

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

Ανάπτυξη Μεθόδου Υπερφασματικής Απεικόνισης για την  
in vivo καταγραφή και ανάλυση της κινητικής της  
αλληλεπίδρασης ασθενών οξέων και ιστών: Εφαρμογή στην  
διάγνωση καρκινικών και προκαρκινικών αλλοιώσεων.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΤΜΗΜΑ  
ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ  
Διπλωματική Εργασία

**Δέσποινα Φραγκούλη**

Επιβλέπων Καθηγητής Τμήματος Χημείας: Θ. Κιτσόπουλος  
Επιβλέπων Καθηγητής: Κ. Μπάλας

Σεπτέμβριος 2002

# Περιεχόμενα

<b>Κεφάλαιο 0</b>	<b>1</b>
Εισαγωγή	1
<b>Κεφάλαιο 1</b>	
<b>Καρκίνος και κλασσικές διαγνωστικές μέθοδοι</b>	<b>2</b>
1.1 Ο καρκίνος και τα είδη του	2
1.2 Καρκίνος και ο Τράχηλος της μήτρας	2
1.2.1 Εισαγωγή	2
1.2.2 Τράχηλος της μήτρας	3
1.2.3 Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας	5
1.3 Κλασσικές διαγνωστικές τεχνικές	7
1.3.1 Τεστ Παπανικολάου	7
1.3.2 Κολποσκόπηση	7
<b>Κεφάλαιο 2</b>	
<b>Οπτική Βιοψία</b>	<b>10</b>
2.1 Εισαγωγή	10
2.2 Αλληλεπίδραση φωτός με ύλη	11
2.2.1 Απορρόφηση	11
2.2.2 Εκπομπή	11
2.2.3 Σκέδαση φωτός	12
2.3 Οπτικές διαγνωστικές μέθοδοι	13
2.3.1 Φασματοσκοπία φθορισμού	13
2.3.2 Φασματοσκοπία Raman	14
2.3.3 Φασματοσκοπία σκέδασης φωτός	14
2.3.4 Φασματοσκοπία ανάκλασης	15
2.3.5 Διαγνωστικοί Δείκτες	15
2.3.6 Βασικά μειονεκτήματα μεθόδων	16
2.4 Απεικονιστική Φασματοσκοπία	17
2.4.1 Εισαγωγή	17
2.4.2 Φασματική απεικόνιση	18
<b>Κεφάλαιο 3</b>	
<b>Πειραματική Διαδικασία</b>	<b>23</b>
3.1 Εισαγωγή	23
3.2 Αλληλεπίδραση Οξικού Οξέος με ιστό	24
3.3 Πειραματική Διάταξη	25
3.3.1 Περιγραφή συστήματος	25
3.3.2 Βαθμονόμηση	27

3.3.3	Λήψη μετρήσεων	27
<b>Κεφάλαιο 4</b>		
	<b>Πειραματικά Αποτελέσματα</b>	<b>34</b>
4.1	Εισαγωγή	34
4.2	Πειραματικά Αποτελέσματα	34
<b>Κεφάλαιο 5</b>		
	<b>Ανάλυση Μηχανισμών Αλληλεπίδρασης Ιστού-Οξικού Οξέος</b>	<b>40</b>
5.1	Εισαγωγή	40
5.2	Ιδιότητες σκέδασης του ιστού	40
5.3	Αλλαγές στην ανατομία και φυσιολογία του ιστού κατά την ανάπτυξη δυσπλασίας	42
5.4	Αλληλεπίδραση Οξικού Οξέος με Ιστό	46
<b>Κεφάλαιο 6</b>		
	<b>Διαμερισματική Ανάλυση</b>	<b>50</b>
6.1	Εισαγωγή	50
6.2	Μοντέλο τριών τμημάτων	50
	6.2.1 Τμηματικό Μοντέλο	50
	6.2.2 Συντελεστές Προσαρμογής	53
6.3	Τριπλό Εκθετικό	54
	6.3.1 Συνάρτηση τριπλού εκθετικού	54
	6.3.2 Στατιστική μελέτη παραμέτρων	58
<b>Κεφάλαιο 7</b>		
	<b>Συσχέτιση Βιολογικού Συστήματος με το Μοντέλο</b>	<b>65</b>
7.1	Συσχέτιση Βιολογικού Μοντέλου με Μαθηματικό Μοντέλο	65
7.2	Συμπεράσματα	68
<b>Κεφάλαιο 8</b>		
	<b>Συμπεράσματα</b>	<b>72</b>

## Κεφάλαιο 0 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται μία οπτική απεικονιστική μέθοδος η οποία βασίζεται στην ικανότητα του οξικού οξέος να αλληλεπιδρά με το μη φυσιολογικό επιθηλιακό ιστό και να προκαλεί σε αυτόν παροδική αλλαγή στις ιδιότητες σκέδασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός. Χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα πολυφασματικής ανάλυσης το οποίο κάνει δυνατή την αποθήκευση και την ανάλυση των φασματικών, χωρικών και χρονικών χαρακτηριστικών του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός. Η μελέτη των χρονικών χαρακτηριστικών οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών και μη φυσιολογικών περιοχών του επιθηλίου. Οι διαφορές αυτές αποτυπώνονται σαν μεταβολές των σταθερών της κινητικής του φαινομένου. Η μέθοδος παρέχει δυνατότητα χωρικής αποτύπωσης της τιμής των παραμέτρων αυτών με την χρήση ψευδοχρωμάτων. Αυτό οδηγεί στην ποσοτική χαρτογράφηση των διαφόρων διαβαθμίσεων της βλάβης καθώς και στον ακριβή προσδιορισμό των ορίων της. Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν με βάση ένα μοντέλο αλληλεπίδρασης του οξικού οξέος με τον επιθηλιακό ιστό το οποίο περικλείει σημαντικές πληροφορίες για τα δομικά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του.

Στο επόμενο κεφάλαιο δίνονται συνοπτικές πληροφορίες οι οποίες αφορούν τον καρκίνο και τον τράχηλο της μήτρας, και είναι απαραίτητες για την κατανόηση της παρούσας εργασίας. Στην συνέχεια μετά από μία σύντομη αναφορά στις κλασσικές διαγνωστικές μεθόδους καθώς και στην οπτική βιοψία οδηγούμαστε στο κυρίως μέρος όπου μετά την παρουσίαση του συστήματος φασματικής απεικόνισης δίνονται τα πειραματικά αποτελέσματα, η εξήγησή και η ανάλυσή τους.

# Κεφάλαιο 1 Καρκίνος και κλασσικές διαγνωστικοί μέθοδοι

## 1.1 Ο καρκίνος και τα είδη του

Μια από τις πιο κοινές αιτίες θανάτου στις μέρες μας είναι ο καρκίνος. Πάνω από το 85% όλων των ειδών καρκίνου ξεκινούν από το επιθήλιο, και είναι θεραπεύσιμοι αν διαγνωστούν εγκαίρως [4]. Το επιθήλιο είναι ένας κυτταρικός ιστός ο οποίος καλύπτει τις εσωτερικές επιφάνειες του σώματος. Οι λεπτομέρειες της δομής του εξαρτώνται από το είδος και τον τύπο του οργάνου.

Ο καρκίνος είναι αποτέλεσμα γενετικών αλλαγών που οδηγεί σε συνεχή ανάπτυξη μη φυσιολογικών κυττάρων. Τα συγκεκριμένα κύτταρα αναπτύσσονται συνήθως σε μία μάζα η οποία ονομάζεται όγκος ή νεόπλασμα, που διεισδύει στους φυσιολογικούς ιστούς και μέσα από τις φλέβες είναι δυνατόν να διαδοθεί σε άλλα μέρη του σώματος, (μετάσταση). Τα είδη καρκίνου διαχωρίζονται ανάλογα με την περιοχή από την οποία έχει ξεκινήσει την ανάπτυξη τους, η οποία περιοχή καθορίζει και το όνομα. Έτσι καρκίνος που ξεκινά από το επιθήλιο, (δέρμα, κτλ), ονομάζεται καρκίνωμα, (carcinoma), ενώ αυτός που ξεκινά από τους συνδετικούς ιστούς, (οστά, μύες, κτλ) ονομάζεται σάρκωμα, (sarcoma). Τα νεοπλάσματα εντοπίζονται σε περιοχές που βρίσκονται έξω από το κυκλοφοριακό σύστημα, και κυρίως αναφέρονται σαν στερεοί όγκοι, και είναι συνήθως καρκινώματα ή σαρκώματα.

## 1.2 Καρκίνος και τράχηλος της μήτρας

### 1.2.1. Εισαγωγή

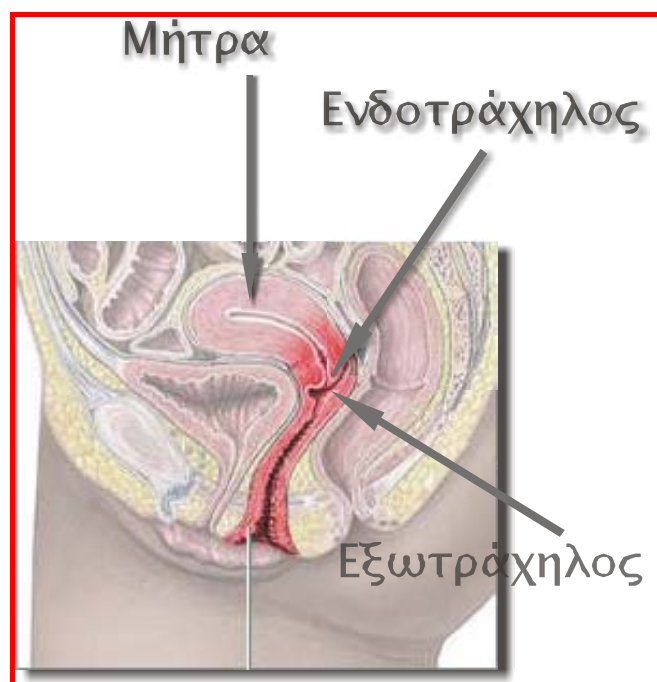
Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας είναι από τα πιο σημαντικά προβλήματα υγείας για τις γυναίκες, αφού είναι η σημαντικότερη μορφή επιθηλιακού καρκίνου για γυναίκες ηλικίας κάτω των 35 ετών ενώ είναι η δεύτερη πιο κοινή μορφή για γυναίκες όλων των ηλικιών [3]. Περίπου το 80% των νέων περιπτώσεων παρατηρείται σε υποανάπτυκτες χώρες όπου οι συνθήκες πρόληψης και διάγνωσης είναι σχεδόν ανύπαρκτες, [5]. Στην περίπτωση όμως των αναπτυγμένων χωρών, τα τελευταία 40 χρόνια έχει παρατηρηθεί μία σημαντική μείωση στην συχνότητα εμφάνισης του διηθητικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα πολύ καλά οργανωμένα προγράμματα έγκυρης διάγνωσης.

Η συγκεκριμένη ασθένεια παρουσιάζεται κυρίως σε γυναίκες χαμηλής κοινωνικοοικονομικής κατάστασης, σε σεξουαλικά ενεργές από μικρή ηλικία ή με πολλούς συντρόφους και σε καπνίστριες. Επίσης η μόλυνση από ιούς όπως ο HIV, (Human Immunodeficiency Virus), και μερικοί τύποι του HPV, (Human Papilloma Virus), αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης του, [1].

Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας αν διαγνωστεί εγκαίρως είναι η πιο αποτελεσματικά ιάσιμη μορφή καρκίνου, [2]. Η συγκεκριμένη μορφή προέρχεται από ένα προκαρκινικό στάδιο το οποίο εξελίσσεται χωρίς συμπτώματα για πολλά χρόνια μέχρι τελικά να φτάσει στο διηθητικό στάδιο. Η έγκυρη διάγνωση σε αυτό το προκαρκινικό στάδιο οδηγεί σε πιο αποτελεσματική θεραπεία.

### 1.2.2. Ο τράχηλος της μήτρας

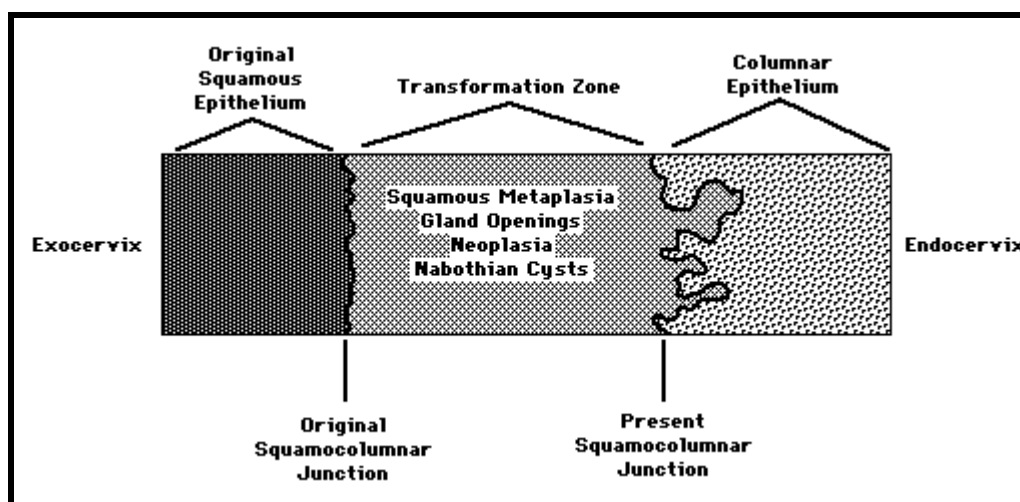
Ο τράχηλος είναι το χαμηλότερο μέρος της μήτρας.



Σχήμα 1: Ανατομία του τραχήλου

Ο τράχηλος της μήτρας χωρίζεται σε δύο μέρη. Τον ενδοτράχηλο, (endocervix) και τον εξωτράχηλο, (exocervix). Ο ενδοτράχηλος βρίσκεται πιο κοντά στην περιοχή της μήτρας ενώ ο εξωτράχηλος βρίσκεται πιο κοντά στην περιοχή του κόλπου. Τα δύο τμήματα διακρίνονται από την διαφορετική κυτταρική δομή του επιθηλίου που τα καλύπτει, (σχήμα 2). Όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα

μεταξύ του ενδοτραχήλου και του εξωτραχήλου υπάρχει μία περιοχή που ονομάζεται ζώνη μετάπτωσης, (transformation zone), η οποία αποτελείται από μία ενδιάμεση μορφή επιθηλίου που ουσιαστικά περιλαμβάνει χαρακτηριστικά και από τα δύο επιθήλια. Σε αυτήν την περιοχή, αυτό που συμβαίνει είναι μια φυσιολογική διαδικασία κατά την οποία το επιθήλιο του ενδοτραχήλου μετατρέπεται σε επιθήλιο του εξωτραχήλου. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται μεταπλασία.



Σχήμα 2: Διαφορές στην μορφή του επιθηλίου, ζώνη μετάπτωσης.

Το επιθήλιο του τραχήλου της μήτρας περιλαμβάνει 15 με 20 στρώματα κυττάρων. Όσο προχωράμε από τα βαθύτερα στρώματα προς την επιφάνεια, τα κύτταρα χαρακτηρίζονται από αυξανόμενο μέγεθος και μείωση του λόγου του μεγέθους του πυρήνα ως προς το κυτταρόπλασμα.

Πιο συγκεκριμένα το επιθήλιο αποτελείται από:

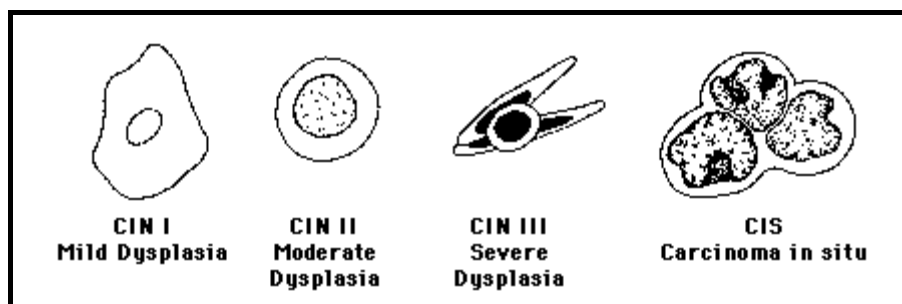
- το εσωτερικό βασικό στρώμα, (internal basal layer), το οποίο αποτελείται από ένα μοναδικό στρώμα από κύτταρα μικρού μεγέθους και κυβικού σχήματος πολύ κοντά το ένα στο άλλο, σχηματίζοντας ένα στρώμα πάνω στην βασική μεμβράνη, η οποία ουσιαστικά διαχωρίζει το επιθήλιο από τον ιστό του τραχήλου.
- το παραβασικό στρώμα, (parabasal layer), που αποτελείται από 3 ή 4 σειρές από κύτταρα περίπου της ίδιας εμφάνισης με τα κύτταρα του βασικού στρώματος, αλλά λίγο μεγαλύτερα.
- το ενδιάμεσο στρώμα, (intermediate layer), το οποίο σχηματίζεται από 5-6 σειρές από κύτταρα τα οποία είναι μεγαλύτερα και πολυεδρικού σχήματος.

- το επιφανειακό στρώμα, (superficial layer), που αποτελείται από 6-8 σειρές κυττάρων των οποίων το σχήμα γίνεται σταδιακά επίπεδο όσο ανεβαίνουν προς την επιφάνεια.
- το στρώμα που αποτελείται από κύτταρα που αποδесμεύονται από την επιφάνεια της βλέννας, (desquamation layer).

### 1.2.3 Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Οι καρκίνοι που ξεκινούν από το επιθήλιο, προέρχονται από μία προκαταρκτική κατάσταση που ονομάζεται νεοπλασία, η οποία σημαίνει “μη φυσιολογική ανάπτυξη”. Η έννοια της τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας, που συνήθως αναφέρεται με τα αρχικά CIN, είναι η συντομογραφία του αγγλικού όρου Cervical Intraepithelial Neoplasia. Αυτή η κατάσταση ξεκινάει από το επιθηλιακό στρώμα και χαρακτηρίζεται από κάποιες αλλαγές στην μορφή και την σύσταση των κυττάρων αλλά και από αλλαγές στην χωρική τους κατανομή, ή αλλιώς στην αρχιτεκτονική τους, [6].

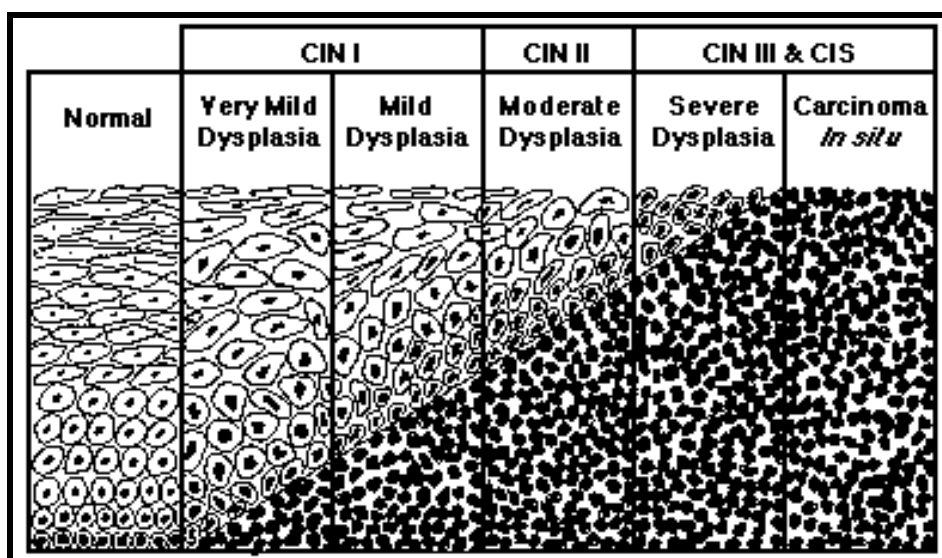
Αυτές οι αλλαγές δεν οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στην εμφάνιση του ιστού, και γι' αυτό δεν μπορούν να ανιχνευτούν με μια απλή γυναικολογική εξέταση. Η διαβάθμιση καθορίζεται από το πως φαίνονται τα καρκινικά κύτταρα στο μικροσκόπιο, (σχήμα 3). Τα στάδια αναφέρονται σε επιθηλιακές αλλαγές που κυμαίνονται από την ελαφριά δυσπλασία, CIN I, μέχρι το CIS, (Carcinoma In Situ). Ο βαθμός αυτών των αλλαγών καθορίζει το προκαρκινικό στάδιο, και μέχρι τώρα προσδιορίζεται μόνο από ιστολογική εξέταση δειγμάτων που έχουν ληφθεί από βιοψία. Στο χαμηλό στάδιο δυσπλασίας τα καρκινικά κύτταρα μοιάζουν πάρα πολύ με τα φυσιολογικά κύτταρα του τραχήλου. Συνήθως μεγαλώνουν με πολύ αργό ρυθμό και είναι λιγότερο πιθανό να εξαπλωθούν. Στο προχωρημένο στάδιο τα κύτταρα φαίνονται μη φυσιολογικά. Είναι πολύ πιθανό να μεγαλώσουν και να εξαπλωθούν πολύ γρήγορα.



Σχήμα 3: Αλλαγές στην κυτταρική δομή ανάλογα με τον βαθμό δυσπλασίας.



Ιστολογικά η διαβάθμιση βασίζεται στην αναλογία της επιφάνειας του επιθηλίου που αποτελείται από μη διαφοροποιημένα κύτταρα του βασικού στρώματος. Ο αυξανόμενος βαθμός σχετίζεται με την σταδιακή απώλεια της φυσιολογικής μορφής του επιθηλίου. Στο Σχήμα 4 είναι παρουσιάζονται τα τρία στάδια επιθηλιακής δυσπλασίας, CIN I, II, III: Το πρώτο στάδιο, CIN I, ή το στάδιο ήπιας δυσπλασίας, κατά την διάρκεια του οποίου τα μη φυσιολογικά κύτταρα καταλαμβάνουν το χαμηλότερο επιθηλιακό στρώμα που βρίσκεται πάνω από την βασική μεμβράνη. Το δεύτερο στάδιο, CIN II, (μέση δυσπλασία), όπου παρατηρείται περαιτέρω αύξηση των μη φυσιολογικών κυττάρων τα οποία πλέον καταλαμβάνουν περίπου τα 2/3 του πάχους του επιθηλίου, και το τρίτο στάδιο CIN III, (σοβαρή δυσπλασία), όπου τα δυσπλαστικά κύτταρα έχουν καταλάβει σχεδόν όλο το επιθήλιο, με μόνο ένα ή δύο κυτταρικά στρώματα που βρίσκονται στην επιφάνεια του επιθηλίου, να αποτελούνται από φυσιολογικά κύτταρα. Όταν όλο το επιθήλιο έχει καταληφθεί από τα μη φυσιολογικά κύτταρα τότε χρησιμοποιείται ο όρος CIS. Όσο οι όροι CIN I, II, III είναι εφαρμόσιμοι για τον χαρακτηρισμό της κατάστασης της δυσπλασίας του τραχήλου, η βασική μεμβράνη παραμένει ανέπαφη. Όταν η βασική μεμβράνη του επιθηλίου παραβιαστεί, τότε διαγιγνώσκεται ο διηθητικός καρκίνος.



Σχήμα 4: Περιγραφή εξέλιξης της δυσπλασίας του τραχήλου της μήτρας.

## 1.3 Κλασσικές Διαγνωστικές Τεχνικές

### 1.3.1 Τεστ Παπανικολάου

Εδώ και πολλά χρόνια γίνεται προσπάθεια να διαγνωστεί εγκαίρως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας στα αρχικά του στάδια έτσι ώστε να μπορεί να θεραπευτεί. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος διάγνωσης είναι το τεστ Παπανικολάου, το οποίο βασίζεται στην εξαγωγή κυττάρων από τον τράχηλο και στην εξέταση τους στο μικροσκόπιο. Με βάση τις αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων ανάλογα με την κατάσταση, είναι δυνατή η διάγνωση τόσο του καρκίνου όσο και άλλων γυναικολογικών ασθενειών. Η συγκεκριμένη διαγνωστική μέθοδος έχει συνεισφέρει σημαντικά στην μείωση της θνησιμότητας τα τελευταία 50 χρόνια, παρόλο που παρουσιάζει κάποια σημαντικά μειονεκτήματα: Αρκετά μεγάλος χρόνος αναμονής για τα αποτελέσματα και υψηλό ποσοστό ψευδών-θετικών απαντήσεων. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου, έχουν εκτιμηθεί να είναι περίπου στα 73% και 63% αντίστοιχα. [7].

### 1.3.2 Κολποσκόπηση

Ένα μη φυσιολογικό τεστ Παπανικολάου ακολουθείται από την κολποσκόπηση [7]. Το κολποσκόπιο, Εικόνα 1, είναι ένα διοπτρικό, με χαμηλή μεγέθυνση, μικροσκόπιο το οποίο περιέχει και μία πηγή φωτός και χρησιμοποιείται από τον εξεταστή για με αποτέλεσμα να έχει καλύτερη οπτική εικόνα της περιοχής. Ο γυναικολόγος παρατηρεί τις αλλαγές που πιθανόν να υπάρχουν στον τράχηλο λόγω της ανάπτυξης της νεοπλασίας και λαμβάνει δείγματα για βιοψία από περιοχές των οποίων η μορφή δεν δείχνει φυσιολογική, ανάλογα με την κρίση του. Μέσω της ιστολογικής εξέτασης γίνεται διάγνωση του προβλήματος που παρουσιάζει κάθε περιοχή. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου, έχουν εκτιμηθεί να είναι περίπου στα 86% και 83% αντίστοιχα. [7].



Εικόνα 1: Κολποσκόπιο

Παρόλο που αυτές οι διαγνωστικές διαδικασίες είναι οι πιο διαδεδομένες, παρουσιάζουν πολλά μειονεκτήματα. Λόγω του ότι ο φυσιολογικός και μη φυσιολογικός ιστός δεν παρουσιάζουν οπτικές διαφορές, η λήψη των δειγμάτων του ιστού που χρησιμοποιούνται για ιστολογικές εξετάσεις συχνά γίνεται τυχαία, και εξαρτάται από την κρίση του γυναικολόγου ο οποίος διενεργεί την εξέταση. Παράλληλα, η ιστολογική εξέταση των δειγμάτων είναι επίσης υποκειμενική, αφού εξαρτάται από την εμπειρία των ειδικών οι οποίοι εκτελούν τις ιστολογικές εξετάσεις, και αρκετά χρονοβόρα. Τέλος δεν παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος και το ακριβές σημείο της νεοπλασίας.

## Βιβλιογραφία

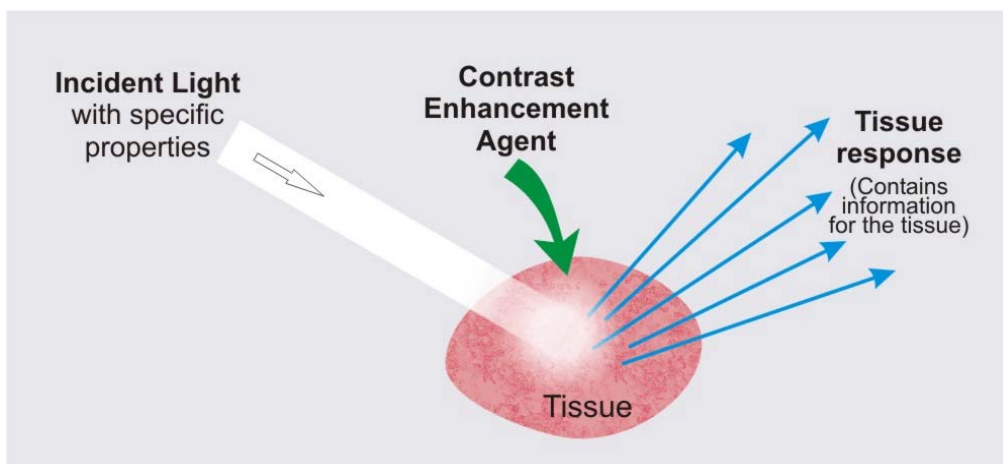
- [1] American Cancer Society. Cancer facts and figures–1993. Atlanta: American Cancer Society, 1993.
- [2] Backman V., Wallace M., Perelman L.T., Arendt J. T., Gurjar R., Müller M. G., Zhang Q., Zonios G., Kline E., McGillican T., Shapshay S., Valdez T., Badizadegan K., Crawford J. M., Fitzmaurice M., Kabani S., Levin H. S., Seiler M., Dasari R. R., Itzkan I., Van Dam J., Feld M.S., “Detection of Preinvasive Cancer Cells: Early Warning Changes in Precancerous Epithelial Cells Can Now be spotted In Situ”, Nature, Vol. 406, pp. 35-36, 2000
- [3] Beral V. and Booth M., "Prediction of cervical cancer incidence and mortality in England and Wales," Lancet, vol. 1, p. 495, 1986
- [4] Molecular biology of the cell, edited by Bruce Alberts, New York, : Garland Publ., 1983
- [5] Parkin D. M., Personal Communication, IARC, July 2000
- [6] Berek J. S., “Novak’s Gynecology – Chapter 16: Intraepithelial Disease of the Cervix, Vagina, and Vulva”, pp. 447-486, Williams & Wilkins, 1996
- [7] Mitchell M. F., Cantor S. B., Ramanujam N., Tortolero-Luna G., Richards-Kortum R., “Fluorescence Spectroscopy for Diagnosis of Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix”, Obstetrics & Gynecology, vol. 93, no. 3, March 1999

## Κεφάλαιο 2 Οπτική Βιοψία

### 2.1 Εισαγωγή

Στην προσπάθεια να εξαλειφθούν τα παραπάνω προβλήματα, και να υπάρξει μια πιο αξιόπιστη μέθοδος ανίχνευσης των προκαρκινικών σταδίων, έχει αναπτυχθεί μια μεγάλη ερευνητική δραστηριότητα με σκοπό την δημιουργία πρωτότυπων οπτικών διαγνωστικών τεχνικών. Οι οπτικές τεχνικές προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα αφού δεν απαιτείται η απομάκρυνση ιστού με αποτέλεσμα η διάγνωση να γίνεται “in vivo”. Αυτές οι τεχνικές ανήκουν στην κατηγορία της Οπτικής Βιοψίας και βασίζονται στην ανάλυση του φωτός που προέρχεται από τον ιστό, μετά την ακτινοβολήση του.

Η Οπτική Βιοψία είναι μία έννοια η οποία περικλείει τεχνικές και φασματοσκοπικές μεθόδους οι οποίες χρησιμοποιούνται για την μη παρεμβατική ανίχνευση του μη φυσιολογικού ιστού. Ο βασικός μηχανισμός που ακολουθείται κατά την διαδικασία της Οπτικής Βιοψίας είναι η ακτινοβολήση του ιστού με φως συγκεκριμένων χρονικών και φασματικών χαρακτηριστικών και η συλλογή και ανάλυση του φωτός που επιστρέφει, Εικόνα 1. Η αλληλεπίδραση του φωτός με τον ιστό, (απορρόφηση, εκπομπή και σκέδαση), εκτός από τα χαρακτηριστικά του προσπίπτοντος φωτός εξαρτάται και από τα χαρακτηριστικά του ιστού, με αποτέλεσμα το φως που επιστρέφει να δίνει πληροφορίες για την μορφολογία και την σύστασή του.



Εικόνα 1: Βασική ιδέα της Οπτικής Βιοψίας

## 2.2 Αλληλεπίδραση Φωτός με Ύλη

Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τρόποι αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με της ύλη. Η μορφή της αλληλεπίδρασης αυτής εξαρτάται από την ηλεκτρονική δομή του υλικού όπως αυτή προσδιορίζεται από τις κβαντομηχανικές του ιδιότητες, και μπορεί να είναι απορρόφηση, εκπομπή, ή σκέδαση.

Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη μπορεί να προκαλέσει επαναπροσανατολισμό της ακτινοβολίας και / ή μεταβάσεις μεταξύ των ενεργειακών επιπέδων των ατόμων ή των μορίων. Μία μετάβαση από ένα χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο σε ένα υψηλότερο που προκαλείται από την μεταφορά ενέργειας στο σύστημα, (άτομο ή μόριο), ονομάζεται απορρόφηση. Μία μετάβαση από ένα υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο σε ένα χαμηλότερο ονομάζεται εκπομπή αν η ενεργειακή διαφορά προσφέρεται στο περιβάλλον ή μη ακτινοβολητική εξασθένιση αν δεν εκπέμπεται ακτινοβολία. Ο επαναπροσανατολισμός του φωτός λόγω της αλληλεπίδρασής του με την ύλη ονομάζεται σκέδαση και μπορεί να εμφανιστεί ή όχι με ταυτόχρονη μεταφορά ενέργειας.

### 2.2.1 Απορρόφηση

Όταν η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου είναι ίση με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δυο ενεργειακών καταστάσεων του μοριακού ή ατομικού συστήματος τότε το φωτόνιο απορροφάται από το σύστημα, με αποτέλεσμα να προκληθεί διέγερση. Ο τύπος της διέγερσης εξαρτάται από το μήκος κύματος, (ή την ενέργεια), της ακτινοβολίας. Έτσι, υπεριώδης ή ορατή ακτινοβολία προκαλεί την διέγερση των ηλεκτρονικών σταθμών, η υπέρυθρη ακτινοβολία προκαλεί την διέγερση δονητικών σταθμών, ενώ οι περιστροφικές στάθμες διεγείρονται από την ακτινοβολία μικροκυμάτων. Τα φασματικά χαρακτηριστικά ενός ατόμου ή μορίου εξαρτώνται από την δομή των ενεργειακών επιπέδων, και τα φάσματα απορρόφησης είναι χρήσιμα για την ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών τους.

### 2.2.2 Εκπομπή

Τα άτομα και τα μόρια που έχουν διεγερθεί σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα μπορούν να αποδιεγερθούν σε χαμηλότερα εκπέμποντας ακτινοβολία. Για άτομα τα οποία έχουν διεγερθεί από ενεργειακές πηγές υψηλής θερμοκρασίας αυτή η εκπομπή

φωτός ονομάζεται ατομική ή οπτική εκπομπή, ενώ όταν τα άτομα έχουν διεγερθεί με φως, ονομάζεται φθορισμός. Όσο αφορά τα μόρια η τελευταία διαδικασία ονομάζεται επίσης φθορισμός στην περίπτωση που η μετάβαση είναι επιτρεπτή, δηλαδή γίνεται μεταξύ καταστάσεων διαφορετικού σπιν, ενώ λέγεται φωσφορισμός όταν η μετάβαση γίνεται μεταξύ καταστάσεων ίδιου σπιν. Η ένταση της εκπομπής του συστήματος, είναι γραμμικά ανάλογη με την συγκέντρωση, όταν αυτή είναι χαμηλή και είναι χρήσιμη η γνώση της για την ποσοτική εκτίμηση των ακτινοβολητικών μέσων. Το κύριο πλεονέκτημα της μελέτης του φθορισμού σε σχέση με την μελέτη της απορρόφησης, είναι η πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία που έχει το σήμα του φθορισμού, το οποίο πρακτικά έχει μηδενικό υπόβαθρο.

### 2.2.3 Σκέδαση Φωτός

Η σκέδαση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων από κάθε σύστημα σχετίζεται με την ανομοιογένεια του συστήματος στην μοριακή κλίμακα. Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διαπεράσει την ύλη, το ηλεκτρικό πεδίο του φωτός επάγει μια ταλαντούμενη διπολική ροπή στα μόρια, τα οποία στην συνέχεια δρουν σαν δευτερογενείς πηγές φωτός και ακτινοβολούν προς όλες τις διευθύνσεις. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σκέδαση, και με την παρατήρηση της αλλαγής στην συχνότητα, την γωνιακή κατανομή, την πόλωση και την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας παρέχονται πληροφορίες για το μέγεθος, το σχήμα, και τις αλληλεπιδράσεις του υλικού.

Αν το σκεδαζόμενο φως έχει το ίδιο μήκος κύματος με την προσπίπτουσα ακτινοβολία τότε γίνεται λόγος για ελαστική σκέδαση, (Rayleigh scattering, κτλ.). Αντιθέτως όταν το σκεδαζόμενο φως έχει μήκος κύματος διαφορετικό από την προσπίπτουσα ακτινοβολία η σκέδαση είναι μη ελαστική, (Raman scattering, κτλ.). Στην περίπτωση που το υλικό στο οποίο προσπίπτει το φως είναι τέλει ομογενές μέσο δεν παρατηρείται σκεδαζόμενη ακτινοβολία, ενώ στην περίπτωση που το μέσο είναι ανομοιογενές παρατηρείται σκέδαση σε όλες τις διευθύνσεις. Όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι μονοχρωματική, (λείζερ), και πολωμένη ως προς κάποιο επίπεδο σκέδασης, επάγονται δίπολα στο μέσο τα οποία ταλαντώνονται παράλληλα με την διεύθυνση πόλωσης της ακτινοβολίας. Έτσι για ισοτροπικό μόριο το πολωμένο προσπίπτων φως θα δώσει σκεδαζόμενο φως με την ίδια πόλωση. Στην

περίπτωση του ανισοτροπικού μορίου το κάθετα ή οριζόντια πολωμένο προσπίπτων φως θα δώσει κάθετα και οριζόντια πολωμένο σκεδαζόμενο φως.

## 2.3 Οπτικές Διαγνωστικές Μέθοδοι

Οι παραπάνω μηχανισμοί αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη χρησιμοποιούνται έτσι ώστε να εξαχθούν διαγνωστικές πληροφορίες κατά την διεξαγωγή της Οπτικής Βιοψίας. Διαφορετικές οπτικές τεχνικές είναι ευαίσθητες σε διαφορετικά χαρακτηριστικά του ιστού, και είναι κοινώς αποδεκτό ότι παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες. Παραδείγματος χάριν, η φασματοσκοπία Raman, και η φασματοσκοπία Φθορισμού Επαγόμενου από Λέιζερ είναι ευαίσθητες στα μοριακά χαρακτηριστικά του ιστού, ενώ η φασματοσκοπία Σκέδασης και η φασματοσκοπία Διάχυτης Ανάκλασης παρέχουν πληροφορίες κυρίως για τη μορφολογική δομή του ιστού.

### 2.3.1 Φασματοσκοπία Φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ, είναι μία μη παρεμβατική διαγνωστική τεχνική της νεοπλασίας του τραχήλου της μήτρας. Η συγκεκριμένη τεχνική μελετά τον φθορισμό του ιστού ο οποίος προέρχεται από φθοροφόρες που υπάρχουν στο εσωτερικό του [13], αφού ακτινοβοληθεί με μονοχρωματικό φως.

Η μορφή του φάσματος εξαρτάται από τον αριθμό και το είδος των φθοροφόρων που περιέχονται στον ιστό και στα κύτταρά του, καθώς και από το μήκος κύματος του μονοχρωματικού φωτός που χρησιμοποιείται, αφού διαφορετικό λ διεγείρει διαφορετικές φθοροφόρες, [10], [7]. Μερικά από τα φθορίζοντα μόρια του ιστού είναι η φλαβίνη, το κολλαγόνο και η ελαστίνη, [8]. Η διαφοροποίηση του φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού, βασίζεται στις αλλαγές που συμβαίνουν στην μοριακή δομή των κυττάρων και του ιστού κατά την διάρκεια της εξέλιξης της νεοπλασίας, [8].

Παρά το γεγονός ότι η παραπάνω μέθοδος έχει αποδείξει την ικανότητα της για την *in vivo* διαφοροποίηση του φυσιολογικού από τον μη φυσιολογικό ιστό, [7], [14], [1], [15], [12], αφού διαφορές στην μοριακή σύσταση του ιστού που σχετίζεται με την παθολογία του είναι εμφανείς στο φάσμα φθορισμού, παρέχοντας έτσι



ποσοτική διαγνωστική πληροφορία, παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα και γι' αυτόν τον λόγο δεν είναι εφαρμόσιμη κλινικά. Οι διάφορες καταστάσεις νεοπλασίας είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν από την μεταπλασία και τις φλεγμονές, αφού παρουσιάζονται σημαντικές ομοιότητες στα φάσματα φθορισμού, [11]. Επίσης, κάποιες ασαφείς διαφοροποιήσεις μεταξύ φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού είναι δύσκολο να ανιχνευθούν σε τόσο σύνθετα μοριακά συστήματα, αφού πολλά μόρια τα οποία έχουν ευρύ φάσμα εκπομπής περιέχονται στο φάσμα φθορισμού, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη επικάλυψη των κορυφών, [9], που ενδιαφέρουν ως προς την διαφοροποίηση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την φτωχή διαφοροποίηση του σήματος, μεταξύ του φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού, [9].

### 2.3.2 Φασματοσκοπία Raman

Τα περισσότερα βιολογικά μόρια είναι 'ενεργά' όσο αφορά την φασματοσκοπία Raman, και τα φάσματα δίνουν και πολύ συγκεκριμένες πληροφορίες οι οποίες είναι ικανές να διαφοροποιήσουν τα είδη των μορίων, [8]. Διάφορα βιολογικά μόρια όπως τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες, και τα λιπίδια έχουν συγκεκριμένα φάσματα Raman τα οποία παρέχουν δομικές πληροφορίες για την κατάσταση του ιστού. Έτσι οι αλλαγές που συμβαίνουν στα παραπάνω μόρια κατά την εξέλιξη της νεοπλασίας μπορούν, μέσω του φάσματος Raman, να ανιχνευτούν.

Μερικές τεχνικές φασματοσκοπίας Raman που έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την βελτίωση της διακριτικής ικανότητας της παραπάνω τεχνικής είναι, η φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier υπερύθρου, (FT-IR), η φασματοσκοπία του εγγύς υπερύθρου, (NIR), και πολλές άλλες.

Τα μειονεκτήματα της παραπάνω μεθόδου, είναι ότι απαιτείται πολύ σύνθετη οργανολογία για την δημιουργία και ανίχνευση του πολύ αδύναμου οπτικού σήματος. Για αυτό το λόγο η τεχνική είναι μέχρι τώρα εφαρμόσιμη μόνο σε *in vitro* πειράματα.

### 2.3.3 Φασματοσκοπία σκέδασης φωτός

Όταν ο ιστός γίνεται δυσπλαστικός προκαλούνται αυξήσεις στις χωρικές μεταβολές του δείκτη διάθλασης του πυρήνα των κυττάρων καθώς και μεταβολή του μεγέθους του και στον τρόπο κατανομής τους στο επιθήλιο, [6], [2]. Τα παραπάνω στοιχεία συμβάλουν στην αλλαγή των ιδιοτήτων σκέδασης του δυσπλαστικού ιστού σε σχέση με τον φυσιολογικό. Μετά την ακτινοβολήση του ιστού με

ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, το οπισθοσκεδαζόμενο φως καταγράφεται σε ανιχνευτές και μέσω της λεπτομερούς ανάλυσης του φάσματος, επιτυγχάνεται η διαφοροποίηση του φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού, [6], [2]. Παρόλα αυτά η διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών σταδίων νεοπλασίας δεν έχει μελετηθεί ακόμα.

#### 2.3.4 Φασματοσκοπία ανάκλασης

Το ποσοστό φως που προσπίπτει στον ιστό, και αφού υφίσταται πολλαπλές ελαστικές σκεδάσεις στο εσωτερικό του, ανιχνεύεται αντιπροσωπεύει την διάχυτη ανάκλαση η οποία περιέχει σημαντικές ποσοτικές πληροφορίες για την δομή και την σύσταση του ιστού, όπως την συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, την πυκνότητα των σκεδαστών και το μέγεθός τους κτλ. [16]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης μπορεί να διαφοροποιήσει *in vivo* τον μη φυσιολογικό από τον φυσιολογικό ιστό, [16].

#### 2.3.5 Διαγνωστικοί Δείκτες

Σε διάφορες περιπτώσεις, για να υποβοηθηθεί η διαγνωστική διαδικασία, γίνεται τοπική εφαρμογή ουσιών, που ονομάζονται “δείκτες”, οι οποίοι αυξάνουν την χρωματική αντίθεση, ουσιαστικά δηλαδή διαφοροποιούν τις οπτικές ιδιότητες, της υγιούς περιοχής και της περιοχής με δυσπλασία. Χαρακτηριστικές ουσίες οι οποίες λειτουργούν με τον παραπάνω τρόπο είναι, το διάλυμα οξικού οξέος, το Toluidine Blue και κάποιες φωτοευαίσθητες ενώσεις, [5]. Η εφαρμογή μιας από τις παραπάνω ενώσεις στον ιστό αλληλεπιδρά με ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό του, το οποίο αλλάζει ανάλογα με τον βαθμό της δυσπλασίας. Έτσι είναι δυνατόν να ανιχνευτεί η αλλαγή, αφού θα παρουσιάζεται αυξημένη διαφορά στις οπτικές ιδιότητες του φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού και με αυτόν τον τρόπο να γίνει δυνατή η διάγνωση της παθολογικής κατάστασης του ιστού. [4]

Πιο συγκεκριμένα, εξωτερικά εφαρμοζόμενες φθοροφόρες είναι δυνατόν να αυξήσουν τις φασματικές διαφορές, οι οποίες οφείλονται στην ιδιότητα της φθοροφόρας να αλληλεπιδρά κυρίως με τα μη φυσιολογικά, (atypical), κύτταρα. Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση της αντίθεσης, μεταξύ του φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού. Συνήθως γίνεται η μελέτη της κινητικής του φαινομένου αυτού, δηλαδή η μέτρηση της έντασης του φθορισμού συναρτήσει του χρόνου. Η παραπάνω

διαδικασία παρέχει πολύ χρήσιμες πληροφορίες για το στάδιο της δυσπλασίας, χωρίς να είναι απαραίτητο να αφαιρεθεί ιστός και να μελετηθεί in vitro. Παρόλα αυτά, λόγω του χαμηλού ρυθμού συσσώρευσης της φθοροφόρας, ο χρόνος που χρειάζεται για να γίνει μια μέτρηση είναι εξαιρετικά μεγάλος, (12-24 ώρες), και είναι δυνατόν να υπάρξουν side effects που σχετίζονται κυρίως με την φθοροφόρα που χρησιμοποιείται, [4], [5]. Είναι, λοιπόν, φανερό ότι υπάρχουν αρκετά σημαντικοί παράγοντες, που επιδρούν περιοριστικά στην κλινική εφαρμογή της μεθόδου.

Ένας άλλος πολύ σημαντικός δείκτης αύξησης της αντίθεσης μεταξύ φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού, είναι το οξικό οξύ. Η συγκεκριμένη ένωση χρησιμοποιείται εμπειρικά, σε κλινικές εξετάσεις πάνω από 70 χρόνια, [4], [5]. Ο σκοπός της χρήσης του είναι να εντοπιστούν οι μη φυσιολογικές περιοχές του τραχήλου της μήτρας, και μέχρι σήμερα παρενέργειες από την εφαρμογή του στον ιστό δεν έχουν επισημανθεί. Η τοπική εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος συγκέντρωσης 3%-6%, προκαλεί αναστρέψιμες αλλαγές στις ιδιότητες του σκεδαζόμενου φωτός επιλεκτικά, στις μη φυσιολογικές περιοχές του επιθηλιακού ιστού, οι οποίες τις περισσότερες φορές έχουν την μορφή άσπρων κηλίδων, [4], [5]. Είναι όμως δυνατόν, επιθηλιακές αλλαγές διαφορετικές από νεοπλασία, να παρουσιάσουν λεύκανση κατά την εφαρμογή οξικού οξέος με αποτέλεσμα να μην είναι τελικά δυνατός ο διαχωρισμός της φυσιολογικής και μη φυσιολογικής περιοχής μόνο βάσει των οπτικών παρατηρήσεων.

### 2.3.6 Βασικά Μειονεκτήματα Μεθόδων

Με βάση όλα τα παραπάνω, είναι εμφανές ότι παρά το ότι πλέον οι μοντέρνες διαγνωστικές τεχνικές παρέχουν αρκετά πιο αντικειμενική διάγνωση των παθολογικών καταστάσεων, σε σύγκριση με της κλασικές διαγνωστικές τεχνικές οι οποίες βασιζόντουσαν κατά κύριο λόγο στον ανθρώπινο παράγοντα, κυρίως στην κρίση και εμπειρία του εξεταστή, εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά μειονεκτήματα, από τα οποία τα σημαντικότερα παρατίθενται παρακάτω.

- ✓ σύνθετη οργανολογία
- ✓ αδύναμο σήμα
- ✓ μελέτη συγκεκριμένου σημείου, που καθορίζεται από τον χρήστη και όχι όλης της περιοχής, [4]

Τα μειονεκτήματα αυτά κάνουν δύσκολη την κλινική εφαρμογή των συγκεκριμένων τεχνικών και παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης διαγνωστικών σφαλμάτων.

## 2.4 Απεικονιστική Φασματοσκοπία

### 2.4.1 Εισαγωγή

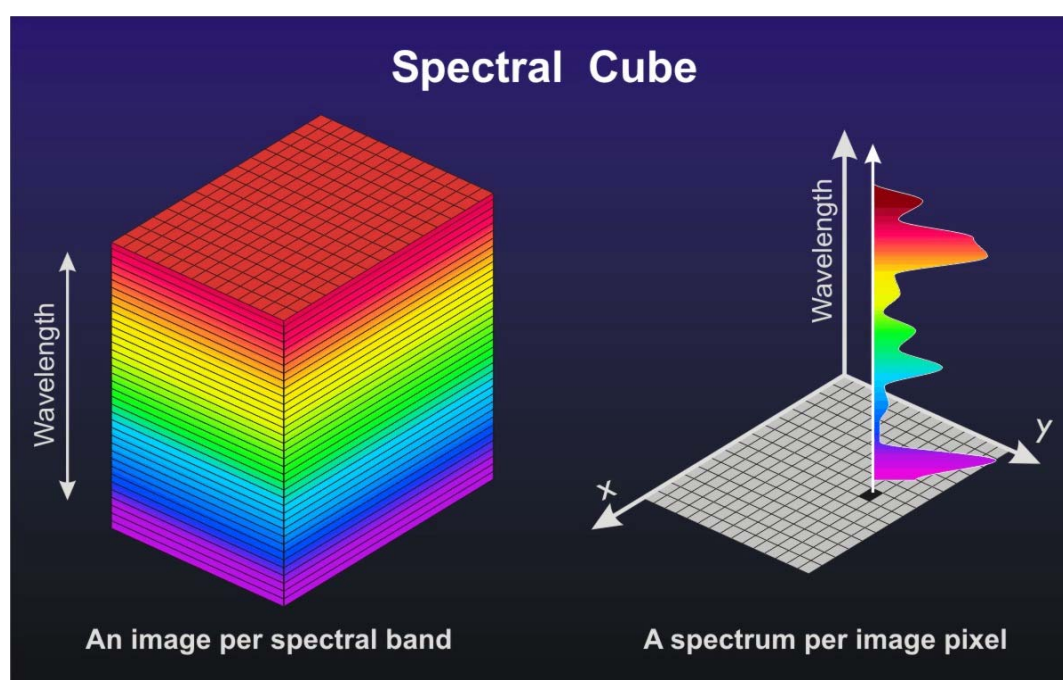
Τα παραπάνω δεδομένα κάνουν εμφανή την ανάγκη ανάπτυξης ενός συστήματος το οποίο να δίνει μία συνολική εικόνα της κατάστασης του ιστού σε κάθε του σημείο, να έχει απλή οργανολογία, και να δίνει ισχυρό σήμα έτσι ώστε να γίνεται εύκολα η ανάλυση των αποτελεσμάτων. Αυτές τις απαιτήσεις ικανοποιεί ο τομέας της Φασματικής Απεικόνισης.

Οι μοντέρνες απεικονιστικές διαγνωστικές τεχνικές βασίζονται στην μετατροπή πληροφοριών που λαμβάνονται από έναν απεικονιστικό αισθητήρα. Ο αισθητήρας εφαρμόζεται σε οπτικά συστήματα, (μικροσκόπια, ενδοσκόπια), και έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να μιμείται την ανθρώπινη όραση, με αποτέλεσμα την δημιουργία μίας έγχρωμης εικόνας του οπτικού πεδίου, όμοια με αυτήν που βλέπει το ανθρώπινο μάτι. Αυτό είναι εφικτό με τον διαχωρισμό του φωτός σε τρεις ευρείες φασματικές περιοχές, δηλαδή στο κόκκινο πράσινο και μπλε, στην περιοχή του ορατού φάσματος, 400-700 nm. Αυτός, όμως, ο τρόπος διαχωρισμού του φωτός θέτει πολλούς περιορισμούς στην διαφοροποίηση και στον προσδιορισμό αντικειμένων τα οποία έχουν τα ίδια ή παρόμοια χρωματικά χαρακτηριστικά αλλά διαφορετική χημική σύσταση, [3].

Συμπληρωματικές διαγνωστικές πληροφορίες μπορούν να ληφθούν από την ανάπτυξη απεικονιστικών συστημάτων τα οποία διευρύνουν την ικανότητα ανίχνευσης του ανθρώπινου οπτικού συστήματος τόσο στην φασματική απόκριση όσο και στην ανάλυση. Τότε θα είναι δυνατή η ανίχνευση καθώς και η φασματική και χρονική διαφοροποίηση διαφορετικών αντικειμένων που έχουν το ίδιο χρώμα, και βασίζεται στις φασματικές διαφορές που εντοπίζονται σε στενές φασματικές περιοχές του ορατού ή μη ορατού φάσματος.

## 2.4.2 Φασματική Απεικόνιση

Οι δύο περιοχές, απεικόνιση και φασματοσκοπία, συνεχώς βελτιώνονται από νέα τεχνολογικά ευρήματα, με αποτέλεσμα να παρέχουν δεδομένα με περισσότερες πληροφορίες. Πλέον, είναι δυνατός ο συνδυασμός απεικόνισης και φασματοσκοπίας σε ένα νέο πεδίο που ονομάζεται Φασματική Απεικόνιση, όπου η ένταση του φωτός καταγράφεται σαν συνάρτηση και του μήκους κύματος αλλά και της περιοχής από την οποία προέρχεται. Στην εικόνα που λαμβάνεται, τα δεδομένα περιλαμβάνουν μια ολοκληρωμένη εικόνα σε κάθε μήκος κύματος, καθώς και ένα ολοκληρωμένο φάσμα σε κάθε στοιχείο εικόνας, (pixel), Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Φασματική Απεικόνιση, Αριστερά: Μία φασματική εικόνα μπορεί να παρουσιαστεί σαν ένα σύνολο από συνεχόμενες εικόνες καθεμία από τις οποίες έχει ληφθεί σε διαφορετικό μήκος κύματος, Δεξιά: Η Τρίτη διάσταση μίας εικόνας παρέχει το φάσμα σε κάθε pixel.

Ένα τυπικό απεικονιστικό σύστημα αποτελείται από μία κάμερα CCD (Charge Couple Device) η οποία συνδέεται με ένα απεικονιστικό στοιχείο, (μικροσκόπιο ή ενδοσκόπιο) απ' όπου το φως προωθείται στην οπτική κεφαλή η οποία αποτελείται από τα παρακάτω στοιχεία

- ✓ Έναν απεικονιστικό μονοχρωμάτορα ο οποίος διαχωρίζει το φως σε διαφορετικά μήκη κύματος.

- ✓ Έναν ανιχνευτή CCD ο οποίος συλλέγει την ένταση του φωτός που απαιτείται έτσι ώστε να ληφθεί ένα φάσμα για κάθε σημείο της εικόνας.
- ✓ Μία πηγή φωτός

Το πιο σημαντικό εξάρτημα τη φασματικής απεικόνισης είναι ο απεικονιστικός μονοχρωμάτορας, ο οποίος κάνει δυνατό τον διαχωρισμό του φωτός που εισέρχεται στην οπτική κεφαλή, στις φασματικές του συνιστώσες. Οι πιο σημαντικοί μονοχρωμάτορες που χρησιμοποιούνται στην απεικονιστική φασματοσκοπία βασίζονται στην χρήση φίλτρων και είναι τα Acousto-Optical Tunable Filters, (AOTF), τα Liquid Crystal Tunable Filters, (LCTF).

Το AOTF σύστημα είναι όργανο που αποτελείται από ένα κρυσταλλικό υλικό, συνήθως διπλοθλαστικό (birefringent), το οποίο έχει κοπεί κατά μήκος ενός συγκεκριμένου κρυσταλλικού άξονα. Ένας πιεζοηλεκτρικός μετατροπέας, (transducer), εφαρμόζει ένα σήμα ραδιοσυχνότητας, με αποτέλεσμα ένα ακουστικό κύμα να σχηματίζεται μέσα στον κρύσταλλο. Αυτό το κύμα αλλάζει το δείκτη διάθλασης του κρυστάλλου και παράγει ένα δίκτυο μεταβλητής φάσης, το οποίο δημιουργεί τις συνθήκες ρύθμισης του μήκους κύματος.

Το φίλτρο υγρών κρυστάλλων LCTF αποτελείται από έναν αριθμό διαδοχικών στρωμάτων, καθένα από τα οποία αποτελείται από διπλοθλαστικό υλικό το οποίο είναι μεταξύ δύο γραμμικών πολωτών. Ο κύριος άξονας των πολωτών είναι τοποθετημένος σε γωνία  $45^0$  ως προς τον οπτικό άξονα του διπλοθλαστικού υλικού. Το γραμμικά πολωμένο φως που εξέρχεται από τον εσωτερικό πολωτή περνά μέσα από το διπλοθλαστικό υλικό το οποίο χωρίζει το μεταφερόμενο φως σε ίσες τακτικές και έκτακτες συνιστώσες. Το φίλτρο δημιουργεί μια σχετική διαφορά φάσης, (επιβράδυνση), ανάμεσα σε δύο ορθογώνια γραμμικά κύματα η οποία εξαρτάται τόσο από το διπλοθλαστικό υλικό όσο και από το μήκος κύματος του φωτός. Αφού εξέλθουν από το υλικό, οι οπτικές ακτίνες επανασυντίθενται, έχοντας γραμμική, ελλειπτική ή κυκλική κατάσταση πόλωσης, η οποία εξαρτάται από τους προαναφερθέντες παράγοντες. Μόνο οι συνιστώσες των τακτικών και έκτακτων ακτινών που ταλαντώνονται στην κατεύθυνση του άξονα μεταφοράς του εξωτερικού πολωτή θα μεταφερθούν και θα καταγραφούν από τον απεικονιστικό ανιχνευτή. Αν το προσπίπτον φως είναι πολυχρωματικό, τότε συγκεκριμένα μήκη κύματος θα σχηματίσουν μια κατάσταση πόλωσης που είναι γραμμική και παράλληλη στον άξονα μεταφοράς του αναλυτή. Κάθε στρώμα υλικού είναι κατασκευασμένο να μεταφέρει συγκεκριμένες φασματικές περιοχές με την κατάλληλη επιλογή του πάχους (οπτικό

μήκος). Τοποθετώντας τα στρώματα σε σειρά, μόνο μία φασματική περιοχή που διαθέτει τα κριτήρια μεταφοράς θα μεταφερθεί. Με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού το κομμάτι του υγρού κρυστάλλου και ο δείκτης διάθλασης ενός από τους κρυσταλλικούς άξονες αλλάζει. Μια συνιστώσα του φωτός τότε επιβραδύνεται σχετικά με τις άλλες δημιουργώντας έτσι μια διαφορά φάσης. Αποτέλεσμα αυτού είναι να επιλέγεται η φασματική περιοχή που μεταφέρεται. Ο συσχετισμός ανάμεσα στο εφαρμοζόμενο επίπεδο αντίθεσης και τη φασματική περιοχή που μεταφέρεται παρέχει ένα μέσο για τον ηλεκτρονικό έλεγχο του LCTF.

Τα παραπάνω συστήματα μπορούν να συνδεθούν με μια διδιάστατη ανιχνευτική διάταξη έτσι ώστε να παραχθεί ένα σύστημα κάμερας μεταβλητού μήκους κύματος. Για να λειτουργήσουν συγχρονισμένα ο μονοχρωμάτορας και ο απεικονιστικός ανιχνευτής χρειάζονται ειδικά συστήματα ελέγχου.

Στο επόμενο κεφάλαιο παρουσιάζεται η πειραματική διάταξη απεικονιστικής φασματοσκοπίας η οποία χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία σε συνδυασμό με την εφαρμογή ενός διαγνωστικού δείκτη αύξησης της χρωματικής αντίθεσης μεταξύ φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού, του οξικού οξέος, για την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση και ανίχνευση των προκαρκινικών σταδίων στον τράχηλο της μήτρας.

## Βιβλιογραφία

- [1] Alfano R. R., Tata D. B., Cordero J., Tomashefsky P., Longo F. W., Alfano M. A., “Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue”, IEEE JQE, vol. 20, pp. 1507-1511, 1984
- [2] Backman V., Gurjar R., Badizadegan K., Itzkan I., Dasari R. R., Perelman L. T., Feld M. S., “Polarized Light Scattering Spectroscopy for Quantitative Measurement of Epithelial Cellular Structures In Situ”, IEEE Journal of Selected Topics in quantum electronics, Vol. 5, no. 4, pp. 1019-1026, 1999
- [3] Balas C., “An imaging colorimeter for non contact tissue color mapping” , IEEE Trans. Biomed. Eng., Vol. 44, No. 6, pp. 468-474, June 1997
- [4] Balas C. J., “A novel optical imaging method for the early detection, quantitative grading, and mapping of cancerous and precancerous lesions of cervix”, IEEE Trans. Biomed. Eng., Vol. 48, No. 1, pp. 96-104, Jan. 2001
- [5] Balas C. J., Themelis G. C., Prokopakis E. P., Orfanoudaki I., Koumantakis E., Helidonis E. S., “*In vivo* detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid-tissue interaction kinetics”, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., Vol. 53, pp. 153-157, 1999
- [6] Gurjar R. S., Backman V., Perelman L. T., Georgakoudi I., Badizadegan K., Itzkan I., Dasari R. R., Feld M. S., “Imaging human epithelial properties with polarized light-scattering spectroscopy”, Nature Medicine, Vol. 7, No. 11, November 2001
- [7] Heintzelman D. L., Utzinger U., Fuchs H., Zuluga A., Gossage K., Gillenwater A. M., Jacob R., Kemp B., Richards-Kortum R. R., “Optimal Excitation Wavelengths for *In vivo* Detection of Oral Neoplasia Using Fluorescence Spectroscopy”, Photochemistry and Photobiology, 72(1): 103-113, 2000.
- [8] Mahadevan-Jansen A., Richards-Kortum R., “Raman Spectroscopy for Cancer Detection: A Review”, 19th International Conference- IEEE/EMBS, Oct. 30-Nov. 2, 1997.
- [9] Mahadevan-Jansen A., Mitchell M. F., Ramanujam N., Malpica A., Thomsen S., Utzinger U., Richards-Kortum R. R., “Near infrared Raman spectroscopy for the *in vitro* detection of cervical precancers”, Photochem. And Photobiol., vol. 68(1), pp. 123-132, 1998
- [10] Mitchell M. F., Cantor S. B., Ramanujam N., Tortolero-Luna G., Richards-Kortum R., “Fluorescence Spectroscopy for Diagnosis of Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix”, Obstetrics & Gynecology, vol. 93, no. 3, March 1999
- [11] Ramanujam N., Mitchell M. F., Mahadevan A., Thomsen S., Malpica A., Wright T., Atkinson N., Richards-Kortum R., “Spectroscopic Diagnosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) *In vivo* Using Laser-Induced Fluorescence Spectra at Multiple Excitation Wavelengths”, Lasers in Surgery and Medicine Vol. 19, 63-74, 1996
- [12] Ramanujam N., Mitchell M. F., Mahadevan-Jansen A., Thomsen S., Staerkel G., Malpica A., Wright T., Atkinson N., Richards-Kortum R. R., “Cervical precancer detection using a multivariate statistical algorithm based on laser induced fluorescence spectra a multiple excitation wavelengths”, Photochem. And Photobiol., vol. 64(4), pp. 720-735, 1996
- [13] Richards-Kortum R, Mitchell MF, Ramanujam N, Mahadevan A, Thomsen S. “*In vivo* fluorescence spectroscopy: Potential for noninvasive, automated diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and use as a surrogate endpoint biomarker”, J Cell Biochem Suppl 1994;19:111-9.



- [14] Richards-Kortum R. R., Mitchell M. F., Ramanujam N., Mahadevan A., Thomsen S., “*In vivo* fluorescence spectroscopy: potential for non-invasive, automated diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and use as a surrogate endpoint biomarker”, J. Cell. Biochem. (Suppl.) vol. 19, pp. 111-119, 1994
- [15] Richards-Kortum R., Rava R. P., Fitzmaurice M., Sivak M., Feld M. S., “Spectroscopic diagnosis of colonic dysplasia”, Photochem. Photobiol., vol. 53, pp. 777-786, 1991
- [16] Zonios G, Perelman L. T, Backman V., Manoharan R., Fitzmaurice M., Van Dam J., Feld M. S., “Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps *in vivo*”, Applied Optics, Vol. 38, No. 31, 1999

## Κεφάλαιο 3 Πειραματική Διαδικασία

### 3.1 Εισαγωγή

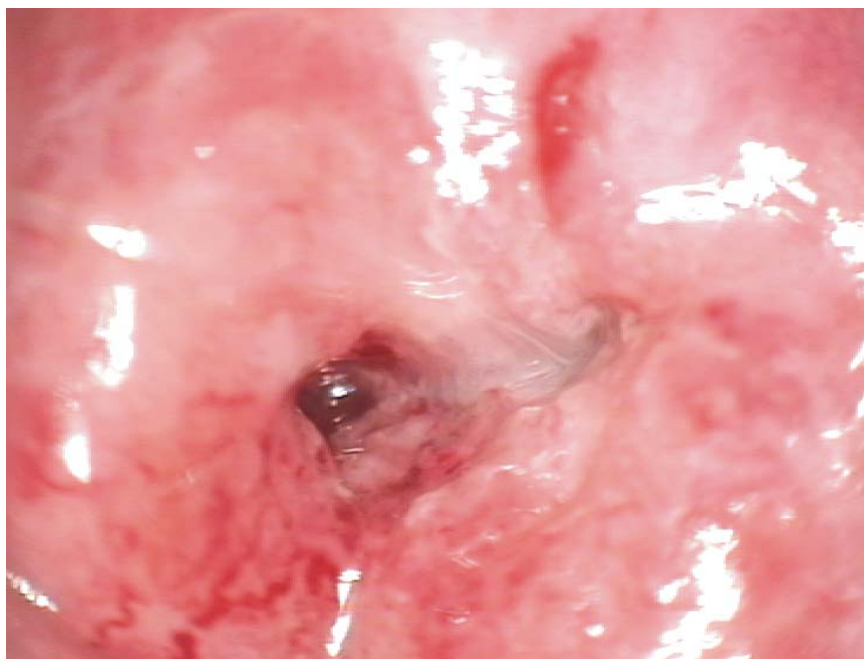
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα νέο οπτικό σύστημα το οποίο βασίζεται στην φασματική απεικόνιση, με σκοπό την ανάπτυξη μίας νέας μεθόδου οπτικής βιοψίας. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί την αλληλεπίδραση του οξικού οξέος με τον ιστό, η οποία παρέχει την δυνατή διαφοροποίηση μεταξύ της φυσιολογικής και μη φυσιολογικής κατάστασης, και την χρήση ενός πρωτότυπου απεικονιστικού οπτικού συστήματος με σκοπό την μελέτη αυτής της διαφοροποίησης. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται δυνατή η χαρτογράφηση του ιστού και η λήψη αντικειμενικών και ποσοτικών πληροφοριών, που με την κατάλληλη επεξεργασία διαφοροποιούν τα προκαρκινικά στάδια καθώς και άλλες παθολογικές καταστάσεις.

Τα δεδομένα που λαμβάνονται από το απεικονιστικό σύστημα περιέχουν χωρικές πληροφορίες αλλά και πληροφορίες για την σύνθεση των δειγμάτων που μελετώνται. Οι φασματικές πληροφορίες μπορούν να συντελέσουν στην *in vivo* αναγνώριση των κακώσεων του ιστού, αφού βασίζονται σε συγκεκριμένα βιοχημικά και δομικά χαρακτηριστικά του ιστού. Επίσης η απεικόνιση σε φασματικές περιοχές οι οποίες ανταποκρίνονται στη μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ των φασματικών χαρακτηριστικών του φυσιολογικού και μη φυσιολογικού ιστού, θα έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγιστοποίηση της χρωματικής αντίθεσης. Έτσι θα είναι εφικτός ο καλύτερος εντοπισμός του σημείου ιστού που παρουσιάζει το πρόβλημα και θα βελτιωθεί η ακρίβεια στον προσδιορισμό του ακριβούς μεγέθους της αλλοίωσης πράγμα πολύ σημαντικό για τον σχεδιασμό της θεραπείας.

Η μέθοδος που περιγράφηκε παραπάνω χρησιμοποιήθηκε για την μη επεμβατική ανίχνευση των νεοπλασιών στον τράχηλο της μήτρας, καθώς και για τον προσδιορισμό του σταδίου της νεοπλασίας. Η μέθοδος βασίζεται στην *in vivo* ποσοτική καταγραφή των φασματικών, χωρικών, και χρονικών αλλαγών των ιδιοτήτων σκέδασης του φωτός, που προκαλούνται στις επιθηλιακές δυσπλασίες και κακοήθειες του τραχήλου της μήτρας μετά την εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος.

### 3.2 Αλληλεπίδραση Οξικού Οξέος με Ιστό

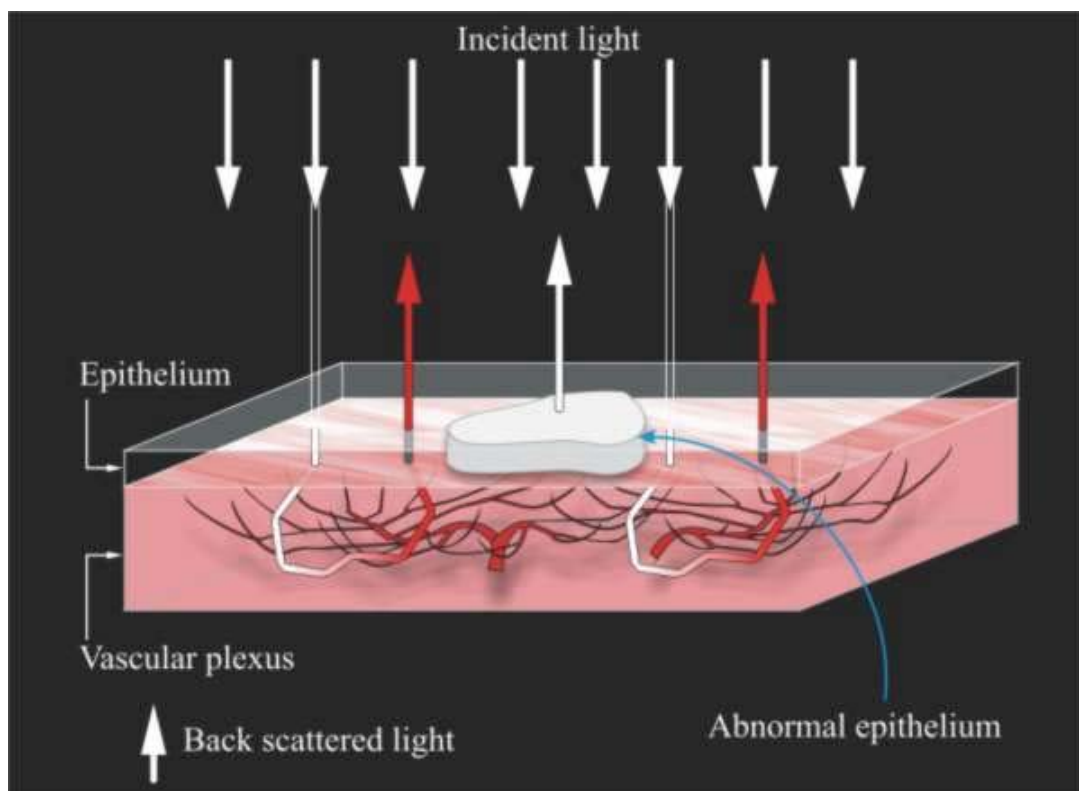
Το επιθήλιο γενικά είναι διαφανές, με αποτέλεσμα η προσπίπτουσα ακτινοβολία να το διαπερνά και να φτάνει στον υποκείμενο ιστό όπου ένα μέρος της απορροφάται και το υπόλοιπο σκεδάζεται, [18], κυρίως σε μήκη κύματος που βρίσκονται στην περιοχή του κόκκινου. Αυτός είναι και ο λόγος που ο τράχηλος έχει κυρίως κόκκινο χρώμα, Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Ο τράχηλος της μήτρας

Για τη διάγνωση καρκινικών και προκαρκινικών καταστάσεων σε επιθηλιακούς ιστούς, χρησιμοποιείται μια μέθοδος που βασίζεται στη χρήση αραιού υδατικού διαλύματος οξικού οξέως. Είναι γνωστό εδώ και 70 περίπου χρόνια στους γυναικολόγους ότι η εφαρμογή αραιού διαλύματος οξικού οξέως, (3-5% κ.ο.), προκαλεί μια παροδική αλλαγή των οπτικών ιδιοτήτων του επιθηλίου, που μακροσκοπικά είναι εμφανές με την μορφή λευκών κηλίδων, των παθολογικών (κυρίως καρκινικών και προκαρκινικών) περιοχών του τραχήλου της μήτρας, ενώ στον φυσιολογικό ιστό δεν παρατηρείται καμία μεταβολή [20], Εικόνα 2. Είναι αξιοσημείωτο ότι η ένταση του φαινομένου, καθώς επίσης η διάρκεια και ο χρόνος κατά τον οποίο παρατηρείται η μέγιστη τιμή της αλλαγής, σχετίζεται με τον βαθμό νεοπλασίας, [17].

Η λεύκανση στην πραγματικότητα είναι μια μεταβολή των οπτικών ιδιοτήτων του δείκτη διάθλασης του επιθηλίου το οποίο από διαφανές -δεν απορροφά ή σκεδάζει το φως- αλλάζει και αποκτά μεγάλο συντελεστή σκέδασης για όλα τα ορατά μήκη κύματος δίνοντας την αίσθηση του λευκού χρώματος. Ο μηχανισμός του συγκεκριμένου φαινομένου θα εξηγηθεί σε επόμενο κεφάλαιο.



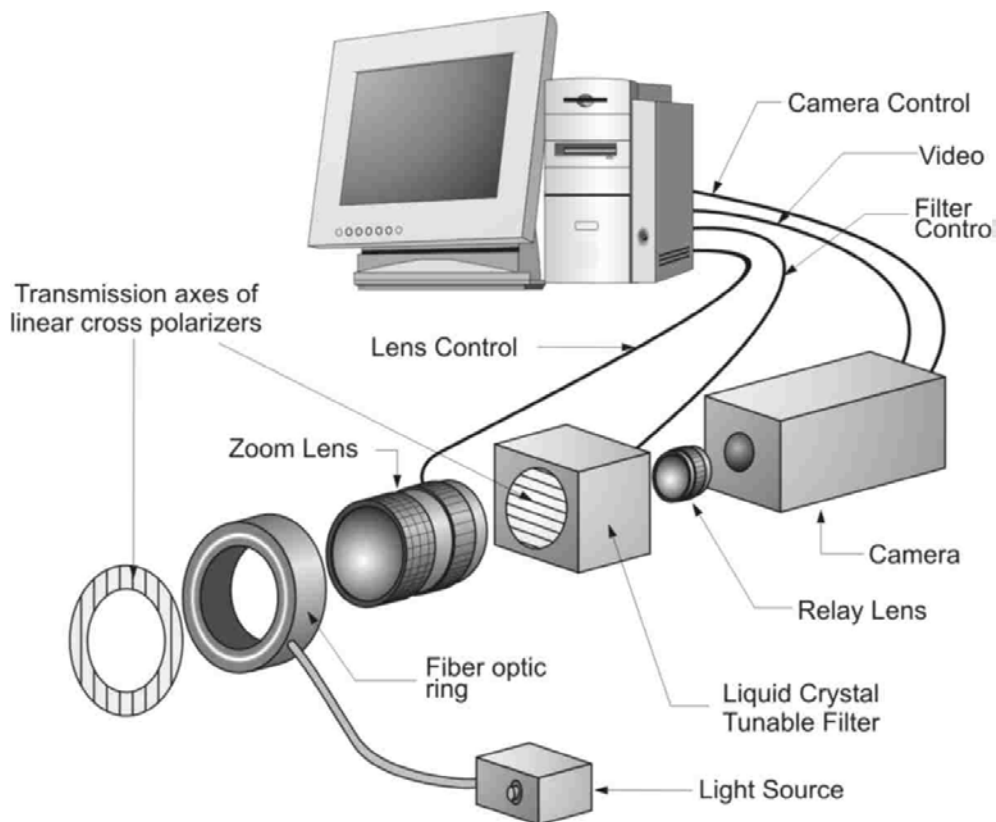
Εικόνα 2: Μηχανισμός αλληλεπίδρασης φωτός με ιστό

### 3.3 Πειραματική Διάταξη

#### 3.3.1 Περιγραφή συστήματος

Στο παρόν υποκεφάλαιο δίνεται μία σύντομη περιγραφή του απεικονιστικού συστήματος, Εικόνα 3, που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των πειραματικών μετρήσεων. Το σύστημα αναπτύχθηκε στο Bioimaging and Spectroscopy Lab του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Laser, που βρίσκεται στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας. Μία ασπρόμαυρη βίντεο κάμερα, με ½ inch CCD (Charge-Coupled Device) και με  $\gamma=1$  χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή της εικόνας. Ο ανιχνευτής

CCD, (Sony), περιέχει εξοπλισμό με μικροφακούς, για βελτιωμένη ευαισθησία στο φως καθώς και φίλτρα για την αποκοπή από την απεικόνιση συγκεκριμένων μηκών κύματος. Ο λόγος που χρησιμοποιούνται τα συγκεκριμένα φίλτρα θα εξηγηθεί στο υποκεφάλαιο 3.3.3. Το φως συλλέγεται μέσω ζουμ φακών, 18-108mm και εστιακής απόστασης  $f=2.5$ , με μία ηλεκτρονική ίριδα. Ένα σύνολο οπτικών ινών, που περιβάλλουν την πρόσοψη των φακών, μεταφέρει το φως από μία λάμπα αλογόνου 250W πάνω στην επιφάνεια του ιστού. Το επίπεδο πόλωσης του προσπίπτοντος φωτός επιλέγεται μέσω ενός γραμμικού πολωτή με σχήμα δαχτυλιδιού, (ring-shaped), ο οποίος έχει τοποθετηθεί σε ένα περιστροφικό μηχανισμό, ο οποίος με τη σειρά του έχει τοποθετηθεί στην οπτική ίνα, (fiber optic ring). Το βίντεο σήμα που λαμβάνεται ψηφιοποιείται, (digitized), με ένα PCI video grabber και εγκαθίσταται σε έναν 200MHz Pentium υπολογιστή, με 64 Mb RAM και ένα πίνακα γραφικών SVGA με γραφικό επιταχυντή 8Mb video RAM. Ο προγραμματισμός, που αναπτύχθηκε σε γλώσσα προγραμματισμού C++, χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της εικόνας που λαμβάνεται, για την βαθμονόμηση καθώς και για την ανάλυση των δεδομένων και της εικόνας [19].



Εικόνα 3: Πειραματική Διάταξη

### 3.3.2 Βαθμονόμηση

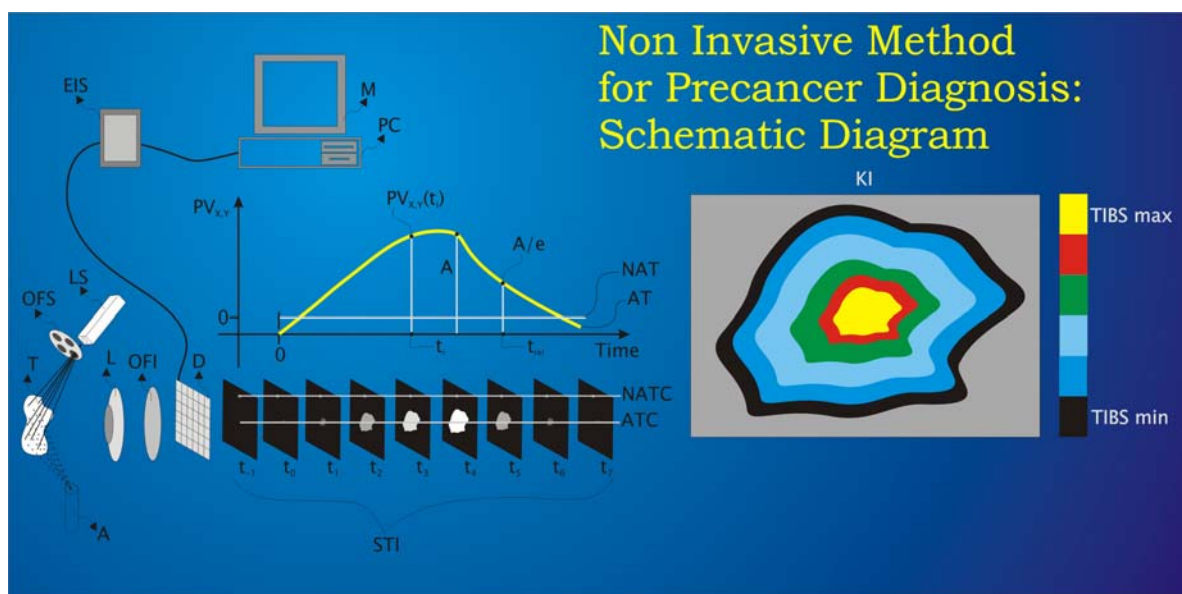
Η βαθμονόμηση της εικόνας είναι πολύ σημαντική διαδικασία αφού με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνονται σταθερές συνθήκες ακτινοβολήσης-απεικόνισης, και η χρήση του ανιχνευτή γίνεται με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Η διαδικασία της βαθμονόμησης είναι η ακόλουθη: ένας reflecting diffuser ( $\text{BaSO}_4$ ) με ενιαία ανάκλαση, τοποθετείται στο οπτικό πεδίο των φακών και οι πολωτές περιστρέφονται μέχρι οι άξονες πόλωσής τους να γίνουν κάθετοι μεταξύ τους. Δέκα φασματικές περιοχές, κατά μήκος του ορατού φάσματος με φασματικό εύρος 30nm προ-επιλέγονται και όταν το φίλτρο σταθεροποιηθεί η μέση τιμή της έντασης του γκριζου μιας 5x5-pixel περιοχής του υλικού μέγιστης ανακλαστικότητας παρουσιάζεται σε πραγματικό χρόνο στην οθόνη του υπολογιστή. Χρησιμοποιώντας αυτήν την τιμή ως υπόβαθρο ρυθμίζεται η ίριδα του φακού και / ή ο χρόνος συλλογής του φωτός στο CCD, μέσω της παράλληλης θύρας, έως ότου το επίπεδο του γκρι του pixel της παραπάνω περιοχής γίνει 255. Αυτή η αριθμητική παράμετρος ανταποκρίνεται στην μέγιστη τιμή της απαιτούμενης κλίμακας του γκρι, το εύρος της οποίας καθορίζεται από το βάθος ψηφιοποίησης των 8 bit του βίντεο σήματος. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται αυτόματα σε όλες τις περιοχές απεικόνισης. Οι καλύτερες συνθήκες της κάμερας, του φακού και της ίριδας σε κάθε περιοχή αποθηκεύονται και αποτελούν το σετ βαθμονόμησης του συστήματος. Όταν αυτή η διαδικασία τελειώνει, το σύστημα λήψης της εικόνας μετακινείται με σκοπό να πάρει μια ακριβή εικόνα του ιστού με την ίδια μεγέθυνση, [2].

### 3.3.3 Λήψη μετρήσεων

Όταν η διαδικασία της βαθμονόμησης τελειώσει, ακολουθεί η διαδικασία της λήψης των πειραματικών δεδομένων. Οι μετρήσεις έγιναν στον χώρο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου, στην γυναικολογική κλινική και κατά την διάρκεια μίας απλής γυναικολογικής εξέτασης.

Αρχικά λαμβάνονται και αποθηκεύονται φασματικές εικόνες στην ορατή περιοχή του φάσματος οι οποίες αποτελούν τις εικόνες αναφοράς. Μετά την εφαρμογή ποσότητας ~2ml διαλύματος οξικού οξέος 3%, σε όλη την περιοχή του τραχήλου, φασματικές εικόνες για μία ποσότητα από μήκη κύματος του ορατού φάσματος λαμβάνονται κάθε 10 sec για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της διαδικασίας

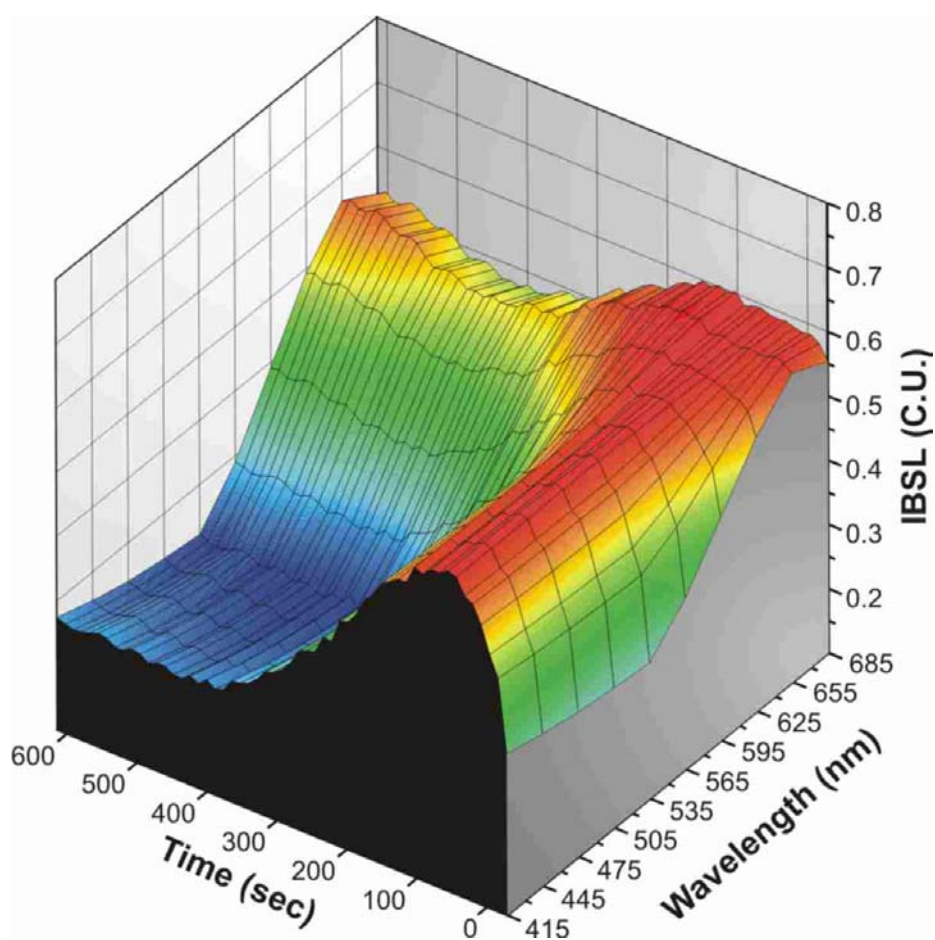
απεικόνισης, οι καμπύλες της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, (IBSL), ως προς τον χρόνο μπορούν αυτόματα να υπολογιστούν για διάφορα μήκη κύματος και για διαφορετικές περιοχές του τραχήλου, από τα δεδομένα που έχουν αποθηκευτεί τον υπολογιστή, Εικόνα 4. Επίσης είναι δυνατή και η απεικόνιση του τραχήλου της μήτρας σε διαφορετικά μήκη κύματος.



Εικόνα 4: Σχηματικό διάγραμμα του τρόπου λήψης μετρήσεων με το σύστημα Πολυφασματικής Απεικόνισης.

Με βάση λοιπόν τα δεδομένα που λαμβάνονται από την πειραματική μέτρηση, είναι δυνατή η χαρτογράφηση του ιστού και η μελέτη της κινητικής της λεύκανσης. Η Εικόνα 5 δείχνει το γράφημα του IBSL (σε βαθμονομημένες μονάδες) ως προς το μήκος κύματος και τον χρόνο, που λήφθηκε από μία περιοχή, (5x5-pixel), του τραχήλου η οποία είχε λευκανθεί πριν την εφαρμογή του οξικού οξέος. Για την συγκεκριμένη περίπτωση η μέγιστη τιμή του IBSL παρατηρείται σε χρόνο 153 sec μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος. Αυτή η τιμή είναι σχεδόν ίδια σε όλα τα μήκη κύματος, πράγμα που δείχνει ότι όλα τα μήκη κύματος οπισθοσκεδαζονται με τον ίδιο τρόπο την χρονική στιγμή που παρατηρείται η μέγιστη λεύκανση. Μετά από αυτήν την χρονική στιγμή το IBSL φτάνει στην αρχική του τιμή με εκθετικό τρόπο. Επίσης είναι εμφανές ότι οι μέγιστες διαφορές μεταξύ των μεγίστων και των ελαχίστων του IBSL παρουσιάζονται σε μήκη κύματος μικρότερα από τα 560nm. Αυτό εξηγείται με το ότι το φως απορροφάται από το αγγειακό πλέγμα περισσότερο όταν το μήκος

κύματός του είναι μικρότερο από τα 560nm, με αποτέλεσμα την μειωμένη συνεισφορά του στην σκέδαση. Ο συγκεκριμένος παράγοντας αποτελεί τον θόρυβο στις καμπύλες και η μείωσή του δίνει βελτιωμένες οπτικές πληροφορίες για την κινητική της αλληλεπίδρασης του οξικού οξέος και του ιστού. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις η επιλογή της απεικόνισης και της μελέτης της κινητικής γίνεται στο μήκος κύματος  $525\pm 25$  nm, [2]. Αυτό επιτυγχάνεται, με την χρήση των φίλτρων που περιέχονται στον ανιχνευτή CCD, τα οποία αποκόπτουν τα μήκη κύματος της περιοχής του κόκκινου, όπου η αιμοσφαιρίνη σκεδάζει υψηλά.

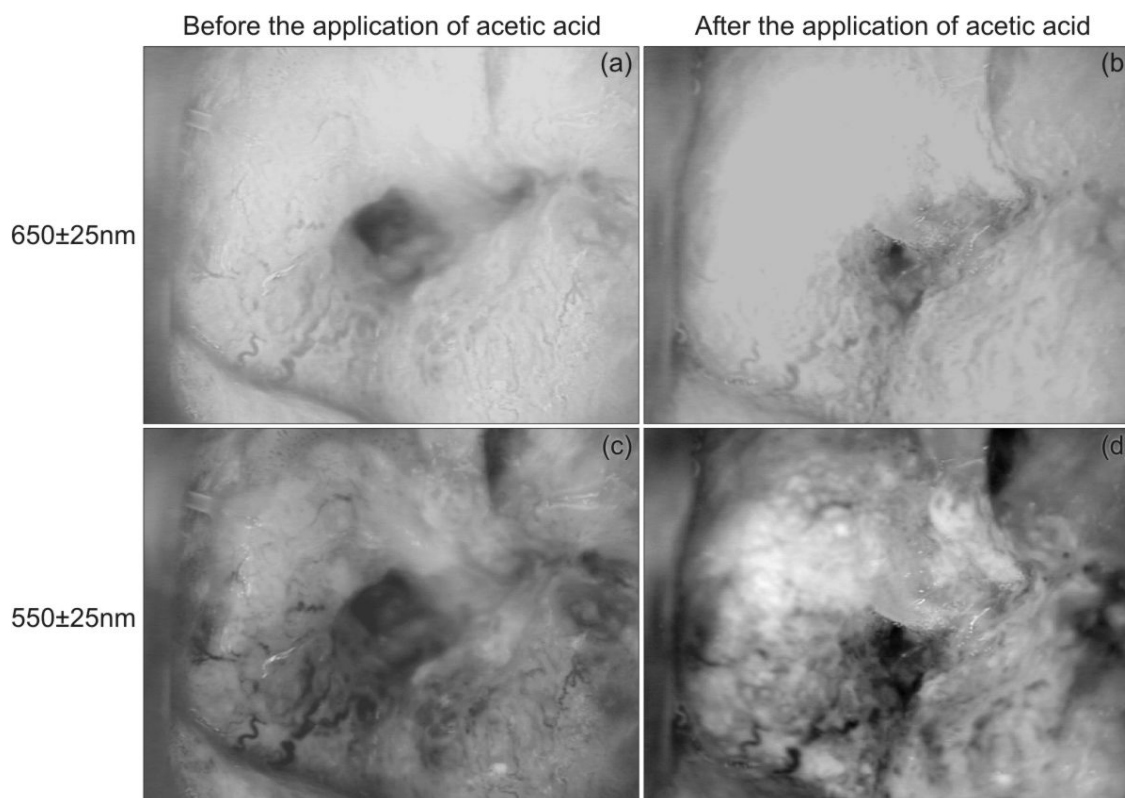


Εικόνα 5: 3D γράφημα της Έντασης του Οπισθοσκεδαζόμενου Φωτός ως προς το μήκος κύματος και τον χρόνο, που λαμβάνεται για κάθε σημείο ης εικόνας του τραχήλου της μήτρας κατά την φασματική απεικόνιση.

Στην παρακάτω εικόνα δίνεται η απεικόνιση του ιστού σε δύο διαφορετικά μήκη κύματος όπου είναι εμφανές ότι οι οπτικές πληροφορίες που λαμβάνονται εξαρτώνται από το μήκος κύματος απεικόνισης. Στα  $650\pm 25$  nm μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος η λεύκανση δεν είναι αρκετά εμφανής σε αντίθεση με τα  $550\pm 25$



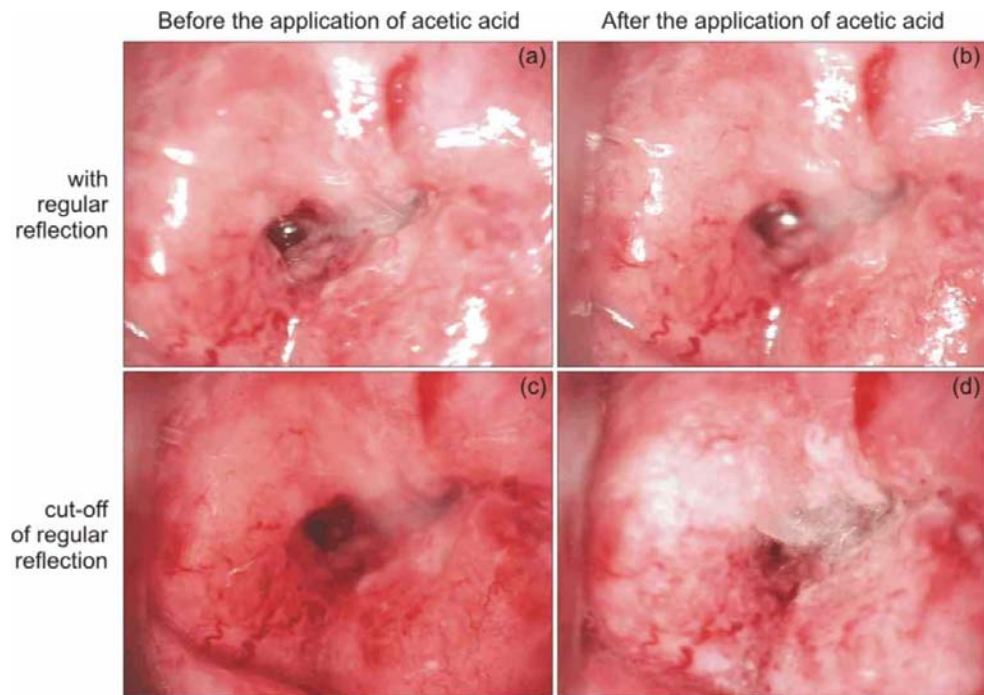
nm, όπου οι πληροφορίες που λαμβάνονται ως προς τον βαθμό και την περιοχή της λεύκανσης είναι ακριβείς. Η μέγιστη χρωματική αντίθεση μεταξύ των περιοχών με λεύκανση και χωρίς, παρατηρήθηκε στα  $525\pm 25$  nm.



Εικόνα 6: Εικόνες του τράχηλου της μήτρας που έχουν ληφθεί στα  $650\pm 25$  nm (a, b) στα  $550\pm 25$  nm (c, d), πριν (a, c) και μετά (b, d) την εφαρμογή οξικού οξέος.

Εκτός από το αγγειακό πλέγμα το οποίο προκαλεί κάποιες αλλοιώσεις στο διαγνωστικό σήμα και το οποίο όπως ήδη αναφέρθηκε αντιμετωπίστηκε επιτυχώς, υπάρχει και ακόμα ένα πρόβλημα το οποίο αφορά την επιφανειακή ανάκλαση του ιστού. Λόγω των μεγάλων διαφορών που παρουσιάζουν οι δείκτες διάθλασης του αέρα και της βλέννας που βρίσκεται στην επιφάνεια του επιθηλίου, η επιφανειακή ανάκλαση είναι έντονη συμπεριλαμβάνεται στο ανιχνευόμενο οπτικό σήμα. Στις νεοπλασίες που βρίσκονται σε αρχικό στάδιο, οι διαγνωστικές πληροφορίες που μπορεί να περιέχει το σήμα που ανιχνεύεται είναι πολύ περιορισμένο, αφού οι προκαλούμενες φασματικές αλλαγές, είναι ελάχιστα εμφανείς και διαρκούν λιγότερο χρόνο. Η διαγνωστική ευαισθησία μπορεί να βελτιωθεί με την ελαχιστοποίηση των συνεισφορών στο σήμα που καταγράφεται από την επιφάνεια της ανάκλασης. Ο διαχωρισμός μεταξύ της επιφανειακής ανάκλασης και του σκεδαζόμενου φωτός

μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση δύο γραμμικών πολωτών. Ο ένας από τους πολωτές εφαρμόζεται στην πηγή ακτινοβολήσης και ο άλλος στον ανιχνευτή. Είναι πολύ καλά γνωστό ότι όταν το προσπίπτον φως στον ιστό είναι γραμμικά πολωμένο, μετά την ανάκλαση από την επιφάνεια η πόλωση του φωτός διατηρείται. Εκτός όμως από την επιφανειακή ανάκλαση το ανιχνευόμενο φως περιέχει και πληροφορία που οφείλεται στην πολλαπλή σκέδαση που λαμβάνει χώρα στο εσωτερικό του ιστού, όπου το σκεδαζόμενο φως αποκτά τυχαία πόλωση. Ευθυγραμμίζοντας του άξονες των πολωτών κάθετα τον ένα στον άλλον, το μέρος του ανιχνευόμενου φωτός που οφείλεται στην επιφανειακή ανάκλαση εξαλείφεται με αποτέλεσμα να καταγράφεται μόνο το σήμα που προέρχεται από την πολλαπλή σκέδαση στο εσωτερικό του επιθηλίου. Οι πληροφορίες λοιπόν που λαμβάνονται, προέρχονται αποκλειστικά από το εσωτερικό του επιθηλίου. Στην Εικόνα 6 δίνεται ο τραχήλος της μήτρας πριν και μετά την εφαρμογή οξικού οξέος, με και χωρίς αποκοπή της επιφανειακής ανάκλασης. Η πρώτη εικόνα είναι η εικόνα που βλέπει ο εξεταστής χωρίς την χρήση του φασματικού αναλυτή όπου οι πληροφορίες που λαμβάνει βασίζονται μόνο στην οπτική του ικανότητα και εμπειρία, και προέρχονται από την επιφάνεια του τραχήλου, κυρίως από την βλέννα. Αντιθέτως με την χρήση του πολωτή του οποίου ο άξονας είναι κάθετος στον άξονα του πολωτή της πηγής η ανάκλαση του φωτός εξαφανίζεται και πλέον οι πληροφορίες που λαμβάνονται προέρχονται από τα φωτόνια που σκεδάζονται στο εσωτερικό του τραχήλου. Η λεύκανση των περιοχών του τραχήλου είναι εμφανής στην περίπτωση που έχει αποκοπεί η επιφανειακή ανάκλαση.



Εικόνα 7: Ο τράχηλος της μήτρας πριν και μετά την εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος, με και χωρίς την αποκοπή της επιφανειακής ανάκλασης.

## Βιβλιογραφία

- [17] Anderson M., Jordan J., Morse A., Sharp F., “A Text and Atlas of Integrated Colposcopy”, Mosby, 1993
- [18] Balas C. J., “A novel optical imaging method for the early detection, quantitative grading, and mapping of cancerous and precancerous lesions of cervix”, IEEE Trans. Biomed. Eng., Vol. 48, No. 1, pp. 96-104, Jan. 2001
- [19] Balas C. J., Themelis G. C., Prokopakis E. P., Orfanoudaki I., Koumantakis E., Helidonis E. S., “*In vivo* detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid-tissue interaction kinetics”, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., Vol. 53, pp. 153-157, 1999
- [20] Belinson J. L., Pretorius R. G., Zhang W. H., Wu L. Y., Qiao Y. L. and Elson P., “Cervical cancer screening by simple visual inspection after acetic acid”, Obstetrics & Gynecology, Volume 98, Issue 3, Pages 441-444, September 2001

## Κεφάλαιο 4 Πειραματικά Αποτελέσματα

### 4.1 Εισαγωγή

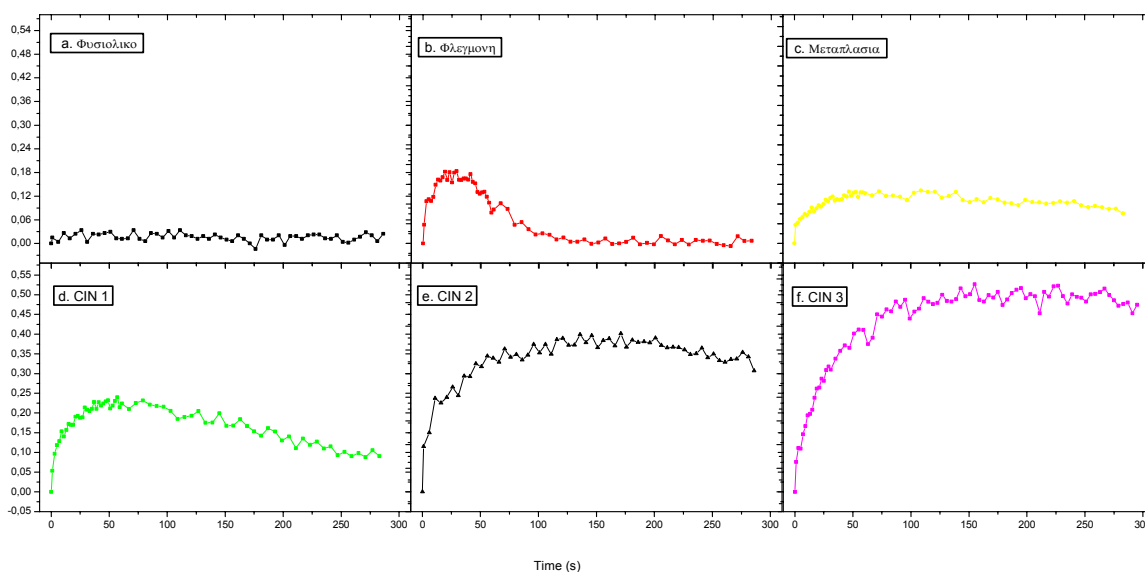
Στην συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκαν συνολικά 80 γυναίκες. Κάθε μία ξεχωριστά ενημερώθηκε για την διαδικασία που θα ακολουθούταν και η μελέτη ενεκρίθη από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου. Οι μετρήσεις, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ο Υπερφασματικός Απεικονιστικός Αναλυτής, πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια μίας συνηθισμένης κολποσκοπικής εξέτασης, η οποία διεξαγόταν στον χώρο της γυναικολογικής κλινικής του νοσοκομείου.

Ένα σύνολο εικόνων λήφθηκε πριν από την εφαρμογή οξικού οξέος, με και χωρίς την χρήση του πολωτή, έτσι ώστε η σύγκρισή τους να κάνει δυνατή την ποσοτική και αντικειμενική εκτίμηση της βελτίωσης της ευαισθησίας. Για κάθε μέλος της ομάδας των ασθενών που μελετήθηκε, με την χρήση του συστήματος που έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, λήφθηκαν ένα σύνολο από εικόνες μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος. Η ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός συναρτηθεί του χρόνου υπολογίστηκαν αυτόματα από το σύστημα για κάθε σημείο του τραχήλου.

### 4.2 Πειραματικά Αποτελέσματα

Η Εικόνα 1 αναπαριστά αντιπροσωπευτικές καμπύλες της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός ως προς τον χρόνο, οι οποίες ελήφθησαν *in vivo* σε μήκος κύματος  $550 \pm 25$  nm, από περιοχές του τραχήλου της μήτρας με διαφορετική ιστολογία. Η καμπύλη (a) προέρχεται από περιοχή όπου ο τράχηλος είναι φυσιολογικός, οι καμπύλες (b) και (c) προέρχονται από περιοχές με μεταπλασία και φλεγμονή αντίστοιχα, ενώ οι καμπύλες (d), (e) και (f), προέρχονται από ιστούς με διαφορετικού βαθμού τραχηλικής ενδοεπιθηλιακής νεοπλασίας, CIN1, CIN2, CIN3. Οι συγκεκριμένες καμπύλες αναφέρονται σε μία μόνο περιοχή του ιστού και κάθε καμπύλη λήφθηκε από διαφορετικό ασθενή. Είναι εμφανές ότι στην περίπτωση του φυσιολογικού επιθηλίου, (a), δεν παρατηρείται εξάρτηση της έντασης της οπισθοσκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τον χρόνο. Στην περίπτωση της μεταπλασίας, (b), η οποία είναι μία φυσιολογική κατάσταση του επιθηλίου, παρατηρείται επίσης αλλαγή στην ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της φλεγμονής, (c), η οποία μπορεί να είναι τραχηλίτιδα ή κολπίτιδα. Οι

καμπύλες (d), (e) και (f), η ένταση του φωτός αυξάνεται μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος αρκετά γρήγορα, και φτάνει σε μία μέγιστη τιμή κάποια χρονική στιγμή η οποία είναι διαφορετική για κάθε βαθμό νεοπλασίας. Στην συνέχεια η ένταση πέφτει εκθετικά μέχρι να φτάσει πάλι στην τιμή που είχε αρχικά. Είναι εμφανές ότι οι καμπύλες έχουν την ίδια συμπεριφορά, με μόνες διαφορές την μέγιστη τιμή της έντασης και η διάρκεια των αλλαγών που προκαλούνται από το οξικό οξύ οι οποίες είναι διαφορετικές ανάλογα με την σοβαρότητα της νεοπλασίας. Πιο συγκεκριμένα όσο πιο σοβαρή είναι η νεοπλασία, τόσο πιο υψηλή είναι η μέγιστη τιμή της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός και τόσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια της λεύκανσης. Επίσης, παρόλο που παρατηρείται αλλαγή του σκεδαζόμενου φωτός και στις περιπτώσεις (b), (c), οι μορφή αυτών των καμπυλών διαφέρει σημαντικά από τις περιπτώσεις νεοπλασίας.



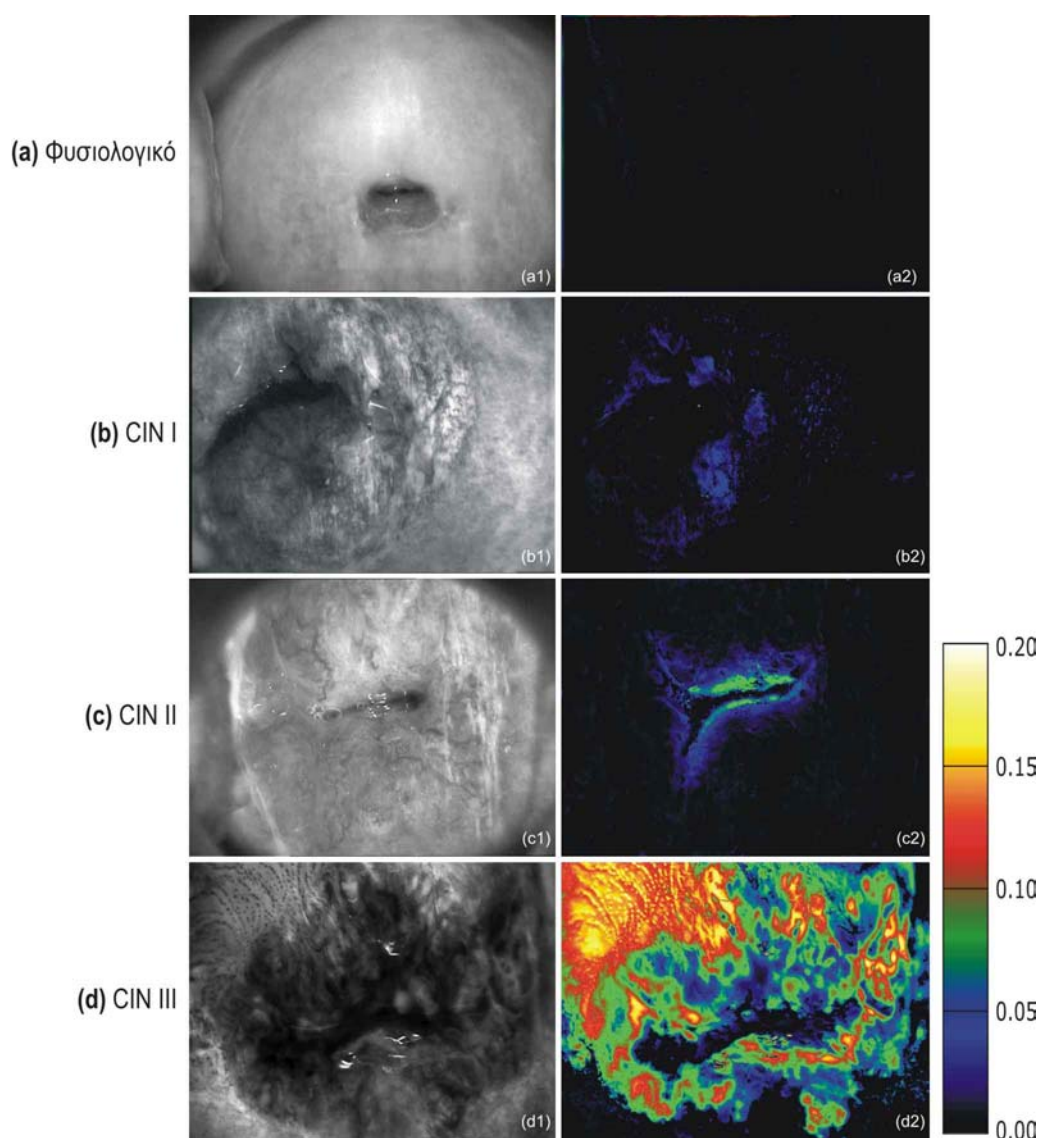
Εικόνα 1: Χαρακτηριστικές καμπύλες για διάφορες καταστάσεις του τραχήλου της μήτρας.

Παρόλο που το σχήμα των παραπάνω καμπυλών κάνει δυνατή την διαφοροποίηση ιστών με διαφορετική ιστολογία, δεν παρέχεται καμία πληροφορία για την χωρική κατανομή της βλάβης. Για να γίνει αυτό αναπτύχθηκε ένα υπολογιστικό πρόγραμμα, το οποίο χρησιμοποιώντας τις πληροφορίες που παρέχονται από τις καμπύλες όλης της περιοχής, παράγεται μία εικόνα ψευδοχρωμάτων, όπου το χρώμα κάθε pixel είναι αντιπροσωπευτικό των

χαρακτηριστικών της αλλαγής που προκαλείται στις ιδιότητες σκέδασης του φωτός, (λεύκανση), (Εικόνα 4, Κεφάλαιο 3).

Στην Εικόνα 2, παρατίθενται εικόνες τραχήλου της μήτρας, οι οποίες έχουν απεικονιστεί στα  $550\pm 25$  nm, και οι αντίστοιχες εικόνες ψευδοχρωμάτων. Οι εικόνες ψευδοχρωμάτων προκύπτουν από την αφαίρεση των δύο εικόνων που έχουν ληφθεί πριν και μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος, σε χρόνο όπου παρατηρείται η μέγιστη λεύκανση, και αναπαριστούν τις αλλαγές στις ιδιότητες σκέδασης του επιθηλίου μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος, αφού έχει προηγηθεί φασματικό φιλτράρισμα και η αφαίρεση της ανάκλασης της επιφάνειας του τραχήλου. Οι αναφερθείσες αλλαγές που προκαλούνται μετά την εφαρμογή οξικού οξέος διατυπώνονται σε μία χρωματική κλίμακα η οποία ξεκινά από το μαύρο, και ανταποκρίνεται στο 0% της αλλαγής των ιδιοτήτων σκέδασης του φωτός, και καταλήγει στο λευκό, που ανταποκρίνεται στο 20% της αλλαγής, [1]. Τα ενδιάμεσα χρώματα από το σκούρο μπλε στο κίτρινο αντιπροσωπεύουν αυξανόμενο βαθμό και διάρκεια λεύκανσης. Η εικόνα ψευδοχρωμάτων είναι μία σημαντική βελτίωση της ικανότητας ανίχνευσης των κλινικών δυσπλασιών στο αρχικό, (θεραπεύσιμο), στάδιο, και παρέχει την δυνατότητα για ένα πιο ακριβή εντοπισμό της νεοπλασίας, αφού προσφέρει βελτιωμένες χωρικές πληροφορίες σχετικά με τον βαθμό των προκαλούμενων αλλαγών. Η χωρική διακύμανση των τελευταίων, η οποία δίνεται με διαφορετικά χρώματα στην εικόνα, πιθανόν να αντιπροσωπεύει διαφορετικούς βαθμούς νεοπλασίας. Είναι εμφανές ότι όταν ο τράχηλος δεν παρουσιάζει επιθηλιακή δυσπλασία, 2(a), και επομένως όπως έχει ήδη αναφερθεί δεν παρατηρείται λεύκανση, στην κινητική εικόνα κυριαρχεί το μαύρο χρώμα, σε αντίθεση τις υπόλοιπες εικόνες, 2(b), 2(c) και 2(d), οι οποίες αναφέρονται σε δυσπλασίες CIN1, CIN2 και CIN3 αντίστοιχα, όπου σε περιοχές όπου παρουσιάζεται λεύκανση τα χρώματα είναι διαφορετικά. Συγκεκριμένα στην 2(b), παρουσιάζονται μερικές περιοχές με σκούρο μπλε οι οποίες είναι ενδεικτικές όσον αφορά την λεύκανση με χαμηλό βαθμό και / ή διάρκεια της λεύκανσης, ενώ στην 2(c) και 2(d) κυριαρχούν χρώματα που βρίσκονται υψηλότερα στην χρωματική κλίμακα και με αυτό τον τρόπο αναπαρίσταται η αυξημένη αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες του επιθηλίου. Παρόλο που δεν υπάρχει ξεκάθαρη συμφωνία μεταξύ ψευδοχρωμάτων και βαθμού κακοήθειας, τα χρώματα που υπάρχουν σε κάθε εικόνα είναι ενδεικτικά του βαθμού νεοπλασίας. Επιπλέον, η χρήση της εικόνας ψευδοχρωμάτων για την αναπαράσταση των χαρακτηριστικών της

λεύκανσης δείχνει την υψηλή αντίθεση μεταξύ φυσιολογικών και μη φυσιολογικών περιοχών και προβάλλει ξεκάθαρα την χωρική κατανομή της νεοπλασίας.

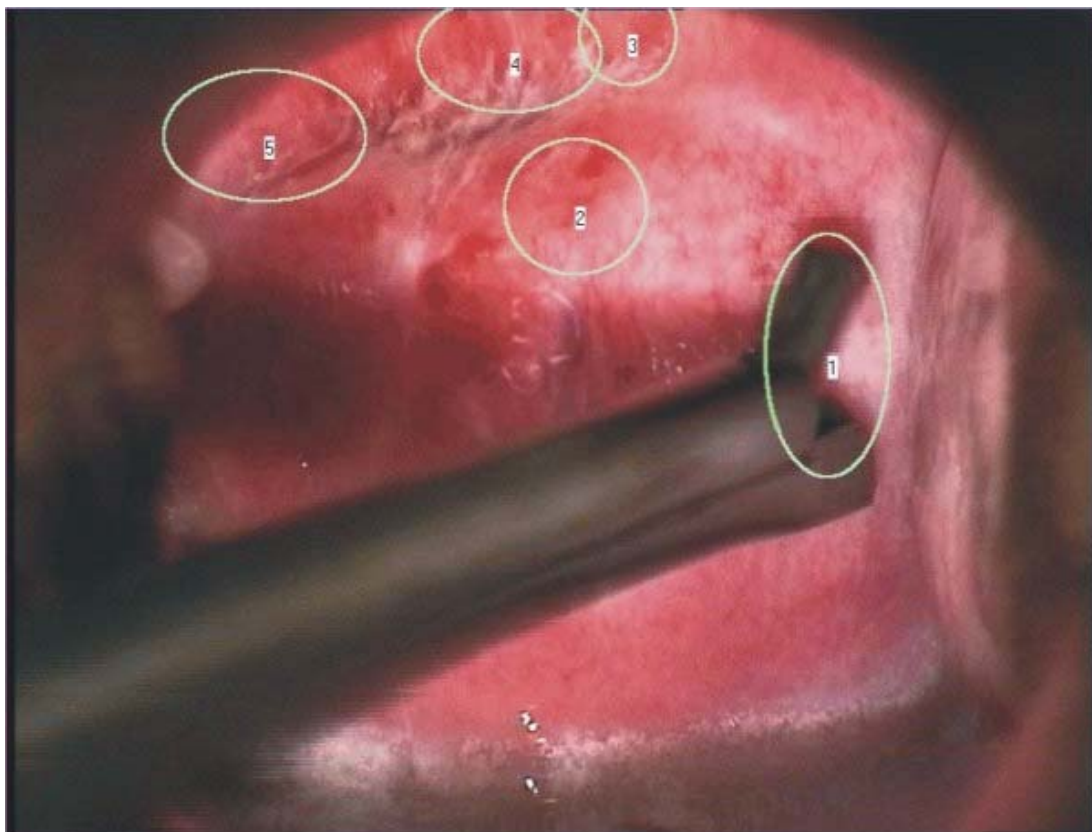


Εικόνα 2: Χαρακτηριστικές εικόνες του τραχήλου της μήτρας, οι οποίες ελήφθησαν σε μήκος κύματος  $550\pm 25$  nm, και οι αντίστοιχες εικόνες ψευδοχρωμάτων. Οι εικόνες (a1), (b1), (c1), (d1), καταγράφηκαν μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος, σε χρόνο όπου παρατηρείται η μέγιστη λεύκανση.

Με βάση, λοιπόν, τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι, με το σύστημα πολυφασματικής ανάλυσης επιτυγχάνεται η αντικειμενική διαφοροποίηση των επιθηλιακών νεοπλασιών, η οποία βασίζεται στην χαρτογράφηση του τραχήλου που προέρχεται από τις εικόνες ψευδοχρωμάτων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι συγκεκριμένες εικόνες προέρχονται από τον συνδυασμό δύο



διαφορετικών εικόνων, μίας που λήφθηκε πριν την εφαρμογή του οξικού οξέος και της άλλης η οποία λήφθηκε την χρονική στιγμή που παρατηρήθηκε η μέγιστη λεύκανση. Η εικόνα ψευδοχρωμάτων λοιπόν, εκτός από τις χωρικές πληροφορίες, περιέχει και πληροφορίες για την κινητική της λεύκανσης. Είναι αξιοσημείωτο ότι σε κάθε κινητική εικόνα περιέχονται περισσότερες από 250.000 καμπύλες. Το υπολογιστικό πρόγραμμα κάνει ικανή την λήψη των καμπυλών χρονικής εξέλιξης σε κάθε χωρικό σημείο και την λεπτομερειακή εξέταση του ιστού απλά με την κίνηση του mouse pointer. Όταν η διαδικασία της μέτρησης τελειώσει, ο εξεταστής μπορεί να επιλέξει με βάση την εικόνα ψευδοχρωμάτων τις περιοχές οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλη χρωματική αντίθεση, να δει την καμπύλη κινητικής της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός σε κάθε pixel της εικόνας, και να επιλέξει δείγματα για την λήψη βιοψιών με αντικειμενικά, πλέον, κριτήρια, Εικόνα 3.



Εικόνα 3: Λήψη βιοψίας με βάση την εικόνα λεύκανσης του τραχήλου. Οι αριθμημένες περιοχές αντιπροσωπεύουν τα σημεία απ' όπου λήφθηκαν δείγματα βιοψιών. Είναι εμφανής και η λαβίδα βιοψίας.

## Βιβλιογραφία

- [1] Balas C. J., Themelis G. C., Prokopakis E. P., Orfanoudaki I., Koumantakis E., Helidonis E. S., “*In vivo* detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid-tissue interaction kinetics”, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., Vol. 53, pp. 153-157, 1999

## Κεφάλαιο 5 Ανάλυση μηχανισμών αλληλεπίδρασης ιστού-οξικού οξέος

### 5.1 Εισαγωγή

Όπως έχει δειχθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο, είναι εμφανής η σχέση της μέγιστης έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός καθώς και του χαρακτηριστικού χρόνου χαλάρωσης με την παθολογική κατάσταση του ιστού. Όσο ο βαθμός του προκαρκινικού σταδίου μεγαλώνει τόσο και τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά αυξάνονται. Με βάση αυτές τις πειραματικές παρατηρήσεις οι οποίες προήλθαν από την χρήση του απεικονιστικού πολυφασματικού αναλυτή, αναπτύχθηκε μία μέθοδος οπτικής βιοψίας η οποία χαρτογραφεί τον ιστό και δίνει αντικειμενικές ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες οι οποίες είναι χρήσιμες για την ανίχνευση της παθολογίας του.

Εκτός από τα παραπάνω διεξάχθηκε και εκτεταμένη βιβλιογραφική έρευνα η οποία αφορούσε το φαινόμενο της αλλαγής των οπτικών ιδιοτήτων του επιθηλίου μετά την εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος, που σε συνδυασμό με τις πειραματικές παρατηρήσεις και με την ανάπτυξη ενός διαμερισματικού μοντέλου το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση συνάρτησης προσαρμογής για τις καμπύλες κινητικής, οδήγησε στην πρώτη ποιοτική εξήγηση της κινητικής του συγκεκριμένου φαινομένου και της συσχέτισής του με την παθολογία του ιστού. Στα παρακάτω υποκεφάλαια παρατίθενται οι πληροφορίες που προήλθαν από την βιβλιογραφική έρευνα και στα επόμενα κεφάλαια παρουσιάζεται το μοντέλο και γίνεται ο συσχετισμός του βιολογικού με το διαμερισματικό μοντέλο και η ποιοτική εξήγηση του φαινομένου της αλλαγής οπτικών ιδιοτήτων του επιθηλίου μετά την εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος.

### 5.2 Ιδιότητες σκέδασης του ιστού

Καθώς η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διαδίδεται μέσα στον ιστό, τα φωτόνια είναι πιθανόν να συναντήσουν οργανίδια διαφορετικού μεγέθους, για παράδειγμα από μακρομόρια πρωτεϊνών, (50-100nm), μέχρι κύτταρα (2-50μm), ως αγγεία αίματος, (>1mm), [35]. Στην πλειονότητα των μηκών κύματος, η πιθανότητα

του φωτός να σκεδαστεί είναι πολύ υψηλότερη από την πιθανότητα απορρόφησης. Η μέση απόσταση που διανύει η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μέσα στον ιστό ώσπου να συμβεί σκέδαση, είναι μεταξύ 0.02-0.005cm, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του ιστού, ενώ η μέση απόσταση μέχρι να παρατηρηθεί απορρόφηση είναι μεγαλύτερη των 0.2cm, στο υπέρυθρο. Οι οπτικές ιδιότητες του ιστού αναφέρονται με τους όρους του συντελεστή σκέδασης  $\mu_s$ , που είναι ίσος με το αντίστροφο της μέσης ελεύθερης διαδρομής μεταξύ σκεδάσεων, και του συντελεστή απορρόφησης  $\mu_a$ , ο οποίος ισούται με το αντίστροφο της διαδρομής που διανύει το φωτόνιο μέχρι να απορροφηθεί, [32].

Ο συντελεστής σκέδασης είναι μια μακροσκοπική περιγραφή ενός συνεχώς μεταβαλλόμενου μεγέθους, του δείκτη διάθλασης,  $n(r)$ , [26]. Ο δείκτης διάθλασης μεταβάλλεται συνεχώς μέσα στον ιστό, λόγω των διαφορετικών συστατικών που περιέχει, όπως τα κύτταρα, τα οργανίδια των κυττάρων και άλλα συστατικά. Η σκέδαση, λοιπόν του φωτός προέρχεται από ανομοιομορφίες στον δείκτη διάθλασης και εξαρτάται από την μορφολογική και βιοχημική δομή του ιστού. Το μέγεθος καθώς και η χωρική έκταση των διακυμάνσεων προέρχονται κυρίως από την φυσική σύσταση και από το μέγεθος των συστατικών του κυττάρου, [24][25]. Τα οργανίδια που περιλαμβάνονται στο κύτταρο και έχουν διαφορετικούς δείκτες διάθλασης από τον περιβάλλοντα χώρο αναμένεται να είναι οι κύριες πηγές σκέδασης, Πίνακας 1, και η αύξηση της διαφοράς τους έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της πιθανότητας σκέδασης.

Πρέπει να αναφερθεί επίσης, ότι η μορφολογία του ιστού και πιο συγκεκριμένα το σχετικό μέγεθος των οργανιδίων και των κυττάρων επηρεάζουν των γωνιακή κατανομή του σκεδαζόμενου φωτός, αναλόγως με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται. Γενικά ένα συστατικό του οποίου το μέγεθος είναι μικρό ως προς το μήκος κύματος της ακτινοβολίας θα σκεδάζει το φως πιο ισοτροπικά από ένα οργανίδιο του οποίου το μέγεθος είναι μεγαλύτερο, αλλά το ολικό ποσοστό του σκεδαζόμενου φωτός θα είναι λιγότερο για το μικρότερο συστατικό λόγω του μικρότερου μεγέθους, [26].

<i>Οργανίδιο</i>	<i>Δείκτης διάθλασης, [26]</i>
<i>Εξωκυττάριο υγρό</i>	<i>1.350-1.360</i>
<i>Κυτταρόπλασμα</i>	<i>1.360-1.375</i>
<i>Πυρήνας</i>	<i>1.380-1.410</i>
<i>Μιτοχόνδρια και οργανίδια</i>	<i>1.380-1.410</i>

Πίνακας 1: Δείκτες διάθλασης των συστατικών του κυττάρου

Είναι αξιοσημείωτο ότι ο δείκτης διάθλασης των κυττάρων και των συστατικών του καθορίζεται κυρίως από την συγκέντρωση των πρωτεϊνών που περιέχουν, αφού η συγκέντρωσή τους είναι πολύ μεγαλύτερη από των άλλων συστατικών. Συμπερασματικά, ο πυρήνας είναι η σημαντικότερη πηγή σκέδασης του κυττάρου, γιατί είναι το μεγαλύτερο οργανίδιο και περιέχει την μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών από όλα τα άλλα συστατικά, [26].

### 5.3 Αλλαγές στην ανατομία και φυσιολογία του ιστού κατά την ανάπτυξη δυσπλασίας.

Στην περίπτωση εμφάνισης επιθηλιακής δυσπλασίας, λαμβάνουν χώρα κάποιες αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων, οι οποίες γίνονται πιο εμφανείς στους πυρήνες. Πιο συγκεκριμένα, με βάση την ιστολογική εικόνα, ο πυρήνας:

- ✓ διογκώνεται [23], με αποτέλεσμα να παρατηρείται αυξημένος ο λόγος του μεγέθους του πυρήνα ως προς το κυτταρόπλασμα, [17] [22] [24] [28] [36].
- ✓ γίνεται ασύμμετρος στο περίγραμμα και στην κατανομή του μεγέθους, [22][24][28].
- ✓ παρουσιάζεται συνωστισμός, (καταλαμβάνουν μεγαλύτερο μέρος του ιστού), [22].
- ✓ περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό χρωματίνης και η κατανομή της είναι ανομοιογενής καθώς παρουσιάζονται περιοχές αραιωμάτων και πυκνωμάτων, [22][24].
- ✓ περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό DNA, [24].

Στην περίπτωση των κυττάρων του επιθηλίου του τραχήλου της μήτρας, το τυπικό μέγεθος του πυρήνα των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων καθώς και οι δείκτες διάθλασης των πυρήνων στις δύο αυτές περιπτώσεις δίνονται στον Πίνακα 2. Στον συγκεκριμένο πίνακα δίνεται και το πως μεταβάλλεται χωρικά ο δείκτης διάθλασης του πυρήνα για τα δύο ειδών κύτταρα. Όπως φαίνεται στους δυσπλαστικούς πυρήνες υπάρχουν πολύ περισσότερες ανομοιομορφίες και αυτό πιθανότατα εξηγείται από την ανομοιογενή κατανομή του μεγαλύτερου ποσοστού πρωτεϊνών που περιέχουν.

	Λόγος μεγέθους πυρήνα προς κυτταρόπλασμα	Μέσος δείκτης διάθλασης του πυρήνα	Εκτροπή του δείκτη διάθλασης του πυρήνα	Μεταβολή της χωρικής συχνότητας του δείκτη διάθλασης του πυρήνα	Αναφορά
<b>Φυσιολογικά κύτταρα</b>	0.2	1.40	0.02	10-30 $\mu\text{m}^{-1}$	[24]
<b>Δυσπλαστικά κύτταρα</b>	0.67	1.42	0.04	3-30 $\mu\text{m}^{-1}$	[24]

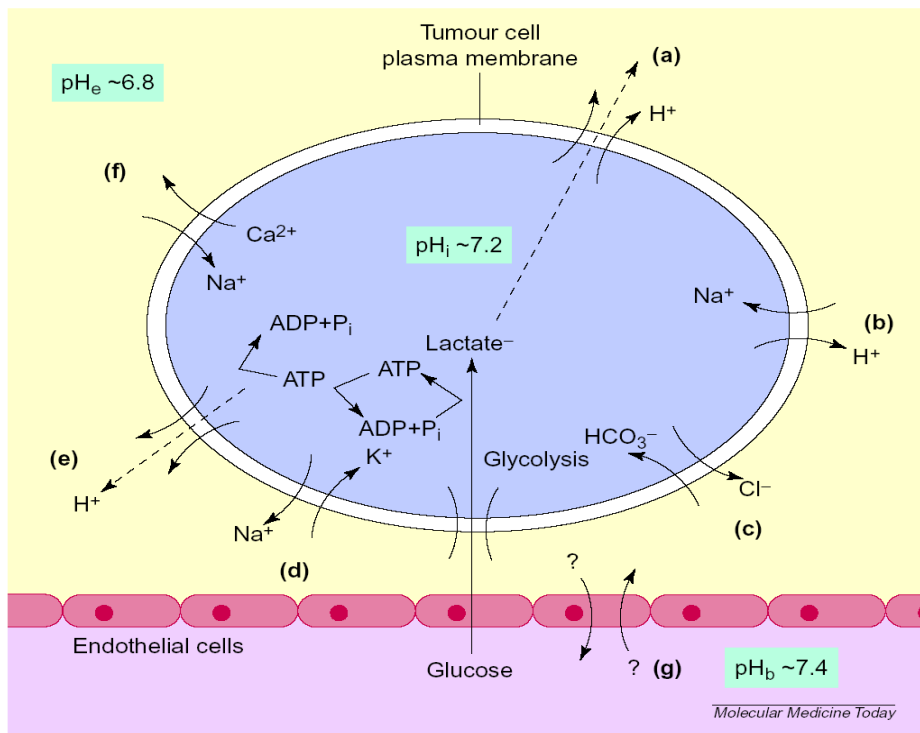
Πίνακας 2: Πειραματικές τιμές που δείχνουν την διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και δυσπλαστικών κυττάρων.

Αυτό που επίσης θα μας απασχολήσει ιδιαίτερα στα επόμενα κεφάλαια, είναι οι λειτουργικές διαφορές μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών κυττάρων και ειδικότερα ο μηχανισμός ρύθμισης του εσωκυττάρου pH.

Το να παραμείνει η τιμή του εσωκυττάρου pH σε ένα στενό εύρος συγκεκριμένων τιμών είναι πάρα πολύ σημαντικό ως προς την βιωσιμότητα του κυττάρου, αφού οι περισσότερες κυτταρικές διεργασίες είναι ευαίσθητες σε αυτόν τον παράγοντα. Για τον λόγο αυτό, τα κύτταρα έχουν κάποιους μηχανισμούς με τους οποίους διεξάγεται η ρύθμιση της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου στο εσωτερικό τους. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι οι αντλίες ιόντων που σχηματικά φαίνονται στην Εικόνα 1. Οι αντλίες ιόντων είναι κάποια μακρομόρια τα οποία βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και η λειτουργία τους βασίζεται στην ανταλλαγή ιόντων. Οι κυριότερες αντλίες ιόντων είναι οι παρακάτω:

- ✓ Η  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  αντλία, η οποία απομακρύνει από τον εσωκυττάριο χώρο  $\text{H}^+$  και εισάγει  $\text{Na}^+$
- ✓ Η εξαρτώμενη από  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  αντλία
- ✓ Η ATP-εξαρτώμενη  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  αντλία
- ✓ Η  $\text{H}^+$ -αντλία

Οι αντλίες ιόντων είναι ικανές να λειτουργήσουν με διάφορους ρυθμούς αναλόγως με τις ανάγκες του κυττάρου. Γενικά η δραστηριότητα της κυτταρικής αντλίας ιόντων εξαρτάται από την συγκέντρωση του ιόντος  $\text{H}^+$  που μεταφέρει. Δηλαδή εξαρτάται από το εσωκυττάριο  $\text{pH}_i = -\log[\text{H}^+]$ . Ο κύριος παράγοντας που τείνει να μεταβάλλει το εσωκυττάριο  $\text{pH}$ , είναι η εσωτερική παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, το κύτταρο προκειμένου να αποκτήσει τα κατάλληλα ποσά ενέργειας για να επιβιώσει εκτελεί κάποιες πολύπλοκες χημικές αντιδράσεις κατά τις οποίες γλυκογόνο μετατρέπεται σε γλυκόζη, αποδίδοντάς του την κατάλληλη προς επιβίωση ενέργεια, η οποία αντιπροσωπεύεται με κάποια συγκεκριμένα μόρια που συμβολίζονται με τα αρχικά ATP. Η χημική αυτή διαδικασία ονομάζεται γλυκόλυση, η οποία διακρίνεται σε αερόβια, όπου για την διεξαγωγή της είναι απαραίτητο το οξυγόνο, και αναερόβια γλυκόλυση, όπου δεν χρειάζεται να υπάρχει οξυγόνο. Κατά την διάρκεια αυτής της πολύπλοκης σειράς χημικών αντιδράσεων παράγονται και κάποια μεταβολικά προϊόντα, όπως είναι το γαλακτικό οξύ, τα οποία περιέχουν υψηλά ποσοστά σε ιόντα υδρογόνου και είναι άχρηστα στο κύτταρο το οποίο μέσω των αντλιών ιόντων τα απομακρύνει από το εσωτερικό του. Από τον εξωκυττάριο χώρο απομακρύνονται μέσω του αίματος. Συμπερασματικά, τα κύτταρα είναι ικανά να ρυθμίζουν αποτελεσματικά το εσωκυττάριο  $\text{pH}$  και να διατηρούν την τιμή του μέσα σε στενά όρια.



Εικόνα 1: Μηχανισμοί ρύθμισης του εσωκυττάριου pH σε καρκινικά κύτταρα. Είναι εμφανής και η υποθετική ανταλλαγή ιόντων μεταξύ του εξωκυττάριου χώρου και των ενδοθηλιακών κυττάρων που συμμετέχουν στην ρύθμιση του εξωκυττάριου pH. [37]

Στην περίπτωση της εμφάνισης νεοπλασίας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα κύτταρα είναι πιο κοντά το ένα στο άλλο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή αιμάτωση του χώρου που οδηγεί στην μειωμένη παροχή οξυγόνου στα κύτταρα, [37][39][40]. Έτσι το κύτταρο προκειμένου να αποκτήσει την ενέργεια που χρειάζεται καταφεύγει σε αυξημένους ρυθμούς γλυκόλυσης, [17], καθώς και στην αναερόβια γλυκόλυση, [39], [18]. Κατά την διαδικασία αυτή τα μεταβολικά προϊόντα, και κατά συνέπεια και τα παραγόμενα ιόντα υδρογόνου είναι πολύ περισσότερα. Το αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι οι αντλίες να λειτουργήσουν με μεγαλύτερο ρυθμό έτσι ώστε να απομακρύνουν τα περιττά ιόντα υδρογόνου από το κύτταρο και έτσι να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητά του. Οι κυριότεροι μηχανισμοί ρύθμισης του εσωκυττάριου pH σε πολλούς τύπους κυττάρων, οι οποίοι εμπλέκονται σε περιπτώσεις κυττάρων που περιέχουν μεγάλες ποσότητες οξέων, είναι η αντλία  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , [29][37][41], και η εξαρτώμενη από  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  αντλία, [29] [37] [41]. Έχει αναφερθεί ότι η εξαρτώμενη από  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  αντλία είναι περισσότερο ενεργή σε εσωκυττάριο pH~6.9, [29] ενώ η αντλία  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  είναι περισσότερο ενεργή σε πιο όξινο περιβάλλον, pH~6.6, [29]. Από τον εξωκυττάριο



χώρο όμως τα προαναφερθέντα ιόντα δεν μπορούν να απομακρυνθούν με ευκολία λόγω της ανεπαρκούς αιμάτωσης του χώρου, [17]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του εξωκυττάρου pH, που είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων.

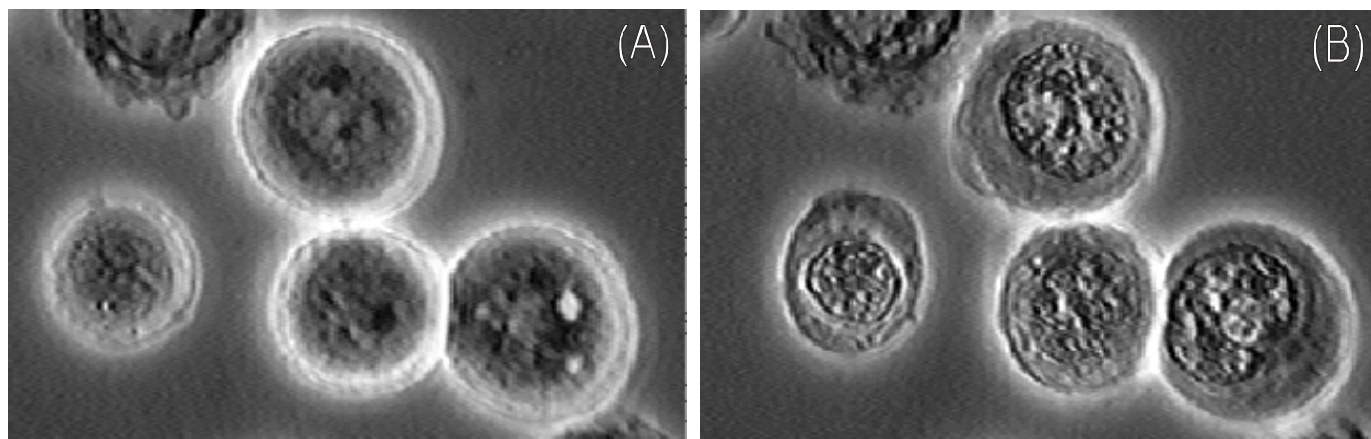
Η παραπάνω θεωρία επιβεβαιώνεται από τις πειραματικές μετρήσεις του εσωκυττάρου και εξωκυττάρου pH, για φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα. Έτσι για τα φυσιολογικά κύτταρα το εσωκυττάριο pH, ( $pH_i$ ), είναι περίπου 7.2, [37], ενώ το εξωκυττάριο pH, ( $pH_e$ ), έχει τιμή  $\sim 7.4$ , [37]. Στην περίπτωση του καρκινικού κυττάρου το  $pH_i$  έχει την ίδια τιμή,  $\sim 7.2$ , [37], ενώ το  $pH_e$  έχει τιμή  $\sim 6.8$ , [37]. Παρατηρούμε λοιπόν ότι τα καρκινικά κύτταρα ζουν σε **όξινο περιβάλλον**.

## 5.4 Αλληλεπίδραση Οξικού Οξέος με Ιστό

Υπάρχουν πολύ λίγες εξηγήσεις για το πως προκαλείται η αλλαγή των οπτικών ιδιοτήτων του ιστού μετά την εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος. Η αλληλεπίδραση, όμως, του οξικού οξέος με τα κύτταρα έχει μελετηθεί λεπτομερώς και έχει δειχθεί πειραματικά ότι το οξικό οξύ προκαλεί τις πρωτεΐνες του κυττάρου να πήζουν, να διογκώνονται, και να μετουσιώνονται (denaturation), [33][34]. Ο πυρήνας έχει το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών από όλα τα άλλα συστατικά του κυττάρου[31]. Έχει επίσης αναφερθεί ότι λόγω αυτού του φαινομένου και λόγω της ύπαρξης ακόμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης πρωτεϊνών στους πυρήνες, των καρκινικών κυττάρων, η αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες της καρκινική περιοχής είναι πιο εμφανής, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αλλαγή οπτικών ιδιοτήτων του επιθηλίου μετά την διαλύματος εφαρμογή οξικού οξέος, [17]. Τέλος, έχει γίνει συσχέτιση της ύπαρξης συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον πυρήνα, της κυτοκερατίνης 10, με την αλλαγή οπτικών ιδιοτήτων του επιθηλίου που προκαλεί το οξικό οξύ, [30].

Στην Εικόνα 2 δίνεται μία εικόνα από μικροσκόπιο διαφοράς φάσης, (phase contrast), όπου είναι εμφανής η οπτική διαφορά καρκινικών κυττάρων πριν και μετά την εφαρμογή διαλύματος οξικού οξέος συγκέντρωσης 6%. Είναι ξεκάθαρο ότι μετά την εφαρμογή του διαλύματος οξικού οξέος, τα κύτταρα έχουν διογκωθεί, ενώ οι πυρήνες είναι ορατοί υποδεικνύοντας με αυτόν τον τρόπο ότι ο σχετικός δείκτης διάθλασης έχει αυξηθεί. Επίσης από την στιγμή που οι εικόνες από το μικροσκόπιο διαφοράς φάσης αντιπροσωπεύουν αλλαγές στο οπτικό μονοπάτι, οι διαφορές στην ένταση μέσα στον πυρήνα του κυττάρου αντιπροσωπεύουν διαφορές στον δείκτη

διάθλασης, δείχνοντας έτσι ότι παρατηρείται αυξημένο μέγεθος και συχνότητα στις διακυμάνσεις του δείκτη διάθλασης του πυρήνα. Αυτές οι χωρικές μεταβολές καθώς και η αυξημένη του τιμή, οδηγούν σε αύξηση της σκέδασης.



Εικόνα 2: Εικόνες από μικροσκόπιο διαφοράς φάσης κυττάρων πριν, (A), και 3 λεπτά μετά την εφαρμογή διαλύματος 6% οξικού οξέος [26]

Στον Πίνακα 3 δίνονται οι πειραματικές τιμές παραμέτρων του κυττάρου που αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι οι χωρικές διακυμάνσεις του δείκτη διάθλασης, των καρκινικών κυττάρων μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος, καθώς και η σχετική του τιμή ως προς το κυτταρόπλασμα, είναι αρκετά αυξημένα, [25], πράγμα που αποδεικνύει το αυξημένο ποσοστό σκέδασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, [26][25] [36].

	Χωρίς οξικό οξύ	Με οξικό οξύ	Αναφορά	Τύπος κυττάρου
<b>Μεταβολή (variation), δείκτη διάθλασης</b>	0.03	0.06	[25]	Τραχηλικά ενδοεπιθηλιακά κύτταρα HeLa
<b>Χωρική συχνότητα μεταβολών</b>	$2 - 10 \mu\text{m}^{-1}$	$2 - 20 \mu\text{m}^{-1}$	[25]	Τραχηλικά ενδοεπιθηλιακά κύτταρα HeLa
<b>Σχετικοί δείκτες διάθλασης, (πυρήνα/κυτταρόπλασμα)</b>	1.036	1.050	[16]	Τραχηλικά ενδοεπιθηλιακά κύτταρα SiHa
<b>Διάμετρος πυρήνα</b>	$12.8 \pm 2 \mu\text{m}$	$11.0 \pm 2 \mu\text{m}$	[16]	Τραχηλικά ενδοεπιθηλιακά

Πίνακας 3: Οπτικές ιδιότητες πυρήνων φυσιολογικών και δυσπλαστικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας

### Βιβλιογραφία

- [21] Anderson M., Jordan J., Morse A., Sharp F., “A Text and Atlas of Integrated Colposcopy”, Mosby, 1993
- [22] Backman V., Gurjar R., Badizadegan K., Itzkan I., Dasari R. R., Perelman L. T., Feld M. S., “Polarized Light Scattering Spectroscopy for Quantitative Measurement of Epithelial Cellular Structures *In Situ*”, IEEE Journal of Selected Topics in quantum electronics, Vol. 5, no. 4, pp. 1019-1026, 1999
- [23] Boone C. W., Kelloff G. J., Steel V. E., “The natural history of intraepithelial neoplasia: Relevance to the search for intermediate endpoint biomarkers”, Journal of Cellular Biochemistry, Supplement 16G:3-26, 1992
- [24] Drezek R., Dunn A., Richards-Kortum R., “A Pulsed Finite-Difference Time-Domain (FDTD) Method for Calculating Light Scattering from Biological Cells Over Broad Wavelength Ranges”, Optics Express, Vol. 6, No. 7, pp. 147-157, 2000
- [25] Drezek R., Dunn A., Richards-Kortum R., “Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements”, Applied Optics, Vol. 38, No. 16, pp. 3651-3661, 1999
- [26] Dunn A., “Light scattering from biological cells”, PhD Thesis, Austin (TX), University of Texas at Austin, 1997
- [27] Dunn A., Richards-Kortum R., “Three-Dimensional Computation of Light Scattering From Cells”, Biomedical Engineering Program, Department of Electrical and Computer Engineering, University of Texas, Austin, TX 78731.
- [28] Georgakoudi I., Jacobson B. C., van Dam J., Backman V., Wallaces M. B., Müller M. G., Zhang Q., Badizadegan K., Sun D., Thomas G. A., Perelman L. T., Feld M. S. “Fluorescence, Reflectance, and Light-Scattering Spectroscopy for Evaluating Dysplasia in Patients with Barrett’s Esophagus”, Gastroenterology, Vol. 120, pp. 1620-1629a, 2001
- [29] Lee A. H. and Tannock I. F., “Heterogeneity of intracellular pH and of Mechanisms That Regulate Intracellular pH in Populations of Cultured Cells”, Cancer Research, Vol 58, pp. 1901-1908, May 1, 1998
- [30] Maddox P., Szarewski A., Dyson J., Cuzick J., “Cytokeratin expression and acetowhite change in cervical epithelium”, Journal of Clinical Pathology, vol. 47, pp. 15-17, 199
- [31] Molecular biology of the cell, edited by Bruce Alberts, New York, : Garland Publ., 1983
- [32] Mourant J. R., Hielscher A. H., Eick A. H., Johnson T. M., Freyer J. P., “Evidence of intrinsic differences in the light scattering properties of tumorigenic and nontumorigenic cells”, Cancer, 1998 Dec 25;84(6):366-374
- [33] Novak I., Hug M., Greger R., “Intracellular pH in rat pancreatic ducts”, Comp. Biochem. Physiol., Vol 118A, No. 2, pp. 409-411, 1997

- [34] Ronne M., "Chromosome preparation and high resolution banding techniques: a review", *Journal of Dairy Science*, vol. 72, pp. 1363-1377, 1989
- [35] Schmitt Joseph M. and Kumar Gitesh, "Optical scattering properties of soft tissue: a discrete particle model", *Applied Optics*, vol 37, No. 13, pp.2788-2797, 1998
- [36] Sokolov K., Drezek R., Gossage K. and Richards-Kortum R., "Reflectance spectroscopy with polarized light: is it sensitive to cellular and nuclear morphology", *Optics Express*, Vol. 5, No. 13, pp. 302-317, 1999
- [37] Stubbs M., McSheehy P. M. J., Griffiths J. R., Bashford L., "Causes and consequences of tumor acidity and implications for treatment", *Molecular Medicine Today*, Vol. 6, pp. 15-19, 2000
- [38] Tannock I. F., Rotin D., "Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation", *Cancer Research*, vol 49, pp. 4373-4384, 1989
- [39] Webb S. D., Sherratt J. A., Fish R. G., "Mathematical modeling of tumor acidity: regulation of intracellular pH", *J. theor. Biol.*, Vol. 196, pp. 237-250, 1999
- [40] Yamagata M., Hasuda K., Stamato T. and Tannock I. F., "The contribution of lactic acid to acidification of tumors: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase", *British Journal of Cancer* (1998), 77(11), pp. 1726-1731
- [41] Zhou R., Bansal N., Leeper D. B., and Glickson J. D., "Intracellular Acidification of Human Melanoma Xenografts by the Respiratory Inhibitor *m*-Iodobenzylguanidine Plus Hyperglycemia: A <sup>31</sup>P Magnetic Resonance Spectroscopy Study", *Cancer Research* 60, 3532-3536, 2000

## Κεφάλαιο 6 Διαμερισματική ανάλυση

### 6.1 Εισαγωγή

Η διαδικασία που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 4 μπορεί να δώσει πολύ καλά αποτελέσματα συγκριτικά με τις κλασσικές μεθόδους διάγνωσης, αλλά και με τις άλλες μεθόδους οπτικής βιοψίας. Παρόλα αυτά είναι αναγκαία η ερμηνεία του φαινομένου της αλλαγής των οπτικών ιδιοτήτων του επιθηλίου και η συσχέτιση συγκεκριμένων παραγόντων που συντελούν στην κινητική του φαινομένου με τα πειραματικά δεδομένα, έτσι ώστε κατόπιν να οδηγηθούμε στην βελτιστοποίηση της παρούσας διαγνωστικής μεθόδου. Με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα του προηγούμενου κεφαλαίου και την θεωρία της Διαμερισματικής Ανάλυσης, (Compartmental Modeling), δημιουργήθηκε ένα μοντέλο απ' όπου εξάχθηκε μία εκθετική συνάρτηση η οποία προσαρμόστηκε στις καμπύλες κινητικής της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός ως προς τον χρόνο. Στην συνέχεια βρέθηκαν οι χαρακτηριστικές τους παράμετροι, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση του διαγνωστικού περιεχομένου των πειραματικών καμπυλών.

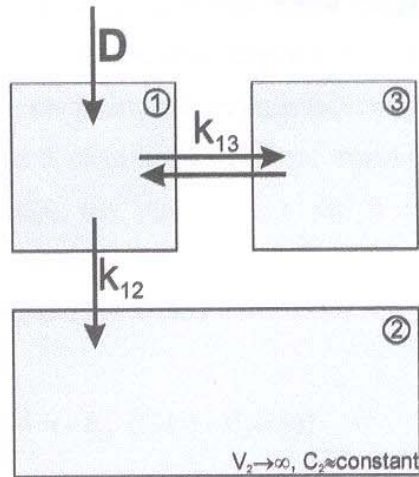
Η συνάρτηση η οποία θα προσαρμοστεί στα πειραματικά δεδομένα, πρέπει να προέρχεται από την μαθηματική αναπαράσταση του βιολογικού συστήματος, ιστός-κύτταρα και να είναι συμβατή με ένα κατά το δυνατόν ρεαλιστικό μοντέλο ιστού. Η βασική προσέγγιση της συγκεκριμένης μαθηματικής θεωρίας, είναι η ανάλυση ενός βιολογικού συστήματος χωρίζοντάς το σε έναν πεπερασμένο αριθμό τμημάτων, τα οποία αλληλεπιδρούν κατά την διάρκεια ανταλλαγής ύλης. Ένας από τους στόχους της ανάλυσης είναι η ανάπτυξη μίας αληθοφανούς μαθηματικής αναπαράστασης ενός συγκεκριμένου βιολογικού συστήματος και της απόκρισής του σε εξωτερική διέγερση. Αυτό το μοντέλο θα είναι μεν μία απλοποίηση αυτού του φαινομένου, αλλά και μία επαρκής αναπαράσταση της λειτουργίας που εκτελείται, [1].

### 6.2 Μοντέλο Τριών Τμημάτων

#### 6.2.1 Τμηματικό Μοντέλο

Αρχικά, στην προσπάθεια εύρεσης μίας συνάρτησης που να προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα, χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο τριών τμημάτων, Εικόνα 1. Τα τρία αυτά τμήματα αναπαριστούσαν τον τράχηλο της

μήτρας. Πιο συγκεκριμένα το τμήμα 1, αναπαριστούσε τον εξωκυττάριο χώρο, το τμήμα 3 το κύτταρο και το τμήμα 2 αναφερόταν στο αγγειακό πλέγμα.



Εικόνα 1: Μοντέλο τριών τμημάτων

Το σκεπτικό που ακολουθούταν ήταν το εξής: αρχικά, ( $t_0=0$ ), εφαρμόζεται το οξικό οξύ, του οποίου, η συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου είναι  $C_0$ . Αμέσως εισέρχεται στον εξωκυττάριο χώρο και παρατηρείται μία ανταλλαγή ιόντων μεταξύ του εξωκυττάριου χώρου (1), και του κυττάρου, (3), με ρυθμό  $k_{13}$ . Από τον εξωκυττάριο χώρο απομακρύνονται προς την δεξαμενή 2, με ρυθμό  $k_{12}$ , η οποία αντιπροσωπεύει το αγγειακό πλέγμα και θεωρείται ότι έχει πολύ μεγαλύτερο όγκο συγκρινόμενο με τα τμήματα 1 και 3. Για τον λόγο αυτό η συγκέντρωση  $C_2$  θεωρείται σταθερή, αφού δεν επηρεάζεται από την ανταλλαγή ιόντων με το τμήμα 1. Η συγκέντρωση της ποσότητας που προστίθεται είναι  $C_1$ ,  $C_2$  και  $C_3$ , στα τρία διαφορετικά τμήματα αντιστοίχως. Ο ρυθμός της ανταλλαγής των ιόντων είναι ανάλογος με την παράγωγο της συγκέντρωσης όπως συμβαίνει στην ανταλλαγή της ύλης μέσω όσμωσης.

$$\frac{dQ_{A \rightarrow B}}{dt} = -k_{A \rightarrow B} \cdot (C_A - C_B)$$

όπου,  $\frac{dQ_{A \rightarrow B}}{dt}$ , αντιπροσωπεύει την ύλη που μεταφέρθηκε από ένα τμήμα A σε κάποιο άλλο B, και  $k_{AB}$  είναι ο ρυθμός μεταφοράς.

Πιο συγκεκριμένα με βάση το μοντέλο που αναφέρθηκε παραπάνω, αρχικά όπου θεωρείται ότι υπάρχει κατάσταση ισορροπίας όλα τα τμήματα έχουν την ίδια συγκέντρωση,  $C_1(eq)=C_2(eq)=C_3(eq)$ , που σημαίνει ότι υπάρχει ισορροπία όσον αφορά την ανταλλαγή ιόντων μεταξύ των τριών τμημάτων. Σε χρόνο  $t_0=0$ , μία ποσότητα ιόντων,  $C_0$ , προστίθεται στο τμήμα 1 με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί άμεση αλλαγή στην συγκέντρωση του συγκεκριμένου τμήματος,  $C_1(0)=C_1(eq)+C_0$ . Θεωρείται ότι το τμήμα 3 είναι πολύ μικρό σε σύγκριση με το τμήμα 1, άρα η ανταλλαγή ιόντων μεταξύ των τμημάτων 1 και 2 είναι ανεξάρτητο από την ανταλλαγή ιόντων μεταξύ των τμημάτων 1 και 3. Η μεταφορά ιόντων μεταξύ των τμημάτων 1 και 2 δίνεται από τον τύπο

$$\frac{dC_1(t)}{dt} = -k_{12} \cdot (C_1(t) - C_2(eq)) \Rightarrow \quad (1)$$

$$C_1(t) = C_1(eq) + C_0 \cdot e^{-k_{12}t} \quad (2)$$

Η ανταλλαγή ιόντων μεταξύ των τμημάτων 1 και 3 δίνεται από την σχέση 3, όπου αν αντικατασταθεί το  $C_1$  από την σχέση 2, καταλήγουμε στην σχέση 4.

$$\frac{dC_3(t)}{dt} = -k_{13} \cdot (C_3(t) - C_1(t)) \Rightarrow \quad (3)$$

$$C_3(t) = C_1(eq) + \frac{k_{13} \cdot C_0}{k_{13} - k_{12}} \cdot e^{-k_{12}t} \cdot (1 - e^{-(k_{13} - k_{12})t}) \quad (4)$$

Η σχέση 4 είναι μία συνάρτηση διπλού εκθετικού, η οποία δείχνει πως μεταβάλλεται η συγκέντρωση των ιόντων του υδρογόνου του κυττάρου σε συνάρτηση με τον χρόνο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αλλαγή του εσωκυττάρου pH, δηλαδή της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου στο εσωτερικό του κυττάρου, οδηγεί σε αλλαγή των οπτικών του ιδιοτήτων. Για τον λόγο αυτό θεωρούμε ότι η χρονική μεταβολή των οπτικών ιδιοτήτων του επιθηλίου ακολουθεί την χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης των ιόντων του υδρογόνου του κυττάρου. Το σημείο αυτό θα γίνει πιο ξεκάθαρο στο επόμενο κεφάλαιο. Η σχέση 4, λοιπόν χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή των πειραματικών σημείων, των μετρήσεων που διεξάχθηκαν στην παρούσα εργασία.

Πιο συγκεκριμένα η εξίσωση διπλού εκθετικού που χρησιμοποιήθηκε για την προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα, είναι η παρακάτω:

$$f(t) = A \cdot \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}} \right) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad (5)$$

Η εξαρτημένη και ανεξάρτητη μεταβλητή της σχέσης 5, είναι η ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, (IBSL) και ο χρόνος, ενώ η παραπάνω εξίσωση έχει τρεις παραμέτρους: το A που δίνει ουσιαστικά την μέγιστη ένταση, και τα  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  που αντιπροσωπεύουν τους χαρακτηριστικούς χρόνους εκθετικής αύξησης και μείωσης, αντίστοιχα.

Χρησιμοποιώντας την παραπάνω εξίσωση, προσαρμόστηκαν όλες οι πειραματικές καμπύλες, που έφταναν τον αριθμό των 228, της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός ως προς τον χρόνο, μέσω του προγράμματος Origin 6.0. Στα αριθμητικά αποτελέσματα της προσαρμογής που δόθηκαν αυτομάτως από το υπολογιστικό πρόγραμμα, περιέχονταν οι τρεις παράμετροι της εξίσωσης, A,  $\tau_1$  και  $\tau_2$ . Επίσης υπολογίστηκαν οι συντελεστές  $R^2$  και  $\chi^2$ , έτσι ώστε να διασφαλιστεί η ακρίβεια της προσαρμογής.

### 6.2.2 Συντελεστές Προσαρμογής

Η σχέση του  $\chi^2$  καθορίζεται από την σχέση

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{y_i - f(x_i)}{\sigma_i} \right]^2 \quad (6)$$

Η συγκεκριμένη εξίσωση προσθέτει τις διαφορές μεταξύ κάθε σημείου από τα δεδομένα και της καμπύλης προσαρμογής, ( $f(x)$ ). Σε αυτήν την εξίσωση τα  $x_i$  είναι οι τιμές της ανεξάρτητης μεταβλητής, στην περίπτωσή μας, ο χρόνος. Το  $y_i$  είναι οι τιμές της εξαρτημένης μεταβλητής, που στην περίπτωσή μας είναι η ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός. Το άθροισμα είναι στα N πειραματικά δεδομένα, και η κάθε διαφορά διαιρείται με την αβεβαιότητα που κάθε σημείου που είναι μία εκτίμηση της πιθανής ασυμφωνίας μεταξύ της θεωρητικής και πραγματικής τιμής του σημείου. Αυτό σημαίνει ότι όταν η καμπύλη είναι μακριά από ένα ‘καλό’ σημείο, με αποτέλεσμα η αβεβαιότητα να είναι μικρή, το  $\chi^2$  είναι πολύ μεγάλο, ενώ σε αντίθετη



περίπτωση, όταν η καμπύλη είναι μακριά από ένα ‘κακό’ πειραματικό σημείο, παρουσιάζεται μεγάλη αβεβαιότητα και το  $\chi^2$  είναι μικρό. Όπως φαίνεται από τη Σχέση 6 το  $\chi^2$  είναι θετική ποσότητα, άρα η μικρότερη τιμή που μπορεί να πάρει είναι το μηδέν. Αυτό συμβαίνει όταν η καμπύλη περνά από όλα τα πειραματικά δεδομένα, το οποίο είναι αδύνατον να συμβεί, αφού τα πειραματικά δεδομένα πάντα έχουν ένα επίπεδο θορύβου, πράγμα που σημαίνει ότι ποτέ δεν θα προσαρμόζονται τέλεια στην καμπύλη. Όσο όμως πιο μικρό είναι το  $\chi^2$ , τόσο πιο καλή είναι η προσαρμογή της καμπύλης στα πειραματικά δεδομένα.

Ο συντελεστής προσδιορισμού  $R^2$  είναι ένας δείκτης ο οποίος δείχνει την επιτυχία προσαρμογής της καμπύλης. Η τιμή του  $R^2$  κυμαίνεται από 0 σε 1. Όταν το  $R^2$  ισούται με μονάδα σημαίνει ότι η προσαρμογή της καμπύλης είναι τέλεια, ενώ όταν ισχύει  $R^2=0$ , τότε η καμπύλη που χρησιμοποιείται για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων δεν είναι η κατάλληλη.

Η προσαρμογή του διπλού εκθετικού στα πειραματικά δεδομένα έδωσε αρκετά καλά αποτελέσματα, ως προς την ακρίβεια της προσαρμογής. Παρόλα αυτά υπήρχε ένας αρκετά μεγάλος αριθμός καμπυλών όπου η προσαρμογή με το διπλό εκθετικό δεν έδινε καλά αποτελέσματα. Η συγκεκριμένη παρατήρηση οδήγησε στην ανάγκη μίας νέας διερεύνησης με σκοπό την εύρεση μίας άλλης συνάρτησης η οποία να προσαρμόζεται καλύτερα σε όλα τα πειραματικά δεδομένα. Για τον λόγο αυτό χρειάστηκε να γίνει ξανά μία διερεύνηση του φυσικού-βιολογικού συστήματος μέσω της τμηματικής ανάλυσης.

## 6.3 Τριπλό εκθετικό

### 6.3.1 Συνάρτηση Τριπλού Εκθετικού

Η συνάρτηση διπλού εκθετικού προέρχεται από την διερεύνηση ενός συστήματος τριών τμημάτων, του επιθήλιου, ενός κυττάρου και του αγγειακού πλέγματος. Το επιθήλιο, όμως, αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων τα οποία είναι πολύ πιθανό να έχουν διαφορετικές σταθερές κινητικής. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη ενός αριθμού τόσων συστημάτων τριών τμημάτων, όσων και ο αριθμός των κυττάρων. Το οπισθοσκεδαζόμενο, λοιπόν, φως το οποίο καταγράφεται από το απεικονιστικό σύστημα, περιέχει πληροφορίες όχι για την κινητική ενός μόνο συστήματος τριών τμημάτων, αλλά για όλα τα συστήματα των οποίων ο αριθμός είναι ίσος με τον αριθμό των κυττάρων του επιθήλιου. Με βάση

αυτήν την υπόθεση καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το οπισθοσκεδαζόμενο φως έχει κινητική η οποία υπάκουει σε μία συνάρτηση η οποία ουσιαστικά είναι η μέση τιμή όλων των συναρτήσεων διπλών εκθετικών.

Η μέση τιμή ενός μεγάλου αριθμού εξισώσεων διπλού εκθετικού είναι μία συνάρτηση τριπλού εκθετικού:

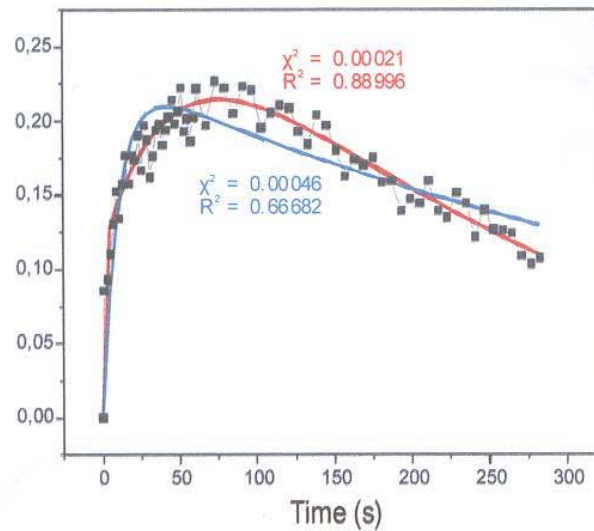
$$f(t) = \left( A_0 + A_1 \cdot \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}} \right) \right) \cdot \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_3}} \quad (7)$$

Η παραπάνω συνάρτηση προσαρμόστηκε στις πειραματικές καμπύλες και έδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα από την σχέση διπλού εκθετικού. Αυτό επιβεβαιώθηκε και μετά την σύγκριση του  $\chi^2$  και του  $R^2$  του διπλού και τριπλού εκθετικού, Πίνακας 1. Παρατηρούμε ότι το  $\chi^2$  είναι πολύ πιο κοντά στο μηδέν και το  $R^2$  πολύ πιο κοντά στο 1 όταν η προσαρμογή των καμπυλών γίνεται με το τριπλό εκθετικό.

	Διπλό Εκθετικό	Τριπλό Εκθετικό
$\chi^2$	0.00675	$4.36053 \cdot 10^{-4}$
$R^2$	0.73454	0.80712

Πίνακας 1: μέσες τιμές των  $R^2$  και  $\chi^2$  για τις δύο συναρτήσεις

Στην Εικόνα 2 δίνεται μία χαρακτηριστική περίπτωση προσαρμογής στα πειραματικά δεδομένα, με τις εξισώσεις διπλού και τριπλού εκθετικού. Όπως φαίνεται το διπλό εκθετικό δεν προσαρμόζεται καλά στα δεδομένα σε αντίθεση με το τριπλό εκθετικό, το οποίο προσαρμόζεται πολύ καλά.



Εικόνα 2: Δεδομένα χρονικής εξέλιξης τα οποία προσαρμόστηκαν με την συνάρτηση διπλού, (μπλε γραμμή), και τριπλού εκθετικού, (κόκκινη γραμμή).

Η εξίσωση του τριπλού εκθετικού έχει πέντε παραμέτρους:  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  και  $\tau_3$ . Η εξίσωση 8 μπορεί να γραφεί και στην μορφή της σχέσης 9.

$$f(t) = \left( A_0 + A_1 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} \right) \cdot \left( 1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}} \right) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_3}} \quad (9)$$

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση τριπλού εκθετικού, έγινε η προσαρμογή σε όλα τα πειραματικά δεδομένα, και ελήφθησαν τα αριθμητικά αποτελέσματα τα οποία περιλάμβαναν τους χαρακτηριστικούς χρόνους  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ , καθώς και τα  $A_0$ ,  $A_1$ . Χρησιμοποιώντας αυτές τις τιμές, μέσω ενός υπολογιστικού προγράμματος που αναπτύχθηκε με την γλώσσα Labview, εξήχθησαν κάποιες χαρακτηριστικές τιμές για κάθε καμπύλη, οι οποίες είναι οι ακόλουθες:

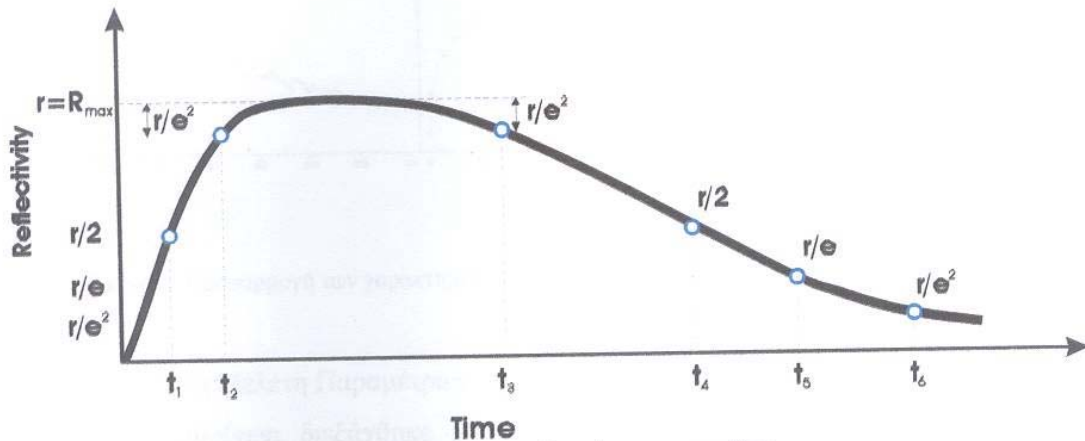
- ✓  $\tau_1$ : ο χρόνος κατά τον οποίο η ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, (IBSL), φτάνει στο  $I_{\max}/2$ .
- ✓  $\tau_2$ : ο χρόνος κατά τον οποίο το IBSL φτάνει στο  $I_{\max} - I_{\max}/e^2$ .
- ✓  $\tau_3$ : ο χρόνος στον οποίο το το IBSL φτάνει στο  $I_{\max} - I_{\max}/e^2$  μετά την κορυφή.
- ✓  $\tau_4$ : ο χρόνος κατά τον οποίο το IBSL, φτάνει στο  $I_{\max}/2$ , μετά την κορυφή.
- ✓  $\tau_5$ : ο χρόνος κατά τον οποίο το IBSL, φτάνει στο  $I_{\max}/e$ .
- ✓  $\tau_6$ : ο χρόνος κατά τον οποίο το IBSL, φτάνει στο  $I_{\max}/e^2$ . (Εικόνα 3)

✓ η μέγιστη τιμή του IBSL

✓ το ολοκλήρωμα της καμπύλης από το μηδέν μέχρι το άπειρο:  $I_1 = \int_0^{\infty} f(t) dt$

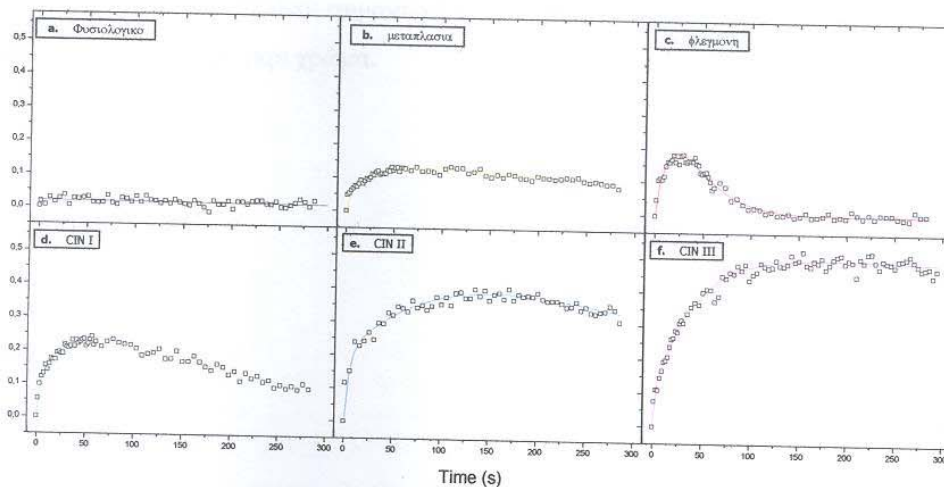
✓ το εμβαδόν της καμπύλης από την χρονική στιγμή μηδέν μέχρι  $t=300\text{sec}$ :

$$I_{300} = \int_0^{300} f(t) dt$$



Εικόνα 3: Χαρακτηριστικοί παράμετροι καμπύλης.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι έξι χαρακτηριστικές περιπτώσεις της παθολογίας του τραχήλου της μήτρας, (φυσιολογική, μεταπλασία, φλεγμονή, CIN1, CIN2, CIN3), οι οποίες έχουν προσαρμοστεί με την εξίσωση τριπλού εκθετικού. Είναι εμφανές ότι η συγκεκριμένη εξίσωση προσαρμόζεται πολύ καλά σε όλες τις περιπτώσεις.



Εικόνα 4: Προσαρμογή των χαρακτηριστικών καμπυλών με την συνάρτηση τριπλού εκθετικού.

### 6.3.2 Στατιστική Μελέτη Παραμέτρων

Στην συνέχεια διεξάχθηκε μία στατιστική μελέτη των παραμέτρων των καμπυλών. Στα παρακάτω γραφήματα και στους πίνακες δίνονται τα ιστογράμματα και τα t-tests των παραμέτρων για κάθε βαθμό νεοπλασίας, καθώς και για τις μεταπλασίες και φλεγμονές. Στον φυσιολογικό ιστό δεν παρουσιάζεται αλλαγή των ιδιοτήτων σκέδασης μετά την εφαρμογή του οξικού οξέος και για αυτόν τον λόγο όλες οι παράμετροι αυτής της κατάστασης θεωρούνται μηδενικά.

Το t-test μεταξύ ανεξάρτητων πληθυσμών εκτιμά αν τα δύο σύνολα μετρήσεων αναφέρονται σε φυσικές ποσότητες με διαφορετική μέση τιμή. Το t-test δίνει δύο παραμέτρους τα t και p. Η παράμετρος t υποδεικνύει πόσο διαφορετικές είναι οι μέσες τιμές των δύο συνόλων (όσο υψηλότερο είναι το t τόσο πιο διαφορετικά είναι τα δύο σύνολα). Η παράμετρος p δείχνει την πιθανότητα τα δύο σύνολα των μετρήσεων να αναφέρονται σε φυσικές ποσότητες με ίσες μέσες τιμές. Κάθε μια από τις παραμέτρους μελετάται χωριστά και κάθε ιστολογική κατάσταση συγκρίνεται με όλες τις άλλες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Όλα τα αποτελέσματα από το t-test εκτιμούνται σύμφωνα με το επίπεδο σπουδαιότητας του 0.05 το οποίο καθορίζει αν οι δύο πληθυσμοί που μελετήθηκαν είναι σημαντικά διαφορετικοί. Συγκεκριμένα αυτό το επίπεδο σπουδαιότητας υποδεικνύει ότι οι δύο πληθυσμοί θεωρούνται σημαντικά διαφορετικοί αν η

πιθανότητα για να είναι οι μέσες τους τιμές ίσες είναι λιγότερο από 5%. Οι πληθυσμοί οι οποίοι θεωρείται ότι δεν είναι σημαντικά διαφορετικοί φαίνονται στους πίνακες με το κελί χρωματισμένο με γκρι χρώμα.

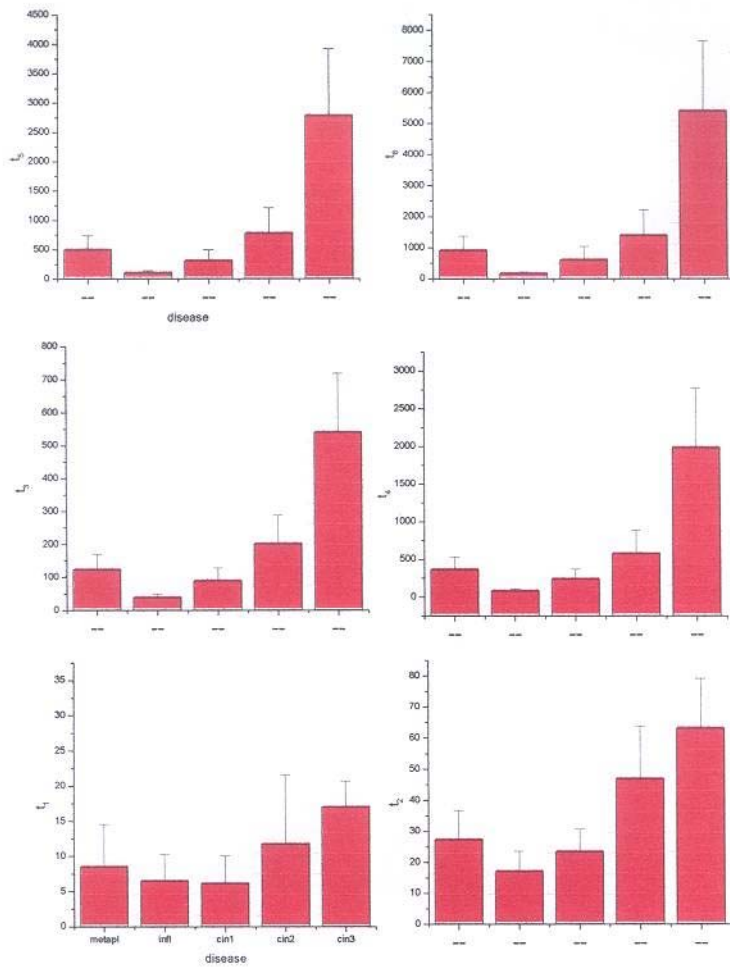
$I_{300}$	μεταπλασία	φλεγμονή	CIN I	CIN II	CIN III
μεταπλασία	-				
φλεγμονή	t=4.73 p=3.22·10 <sup>-5</sup>	-			
CIN I	t=4.72 p=1.42·10 <sup>-5</sup>	t=7.12 p=2.81·10 <sup>-9</sup>	-		
CIN II	t=11.34 p=9.24·10 <sup>-14</sup>	t=11.11 p=2.40·10 <sup>-12</sup>	t=9.31 p=7.96·10 <sup>-13</sup>	-	
CIN III	t=9.86 p=1.32·10 <sup>-10</sup>	t=9.97 p=2.04·10 <sup>-9</sup>	t=5.58 p=1.38·10 <sup>-6</sup>	t=-1.366 p=1.1·10 <sup>-1</sup>	-
$I_{\infty}$					
μεταπλασία	-				
φλεγμονή	t=6.60 p=9.70·10 <sup>-8</sup>	-			
CIN I	t=1.27 p=2.10·10 <sup>-1</sup>	t=5.48 p=1.18·10 <sup>-6</sup>	-		
CIN II	t=7.25 p=1.14·10 <sup>-8</sup>	t=7.63 p=1.32·10 <sup>-8</sup>	t=8.15 p=5.61·10 <sup>-11</sup>	-	
CIN III	t=11.90 p=1.82·10 <sup>-12</sup>	t=13.04 p=1.54·10 <sup>-11</sup>	t=11.1 p=2.62·10 <sup>-14</sup>	t=3.02 p=7.33·10 <sup>-3</sup>	-
EDR <sub>max</sub>					
μεταπλασία	-				
φλεγμονή	t=-4.47 p=7.07·10 <sup>-5</sup>	-			
CIN I	t=9.16 p=5.26·10 <sup>-13</sup>	t=3.12 p=2.88·10 <sup>-3</sup>	-		
CIN II	t=13.67 p=3.01·10 <sup>-16</sup>	t=8.20 p=2.95·10 <sup>-9</sup>	t=8.59 p=1.13·10 <sup>-11</sup>	-	
CIN III	t=23.44 p=6.08·10 <sup>-20</sup>	t=13.54 p=7.58·10 <sup>-12</sup>	t=13.7 p=1.57·10 <sup>-17</sup>	t=3.83 p=9.06·10 <sup>-4</sup>	-

$\tau_1$					
μεταπλασία	-				
φλεγμονή	t=1.15 p=2.56·10 <sup>-1</sup>	-			
CIN I	t=-1.86 p=6.86·10 <sup>-2</sup>	t=-3.38 p=7.36·10 <sup>-1</sup>	-		
CIN II	t=1.28 p=2.08·10 <sup>-1</sup>	t=1.97 p=5.68·10 <sup>-2</sup>	t=3.05 p=3.50·10 <sup>-3</sup>	-	
CIN III	t=3.43 p=1.90·10 <sup>-3</sup>	t=4.63 p=1.45·10 <sup>-4</sup>	t=6.13 p=2.19·10 <sup>-7</sup>	t=1.57 p=1.13·10 <sup>-1</sup>	-
$\tau_2$					
μεταπλασία	-				
φλεγμονή	t=3.73 p=6.40·10 <sup>-4</sup>	-			
CIN I	t=-1.80 p=7.68·10 <sup>-2</sup>	t=2.99 p=4.20·10 <sup>-3</sup>	-		
CIN II	t=4.64 p=4.07·10 <sup>-5</sup>	t=6.56 p=2.55·10 <sup>-7</sup>	t=7.25 p=1.61·10 <sup>-9</sup>	-	
CIN III	t=7.72 p=2.06·10 <sup>-8</sup>	t=11.22 p=2.50·10 <sup>-10</sup>	t=11.19 p=1.84·10 <sup>-14</sup>	t=2.03 p=5.40·10 <sup>-2</sup>	-
$\tau_3$					
μεταπλασία	-				
φλεγμονή	t=7.14 p=1.84·10 <sup>-8</sup>	-			
CIN I	t=-3.04 p=3.47·10 <sup>-3</sup>	t=5.10 p=4.67·10 <sup>-6</sup>	-		
CIN II	t=3.65 p=7.75·10 <sup>-4</sup>	t=7.40 p=2.50·10 <sup>-8</sup>	t=6.64 p=1.56·10 <sup>-8</sup>	-	
CIN III	t=10.33 p=4.68·10 <sup>-11</sup>	t=11.47 p=1.68·10 <sup>-10</sup>	t=14.4 p=2.94·10 <sup>-18</sup>	t=6.20 p=3.06·10 <sup>-6</sup>	-

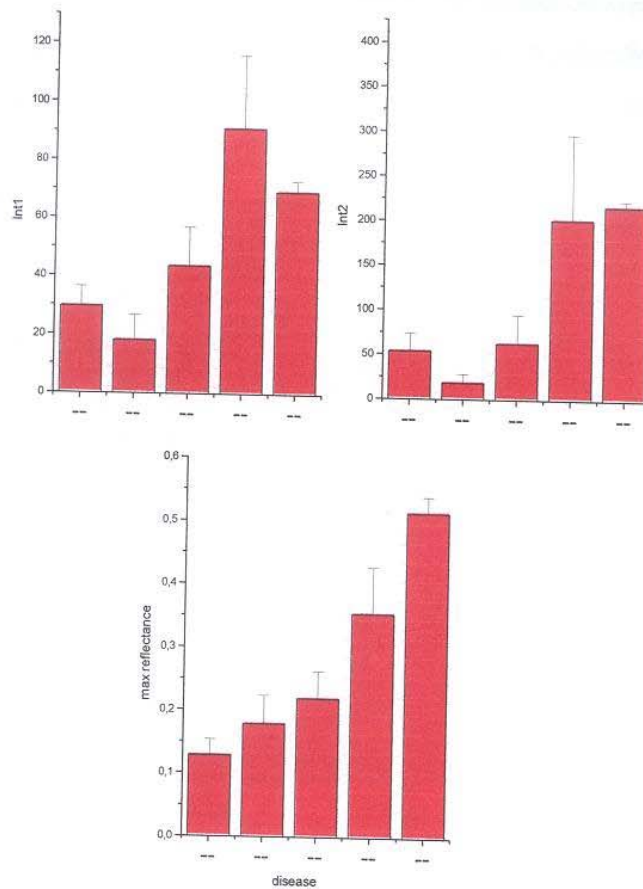


$\tau_4$					
μεταπλασία	-				
φλεγμονή	t=6.77 p=5.72·10 <sup>-8</sup>	-			
CIN I	t=-3.39 p=1.22·10 <sup>-3</sup>	t=4.53 p=3.35·10 <sup>-5</sup>	-		
CIN II	t=2.77 p=8.70·10 <sup>-3</sup>	t=6.37 p=4.31·10 <sup>-7</sup>	t=5.79 p=3.68·10 <sup>-7</sup>	-	
CIN III	t=9.46 p=3.21·10 <sup>-10</sup>	t=9.93 p=2.18·10 <sup>-9</sup>	t=13.38 p=4.09·10 <sup>-17</sup>	t=6.34 p=2.23·10 <sup>-6</sup>	-
$\tau_5$					
μεταπλασία	-				
φλεγμονή	t=6.64 p=8.49·10 <sup>-8</sup>	-			
CIN I	t=-3.53 p=8.13·10 <sup>-4</sup>	t=4.33 p=6.65·10 <sup>-5</sup>	-		
CIN II	t=2.61 p=1.28·10 <sup>-2</sup>	t=6.23 p=6.34·10 <sup>-7</sup>	t=5.72 p=4.78·10 <sup>-7</sup>	-	
CIN III	t=9.38 p=3.86·10 <sup>-10</sup>	t=9.81 p=2.72·10 <sup>-9</sup>	t=13.34 p=4.62·10 <sup>-17</sup>	t=6.40 p=1.96·10 <sup>-6</sup>	-
$\tau_6$					
μεταπλασία	-				
φλεγμονή	t=6.48 p=1.40·10 <sup>-7</sup>	-			
CIN I	t=-2.65 p=1.04·10 <sup>-2</sup>	t=3.86 p=3.05·10 <sup>-4</sup>	-		
CIN II	t=2.34 p=2.46·10 <sup>-3</sup>	t=5.40 p=1.47·10 <sup>-6</sup>	t=4.66 p=2.12·10 <sup>-5</sup>	-	
CIN III	t=9.31 p=4.52·10 <sup>-10</sup>	t=9.67 p=3.45·10 <sup>-9</sup>	t=12.60 p=3.36·10 <sup>-16</sup>	t=6.49 p=1.56·10 <sup>-6</sup>	-

Πίνακας 2: T-test των χαρακτηριστικών παραμέτρων ιστών με διαφορετική παθολογία.



Γράφημα 1: Ιστογράμματα χαρακτηριστικών χρόνων

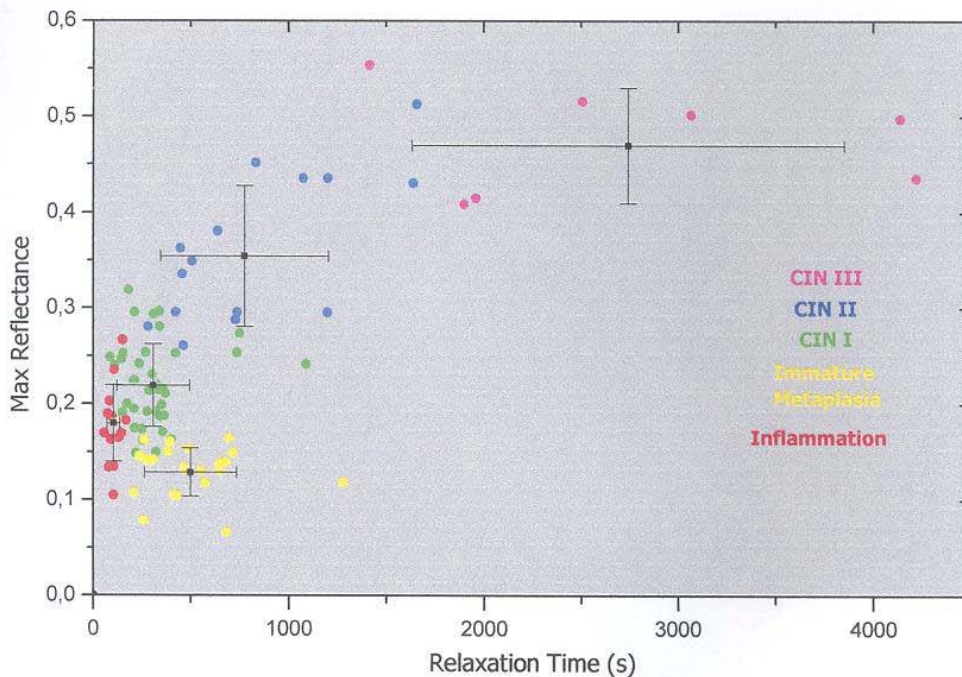


Γράφημα 2: Ιστογράμματα χαρακτηριστικών τιμών

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι κάθε παράμετρος δεν έχει την ίδια ικανότητα να διαφοροποιήσει όλες τις παθολογικές καταστάσεις. Αυτό είναι εμφανές και από τα ιστογράμματα και από τα t-tests. Για παράδειγμα, ενώ  $t_1$  διαφοροποιεί πολύ καλά το CIN1 από τους άλλους βαθμούς νεοπλασίας, δεν το διαφοροποιεί ικανοποιητικά από την μεταπλασία και την φλεγμονή. Παρουσιάζεται λοιπόν, η ανάγκη ύπαρξης ενός τρόπου ο οποίος να αξιολογεί πληροφορίες που παρέχονται ταυτόχρονα από δύο ή παραπάνω παραμέτρους, έτσι ώστε να υπάρξει πιο αντικειμενική διαφοροποίηση των διαφορετικών παθολογικών καταστάσεων του τραχήλου της μήτρας.

Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να παρατηρηθούν δυο παράμετροι αντί για μία, και έτσι η διαφοροποίηση των καταστάσεων να γίνεται μέσω διδιάστατων γραφημάτων. Επελέγησαν οι παράμετροι της μέγιστης έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός και το  $t_5$ , οι οποίες με βάση τα παραπάνω γραφήματα

και τους πίνακες θεωρείται ότι μπορούν να διαφοροποιήσουν ικανοποιητικά τις διάφορες καταστάσεις, και το γράφημα στο οποίο περιλαμβάνεται και η μέση τιμή και τα τυπικές αποκλίσεις, που σχηματίστηκε δίνεται στο Γράφημα 3.



Γράφημα 3

Είναι εμφανές ότι μέσω των χαρακτηριστικών παραμέτρων είναι δυνατή η διαφοροποίηση των διαφορετικών παθολογικών καταστάσεων του τραχήλου της μήτρας. Παρατηρούμε ότι κάθε κατάσταση καταλαμβάνει μία συγκεκριμένη περιοχή στο επίπεδο xy. Πιο συγκεκριμένα η μεταπλασία καταλαμβάνει περιοχή με χαμηλές τιμές της μέγιστης έντασης και σχετικά μεγάλες τιμές του  $\tau_5$ , σε αντίθεση με τις φλεγμονές οι οποίες έχουν μικρούς χρόνους χαλάρωσης και υψηλές τιμές μέγιστης έντασης. Όσο αφορά τους τρεις βαθμούς νεοπλασίας CIN1, CIN2, CIN3, όσο αυξάνεται ο βαθμός, τόσο αυξάνεται η ένταση και ο χρόνος χαλάρωσης. Είναι αξιοσημείωτο, ότι τα σημεία που βρίσκονται στην περιοχή του CIN3, σχηματίζουν ένα πλατό, το οποίο σημαίνει ότι από εκεί και πέρα η ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός δεν μπορεί να αυξηθεί άλλο. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην νέκρωση του ιστού που προκαλείται κατά την μετάβαση από νεοπλασία σε διηθητικό καρκίνο. Το αποτέλεσμα αυτού του φαινομένου είναι να μην απορροφάται

πολύ οξικό οξύ από τον ιστό με αποτέλεσμα οι αλλαγές στην ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός να μην είναι οι αναμενόμενες.

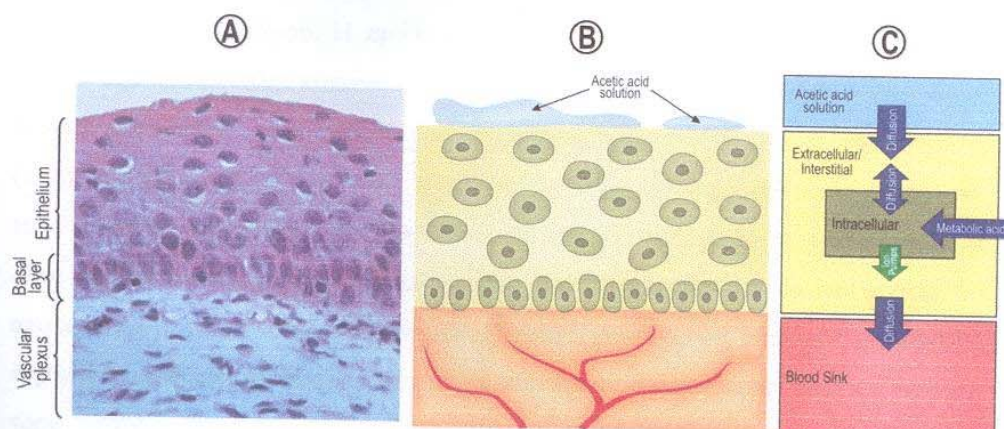
## Βιβλιογραφία

- [1] David H. Anderson, “Compartmental Modeling and Tracer Kinetics”, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 1983.

## Κεφάλαιο 7 Συσχέτιση του Βιολογικού Συστήματος με το Μοντέλο

### 7.1 Συσχέτιση Βιολογικού Μοντέλου με Μαθηματικό Μοντέλο

Η συσχέτιση του βιολογικού μοντέλου με το μαθηματικό μοντέλο που έχει αναπτυχθεί φαίνεται στην Εικόνα 1, όπου παρουσιάζεται μία σχηματική αναπαράσταση του επιθηλιακού ιστού, (B), και το μοντέλο τριών τμημάτων, στο οποίο αντιστοιχεί, (C). Η ανταλλαγή των μορίων και των ιόντων του οξικού οξέος μέσα στον ιστό λαμβάνει χώρα μεταξύ των τριών βασικών τμημάτων: 1) του εξωκυττάριου, 2) του εσωκυττάριου, 3) του αγγειακού πλέγματος. Αυτό το απλοποιημένο διαμερισματικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική περιγραφή της κινητικής των ιόντων υδρογόνου μέσα στα τμήματα του ιστού. Οι βασικές υποθέσεις του μοντέλου που αναπτύχθηκε είναι α) η προσθήκη των μορίων του οξικού οξέως στον εξωκυττάριο χώρο του επιθηλίου συμβαίνει πολύ γρήγορα σε σύγκριση με τους ρυθμούς ανταλλαγής μεταξύ των τμημάτων, β) η εσωκυττάρια παραγωγή των μεταβολικών οξέων είναι σταθερή κατά την διάρκεια της αλληλεπίδρασης οξικού οξέως και ιστού, γ) ο ρυθμός λειτουργίας των αντλιών ιόντων του κυττάρου είναι ανάλογος με την οξύτητα του εσωκυττάριου χώρου.



Εικόνα 1: (A) Τραχηλικός επιθηλιακός ιστός, όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο, (B) Σχηματική αναπαράσταση του επιθηλιακού ιστού, (C) Τμηματική ανάλυση του επιθηλιακού ιστού.

Το οξικό οξύ, CH<sub>3</sub>COOH, έχει σταθερά διάστασης K<sub>a</sub> =10<sup>-4.74</sup> ή pK<sub>a</sub>=4.74 όπου pK<sub>a</sub>=-log(K<sub>a</sub>). Η K<sub>a</sub> εκφράζει τον σταθερό λόγο του γινομένου των συγκεντρώσεων των ιόντων του οξέος προς την συγκέντρωση των αδιάστατων μορίων του, και είναι ένα μέτρο ισχύος του οξέος. Δεδομένου με τον όρο ασθενές χαρακτηρίζεται το οξύ το οποίο δίνει λιγότερα από 10% ιόντα υδρογόνου όταν διαλυθεί στο νερό, το οξικό οξύ είναι ένα ασθενές οξύ

Αφού το διάλυμα οξικού οξέος διαβρέξει στην περιοχή του τραχήλου της μήτρας, τα μόρια και τα ιόντα του διαχέονται μέχρι τον εξωκυττάριο χώρο του επιθηλίου. Τα αδιάστατα μόρια του οξικού οξέος διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, όπως συμβαίνει και με όλα τα λιποδιαλυτά οργανικά ασθενή οξέα, [4], [3], διαχέονται στο εσωτερικό του κυττάρου όπου δίσταται.

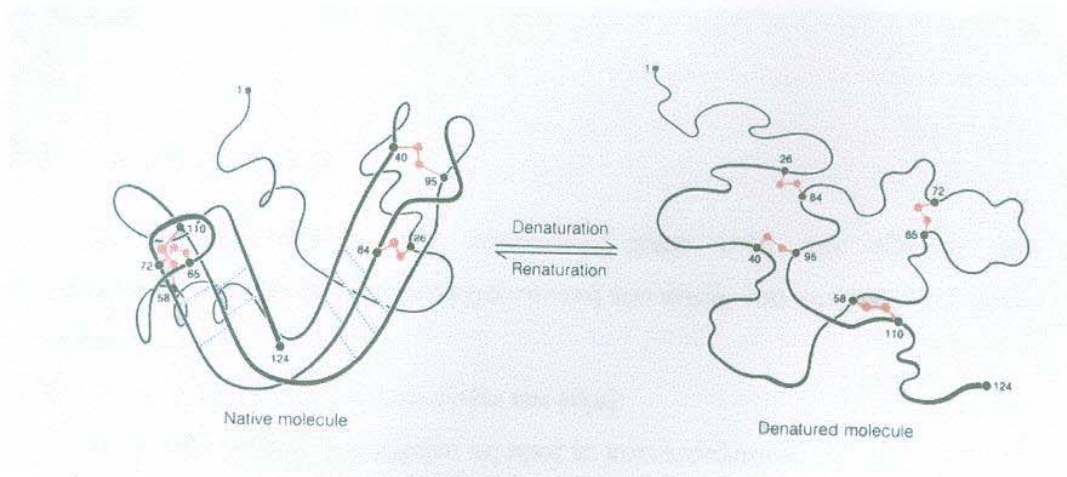


Το αποτέλεσμα της διάστασης είναι η απελευθέρωση ιόντων υδρογόνου, τα οποία προκαλούν προσωρινή οξείδωση του εσωκυττάρου χώρου, δηλαδή μείωση του εσωκυττάριο pH. Όσο πιο όξινος είναι ο εξωκυττάριος χώρος, τόσο περισσότερα μόρια οξικού οξέος παραμένουν αδιάστατα, άρα τόσο περισσότερα μόρια εισέρχονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στον εσωκυττάριο χώρο όπου δίστανται.

Πρέπει να σημειωθεί ότι ο η στερεοχημική δομή των πρωτεϊνών είναι βασική παράμετρος για τον καθορισμό των οπτικών ιδιοτήτων τόσο της ίδιας, όσο και ολόκληρου του κυττάρου. Η προσωρινή μείωση του εσωκυττάρου pH, λόγω του οξικού οξέως, προκαλεί κάποιες αλλαγές στην κατανομή στον χώρο και στην δομή πρωτεϊνών κυρίως του πυρήνα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μετουσίωση, (denaturation), [2][5]. Όταν το pH έχει τιμή πολύ χαμηλότερη από το ισοηλεκτρικό τους σημείο, οι πρωτεΐνες θα χάσουν το αρνητικό τους φορτίο με αποτέλεσμα να είναι θετικά φορτισμένες. Σημεία μεταξύ των πρωτεϊνών με όμοια φορτία θα απωθούνται με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η συνάθροισή τους σε πολύ κοντινά σημεία. Σε περιοχές με μεγάλη πυκνότητα φορτίου οι ενδομοριακές απώσεις θα είναι τόσο έντονες ώστε να προκαλέσουν αλλαγή στην δομή της πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα ξεδίπλωμα, (denaturation), [8], Εικόνα 2. Συνεπώς ο τρόπος με τον οποίο αλλάζουν οι οπτικές ιδιότητες των πρωτεϊνών αλλά και όλου του πυρήνα και του κυττάρου, εξαρτάται από το pH, [1] [6]. Δηλαδή οι αλλαγές του εσωκυττάρου pH ανακλώνται στις αλλαγές των ιδιοτήτων σκέδασης του κυττάρου. Πρέπει να



σημειωθεί ότι η παραπάνω διαδικασία συμβαίνει πολύ γρήγορα, χρόνος της τάξης του ms, μετά την εφαρμογή της ουσίας που προκαλεί το φαινόμενο, [7]. Η αλλαγή αυτή που συμβαίνει συνήθως είναι αναστρέψιμη.



Εικόνα 2: Μετουσίωση πρωτεΐνης

Μόλις μειωθεί το εσωκυττάριο pH, και κατά συνέπεια διαταραχθεί η ισορροπία του κυττάρου, η λειτουργία των αντλιών ιόντων γίνεται πιο έντονη, προκειμένου να απομακρύνουν από το εσωτερικό του κυττάρου το μεγάλο ποσό των ιόντων υδρογόνου που έχει δημιουργηθεί. Έτσι μετά από κάποιο διάστημα το εσωκυττάριο pH έχει επανέλθει στα φυσιολογικά του επίπεδα, και οι πρωτεΐνες έχουν επανέλθει στην αρχική τους μορφή, όπως και ο δείκτης διάθλασης του επιθηλίου, ο οποίος έχει επανακτήσει την αρχική του τιμή. Από τον εξωκυττάριο χώρο το οξικό οξύ και τα ιόντα του απομακρύνονται μέσω του αίματος.

Όπως αναφέρθηκε ήδη, όσο πιο όξινος είναι ο εξωκυττάριος χώρος, τόσο περισσότερα είναι τα αδιάστατα μόρια του οξικού οξέος που εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα να υπάρχει και διαφορετική κινητική του φαινομένου της αλλαγής των οπτικών ιδιοτήτων. Για διαφορετικούς βαθμούς νεοπλασίας, είναι γνωστό ότι αντιστοιχεί διαφορετική κατανομή των κυττάρων στο επιθήλιο, άρα και διαφορετική οξυγόνωση του χώρου, δηλαδή διαφορετική οξύτητα. Συμπερασματικά διαφορετικός βαθμός νεοπλασίας, παρατηρείται διαφορετική αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες του επιθηλίου, άρα και διαφορετικά χαρακτηριστικά λεύκανσης: μέγιστη τιμή και διάρκεια.

Μία από τις λύσεις του μοντέλου που περιγράφηκε παραπάνω, είναι η εξίσωση του τριπλού εκθετικού η οποία όπως έχει ήδη αναφερθεί προσαρμόζεται σε

όλες τις καμπύλες των πειραματικών δεδομένων. Με βάση λοιπόν τα παραπάνω δεδομένα και το τμηματικό μας μοντέλο, καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα ως προς την σχέση του βαθμού και της διάρκειας της λεύκανσης και το βαθμό νεοπλασίας.

## 7.2 Συμπεράσματα

Οι βασικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά την εξέλιξη των προκαρκινικών σταδίων τόσο στην αρχιτεκτονική του ιστού, όσο και στην λειτουργία του κυττάρου είναι:

- ✗ Ως προς την κυτταρική λειτουργία και δομή:
  - ✓ Αυξημένο μέγεθος του πυρήνα ως προς το κυτταρόπλασμα.
  - ✓ Αυξημένος ρυθμός γλυκόλυσης και αυξημένη ποσότητα μεταβολικών προϊόντων.
  - ✓ Αυξημένη ποσότητα DNA στον πυρήνα.
  - ✓ Ασύμμετρος πυρήνας ως προς το περίγραμμα και την κατανομή του μεγέθους.
  - ✓ Μεγαλύτερο ποσοστό χρωματίνης με ανομοιογενής κατανομή στον πυρήνα καθώς παρουσιάζονται περιοχές αραιωμάτων και πυκνωμάτων.
  - ✓ Το εξωκυττάριο pH είναι όξινο
- ✗ Ως προς την αρχιτεκτονική του ιστού
  - ✓ Παρουσιάζεται συνωστισμός των καρκινικών κυττάρων που ξεκινά από την βάση του επιθηλίου και καταλήγει στην επιφάνεια ανάλογα με τον βαθμό νεοπλασίας.

Επίσης σύμφωνα με το συγκεκριμένο μοντέλο και την περαιτέρω μελέτη οι παράγοντες που πιθανότατα επηρεάζουν την διάρκεια και τον βαθμό της λεύκανσης είναι οι παρακάτω:

- ✓ Ο πυκνός τρόπος κατανομής των κυττάρων του επιθηλίου ο οποίος επηρεάζει το σήμα με τους παρακάτω τρόπους:
  - i. Όσο πιο πυκνή είναι η κατανομή των κυττάρων, τόσο πιο ισχυρή είναι η σκέδαση του φωτός, άρα στο μετρούμενο σήμα, η τιμή της μέγιστης έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός θα είναι μεγαλύτερη.
  - ii. Η πυκνή κατανομή των κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα ο εξωκυττάριος χώρος να είναι περιορισμένος. Σαν αποτέλεσμα του παραπάνω

είναι η μειωμένη παροχή οξυγόνου στα κύτταρα και η μειωμένη ικανότητα εκκαθάρισης της περιοχής από τα μεταβολικά προϊόντα, τα οποία οδηγούν, όπως έχει ήδη αναφερθεί στην όξινηση του εξωκυττάριου χώρου. Επίσης το οξικό οξύ δεν θα μπορεί να διαχέεται με ευκολία προς το αγγειακό πλέγμα και να απομακρύνεται. Τα αποτελέσματα των παραπάνω είναι η εισαγωγή στον εσωκυττάριο χώρο, μεγαλύτερης ποσότητας οξικού οξέος και η μεγαλύτερη ένταση του φαινομένου της λεύκανσης.

- ✓ Ο τρόπος κατανομής των κυττάρων του βασικού στρώματος. Τα κύτταρα του βασικού στρώματος λειτουργούν σαν μία μεμβράνη η οποία διαχωρίζει το αγγειακό πλέγμα από το επιθήλιο. Όσο πιο πυκνή είναι η κατανομή των συγκεκριμένων κυττάρων τόσο πιο δύσκολη είναι η απομάκρυνση των μεταβολικών προϊόντων των κυττάρων, τόσο πιο ανεπαρκείς είναι η οξυγόνωση του χώρου, και τόσο πιο δύσκολη είναι η απομάκρυνση του οξικού οξέος από τον χώρο του επιθηλίου. Τα παραπάνω οδηγούν στην αργή εξέλιξη του φαινομένου της λεύκανσης, άρα σε μεγαλύτερους χρόνους χαλάρωσης.
- ✓ Το μέγεθος του πυρήνα. όσο πιο μεγάλος ο πυρήνας, τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό του φωτός που σκεδάζεται, άρα τόσο πιο μεγάλη είναι η μέγιστη τιμή της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός.
- ✓ Η πυκνότητα των πρωτεϊνών και η ανομοιογενής κατανομή τους στον πυρήνα. Οι διαφορές στον δείκτη διάθλασης μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, καθώς και οι ανομοιογένειες του δείκτη διάθλασης στον πυρήνα καθορίζουν την σκέδαση του φωτός. Αλλαγή στο εσωκυττάριο pH οδηγούν και σε αλλαγή των παραπάνω στοιχείων με αποτέλεσμα στην αλλαγή των ιδιοτήτων σκέδασης, και σε αλλαγή της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός.
- ✓ Ο ρυθμός λειτουργίας των κυτταρικών αντλιών. Όσο μεγαλύτερος ο ρυθμός λειτουργίας, τόσο πιο γρήγορα επανέρχεται το εσωκυττάριο pH στην αρχική του τιμή, με αποτέλεσμα να επανέρχονται και οι πρωτεΐνες στην αρχική τους δομή. Δηλαδή όσο πιο μεγάλος ο ρυθμός λειτουργίας των αντλιών, τόσο πιο γρήγορα εξαφανίζεται η λεύκανση.
- ✓ Το πάχος του επιθηλίου. Όσο πιο παχύ είναι το επιθήλιο τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα σκέδασης, άρα τόσο μεγαλύτερη είναι και η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός.

Όλα τα παραπάνω επηρεάζουν το φαινόμενο της λεύκανσης. Επίσης έχουν διαφορετικό βαθμό εμφάνισης ανάλογα με τον βαθμό νεοπλασίας. Είναι σημαντικό να μελετηθούν οι παραπάνω παράμετροι με μεγαλύτερη μεθοδικότητα, και να εξακριβωθεί ο ρόλος της καθεμίας στην κινητική και την ένταση της λεύκανσης έτσι ώστε να συσχετιστεί ακριβώς η κάθε χαρακτηριστική τιμή της καμπύλης με κάποια συγκεκριμένη λειτουργία. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα μελλοντικά μέσω της παρατήρησης της καμπύλης και της προσαρμογής της με συγκεκριμένη συνάρτηση την εξαγωγή συγκεκριμένων συμπερασμάτων ως προς τον βαθμό νεοπλασίας.

Τα παραπάνω χρίζουν εντατικότερης μελέτης, έτσι ώστε κάποια στιγμή χρησιμοποιώντας το απλό σύστημα του πολυφασματικού αναλυτή και την μέθοδο του οξικού οξέος, να εξάγεται μία κινητική εικόνα του ιστού, μέσω της οποίας να εξάγονται κατευθείαν συμπεράσματα για την παθολογία του ιστού, χωρίς να ακολουθείται η επίπονη διαδικασία της λήψης βιοψίας. Έτσι η διάγνωση του καρκίνου θα γίνεται γρήγορα, αντικειμενικά, και πολύ πιο εύκολα.

## Βιβλιογραφία

- [1] Drezek R., Dunn. A., Richards-Kortum R., “Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements”, *Applied Optics*, Vol. 38, No. 16, pp. 3651-3661, 1999
- [2] Dunn A., “Light scattering from biological cells”, PhD Thesis, Austin (TX), University of Texas at Austin, 1997
- [3] Hamamoto D. T., Forkey M. W., Davis W. L., Kajander K.C., Simone D. A., “The role of pH and osmolarity in evoking the acetic acid-induced iping response in a model of nociception in frogs”, *Brain Research*, Vol. 862, pp. 217-229, 2000
- [4] Kozin S. V., Gerweck L. E., “Cytotoxicity of weak electrolytes after the adaptation of cells to low pH: role of the transmembrane pH gradient”, *British Journal of Cancer*, Vol. 77(10), pp. 1580-1585, 1998
- [5] Ronne M., “Chromosome preparation and high resolution banding techniques: a review”, *Journal of Dairy Science*, vol. 72, pp. 1363-1377, 1989
- [6] Sokolov K., Drezek R., Gossage K. and Richards-Kortum R., “Reflectance spectroscopy with polarized light: is it sensitive to cellular and nuclear morphology”, *Optics Express*, Vol. 5, No. 13, pp. 302-317, 1999
- [7] Stryer L., “Biochemistry”, Fourth Edition 1999, W.H. Freeman and Company
- [8] <http://class.fst.ohio-state.edu/FST605/lectures/Lect11.html>

## Κεφάλαιο 8 Συμπεράσματα

Στην συγκεκριμένη εργασία παρουσιάζεται μία μέθοδος κατά την οποία γίνεται εφικτή η *in vivo* διάγνωση των καρκινικών και προκαρκινικών σταδίων του τραχήλου της μήτρας. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την χαρτογράφηση του ιστού και με βάση κάποια ποιοτικά χαρακτηριστικά που εξάγονται από την μελέτη της κινητικής της αλληλεπίδρασης του οξικού οξέος με τον ιστό, επιτρέπεται η αντικειμενική επιλογή των σημείων του ιστού από τα οποία θα ληφθεί δείγμα προς βιοψία.

Κατά την συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται η χρήση ενός πολυφασματικού απεικονιστικού αναλυτή, μέσω του οποίου γίνεται η χαρτογράφηση του ιστού και εξάγονται οι καμπύλες κινητικής της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός οι οποίες προσαρμόζονται με μία συνάρτηση τριπλού εκθετικού, οι παράμετροι της οποίας χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό κάποιων χαρακτηριστικών τιμών, οι οποίες είναι χρήσιμες για την αντικειμενική διεξαγωγή συμπερασμάτων ως προς την παθολογία του ιστού. Η συγκεκριμένη συνάρτηση εξάχθηκε από ένα μοντέλο τμηματικής ανάλυσης, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την σχηματική προσομοίωση του ιστού και για την περιγραφή συγκεκριμένων λειτουργιών του.

Το τμηματικό μοντέλο αποτελείται από τρία τμήματα, τον εξωκυττάριο χώρο, τον εσωκυττάριο και το αγγειακό πλέγμα. Όταν εισέρχεται το οξικό οξύ στο επιθήλιο, προκαλείται ξαφνική μείωση του εξωκυττάριου pH, και αδιάστατα μόρια οξικού οξέος εισέρχονται στον εσωκυττάριο χώρο, προκαλώντας και εκεί μείωση του pH. Η μεγάλη αύξηση των ιόντων υδρογόνου στον εσωκυττάριο χώρο, προκαλεί σημαντική αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες του πυρήνα. Αμέσως μετά την αλλαγή στην ισορροπία του, το κύτταρο αυξάνει τον ρυθμό λειτουργίας των αντλιών ιόντων οι οποίες επαναφέρουν το εσωκυττάριο pH στην αρχική του τιμή. Από τον εξωκυττάριο χώρο τα ιόντα και τα μόρια του οξικού οξέος απομακρύνονται μέσω του αίματος, δηλαδή του αγγειακού πλέγματος.

Με βάση, λοιπόν, τα παραπάνω σε συνδυασμό με τις αλλαγές που συμβαίνουν σε κυτταρικό επίπεδο κατά την εξέλιξη της νεοπλασίας, αλλά και τις πολύ σημαντικές πειραματικές παρατηρήσεις δόθηκε μία πρώτη εξήγηση για το φαινόμενο της παροδικής λεύκανσης σε ιστούς με νεοπλασία, καθώς και για τους πιθανούς παράγοντες που επιδρούν στην ένταση και στην διάρκεια της λεύκανσης.

Είναι σημαντικό να μελετηθούν οι παράμετροι που προκαλούν την λεύκανση με μεγαλύτερη μεθοδικότητα, και να εξακριβωθεί ο ακριβής ρόλος της καθεμίας στην

κινητική και την ένταση της λεύκανσης έτσι ώστε να συσχετιστεί η κάθε χαρακτηριστική τιμή της καμπύλης με κάποια συγκεκριμένη λειτουργία. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα μελλοντικά μέσω της παρατήρησης της καμπύλης και της προσαρμογής της με συγκεκριμένη συνάρτηση την εξαγωγή αντικειμενικών συμπερασμάτων ως προς τον βαθμό νεοπλασίας.

Τα παραπάνω, λοιπόν, χρίζουν εντατικότερης μελέτης, έτσι ώστε κάποια στιγμή στο μέλλον χρησιμοποιώντας το απλό σύστημα του πολυφασματικού αναλυτή και την μέθοδο του οξικού οξέος, να εξάγεται μία κινητική εικόνα του ιστού, μέσω της οποίας οι κλινικοί γιατροί να καταλήγουν κατευθείαν σε συμπεράσματα που αφορούν την παθολογία του ιστού, χωρίς να ακολουθείται η επίπονη διαδικασία της λήψης βιοψίας. Έτσι η διάγνωση του καρκίνου θα γίνεται γρήγορα, αντικειμενικά, και πολύ πιο εύκολα.