχειρήσεων by-pass, είναι αρκετά ελπιδοφόρα. Όμως ο περιορισμένος αριθμός τους δεν μπορεί να οδηγήσει σε οριστικά συμπεράσματα. Επομένως, η διεξαγωγή μίας οργανωμένης σειράς *in vivo* πειραμάτων, σε συνεργασία με την Αγγειοχειρουργική Κλινική του Πανεπιστημίου Κρήτης, αποτελεί το βασικό μελλοντικό στόχο.

Για την ακτινοβόληση των δειγμάτων (*in vivo*) μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ήδη υπάρχον λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm). Επίσης, είναι δυνατή η χρήση ενός παλμικού λέιζερ με μήκος κύματος εκπομπής στο υπεριώδες (π.χ. λέιζερ αζώτου 337nm, ή λέιζερ διεγερμένων διμερών, ή τρίτη αρμονική ενός Nd-YAG 355nm). Με αυτό το τρόπο, δηλαδή με τη διέγερση των δειγμάτων με υπεριώδη ακτινοβολία, επιτυγχάνεται η συλλογή περισσότερων πληροφοριών σχετικά με το φθορισμό των πρωτεϊνών του ιστού. Εκτός αυτού, υπάρχει η σκέψη για την ακτινοβόληση των αρτηριών με τη βοήθεια διοδικού λέιζερ (diode laser). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα των διοδικών λέιζερ είναι ότι, έχουν μεταβλητό μήκος κύματος εκπομπής, παρουσιάζουν μεγάλη ευκολία στη χρήση τους, είναι αναγκαία ελάχιστη

συντήρηση για την καλή λειτουργία τους και οι διαστάσεις τους είναι αρκετά μικρές (compact systems), οπότε είναι κατάλληλα για *in vivo* μετρήσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε όλες τις περιπτώσεις το λέιζερ που θα χρησιμοποιηθεί για τα πειράματα θα αποδίδει χαμηλής ισχύος ακτινοβολία, η οποία είναι τελείως αβλαβή για τον ασθενή. Η μεταφορά της δέσμης στο υπό ακτινοβόληση αρτηριακό τοίχωμα θα γίνει με τη χρήση κατάλληλης οπτικής ίνας προσαρμοσμένης σε καθετήρα. Η ανάλυση των καταγραφόμενων σημάτων θα πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια των νευρωνικών δικτύων. Ο ολικός χρόνος που είναι αναγκαίος για την απόκτηση και την επεξεργασία των φασμάτων είναι ελάχιστος (λιγότερος από 10 sec).

Άρα, αυτή η τεχνική της φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ, σε συνδυασμό με τη χρήση των νευρωνικών δικτύων, έχει άμεση κλινική εφαρμογή, αφού και οι μετρήσεις και η επεξεργασία τους γίνονται μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα που θα εξαχθούν από μία σειρά *in vivo* μετρήσεων θα παρουσιάσουν μεγάλο ενδιαφέρον και θα πιστοποιήσουν την αξία αυτής της ελάχιστα επεμβατικής τεχνικής στο τομέα της διάγνωσης των παθολογικών από τα φυσιολογικά περιφερειακά αγγεία.

Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα συνδυασμού της φασματοσκοπίας φθορισμού επαγόμενης από λέιζερ με κάποιες απεικονιστικές τεχνικές (imaging techniques) κατά την διάρκεια των *in vivo* μετρήσεων. Αυτός ο συνδυασμός μπορεί να αποφέρει καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά τη διάκριση των περιφερειακών αγγείων. Με τη βοήθεια κάποιας απεικονιστικής τεχνικής (είτε με χρήση λέιζερ, είτε με χρήση μίας πηγής λευκού φωτός, είτε ακτίνων X) θα επιτευχθεί η πλήρης χαρτογράφηση της υπό διερεύνηση περιοχής. Ακόμη, θα υπάρξει η δυνατότητα για άμεσο και πλήρη έλεγχο των διαδικασιών από τους γιατρούς. Επιπλέον, θα καταστεί δυνατή η μελέτη των υπό ακτινοβόληση ιστών σε διάφορες περιοχές του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, με τη χρήση κατάλληλων φίλτρων μπροστά από το ανιχνευτικό σύστημα (κάμερα).

Καρδιές

Υπάρχει η σκέψη στο άμεσο μέλλον (ήδη έχει εγκριθεί σχετικό κρατικό πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ), της πραγματοποίησης σειράς πειραμάτων *in vivo* σε καρδιές χοίρων. Ως πηγή διέγερσης θα χρησιμοποιηθεί το λέιζερ Ηλίου-Καδμίου (442nm). Με τη βοήθεια καθετήρα, στον οποίο θα είναι προσαρμοσμένη κατάλληλη οπτική ίνα, η δέσμη θα κατευθύνεται στις υπό διερεύνηση περιοχές. Από τα σημεία από όπου θα λαμβάνονται δείγματα για βιοψία, θα συλλέγονται ταυτόχρονα και φάσματα φθορισμού και θα ακολουθείται ιστολογική ανάλυση των δειγμάτων. Στα φάσματα φθορισμού που θα ληφθούν *in vivo* θα ελεγχθεί, τόσο η σταθερότητα των μετρήσεων μέσα σε κάθε κοιλότητα όσο και οι τυχόν αλλαγές στην ένταση και στην μορφολογία των συλλεγόμενων σημάτων που προέρχονται από διαφορετικές ανατομικές περιοχές της καρδιάς των χοίρων. Η περαιτέρω επεξεργασία των φασμάτων φθορισμού θα γίνει και σε αυτή την περίπτωση με τη βοήθεια αλγεβρικών αλγορίθμων αλλά και με τη χρήση νευρωνικών δικτύων. Με αυτό τον τρόπο θα διαπιστωθεί αν τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τις καρδιές των αμνών (*in vitro*) ισχύουν και για τις *in vivo* μελέτες. Εκτός των άλλων, τα αποτελέσματα που θα εξαχθούν από τις μετρήσεις φθορισμού στους χοίρους, θα βοηθήσουν σημαντικά για την αξιολόγηση της συγκεκριμένης φασματοσκοπικής τεχνικής και θα αποτελέσουν το πρώτο βήμα για τυχόν χρησιμοποίηση της στο απώτερο μέλλον και σε ανθρώπινες καρδιές *in vivo* (με χρήση καθετήρα και κατάλληλα προσαρμοσμένης σε αυτόν οπτικής ίνας για την μεταφορά της δέσμης).

Επίσης, θα συνεχιστούν οι *in vitro* μετρήσεις σε ανθρώπινες καρδιές. Ο κυριότερος στόχος είναι η επιβεβαίωση των σημαντικών αλλαγών που παρατηρήθηκαν στη φασματική κατανομή του ανθρώπινου μυοκαρδίου συγκριτικά με σήματα φθορισμού που καταγράφηκαν από άλλες ανατομικές

περιοχές της καρδιάς. Επιπλέον, περισσότερες μετρήσεις (*in vitro*) είναι αναγκαίες για την πλήρη υποστήριξη όλων των αρχικών συμπερασμάτων που αφορούν φάσματα φθορισμού που συλλέχτηκαν κατά την διάρκεια ακτινοβολήσης ανθρώπινων καρδιών.

Βιβλιογραφία

Κεφάλαιο 1

1. A. Katzir “Lasers and optical fibers in Medicine” *Academic Press, Inc* (1993)
2. J. Wilson, J.F.B. Hawkes “Lasers: Principles and Applications” *Prentice Hall* (1987)
3. Σ. Τραχανάς “Κβαντομηχανική ΙΙΙ” *Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Δεύτερη έκδοση* (1991)
4. W. Demtröder “Laser Spectroscopy” *Springer-Verlag Third Edition* (1988)
5. Α.Α. Σεραφετινίδης “Εισαγωγή στην Οπτοηλεκτρονική” *Οργανισμός εκδόσεων διδακτικών βιβλίων* (1991)
6. M. Young “Optics and Lasers” *Springer-Verlag Third Edition* (1986)
7. O. Svelto “Αρχές των Lasers” Μετάφραση: Γ.Α. Κουρούκλης, Α.Α. Σεραφετινίδη, *Εκδόσεις Συμμετρία Δεύτερη Έκδοση* (1986)
8. J.A.S. Carruth, A.L. McKenzie “Ιατρικά Lasers” Μετάφραση: Α.Α. Σεραφετινίδη, Μ.Ι. Μακροπούλου, *Εκδόσεις Συμμετρία* (1994)
9. W.Q. Liu “Diagnosis of atherosclerosis by laser induced fluorescence spectroscopy” Ph. D. Thesis *University of Crete Medical school* (1995)
10. J.R. Lackowicz “Principles of fluorescence spectroscopy” *Plenum Press, New York* (1983)
11. J. Johansson “Fluorescence spectroscopy for Medical and environmental diagnostics” Ph. D. Thesis *Department of Physics Lund Institute of Technology* (1993)
12. S. Svanberg “Atomic and molecular spectroscopy” *Springer-Verlag* (1991)

Κεφάλαιο 2

1. Κ. Παπαδημητρίου “Ειδική παθολογική ανατομική (συστηματική παθολογία)” *Εκδόσεις Λίτσας* (1988)
2. Β. Γολεμάτη “Χειρουργική ανατομική, τόμος Β” *Εκδόσεις Πασχαλίδη* (1986)
3. S.S. Eccles “Health sciences electronic library (<http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/ATHHTML/ATHIDX.html>)” *University of Utah-Health Sciences Center* (1999)
4. Α. Κατσαμούρης, Ν. Χατζηνικολάου “Αιμοδυναμική παθοφυσιολογία των αγγειακών παθήσεων” *Υπό έκδοση, Κέντρο Βιοηθικής, Αθήνα*
5. D.G. Kardoulas, A.N. Katsamouris, P.T. Gallis, T.P. Philippides, N.K. Anagnostakos, D.S. Gorgoyannis, N.C. Gourtsoyannis, “Ultrasonographic and histologic characteristics of symptom-free and symptomatic carotid plaque” *Cardiovascular surg.* **4** 580-589 (1996)
6. T.G. Papazoglou: “Malignancies and atherosclerotic plaque diagnosis - is laser induced fluorescence spectroscopy the ultimate solution?” (Review paper) *J. Photochem. Photobiol. B: Bio.*, **28**, 3-11, (1995)
7. J. Wu, M.S. Feld, R.P. Rava, “Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media” *App. Optics*, **32** 3585-3595 (1993)
8. E. A. Burstein, V. I. Emelyanko, “Log-normal description of fluorescence spectra of organic fluorophores. ”, *Photochem. and Photobiol.* **64** 316-320 (1996).
9. Y. Chen M. D. Barkley, “ Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins “ *Biochemistry* **37** 9976-9982 (1998).
10. A. V. Novikov, “ Laser-induced fluorescence line narrowing of native porphyrins in animal tissue “ *Photochem. and Photobiol.* **59** 12-15 (1994).
11. M. Gardner, S. L. Jaques, A. J. Welch, “Fluorescence spectroscopy of tissue: recovery of intrinsic fluorescence from measured fluorescence” , *App. Optics* , **35** 1780-1792 (1996).

12. S. Fantini, M. A. Franceschini, J. B. Fishkin, B. Barbieri E. Gratton, "Quantitative determination of the absorption spectra of chromophores in strongly scattering media: a light-emitting-diode based technique."; *App. Optics* **33** 5204-5213 (1994).
13. M.K. Nilsson, D. Heinreich, J. Olajos, S. Andersson-Engels, "Near infrared diffuse reflection and laser-induced fluorescence spectroscopy for myocardial tissue characterization" , *Spectrochimica Act.* **53** 1901-1912 (1997).
14. M. Sartori, R. Sauerbrey, S. Kubodera, F.K. Tittel, R. Roberts, P.D. Henry, "Autofluorescence maps of atherosclerotic human arteries: a new technique in medical imaging", *IEEE J. Quan. Electron.* **QE-23** 1794-1797 (1987)
15. P. S. Andersson, S. Montan and S. Svanberg, "Multispectral system of medicine fluorescence imaging", *IEEE J. Quantum Electron.*, **23** 1798-1805 (1987)
16. L. K. Deckelbaum, M.L. Stetz, K.M. O'Brien, F. W. Cutruzzola, A. F. Gmitro, L. I. Laifer, G. R. Gindi, "Fluorescence spectroscopy guidance of laser ablation of atherosclerotic plaque", *Lasers Surg. Med.*, **9** 205-214 (1989)
17. K. Svanberg, C. A. F. Klinteberg, A Nilsson, I Wang, S. Andersson-Engels, S. Svanberg, "Laser-based spectroscopic methods in tissue characterization", *Ann. N. Y. Ac. Sci.* **838** 123-129 (1998)
18. A.A. Oraevsky, V.S. Lethokov, S.E. Ragimov, V.G. Omel'yanenko, A.A. Belyaev, B.V. Shekhonin, R.S. Akchurin, "Spectral properties of human atherosclerotic blood vessel walls", *Lasers Life Sci* **2** 275-288 (1988)
19. H.W. Chaudhry, R. Richards-Kortum, T. Kolubayev, C. Kittrell, F. Partovi, J.R. Kramer, M.S. Feld, "Alteration of spectral characteristics of human artery wall caused by 476 nm laser irradiation", *Lasers Surg. Med.* **9** 572-580 (1989)
20. J.J. Barraga, P. Taroni, Y.D. Park, K. An, A. Maestri, L.L. Tong, R.P. Rava, C. Kittrel, R.R. Dasari, M.S. Feld, "Ultraviolet laser induced fluorescence of human aorta", *Spectrochimica Acta* **45a** 95-99 (1989)

21. A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, G. H. Pettit, R. A. Sauerbrey, F. K. Tittel, J. H. Nguy, P. D. Henry “XeCl laser-induced fluorescence of atherosclerotic arteries. Spectral similarities between lipid-rich lesions and peroxidized lipoproteins” *Circ. Res* **72** 84 (1993)
22. G. Laufer, G. Wollenek, B. Rueckle, M. Buchelt, C. Kuckla, H. Ruatti, P. Buxbaum, R. Fasol, P. Zilla, “Characteristics of 308 nm excimer laser activated arterial tissue photoemission under ablative and non-ablative conditions”, *Lasers Surg. Med.* **9** 556-571 (1989)
23. G.H. Pettit, R. Pini, F.K. Tittel, R. Sauerbrey, M.P. Sartori, P.D. Henry, “Excimer laser induced autofluorescence from atherosclerotic human arteries”, *Lasers Life Sci* **3** 205-215 (1990)
24. T.G. Papazoglou, W.Q. Liu, A. Katsamouris C, Fotakis, “Laser induced fluorescence detection of atherosclerotic deposits via their natural emission and hypocrellin (HA) probing”, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **22** 139-144, (1994).
25. G. Filippidis, G. Zacharakis, A. Katsamouris, A. Giannoukas, M. Kouktzela, T.G. Papazoglou, “Effect of liquid nitrogen and formalin -based conservation in the in-vitro measurements of laser-induced fluorescence of peripheral vascular tissue”, *J. of Photochem. and Photobiol., Biol.*, **Vol. 47** 109-114, (1998)
26. L.I. Deckelbaum, J.K. Lam, H.S. Cabin, K.S. Clubb, M.B. Long, “Discrimination of normal and atherosclerotic aorta by laser-induced fluorescence”, *Lasers Surg. Med.* **7** 330-335 (1987)
27. L.I. Laifer, K.M. O'Brien, M.L. Stetz, G.R. Gindi, T.J. Garrand, L.I. Deckelbaum, “Biochemical basis for the difference between normal and atherosclerotic arterial fluorescence”, *Circulation* **80** 1893-1901 (1989)
28. S. Andersson-Engels, J. Johanson, U. Stenram, S. Svanberg, K. Svanberg, “Laser induced fluorescence diagnostics of atherosclerotic plaque”, *IEEE J. Quan. Electron.* **QE-26** 1536-1539 (1990)
29. S. Andersson-Engels, A. Gustafson, J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg, S. Svanberg. “Laser-induced fluorescence used in localizing atherosclerotic lesions”, *Lasers Surg. Med.*, **4** 171-181 (1989)

30. R.H. Clarke, J.M. Isner, T. Gauthier, K. Nakagawa, F. Cerio, E. Hanion, E Gaffney, E. Rouse, S. DeJesus, "Spectroscopic characterization of cardiovascular tissue" *Lasers Surg. Med.*, **8** 45-59 (1988)
31. D. Murhy-Chutorian, J. Kosek, W. Mok, S. Quay, W. Huestis, J. Mehigan, D. Profitt, R. Ginburg, "Selective absorption of ultraviolet laser energy by human atherosclerotic plaque treated with tetracycline" *Am. J. Cardiol.*, **55** 1293-1297 (1985)
32. S.G. Vari, M.J. van der Veen, T.G. Papazoglou, M.C. Fishbein, M. Stayridi, T. Papaioannou, w.S. Grundfest, "Differentiation of artery wall lesions using porphyrins and fiberoptic sensor in rabbits" *SPIE Proc.*, **2086** 2-10 (1993)
33. A.H Kragel, SG Reddy, JT Wittes, WC Roberts, "Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death", *Circulation* **80**: 1747-1756 (1989)
34. H.C. Stary, "Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults", *Arteriosclerosis* **9** I-19 I-32 (1989)
35. J. Masuda, R. Ross, "Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation", *Arteriosclerosis* **10** 164-177 (1990)
36. D. Steinberg, J.L. Witztum, "Lipoproteins and atherogenesis", *JAMA* **264** 3047-3052 (1990)
37. J. Schuh, G.F. Fairclough, R.H. Haschemeyer, "Oxygen-mediated heterogeneity of apo-low-density lipoprotein", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** 3173-3177 (1978)
38. W. Palinski, S. Ylä-Herituala, M.E. Rosenfeld, S.W. Butler, S.A. Socher, S. Parthasarathy, L.K. Curtiss, J.L. Witztum, "Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein" *Arteriosclerosis*, **10** 325-335 (1990)
39. S. Andersson-Engels, A. Gustafson, J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg, S. Svanberg. "Investigation of possible fluorophores in human atherosclerotic plaque" *Lasers In Life Sciences*, **5** 1-11 (1992)

40. I. Banga, M. Bihari-Varga, “Investigations of free and elastin-bound fluorescent substances present in the atherosclerotic lipid and calcium plaques” *Connective Tissue Research* **2** 237-241 (1974)
41. M.B. Leon, D.Y. Lu, L.G. Prevosti, W.W. Macy, P.D. Smith, M. Granovsky, R.F. Bonner, R.S. Balaban, “Human arterial surface fluorescence: atherosclerotic plaque identification and effects of laser atheroma ablation” *JACC*, **12** 94-102 (1988)
42. M. Fitzmaurice, J.O. Bordagaray, G.L. Engelmann, R. Richards-Kortum T. Kolubayev, M.S. Feld, N.B. Ratliff, J.R. Kramer, “Argon ion laser excited autofluorescence in normal and atherosclerotic aorta and coronary arteries: morphologic studies” *American Heart Journal*, **118** 1028-1038 (1989)
43. J.J. Baraga, R.P. Rava, P. Tantori, C. Kittrell, M. Fitzmaurice, M.S. Feld, “Laser induced fluorescence spectroscopy of normal and atherosclerotic human aorta using 306-310nm excitation” *Lasers Surg. Med.*, **10** 245-261 (1990)
44. S. Andersson-Engels, J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg, S. Svanberg, “Malignant tumor and atherosclerotic plaque diagnosis using laser-induced fluorescence”, *IEEE J. Quantum Electron.*, **26** 2207-2215 (1990)
45. K.M. O’Brien, A.F. Gmitro, G.R. Gindi, M.L. Stetz, F.W. Cutruzzola, L.I. Laifer, L.I. Deckelbaum. “Development and evaluation of spectral classification algorithms for fluorescence guided laser angioplasty”, *IEEE J. Trans. Of Biom. Eng.*, **36** 424-430 (1989)
46. E.J. Gaffney, R.H. Clarke, A.R. Lucas, J.M. Isner. “Correlation of fluorescence emission with the plaque content and intimal thickness of atherosclerotic coronary arteries”, *Lasers Surg. Med.*, **9** 215-228 (1989)
47. S. Palsson M. Palsson, S. Montan, K. Svanberg, S Andersson-Engels, A. Malmberg, U. Holst, G. Zacharakis, G. Filippidis, T.G. Papazoglou, A. Katsamouris, R. Doornbos, R. van Veen, H.J.C.M. Sterenborg G. Koduri, F. Cross, “NIR Raman spectroscopy for cardiovascular tissue characterisation”, *Conference of Lasers and Electro-Optics (CLEO)* **BTuC5-1** 413-415 (1999).
48. S. Andersson-Engels, J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg, S. Svanberg, “Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy for enhanced

- demarcation of human atherosclerotic plaque” *J. Photochem. Photobiol. B: Bio.*, **4** 363-369 (1990)
49. S. Andersson-Engels, J. Johansson, S. Svanberg, “The use of time resolved fluorescence for diagnosis of atherosclerotic plaque and malignant tumors” *Spectrochimica Act.* **8** 1203-1210 (1990)
50. G. Zacharakis, A. Zolindaki, V. Sakkalis, G. Filippidis, E. Koumantakis, T. G. Papazoglou, “Nonparametric characterization of human breast tissue by the Laguerre expansion of the kernels technique applied on propagating femtosecond laser pulses through biopsy samples”, *Appl. Phys. Lett.*, **Vol. 74**. 771-772 (1999)
51. T.Q. Ye, C.J. Arnold, D.I. Pattison, C.L. Anderton, D. Dukin, R.N. Perutz, R.E. Hester, J.N. Moore, “Development of an ultrafast laser apparatus for time-resolved UV-Visible and Infrared spectroscopy” *App. Optics* , **50** 597-606 (1996)

Κεφάλαιο 3

1. T.G. Papazoglou, W.Q. Liu, A. Katsamouris C, Fotakis, “Laser induced fluorescence detection of atherosclerotic deposits via their natural emission and hypocrellin (HA) probing”, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **22** 139-144, (1994)
2. S. Andersson-Engels, A. Gustafson, J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg, S. Svanberg. “Laser-induced fluorescence used in localizing atherosclerotic lesions”, *Lasers Surg. Med.*, **4** 171-181 (1989)
3. G. Filippidis, G. Zacharakis, A. Katsamouris, M. Kouktzela, S. Montan, S. Andersson-Engels, T.G. Papazoglou, “Effect of liquid nitrogen and formalin -based conservation in the in-vitro measurements of laser-induced fluorescence of peripheral vascular tissue”, *SPIE Optical Biopsies and Microscopic Techniques II.*, **Vol. 3197** 27-31 (1997)
4. G. Filippidis, G. Zacharakis, A. Katsamouris, A. Giannoukas, M. Kouktzela, T.G. Papazoglou, “Effect of liquid nitrogen and formalin -based conservation in the in-vitro measurements of laser-induced fluorescence of peripheral vascular tissue”, *J. of Photochem. and Photobiol., Biol.*, **Vol. 47** 109-114, (1998)

Κεφάλαιο 4

1. G. Filippidis, G. Zacharakis, A. Katsamouris, A. Giannoukas, T.G. Papazoglou, “Ex-vivo laser-induced fluorescence measurements based on double wavelength laser excitation of peripheral vascular tissue” *Conference of Lasers and Electro-Optics (CLEO) CTuE4*, 57 (1998)
2. G. Filippidis, G. Zacharakis, A. Katsamouris, A. Giannoukas, T.G. Papazoglou, “Single and double wavelength excitation of laser induced fluorescence of normal and atherosclerotic peripheral vascular tissue” (in press) *J. of Photochem. and Photobiol., Biol.*
3. G.A. Rovithakis, M. Maniadakis, M. Zervakis, G. Filippidis, G. Zacharakis, A. Katsamouris T.G. Papazoglou, “Artificial neural networks for discriminating pathologic from normal peripheral vascular tissue” submitted to *IEEE Trans. Neural Networks*
4. G.A. Rovithakis, M.A. Christodoulou “Direct adaptive regulation of unknown nonlinear dynamical systems via dynamic neural networks” *IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics*, **25** 1578-1594 (1995)
5. E.B. Kosmatopoulos, M. Polycarpou, M.A. Christodoulou, P.A. Ioannou, “High-order neural network structures for identification of dynamical systems” *IEEE Trans. of Biom. Eng.* **6** 422-431 (1995)

Κεφάλαιο 5

1. M.K. Nilsson, D. Heinrich, J. Olajos, S. Andersson-Engels, “Near infrared diffuse reflection and laser-induced fluorescence spectroscopy for myocardial tissue characterization” , *Spectrochimica Act.* **53** 1901-1912 (1997).
2. E.J. Gaffney, R.H. Clarke, A.R. Lucas, J.M. Isner. “Correlation of fluorescence emission with the plaque content and intimal thickness of atherosclerotic coronary arteries”, *Lasers Surg. Med.*, **9** 215-228 (1989)
3. G. Filippidis, G.Zacharakis, A. Katsamouris, S. Palsson, S. Montan, K. Svanberg, S. Andersson-Engels, R. Doornbos, R. van Veen, H.J.C.M. Sterenborg, G. Koduri, F. Cross, T.G. Papazoglou, “In vitro and in vivo laser-induced fluorescence measurements of human and lamb heart tissue” *Conference of Lasers and Electro-Optics (CLEO)* **BTuC3-1** 407-405 (1999)
4. G. Filippidis, G. Zacharakis, G. E. Kochiadakis, S. I. Chrysostomakis, P. E. Vardas, T. G. Papazoglou, “In vitro laser-induced fluorescence measurements of lamb and human heart tissue” submitted to *J. of Biomed. Opt.*
5. G. Filippidis, G. Zacharakis , G.E. Kochiadakis , S.I. Chrysostomakis, P.E. Vardas, T.G. Papazoglou, “In vitro laser-induced fluorescence measurements of human and lamb heart tissue” *OWLS V, Fifth International Conference on Optics Within Life Sciences* (1998)