

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθύντρια: Καθηγήτρια Μαρία Παπαχατζή-Καλμαντή

Η ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ
(FRACTAL DIMENSION) ΚΑΙ Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΙΚΩΝ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ

Διδακτορική διατριβή
Νικολάου Κατζηλάκη
Παιδιάτρου

Επιβλέπουσα: Μαρία Παπαχατζή-Καλμαντή
Καθηγήτρια Παιδιατρικής

Ηράκλειο Κρήτης
2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθύντρια: Καθηγήτρια Μαρία Παπαχατζή-Καλμαντή

Η ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΟΡΦΟΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ
(FRACTAL DIMENSION) ΚΑΙ Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΙΚΩΝ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΑ ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ
ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ

Διδακτορική διατριβή
Νικολάου Κατζηλάκη
Παιδιάτρου

Επταμελής εξεταστική επιτροπή:

- Μ. Καλμαντή** Καθηγήτρια Παιδιατρικής
Γ. Δελίδης Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
Ε. Δημητρίου Επίκουρη Καθηγήτρια Εργ Παιδ Αιματολογίας/Ογκολογίας
Γ. Γεωργούλιας Καθηγητής Παθολογίας/Ογκολογίας
Δ. Μαυρουδής Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας/Ογκολογίας
Ε. Σταθόπουλος Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
Ε. Στειακάκη Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδ Αιματολογίας/Ογκολογίας

Στην οικογένειά μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	20
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	22
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
1. Μορφοκλασματική διάσταση (Fractal dimension)	26
1.1 Μορφοκλασματική διάσταση και εφαρμογές στην Ιατρική	32
1.2 Μορφοκλασματική διάσταση και εφαρμογή στην Ογκολογία	36
1.3 Μορφοκλασματική διάσταση και κυτταρικές μεμβράνες	39
1.4 Μορφοκλασματική διάσταση και αιμοποιητικά και λευχαιμικά κύτταρα	40
2. Φασματική απεικόνιση	42
2.1 Φασματική απορρόφηση	42
2.2 Συστήματα φασματοσκοπίας	44
2.3 Εφαρμογές της φασματικής απεικόνισης στην Ιατρική	46
2.3.1 Φθορίζων υβριδισμός in situ- Spectral karyotyping	48
2.3.2 Μελέτη και ανάλυση της κινητικής των κυτταρικών λειτουργιών	49
2.3.3 Φασματικά χαρακτηριστικά κυτταρικών πληθυσμών	51
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	53
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ	56
ΥΛΙΚΟ	56

ΜΕΘΟΔΟΙ	58
1. Μέτρηση μορφοκλασματικής διάστασης	58
2. Φασματικό μικροσκόπιο	61
2.1 Ποσοτική εκτίμηση φασματικών διαφορών	63
2.2 Μελέτη επιχρισμάτων μυελού των οστών μετά από χρώση	64
3. Στατιστική ανάλυση	67
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
1. Μορφοκλασματική διάσταση φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών	68
2. Φασματική ανάλυση φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων	69
2.1 Φασματική ανάλυση κυττάρων μετά από χρώση	69
2.2 Διάκριση φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών με τη φασματική ανάλυση	74
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	89
SUMMARY	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ	ΚΑΤΖΗΛΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΤΟΥ ΠΑΥΛΟΥ
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	31/1/1971
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΑΔΕΙΑ ΑΣΚΗΣΕΩΣ	
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ	Αριθ. Πρωτ.13755, 1/8/1995
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ (Λήψη ειδικότητας: Αριθ. Πρωτ. 15685 30/9/2002)
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ	ΑΓΓΛΙΚΑ

Εκπαίδευση-Πrouπηρεσία

- 1995:** Πτυχίο Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ηρακλείου Κρήτης με βαθμό επίδοσης «Λ. Καλώς» 7.69 (επτά και εξήντα εννέα).
Υποτροφία επίδοσης από το Ι.Κ.Υ. τα ακαδημαϊκά έτη 1990-1991 και 1993-1994.
- 1995-1996:** Εκπλήρωση υπηρεσίας υπαίθρου στο Π.Ι. Κριτσάς Νομού Λασιθίου.
- 1996-1998:** Εκπλήρωση στρατιωτικής θητείας ως οπλίτης ιατρός.

1998-2002: Ειδικευόμενος ιατρός στην Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική ΠΑ.Γ.Ν. Η.

2002: Επιστημονικός συνεργάτης στην Παιδιατρική Κλινική Αιματολογίας/Ογκολογίας ΠΑ.Γ.Ν.Η από 26/9/2002 έως και 29/1/2003.

2003: Μετεκπαίδευση σε έμμισθη θέση του Εθνικού Συστήματος Υγείας της Μεγάλης Βρετανίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο “ ROYAL LONDON HOSPITAL” στο Τμήμα Παιδιατρικής Αιματολογίας- Ογκολογίας και με Μονάδα Μεταμοσχεύσεων Μυελού των Οστών ως ειδικευμένος ιατρός από 29/1/2003 έως και 29/1/2004.

Βασικός ερευνητής σε δύο εθνικά ερευνητικά πρωτόκολλα της Μεγάλης Βρετανίας κατά τη διάρκεια της παραμονής στο Τμήμα Παιδιατρικής Αιματολογίας/Ογκολογίας στο Royal London Hospital. Το ένα αφορά τη νόσο Hodgkin και τον λεμφοεπικρατούντα τύπο (Lymphocyte Predominant Hodgkin’s Disease) και το άλλο αφορά τα παιδιά με αμφοτερόπλευρο ρετινοβλάστωμα (Bilateral retinoblastoma).

Εκπαιδευτικό έργο

- Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Παιδιατρικής Κλινικής ΠΑ.Γ.Ν.Η. και στην παρουσίαση ενδιαφερόντων περιστατικών (ως ειδικευόμενος ιατρός)

- Συμμετοχή στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας/Ογκολογίας ΠΑ.Γ.Ν.Η. την περίοδο 2002-2003 (ως ειδικευμένος ιατρός)
- Στο εκπαιδευτικό πρόγραμμα της Πανεπιστημιακής Παιδιατρικής Κλινικής Αιματολογίας/Ογκολογίας στο Royal London Hospital (ως ειδικευμένος ιατρός)

Διαλέξεις

“Ανιχνεύσιμες χρωμοσωμικές διαταραχές και μοριακοί δείκτες με διαγνωστική και προγνωστική αξία σε κακοήθειες της παιδικής ηλικίας”
(15^η Επιστημονική Ημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Παιδιατρικής Αιματολογίας-Ογκολογίας, Ιανουάριος 2003, Νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία)

Πλήρεις δημοσιεύσεις σε ελληνικά επιστημονικά περιοδικά

- 1) Προβλήματα υγείας σε παιδιά από την Ευρώπη που παραθερίζουν στην Κρήτη. Ε. Γαλανάκης, Ε. Παρασκάκης, Σ. Μπικουβαράκης, Ν. Κατζηλάκης, Σ. Σμπυράκης. *Παιδιατρική Βορείου Ελλάδος*, 11 (1), 28-31, 1999.
- 2) Η θεραπευτική δράση της μεθυλπρεδνιζολόνης στο ανθεκτικό στην ενδοφλέβια γ-σφαιρίνη σύνδρομο Kawasaki. Ε. Μιχαηλίδου, Π.

- Πασπαλάκη, Ν. Κατζηλάκης, Ε. Μαντζουράνη, Σ. Σμπυράκης. *Δελτίο Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών*, 47 (2), 78-83, 2000.
- 3) Μεταβολικά νοσήματα σε παιδιά και νέους. Πρώτη πιλοτική μελέτη στην Κρήτη. Ε. Μιχαηλίδου, Χ. Λιονής, Μ. Σπηλιώτη, Π. Πασπαλάκη, Π. Νικητάκης, Ε. Παπαδοπούλου, Ν. Κατζηλάκης, Ε. Τσαπάκη, Η. Μανιαδάκη, Π. Βοργιά, Α. Κανιτσάκης, Ε. Κόκκορη, R.A. Wevers, Σ. Σμπυράκης, Α. Ευαγγελίου. *Παιδιατρική*, 66 (2), 133-139, 2003.
- 4) Ανιχνεύσιμες χρωμοσωμικές διαταραχές και μοριακοί δείκτες με διαγνωστική και προγνωστική αξία σε κακοήθειες της παιδικής ηλικίας. Ν Κατζηλάκης, Ε Στειακάκη, Μ Καλμαντή. *Ογκολογική Ενημέρωση Παιδιατρικής Αιματολογίας Ογκολογίας*, Τόμος 1, Τεύχος 1, σελ 8-9, 2003.
- 5) Νεφροβλάστωμα. Ν Κατζηλάκης, Ε Στειακάκη, Μ Καλμαντή. *Ογκολογική Ενημέρωση Παιδιατρικής Αιματολογίας Ογκολογίας*, Τόμος 1, Τεύχος 2, σελ 41-44, 2003.
- 6) Νευροβλάστωμα. Ν Κατζηλάκης, Ε Στειακάκη, Μ Καλμαντή. *Ογκολογική Ενημέρωση Παιδιατρικής Αιματολογίας Ογκολογίας*, Τόμος 1, Τεύχος 2, σελ 45-48, 2003.
- 7) Φυματίωση στην κύηση και στο νεογνό. Μανουρά Αντωνία, Κατζηλάκης Νικόλαος. *Παιδιατρική* 67, 19-25, 2004.

Πλήρεις δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

- 1) Spectral characteristics of Acute Lymphoblastic Leukemia in childhood. Katzilakis N, Stiakaki E, Papadakis A, Dimitriou H, Stathopoulos E, Balas K, Kalmanti M. *“Leukemia Research” (in press)*
- 2) Prevalence of FV Leiden among Cretan children with malignancy. Stiakaki E, Germanakis I, Sfyridaki C, Katzilakis N, Danilatou V, Kalmanti M. *“Paediatric Blood and Cancer” (accepted)*
- 3) Mutational Analysis of the cell cycle inhibitor KIP1/P27 in pediatric malignancies. Markaki EA, Arvanitis D, Stiakaki E, Dimitriou H, Katzilakis N, Spandidos D, Kalmanti M. *“Paediatric Blood and Cancer” (submitted)*

Ανακοινώσεις σε Ελληνικά Συνέδρια

- 1) Προβλήματα υγείας σε παιδιά - παραθεριστές στην Κρήτη. Μπικουβαράκης Σ, Κατζηλάκης Ν, Παρασκάκης Ε, Γαλανάκης Ε, Σμπυράκης
A) 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κοινωνικής Ιατρικής, 40, 1999.
B) 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 317, 2000.
- 2) Αποδοχή των νεότερων εμβολίων στην Κρήτη. Κατζηλάκης Ν, Μπικουβαράκης Σ, Παρασκάκης Ε, Γαλανάκης Ε, Σμπυράκης Σ. *37^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 001AA, 6, 1999.*

- 3) Σοβαρό βρογχικό άσθμα σε παιδιά: Ευρήματα στην αξονική τομογραφία πνευμόνων υψηλής ευκρίνειας (HRCT). Μιχαηλίδου Ε, Πασπαλάκη Π, Κουβίδη Ε, Κατζηλάκης Ν, Βολουδάκη Α, Μαντζουράνη Ε. 37^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 268ΑΑ, 139, 1999.
- 4) Μη οργανικής αιτιολογίας ανεπαρκής πρόσληψη βάρους (ΑΠΒ) στα παιδιά: θέση του παιδιού στην οικογένεια και ρόλος του παιδίατρου. Κατζηλάκης Ν, Μιχαηλίδου Ε, Πασπαλάκη Π, Κατάκη Α, Βοργιά Λ, Συμπυράκης Σ.
- Α) 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κοινωνικής Παιδιατρικής, 58, 2000.
- Β) 38^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 040, 24, 2000.
- Γ) 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 255, 2000.
- 5) Απεικονιστικός έλεγχος στα παιδιά με λοιμώξεις ουροποιητικού. Μπιτσώρη Μ, Κατζηλάκης Ν, Βασιλάκη Ε, Μπακαντάκη Α, Μαμουλάκης Δ, Συμπυράκης Σ. 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 319, 2000.
- 6) Ανίχνευση αντίστασης στην πρωτεΐνη APC Resistance σε παιδιά με οξεία λευχαιμία. Κατζηλάκης Ν, Στειακάκη Ε, Σφυριδάκη Α, Τσαπάκη Ε, Μαρκάκη Ε.Α, Καμπουράκης Α, Καλμαντή Μ.
- Α) 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 431, 2000.
- Β) 39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, ΑΑ061, 88, 2001.
- 7) Ο υπολογισμός της μορφοκλασματικής διάστασης (FD) στη διαφοροδιάγνωση αιματολογικών κακοηθειών. Κατζηλάκης Ν, Δημητρίου Ε, Παπαδάκης Α, Στειακάκη Ε, Δελίδης Γ, Καλμαντή Μ.
- Α) 10^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 432, 2000.

B) 11^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, 267, 263-264, 2000.

Γ) 10^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, 9, 115, 2001.

- 8)** Μεταβολικά νοσήματα σε παιδιά και νέους. Πρώτη πιλοτική μελέτη στην Κρήτη. Μιχαηλίδου Ε, Λιονής Χ, Ευαγγελίου Α, Σπηλιώτη Μ, Πασπαλάκη Π, Νικητάκης Π, Παπαδοπούλου Ε, Τσαπάκη Ε, Μανιαδάκη Η, Βοργιά Π, Κατζηλάκης Ν, Κανιτσάκης Α, Χαρωνίτη Ι, Κόκορη Ε, Wevers R.A, Σμπυράκης Σ. *39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, ΕΑ059, 34, 2001.*
- 9)** Ανεπαρκής εμβολιασμός σε παιδιά μεταναστών και αθιγγάνων. Κατζηλάκης Ν, Παρασκάκης Ε, Μπικουβαράκης Σ, Γαλανάκης Ε, Σμπυράκης Σ. *39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, ΕΑ066, 37, 2001.*
- 10)** Εμβολιαστική κάλυψη ατόμων με «ειδικά προβλήματα» στην Κρήτη. Μιχαηλίδου Ε, Πασπαλάκη Π, Τσαπάκη Ε, Κατζηλάκης Ν, Βοργιά Π, Μαντζουράνη Ε, Σμπυράκης Σ. *39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, ΕΑ100, 54, 2001.*
- 11)** Βακτηριδιακές επιλοιμώξεις αναπνευστικού σε βρέφη με βρογχιολίτιδα. Παπαδοπούλου Ε, Μιχαηλίδου Ε, Μαμουλάκης Δ, Πασπαλάκη Π, Γιαννούση Ε, Φυτρολάκη Ν, Μαθιουδάκη Π, Κατζηλάκης Ν, Τσαπάκη Ε, Μαντζουράνη Ε, Σμπυράκης Σ. *39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, ΑΑ012, 64, 2001.*
- 12)** Βρογχιολίτιδα από αναπνευστικό συγκυτιακό ιό: Επιδημιολογία και έκβαση. Αγγελάκου Β, Κατζηλάκης Ν, Μπιτσώρη Μ, Αγγελάκη Μαρία, Σμυρνάκη Π, Στεφανάκη Σ, Σχοινάκη Α, Σμπυράκης Σ. *39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, ΑΑ020, 68, 2001.*

- 13) Παιδιά παραθεριστές στην Κρήτη και νοσηρότητα κατά τις διακοπές τους τα έτη 1997-2000. Μπικουβαράκης Σ, Κατζηλάκης Ν, Παρασκάκης Ε, Γαλανάκης Ε, Σμπυράκης Σ. *39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο*, ΑΑ210, 163, 2001.
- 14) Σοβαρές ουλοστοματίτιδες στα παιδιά. Ανασκόπηση. Μιχαηλίδου Ε, Κατζηλάκης Ν, Πασπαλάκη Π, Τσαπάκη Ε, Μαντζουράνη Ε, Σμπυράκης Σ. *39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο*, ΑΑ083, 278, 2001.
- 15) Προγνωστικοί δείκτες για τη διάρκεια νοσηλείας βρεφών με βρογχιολίτιδα. Μιχαηλίδου Ε, Πασπαλάκη Π, Παπαδοπούλου Ε, Τσαπάκη Ε, Μαθιουδάκη Π, Γιαννούση Ε, Κατζηλάκης Ν, Φυτρολάκη Ν, Σμπυράκης Σ, Μαντζουράνη Ε. *39^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο*, RT085, 279, 2001.
- 16) Οξύ και χρόνια κοιλιακό άλγος στα παιδιά: Εμπειρία τριών ετών. Μανιαδάκη Η, Μιχαηλίδου Ε, Πασπαλάκη Π, Κατζηλάκης Ν, Άρμπιρος Ι, Χαρίσης Γ, Μαντζουράνη Ε. *24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Παίδων*, 1, 4, 2001.
- 17) Παθήσεις της παιδικής ηλικίας που υποδύονται οξεία κοιλία. Κατζηλάκης Ν, Βλαχάκης Ι, Γαλανάκης Ε, Χαρίσης Γ. *24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Παίδων*, 4, 7, 2001.
- 18) Εχينوκοκκίαση πνεύμονα στα παιδιά: Παρουσίαση περιπτώσεων. Κατζηλάκης Ν, Μιχαηλίδου Ε, Πασπαλάκη Π, Βλαχάκης Ι, Μανιαδάκη Η, Χαρίσης Γ, Μαντζουράνη Ε. *24^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χειρουργικής Παίδων*, 33, 40, 2001.

- 19) Αίτια χειρουργικών επεμβάσεων στη νεογνική ηλικία τα τελευταία δέκα χρόνια, στην Κρήτη. Μανουρά Α, Κορακάκη Ε, Χατζηδάκη Ε, Μπικουβαράκης Σ, Βάλαρη Β, Κατζηλάκης Ν, Γιωτάκη Ι, Άρμπιρος Ι, Γιαννακοπούλου Χ. *6^η Επιστημονική Συνάντηση Παιδιάτρων Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης*, 19P, 33, 2002.
- 20) Νεογνά μητέρων με οξεία τοξοπλάσμωση στην κύηση, την τελευταία πενταετία: Αναδρομική μελέτη. Κορακάκη Ε, Χατζηδάκη Ε, Μανουρά Α, Παπαγεωργίου Μ, Μητσάκη Μ, Βοργιά Π, Κατζηλάκης Ν, Γιαννακοπούλου Χ. *6^η Επιστημονική Συνάντηση Παιδιάτρων Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης*, 20P, 34, 2002.
- 21) Σύγκριση έκβασης νεογνών διδύμων κυήσεων αυτόματης και εξωσωματικής γονιμοποίησης. Χατζηδάκη Ε, Μανουρά Α, Κορακάκη Ε, Μπικουβαράκης Σ, Μητσάκη Μ, Γιωτάκη Ι, Τσαπάκη Ε, Κατζηλάκης Ν, Γιαννακοπούλου Χ. *6^η Επιστημονική Συνάντηση Παιδιάτρων Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης*, 21P, 35, 2002.
- 22) Μη χειρουργικές καταστάσεις στα παιδιά που υποδύονται οξεία κοιλία. Κατζηλάκης Ν, Βλαχάκης Ι, Μπικουβαράκης Σ, Γαλανάκης Ε, Σμυρράκης Σ, Χαρίσης Γ. *40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο*, ΑΑ244, 192, 2002.
- 23) Υποκαπνία και περικοιλιακή λευκομαλακία σε πρόωρα νεογνά. Κορακάκη Ε, Χατζηδάκη Ε, Μανουρά Α, Μπικουβαράκης Σ, Κατζηλάκης Ν, Γιωτάκη Ι, Μάρακα Σοφία, Γιαννακοπούλου Χ. *40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο*, ΑΑ358, 249, 2002.

- 24)** Αιμορραγικές κενώσεις την πρώτη ημέρα ζωής σε νεογνό σαν εκδήλωση αλλεργίας στο γάλα αγελάδας. Χατζηδάκη Ε, Μανουρά Α, Κορακάκη Ε, Παπαγεωργίου Μ, Βάλαρη Β, Κατζηλάκης Ν, Βοργιά Π, Γιαννακοπούλου Χ. *40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο*, ΑΑ385, 263, 2002.
- 25)** Αμφιβληστροειδοπάθεια της προωρότητας. Ποια νεογνά αφορά πραγματικά; Κορακάκη Ε, Χατζηδάκη Ε, Μανουρά Α, Βοργιά Π, Παπαγεωργίου Μ, Κατζηλάκης Ν, Ηλιάκη Όλγα, Γιαννακοπούλου Χ. *40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο*, ΑΑ394, 267, 2002.
- 26)** Η φασματική απεικόνιση στη μελέτη φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας της παιδικής ηλικίας. Κατζηλάκης Ν, Παπαδάκης Α, Στειακάκη Ε, Δημητρίου Ε, Μπάλας Κ, Δελίδης Γ, Καλμαντή Μ.
Α) *13^ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο*, 249, 292, 2002.
Β) *11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο*, 90, 2002.
- 27)** Αίτια νοσηλείας νεογνών από οικογένειες οικονομικών μεταναστών. Συγκριτική μελέτη. Μανουρά Α, Χατζηδάκη Ε, Κορακάκη Ε, Μπικουβαράκης Σ, Παπαγεωργίου Μ, Μανιαδάκη Η, Κατζηλάκης Ν, Αγγελάκη Μ, Γιαννακοπούλου Χ. *11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο*, 145, 2002.
- 28)** Γεννήσεις και ανάγκες νοσηλείας νεογνών από οικογένειες οικονομικών προσφύγων. Χατζηδάκη Ε, Κορακάκη Ε, Μανουρά Α, Μπικουβαράκης Σ, Παπαγεωργίου Μ, Μανιαδάκη Η, Κατζηλάκης Ν, Γιαννακοπούλου Χ. *11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο*, 146, 2002.

29) Οξεία λευχαιμία στα παιδιά. Παιδιατρική Κλινική Αιματολογίας/Ογκολογίας Παν/μίου Κρήτης 1991-2001. Μαρκάκη Ε.Α, Στειακάκη Ε, Δανηλάτου Β, Κατζηλάκης Ν, Δημητρίου Ε, Καμπουράκης Α, Βλαχινικολής Ι, Καλμαντή Μ. *11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο*, 88, 2002.

30) Interleukin-6 as indicative of early neonatal sepsis in preterm neonates. Hatzidaki E, Gourgiotis D, Korakaki E, Manoura A, Katzilakis N, Lambraki D, Bossios A, Giannakopoulou Ch. *12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, 8^ο Ελληνοτουρκικό Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής*, P24, 2003.

Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια

1) Infectious mononucleosis associated with peripheral facial palsy in a 3 year old boy. Mihailidou E, Paspalaki P, Fitrolaki D, Katzilakis N, Bitsori M, Sbyrakis S. *Mediterranean Child Neurology Meeting*, 35, 1999.

2) Health hazards in children from Europe during holidays in Crete. Paraskakis E, Galanakis E, Bikouvarakis S, Katzilakis N, Kokori H, Sbyrakis S. *Annual Congress of the European Society for Social Pediatrics ESSOP*, B19, 68, 1999.

3) Fractal Dimension (FD) in Acute Leukemia of childhood- Preliminary Results. Kalmanti M, Dimitriou H, Katzilakis N, Papadakis A, Stiakaki E,

Delides G. *37th Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology (ASCO)*, 1523, 382a, 2001.

4) Detection of Resistance to Activated Protein C (APC-R) in children with malignancy. Stiakaki E, Katzilakis N, Sfyridaki E, Tsapaki E, Markaki E.A, Kalmanti M. *6th Annual Meeting of the European Haematology Association (EHA)*, 631, 171, 2001.

5) Spectral imaging study of normal lymphocytes and lymphoblasts of Acute Lymphoblastic Leukemia in childhood. Katzilakis N, Papadakis A, Stiakaki E, Dimitriou H, Balas K, Delides G, Kalmanti M.

A) *15th Congress of the International Society of Diagnostic and Quantitative Pathology, 8th Congress of the European Society of Analytical and Cellular Pathology and 6th Congress of the European Telepathology Group*, 52, 46, 2002

B) *8th Annual Congress of the European Hematology Association*, 0395, 122, 2003

C) *35th SIOP (International Society of Paediatric Oncology) Congress, Cairo*, P001, 367, 2003

6) A single center experience with temozolomide in children with Low Grade Gliomas and advanced CNS tumors. Stiakaki E, Katzilakis N, Markaki EA, Mantadakis E, Kalmanti M.

A) *14th International Congress on Anticancer treatment*, 239, 2003

B) *35th SIOP (International Society of Paediatric Oncology) Congress*, PE002, 332, 2003

7) Mutational Analysis of the cell cycle inhibitor KIP1/P27 in pediatric malignancies. Markaki EA, Arvanitis D, Stiakaki E, Dimitriou H, Katzilakis N, Spandidos D, Kalmanti M.

A) *8th Annual Congress of the European Hematology Association*, 0079, 34, 2003

B) *35th SIOP (International Society of Paediatric Oncology) Congress*, PA012, 323, 2003.

8) Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin's disease in Children – Results of the United Kingdom Children's Cancer Study Group. Katzilakis N, Nicolin G, Coen P, Hall G, Wallace H, Shankar A. *36th SIOP 2004*

9) Bilateral retinoblastoma. A single centre experience. Katzilakis N, Shankar A, Kingston J, Hungerford J. *36th SIOP 2004*

Συμμετογή στην ομάδα εργασίας για την εκπόνηση της εργασίας Burden of Respiratory Syncytial Viral Infections on Paediatric Hospitals: A Two-Year Prospective Epidemiology Study. Constantopoulos A.G, Kafetzis D.A, Syrogiannopoulos G.A, Roilides E.J, Malaka-Zafiriou E.E, Sbyrakis S.S, Markopoulos M.L. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21:102-107, 2002.

(Acknowledgement)

Βραβεία

Β' Χωρέμειο έπαθλο στο 40^ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο (2002) με

θέμα: « **Η φασματική απεικόνιση στη μελέτη φυσιολογικών**

λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας

της παιδικής ηλικίας » Κατζηλάκης Ν, Παπαδάκης Α, Στειακάκη Ε,

Δημητρίου Ε, Μπάλας Κων/νος, Καλμαντή Μ.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να αναφερθώ στους ανθρώπους που με βοήθησαν πραγματικά και χωρίς αυτούς σίγουρα δε θα έφτανα στη στιγμή να την παρουσιάσω.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Μ. Καλμαντή για την παρακίνηση πραγματοποίησης διδακτορικής διατριβής αλλά και όλη την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διάρκεια της διατριβής. Επίσης στις ευκαιρίες και τα ερεθίσματα που μου έδωσε στο αντικείμενο της Παιδιατρικής Αιματολογίας/Ογκολογίας αλλά και στη δυνατότητα που μου έδωσε για μετεκπαίδευση σε εξειδικευμένο κέντρο Παιδιατρικής Αιματολογίας και Μεταμοσχεύσεων Μυελού των Οστών του εξωτερικού.

Τον Καθηγητή κ. Γ. Δελίδη που η βοήθεια και οι παρεμβάσεις του κατά τη διάρκεια της διατριβής ήταν καταλυτικές και οι γνώσεις του σε μαθηματικά μοντέλα και θέματα μορφομετρίας κατάφεραν να με βοηθήσουν να ξεπεράσω δυσκολίες κατά τη διάρκεια της εκπόνησης.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πολυτεχνείου Κρήτης κ. Κ. Μπάλα, υπεύθυνου κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής του Τμήματος Ηλεκτρονικής Δομής και Laser στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Έρευνας (Ι.Τ.Ε.), για όλη τη βοήθεια και την προσφορά τεχνογνωσίας των συστημάτων υψηλής τεχνολογίας που αναπτύχθηκαν στο τμήμα του και χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων και μετρήσεων.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ευτυχία Στειακάκη που η συμβολή της στην ολοκλήρωση της διατριβής με τις καίριες και πολύ σημαντικές παρατηρήσεις της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής ήταν ανεκτίμητη. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Ε. Δημητρίου όπως και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ε. Σταθόπουλο για τις πολύτιμες υποδείξεις τους και την ανά πάσα στιγμή πρόθυμη βοήθεια τους σε κάθε θέμα που προέκυπτε.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή κ. Β. Γεωργούλια και στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δ. Μαυρουδή για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και η ευγνωμοσύνη στην οικογένειά μου και στους ανθρώπους που είναι δίπλα μου είναι ότι λιγότερο μπορώ να εκφράσω και χωρίς τη συμπαράστασή τους δε θα μπορούσα να επιτύχω τίποτα.

Τέλος θα ήθελα να απευθύνω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στα παιδιά που συναναστρέφομαι καθημερινά και στα επανειλημμένα μαθήματα ψυχικής δύναμης που προσφέρουν σε εμάς τους γιατρούς αλλά και στους γονείς τους. Αποτελούν ανεξάντλητη πηγή δύναμης για επίταση της προσπάθειας, της προσφοράς και της αποτελεσματικότερης αντιμετώπισης των κακοηθειών στα παιδιά.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οξεία λευχαιμία αποτελεί το 35% των κακοηθειών της παιδικής ηλικίας. Χαρακτηρίζεται από την επικράτηση άωρων αιμοποιητικών κυττάρων ή πρόδρομων μορφών της λεμφικής σειράς και ταξινομείται μορφολογικά ανάλογα με την προέλευση του παθολογικού κλώνου αντίστοιχα σε μυελογενή και λεμφοβλαστική .

Στη παιδική ηλικία περίπου το 80% της οξείας λευχαιμίας είναι λεμφοβλαστική και το 15% μυελογενής ενώ ένα μικρό ποσοστό περιπτώσεων ταξινομείται ως αδιαφοροποίητη.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της οξείας λευχαιμίας είναι αυτά των βλαστικών κυττάρων, δηλαδή σχετικά αδιαφοροποίητο κύτταρο με διάχυτη κατανομή πυρηνικής χρωματίνης, ένα ή περισσότερα πυρήνια και βασεόφιλο κυτταρόπλασμα. Για την ταξινόμηση και τυποποίηση της οξείας λευχαιμίας χρησιμοποιούνται εκτός από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, κυτταροχημικά, κυτταρογενετικά, μοριακά δεδομένα και ανοσοφαινοτυπική ανάλυση.

Μορφολογικά κριτήρια χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό των λεμφοβλαστών από τους μυελοβλάστες ενώ και η λεμφοβλαστική και η μυελογενής λευχαιμία ταξινομούνται περαιτέρω σε υποομάδες σύμφωνα με τη French-American-British (FAB) ταξινόμηση. Ειδικότερα η λεμφοβλαστική λευχαιμία διακρίνεται μορφολογικά σε 3 υποομάδες (L_1 , L_2 , L_3) από τις οποίες η L_1 είναι η συχνότερη σε ποσοστό 85% των περιπτώσεων της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας στα παιδιά.

Μορφολογικά οι L_1 λεμφοβλάστες είναι μικρά κύτταρα σε ομοιογενή χρωματίνη του πυρήνα χωρίς ορατά ή μόλις υποσημαινόμενα πυρήνια, ομοιόμορφο σχήμα, ελάχιστο κυτταρόπλασμα ήπια ή μέτρια βασεόφιλο. Η προσπάθεια να συμπεριληφθεί η μορφολογική ταξινόμηση των λεμφοβλαστών στη θεραπευτική στρατηγική δεν έχει αποδώσει λόγω της περιορισμένης ετερογένειας των κυττάρων στο απλό μικροσκόπιο, των υποκειμενικών διαφορών μεταξύ των μορφολογικών υποτύπων και τη φτωχή συσχέτιση των υποτύπων με την κλινική έκβαση. Για το λόγο αυτό η σύγχρονη διαγνωστική της ΟΛΛ βασίζεται κυρίως στον ανοσοφαινότυπο και το γονότυπο των κυττάρων [1, 2].

Η ακρίβεια και η χρησιμότητα του ανοσοφαινότυπου στη διάγνωση της ΟΛΛ έχει παρουσιάσει σημαντική πρόοδο με τη διάθεση μεγάλου αριθμού μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των λευκοκυτταρικών αντιγόνων, την ανάπτυξη νέων αντιδραστηρίων φθορισμού για τη σήμανση των κυττάρων και την εξέλιξη της κυτταρομετρίας ροής. Αν και είναι διαθέσιμα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι μεγάλου αριθμού αντιγόνων επιφανείας των ανθρωπίνων λευκοκυττάρων, λίγα μόνο από αυτά έχουν ειδικότητα για συγκεκριμένες σειρές, γεγονός που δημιουργεί αναγκαιότητα επιλογής σειράς αντισωμάτων για τη διάκριση των ανοσολογικών υποομάδων και τον καθορισμό της διάγνωσης [3].

Παρά το ότι η ανοσοφαινοτυπική μελέτη των λευχαιμικών κυττάρων αποτελεί σημαντική παράμετρο στη διάγνωση και ταξινόμηση της ΟΛΛ σε υποομάδες, μορφολογικά με το κοινό μικροσκόπιο, η διάκριση φυσιολογικών

λεμφοκυττάρων από λεμφοβλάστες και ιδιαίτερα L1 σε πολλές περιπτώσεις είναι δυσχερής. Ιδιαίτερα στις περιπτώσεις της παρακολούθησης των ασθενών όπου και η κύρια μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι το κοινό μικροσκόπιο και ο βαθμός διήθησης μπορεί να είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με την πρωτοδιάγνωση, η διάκριση λεμφοβλαστών από φυσιολογικά λεμφοκύτταρα δεν είναι πάντα εύκολη.

Με σκοπό τη διάκριση των κυττάρων και την εκτίμηση των χαρακτηριστικών τους, χρησιμοποιήθηκε ο υπολογισμός της μορφοκλασματικής διάστασης (Fractal Dimension FD) ως εναλλακτική μέθοδος ή και επιπρόσθετη στις ήδη υπάρχουσες μεθόδους συγκρίνοντας το ακανόνιστο της κυτταρικής μεμβράνης των φυσιολογικών και λευχαιμικών κυττάρων. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι φασματικής ανάλυσης με σύγχρονα συστήματα ανάλυσης εικόνας, σε επιχρίσματα μετά από χρώση και καθορίστηκαν τα φασματικά χαρακτηριστικά και τα μήκη κύματος όπου μπορεί να γίνει η διάκριση των δύο διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών η οποία δεν είναι πάντα ορατή με το κοινό μικροσκόπιο.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΜΟΡΦΟΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΣΤΑΣΗ (FRACTAL DIMENSION)

Η Μορφοκλασματική Γεωμετρία (fractal geometry) αποτελεί ένα κλάδο των μαθηματικών η ανάπτυξη του οποίου έγινε δυνατή χάρη στην συνεχώς αναπτυσσόμενη επιστήμη των υπολογιστών. Στόχος της ήταν η ακριβέστερη περιγραφή των περισσότερων φυσικών αντικειμένων που μας περιβάλλουν με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη προσέγγιση δεδομένο το οποίο η κλασσική Ευκλείδειος Γεωμετρία αδυνατεί να προσφέρει [4,5,6].

Η δυνατότητα που υπάρχει σήμερα χάρη στους Η/Υ, εκτέλεσης σε ελάχιστο χρόνο ενός τεράστιου αριθμού μαθηματικών υπολογισμών, κατέστησε εφικτό τον καθορισμό μιας νέας σταθεράς, της Μορφοκλασματικής Διάστασης (Fractal Dimension FD).

Η Γεωμετρία των Fractals προέκυψε από μια προσεκτική μελέτη της φύσης. Πολλά σχήματα στη φύση είναι τόσο ακανόνιστα, η μορφή τους είναι τόσο ανώμαλη, που, αν τα συγκρίνουμε με εκείνα που μελετά η Ευκλείδειος Γεωμετρία, θα παρατηρήσουμε ότι η φύση παρουσιάζει μια εικόνα πολύ πιο πολύπλοκη και διαφορετικής υφής. Για πληρέστερη κατανόηση αναφέρεται ότι ένα σύννεφο δεν είναι σφαίρα, ένα βουνό δεν είναι κώνος, οι θαλάσσιες ακτές μιας χώρας δεν είναι τόξα κύκλων, ούτε και η τροχιά μιας αστραπής είναι ευθεία γραμμή.

Η ύπαρξη των πολύπλοκων αυτών σχημάτων στη φύση, τα οποία η Ευκλείδειος Γεωμετρία παραλείπει να εξετάσει ως στερούμενα συγκεκριμένης μορφής, υπήρξε η αιτία που οδήγησε στη διερεύνηση της μορφολογίας του 'άμορφου'. Έτσι η Γεωμετρία των fractals και η χρήση πρώτα από τον Benoit

Mandelbrot, ως μονάδας μέτρησης της FD, ασχολείται με τη μελέτη μιας μεγάλης κατηγορίας ανωμαλών, ακανόνιστων αντικειμένων. Η λέξη fractal προέρχεται από το λατινικό επίθετο fractus που σημαίνει ακανόνιστο, σπασμένο κομμάτι, θρύμμα [7].

Σε κάθε σημείο του ευκλείδειου χώρου (του φυσικού χώρου που μας περιβάλλει) αντιστοιχεί ένας αριθμός ο οποίος καλείται “τοπολογική διάσταση” του συνόλου. Έτσι, για ένα σημείο η τοπολογική διάσταση είναι μηδέν (0), για μια ευθεία ένα (1), για ένα κανονικό πολύγωνο (επιφάνεια) δύο (2), για ένα κανονικό στερεό τρία (3). Εκτός από την τοπολογική διάσταση σε κάθε δομή αντιστοιχεί και η μορφοκλασματική διάσταση των οποίων οι τιμές για το σημείο, την ευθεία και ένα κανονικό στερεό (π.χ. σφαίρα) είναι ίδιες. Στις ανώμαλες και ακανόνιστες γραμμές ή επιφάνειες όμως η FD είναι διάφορη του ακεραίου αριθμού. Η διάσταση αυτή είναι ένας κλασματικός αριθμός ο οποίος ευρίσκεται μεταξύ δύο ακεραίων. Μια δομή ονομάζεται fractal όταν έχει τιμή διαφορετική από την τοπολογική της διάσταση. Έτσι π.χ. μια γραμμή, η οποία διαφέρει τόσο από την ευθεία όσο και από τόξο κύκλου, έχει διάσταση περιλαμβανόμενη μεταξύ του ενός και του δύο (1 έως 2) και τόσο πλησιάζει το δύο, όσο πιο πολύ διαφέρει της ευθείας. Σε ένα δισδιάστατο σύστημα μέτρησης η FD θα είναι μεταξύ ένα και δύο ενώ σε ένα τρισδιάστατο μεταξύ δύο και τρία.

Η FD, μετά την εισαγωγή της έννοιας από τον Mandelbrot, έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να χαρακτηρίσει κάθε αντικείμενο που υπάρχει στη φύση. Έτσι φαίνεται ότι οι ευκλείδειες ακέραιες διαστάσεις, αποτελούν

σήμερα μάλλον την εξαίρεση παρά τον κανόνα, σε όλες τις φυσικές κλίμακες. Έννοιες και φαινόμενα τα οποία δεν μπορούσαν να προβλεφθούν και διέπονταν από τη θεωρία του χάους μπορούν να ερμηνευτούν και να αποδοθούν με μαθηματική εξήγηση στηριζόμενη στον υπολογισμό των fractals. Χαρακτηριστικός άλλωστε είναι ο τίτλος του συγγράμματος του B.B. Manderbrot «Η μορφοκλασματική γεωμετρία της φύσεως» (The fractal geometry of nature), στο οποίο η διάσταση αυτή αναγνωρίζεται σε μια πλειάδα φυσικών καταστάσεων και μορφών, από τη μορφή των ακτών μέχρι την καταγραφή της θερμοκρασίας μιας περιοχής [7].

Η εξίσωση Richardson-Mandelbrot αποτελεί μαθηματική βάση για την κατανόηση των μορφοκλασματικών γεωμετρικών δομών, τη μέτρηση και την ερμηνεία τους

$$L(\epsilon) = N(\epsilon)\epsilon \quad (1)$$

όπου $L(\epsilon)$ είναι το μήκος (περίμετρος) του ακανόνιστου σχήματος που μετρούμε, ϵ η μονάδα μέτρησης μήκους που χρησιμοποιείται για να μετρήσουμε την περίμετρο, $N(\epsilon)$ ο αριθμός των μονάδων μέτρησης που είναι απαραίτητο να καλύψουν την περίμετρο $L(\epsilon)$ όπου $N(\epsilon) = 1/\epsilon^D$ (D έχει ονομαστεί σταθερά του Hausdorff η οποία όταν είναι διάφορη και μεγαλύτερη από την τοπολογική διάσταση όπως περιγράφηκε ήδη ορίζεται ως μορφοκλασματική διάσταση, Fractal Dimension, FD). Επομένως η εξίσωση (1) γίνεται

$$L(\epsilon) = \epsilon^{1-D} \quad (2)$$

Μετατρέποντας την παραπάνω εξίσωση σε λογαριθμική ισχύει

$$D = \log N(\epsilon) / \log(1/\epsilon) \quad (3)$$

Η FD είναι πάντα θετικός αριθμός, ορίζεται από την τιμή της κλίσης της ευθείας της λογαριθμικής εξίσωσης και δεν είναι κατ'ανάγκη ακέραιος αριθμός.

Κατά τον Mandelbrot η Γεωμετρία των Fractals παρέχει λύσεις σε ένα σύνολο προβλημάτων[8]. Μια χαρακτηριστική ιδιότητα των Fractals είναι η αυτό-ομοιότητα (self-similarity) είναι ότι η δομή που παρουσιάζουν όταν η παρατήρηση γίνεται υπό μικρή κλίμακα είναι η ίδια με εκείνη που παρουσιάζουν όταν η παρατήρηση γίνεται υπό μεγαλύτερη κλίμακα ή τα αντικείμενα παρουσιάζουν το φαινόμενο μικρά τμήματά τους να είναι αντίγραφα ή να μοιάζουν με το όλο. Η έννοια της αυτο-ομοιότητας περιλαμβάνει επομένως δύο κυρίως είδη. Το πρώτο είδος είναι η γεωμετρική αυτο-ομοιότητα όπου το κάθε αντικείμενο είναι ακριβές αντίγραφο του αρχικού και η μορφολογία αυτή αποκαλύπτεται σε διαδοχικές μεγενθύνσεις της αρχικής μορφής. Ένα παράδειγμα φυσικού fractal που παρουσιάζει γεωμετρική αυτό-ομοιότητα είναι το φύλλο μιας φτέρης. Το δεύτερο είδος είναι η καλούμενη στατιστική αυτό-ομοιότητα που παρουσιάζουν για παράδειγμα τα σύννεφα, η ακτογραμμή ή τα βιολογικά αντικείμενα και που σε διαδοχικές μεγεθύνσεις του αρχικού αντικειμένου δεν αποκαλύπτουν εικόνες οπτικά όμοιες με την αρχική αλλά σχήματα με διαρκώς μεγαλύτερες λεπτομέρειες που διαθέτουν τις ίδιες στατιστικές ιδιότητες με το αρχικό σχήμα σύμφωνα με τις εξισώσεις που αναφέρθηκαν [9,10]. Σε περίπτωση που δε διαθέτουν τις ίδιες στατιστικές ιδιότητες με το αρχικό σχήμα είναι απαραίτητη η μέγιστη

μεγέθυνση πάνω από την οποία η ανάλυση δεν αναδεικνύει περαιτέρω λεπτομέρειες για τον καθορισμό της ακανόνιστης δομής.

Δύο τρόποι έχουν διατυπωθεί για να προσεγγιστεί και να εκτιμηθεί η fractal διάσταση: η μέθοδος της καταμέτρησης τετραγώνων (box counting method) που είναι και η ευρέως χρησιμοποιούμενη και η μέθοδος διαδοχικών βημάτων (structured walk technique).

Με τη μέθοδο της καταμέτρησης τετραγώνων για να μελετήσουμε μια fractal δομή καλύπτουμε το αντικείμενο με πλέγμα τετραγώνων σε επαφή μεταξύ τους αριθμού N με πλευρά μεγέθους ϵ σύμφωνα με τις εξισώσεις 1-3. Η FD ορίζεται από την κλίση της γραφικής παράστασης που προκύπτει από τον $\log(N)$ του αριθμού τετραγώνων προς το $\log(1/\epsilon)$ για τετράγωνα μελέτης διαφόρου μήκους πλευράς ϵ (εξίσωση 3).

Η πρώτη εφαρμογή της FD έγινε από τον Mandelbrot και αφορούσε τη μέτρηση και απόδοση μιας τιμής σε μια ακτή ανεξάρτητα από τη χρησιμοποιούμενη κλίμακα [11]. Ένα τμήμα της παραλιακής γραμμής κάποιας χώρας είναι ένα fractal. Πρόκειται για μια ανώμαλη καμπύλη, το μήκος της οποίας είναι, προφανώς, μεγαλύτερο από το ευθύγραμμο τμήμα που ενώνει τα δύο άκρα της. Αν επιχειρηθεί να υπολογιστεί το “ακριβές” μήκος της θεωρούμενης ακτής θα διαπιστωθεί ότι αυτό είναι πάρα πολύ μεγάλο και τόσο ακαθόριστο ώστε είναι προτιμότερο να θεωρηθεί άπειρο. Πρόκειται δηλαδή για μια μη ευθύγραμμη καμπύλη. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κλασσική έννοια του μήκους είναι ακατάλληλη για ποσοτική σύγκριση

τέτοιων μεγεθών και είναι η έννοια της FD που μπορεί να αποδώσει αυτές τις μετρήσεις.

Το πρώτο πρότυπο fractal στην Ιατρική οφείλεται επίσης στον Mandelbrot και εφαρμόστηκε στον πνεύμονα [7]. Καθώς διακλαδίζεται το βρογχικό σύστημα, το μήκος του κάθε κλάδου ελαττώνεται. Μια θεωρία, που κάνει χρήση των κλασικών αναλογιών και που υποθέτει ότι το βρογχικό δέντρο είναι ομοιογενές και ότι ο όγκος του αέρα υποδιπλασιάζεται όταν μεταβαίνουμε από μια διακλάδωση στην επόμενη, προβλέπει ότι οι διάμετροι των κλάδων θα ελαττώνονται ακολουθώντας κάποια εκθετική συνάρτηση. Η παρατήρηση και το πείραμα πιστοποιούν ότι η πρόβλεψη επαληθεύεται μέχρι και τη δέκατη διακλάδωση, μετά την οποία τα πειραματικά δεδομένα αποκλίνουν συστηματικά από εκείνα που προβλέπει η εκθετική συνάρτηση. Η απόκλιση οφείλεται στο γεγονός ότι η περιγραφή του βρογχικού δέντρου μέσω των κλασικών αναλογιών δεν λαμβάνει υπόψη τις μεταβολές που παρουσιάζονται στον κάθε κλάδο και το ακανόνιστο του σχήματός του. Η θεώρηση του πνεύμονα ως fractal και η ανάδειξη και μέτρηση των λεπτομερειών του βρογχικού δέντρου μέσω της FD παρέχει τη δυνατότητα μέτρησης των μεταβολών και της μορφής του πνεύμονα στο fractal μοντέλο.

Το πρώτο αυτό πρότυπο fractal που περιγράφηκε από τον Mandelbrot και αφορούσε τον πνεύμονα είναι ένα υποσύνολο των μιγαδικών αριθμών, δηλαδή ένα υποσύνολο του επιπέδου, το οποίο προκύπτει όταν μια αλγεβρική πράξη εκτελείται επανειλημμένως με μιγαδικούς αριθμούς. Με τη βοήθεια ενός προγράμματος υπολογιστή μεταμορφώνεται σε ένα είδος μικροσκοπίου

με το οποίο μπορούμε να δούμε τα όρια του συνόλου του Mandelbrot, που είναι ένα fractal.

1.1 Μορφοκλασματική Διάσταση και εφαρμογές στην Ιατρική

Η πιο απλή εφαρμογή της FD σε εφαρμογές της ιατρικής είναι η ανάλυση της μορφολογίας μιας ανατομικής δομής όπως είναι αυτή των αγγειακών δικτύων [12-14]. Η ανάλυση του ακανόνιστου σχήματος με την FD μπορεί να εφαρμοστεί σε περιπτώσεις όπως ο διαχωρισμός μεταξύ ενός υγιούς ιστού και ενός όγκου, ή ακόμα τα όρια μιας δερματικής βλάβης [15-18]. Η μορφοκλασματική διάσταση μπορεί επίσης να εφαρμοστεί σε φαινόμενα φυσιολογίας οργάνων όπως η ποικιλομορφία του καρδιακού ρυθμού ή των ηλεκτροεγκεφαλογραφικών κυμάτων του εγκεφάλου.

Στο καρδιαγγειακό σύστημα η ανατομική δομή των στεφανιαίων αγγείων δίνει μια fractal μέτρηση και επομένως υπάρχει η δυνατότητα να μελετηθούν οι μορφολογικές αλλαγές ειδικότερα στους μικρότερους κλάδους. Αυτός ο τύπος της μορφοκλασματικής ανατομίας έχει επίσης βρεθεί σε μελέτη της ετερογένειας της διάχυσης της ροής στο μυοκάρδιο, στον πνεύμονα ή στο φλοιό του νεφρού[19-20].

Η χρήση της FD στα χαρακτηριστικά του καρδιακού ρυθμού σε σχέση με το QRS διάστημα ή το RR διάστημα μπορούν να δώσουν πληροφορίες και σημάδι καρδιακής βλάβης [21-26].

Στο βρογχοπνευμονικό σύστημα εκτός από το μοντέλο Mandelbrot και τη δυνατότητα μονάδας μέτρησης στην ετερογένεια των βρογχικών

διαμέτρων ακόμα και των πιο απομακρυσμένων, το αρτηριοφλεβικό δίκτυο δίνει και αυτό μια τιμή FD. Στην ακτινογραφία θώρακα η κατανομή των πνευμονικών αγγείων με τη μέτρηση της FD δίνει πληροφορίες για την πνευμονική υπέρταση[27]. Ο καθορισμός της FD μας επιτρέπει σε αυτές τις περιπτώσεις να εκτιμηθεί ποσοτικά η παθολογική τροποποίηση της κατανομής των πνευμονικών αγγείων. Η σοβαρότητα επίσης του εμφυσήματος μπορεί να μελετηθεί με μέτρηση της FD [28-29].

Η μέτρηση της FD έχει μελετηθεί στις νευροεπιστήμες σε παθολογικές και φυσιολογικές καταστάσεις με τη βοήθεια συστημάτων υψηλής ευκρίνειας απεικόνισης όπως είναι η μαγνητική τομογραφία [30-34]. Σε αυτές τις μελέτες έχει γίνει μέτρηση FD σε νευρώνες και άλλα κύτταρα του νευρικού ιστού καθώς και σε περιφερικά νεύρα κάτω από φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Ο αριθμός και το μήκος των δενδριτών των κινητικών νευρώνων της παρεγκεφαλίδας (κύτταρα Purkinje) έχουν δείξει ότι σχετίζονται με τον αριθμό των συνάψεων με τους άξονες των άλλων κυττάρων [35,36]. Η FD στους δενδρίτες σε ανθρώπινη εμβρυονική παρεγκεφαλίδα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης φτάνει στο 97% της ενήλικου τιμής στη γέννηση. Αυτό συνηγορεί στο συμπέρασμα ότι το φυσικό μέγεθος και η ανάπτυξη των δενδριτών ολοκληρώνονται μετά τη γέννηση παρά η πολυπλοκότητα των κυττάρων των δενδριτών. Σε μια συγκριτική μελέτη των μη νευρονικών εγκεφαλικών κυττάρων, αποδείχτηκε ότι οι ολιγοδενδρίτες ωριμάζουν γρηγορότερα από τα αστροκύτταρα και παρουσιάζουν παρόμοιες μεγάλες τιμές FD. Σε αντίθεση οι οπτικοί ολιγοδενδρίτες ωριμάζουν αλλά και παρουσιάζουν

μεγαλύτερη πολυπλοκότητα, επομένως και FD από τα αστροκύτταρα του εγκεφάλου[37-39].

Εκτός από τα ανωτέρω η FD έχει επίσης μελετηθεί στο ηλεκτροεγκεφαλογράφημα. Στη νόσο του Alzheimer έχει δειχθεί στατιστικώς σημαντική μείωση της FD. Αν και δε βοηθάει στη διάγνωση της νόσου, αυτός ο τύπος της ανάλυσης βοηθάει στην κατανόηση του ηλεκτροεγκεφαλογραφήματος [40].

Στη νόσο του Alzheimer η κατανομή της αιματικής ροής στο φλοιό του εγκεφάλου σε ασθενείς έχει μελετηθεί επίσης με χρήση της FD [41].

Στα οστά η διάταξη των δοκίδων δίνει FD και αυτό μπορεί να αποτελέσει χαρακτηριστικό ανάλογα με τη νόσο [42-44]. Έχει αναφερθεί ότι σε ακτινολογικές εικόνες, στην οστεοπόρωση, η FD στη δοκιδώδη διάταξη είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στα φυσιολογικά οστά [45,46]. Αυτό ίσως οφείλεται στην αποδιοργάνωση του δικτύου των δοκίδων των οστών. Έχουν δημοσιευτεί ακτινολογικές μέθοδοι με τη βοήθεια υπολογιστών που βασίζονται στην FD και καθορίζουν τη δομή των οστών και την πιθανότητα καταγμάτων σε οστεοπόρωση [47,48]. Επίσης η FD έχει χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσει τη δομή των δοκίδων στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών [49].

Το φυσιολογικό νεφρικό αρτηριακό δέντρο έχει επίσης εκτιμηθεί χρησιμοποιώντας την FD δίνοντας μια τιμή [50,51]. Δεν είχε διαπιστωθεί συσχέτιση μεταξύ της FD και νόσου που είχε αναπτυχθεί στην ενήλικη ζωή όπως η υπέρταση. Συγγενείς ανωμαλίες του νεφρού, όπως η υποπλαστική

νεφρική δυσπλασία είχαν στατιστικώς μικρότερες FD. Η FD του νεφρικού αρτηριακού δέντρου δείχνει ότι έχει σχεδόν πλήρως διαμορφωθεί από την ηλικία κύησης των 21 εβδομάδων σε επίπεδο λοβών και λοβιδίων [52]. Με τη βοήθεια της ακτινολογίας και των σκιαγραφικών είναι δυνατή η μέτρηση της FD και άλλων αρτηριακών δέντρων.

Έχει γίνει εκτίμηση της ηπατικής ίνωσης σε δείγματα μετά από βιοψία με βελόνη με τη χρησιμοποίηση της FD μέτρησης [53]. Η FD μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην απεικόνιση των σιελογόνων αδένων [54]. Έχει μελετηθεί η χρήση της FD σε σιελογραφίες για την παρακολούθηση σε ασθενείς με σύνδρομο Sjogren [55].

Η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια είναι άλλη μια περιοχή για εφαρμογή της FD [56]. Η μελέτη του αγγειακού δικτύου του αμφιβληστροειδή αντιπροσωπεύει ένα καλό παράδειγμα όπου μπορεί να εφαρμοστεί η FD [57]. Έχει δημοσιευτεί στατιστικώς σημαντική διαφορά της FD του δικτύου του αμφιβληστροειδή φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με προχωρημένη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια με την FD να έχει τιμή μεγαλύτερη σε αγγεία με διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια σε σχέση με φυσιολογικά. Με αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να γίνει προσπάθεια ανάπτυξης μια αντικειμενικής και αυτόματης τεχνικής παρακολούθησης περιοχών που παρουσιάζονται στους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη έτσι ώστε να επιλέγονται οι ασθενείς που χρειάζονται θεραπεία με laser [58,59].

Η ποσοτική προσέγγιση της βακτηριακής ή μυκητιασικής ανάπτυξης είναι σημαντική και ειδικά αν μπορεί να συσχετιστεί με παραμέτρους όπως η

μεταβολική δραστηριότητα, η παραγωγή ενζύμων ή η παθογένεια. Η μελέτη των αποικιών μικροοργανισμών έκανε δυνατή την συσχέτιση της FD ως μιας ποσοτικής παραμέτρου ανάπτυξης των μικροοργανισμών[60]. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να υπάρξει ως ποσοτικοποίηση στο φαρμακολογικό αποτέλεσμα της ανάπτυξης βακτηρίων ή μυκήτων [61].

Τα δενδριτικά έλκη, τα πιο συχνά προκαλούμενα από τον απλό έρπη στον οφθαλμό ως επιθηλιακή κερατίτιδα, έχουν μια fractal εμφάνιση. Η FD μειώνεται με την αύξηση του μεγέθους του έλκους, δείχνοντας ότι η περιφέρεια του έλκους γίνεται λιγότερο ακανόνιστη όσο μεγαλύτερο γίνεται και αλλάζει τη μορφή του από δενδριτικό σε αμοιβαδικό [62].

1.2 Μορφοκλασματική διάσταση και εφαρμογή στην Ογκολογία

Οι όγκοι χαρακτηρίζονται από μια χαοτική, ακανόνιστη ανάπτυξη. Η Ευκλείδειος Γεωμετρία δεν μπορεί να μελετήσει τα καρκινικά κύτταρα και τον ακανόνιστο τρόπο ανάπτυξης των αγγείων μέσα στον όγκο. Τα ανώμαλα όρια των όγκων μπορούν να εξεταστούν με την fractal γεωμετρία και πολλοί όγκοι μπορεί να δείξουν ότι έχουν FD μεγαλύτερη από την τοπολογική τους διάσταση. Η FD ενός όγκου αντιπροσωπεύει ως μέτρηση την πολυπλοκότητα του σχήματος του όγκου, συνιστά μία επιπλέον μορφομετρική παράμετρο και είναι ειδική για τον όγκο [63,64]. Η διάμετρος των διαφόρων όγκων μπορεί να είναι η ίδια ακριβώς, αλλά οι FD διαφέρουν. Η αναγνώριση της FD για τον όγκο μπορεί να βοηθήσει στην εκτίμηση της εξέλιξής του, του βαθμού κακοήθειας και της πιθανότητας μετάστασης. Επομένως η μαθηματικής αυτής

βάσης εφαρμογή της fractal δομής ενός συγκεκριμένου όγκου έχει τη δυνατότητα να υποθέσει την πιθανή ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου πριν το αποτέλεσμα της ιστολογικής εξέτασης.

Στην ιατρική απεικόνιση η FD έχει εφαρμοστεί στις μαστογραφίες και στην αναγνώριση παθολογικών περιπτώσεων μέσα από την καταγραφή της FD σε μεγάλη σειρά φυσιολογικών μαστογραφιών[65-67]. Ορισμένες μελέτες χρησιμοποιούν την FD στη εκτίμηση και παρακολούθηση της δομής του μαζικού αδένα [68]. Αυτές οι διαδικασίες μπορούν να εφαρμοστούν στις μαστογραφίες ή σε περιορισμένες περιοχές της μαστογραφίας και χαρακτηρίζουν τις μικροαποτιτανώσεις, την αναγνώριση κακοήθειας, ή τη διάκριση σε καλοήθεις και κακοήθεις όγκους με βάση την FD [69,70].

Μια ακόμα εφαρμογή των fractals αφορά τα κακοήθη μελανώματα και έχουν μελετηθεί οι περιοχές πριν την εκτομή και στη συνέχεια μετά την ιστοπαθολογική επιβεβαίωση. Οι τιμές της FD των ορίων των μελανωμάτων έχει χρησιμοποιηθεί ως διαφοροδιαγνωστικός δείκτης από άλλους καλοήθεις όγκους του δέρματος (π.χ. καλοήθης μελαχρωματικός σπίλος) [71,72].

Όσον αφορά παθήσεις του γαστρεντερικού συστήματος οι αλλαγές στα γαστρικά έλκη και η διάκριση καλοηθών από κακοήθων βλαβών των ελκών έχει επίσης μελετηθεί με την FD [73].

Οι πολύποδες του παχέος εντέρου έχουν μια FD ανάλογα με τη δομή τους. Σε μελέτη που έχει γίνει έχει συγκριθεί η FD των αδενωματώδων, των μεταπλαστικών και των φλεγμονωδών πολυπόδων και έχει βρεθεί στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των FD στις τρεις αυτές ομάδες [74].

Η FD έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της δομής του καρκίνου του προστάτη, και συγκεκριμένα στη δομή του πυρήνα των κακοήθων κυττάρων και έχει συσχετιστεί με την πρόγνωση του και την πιθανότητα μετάστασης [75].

Στην ιστολογία ο καθορισμός της FD για τη διάκριση μεταξύ φυσιολογικού ιστού και όγκου, μπορεί να βοηθήσει στην εκτίμηση της διεισδυτικής φύσης του όγκου [76-80]. Τέτοια μελέτη έχει γίνει για όγκους που εντοπίζονται στη βάση της στοματικής κοιλότητας. Παρατηρήθηκε αύξηση στο ακανόνιστο και της FD στα όρια μεταξύ του επιθηλίου-στρώματος των βλαβών και του φυσιολογικού ιστού σε δυσπλαστικές βλάβες καθώς και σε διεισδυτικά καρκινώματα [81,82].

Η αγγειογένεση και η διάταξη των νεοαγγείων στους όγκους είναι φαινόμενο που έχει μελετηθεί με την FD . Η οργάνωση των αγγείων η κατεύθυνση και η αρχιτεκτονική τους μεταβάλλεται στις νεοπλασίες . Έχει γίνει επίσης μελέτη με FD του δικτύου των αγγείων στους όγκους πριν και μετά χρήση αντιαγγειογενετικών παραγόντων και την αποτελεσματικότητα των παραγόντων αυτών με τη μεταβολή του δικτύου των αγγείων σε φυσιολογικό και κανονικό με την καταστολή περαιτέρω αγγειογενετικής ανάπτυξης στον όγκο [83-85].

Οι δυναμικές, λειτουργικές απεικονιστικές μέθοδοι με τη χρήση ουσιών και την καταγραφή της κατανομής και της ροής τους μέσα στους ιστούς με τα μαθηματικά μοντέλα της FD έχει μελετηθεί ότι μπορούν να αναδείξουν τις διαφορές όγκων από φυσιολογικούς ιστούς. Η αρχιτεκτονική των αγγείων

στους όγκους και η fractal δομή μπορεί να δώσει ερμηνεία στην αντίσταση στη ροή του αίματος, τους χαμηλούς κορεσμούς οξυγόνου μέσα στα αγγεία του όγκου καθώς και την ετερογενή ροή αίματος [86,87].

1.3 Μορφοκλασματική διάσταση και κυτταρικές μεμβράνες

Έχουν γίνει μελέτες μέτρησης FD σε κυτταρικές μεμβράνες λόγω του ακανόνιστου σχήματός τους με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου [88,89]. Σε ηπατοκύτταρα ποντικών έχει γίνει μέτρηση της μιτοχονδριακής μεμβράνης και του ενδοπλασματικού δικτύου και έχει διαπιστωθεί η διαφορετική τους FD. [90,91].

Μια άλλη εφαρμογή ήταν σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου όπου μελετήθηκε η αλλαγή της πυρηνικής μεμβράνης και η δομή της πυρηνικής χρωματίνης μετά την επίδραση στεροειδών ορμονών και η ευόδωση ή όχι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, με μέτρηση της FD της πυρηνικής μεμβράνης και των άλλων δομών πριν και μετά τη δράση των στεροειδών [92].

Έχει επίσης δοκιμαστεί στη διάκριση των πυρήνων φυσιολογικών και δυσπλαστικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας [93,94].

Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, της φυσιολογικής δηλαδή πορείας του θανάτου του κυττάρου που συμβαίνει σε όλους τους ιστούς και όπου τα κύτταρα πεθαίνουν παρουσιάζοντας λειτουργικές και μορφολογικές αλλαγές, έχει γίνει προσπάθεια πρώιμης καταγραφής αυτών των μορφολογικών αλλαγών σε κακοήθη κύτταρα με την FD. Σε μελέτη που έχει γίνει σε

ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαπιστώθηκε μείωση της FD της κυτταροπλασματικής και της πυρηνικής μεμβράνης σε αρχικά στάδια της απόπτωσης όπως επίσης μείωση της FD στις μετρήσεις για τη δομή της χρωματίνης αλλά και άλλων δομικών κυτταρικών συστατικών σε σύγκριση με φυσιολογικά κύτταρα. Επομένως με τη βοήθεια της FD και τη διαπίστωση της έναρξης απώλειας της πολυπλοκότητας μπορεί να αναγνωριστούν οι αρχικές φάσεις της απόπτωσης όπου ακόμα τα κύτταρα εμφανίζονται φυσιολογικά και υγιή [95,96].

1.4 Μορφοκλασματική διάσταση στα αιμοποιητικά και λευχαιμικά κύτταρα

Τα αιμοποιητικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένων των λεμφοκυττάρων, των πολυμορφοπυρήνων και των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων όπως και τα κακοήθη κύτταρα στη λευχαιμία, στα λεμφώματα και στις άλλες κακοήθειες του αιμοποιητικού ιστού έχουν τέτοια μορφολογικά χαρακτηριστικά ώστε να μπορούν να αναλυθούν και να δώσουν πληροφορίες για την κυτταρική προέλευση στη πρόγνωση αλλά και την ανταπόκριση στη θεραπεία [97-99]. Το ακανόνιστο και η πολυπλοκότητα της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί επαρκώς να μετρηθεί με την FD. Οι μέχρι σήμερα μετρήσεις έχουν γίνει με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε μεγεθύνσεις πάνω από τις οποίες παραμένουν σταθερές οι λεπτομέρειες της μεμβράνης όσο και να αυξάνεται η μεγέθυνση. Τα ερυθροκύτταρα έχουν μικρή τιμή FD ενώ τα πολυμορφοπύρηννα από περιφερικό αίμα έχουν βρεθεί να έχουν πιο πολύπλοκη μεμβράνη και

μεγαλύτερη FD από ότι τα μονοπύρηννα. Η FD έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση CD8 κατασταλτικών T λεμφοκυττάρων από CD4 βοηθητικά T λεμφοκύτταρα. Οι βλάστες της T οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας βρέθηκαν να έχουν μικρότερη τιμή FD σε σχέση με τα φυσιολογικά και διαφοροποιημένα T κύτταρα στο θύμο αδέννα, όπως επίσης και οι βλάστες της B οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και της προ B οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας βρέθηκε να έχουν μικρότερες τιμές σε σχέση με τα φυσιολογικά. Από τις μελέτες αυτές διαπιστώνονται ότι όσο πιο αδιαφοροποίητα, κακοήθη και με μεγάλο βαθμό πολλαπλασιασμού είναι τα κύτταρα, όπως τα λευχαιμικά, τόσο λιγότερη πολυπλοκότητα έχει η μεμβράνη και επομένως τόσο πιο χαμηλή τιμή FD έχουν [100-103].

Η εισαγωγή της FD έχει καταστήσει δυνατή την μέτρηση της πολυπλοκότητας του σχήματος κυττάρων και ιστών στο επίπεδο οπτικού και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου [104,105]. Είναι δυνατή η καταγραφή διαφορών σε ποικίλους πληθυσμούς κυττάρων καθώς και η μεταξύ τους σύγκριση. Με την προσέγγιση των fractals μπορούν να καταγραφούν οι διαφορές σε καλοήθεις και κακοήθεις ιστούς ή κύτταρα.

2. ΦΑΣΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ

2.1 Φασματική απορρόφηση

Η εξέταση ιστολογικών και κυτταρολογικών δειγμάτων μπορεί να μελετηθεί με βάση την ικανότητά τους να απορροφούν ή να αντανακλούν τα φωτόνια με χαρακτηριστικούς τρόπους μετά την αντίδραση των συστατικών τους με ειδικές χρωστικές. Η ανάλυση της έντασης της ακτινοβολίας του φωτός και της απορρόφησής τους από συγκεκριμένο υλικό σε σχέση με το μήκος κύματος αποδίδεται με γραφική παράσταση η οποία είναι χαρακτηριστική για το κάθε υλικό ξεχωριστά [106-108].

Η διαπερατότητα ή εκπομπή (transmittance) του φωτός μέσω ενός υλικού ορίζεται από την εξίσωση:

$$T=I(x,y)/I_0(x,y) \quad (4)$$

όπου I είναι η εκπεμπόμενη ένταση (transmitted) ενώ I_0 η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (incident).

Η μέτρηση της φασματικής απορρόφησης (absorbance) σε συγκεκριμένο μήκος κύματος ενός υλικού ή διαλύματος όπως αυτά παρατηρούνται στο μικροσκόπιο ορίζεται από τον τύπο:

$$A=-\log T=\log I_0(x,y)/I(x,y) \quad (5)$$

Όπου $I_0(x,y)$ είναι η κατανομή της προσπίπτουσας έντασης ενώ $I(x,y)$ η κατανομή της εκπεμπόμενης έντασης μιας δομής ή ενός διαλύματος μετά τη διέλευσή της δέσμης φωτός μέσω του υλικού [109-111].

Η εφαρμογή της φασματικής απορρόφησης σε ιστολογικά παρασκευάσματα και η ποσοτικοποίηση της ορίζεται από το νόμο του Beer-Lambert.

$$A = \epsilon c l \quad (6)$$

όπου ϵ ο συντελεστής απορρόφησης ή η απορροφησιμότητα του υλικού (molar absorption coefficient) ο οποίος είναι μέτρο της απορροφούσας δυναμικής του υλικού σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, c η συγκέντρωση του υλικού και l η απόσταση που διανύει η δέσμη φωτός μέσα στο υλικό [112].

Ο ανθρώπινος οφθαλμός λόγω του περιορισμού που έχει για φασματική διάκριση μόνο στα μήκη κύματος στις περιοχές του κόκκινου, πράσινου, μπλε δεν μπορεί να διακρίνει διαφορές σε άλλα μήκη κύματος. Η εφαρμογή όμως της φασματικής απορρόφησης στα συγκεκριμένα μήκη κύματος δίνει την πληροφορία και τη διάκριση των δομών.

Με βάση τις παραπάνω εξισώσεις η διαφορά φασματικής απορρόφησης στα διαφορετικά μήκη κύματος $A_r(x,y)$ ή ισοδύναμα ο λογάριθμος του λόγου των εντάσεων τους στα συγκεκριμένα μήκη κύματος υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση.

$$A_r(x,y) = A_{\lambda_i}(x,y) - A_{\lambda_j}(x,y) = \log I_{\lambda_i}(x,y) / I_{\lambda_j}(x,y) \quad (7)$$

Όπου $A_{\lambda_i}(x,y)$, $A_{\lambda_j}(x,y)$ και $I_{\lambda_i}(x,y)$, $I_{\lambda_j}(x,y)$ είναι οι κατανομές απορρόφησης και έντασης αντίστοιχα των φασματικών εικόνων που έχουν μετρηθεί στα μήκη κύματος λ_i και λ_j αντίστοιχα. Με αυτή την εξίσωση ποσοτικοποιούνται οι διαφορές απορρόφησης μεταξύ μηκών κύματος και επομένως μπορεί να

γίνει σύγκριση αυτών των διαφορών όταν μελετώνται διαφορετικές δομές [113-115].

2.2 Συστήματα φασματοσκοπίας

Το φασματόμετρο είναι μια συσκευή που δέχεται φως, το διαχωρίζει στα συστατικά μήκη κύματος και μετράει το φάσμα του φωτός που ορίζεται στην ένταση του φωτός σε σχέση με το μήκος κύματος. Το απεικονιστικό φασματόμετρο είναι το φασματόμετρο που συλλέγει φως από μια εικόνα και καθορίζει τις μετρήσεις των φασμάτων για κάθε ψηφιακό σημείο της εικόνας [116,117].

Η φασματοσκοπία είναι μια αναλυτική διαδικασία που έχει χρησιμοποιηθεί για να χαρακτηρίσει υλικά και δομές βάσει των φασματικών ιδιοτήτων των χημικών συστατικών. Η φυσική βάση της φασματοσκοπίας καθορίζεται από την αλληλεπίδραση του φωτός με το υλικό. Η φασματοσκοπία μετρά την ένταση του φωτός που αντανακλάται ή μεταφέρεται από ένα δείγμα σε σχέση με το μήκος κύματος, με υψηλή φασματική ανάλυση, αλλά χωρίς πληροφορία για το κάθε σημείο του δείγματος [118,119].

Η φασματική απεικόνιση εξ'άλλου είναι ο συνδυασμός της υψηλής ανάλυσης φασματοσκοπίας και της υψηλής απεικονιστικής ανάλυσης για κάθε ψηφιακό σημείο. Ένα φασματικό απεικονιστικό σύστημα αποτελείται από α) σύστημα μέτρησης και β) λογισμικό ανάλυσης απεικόνισης. Το σύστημα μέτρησης συμπεριλαμβάνει όλα τα οπτικά, ηλεκτρονικά μέσα που εστιάζουν στο δείγμα (π.χ. την επιλογή της φωτεινής πηγής), τον τρόπο μέτρησης όπως

επίσης και τον πιο αξιόπιστο τρόπο στάθμισης (calibration) του συστήματος για να ληφθούν οι μετρήσεις. Το λογισμικό ανάλυσης περιλαμβάνει όλους εκείνους τους απαραίτητους αλγορίθμους για την ανάλυση και εξαγωγή αποτελεσμάτων [120].

Οι βασικοί τύποι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός φασματικού απεικονιστικού συστήματος είναι α) με το φασματικό πρίσμα β) με τα φασματικά φίλτρα και γ) με φασματικά συστήματα ανά ψηφιακό σημείο.

Τα συστήματα που βασίζονται στο φασματικό πρίσμα, έχουν αφενός την υψηλής ευκρίνειας κάμερα (CCD, Charge Coupled Device) και αφετέρου το φασματικό σύστημα του πρίσματος που μετρά την ένταση του φωτός η οποία περνά μέσω του πρίσματος σε σχέση με το μήκος κύματος. Τα συστήματα αυτά εστιάζουν σε μια γραμμή ψηφιακών σημείων στο δείγμα περιορίζοντας το πεδίο επαφής με το δείγμα σε μια γραμμή από σημεία κάθε φορά. Με αυτό τον τρόπο μια ολόκληρη εικόνα μπορεί να ολοκληρωθεί μετά από σάρωση μιας σειράς από γραμμές του δείγματος. Στα συστήματα αυτά δεν είναι δυνατή η απεικόνιση όλου του δισδιάστατου αντικειμένου σε συγκεκριμένο χρόνο πριν ολοκληρωθεί όλη η μέτρηση, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να μη μπορεί να εστιαστεί ή να επισημανθεί μια συγκεκριμένη περιοχή που ενδιαφέρει πριν την ολοκλήρωση της μέτρησης. Επιπλέον με αυτόν τον τρόπο ο χρόνος μέτρησης όλης της εικόνας είναι μεγάλος και η συλλογή των πληροφοριών με τη μορφή των γραμμών οδηγεί σε απώλεια πληροφορίας στην ολική εικόνα και ανακρίβεια [121,122].

Τα συστήματα που έχουν φίλτρα όπως τα ακουστικο-οπτικά τονικά φίλτρα (acousto-optic tunable filters AOTF) ή τα υγρού κρυστάλλου τονικά φίλτρα (liquid-crystal tunable filter LCTF) δημιουργούν τη φασματική εικόνα με το φιλτράρισμα της έντασης για όλα τα ψηφιακά σημεία του δείγματος ταυτόχρονα σε διαφορετικό μήκος κύματος [123]. Σε αυτά η μέτρηση όλης της φασματικής εικόνας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι πιθανή γιατί όλα τα φωτόνια έξω από αυτή την περιοχή του μήκους κύματος που επιλέγεται απωθούνται και δεν φτάνουν την κάμερα (CCD). Τα μειονεκτήματα αυτών των φίλτρων είναι τα περιορισμένα φασματικά όρια μηκών κύματος και η μελέτη πέρα αυτών δεν είναι δυνατή, ο περιορισμός στην ευκρίνεια, η χαμηλή ευαισθησία, η δυσκολία σάρωσης των εικόνων σε διαφορετικά μήκη κύματος και η έλλειψη εύχρηστων αλγορίθμων για την ανάδειξη των αποτελεσμάτων.

Τα πιο σύγχρονα φασματικά συστήματα καθορίζουν τη φασματική ένταση του δείγματος ανά ψηφιακό σημείο. Επομένως, ταυτόχρονα και ανεξάρτητα λαμβάνουμε τα φάσματα απορρόφησης ανά ψηφιακό σημείο αλλά και συνολικά της εικόνας [124]. Με αυτά τα συστήματα σε σχέση με τα άλλα που προαναφέρθηκαν γίνονται οι μετρήσεις σε στενό όριο μηκών κυμάτων, με μεγάλη ευαισθησία, και σε ελάχιστο χρόνο μέτρησης [125,126].

2.3 Εφαρμογές της φασματικής απεικόνισης στην Ιατρική

Είναι γνωστό ότι η χρήση διαφόρων χρωστικών οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως δείκτες είναι ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία για την ανάλυση οργανικών ιστών. Η ταχεία ανάπτυξη νέων και περισσότερο

πολύπλοκων, πολλαπλών χρωμάτων, φθοριζόντων χρωστικών έχει δώσει ώθηση στη μικροσκοπία φθορισμού, η οποία αποτελεί μια από τις πιο σπουδαίες πειραματικές μεθόδους στη μικροσκοπία [127-129].

Η απεικονιστική φασματοσκοπία παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα στην απεικόνιση φθορισμού έναντι άλλων κλασσικών μεθόδων που βασίζονται σε φίλτρα [130-133]. Μερικά από τα πλεονεκτήματα είναι τα κατωτέρω:

- Μέτρηση πλήρους φάσματος, η οποία δίνει περισσότερες πληροφορίες για την συμπεριφορά των μορίων των χρωστικών στο δείγμα ενδιαφέροντος.
- Απλούστευση της λήψης της εικόνας φθορισμού, προσφέροντας τη δυνατότητα με μία μόνο μέτρηση το διαχωρισμό και χαρτογράφηση πολλών φασματικά επικαλυπτόμενων φθοριζόντων δεικτών.
- Επίλυση πολλών προβλημάτων που σχετίζονται με τον μη ειδικό επιπρόσθετο φωτισμό (background).
- Παρέχει τη δυνατότητα να αναλυθούν ταυτόχρονα πολλές παράμετροι φασματικά σχετιζόμενες με την εφαρμογή πολύπλοκων αλγορίθμων ανάλυσης.

Οι κλασσικές εφαρμογές της απεικονιστικής φασματοσκοπίας στη βιολογία περιλαμβάνουν απεικόνιση και χαρτογράφηση ιόντων ασβεστίου καθώς και άλλων προϊόντων μεταβολισμού σε ζωντανά κύτταρα και σε πραγματικό χρόνο, καθώς και ανάλυση των χρωμοσωμάτων στα ανθρώπινα κύτταρα με τη χρήση φθορίζοντος υβριδισμού [134-136]. Νεώτερες εφαρμογές στη βιοιατρική βασίζονται σε σκέδαση και απορρόφηση υπερύθρου

ακτινοβολίας, οι οποίες δίνουν το πλεονέκτημα της μελέτης δειγμάτων χωρίς τον κίνδυνο της διαταραχής των φθορίζοντων δεικτών [137,138].

2.3.1 Φθορίζων υβριδισμός in situ- Spectral karyotyping

Η απεικονιστική φασματοσκοπία έχει δώσει ώθηση στην ανάλυση και διάγνωση χρωμοσωματικών αλλοιώσεων με τη χρήση φθορίζοντος υβριδισμού (Fluorescence In Situ Hybridization – FISH) [139-141] όπως και την παραλλαγή της μεθόδου αυτής που είναι η SKY (Spectral Karyotyping) μέθοδος [142]. Η τεχνική FISH όπως και η SKY είναι κυτταρογενετικές διαδικασίες, οι οποίες ταυτοποιούν αλυσίδες DNA σεσημασμένες με φθορίζοντες DNA δείκτες, οι οποίοι υβριδίζονται με το υπό εξέταση γενετικό υλικό. Ειδικές χρωμοσωματικές αλυσίδες και αλλοιώσεις μπορούν να ανιχνευθούν με μεγάλη ευαισθησία με τη χρήση αυτής της τεχνικής. Διάφορα υπολογιστικά συστήματα ανάλυσης εικόνας και αναγνώρισης προτύπων έχουν αναπτυχθεί βασισμένα στη μέθοδο του φασματικού απεικόνισης. Τα συστήματα αυτά αυτοματοποιούν την παρατήρηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων FISH και SKY και είναι διαθέσιμα για ερευνητική και κλινική χρήση. Υψηλή φασματική ανάλυση καθώς και μεγάλη ευαισθησία επιτυγχάνονται με τη χρήση συνδυασμού απεικονιστικού μονοχρωμάτωρα, ψηφιακής απεικόνισης (CCD) και ειδικού λογισμικού ανάλυσης. Το αποτέλεσμα είναι ο φασματικός διαχωρισμός διαφορετικών φθορίζοντων δεικτών στο προς εξέταση γενετικό υλικό και κατά συνέπεια η παρατήρηση διαφορετικών χρωμοσωμάτων. Έτσι καταγράφεται ένα πλήρες

φάσμα στο ορατό του σήματος φθορισμού για κάθε ψηφιακό σημείο της εικόνας χωρίς τους περιορισμούς που επιβάλλουν τα φίλτρα. Τα συστήματα αυτά διακρίνουν μεγάλο αριθμό φθορίζοντων DNA δεικτών με μία μόνο μέτρηση. Ειδικότερα τέτοια συστήματα μπορούν να καταγράψουν πολυχρωματικά σήματα φθορισμού με μεγάλη ακρίβεια και αξιοπιστία σε μεγάλο αριθμό φθορίζοντων χρωστικών (ακόμα και στην περίπτωση που επικαλύπτονται φασματικά) κάτι που δεν είναι εφικτό με τη χρήση συμβατικών συστημάτων που βασίζονται μόνο σε φίλτρα [143].

2.3.2 Μελέτη και ανάλυση της κινητικής των κυτταρικών λειτουργιών.

Οι κυτταρικές λειτουργίες βασίζονται σε κινήσεις μορίων διαμέσου των μεμβρανών, μέσα στις κυτταροπλασματικές δομές και ανάμεσα στα κύτταρα (διακυτταρική επικοινωνία). Ταχείες αλλαγές στη ροή ιόντων, στη συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου Ca^{++} και στα δυναμικά των μεμβρανών καθορίζουν τη δυναμική των λειτουργιών των κύτταρων. Η απεικονιστική φασματοσκοπία με τη βοήθεια κατάλληλων φθορίζοντων δεικτών έχει καθιερωθεί για τη μελέτη και κατανόηση γρήγορων δυναμικών διεργασιών, οι οποίες διενεργούνται στα κύτταρα αλλά και διακυτταρικά.

Μικρές αλλαγές στα ελεύθερα διακυτταρικά ιόντα ασβεστίου επηρεάζουν τα δυναμικά μεμβρανών, τη διαίρεση του κύτταρου, τις κινήσεις των μυών, τις διεγέρσεις των ουδετερόφιλων και άλλων σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών. Πολλοί φθορίζοντες δείκτες έχουν αναπτυχθεί για τη μέτρηση ελεύθερων ιόντων ασβεστίου οι οποίοι είναι διπλής διέγερσης ή

διπλής εκπομπής. Η δυνατότητα της κλασματικής απεικόνισης διέγερσης ή εκπομπής αποκλείει επιπλέον σήμα φθορισμού που προέρχεται από μεταβολές στη συγκέντρωση των χρωστικών λόγω διαρροής ή φωτόλυσης των δεικτών (photobleaching) [144].

Η μέτρηση της ανακατανομής του σήματος φθορισμού μετά τη φωτόλυση των δεικτών είναι η μόνη όχι παρεμβατική μέθοδος για την απευθείας ανάλυση δυναμικών διεργασιών σε ζωντανά κύτταρα. Τέτοιες μετρήσεις παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη δομή των μεμβρανών, τη δράση των ορμονών, την επικοινωνία μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος καθώς και μεταξύ κύτταρων, την κυτταροπλασματική δομή και οργάνωση, τη διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των κύτταρων και άλλων πολύπλοκων διεργασιών. Οι μετρήσεις ανακατανομής του σήματος φθορισμού πραγματοποιούνται φωτίζοντας μια πολύ μικρή επιφάνεια (1 μ m-2 μ m) με ένα στενό και μεγάλης έντασης παλμικό λέιζερ. Λόγω φωτόλυσης των δεικτών η ένταση του φθορισμού σε εκείνο το σημείο μειώνεται. Η ανάκτηση του φθορισμού από αυτήν την περιοχή εξαιτίας της πλευρικής διάχυσης γειτονικών άθικτων φθορίζοντων ουσιών, μετράται με επαναλαμβανόμενη σάρωση της επιφάνειας του κυττάρου με μια δέσμη μειωμένης έντασης έτσι ώστε από το ρυθμό και το βαθμό ανάκτησης του σήματος να υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης (κινητικότητα) των φθορίζοντων δομών .

Η μείωση της έντασης φθορισμού και οι μετρήσεις ανάκτησης του σήματος μπορούν να εφαρμοστούν και σε μετρήσεις διακυτταρικής επικοινωνίας για την παρατήρηση φθορίζοντων μορίων. Σε αυτήν την

περίπτωση γίνονται μετρήσεις μεταφοράς χρωστικών μεταξύ κύτταρων που βρίσκονται σε επαφή. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι ο ρυθμός επικοινωνίας είναι ανάλογος με τον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται σε επαφή [145].

2.3.3 Φασματικά χαρακτηριστικά κυτταρικών πληθυσμών

Η ακριβής διάγνωση σε καλοήθειες από κακοήθειες βλάβες και η διάκριση των κυτταρικών πληθυσμών έχουν μελετηθεί και σε σχέση με τα φασματικά χαρακτηριστικά τους [146-148]. Έχει μελετηθεί η διάκριση φυσιολογικών λεμφοκυττάρων, κυττάρων ασθενών με μη Hodgkin λέμφωμα και ασθενών με Χρόνια Λεμφική Λευχαιμία (ΧΛΛ) μετά από χρώσεις [149-152]. Σε αυτές τις μελέτες διαπιστώθηκε ότι τα φασματικά χαρακτηριστικά των πυρήνων διαφέρουν παρά τη μορφολογική ομοιότητα που μπορεί να έχουν κάποιοι πληθυσμοί μεταξύ τους (φυσιολογικά λεμφοκύτταρα και κύτταρα ΧΛΛ). Αντίστοιχη διάκριση μεταξύ φυσιολογικών ηπατοκυττάρων και κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκίνου έχει γίνει με συστήματα φασματικής απεικόνισης [153] αλλά και σε κακοήθειες του δέρματος όπως τα κύτταρα μελανώματος [154,155].

Φασματικά χαρακτηριστικά έχουν μελετηθεί επίσης και σε κύτταρα καρκίνου του μαστού [156,157]. Τα κύτταρα διαφόρων τύπων καρκίνου του μαστού έχουν και διαφορετικά φάσματα απορρόφησης. Αποτελέσματα μελετών έχουν δείξει διαφορές στα φασματικά χαρακτηριστικά κυττάρων σωληνώδους και λοβώδους καρκίνου του μαστού [158-160].

Φασματικές διαφορές σε σχέση με φυσιολογικά κύτταρα των αντίστοιχων ιστών έχουν επίσης μελετηθεί και σε κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου [161,162] όπως και του καρκίνου του προστάτη [163].

Η διάταξη της χρωματίνης [164] όπως επίσης και οι διαφορές στα φασματικά χαρακτηριστικά στους πυρήνες και στη οργάνωση της χρωματίνης σε φυσιολογικά κύτταρα που βρίσκονται στη διαδικασία της διαφοροποίησης και σε κύτταρα που βρίσκονται στη διαδικασία της απόπτωσης [165] έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης. Στις μελέτες αυτές έγινε σύγκριση φυσιολογικών ερυθροποιητικών πρόδρομων κυττάρων μυελού με αυτά ασθενών με μυελοειδή μεταπλασία και διαπιστώθηκαν διαφορές στη δομή των πυρήνων τους όχι ορατές με το κοινό μικροσκόπιο [166].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Μέχρι σήμερα οι μελέτες που έχουν δημοσιευτεί αφορούν στη μέτρηση της FD σε κυτταρικό επίπεδο με χρήση αποκλειστικά ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε κακοήθη νοσήματα των ενηλίκων.

Επίσης σε άλλες μελέτες έχει εφαρμοστεί η φασματική απεικόνιση για τη διάκριση σε επίπεδο κυττάρου διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών με βάση τα φασματικά χαρακτηριστικά πάλι σε κακοήθειες ενηλίκων.

Σε κακοήθη νοσήματα της παιδικής ηλικίας οι παράμετροι FD και φασματικών χαρακτηριστικών δεν έχουν μελετηθεί πιθανόν λόγω της διαφορετικής ιστολογίας και φύσης των μορφών του παιδικού καρκίνου.

Ένα από τα προβλήματα διαφοροδιάγνωσης στις κακοήθειες των παιδιών μορφολογικά, είναι και η διάκριση μεταξύ ΟΛΛ μορφολογίας L1 με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα. Η μορφολογική αυτή διάκριση είναι τις περισσότερες φορές αδύνατη με το κοινό μικροσκόπιο.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν ο καθορισμός μιας μονάδας μέτρησης και συγκεκριμένα των τιμών της FD για το ακανόνιστο του περιγράμματος των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και των λεμφοβλαστών στη μέγιστη μεγέθυνση που μπορεί να επιτευχθεί με το κοινό και όχι με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τιμής FD. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαπιστωθεί αν οι δύο αυτοί κυτταρικοί πληθυσμοί μπορούν να διακριθούν με βάση την FD σε μικρότερες μεγεθύνσεις από αυτές του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και η μέθοδος αυτή να αποτελέσει εύχρηστο τρόπο εφαρμογής στην καθημερινή κλινική πράξη για τη διάκριση τους.

Όσον αφορά τη φασματική απεικόνιση, σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να καθοριστούν τα μήκη κύματος στα οποία μπορεί να γίνει διάκριση των δύο αυτών πληθυσμών - φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών - ανάλογα με τα φάσματα απορρόφησης των πυρήνων τους.

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΟ

Χρησιμοποιήθηκαν επιχρίσματα μυελού των οστών από 20 παιδιά με Β-σειράς Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία, L1 μορφολογίας, χωρίς κυτταρογενετικές ανωμαλίες, στην πρωτοδιάγνωση. Η ταυτοποίηση των λευχαιμιών βασίστηκε σε ειδικές χρώσεις (PAS, μυελουπεροξειδάση, όξινη φωσφατάση, μη ειδικές εστεράσες) και στην κυτταρομετρία ροής. Η ταξινόμηση των λευχαιμιών έγινε σύμφωνα με την γνωστή ταξινόμηση κατά FAB. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν επιχρίσματα μυελού των οστών 20 παιδιών στα οποία το μυελόγραμμα έγινε στα πλαίσια διερεύνησης παρατεινόμενου εμπύρετου, αναιμίας, θρομβοπενίας, ουδετεροπενίας, μεταβολικών νοσημάτων. Η εξέταση του μυελού των οστών των παιδιών αυτών έδειξε φυσιολογική κυτταροβρίθεια και φυσιολογική εκπροσώπιση και ωρίμανση όλων των αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών. Η ηλικία ασθενών και μαρτύρων κυμαινόταν από 2 έως 14 ετών με μέση ηλικία τα 6 έτη. Από κάθε ασθενή επιλέχθηκαν 15 κύτταρα σε 20 διαφορετικά οπτικά πεδία των επιχρισμάτων του μυελογράμματος πρωτοδιάγνωσης για τους ασθενείς με ΟΛΛ και του διαγνωστικού μυελογράμματος για τους μάρτυρες. Μελετήθηκαν 300 κύτταρα από κάθε πληθυσμό. Τα παιδιά ασθενείς και μάρτυρες εξετάστηκαν, διαγνώστηκαν και νοσηλεύτηκαν στην Παιδιατρική Κλινική Αιματολογίας/Ογκολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου κατά το διάστημα 1999-2002. Η χρώση May-Grunwald Giemsa των επιχρισμάτων έγινε στο Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού

Νοσοκομείου Ηρακλείου με το σύνηθες πρωτόκολλο. Το λογισμικό υπολογισμού της FD αλλά και το σύστημα του φασματικού μικροσκοπίου αναπτύχθηκαν στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Έρευνας Κρήτης, στο Τμήμα Ηλεκτρονικής Δομής και Έρευνας. Η μέτρηση της FD στο περίγραμμα που δημιουργεί η κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων μετά από επεξεργασία με το λογισμικό υπολογισμού της σε μεγέθυνση 100x του μικροσκοπίου έγινε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου Κρήτης. Επίσης έγινε καταγραφή των φασματικών χαρακτηριστικών των πυρήνων των κυττάρων με μέτρηση της απορρόφησης τους ως προς διαφορετικά μήκη κύματος (400-1000nm). Καταγράφηκαν οι διαφορές της FD και των φασματικών χαρακτηριστικών μεταξύ των κυτταρικών πληθυσμών.

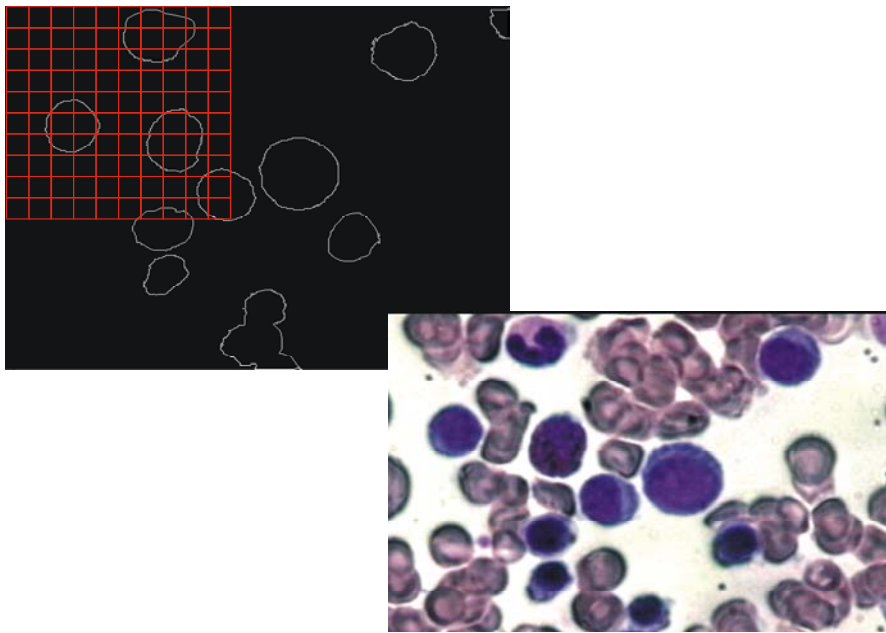
ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Μέτρηση μορφοκλασματικής διάστασης

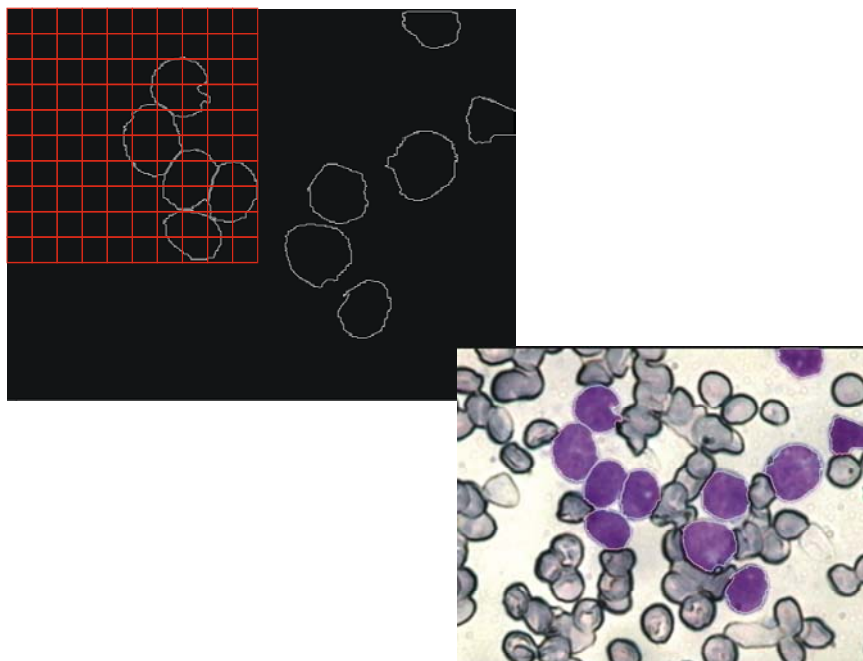
Η μέτρηση της Μορφοκλασματικής Διάστασης (FD) έγινε με τη χρήση ψηφιακής κάμερας (Charged-Coupled Device CCD) ανάλυσης 736X560 ψηφιακά σημεία (pixels) με βάθος ψηφιοποίησης 8bit. Η κάμερα προσαρμόζεται σε μικροσκόπιο και το αναλογικό σήμα της μετατρέπεται σε ψηφιακή εικόνα. Η μεγέθυνση του μικροσκοπίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100x. Οι εικόνες αποθηκεύονταν σε προσωπικό υπολογιστή στη συνέχεια και βάσει του χρωματικού μοντέλου HSI (χρώμα, κορεσμός, ένταση) γινόνταν

- α) ανίχνευση και χαρτογράφηση των κεχρωσμένων κυττάρων,
- β) τμηματοποίησή τους με βάση τον κορεσμό και την ένταση για τον ακριβή προσδιορισμό των προς μέτρηση περιοχών,
- γ) μετατροπή σε εικόνα μαύρου και άσπρου που περιέχει μόνο τις περιφέρειες των χαρτογραφημένων περιοχών.

Με τη χρήση του λογισμικού “Fractal Calculator” που αναπτύχθηκε σε συνεργασία με το Ίδρυμα Τεχνολογίας Έρευνας Κρήτης (Τμήμα Ηλεκτρονικής Δομής και Laser) υπολογίστηκε η FD με βάση τη μέθοδο της καταμέτρησης τετραγώνων (box counting method). Σύμφωνα με αυτή στη μικροσκοπική εικόνα που περιέχει περιγράμματα κυττάρων τοποθετούνται διαδοχικά τετραγωνικά πλέγματα κάθε ένα με διαφορετικό μήκος πλευράς (s) τετραγώνου (Εικόνα 1 και 2).

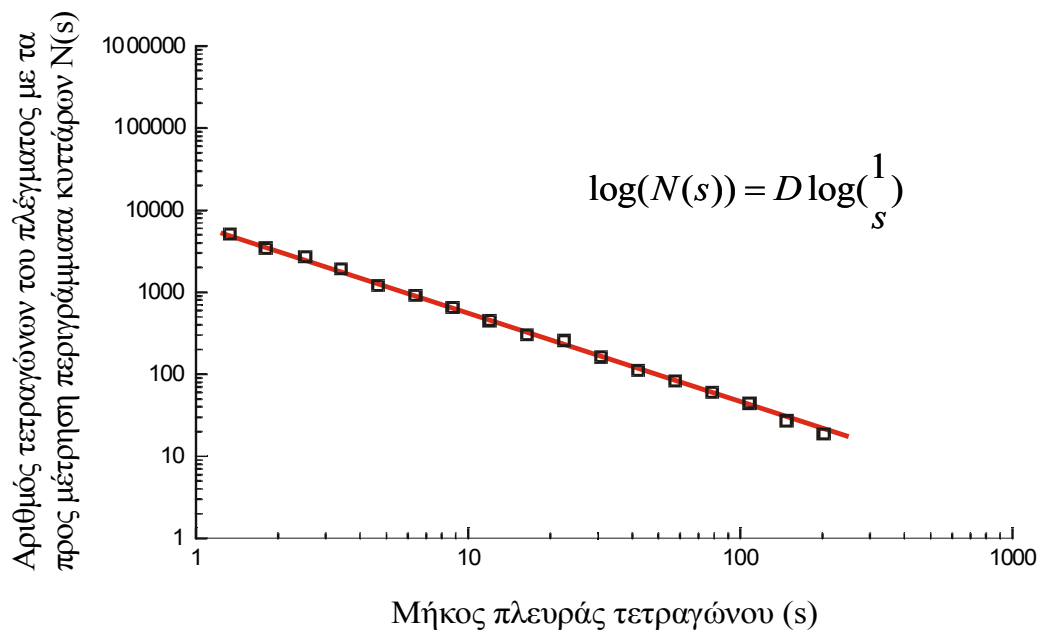


Εικόνα 1. Επίχρισμα μυελού των οστών φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και απεικόνιση της μεθόδου της καταμέτρησης τετραγώνων



Εικόνα 2. Επίχρισμα μυελού των οστών λεμφοβλαστών και απεικόνιση της μεθόδου της καταμέτρησης τετραγώνων

Ο αριθμός των τετραγώνων κάθε πλέγματος $N(s)$ που περιέχουν τα προς μέτρηση περιγράμματα κυττάρων αναπαρίσταται γραφικά σε συνάρτηση με το αντίστροφο του μήκους της πλευράς του τετραγώνου κάθε πλέγματος. Σύμφωνα με την εξίσωση 3 η γραφική παράσταση σε κλίμακα log-log είναι η ευθεία γραμμή η κλίση της οποίας δίνει την τιμή της FD [$\log(N(s))=D\log(1/s)$]. Ο περιορισμός του μήκους της πλευράς των τετραγώνων καθορίζεται μεταξύ των τιμών των δύο άκρων της ευθείας γραμμής (Σχήμα 1).

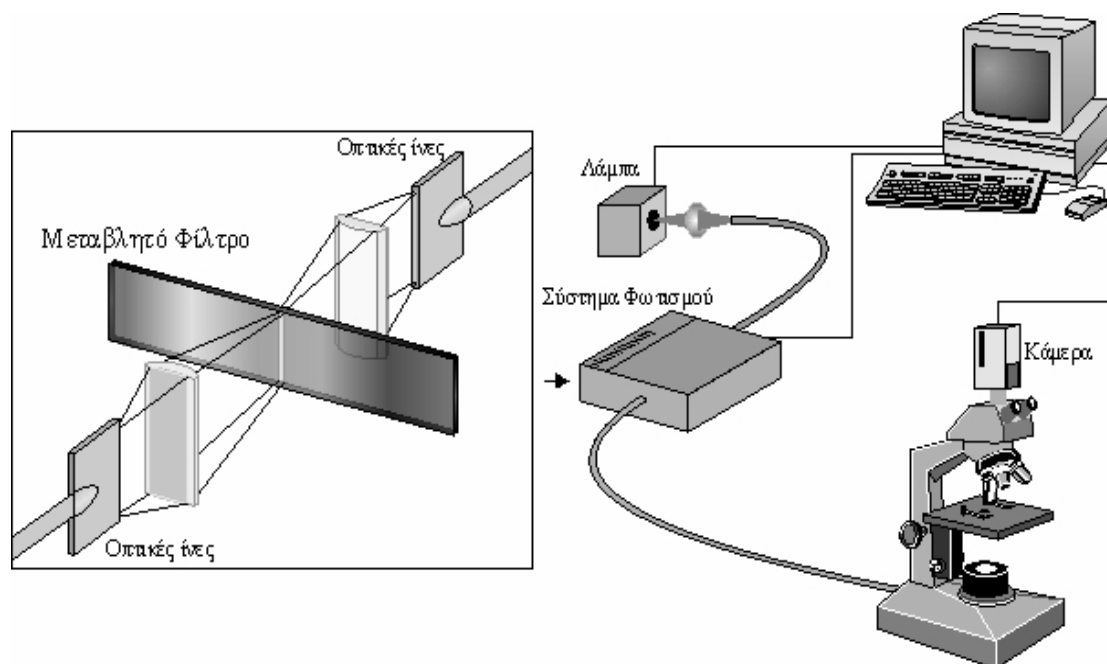


Σχήμα 1

2. Φασματικό μικροσκόπιο

Φασματική απεικόνιση έγινε με το φασματικό μικροσκόπιο το οποίο αναπτύχθηκε από το Ινστιτούτο Τεχνολογίας και Έρευνας (Ι.Τ.Ε.), το τμήμα Ηλεκτρονικής Δομής και Laser. Το σύστημα αυτό οποίο βασίζεται σε ένα σύστημα φωτισμού (μονοχρωμάτωρας) με μεταβλητό φίλτρο συμβολής (VIF) το οποίο συζεύγνυται στη διαδρομή φωτισμού του μικροσκοπίου. Αυτοί οι μονοχρωμάτρες δρουν ως τονικά οπτικά φίλτρα που επιτρέπουν τη λήψη μεγάλου αριθμού φασματικών εικόνων και ένα φάσμα για κάθε ψηφιακό σημείο. Τα μειονεκτήματα των συνήθων χρησιμοποιούμενων συστημάτων φασματικής απεικόνισης όπως περιορισμένο φασματικό εύρος, χαμηλή έξοδος φωτός, μειωμένη ευκρίνεια της εικόνας κατά τη διάρκεια αλλαγής των μηκών κυμάτων και μεγάλος χρόνος ολοκλήρωσης της διαδικασίας απαλείφονται με τη χρήση του συγκεκριμένου φασματικού μικροσκοπίου (Εικόνα 3).

Το VIF διαδίδει φως στην περιοχή του ορατού και του υπερύθρου, στα μήκη κύματος 400nm–1000nm. Η μετακίνηση στο



Εικόνα 3. Απεικόνιση του συστήματος φασματικού μικροσκοπίου

μονοχρωμάτωρα αντιστοιχεί σε 2.4-2.6nm ανά 1 mm. Με αυτόν το μονοχρωμάτωρα είναι δυνατή η φασματική ανάλυση που καθιστά εφικτή τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης στο ορατό και στο υπέρυθρο των χρωστικών που χρησιμοποιούνται στη μικροσκοπία. Μια εξωτερική λάμπα αλογόνου ισχύος 150W χρησιμοποιείται για το φωτισμό με τη βοήθεια μιας ηλεκτρονικής ίριδας. Ο μονοχρωμάτωρας με το VIF και η λάμπα αλογόνου ρυθμίζονται από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Δύο όμοιες συστοιχίες οπτικών ινών χρησιμοποιούνται για να μεταφέρουν το φως από την πηγή στο VIF και από το φίλτρο στη διαδρομή φωτισμού του μικροσκοπίου. Η λήψη των φασματικών εικόνων γίνεται με τη βοήθεια μιας 8-bit ασπρόμαυρης

κάμερας υψηλής ανάλυσης (CCD) της οποίας η ευαισθησία και η ενίσχυση ελέγχονται από τον υπολογιστή. Η κάμερα μπορεί να λαμβάνει εικόνες 15-30/δευτερόλεπτο. Η έγχρωμη κάμερα καταγράφει την ένταση του διερχόμενου φωτός για κάθε ψηφιακό σημείο.

Το σύστημα αυτό που περιγράφηκε και αποτελείται από την CCD κάμερα, τον VIF μονοχρωμάτωρα, την πηγή φωτός και το λογισμικό του φασματικού αυτού συστήματος απεικόνισης λειτουργεί σε δύο φάσεις (φασματοσκοπία και φασματομετρία). Η πρώτη δίνει τη δυνατότητα επιλογής του μήκους κύματος απεικόνισης και της επίδειξης της επιθυμητής φασματικής εικόνας ενώ η δεύτερη κάνει συντονισμένη φασματική σάρωση και λήψη εικόνων και τελικό υπολογισμό ενός πλήρους φάσματος απορρόφησης σε κάθε σημείο της εικόνας. Στη φάση φασματομετρίας το σύστημα εκτελεί συγχρονισμένη ρύθμιση μήκους κύματος με λήψη και αποθήκευση της υπό ανάλυση περιοχής. Από το αποθηκευμένο σύνολο των φασματικών εικόνων ένα φάσμα απορρόφησης μπορεί να υπολογιστεί και να επιδειχτεί για κάθε σημείο της εικόνας. Η σύνθεση του φάσματος απορρόφησης της συνολικής εικόνας γίνεται από τα φάσματα απορρόφησης 600X600 ψηφιακών σημείων (pixels) ανά εικόνα. Με την περιγραφόμενη διάταξη μπορούν να ληφθούν και να επεξεργαστούν σε περίπου ένα λεπτό ένα εκατομμύριο φάσματα .

2.1 Ποσοτική εκτίμηση φασματικών διαφορών

Το σύστημα κάνει αυτόματη φασματική σάρωση του υπό εξέταση παρασκευάσματος και τα φάσματα απορρόφησης στην περιοχή 400nm-

1000nm μετρώνται για κάθε σημείο της εικόνας. Με βάση τα μετρούμενα φάσματα ο χρήστης μπορεί να καθορίσει τις απεικονιστικές περιοχές που αντιστοιχούν, α) στη μέγιστη απορρόφηση των κυτταρικών δομών που ενδιαφέρουν, β) στη μέγιστη διαφορά μεταξύ κυτταρικών δομών με διαφορετική βιοχημική σύνθεση.

Αφ'ότου έχουν επιλεγεί οι φασματικές περιοχές (400nm-1000nm), οι φασματικές εικόνες από αυτές τις περιοχές ανακαλούνται από το αποθηκευμένο σύνολο φασματικών εικόνων και η φασματική τους διαφορά υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (5). Η δισδιάστατη κατανομή που προκύπτει από τις τιμές της φασματικής διαφοράς δίνει τη διαφορά φασματικής απορρόφησης των εξεταζόμενων κυτταρικών δομών στα προκαθορισμένα μήκη κύματος. Μια ψευδοχρωματική κλίμακα περιγράφει την κατανομή της έντασης που κυμαίνεται από το μπλε στο κόκκινο και είναι ενδεικτική της διαφοράς απορρόφησης όπου στο μπλε καταγράφεται το ελάχιστο και στο κόκκινο το μέγιστο.

2.2 Μελέτη επιχρισμάτων μυελού των οστών μετά από χρώση

Διάφορες χρωστικές χρησιμοποιούνται στην Αιματολογία και Κυτταρολογία για την ανάδειξη και ανίχνευση των διαφόρων τύπων κυττάρων. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι η MGG [167-170].

Τα βιοχημικά συστατικά των κυττάρων είναι ιστόνες, μη ιστόνες, ανόργανα υλικά, νερό, DNA και RNA. Το περιεχόμενο όλων αυτών ποικίλλει όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων αλλά επίσης κατά την

κακοήθη εξαλλαγή. Η αλληλεπίδραση των χρωστικών με τα συστατικά των κυττάρων δίνει το χαρακτηριστικό χρώμα.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της χρώσης MGG τα επιχρίσματα εμβαπτίζονται σε δύο διαλύματα χρωστικών, το ένα της May-Grunwald (MG) και το άλλο της Giemsa (G).

Η May-Grunwald χρωστική αποτελείται από Κυανούν του Μεθυλενίου (Methylene Blue MB) και Ηωσίνη Y (Eosin EY) σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Η χρωστική Giemsa αποτελείται από τα ίδια συστατικά με την MG και επιπλέον περιέχει Κυανούν της Ανιλίνης που περιλαμβάνει τα οξειδωτικά παράγωγα του Κυανού του Μεθυλενίου. Το περιεχόμενο της Giemsa στα οξειδωτικά παράγωγα του Κυανού του Μεθυλενίου (azures A, B, C και θειονίνη) καθορίζει τα ακριβή φασματικά χαρακτηριστικά απορρόφησης της.

Η χρώση των κυττάρων του αίματος με την MGG δίνει χαρακτηριστικά χρώματα στα διάφορα κυτταρικά συστατικά, ως επί το πλείστον μπλε, μωβ και ροζ. Για παράδειγμα, ο πυρήνας των λευκών αιμοσφαιρίων βάφεται μωβ, το κυτταρόπλασμα των λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων μπλε και το οξύφιλο κυτταρόπλασμα των πολυμορφοπυρήνων και των ερυθροκυττάρων ροζ. Ο διαφορετικός χρωματισμός των συστατικών των κυττάρων είναι το αποτέλεσμα των μεταχρωματικών ιδιοτήτων της χρωστικής May Grunwald και των οξειδωτικών παραγώγων της (azures).

Η μεταχρωμασία αναφέρεται στη διαδικασία και αλλαγή των φασματικών χαρακτηριστικών που γίνονται όταν οι χρωστικές συνδέονται σε

συγκεκριμένες ουσίες όταν είναι παρούσες σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις διαλυμάτων. Αν και ο ακριβής φυσικοχημικός μηχανισμός δεν είναι ακριβώς γνωστός, πιστεύεται ότι αυτή η αλλαγή οφείλεται στη μετατροπή του μονομερούς της χρωστικής που υπάρχει στο αρχικό διάλυμα, στο διμερές ή πολυμερές στη συνδεδεμένη χρωστική ή στα άλλα διαλύματα. Η αλλαγή από μονομερές σε πολυμερές έχει ως αποτέλεσμα στο φάσμα απορρόφησης της χρωστικής τη μείωση του μέγιστου της χρωστικής του μονομερούς και τη μετατόπιση σε μικρότερο μήκος κύματος που οφείλεται στο δημιουργούμενο πολυμερές.

Οι χρωστικές από την MGG προσκολλώνται στις κυτταρικές δομές με ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αντιδράσεις και ο βαθμός της προσλαμβανόμενης χρωστικής καθορίζεται από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Ειδικότερα, οι αρνητικά φορτισμένες ομάδες των νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών που περιέχονται στους πυρήνες των κυττάρων και το κυτταρόπλασμα των λευκών αιμοσφαιρίων συνδέονται με τις θετικά φορτισμένες ομάδες των MB και A χρωστικών και δημιουργούν το σύμπλεγμα MB-A-κύτταρο με ουδέτερο ή θετικό φορτίο. Αυτό το σύμπλεγμα κατόπιν συνδέεται με την αρνητικά φορτισμένη EY και δημιουργεί το μεγαλύτερο σύμπλεγμα MB-A-EY-κύτταρο. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μεταχρωμασία στις MB και A χρωστικές. Ανάλογα από το βαθμό της προκαλούμενης μεταχρωμασίας, τα συμπλέγματα MB-A-EY-κύτταρο λαμβάνουν χρώματα που διαφοροποιούνται από βαθύ μωβ σε μπλε.

Στην περίπτωση των ηωσινόφιλων και των ερυθροκυττάρων, η σύνδεση με τις MG και A χρωστικές είναι λιγότερη έντονη. Η παρουσία θετικών φορτισμένων ομάδων σε αυτά τα κύτταρα ευοδώνει τη σύνδεση των δομών τους με την EY. Τα συμπλέγματα EY-κύτταρο δίνουν ροζ χρωματισμό.

Βάση των ανωτέρω, τα φάσματα απορρόφησης κυτταρικών δομών με την παραπάνω χρώση εξαρτώνται από τα βιοχημικά συστατικά τους. Επομένως μπορεί να προταθεί ότι τα φασματικά χαρακτηριστικά των κεχρωσμένων με MGG χρώση μπορούν να δώσουν σημαντική πληροφορία για τα βιοχημικά συστατικά των κυττάρων. Η εκτίμηση των φασματικών χαρακτηριστικών απορρόφησης δίνει σημαντική πληροφορία που δε διακρίνεται με το κοινό μικροσκόπιο με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να συμβάλλει στην τυποποίηση και ταξινόμηση των κυττάρων.

3. Στατιστική ανάλυση

Ο υπολογισμός των αποτελεσμάτων εκφράζεται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση. Η σύγκριση της FD και της διαφοράς της φασματικής απορρόφησης μεταξύ των ομάδων έγινε με unpaired t-test για ίσες και άνισες διακυμάνσεις για τη σύγκριση των μέσων τιμών και τη συσχέτιση των κατανομών μεταξύ τους. Θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική η δοκιμασία με πιθανότητα λάθους μικρότερη του 0.05.

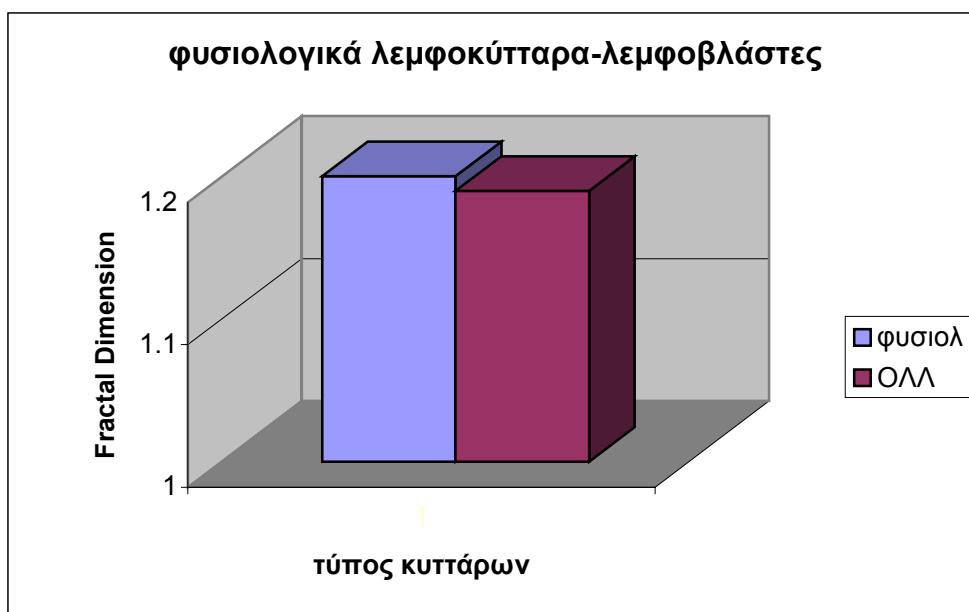
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μορφοκλασματική διάσταση φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών

Έγινε μέτρηση της FD του περιγράμματος που σχηματίζει η κυτταροπλασματική μεμβράνη των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών μετά από μετατροπή του σε ψηφιακή εικόνα άσπρου-μαύρου σε μεγέθυνση 100x όπου 1 pixel αντιστοιχεί σε 4 μm . Η μέτρηση έγινε με τη μέθοδο της καταμέτρησης τετραγώνων που περιγράφηκε ήδη. Στην εικόνα 1 και 2 φαίνεται πως απεικονίζονται τα κύτταρα στην οθόνη του υπολογιστή.

Ο προσδιορισμός της FD έγινε σε 300 φυσιολογικά λεμφοκύτταρα και 300 λεμφοβλάστες μορφολογίας L1.

Η τιμή της FD των δύο κυτταρικών πληθυσμών ήταν 1.21 ± 0.04 για φυσιολογικά λεμφοκύτταρα και 1.19 ± 0.03 για λεμφοβλάστες αντίστοιχα. Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική ($p=0.19$). Όμως όλες οι τιμές των λεμφοβλαστών παρουσιάζουν μικρότερη τιμή σε σχέση με των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Ο μέσος όρος των FD φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών

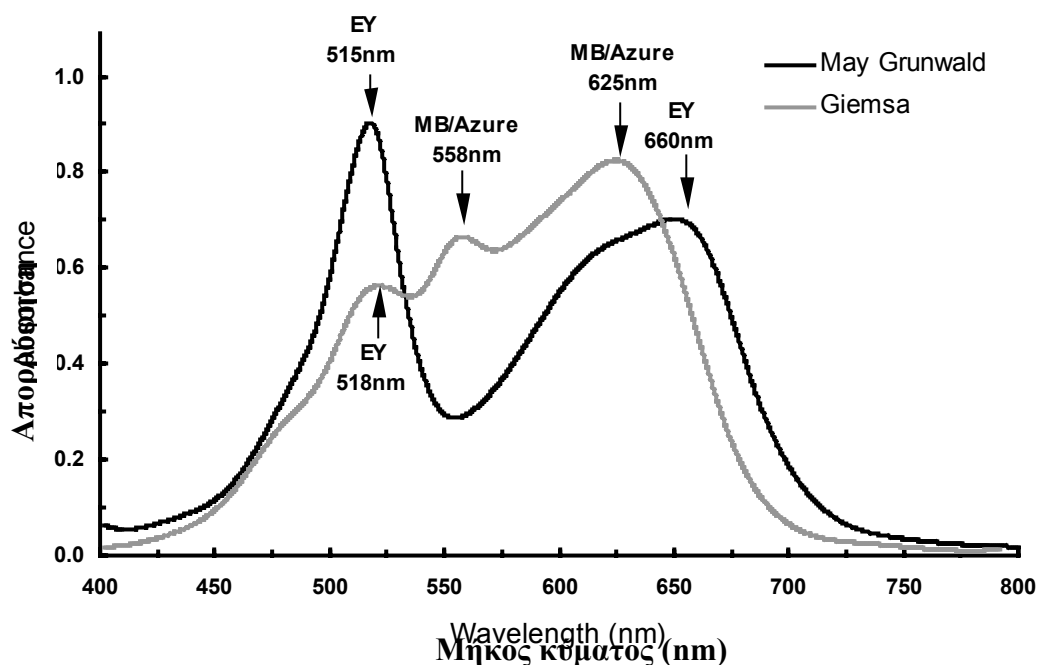
2. Φασματική ανάλυση φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων

2.1 Φασματική ανάλυση κυττάρων μετά από χρώση

Αρχικά παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης των διαλυμάτων της MGG χρωστικής και διαφόρων κυττάρων από επίχρισμα μυελού των οστών φυσιολογικού παιδιού. Υπολογίστηκε ένα πλήρες φάσμα απορρόφησης για κάθε σημείο της εικόνας των χρωματισμένων κυττάρων με το φασματικό μικροσκόπιο.

Στο Σχήμα 3 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης σε σχέση με το μήκος κύματος των May-Grunwald και Giemsa χρωστικών. Οι μέγιστες τιμές των μονομερών και των διμερών του Κυανού του Μεθυλενίου (MB) είναι στα 660nm και 610nm αντίστοιχα. Η παρουσία των οξειδωτικών παραγώγων του

MB (Azures A, B, C, θειονίνη) φαίνεται στην καμπύλη απορρόφησης της Giemsa όπου παρατηρείται μείωση του μέγιστου του MB σε μικρότερα μήκη κύματος σε σχέση με τη MG. Τα οξειδωτικά αυτά παράγωγα του Κυανού του Μεθυλενίου (Azures) καταγράφουν μέγιστες τιμές στα 558nm και 625nm. Στη May-Grunwald χρώση η Ηωσίνη Υ (EY) απορροφά στα 515nm ενώ στη Giemsa στα 518nm.



Σχήμα 3. Τα φάσματα απορρόφησης των χρωστικών May-Grunwald και Giemsa

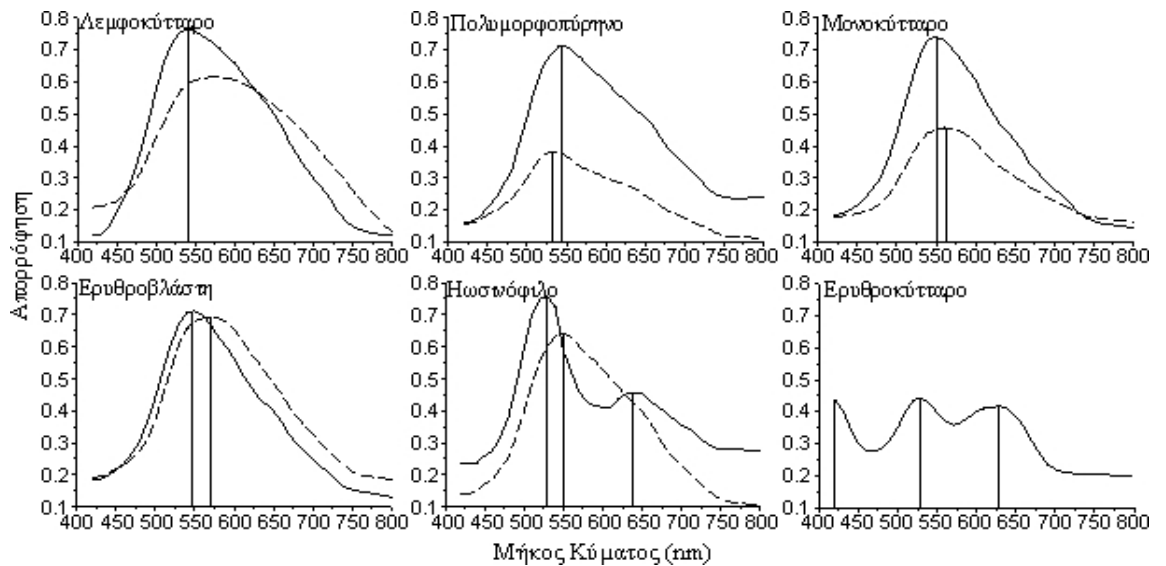
Η Εικόνα 4 δείχνει ένα πεδίο αιματολογικού παρασκευάσματος μυελού των οστών από φυσιολογικό παιδί που έχει χρωματιστεί με MGG. Το πεδίο περιέχει λεμφοκύτταρο, ερυθροβλάστη, μονοκύτταρο, ηωσινόφιλο, πολυμορφοπύρηνο, ερυθροκύτταρο. Είναι φανερό ότι τα συμπλέγματα MGG-

κύτταρο λαμβάνουν χρώματα που κυμαίνονται από μπλε σε μωβ. Ο διαφορετικός χρωματισμός είναι φανερός όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών κυττάρων αλλά και μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος στο ίδιο κύτταρο. Η ποσοτική μέτρηση του χρωματισμού αναδεικνύεται από το φάσμα απορρόφησης που ορίζεται για το κάθε σημείο της εικόνας.



Εικόνα 4. Πεδίο φυσιολογικού επιχρίσματος μυελού των οστών

Στο Σχήμα 4 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος των κυττάρων της εικόνας 4. Τα φάσματα δε δείχνουν διαφορές στην απορρόφηση στα 800nm-1000nm. Η σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης της MG και Giemsa με τα φάσματα απορρόφησης των κυττάρων αναδεικνύει τις αλλαγές των ιδιοτήτων των χρωστικών όταν συνδέονται με τα συστατικά των κυττάρων. Οι διακριτές φασματικές κορυφές των διαλυμάτων μετασηματίστηκαν σε μια μοναδική κορυφή ευρείας περιοχής μεταξύ 530-570nm .



Σχήμα 4. Η απορρόφηση σε σχέση με το μήκος κύματος πυρήνα και κυτταροπλάσματος διαφόρων τύπων κυττάρων χρωματισμένων με MGG

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης πυρήνα και κυτταροπλάσματος για κάθε τύπο κυττάρου. Στα ερυθροκύτταρα τα οποία δεν είναι εμπύρρηνα και περιέχουν αιμοσφαιρίνη, η Ηωσίνη Υ απορροφά στα 530nm, τα οξειδωτικά παράγωγα του Κυανού του Μεθυλενίου (MB Azures) στα 630nm και η αιμοσφαιρίνη στα 420nm.

Τύπος κυττάρου	Πυρήνας/nm	Κυτταρόπλασμα/ nm
Λεμφοκύτταρο	535	570
Πολυμορφοπύρηνο	545	535
Μονοκύτταρο	550	560
Ερυθροβλάστη	545	570
Ηωσινόφιλο	530, 640	550
Ερυθροκύτταρο	-	420, 530, 630

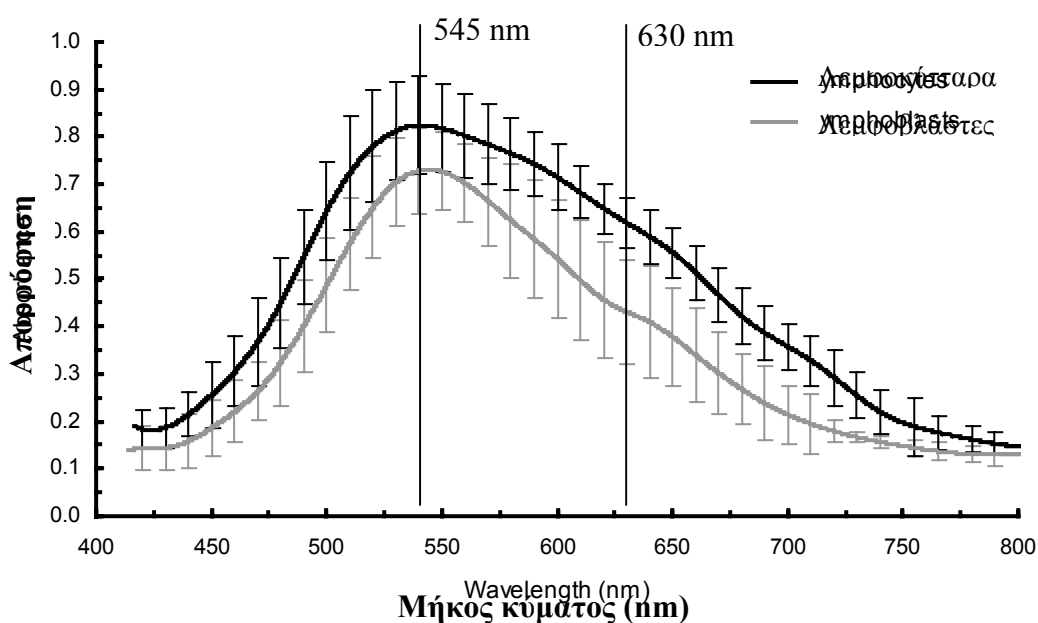
Πίνακας 1.

Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι τα φάσματα απορρόφησης των κεχρωσμένων κυτταρικών δομών εξαρτώνται από τα βιοχημικά τους συστατικά επομένως παρουσιάζει ενδιαφέρον η μελέτη των φασματικών χαρακτηριστικών σε διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων ως μέσου σύγκρισης και συλλογής πληροφοριών.

2.2 Διάκριση φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών με τη φασματική ανάλυση

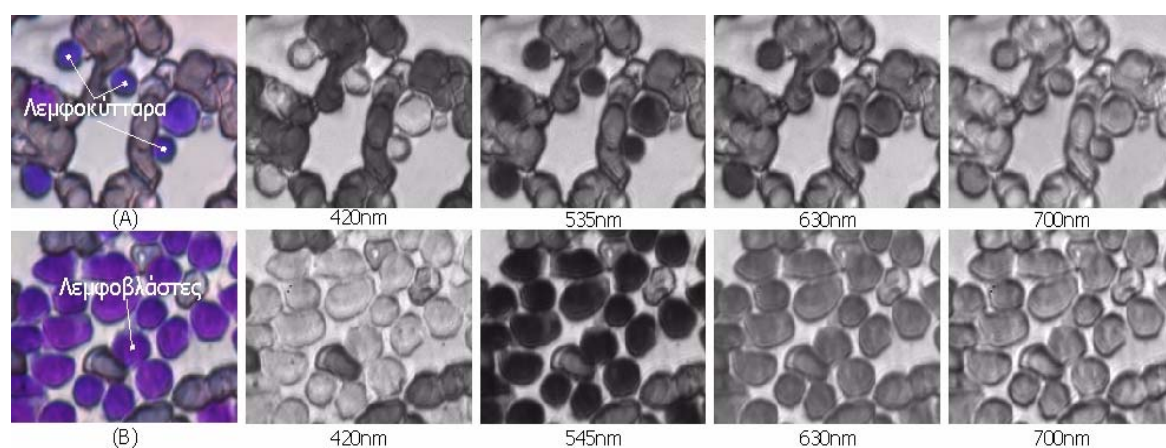
Στην παρούσα μελέτη προτείνεται νέα μέθοδος αναγνώρισης κυττάρων σε παρασκευάσματα που έχουν ήδη επιστρωθεί και βαφεί για μελέτη στο κοινό μικροσκόπιο.

Η μέθοδος βασίζεται στη συγκριτική εκτίμηση των φασματικών χαρακτηριστικών απορρόφησης των λεμφοβλαστών σε σχέση με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα. Για να καθορίσουμε τα φασματικά χαρακτηριστικά των παραπάνω δύο κυτταρικών τύπων μετρήσαμε τα φάσματα απορρόφησης 300 πυρήνων λεμφοβλαστών και 300 πυρήνων φυσιολογικών λεμφοκυττάρων. Η μέση τιμή απορρόφησης σε σχέση με το μήκος κύματος φαίνεται στο Σχήμα 5.



Σχήμα 5. Μέσος όρος φασμάτων απορρόφησης πυρήνων λεμφοκυττάρων και πυρήνων λεμφοβλαστών

Κάθε καμπύλη είναι μέση τιμή από τα φάσματα απορρόφησης πυρήνων φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και πυρήνων λεμφοβλαστών. Τα φάσματα απορρόφησης των λεμφοκυττάρων επικαλύπτουν αυτά των λεμφοβλαστών σε όλη την περιοχή έχοντας μόνο μικρές φασματικές διαφορές. Η κορυφή απορρόφησης των λεμφοβλαστών καταγράφεται στα 545nm και των λεμφοκυττάρων στα 535nm. Τα λεμφοκύτταρα έχουν αυξημένη μέση απορρόφηση σε σχέση με τους λεμφοβλάστες η οποία στα 630nm είναι πιο εμφανής. Σ' αυτή τη φασματική περιοχή καταγράφεται η μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο φασμάτων. Επιπλέον η σταθερή απόκλιση (Standard Deviation) της απορρόφησης παίρνει την ελάχιστη της τιμή. Η φασματική εξάρτηση της λαμβανόμενης αντίθεσης μεταξύ ΟΛΛ και φυσιολογικών λεμφοκυττάρων φαίνεται στην Εικόνα 5 στις εικόνες των 630nm.



Εικόνα 5. (Α) Λεμφοκύτταρα φυσιολογικού μυελού οστών και (Β) λεμφοβλάστες μυελού ΟΛΛ σε διάφορα μήκη κύματος

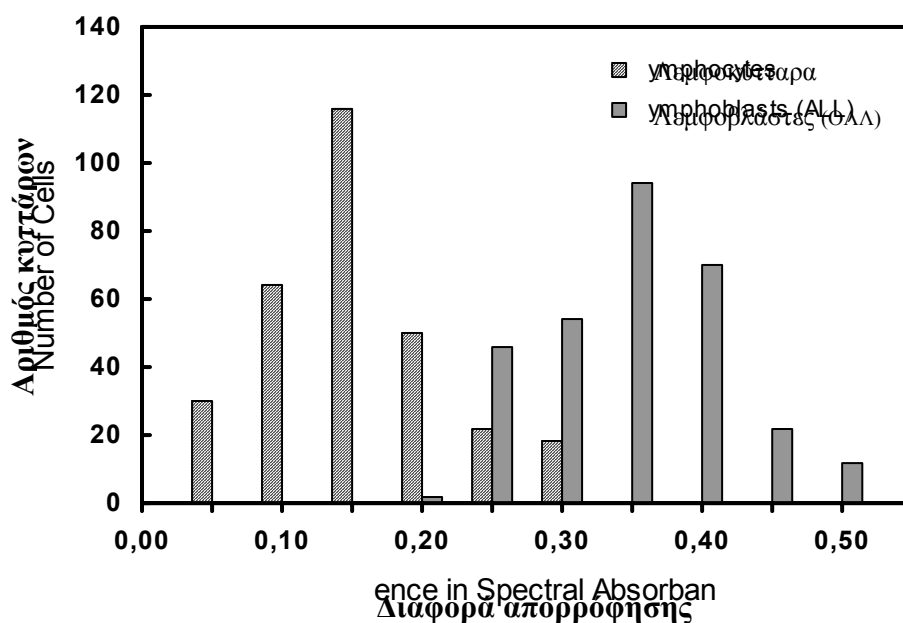
Απεικονίζονται φυσιολογικά λεμφοκύτταρα (εικόνα 5A), ΟΛΛ λεμφοβλαστών (εικόνα 5B) και ένα υποσύνολο φασματικών εικόνων των ίδιων κυττάρων στα 420nm, 535nm, 545nm, 630nm, 700nm. Με βάση τις φασματικές καμπύλες του Σχήματος 5 οι εικόνες στα 535nm και 545nm αντιστοιχούν στη μέγιστη απορρόφηση για λεμφοκύτταρα και λεμφοβλάστες αντίστοιχα. Στα 630nm καταγράφεται η μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ τους. Όλη αυτή η πληροφορία δεν είναι ορατή με το κοινό μικροσκόπιο και αυτοί οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί είναι σχεδόν όμοιοι μορφολογικά, με τα φασματικά χαρακτηριστικά τους να διαφέρουν στα 630nm.

Παρατηρείται σημαντική μείωση της απορρόφησης των λεμφοβλαστών σε σχέση με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα συνολικά στις δύο καμπύλες. Σε μικρότερα και μεγαλύτερα μήκη κύματος η απορρόφηση και η λαμβανόμενη αντίθεση προοδευτικά μειώνεται. Αυτό φαίνεται στις εικόνες με 420nm και 700nm. Τα ερυθροκύτταρα καταγράφονται με μέγιστη αντίθεση στα 420nm εξαιτίας της αυξημένης απορρόφησης από τα μόρια αιμοσφαιρίνης.

Για να ποσοτικοποιήσουμε τις διαφορές των 2 κυτταρικών πληθυσμών μετρήσαμε τη διαφορά απορρόφησης A_r με βάση την εξίσωση 7 για 300 κύτταρα με ΟΛΛ από 20 παιδιά και 300 κύτταρα από 20 παιδιά με φυσιολογικό μυελό των οστών. Επιλέχθηκε η διαφορά απορρόφησης στα μήκη κύματος που απορροφούν μέγιστα τα κύτταρα και που έχουν τη μεγαλύτερη αντίθεση, δηλαδή λ_i στα 545nm και λ_j στα 630nm αντίστοιχα.

Στο Σχήμα 6 φαίνεται το ιστόγραμμα της υπολογιζόμενης διαφοράς απορρόφησης για τους 2 πληθυσμούς. Το ιστόγραμμα δείχνει ότι τα κύτταρα

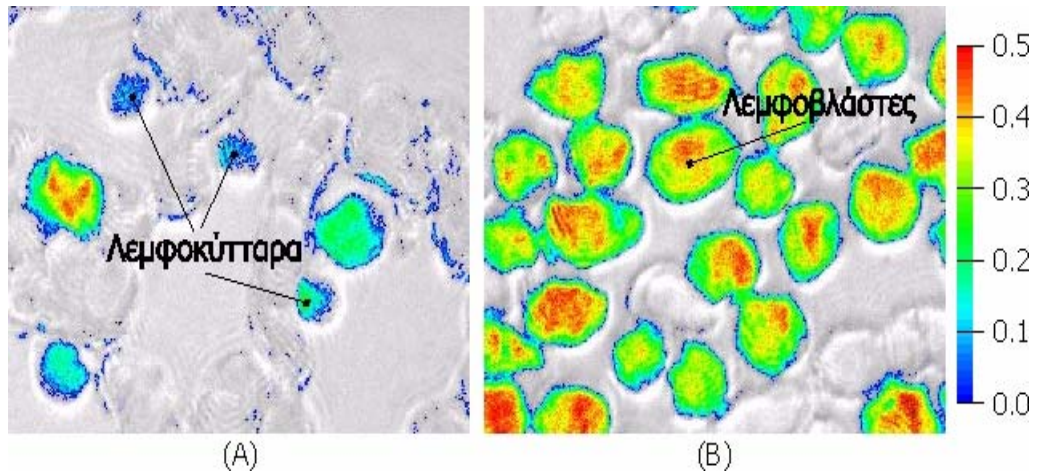
διακρίνονται σε 2 μείζονες πληθυσμούς με βάση τη φασματική διαφορά στο 545nm και 630nm. Οι μέσες τιμές είναι 0.352 ± 0.055 για τους λεμφοβλάστες και 0.149 ± 0.064 για τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα. Η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική ($p < 0.0001$).



Σχήμα 6. Ιστόγραμμα διαφοράς απορρόφησης στα 630nm και 545nm λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών

Στην εικόνα 6 φαίνονται τεχνητά με χρωματισμό, οι προαναφερόμενες διαφορές απορρόφησης των λεμφοκυττάρων (εικόνα 5A) και λεμφοβλαστών (εικόνα 5B) στα μήκη κύματος 545nm και 630nm οι οποίες κυμαίνονται όπως φαίνεται και σε κλίμακα από 0 έως 0.5 που στην έγχρωμη εικόνα αντιστοιχούν στην περιοχή από το μπλε έως το κόκκινο. Τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα έχουν μικρή διαφορά απορρόφησης (μέση τιμή 0.149) και

στην κλίμακα είναι πιο κοντά στο μπλε, ενώ οι λεμφοβλάστες μεγαλύτερη διαφορά (μέση τιμή 0.352) και στην κλίμακα πιο κοντά στο κόκκινο.



Εικόνα 6. Ψευδοχρωματική εικόνα της διαφοράς απορρόφησης φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μέτρηση της FD έχει περάσει από την αρχική της εφαρμογή σε ακανόνιστα σχήματα στη φύση σε εφαρμογές στην ιατρική [20]. Στην ιατρική απεικόνιση όπως η μαστογραφία [67] ή η μαγνητική τομογραφία του νευρικού συστήματος [30] η μέτρηση και καθορισμός της FD σε φυσιολογικές δομές και η σύγκρισή τους με τις παθολογικές μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση και διάγνωση.

Στην καρδιολογία με το ηλεκτροκαρδιογράφημα [22] και στη νευρολογία με το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα [40], η επαναληπτικότητα και η μέτρηση της fractal δομής απεικόνισης διαστημάτων και κυμάτων δίνει πληροφορία για προγνωστική αξία και εξέλιξη μιας νόσου.

Η διάταξη και ανάπτυξη των αγγείων σε διάφορες παθήσεις [56] αλλά και σε όγκους όπου παρατηρείται αυξημένη αγγειογένεση δίνει τη δυνατότητα με τον καθορισμό της FD, της διάκρισης των παθολογικών δομών και της προγνωστικής αξίας των τιμών αυτών [83-85].

Σε ιστολογικά παρασκευάσματα η τιμή της FD που προκύπτει κατά τη μέτρηση στα όρια παθολογικού-φυσιολογικού ιστού όπως στο μελάνωμα [71,72] αλλά και σε άλλους όγκους δέρματος μπορεί να οδηγήσει σε συμπεράσματα για το βαθμό διήθησης και κακοήθειας. Επίσης έχει μελετηθεί ο βαθμός κακοήθειας και ο τύπος ιστολογικών παρασκευασμάτων όγκων που εξαιρούνται [74].

Σε επίπεδο κυττάρου όλες οι μελέτες έχουν γίνει με τη χρησιμοποίηση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου [88]. Έχουν μελετηθεί οι FD

κυτταροπλασματικών-πυρηνικών μεμβρανών αλλά και αυτή της δομής της χρωματίνης στον πυρήνα φυσιολογικών και παθολογικών-κακόηθων κυττάρων [92].

Έχουν μελετηθεί οι μεταβολές της FD της πυρηνικής χρωματίνης σε κύτταρα κατά σε πρόωρα στάδια διαδικασίας απόπτωσης [95]. Επίσης οι διαφορές τιμών FD των κυτταροπλασματικών μεμβρανών λευχαιμικών και φυσιολογικών λεμφοκυττάρων [100,101].

Με την παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια καθορισμού της FD της κυτταροπλασματικής μεμβράνης κυττάρων της πιο συχνής κακοήθειας της παιδικής ηλικίας, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε η FD στους λεμφοβλάστες μορφολογίας L1 συγκριτικά με φυσιολογικά λεμφοκύτταρα τα οποία παρουσιάζουν παρόμοια μορφολογία και είναι δύσκολη η διάκρισή τους με το κοινό μικροσκόπιο.

Οι μέχρι τώρα μελέτες στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δείξει ότι η πολυπλοκότητα και το ακανόνιστο σχήμα της μεμβράνης των λευχαιμικών κυττάρων διαφέρουν από αυτά των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων. Όσο πιο κακόηθες είναι το κύτταρο τόσο λιγότερο ακανόνιστο είναι το περίγραμμα της μεμβράνης που το περιβάλλει [100-103].

Αποτελεί προσπάθεια για πρώτη φορά εφαρμογής της μέτρησης FD σε λεμφοβλάστες και φυσιολογικά λεμφοκύτταρα της παιδικής ηλικίας με τη μέγιστη μεγέθυνση που μπορεί να προσφέρει το κοινό μικροσκόπιο και όχι με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που θα μπορούσε έτσι να αποτελέσει εύκολα εφαρμόσιμη μέθοδο στην κλινική πράξη. Ιδιαίτερα όχι τόσο στην

πρωτοδιάγνωση όπου η διήθηση του μυελού των οστών είναι σχεδόν πλήρης με λεμφοβλάστες, αλλά στην παρακολούθηση των ασθενών που πολλές φορές είναι δύσκολη η διάγνωση της υποτροπής με το κοινό μικροσκόπιο και γίνονται επιπλέον και άλλες μέθοδοι (ανοσοφαινότυπος, κυτταρογενετική).

Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορετικές τιμές FD μεταξύ των δύο κυτταρικών πληθυσμών με τις τιμές των λεμφοβλαστών να είναι μικρότερες από αυτές των λεμφοκυττάρων, αποτέλεσμα που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία. Η διαφορά όμως των τιμών δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0.19$) και η διάκριση των κυτταρικών πληθυσμών με τη μέθοδο της FD στη μεγέθυνση αυτή που προτείνουμε δεν είναι απόλυτα αξιόπιστη.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά μέθοδοι υπολογισμού των φασματικών χαρακτηριστικών του πυρήνα φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών με τις οποίες αποδεικνύεται ότι είναι δυνατή η διάκρισή τους με μεγάλη αξιοπιστία.

Η δομή των κυττάρων και ειδικότερα του πυρήνα ουσιαστικά αντανακλά τη μεταβολική κατάσταση και τη φυσική συσχέτιση των βιοχημικών συστατικών του. Στην κακοήθη εξαλλαγή λαμβάνουν χώρα μια σειρά από δομικές και βιοχημικές μεταβολές. Αυτές οι μεταβολές σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι ορατές μετά από χρώση με το κοινό μικροσκόπιο.

Με το φασματικό μικροσκόπιο και τη μέθοδο φασματικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε είναι εφικτή η διάκριση διαφόρων τύπων κυττάρων με βάση την ανίχνευση, ταυτοποίηση και χαρτογράφηση της κατανομής των απορροφούμενων χρωστικών από τα κύτταρα καθώς και των φασματικών

χαρακτηριστικών απορρόφησής τους [171-174]. Η πληροφορία που λαμβάνεται βασίζεται στη βιοχημική, λειτουργική και δομική κατάσταση του κυττάρου και δίνει έτσι τη δυνατότητα ανάδειξης διαφορών σε παραπλήσια μήκη κύματος που δεν είναι ορατές με το κοινό μικροσκόπιο.

Το συγκεκριμένο σύστημα που χρησιμοποιήθηκε και βασίζεται στη σύγχρονη τεχνολογία παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα με κύρια την ευρεία φασματική περιοχή λειτουργίας, την υψηλή διαπερατότητα και φασματική ανάλυση σε συνδυασμό με την ταχύτατη λήψη μεγάλου αριθμού φασματικών εικόνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παροχή πληροφορίας με μορφή μεγάλου αριθμού εικόνων. Οι εικόνες αντιστοιχούν σε διαφορετικές περιοχές μήκους κύματος οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη λήψη περισσότερο από ένα εκατομμύριο φασμάτων με καθένα να αντιστοιχεί σε ένα σημείο της εικόνας. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι σημαντικό για την ανάλυση ανομοιογενών μικροσκοπικών υλικών αφού η αναλυτική πληροφορία μπορεί να προέλθει από κάθε σημείο του εξεταζόμενου δείγματος .

Η χρήση διαφόρων χρωστικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τη μελέτη των ενδοκυττάρων μοριακών λειτουργιών και διεργασιών [175,176]. Επίσης με τις χρωστικές και τις φασματικές τους ιδιότητες μπορούν να ανιχνευθούν τα κυτταρικά οργάνια και ο τρόπος λειτουργίας τους μέσα στο κύτταρο [177,178].

Η ποσοτικοποίηση και η μέτρηση δεικτών με τη βοήθεια της φασματικής απεικόνισης έχει χρησιμοποιηθεί στη διαγνωστική [179]. Ανάλυση ιστολογικών παρασκευασμάτων μετά από χρώσεις και η διαφοροποίηση της

απορρόφησης σε σχέση με τα φασματικά χαρακτηριστικά έχει χρησιμοποιηθεί για τη ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών αντιγόνων και το βιοχημικό περιεχόμενο των δομών [180-182]. Στην αγγειογένεση των όγκων, ο βαθμός της ανάπτυξης των αγγείων έχει μετρηθεί ποσοτικά μέσω των ανοσοσημασμένων αγγειογενετικών ενδοθηλιακών κυττάρων στα αντίστοιχα δείγματα [183]. Οι υποδοχείς οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού και η ποσοτική καταγραφή της έκφρασής τους ανάλογα με τον υπολογισμό της πρόσληψης της χρωστικής από τον ιστό όπως επίσης και η προγνωστική τους αξία αποτελεί μια ακόμη εφαρμογή της φασματικής απεικόνισης [184,185].

Η πρόωρη ανίχνευση και καταγραφή προκαρκινικών και καρκινικών περιοχών του τραχήλου της μήτρας έχουν μελετηθεί με τη μη-επεμβατική μέθοδο της φασματοσκοπίας και ποσοτική εκτίμηση των διαφορών των μετά από χρώση κυττάρων [186].

Η φασματική απεικόνιση επίσης έχει δώσει ώθηση στην κυτταρογενετική με τη χρήση φθορίζοντος υβριδισμού *in situ* αλλά και άλλων παρόμοιων μεθόδων (Spectral Karyotyping) με την ανάλυση και διάγνωση πολύπλοκων καρυοτύπων, χρωμοσωμικών μεταθέσεων και αναδιατάξεων χωρίς φασματική αλληλοεπικάλυψη [187,188].

Οι αλλαγές της δομής του πυρήνα κυττάρων που σχετίζονται με τη διαδικασία της απόπτωσης έχουν μελετηθεί εκτός από τη μέτρηση της FD και τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου που ήδη αναφέρθηκε και με την καταγραφή των φασματικών χαρακτηριστικών τους με φασματικά συστήματα απεικόνισης [189].

Στην παρούσα μελέτη με το σύγχρονο σύστημα φασματικής απεικόνισης για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκαν λεμφοβλάστες μορφολογίας L_1 από περιπτώσεις ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας που σε πολλές περιπτώσεις είναι δύσκολο να διακριθούν από τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα με το κοινό μικροσκόπιο. Περιγράφηκε η διαφοροποίηση των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων από λεμφοβλάστες L_1 και καταγράφηκαν οι διαφορές τους με το φασματικό μικροσκόπιο. Διαπιστώθηκε ότι τα 535nm και 545nm αντιστοιχούν στη μέγιστη απορρόφηση για λεμφοκύτταρα και λεμφοβλάστες αντίστοιχα. Στα 630nm καταγράφηκε η μέγιστη διαφοροποίηση μεταξύ τους.

Αυτή η σημαντική μείωση της απορρόφησης των λεμφοβλαστών σε σχέση με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα στα 630nm ποσοτικοποιήθηκε με τον ορισμό της διαφοράς απορρόφησης μεταξύ μήκους κύματος 545nm και 630nm η οποία είναι στατιστικώς σημαντική μεταξύ των δύο κυτταρικών πληθυσμών ($p < 0.0001$).

Μέχρι σήμερα η μέτρηση κάποιων μορφολογικών παραμέτρων αλλά και παραμέτρων χρώματος με βάση χρωματικά μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση κυτταρικών πληθυσμών όταν η μορφολογία μόνη με το κοινό μικροσκόπιο δε βοηθάει τη διάγνωση, εναλλακτικά, από μεθόδους που ήδη χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη (ανοσοφαινότυπος, μοριακή βιολογία, κυτταρογενετική). Έχει επίσης προταθεί σε πρόσφατη μελέτη ένα σύστημα κατάταξης των διαταραχών των κυττάρων Β-σειράς των ενηλίκων χρησιμοποιώντας μορφομετρικές και μετρήσεις των χρωστικών [190].

Έχουν επιπλέον μελετηθεί τα φασματικά χαρακτηριστικά κυτταρικών πληθυσμών όπως ΧΛΛ [150,191], μη Hodgkin λεμφωμάτων [152], του ηπατοκυτταρικού καρκίνου [153], καρκίνου του μαστού [156] και η φασματική απεικόνιση έχει προταθεί ως επιπλέον μέθοδος για τη διάκρισή τους αλλά όλες αυτές οι μελέτες έχουν γίνει σε ενήλικες.

Οι έως τώρα μελέτες σε κυτταρικό επίπεδο με μεθόδους φασματικής απεικόνισης και υπολογισμού FD έχουν γίνει σε κακοήθη αιματολογικά νοσήματα και συμπαγείς όγκους ενηλίκων λόγω του μεγάλου αριθμού περιστατικών αλλά και της δυσκολίας και της ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν οι κακοήθειες στους ενήλικες σε αντίθεση με της παιδικής ηλικίας στη διάγνωση, τη σταδιοποίηση, τη θεραπεία και την πρόγνωση. Τις περισσότερες φορές η διάγνωση των κακοηθειών της παιδικής ηλικίας και η ταξινόμησή τους σε υποομάδες είναι ευκολότερη σε σχέση με των ενηλίκων. Στην περίπτωση όμως της ΟΛΛ Β-σειράς και ιδιαίτερα μορφολογίας L1 όπου η διάκριση από τα φυσιολογικά ώριμα λεμφοκύτταρα δεν είναι πάντα εύκολη, η μέθοδος της φασματικής απεικόνισης μπορεί να βοηθήσει. Η μέθοδος αυτή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη συμπαγών όγκων της παιδικής ηλικίας από μικρά μπλε στρόγγυλα κύτταρα (small blue round cells) που προσβάλλουν τα μυελό των οστών όπως νευροβλάστωμα, ραβδομυοσάρκωμα, σάρκωμα Ewing.

Τα ευρήματα της μελέτης μας αναδεικνύουν τη φασματική απεικόνιση σε αντίθεση με τον υπολογισμό της FD, σε μέθοδο που μπορεί να συμβάλλει στη διαγνωστική προσέγγιση με την καταγραφή και διάκριση των κυττάρων

του δείγματος, ως αντανάκλαση της δομής του πυρήνα και της οργάνωσης της χρωματίνης. Είναι δυνατόν επομένως, σε συνδυασμό και με τις υπάρχουσες μεθόδους, να προσδιορίσει ή και να ανιχνεύσει την ύπαρξη λευχαιμικών κυττάρων ή ακόμη και το βαθμό διήθησης σε διάφορες φάσεις της θεραπείας παιδιών με οξεία λευχαιμία και κατά την παρακολούθηση τους μετά το τέλος της θεραπείας, για τυχόν υποτροπή η οποία σε αρχικά στάδια δεν είναι ορατή με λοιπές συμβατικές μεθόδους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι υπολογισμού της FD της περιμέτρου της κυτταρικής μεμβράνης με το κοινό μικροσκόπιο, όπως επίσης και οι φασματικές ιδιότητες του πυρήνα τους με το φασματικό μικροσκόπιο, σε λεμφοβλάστες μορφολογίας L1 παιδιών με ΟΛΛ και σε φυσιολογικά λεμφοκύτταρα παιδιών με φυσιολογικό μυελό των οστών. Τα κυριότερα συμπεράσματα είναι:

1. Ο προσδιορισμός της FD στη συγκεκριμένη μεγέθυνση (100x) που χρησιμοποιήθηκε με το κοινό μικροσκόπιο κατέστησε δυνατή τη διάκριση φυσιολογικών λεμφοκυττάρων από λεμφοβλάστες μορφολογίας L1 στην ΟΛΛ της παιδικής ηλικίας.
2. Παρόλο που οι τιμές της FD των δύο αυτών κυτταρικών πληθυσμών δεν έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0.19$), οι τιμές της FD των λεμφοβλαστών βρίσκονται σταθερά μικρότερες από αυτές των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων. Η μικρότερη τιμή FD που παρατηρείται υποδηλώνει τη μικρότερου βαθμού πολυπλοκότητα που παρουσιάζει η κυτταροπλασματική μεμβράνη των κακοηθών κυττάρων και συγκεκριμένα των λεμφοβλαστών και η οποία αναδεικνύεται ακόμα και με το κοινό μικροσκόπιο.
3. Η φασματική απεικόνιση και τα φασματικά χαρακτηριστικά των πυρήνων των λεμφοβλαστών και φυσιολογικών λεμφοκυττάρων μπορούν να αποτελέσουν μέθοδο για τη διάκριση τους. Η μέγιστη

διαφορά της τιμής που απορροφούν οι δύο κυτταρικοί πληθυσμοί παρατηρείται στο μήκος κύματος των 630nm με τους λεμφοβλάστες να εμφανίζουν μικρότερη τιμή απορρόφησης σε σχέση με τα λεμφοκύτταρα.

4. Η μέγιστη τιμή απορρόφησης για τους δύο πληθυσμούς παρατηρείται επίσης σε διαφορετικά μήκη κύματος, 535nm και 545nm για τα λεμφοκύτταρα και τους λεμφοβλάστες αντίστοιχα και επομένως
5. Οι καμπύλες απορρόφησης των δύο πληθυσμών σε σχέση με το μήκος κύματος είναι διαφορετικές και η μέγιστη διαφορά παρατηρείται σε συγκεκριμένη περιοχή μήκους κύματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οξεία λευχαιμία αποτελεί την πιο συχνή κακοήθεια της παιδικής ηλικίας και περίπου στο 80% των περιπτώσεων πρόκειται για οξεία λεμφοβλαστική. Σε πολλές περιπτώσεις η μορφολογική διάκριση φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών είναι δυσχερής με το κοινό μικροσκόπιο και η διάκριση και ταξινόμηση γίνεται με βάση κυτταροχημικά, κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά, μοριακά δεδομένα και ανοσοφαινοτυπική ανάλυση.

Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση μια νέας μεθόδου διάκρισης φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών μορφολογίας L1 Οξείας Λεμφοβλαστικής Λευχαιμίας (ΟΛΛ) με τη χρήση της Μορφοκλασματικής Διάστασης (Fractal Dimension FD) και τη φασματική ανάλυση και απεικόνιση.

Η FD είναι μια μονάδα μέτρησης που έχει καθιερωθεί και αποδίδει με μεγάλη ακρίβεια την πραγματική διάσταση αντικειμένων τα οποία είναι πιο πολύπλοκα από μία ευθεία ή ένα κύκλο ή ένα κύβο και των οποίων το ακανόνιστο σχήμα δε μπορεί να μετρηθεί με τις αρχές της Ευκλείδειας Γεωμετρίας. Οι μετρήσεις της μορφοκλασματικής διάστασης των φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και των λεμφοβλαστών μπορούν να συμβάλουν στην ακριβή έκφραση της πολυπλοκότητας της κυτταρικής μεμβράνης, του ανώμαλου σχήματος των κυττάρων αυτών και επομένως της μεταξύ τους διάκρισης.

Η εκτίμηση των φασματικών χαρακτηριστικών απορρόφησης των πυρήνων των δύο κυτταρικών πληθυσμών βασίζεται στις αρχές της φασματικής ανάλυσης και απεικόνισης σε σχέση με μήκη κύματος και αναδεικνύει διαφορές που δεν είναι ορατές με το κοινό μικροσκόπιο σε στενά όρια στα μήκη κύματος. Το φασματικό μικροσκόπιο είναι ικανό να απεικονίσει μεγάλο αριθμό φασματικών περιοχών απορρόφησης σε κάθε ένα ψηφιακό σημείο της εικόνας σε μια ευρεία φασματική περιοχή η οποία εκτείνεται από τα 400nm στα 1000nm σε περιοχές του ορατού και του υπέρυθρου.

Το λογισμικό πρόγραμμα υπολογισμού της FD όπως επίσης και το φασματικό μικροσκόπιο αναπτύχθηκαν από το Ίδρυμα Τεχνολογίας Έρευνας Κρήτης, το Τμήμα Ηλεκτρονικής Δομής και Laser.

Με σκοπό την αντικειμενική εκτίμηση φυσιολογικών λεμφοκυττάρων και λεμφοβλαστών ΟΛΛ μελετήθηκαν με μέτρηση της FD και φασματική ανάλυση, κύτταρα από επιχρίσματα μυελού των οστών 40 παιδιών ηλικίας από 2-14 ετών (20 παιδιών με ΟΛΛ μορφολογίας L1 και 20 παιδιών με φυσιολογικό μυελό των οστών) μετά από χρώση με May-Grunwald-Giemsa (MGG) χρωστική.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διάκριση φυσιολογικών λεμφοκυττάρων από λεμφοβλάστες ΟΛΛ στην παιδική ηλικία δεν είναι εφικτή με τη μέτρηση της FD. Η χρήση κοινού μικροσκοπίου με 100X μεγέθυνση δεν βοήθησε ώστε να φανεί η διαφορά του ακανόνιστου του περιγράμματος των κυττάρων και την ανάδειξη αυτής της διαφοράς με τη χρήση της μονάδας μέτρησης της

μορφοκλασματικής διάστασης. Πιθανόν η χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μπορεί να καταδείξει τις διαφορές των δύο αυτών πληθυσμών κυττάρων με τη χρήση της FD.

Τα αποτελέσματα όμως σε σχέση με τα φασματικά χαρακτηριστικά των πυρήνων των κυττάρων κατέδειξαν ότι οι λεμφοβλάστες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.0001$) σε σχέση με τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα στην αντίχρευση, ταυτοποίηση και χαρτογράφηση των φασματικών τους χαρακτηριστικών απορρόφησης στα διάφορα μήκη κύματος.

Αναλυτικότερα η μέγιστη φασματική απορρόφηση για τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα παρατηρήθηκε στα 535nm, για τους λεμφοβλάστες η αντίστοιχη απορρόφηση παρατηρήθηκε στα 545nm. Η μέγιστη δε μεταξύ τους διαφοροποίηση καταγράφηκε στα 630nm.

Συμπερασματικά σε αυτή τη μελέτη τα ευρήματα ανέδειξαν τη μεγαλύτερη δυνατότητα της φασματικής απεικόνισης σε σχέση με την FD ως μεθόδου ικανής να παρέχει πληροφορίες που δεν είναι ορατές με το κοινό μικροσκόπιο και οι οποίες συσχετίζονται με τη βιοχημική, λειτουργική και δομική κατάσταση των κυττάρων.

Επομένως, προτείνεται η εφαρμογή της ως μιας ακόμη μεθόδου για τη ταυτοποίηση και ταξινόμηση της ΟΛΛ.

SUMMARY

Acute Leukemia is the most common malignancy in childhood and approximately 80% of it is lymphoblastic. In many cases the morphological distinction of normal lymphocytes from L₁ lymphoblasts is difficult using light microscopy. The differentiation and classification is mainly based upon cytochemical features as well as immunologic, cytogenetic and molecular characteristics.

In this study we evaluated a new method for distinction between normal lymphocytes and L₁ lymphoblasts of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) namely Fractal Dimension (FD) and spectral analysis and imaging.

Fractal geometry is a tool for the characterization of irregularly-shaped and complex figures more than a line, a circle or a cube. Thus fractals provide a description of forms, wherever Euclidean geometry is unable to describe and analyze. Fractal dimension (FD) is correlated with the complexity or the irregularity of a structure, so the measurement of FD of normal lymphocytes and lymphoblasts can provide the accurate expression of irregularity of cellular membrane and the distinction of two cellular populations.

The method of spectral imaging has been based upon the knowledge of spectral microscope and imaging in order to assess the spectral absorbance characteristics of the blood cells with variant biochemical composition, which uptake in a different way the dye on the routine cytological staining. The spectral microscope system is capable of performing imaging of absorbance in

a variety of spectral bands, in any image spatial point in a wide spectral range throughout in both visible and near infrared (NIR) bands from 400nm to 1000nm.

The software for the calculation of FD as well as the spectral microscope as well were developed by the Foundation of Science and Technology in Crete, the Department of Electronical Structure and Laser.

Spectral analysis and FD calculation have been performed in bone marrow smears of 40 children aged from 2-14 years old, (20 children with ALL and 20 children with normal bone marrow) following staining with May-Grunwald-Giemsa (MGG) in order to be achieved an objective assessment of normal lymphocytes and ALL lymphoblasts.

The results showed that the distinction of normal lymphocytes and ALL lymphoblasts in childhood is not accurate using the FD calculation. The use of light microscope in a 100x magnification did not help in the identification of the irregularity of the cellular membrane and the distinction of the two cellular populations. The measurement of FD with the use of electron microscope could probably reveal to show the differences in the irregularity of the shape.

The analysis showed statistically significant difference ($p < 0.0001$) between normal lymphocytes and lymphoblasts based upon the detection, identification and mapping of their spectral absorbance.

The wavelengths of 535nm and 545nm corresponded with the maximum absorbance for lymphocytes and lymphoblasts respectively. The maximum spectral differentiation has been observed at 630nm wavelength.

In conclusion, in this study the results suggest the potential of spectral imaging, more than the use of measurement of FD, to provide information that is not available with the light microscope and is correlated with the biochemical, functional and structural status of the cell.

Consequently, the application of spectral imaging as an accurate, easy method is suggested for differentiation and classification of the blasts in childhood ALL especially in the cases where the discrimination is not possible with light microscopy and more complex, time consuming and expensive methods are applied.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Curr Opin Oncol* 2000;12:3-12.
2. Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med* 1995;332:1618-1630.
3. Kersey JH. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood* 1997;90:4243-4251.
4. Addison PS. *Fractals and chaos, an illustrated course*. IOP Publishing Ltd 1997.
5. Falconer K. *Fractal geometry, mathematical foundations and applications*. J. Willey & Sons Ltd 1990.
6. Cross SS, Cotton DWK. Chaos and Antichaos in Pathology. *Human Pathology* 1994; 25 (7): 630-637.
7. Mandelbrot BB. *The fractal geometry of nature*. 1982; Freeman, New York.
8. Weibel ER. *Fractal geometry: A design principle for living organisms*. *Am J Physiol* 1991;261:361-367.
9. Losa GA, Nonnenmacher TF. Self-similarity and Fractal Irregularity in Pathologic Tissues. *Mod Pathol* 1996;9:174-182.
10. Heymans O, Fissette J, Vico J, Blacher S, Masset D, Brouers F. Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? *Med Hypotheses* 2000; 54(3): 360-366.
11. Keipes M, Ries F, Dicato M. Of the British coast line and the interest of fractals in medicine. *Biomed Pharmacother* 1993;47:409-415.

12. Mutch WA, Lefevre GR. Health, “small worlds” fractals and complex networks, an emerging field. *Med Sci Monit* 2003;9:19-23.
13. Nonnenmacher TF, Baumann G, Barth A, Losa GA. Digital image analysis of self-similar cell profiles. *J Biomed Comput* 1994;37:131-139.
14. Chandawarkar RY, Guyton DP. Oncologic mathematics: evolution of a new specialty. *Arch Surg* 2002;137:1428-1434.
15. Cross SS. Fractals in pathology. *J Pathol* 1997; 182: 1-8.
16. Losa GA. Fractals in pathology: are they really useful? *Pathologica* 1995; 87: 310-317.
17. Goldberger AL, West BJ. Fractals in physiology and medicine. *Yale J Biol Med* 1987;60:421-435.
18. Cross SS, Cotton DW, Underwood JCE. Measuring Fractal Dimensions: sensitivity to edge-processing functions *Analyt Quant Cytol Histol* 1994;16:375-379.
19. Salisbury JR, Whimster WF. Progress in computer-generated three-dimensional reconstruction. *J Pathol* 1993;170:223-227.
20. Havlin S, Buldyrev SV, Goldberger AL, Mantegna RN, Ossadnik SM, Penk CK, Simons M, Stanley HE. Fractals in biology and medicine. *Chaos Solitions Fracatls* 1995;6:171-201.
21. Peng CK, Havlin S, Stanley HE, Goldberger AL. Quantfication of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos* 1995;5:82-87.

22. Pikkujamsa SM, Makikalli TH, Sourander LB, Raiha IJ, Pukka P, Skytta J, Peng CK, Goldberger AL, Huikuri HV. Cardiac interbeat interval dynamics from childhood to senescence: comparison of conventional and new measures based on fractals and chaos theory. *Circulation* 1999;100:393-399.
23. Anderson JL, Karagounis LA, Stein KM, Moreno FL, Ledingham R, Hallstrom A. Predictive value for future arrhythmic events of fractal dimension, a measure of time clustering of ventricular premature complexes, after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:226-232.
24. Lin LY, Lin JL, Du CC, Huag SK. Reversal of deteriorated fractal behaviour of heart rate variability by beta-blocker therapy in patients with advanced congestive heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;12:26-32.
25. Goldberger AL. Application of nonlinear dynamics to clinical cardiology. *Ann NY Acad Sci* 1987; 504:195-213.
26. Goldberger AL, Rigney DR, Mietus J, Antmen EM, Greewalt S. Nonlinear dynamics in sudden cardiac death syndrome: heartrate oscillations and bifurcations. *Experientia* 1988; 44:983-987.
27. Boxt LM, Katz J, Leibovich LS, Jones R, Esser PD, Reid L. Fractal analysis of pulmonary arteries: the fractal dimension is lower in pulmonary hypertension. *J Thor Imaging* 1994; 9: 8-13.

28. Nagao M, Murase K, Ichiki T, Sakai S, Yasuhara Y, Ikezoe J. Quantitative analysis of technegas SPECT: evaluation of regional severity of emphysema. *J Nucl Med* 2000;41:590-595.
29. Chung HW. The severity of pulmonary emphysema investigated with fractal analysis: regional dependence. *J Nucl Med* 2001;42:177-178.
30. Fernandez E, Jelinek HF. Use of fractal theory in neuroscience: methods, advantages, and potential problems. *Methods* 2001;24: 309-21.
31. Takahashi T, Murata T, Omori M, Kimura H, Kado H, Kosaka H, Takahashi K, Itoh H, Wada Y. Quantitative evolution of magnetic resonance imaging of deep white matter hyperintensity in geriatric patients by multifractal analysis. *Neurosci Lett* 2001;314:143-146.
32. Murray JD. Use and abuse of fractal theory in neuroscience. *J Comp Neurol* 1993;331:402-406.
33. Hofman MA. The fractal geometry of convoluted brains. *J Hirnforsch* 1991;32:103-111.
34. Kiselev VG, Hahn KR, Auer DP. Is the brain cortex a fractal? *Neuroimage* 2003;20:1765-1774.
35. Bernard F, Bossu JL, Gaillard S. Identification of living oligodendrocyte development stages by fractal analysis of cell morphology. *J Neurosc Res* 2001;65:439-445.
36. Takeda T, Ishikawa A, Ohtomo K, Kobayasi Y, Matsuoka T. Fractal dimension of dendritic tree of cerebellar Purkinje cell during onto- and phylogenetic development. *Neurosci Res* 1992;13:19-28.

37. Smith TG, Behar TN. Comparative fractal analysis of cultured glia derived from the optic nerve and brain demonstrated different rates of morphological differentiation. *Brain Res* 1994;634:181-192.
38. Neale EA, Bowers LM, Smith TG. Early dendrite development in spinal cord cell cultures: a quantitative study. *J Neurosci Res* 1993;34:54-66.
39. Nonnenmacher TF, Losa G.A. Weibel E.R. A fractal Analysis of morphological differentiation of Spinal cord neurons in cell culture. *J Pathol* 1994; 210-229.
40. Woysville MJ, Calabrese JR. Quantification of occipital EEG changes in Alzheimer's disease utilizing a new metric: the fractal dimension. *Biol Phych* 1994; 35: 381-387.
41. Nagao M, Murase K, Kikuchi T, Ikeda M, Nebu A, Fukuhara R, Sugawara Y, Miki H, Ikezoe J. Fractal analysis of cerebral blood flow distribution in Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 2001;42:1446-1450.
42. Inversen PO, Nicolaysen G. Fractals describes blood flow heterogeneity within skeletal muscle and within myocardium. *Am J Physiol* 1995;268:112-116.
43. Landini G. A fractal model for periodontal breakdown in periodontal disease. *J Periodontal Res* 1991;26:176-182.
44. Chung HW, Chu CC, Underweiser M. On the fractal nature of trabecular structure. *Med Phys* 1994;21:1535-1540.
45. Parkinson IH, Fazzalari NL. Fractal dimension and architecture of trabecular bone. *J Path* 1996;178:100-105.

46. Weinstein RS, Majumbar S. Fractal geometry and vertebral compression fractures. *J Bone Miner Res* 1994;9:1797-1802.
47. Feltrin GP, Macchi V, Saccavini C, Tosi E, Dus C, De Caro R. Fractal analysis of lumbar vertebral cancellous bone architecture. *Clin Anat* 2001;14:414-417.
48. Caligiuri P, Giger ML, Favus M. Multifractal radiographic analysis of osteoporosis. 1994;21:503-514.
49. Ruttiman VE, Webber RL, Hazelvig JB. Fractal dimension from radiographs of peridental alveolar bone. A possible diagnostic indicator of osteoporosis. *Oral Pathol* 1992;74:98-107.
50. Grant PE, Lumsden CJ. Fractal analysis of renal cortical perfusion. *Invest Radiol* 1994; 29: 16-23.
51. Cross SS, Bury J, Silcocks P, Stephenson TJ, Cotton DWK. Quantitation of the Renal Arterial Tree by Fractal Analysis. *Journal of Pathology* 1994; 72: 317-323.
52. Cross SS, Start RD, Stephenson TJ, Cotton WK, Variend S, Underwood JCE. Fractal geometric analysis of the renal arterial tree in infants and fetuses. *Ped Pathol and Lab Med* 1995;15:259-268.
53. Dioguardi N, Grizzi F, Bossi P, Ronalli M. Fractal and spectral dimension analysis of liver fibrosis in needle biopsy specimens. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:262-266.
54. Honda E, Domon M, Sasaki T. A method for determination of fractal dimension of scialographic images. *Invest Radiol* 1991; 26: 854-901.

55. Honda E, Domon M, Sasaki T, Obayashi N, Ida M. Fractal dimension of ductal pattern in the parotid glands of normal subjects and patients with Sjogren syndrome. *Invest Radiol* 1992;27:790-794.
56. Daxer A. Characterization of the neovascularisation process in diabetic retinopathy by means of fractal geometry: diagnostic implications. *Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993; 231: 681-686.
57. Landini G, Mission GP, Murray PI. Fractal analysis of the normal human retinal fluorescein angiogram. *Curr Eye Res* 1993;12:23-27.
58. Daxer A. Mechanisms in retinal vasculogenesis: an analysis of the spatial branching site correlation. *Curr Eye Res* 1995;14:251-254.
59. Daxer A, Ertle A. Corneal vascularisation and its relation to the physical properties of the tissue: fractal analysis. *Curr Eye Res* 1995;16:263-268.
60. Obert M, Pfeifer P, Sernetz M. Microbial growth patterns describes by fractal geometry. *J Bacteriol* 1990; 172: 1180-1185.
61. Tany S, Ma Y, Sebastine IM. The fractal nature of Escherichia coli biological flocs. *Colloids Surf Biointerfaces* 2001;20:211-218.
62. Landini G, Mission GP, Murray PI. Fractal properties of herpes simplex dendritic keratitis. *Cornea* 1992;11:510-514.
63. Pansera F. Fractals and cancer. *Med Hypotheses*. 1994;42:400-413.
64. Baish JW, Jain RK. Fractals and cancer. *Cancer Res* 2000;15:3683-3688.
65. Lefebvre F, Benali H, Gilles R, Kahn E, Di Paola R. A fractal approach to the segmentation of microcalcification in digital mammograms. *Med Phys* 1995; 22: 381-390.

66. Thiele DL, Kimme-Smith C, Johnson TD, McCombs M, Bassett LW. Using tissue texture surrounding calcification clusters to predict benign vs malignant outcomes. *Med Phys* 1996 ; 23(4): 549-555.
67. Caldwell CB, Stapelton SJ, Holdworth DW. Characterization of mammographic parenchymal pattern by fractal dimension. *Phys Med Biol* 1994; 35: 235-247.
68. Cross SS, Bury JP, Stephenson TJ, Harrison RF. Image analysis of low magnification images of fine needle aspirates of the breast produces useful discrimination between benign and malignant cases. *Cytopathology* 1997 ; 8(4): 265-273.
69. Byng JW, Yaffe MJ, Lockwood GA, Little LE, Tritchler DL, Boyd NF. Automated analysis of mammographic densities and breast carcinoma risk. *Cancer* 1997;80:66-74.
70. Velanovich V. Fractal analysis of mammographic lesions: a feasibility study quantifying the difference between benign and malignant masses. *Am J Med Sci* 1996 ; 311(5): 211-214.
71. Claridge E, Hall PN, Keefe M. Shape analysis for classification of malignant melanoma. *J Biomed Eng* 1992;14:229-234.
72. Ahammer H, De vaney TT, Tritthart HA. Fractal dimension of K1735 mouse melanoma clones and spheroid invasion in vitro. *Eur Biophys J* 2001;30:494-499.
73. Deling L, Ellie C. Fractal stomach ulcer. A measurement parameter for benign and malignant changes for the future. *J Pathol* 1994;112:315-323.

74. Cross SS, Bury JP, Silcocks PB, Stephenson TJ, Cotton DW. Fractal geometric analysis of colorectal polyps. *J Pathol* 1994;172:317-323.
75. Irinopoulou T, Rigaut JP, Benson MC. Toward objective prognostic grading of prostatic carcinoma using image analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1993;15:341-344.
76. Sanders H, Crocker J. A simple technique for the measurement of Fractal Dimension in histopathological specimens. *J Pathol* 1993;169:383-385.
77. Cross SS, Cotton DW. The Fractal Dimension may be a useful morphometric discriminant in histopathology. *J Pathol* 1992;166:409-411.
78. Landini G, Geake JG. Discrimination of complex histopathological tumour profiles by experienced and inexperienced observers. *J Oral Pathol Med* 1997;26:477-479.
79. Liotta LA. Tumour invasion and metastases. Role of the basement membrane. *Am J Pathol* 1994;117:339-350.
80. Cross SS, McDonagh AJG, Stephenson TJ. Fractal and integer-dimensional geometric analysis of pigmented skin lesions. *Am J Dermatol* 1995;17:374-378.
81. Landini G, Rippin JW. How Important is Tumor shape? Quantification of the epithelial-connective tissue interface in oral lesions using local connected fractal dimension analysis. *Journal of Pathology* 1996; 179: 210-217.

82. Landini G, Ripplin JW. Fractal dimension of the epithelial-connective tissue interface in premalignant and malignant epithelial lesions of the floor of the mouth. *Analyt Quantit Cytol Histol* 1993; 15: 144-149.
83. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-395.
84. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumour angiogenesis in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukaemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 815-821.
85. Gazit Y, Baish J, Safabakhsh N, Leunig M, Baxter LT, Jain RK. Fractal characteristics of tumour vascular architecture during tumour growth and regression. *Microcirculation* 1997; 4:395-402.
86. Craciunescu OI, Das SK, Clegg ST. Dynamic contrast-enhanced MRI and fractal characteristics of percolation clusters in two-dimensional tumour blood perfusion. *J Biomech Eng* 1999; 121: 480-486.
87. Secomb TW, Hsu R, Dewhirst MW, Klitzman B, Cross JF. Analysis of oxygen transport to tumour tissue by microvascular networks. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 481-489.
88. Gao Q. The Method of Calculating Fractal Dimension. *Journal of Pathology* 1995; 175: 461-462.
89. Cross SS. The Application of Fractal Analysis to Microscopic Images. *Micron* 1994; 25(1): 101-113.
90. Loud AV. A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cell. *J Cell Biol* 1995;37:27-39.

91. Reith A. The influence of triiodothyronine and riboflavine deficiency on the rat liver with special reference to mitochondria. A morphologic, morphometric, and cytochemical study by electron microscopy. *Lab Invest* 1997;29:216-229.
92. Graber R, Sumida C, Vallete G, Nunez EA. Rapid and long-term effects of 17 β -estradiol on PIP2-phospholipase C specific activity of MCF-7 cells. *Experientia* 1997;48:101-110.
93. Mc Aulay C, Palcic B. Fractal texture features based on optical density surface area. Use in image analysis of cervical cells. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;12:394-401.
94. Sedivy R, Windischberger L, Svazil K, Moser E, Breitenecker G. Fractal analysis: an objective method for identifying a typical nuclei in dysplastic lesions of the cervix uteri. *Gynecol Oncol* 1999;75:78-83.
95. Losa GA, Graber R, Baumann G, Nonnenmacher TF. Effects of steroid hormones on nuclear membrane and membrane-bound heterochromatin from breast cancer cells evaluated by fractal morphometry. *Anal Quant Cyto Histol* 1999;21:430-435.
96. Castelli C, Losa GA. Ultrastructural complexity of nuclear components during early apoptotic phases in breast cancer cells. *Anal Cell Path* 2001;23:1-9.
97. Smith TG, Marks WB, Lange GD, Sheriff WH, Neale EA. A fractal analysis of cell images. *J Neurosci Methods* 1995;27:375-382.

98. Keough KM, Hyam P, Pink DA. Cell surfaces and fractal dimensions. *J microsc* 1991;163:95-99.
99. Vilela MJ, Martins ML, Beschetti SR. Fractal patterns for cells in culture. *J Pathol* 1995;177:103-107.
100. Losa GA, Baumann G. Fractal dimension of pericellular membranes in human lymphocytes and lymphoblastic leukemia cells. *Path Res Pract* 1992; 188: 680-686.
101. Losa GA. Fractal morphometry of cell complexity. *Riv Biol* 2002;95:239-258.
102. Losa G.A. Weibel E.R. Spatial and Temporal Fractal patterns in Cell and Molecular Biology. *J Microsc* 1994; 22- 37.
103. Nonnenmacher TF. Fractal scaling mechanisms in biomembranes. Oscillations in the lateral diffusion coefficient. *Eur Biophys J* 1996;16:375-386.
104. Pesce V, Potente F, Vacca E. Shape evaluation in medical image analysis. *Eur Microsc Anal* 1990;7:212-220.
105. Sandau K, Kurtz H. Measuring fractal dimension and complexity-an alternative approach and applications. *J Microsc* 1997;186:164-176.
106. Skinner J, Zhao Y, Coventry B, Bradley J. Video image analysis in Pathology. *Disease Markers* 1993;11:53-70.
107. Wells WA, Rainer RO, Memoli VA. Basic principles of image processing. *Am J Clin Pathol* 1992;98:493-501.

108. Castleman KR. Concepts in imaging and microscopy: color image processing for microscopy. *Biol Bull* 1998;194:100-107.
109. Inoue T, Gliksman N. Techniques for optimizing microscopy and analysis through digital image processing. *Methods Cell Biol* 1998;56:63-90.
110. Palmer C. Diffraction gratings: The crucial dispersive component. *Spectroscopy* 1995;10:14-19.
111. Cardullo RA, Alm EJ. Introduction to image processing. *Methods Cell Biol* 1998;56:91-115.
112. Summer A, Berwick N, Lothian E. Microdensitometry-measurement of staining in cells. *Microscopy Anal* 1997;50:9-15.
113. Oberholzer M, Ostreicher M, Christen H, Bruhlmann M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol* 1996;105:333-355.
114. Wied GL, Bartels PH, Bibbo M, Dytch HE. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Hum Pathol* 1989;20:549-571.
115. Ruifrok AC. Quantification of immunohistochemical staining by color translation and automated thresholding. *Anal Quant Cytol Histol* 1997;19:107-113.
116. Wong S, Huang JK. Networked multimedia for medical imaging. *IEEE Multimedia* 1997;4:24-35.

117. Zhou R, Hammond EH, Parker DL. A multiple wavelength algorithm in color image analysis and its applications in stain decomposition in microscopy images. *Med Phys* 1996;23:1977-1986.
118. Piston DW. Choosing objective lenses: the importance of numerical aperture and magnification in digital optical microscopy. *Biol Bull* 1998;195:1-4.
119. Dunn KW, Wang E. Optical aberrations and objective choice in multicolor confocal microscopy. *Biotechniques* 2000;28:542-550.
120. Malik Z, Cabib D, Buckward RA, Talmi Y, Garini Y, Lipson SG. Fourier transform multipixel spectroscopy for quantitative cytology. *J Microsc* 1996;182:133-140.
121. Schultz RA, Nielsen T, Zavaleta JR, Ruch R, Wyatt R, Garner R. Hyperspectral Imaging: A novel approach for microscopy analysis. *Cytometry* 2001;43:239-247.
122. Farkas D, Du C, Fisher G, Lau C, Niu W, Wachman E, Levenson R. Non-invasive image acquisition and advanced processing in optical bioimaging. *Comput Med Imag Graphic* 1998;22:89-102.
123. Morris HR, Hoyt CC, Treado PJ. Imaging spectrometers for fluorescence and Raman microscopy: acousto-optic and liquid crystal tunable filters. *Appl Spectrosc* 1994;48:857-866.
124. Hocde S, Loreal O, Sire O, Boussard-Pledel C, Boureau B, Turlin B, Keirsse J, Lucas J. Imaging of tissues by infrared optic spectroscopy: an efficient tool for medical diagnosis. *J Biomed Opt* 2004;9:404-407.

125. Matsuoka H, Kosai Y, Saito M, Takeyama N, Suto H. Single-cell viability assessment with a novel spectro-imaging system. *J Biotechnol* 2002;94:299-308.
126. Papadakis A, Stathopoulos E, Delides G, Berberides K, Nikiforidis G, Balas C. A novel spectral microscope system: application in quantitative pathology. *IEEE Trans Biomed Eng* 2003;50(2):207-217.
127. Berland K, Gratton E. Two photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment. *Biophys J* 1995;68:694-701.
128. Brock R, Jovin TM. Fluorescence correlation microscopy taken into the cell. *Cell Mol Biol* 1998;44:847-856.
129. Brock R, Hink MA, Jovin TM. Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence. *Biophys J* 1998;75:2547-2557.
130. Wang L. Digital deconvolution of fluorescence images for biologists. *Methods Cell Biol* 1998;56:305-315.
131. Greenbaum L, Schwartz D, Malik Z. Spectrally resolved microscopy of cyan fluorescent fusion proteins trafficking. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1205-1212.
132. Boland MV, Murphy RF. Automated analysis of patterns in fluorescence-microscope images. *Trends Cell Biol* 1999;9:201-206.
133. Cohen E, Gatt S, Schachtschabel A, Schachtschabel DO, Kohen C, Agmon V, Hirschberg JG, Monti M. Microspectrofluorometry and

- fluorescence imaging in the study of human cytopathology. *Microsc Res Tech* 2000;51(5):469-480.
134. Morris HR, Hoyt CC, Treado PJ. Imaging spectrometers for fluorescence and Raman microscopy for quantitative cytology. *J Microsc* 1996;182:133-140.
 135. Haraguchi T, Shimi T, Koujin T, Hiraoka Y. Spectral imaging in fluorescence microscopy. *Genes Cells* 2002;7:881-887.
 136. Chen Y, Periasamy A. Characterization of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy for protein localization. *Microsc Res Tech* 2004;63:72-80.
 137. Qu JY, Chang H, Xiong S. Fluorescence spectral imaging for characterization of tissue based on multivariate statistical analysis. *J Opt Imag Sci* 2002;19:1823-1831.
 138. Hiraoka Y, Shimi T, Haraguchi T. Multispectral imaging fluorescence microscopy for cells. *Cell Struct Funct* 2002;27:367-374.
 139. Rothmann C, Bar-Am I, Malik Z. Spectral imaging for quantitative histology and cytogenetics. *Histol Histopathol* 1998;13:921-926.
 140. Anguiano A. Fluorescence in situ hybridization (FISH) : Overview and medical applications. *J Clin Ligand Assay* 2000;23:33-42.
 141. Zhao L, Hayes K, Glassman A. Enhanced detection of chromosomal abnormalities with the use of FISH multicolour banding technique. *Cancer GenetCytogenet* 2000;118:108-111.

142. Schrock E, Du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soensken D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494-497.
143. Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley JD, Ried T. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolor spectral karyotyping. *Nature Genet* 1997;15:406-410.
144. Ford BK, Volin CE, Murphy BM, Lynch RM, Descour MR. Computed tomography-based spectral imaging for fluorescence microscopy. *Biophys J* 2001;80:986-993.
145. Martinez-Zagnilan R, Gurule MW, Lynch RM. Simultaneous measurement of intracellular PH and Ca⁺² in insulin-secreting cells by spectral imaging microscopy. *Am J Physiol* 1996;270:438-446.
146. Berman J, Moore G. Image analysis software for the detection of preneoplastic and early neoplastic lesions. *Cancer* 1994;77:103-109.
147. Aziz D, Barathur R. Quantitation and morphometric analysis of tumors by image analysis. *J Cell Bioch* 1994;19:120-125.
148. Diem M, Chiriboga L, Larsch P, Pacifico A. Spectral maps of individual normal and cancerous cells. *Biopolymers* 2002;67:349-353.
149. Walts A, Morimoto R, Marchevsky A. Computerized interactive morphometry and the diagnosis of lymphoid-rich effusions. *Anatom Pathol* 1992;99:570-575.

150. Malik Z, Rothmann C, Cycowitz T, Ohen A. Spectral morphometric characterization of B-CLL cells versus normal small lymphocytes. *J. Histochem. Cytochem* 1998;46:1113-1118.
151. Greenspan H, Rothmann C, Cycowitz T, Nissan Y, Cohen AM, Malik Z. Classification of lymphoproliferative disorders by spectral imaging of the nucleus. *Histol Histopathol* 2002;17:767-773.
152. Kneitz S, Ott G, Schindewolf T, Muller-Hermelink HK, Harms H. Differentiation of low grade non-Hodgkin's lymphoma by digital image processing. *Anal Quant Cytol Histol* 1996;18:121-128.
153. Rothmann C, Barshack I, Kopolovic J, Malik Z. Spectrally resolved morphometry of the nucleus in hepatocytes stained by four histological methods. *J Histochem Cytochem* 1998;30:539-547.
154. Malik Z, Dishi M, Garini Y. Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin and photofrin in single melanoma cells. *Photochem Photobiol* 1996;63:608-614.
155. Silverman RH, Folberg R, Rondeau MJ, Bolart HC, Lloyd HD, Lizzi FL, Coleman DJ. Spectral parameter imaging for detection of prognostically significant histologic features in uveal melanoma. *Ultrasound Med Biol* 2003;29:951-959.
156. Ortiz De Solorzano C, si R, Bernabei PA, Caporale R, Ferrini PR, Bottiroli G. Costes S, Callahan DE, Parvin B, Barcellos-Hoff MH. Applications of quantitative digital image analysis to breast cancer research. *Microsc Res Tech* 2002;59:19-27.

157. Komitowski DD, Hart MM, Janson CP. Chromatin organization and breast cancer prognosis: two dimensional and three dimensional image analysis. *Cancer* 1993;72:1239-1246.
158. Barshack I, Kopolovic J, Malik Z, Rothmann C. Spectral morphometric characterization of breast carcinoma cells. *Br J Cancer* 1999;79:1613-1619.
159. Zhong L, Small GW, Hako AS, Kidder LH, Lewis EN. Classification of Fourier transform infrared microscopic imaging data of human breast cells by cluster analysis and artificial neural networks. *Appl Spectrosc* 2003;57:14-22.
160. Yu GH, Sneige N, Kidd LD, Katz RL. Image analysis derived morphometric differences in fine needle aspirates of ductal and lobular breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;17:88-92.
161. Malik Z, Amit I, Rothman C. Subcellular localization of sulfonated tetraphenyl porphines in colon carcinoma cells by spectrally resolved imaging. *J Photochem Photobiol* 1997;65:389-396.
162. Siboni G, Rothman C, Ehrenberg B, Malik Z. Spectral imaging of MC540 during murine and human colon carcinoma cell differentiation. *J Histochem Cytochem* 2001;49:147-153.
163. Gazi E, Dwyer J, Gardner P, Clarke NW, Shanks JH, Scott LJ, Brown M. Applications of infrared microspectroscopy studies of benign prostate and prostate cancer. A pilot study. *J Pathol* 2003;201:99-108.
164. Woodcock CL, Horowitz RA. Chromatin organization reviewed. *Trends Cell Biol* 1995;5:272-277.

165. Miller M, Andringa A, Elliot J, Conwell K, Dixon K, Carty M. The morphological and spectral phenotype of apoptosis in HeLa cells varies following exposure to UV-C and the addition of inhibitors of ICE and CPP32. *Cell Prolif* 1998;31:17-33.
166. Rothmann C, Coen A, Malik Z. Chromatin condensation in erythropoiesis resolved by multipixel spectral imaging: Differentiation versus apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1997;45:1097-1108.
167. Dacie J& Lewis S. Preparation and staining methods for blood and bone marrow films. *Practical Haematology*. 9th ed. Edinburgh London Melbourne and New York: Churchill Livingstone; 2001. p. 50.
168. Friedrich K, Seiffert W, Zimmermann H. Romanowsky dyes and Romanowsky-Giemsa effect. Structural investigations of the purple DNA-AB-EY dye complexes of Romanowsky-Giemsa staining. *Histochem* 1990;93:247-256.
169. Benattar L, Flandrin G. Morphometry and quality control for a May-Grunwald Giemsa stained preparation. A 40 centers cooperative study. *Leuk Lymphoma* 1999;33;587-591.
170. Galbraith W, Marshall PN, Bacus JW. Microspectrophotometric studies of Romanowsky stained blood cells. Subtraction analysis of a standardized procedure. *J Microsc* 1980;119:313-330.
171. Sorensen FB. Biology of disease: quantitative analysis of nuclear size for objective malignancy grading. A review with emphasis on new unbiased stereologic methods. *Lab Invest* 1992;66:4-23.

172. Veltri RW, Partin AW, Miller MC. Quantitative nuclear grade: an image analysis-based on clinically relevant structure alterations. *J Cell Biochem* 2000;35:151-157.
173. Macville MV, Van der Laak JA, Hopman AH, Reid T. Spectral imaging of multi-color chromogenic dyes in pathological specimens. *Anal Cell Pathol* 2001;22:133-142.
174. Shah SA, Bacrach N, Spear SJ, Stone RA, Prichard JW, Brown HG, La Framboise WA. Cutaneous wound analysis using hyperspectral imaging. *Biotechniques* 2003;34:408-413.
175. Hendzel MJ, Bazett-Jones DP. Probing nuclear ultrastructure by electron spectroscopic imaging. *J Microsc* 1996;182:1-14.
176. Funk RH, Hoper J, Dramm P. Electronic light microscopy combined with spectrophotometry allows real-time analysis of structures at the subcellular level. *Physiol Meas* 1998;19:225-233.
177. Huth U, Wieschollek A, Garini Y, Schubert R, Peschka-Suss R. Fourier transformed spectral bio-imaging for studying intracellular liposomes. *Cytometry* 2004;57;10-21.
178. Rothmann C, Malik Z, Cohen A. Spectrally resolved imaging of Cabot rings and Howell-Jolly bodies. *Photoch Photob* 1998;68:584-587.
179. Monici M, Pratesi R, Bernabei PA, Caporale R, Bottiroli G. Natural fluorescence of white blood cells: spectroscopic and imaging staging. *J Photochem Photobiol* 1995;30:29-37.

180. Rothman C, Levinshal T, Timan B, Malik Z. Spectral imaging of red blood cells in experimental anemia of *Cyprinus caprio*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2000;125:75-83.
181. Swedlow JR, Goldberg I, Branner E, Sorger PK. Informatics and quantitative analysis in biological imaging. *Science* 2003;300:100-102.
182. Wang HW, Willis J, Canto MI, Sivak MV, Izatt JA. Quantitative laser scanning confocal autofluorescence microscopy of normal, premalignant, and malignant colonic tissues. *IEEE Trans Biomed Eng* 1999;46:1246-1252.
183. Ornberg R, Worner B, Edwards D. Analysis of stained objects in histological sections by spectral imaging and differential absorption. *J Histochem. Cytochem* 1999;47:1307-1313.
184. Esteban J, Ahy C, Metha P, Bartizora H. Biologic significance of quantitative estrogen receptor immunohistochemical assay by image analysis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994;102:158-162.
185. Rothmann C, Barshack I, Gil A, Goldberg I, Kopolovic J, Malik Z. Potential use of spectral image analysis for the quantitative evaluation of estrogen receptors in breast cancer. *Histol Histopathol* 2000;15:1051-1057.
186. Balas C. A novel optical imaging method for the early detection, quantitative grading, and mapping of cancerous and precancerous lesions of cervix. *IEEE Trans Biomed Eng* 2001;48(1):96-104.

187. Fung J, Weier HU, Pedersen RA. Detection of structural and numerical chromosome abnormalities in cells using spectral imaging. *J Histochem Cytochem* 2001;49:797-805.
188. Garini Y, Macv M, Buckwald RA, Schrock E, Ried T. Spectral karyotyping. *Bioimaging* 1996;4:64-72.
189. Miller ML, Andringa A, Dixon K, Carty MP. Insights into UV-induced apoptosis: ultrastructure, trichrome stain and spectral imaging. *Micron* 2002;33(2):157-166.
190. Benattar L, Flandrin G. Morphometric and colorimetric analysis of peripheral blood smears lymphocytes in B-cell disorders: proposal for a scoring system. *Leuk Lymphoma* 2001;42:29-40.
191. Lunning MA, Zenger VE, Dreyfuss R, Stetler- Stevenson M, Rick ME, White TA, Wilson WH. Albumin enhanced morphometric image analysis in CLL. *Cytometry* 2004;57:7-14.

