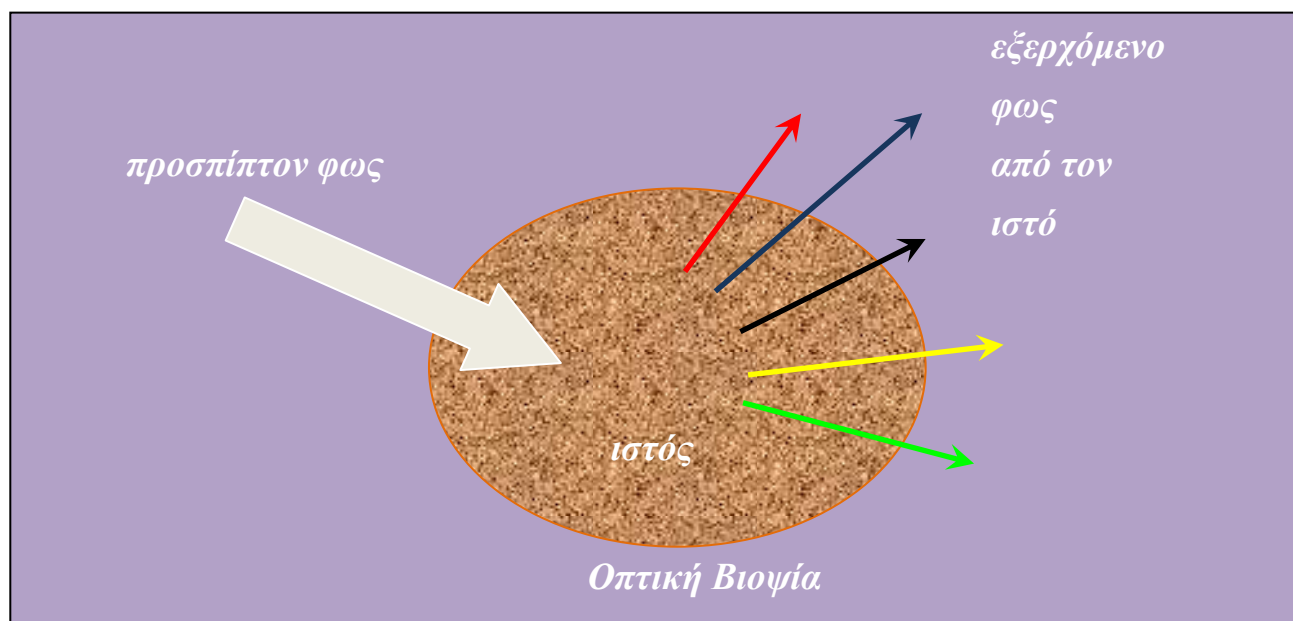




Ανάπτυξη και συγκριτική αξιολόγηση νέων μεθόδων για τον μη επεμβατικό οπτικό χαρακτηρισμό και την ανάλυση φυσιολογικών και παθολογικών νευρικών ιστών.

Development and comparative evaluation of new methods for noninvasive optical characterization and analysis of the physiological and pathological nerve tissues.



ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ Μ. ΒΑΖΓΙΟΥΡΑΚΗ, ΦΥΣΙΚΟΣ

Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τομέας Βασικών Επιστημών,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εργαστήριο Πολυφασματικής Απεικόνισης,
Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Laser, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

**Εργαστήριο φαρμακολογίας
Τομέας Βασικών Επιστημών, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης**

**Εργαστήριο Πολυφασματικής Απεικόνισης
Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Laser, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας**

Ανάπτυξη και συγκριτική αξιολόγηση νέων μεθόδων για τον μη επεμβατικό οπτικό χαρακτηρισμό και την ανάλυση φυσιολογικών και παθολογικών νευρικών ιστών.

Ελευθερία Μ. Βαζγιουράκη, Φυσικός



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ



Ηράκλειο 2016

1 ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Περιεχόμενα	3
2.	Βιογραφικό	5
3.	Περίληψη	10
4.	Abstract	14
5.	Εισαγωγή - Θεωρητικό Υπόβαθρο	17
5.1	Φυσικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτός - ύλης	21
5.1.1.1	Συντονισμένη Αλληλεπίδραση	22
5.1.1.2	<i>Απορρόφηση, Εκπομπή – Φθορισμός</i>	22
5.1.1.3	<i>Ανάκλαση και Σκέδαση– Είδη σκέδασης</i>	24
5.1.1.4	<i>Ιονισμός ή φωτοηλεκτρικό φαινόμενο</i>	28
5.1.2	Οπτικές ιδιότητες των ιστών	29
5.1.2.1	<i>Διάδοση του φωτός στους ιστούς</i>	30
5.1.2.1.1	<i>Θεωρία μεταφοράς</i>	30
5.1.2.1.2	<i>Προσέγγιση της διάχυσης του φωτός</i>	32
5.1.2.2	<i>Φασματική περιοχή με υψηλή απορρόφηση</i>	33
5.1.2.3	<i>Φασματική περιοχή με υψηλή σκέδαση</i>	33
5.1.2.4	<i>Φασματική περιοχή που τα δύο φαινόμενα είναι συγκρίσιμα</i>	34
5.1.3	Οπτικές φασματοσκοπικές διαγνωστικές μέθοδοι	35
5.1.3.1	<i>Φασματοσκοπία απορρόφησης</i>	38
5.1.3.1.1	<i>Διαπερατότητα</i>	39
5.1.3.1.2	<i>Νόμος Beer-Lambert</i>	43
5.1.3.2	<i>Φασματοσκοπία ανάκλασης και ελαστικής σκέδασης</i>	46
5.1.3.2.1	<i>Μοντέλο Kubelka – Munk</i>	48
5.1.3.2.2	<i>Διάχυτη ανάκλαση από ένα ημιάπειρο υλικό</i>	50
5.1.3.3	<i>Φασματοσκοπία φθορισμού-ανοσοφθορισμός</i>	53
5.1.3.4	<i>Φασματοσκοπία Raman</i>	53
5.2	Δομή του νευρικού συστήματος – Σκλήρυνση κατά πλάκας – Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)	55
5.2.1	Δομή του νευρικού συστήματος	55
5.2.2	Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΣκΠ	57
5.2.3	Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)	58
5.3	Διαγνωστικές μέθοδοι για τη Σκλήρυνση κατά Πλάκας	60
5.3.1	Τρέχουσες διαγνωστικές μέθοδοι	60
5.3.2	Μικροσκοπία φθορισμού	62
5.3.3	Εναλλακτικές απεικονιστικές διαγνωστικές μέθοδοι	65
5.3.4	Απεικονιστική Φασματοσκοπία	66
5.3.4.1	<i>Συστήματα φασματικής απεικόνισης</i>	69

5.3.4.2	<i>Ανιχνευτής CCD (Charge-Coupled Device)</i>	73
5.3.4.3	<i>Ανιχνευτής CMOS (Complementary Metal–Oxide semiconductor)</i>	74
6.	Ερευνητική Υπόθεση και Σκοπός της Μελέτης	76
7.	Όργανα, Υλικά και Μεθοδολογία	80
7.1	Προετοιμασία δειγμάτων	80
7.2	Σύστημα Πολύ-φασματικής μικροσκοπίας	82
7.3	Πρωτόκολλο μετρήσεων	85
8.	Μελέτη δειγμάτων νευρικού ιστού: Αποτελέσματα	86
8.1	Απεικόνιση του φθορισμού τομών νευρικού ιστού με οπτικό και συνεστιακό μικροσκόπιο	88
8.2	Απεικόνιση της ανάκλασης τομών νευρικού ιστού με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης	90
8.3	Απεικόνιση της διαπερατότητας τομών νευρικού ιστού με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης	93
8.4	Απεικόνιση της σκέδασης τομών νευρικού ιστού με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης	94
8.5	Συγκριτικά αποτελέσματα μετρήσεων στο νευρικό ιστό	97
8.6	Μελέτη της καταστροφής των κυττάρων του βυθού του οφθαλμού με την πολυφασματική απεικόνιση	103
9.	Συζήτηση - Συμπεράσματα	107
9.1	Μελλοντικοί στόχοι	112
10.	Βιβλιογραφικές Αναφορές	113
11.	Ευχαριστίες	119
12.	Πρωτότυπες Δημοσιεύσεις	120

ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Επώνυμο-Όνομα : Βαζγιουράκη Ελευθερία
Γέννηση: 20 Ιουνίου 1974, Χανιά, Κρήτη
Οικογ. κατάσταση: Έγγαμη με 2 παιδιά
Διεύθυνση οικίας: Τέρμα Αρκαδίου - Παρηγοριά
Τηλέφωνα επικοινωνίας: (28210) – 79466, 6973 399217
e-mail : eltha@pathfinder.gr, eltha07@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1989 έως 1992 4^ο Γενικό Λύκειο Χανίων με χαρακτηρισμό «Άριστα».

1993 έως 1997 Τμήμα Φυσικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, πτυχίο Φυσικής με βαθμό «Λίαν Καλώς, 7.26» και επιπλέον εξειδίκευση στην «Ατομική, Μοριακή Φυσική και Λείζερ» με χαρακτηρισμό «Λίαν Καλώς».

2016 Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στη Σχολή Επιστημών Υγείας του τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης με θέμα: “Ανάπτυξη και συγκριτική αξιολόγηση νέων μεθόδων για τον μη επεμβατικό οπτικό χαρακτηρισμό και την ανάλυση φυσιολογικών και παθολογικών νευρικών ιστών”.

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ - ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

1993 έως 1994 Υποτροφία Επίδοσης 4^{ης} θέσης του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι. Κ. Υ.) στη διάρκεια των σπουδών στη Φυσική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης.

1994 έως 1995 Υποτροφία Επίδοσης 2^{ης} θέσης του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι. Κ. Υ.) στη διάρκεια των σπουδών στη Φυσική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης.

1995 έως 1996 Βραβείο και Υποτροφία Επίδοσης 1^{ης} θέσης του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (Ι. Κ. Υ.) στη διάρκεια των σπουδών στη Φυσική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΣ

Ξένες Γλώσσες : Αγγλικά (Cambridge First Certificate).

Χρήση λογισμικού : MS Windows, Microcal Origin, MS Word, Corel Draw, Photopaint, MS Office Excel, MS Power Point.

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- 7/1997 Παρακολούθηση 9^{ου} Θερινού Κύκλου Σχολείου Προχωρημένης Φυσικής Ηρακλείου.
- 7/1998 Παρακολούθηση 10^{ου} Θερινού Κύκλου Σχολείου Προχωρημένης Φυσικής Ηρακλείου.
- 12/2007 Σεμινάριο ΛΑΕΚ Διδακτικής μεθοδολογίας και Ψυχοπαιδαγωγικών θεμάτων.
- 11/2012 Σεμινάριο Ιδρύματος Νεολαίας και Δια Βίου Μάθησης με θέμα: «Συνεργασία εκπαιδευτικών – οικογένειας».

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ – ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 9/1996 έως 10/1997 Διπλωματική εργασία με τίτλο: “Επίδραση των σκεδαστών στο φθορισμό οργανικών χρωστικών επαγόμενο από Laser” με υπεύθυνο τον καθηγητή Κ. Φωτάκη, ΙΗΔΛ-ΙΤΕ.
- 10/1997 έως 10/2003 Εργαστήριο Βιοϊατρικής Απεικόνισης του ΙΗΔΛ-ΙΤΕ.
- 8/2000 έως 6/2001 Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα «Ταυτοποίηση μυοκαρδιακού ιστού με τη μέθοδο του φασματοσκοπικού φθορισμού. In vivo και in vitro πειραματική μελέτη. Κλινική μελέτη με τη χρήση ειδικού καθετήρα», ΠΕΝΕΔ ’99 σε συνεργασία Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας-ΙΤΕ και Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.
- 9/2002 έως 11/2011 Εργαστηριακή Συνεργάτης του ΑΤΕΙ Κρήτης, τμήμα Ηλεκτρονικής, τμήμα Συστημάτων Διαχείρισης και Εκμετάλλευσης Φυσικών Πόρων, τμήμα Μουσικής Τεχνολογίας και Ακουστικής, τμήμα Εφαρμοσμένης Πληροφορικής και Πολυμέσων.
- 9/2006 έως 3/2007 Ενασχόληση ως 407/80 στο εργαστήριο Φυσικής, Πολυτεχνείο Κρήτης, Γενικό τμήμα.
- 1/2014 έως 6/2014 Διοικητικός στον ΕΟΠΥΥ Χανίων.
- 12/2015 έως σήμερα Διοικητικός στο Πολιτιστικό Κέντρο Χανίων.

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 9/2002 έως 6/2003 Διδασκαλία στην Τριτοβάθμια Εκπαίδευση (ΑΤΕΙ Κρήτης, Τμήμα Ηλεκτρονικής) των μαθημάτων Οπτοηλεκτρονικής και Φυσικής.
- 9/2002 έως 11/2011 Εργαστηριακή συνεργάτης στα εργαστήρια Φυσικής, Οπτοηλεκτρονικής (τμήμα Ηλεκτρονικής), Τεχνικής Θερμοδυναμικής, Ηλεκτρικών Κυκλωμάτων (τμήμα Συστημάτων Διαχείρισης και Εκμετάλλευσης Φυσικών Πόρων), Ψηφιακών Ηλεκτρονικών Ι, (τμήμα Μουσικής Τεχνολογίας και Ακουστικής), Οπτικών Επικοινωνιών, Τηλεπικοινωνιακών Συστημάτων και Εισαγωγή στην Ηλεκτρονική (τμήμα Εφαρμοσμένης Πληροφορικής και Πολυμέσων), ΑΤΕΙ Κρήτης,
- 9/2003 έως 6/2008 Διδασκαλία του μαθήματος Φυσικής στη Δευτεροβάθμια Εκπαίδευση, (1^ο Ενιαίο Λύκειο Ηρακλείου, 4^ο Ενιαίο Λύκειο Ηρακλείου, Ενιαίο Λύκειο Μοχού και Ενιαίο Λύκειο Ακρωτηρίου, Χανίων), στα πλαίσια της Πρόσθετης Διδακτικής Στήριξης (ΠΔΣ).
- 9/2003 έως 5/2008 Συνεργασία με τα φροντιστήρια μέσης εκπαίδευσης, Θαλής και Ηράκλειτος, Ηράκλειο.
- 9/2006 έως 3/2007 Εργαστήριο Φυσικής Ι, ως 407/80 στο Πολυτεχνείο Κρήτης, Γενικό Τμήμα.
- 12/2007 έως 6/2010 Ωρομίσθια καθηγήτρια Φυσικής στο 3^ο Γυμνάσιο Ιεράπετρας, στο Ενιαίο Λύκειο Ακρωτηρίου Χανίων και στο 4^ο Γυμνάσιο Χανίων.

ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΣΗΜΕΙΩΣΕΩΝ

1. Ε. Βαζγιουράκη, Γ. Θεμελής, Α. Παπαδάκης, Β. Παπαδάκης, Κ. Μπάλας, “Imaging Diagnostics”, Optical Imaging Lab, Heraklion Crete, Greece, 1998.
2. Ε. Βαζγιουράκη, “Σημειώσεις Φυσικής,” (2003) για τους σπουδαστές του τμήματος Ηλεκτρονικής ΑΤΕΙ Κρήτης.

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Zacharakis, G.; Anglos, D.; Vazgiouraki, E.; Papazoglou, T.G, “Temporal and spectral effects of scatterers on sub-picosecond laser-induced fluorescence of organic dyes”, Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO)/Europe - Technical Digest, 14-18 September 1998, Pages 119, Glasgow, U.K.
2. Μ. Κοσμαδάκη, Κ. Μπάλας, Σ. Μαράκη, Γ. Θεμελής, Ε. Βαζγιουράκη, Μ. Στεφανίδου, Ε. Χελιδόνης, Α. Τόσκα, 9ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, «Ποσοτική Πολυφασματική απεικόνιση του *Corynebacterium Minutissimum* σε βλάβες ερυθράσματος», Ηράκλειο, Ελλάδα, Νοέμβριος 1998.
3. Μ. Kosmadaki, G. Themelis, E. Vazgiouraki, C. Balas and A. Tosca “The diagnostic potential of multispectral imaging and excitation in skin infections”, VI International Conference on MEDICAL PHYSICS, Patras (Greece), September 1-4, 1999.

4. E. Βαζγιουράκη, Γ. Ορφανός, Α. Παπαδάκης, Κ. Μπάλας. “Ανάπτυξη βάσης δεδομένων για την τεκμηρίωση ζωγραφικών έργων με τη χρήση πολυφασματικής απεικόνισης και φασματομετρίας”. IB’ Σύμπόσιο Ιστορίας και τέχνης, Μονεμβασία 1999.
5. Stefanaki, C. Balas, G. Themelis, E. Vazgiouraki, A. Tosca, “Photodiagnosis of Condylomata Acuminata by using Acetic Acid and 5-Aminolevulinic Acid”, Tosca Clinical Dermatology 2000, Vienna May 17-20, 2000
6. Costas Balas, Vasilis Papadakis, Nicolas Papadakis, Antonis Papadakis, George Tsairis, Eleftheria Vazgiouraki, Costas Fotakis, “A Novel Hyper-Spectral Imaging Apparatus for the Non-Destructive Analysis of Objects of Artistic and Historic Value” LACONA 2000.
7. Costas J. Balas, Antonis E. Papadakis, George C. Themelis, Eleftheria Vazgiouraki, Vasilis M. Papadakis, Eugenios Koumantakis, Androniki Tosca, Emmanuel S. Helidonis, “A novel Spectral Imaging System for the in-vivo early detection, quantitative staging and mapping of dysplasias and malignancies of cervix and larynx,” Multi-modal & Automated Computational Methods for Pre-surgical Visualization of Tissue Structure. Amsterdam, Ebios 2000.
8. C. Balas, V. Papadakis, N. Papadakis, A. Papadakis, E. Vazgiouraki, G. Themelis, “A Novel Hyper-Spectral Imaging Apparatus for the Non-Destructive Analysis of Objects of Artistic and Historic Value” Paris, LACONA 2001.
9. C. Balas, G. Themelis, A. Papadakis, E. Vazgiouraki, A. Argyros, E. Koumandakis, A. Tosca, E. Helidonis, “A Novel Hyper-Spectral Imaging System: Application on *in vivo* detection and grading of cervical precancers and of pigmented skin lesions, IEEE Workshop on Computer Vision beyond the Visible Spectrum: Methods and Applications, Hawaii, 14th Dec., 2001.
10. E. M. Vazgiouraki, A. D. Tosca, V. M. Papadakis, A. E. Papadakis, J. G. Panayotidis, D. Ioannidou, S. Kruger, C. J. Balas, “A new diagnostic method using a novel Hyper Spectral Imaging System for the in-vivo assessment of melanin pigmented skin lesions” BIOPHOTONICS, FO.R.T.H. IESL, 2002, October 18 – 20, 2002, Heraklion, Crete, Greece.
11. E. M. Βαζγιουράκη, Β. Μ. Παπαδάκης, Ι. Παναγιωτίδης, Δ. Ιωαννίδου, S. Kruger, Κ. Μπάλας, Α. Τόσκα, “Χρήση νέας μεθόδου υπερφασματικής απεικόνισης και φασματομετρίας στον *in vivo*, μη επεμβατικό οπτικό χαρακτηρισμό και την ανάλυση μελαγχρωματικών βλαβών του δέρματος”, 11^ο Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο, 1 – 3 Νοεμβρίου 2002, Χανιά.
12. Orfanoudaki E, Sifakis S, Themelis G, Fragouli D, Panayotidis J, Vazgiouraki E, Balas C and Koumandakis E, A clinical study of optical biopsy of the uterine cervix using a multispectral imaging system, The 18th European Congress of Gynecology, 12-15 / 5 / 2004, Athens, Greece.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

1. Stefanidou M.; Tosca A.; Themelis G.; Vazgiouraki E.; Balas C, *In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy efficacy of δ -aminolevulinic acid-induced porphyrins in basal cell carcinomas and actinic keratoses; implications for optimization of photodynamic therapy*, European Journal of Dermatology, Volume 10, Issue 5, 2000, Pages 351-356.
2. Stefanaki IM, Tosca AD, Themelis GC, Vazgiouraki EM, Dokianakis DN, Panayiotidis JG, Spandidos DA, Balas CJ. *In vivo detection of human papilloma virus-induced lesions of anogenital area after application of acetic acid: a novel and accurate approach to a trivial method*. J Photochem Photobiol B. 2001 Dec 31;65(2-3):115-21.
3. Costas Balas, Vassilis Papadakis, Nicolas Papadakis, Antonis Papadakis, Eleftheria Vazgiouraki, George Themelis, “*A Novel Hyper-Spectral Imaging Apparatus for the Non-Destructive Analysis of Objects of Artistic and Historic Value*”, Journal of Cultural Heritage, Volume 4, January 2003, Pages 330-337.
4. I.M. Stefanaki, S. Georgiou, G.C. Themelis, E.M. Vazgiouraki and A.D. Tosca, *In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy in condylomata acuminata*. British Journal of Dermatology, Volume 149, Issue 5, Page 972-976, Nov 2003.
5. Orfanoudaki E, Themelis G, Sifakis S, Fragouli D, Panayotidis J, Vazgiouraki E, Koumandakis E, *A clinical study of optical biopsy of the uterine cervix using a multispectral imaging system*, Gynecologic Oncology, Volume 96, Page 119-131, January 2004.
6. M. Kosmadaki, G. Themelis, E. Vazgiouraki, C. Balas and A. Tosca, *The diagnostic potential of multispectral imaging and excitation in skin infections*, VI International Conference on MEDICAL PHYSICS, Patras (Greece), September 1-4, 1999.
7. Eleftheria Vazgiouraki, Vassilis M. Papadakis, Paschalis Efstathopoulos, Iakovos Lazaridis, Ioannis Charalampopoulos, Costas Fotakis, Achille Gravanis, *Application of multispectral imaging detects neuronal myelin loss, without tissue labeling*, Microscopy, 2015 (accepted-under publication).

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣκΠ) χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη φλεγμονής και την παρουσία απομυελινωμένων βλαβών κυρίως στη λευκή ουσία (WM: white matter) του κεντρικού νευρικού συστήματος (CNS), κατάσταση που οδηγεί σε μόνιμη νευρολογική αναπηρία (αισθητηριακή και κινητική). Η έρευνα για τη ΣκΠ πραγματοποιείται κυρίως με τη βοήθεια του μοντέλου της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (experimental allergic encephalomyelitis, EAE) σε ποντίκια.

Οι τρέχουσες διαγνωστικές απεικόνισης των αλλοιώσεων της μυελίνης βασίζονται είτε στη μικροσκοπία μονιμοποιημένων ιστών είτε σε μια ποικιλία σύγχρονων μεθόδων. Η μικροσκοπία του φθορισμού είναι ένα ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο, το οποίο συνήθως συνοδεύεται με τεχνικές ανοσοφθορισμού. Κατά την τεχνική αυτή χρησιμοποιείται ένα αντισώμα υψηλής ειδικότητας σε κάποιο στο αντιγόνο, για την επισήμανση συγκεκριμένων κυτταρικών πρωτεϊνών ή άλλων μορίων μέσα στο κύτταρο. Αυτή η μέθοδος απαιτεί τη χορήγηση φθορίζουσών χρωστικών. Δυστυχώς, πολλοί από αυτούς τους δείκτες έχουν την τάση να διαταράσσουν τη δομή των λιπιδίων της μυελίνης, ενώ μπορεί να συμβεί και ουσιαστική συρρίκνωση των ινών της κατά τη διαδικασία της σταθεροποίησης και της αφαίρεσης του νερού. Επιπλέον, οι φθορίζουσες ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως ακριβές και μπορεί να υποστούν χημική φθορά και να χάσουν την ικανότητά τους να φθορίζουν, αν ακτινοβοληθούν με φως υψηλής ισχύος, πράγμα που περιορίζει αυτόματα το χρόνο εξέτασης του δείγματος.

Μια ποικιλία σύγχρονων οπτικών μεθόδων (coherent anti-stokes raman scattering, CARS; third harmonic generation microscopy) έχει χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση της κατάστασης των νευρώνων, των αλλοιώσεων των αξόνων, ή της διήθησης των ανοσοκυττάρων σε ποντίκια που έχει επαχθεί η ΕΑΕ. Αν και αυτά τα συστήματα απεικόνισης και οι εφαρμοζόμενες μέθοδοι είναι αρκετά ελπιδοφόρα για την ανίχνευση των αλλοιωμένων περιοχών κατά τη διάρκεια της ΣκΠ και της ΕΑΕ, έχουν υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης, ενώ είναι ογκώδη, μη φορητά και περίπλοκα στη χρήση τους. Επιπλέον, η ενέργεια και η ισχύς του φωτός λέιζερ που πέφτει πάνω στο δείγμα πρέπει να ρυθμιστεί προσεκτικά, προκειμένου να επιτευχθεί αφ' ενός το μέγιστο βάθος διείσδυσης του φωτός μέσα στον υπό εξέταση ιστό και αφ' ετέρου να μην αλλοιωθεί το δείγμα.

Η φασματική απεικόνιση είναι μια μέθοδος η οποία συνδυάζει τις δύο καθιερωμένες τεχνολογίες, της φασματοσκοπίας και της απεικόνισης. Το αποτέλεσμα της εφαρμογής της φασματικής απεικόνισης είναι η συλλογή ενός τρισδιάστατου συνόλου δεδομένων, που αποτελείται από ένα σύνολο εικόνων του δείγματος, που αποκτήθηκαν με απεικόνιση σε διαφορετικές φασματικές ζώνες. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της φασματικής απεικόνισης είναι ότι επιτρέπει την λεπτομερή επιθεώρηση των χαρακτηριστικών του δείγματος σε στενές φασματικές ζώνες, κατά μήκος μιας ευρείας φασματικής περιοχής. Αυτό επιτρέπει την ανάδειξη και την άμεση αξιολόγηση των «αόρατων» χαρακτηριστικών του δείγματος ή εκείνων των χαρακτηριστικών που εμφανίζουν χαμηλή αντίθεση. Επιπλέον, η φασματική απεικόνιση επιτρέπει τη μέτρηση του φάσματος σε κάθε σημείο ή περιοχή της εικόνας. Μια βασική διάταξη υλοποίησης της φασματικής απεικόνισης βασίζεται στη σύζευξη των ανιχνευτών απεικόνισης με τους μονοχρωμάτορες. Λόγω της έλλειψης οργάνων που να κυκλοφορούν στο εμπόριο, η φασματοσκοπία απεικόνισης πραγματοποιείται γενικά με αναπτυχθέντα συστήματα επί σκοπώ.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται ένας αναπτυχθέντας μονοχρωμάτορας απεικόνισης σε συνδυασμό με ένα εμπορικό μικροσκόπιο, προκειμένου να αξιολογηθούν βλάβες μυελίνης στο νωτιαίο μυελού ποντικών. Το βασικό συστατικό του συστήματος είναι ένας μονοχρωμάτορας απεικόνισης που συνίσταται από ένα περιστρεφόμενο δίσκο πάνω στον οποίο έχουν προσαρτηθεί διάφορα φίλτρα διέλευσης του φωτός. Ο μονοχρωμάτορας είναι ενσωματωμένος με ένα μονόχρωμο CMOS αισθητήρα των 5 MPixel [complementary metal-oxide semiconductor (CMOS)] και περιλαμβάνει 24 φίλτρα παρεμβολής που καλύπτουν τη φασματική περιοχή του ορατού (400 nm) για τους εγγύς υπερύθρου (1200 nm). Το σύστημα είναι ευαίσθητο σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού και είναι εύκολο στη χρήση του από οποιοδήποτε χρήστη. Το ανεπτυγμένο λογισμικό είναι σχεδιασμένο σε LabView (National Instruments) περιβάλλον προγραμματισμού και χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση του συστήματος, για τον έλεγχο της κάμερας και του μονοχρωμάτορα αλλά και για τη λήψη και ανάλυση των φασματικών εικόνων.

Το σύστημα λειτουργεί με δύο τρόπους: φασματοσκοπικά και φασματομετρικά. Ο φασματοσκοπικός τρόπος λειτουργίας επιτρέπει την προβολή, σε πραγματικό χρόνο, των επιθυμητών φασματικών εικόνων, ενώ κατά τον φασματομετρικό τρόπο λειτουργίας εκτελείται συγχρονισμένη φασματική σάρωση, η αποθήκευση των εικόνων και ο υπολογισμός ενός πλήρους φάσμα ανά εικονοστοιχείο. Οι προαναφερθείσες διαδικασίες (απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο, φασματική σάρωση, η αποθήκευση των εικόνων και ο υπολογισμός των φασμάτων) ελέγχονται μέσω του λογισμικού.

Η ΕΑΕ επάχθηκε σε θηλυκά ποντίκια C57BL/6 (B6) (6-10 εβδομάδων). Η ανοσοποίηση έγινε με 100 mg πεπτιδίου MOG35-55 γαλακτωματοποιημένου σε ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA Freud's adjuvant, Sigma) χορηγούμενο υποδόρια, στη βάση της ουράς, καθώς και με ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις των 200ng τοξίνη του κοκκύτη (Sigma) κατά το χρόνο της ανοσοποίησης και 48 ώρες αργότερα. Για τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια που 10 ημέρες μετά την ανοσοποίηση κατέληξαν στην κλινική βαθμολογία 3-4. Πέντε θηλυκά ποντίκια C57/BL6 χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου και τα οποία ανοσοποιήθηκαν μόνο με το CFA και την τοξίνη του κοκκύτη. Τομές των 40 ή 50μm κόπηκαν με κρυτόμο, κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης. Οι τομές εμποτίστηκαν με το αντίσωμα της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης, anti-MBP 1:500 (ab980; Chemicon), το αντίσωμα anti-cluster of differentiation 3 (anti-CD3, ebiosciences purified Rat anti-mouse CD3) και τέλος με δευτερογενή αντισώματα (Alexa Fluor 488, and 633; 1:1000 σε TBST 0.1%). Τέλος τα δείγματα επικαλύφθηκαν με Antifade Gold με DAPI (Invitrogen).

Πριν την ένεση οποιουδήποτε συνόλου μετρήσεων, το πολυφασματικό μικροσκόπιο βαθμονομείται. Μετά την επιτυχημένη ολοκλήρωση της διαδικασίας της βαθμονόμησης του, οι τομές του νευρικού ιστού από το νωτιαίο μυελό των ποντικών σαρώνονται προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές αλλοιώσεις και οι απομυελινωμένες περιοχές σημειώνονται και ελέγχονται μία προς μία αντίστοιχα με τις συμβατικές απεικονιστικές μεθόδους του ανοσοφθορισμού. Η ανάλυση των δεδομένων που συλλέχθηκαν έδειξε ότι η παράμετρος διαφοροποίησης της έντασης, ΠΔΕ(λ) είναι μια σημαντική διαγνωστική παράμετρος που εξαρτάται από τη φασματική περιοχή μελέτης και εντοπίζει τις περιοχές που έχουν υποστεί απώλεια στη μυελίνη. Η ΠΔΕ(λ) υπολογίστηκε και κάθε φασματική περιοχή παρατήρησης. Η όλη διαδικασία σάρωσης του δείγματος, ανάλυσης και εξαγωγής των αποτελεσμάτων διαρκεί μόλις λίγα λεπτά.

Η πολυφασματική απεικόνιση του ιστού δείχνει ότι το οπισθοσκεδαζόμενο σήμα αυξάνεται στην περιοχή της λευκής ουσίας λόγω του μεγάλου αριθμούς των μυελινωμένων νευροαξόνων, ενώ τα σώματα των νευρικών κυττάρων και οι δενδρίτες παρουσιάζουν χαμηλή ανάκλαση. Επιπλέον, τα όρια μεταξύ της λευκής και της φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού απεικονίζονται ευκρινώς σε αρκετές φασματικές ζώνες. Ο ιστός γίνεται σταδιακά διαφανής σε μεγάλα μήκη κύματος (υπέρυθρη περιοχή του φάσματος), με τα όρια μεταξύ λευκής και φαιάς ουσίας να γίνονται δύσκολα ανιχνεύσιμα στις εικόνες που αντιστοιχούν σε ζώνες άνω των 800nm.

Το DAPI είναι μία εγγενώς φθορίζουσα χρωστική, η οποία δεσμεύεται στο DNA, και αναδεικνύει τα εμπύρηννα κύτταρα. Η πυκνότητα των φθορίζοντων μορίων είναι αυξημένη στις περιοχές που παρουσιάζουν αλλοίωση, υποδεικνύοντας τον αυξημένο αριθμό εμπύρηνων κυττάρων. Η επαγωγή της αυτοάνοσης αντίδρασης και η αύξηση της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που επάγεται η χορήγηση της τοξίνης του κοκκύτη επιφέρουν την είσοδο των ενεργοποιημένων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος εντός του ΚΝΣ. Εκτός από τη χρήση του DAPI ως φθορίζουσα χρωστική έγινε και απεικόνιση του φθορισμού του αντισώματος της MBP (βασική πρωτεΐνη της μυελίνης). Πράγματι, η MBP είναι ένα σημαντικό συστατικό της μυελίνης, η οποία περιβάλλει τους άξονες των νευρώνων στο ΚΝΣ. Η περιοχή της αλλοίωσης χαρακτηρίζεται από ένα χαμηλότερο σήμα φθορισμού του anti-MBP, υποδεικνύοντας τα μειωμένα επίπεδα της μυελίνης σε ορισμένες περιοχές που παρουσιάζονται ως μαύρες τρύπες που περιβάλλονται από ένα φθορίζον φόντο. Προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση των εμπύρηνων κυττάρων που συγκεντρώθηκαν στην περιοχή της βλάβης, έγινε χρώση των τομών του νωτιαίου μυελού με αντισώματα έναντι του αντιγόνου CD3. Το CD3 είναι ένας ειδικότατος δείκτης των T-λεμφοκυττάρων σε αλλοιωμένες περιοχές και δείχνει την διείσδυση αυτών των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που σχετίζονται με την απώλεια της μυελίνης. Η διαφορετική ανακλαστικότητα μεταξύ της κανονικής και της αλλοιωμένης περιοχής αποτυπώθηκε ξεκάθαρα και στις εικόνες που συλλέχθηκαν με το σύστημα της πολυφασματικής απεικόνισης.

Η αποτελεσματικότητα του συστήματος της πολυφασματικής απεικόνισης στην ανίχνευση περιοχών που παρουσιάζουν απώλεια μυελίνης ελέγχθηκε μέσω της συγκριτικής απεικόνισης των ίδιων αλλοιώσεων με το πολυφασματικό σύστημα μικροσκοπίου και με τα μικροσκόπια και τις μεθόδους του ανοσοφθορισμού. Στις εικόνες του πολυφασματικού μικροσκοπίου, στην περιοχή της βλάβης, το οπισθοσκεδαζόμενο σήμα ελαχιστοποιείται και η περιοχή απεικονίζεται ως μια μαύρη τρύπα σε ένα σημαντικά ανοιχτόχρωμο φόντο. Η σύγκριση των εικόνων που συλλέγονται με το μικροσκόπιο του φθορισμού και του συστήματος της πολυφασματικής απεικόνισης δείχνει σαφώς ότι η τελευταία μέθοδος ανιχνεύει με ακρίβεια την έκταση της βλάβης.

Στην περιοχή της βλάβης τα συσσωρευμένα κύτταρα που έχουν διεισδύσει εκτοπίζουν τις γειτονικές εμπύρηνες ίνες, και τα έλυτρα της μυελίνης διαταράσσονται και διαστέλονται, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας εικόνας απομυελίνωσης. Είναι έτσι δυνατόν η απώλεια του σήματος της οπισθοσκεδαζόμενης ακτινοβολίας να αποδοθεί στην απώλεια της ανακλαστικότητας των ιών της μυελίνης, στην ύπαρξη των συγκεντρωμένων φλεγμονωδών κυττάρων της ανοσολογικής απόκρισης τα οποία απορροφούν το προσπίπτον φως, και στην αυξημένη πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων. Ένα μέρος του προσπίπτοντος φωτός περνάει απευθείας μέσα από την περιοχή της βλάβης σχεδόν ανεπηρέαστο από τις κατεστραμμένες ίνες της μυελίνης, και ένα άλλο μέρος οπισθοσκεδάζεται ανάλογα με τον συντελεστή απορρόφησης και την συγκέντρωση των συσσωρευμένων κυττάρων και των αιμοφόρων αγγείων εντός της βλάβης. Κατά συνέπεια, η περιοχή

της βλάβης χάνει το ιδιαίτερο σήμα ανάκλασης που εμφανίζεται στην άθικτη λευκή ουσία. Η μορφολογία της περιοχής που παρουσιάζει απώλεια μυελίνης και που ανιχνεύεται με τις συμβατικές μεθόδους απεικόνισης είναι συγκρίσιμη με εκείνη που λαμβάνεται με το πολυφασματικό σύστημα.

Ο υπολογισμός της παραμέτρου διαφοροποίησης της έντασης, ΠΔΕ(λ) υποδεικνύει ότι η μέγιστη διάκριση μεταξύ καταστραμμένων και άθικτων περιοχών επιτυγχάνεται με απεικόνιση του ιστού στη φασματική ζώνη των 500 nm. Οι φασματικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των κανονικών και των αλλοιωμένων περιοχών αντικατοπτρίζουν τις διαφορετικές πυκνότητες και τη διαφορετική σύσταση των ιστών στις περιοχές αυτές. Πράγματι, στην περιοχή της βλάβης, τα έλυτρα μυελίνης είναι διεσταλμένα/κατεστραμένα και επομένως η προσπίπτουσα ακτινοβολία παρουσιάζει μικρότερη διασπορά.

Τέλος, η σύγκριση της αναπτυχθείσας μεθόδου με τις κλασικές μεθόδους ανοσοφθορισμού δείχνει ότι η ευαισθησία του πολυφασματικού συστήματος για την ανίχνευση περιοχών του νωτιαίου μυελού με απώλεια μυελίνης είναι 90,4% και η θετική προγνωστική αξία είναι 92,2%.

Στο τελευταίο πειραματικό κομμάτι της παρούσας διατριβής έγινε εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης στην ανίχνευση της καταστροφής των στιβάδων του αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού ποντικών κατόπιν επαγωγής τοξικότητας με τη χορήγηση AMPA. Με επιλεκτική απεικόνιση των τομών των ποντικών που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (PBS) φάνηκε ότι οι στιβάδες του αμφιβληστροειδή χιτώνα έχουν διαφορετικά φασματικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, μέσω της καταγραφής του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός από αυτές. Τα φασματικά χαρακτηριστικά αυτά αλλοιώνονται στην περίπτωση τομών στις οποίες επάχθηκε τοξικότητα, με φυσική συνέπεια η σχεδόν ολική απώλεια του οπισθοσκεδαζόμενου σήματος της πολυφασματικής απεικόνισης να σχετιστεί με την μερική ή ολική νέκρωση των κυττάρων.

Multiple sclerosis (MS) is characterized by inflammation and demyelinating lesions in white matter (WM) of the central nervous system (CNS), leading to permanent neurological disabilities (sensory and motor deficiencies). Research on MS has been performed mainly with the aid of the experimental allergic encephalomyelitis (EAE) mouse model.

Current diagnostic imaging of myelin alterations is conducted using microscopy of fixed tissue or a variety of modern methods. Fluorescence microscopy is a powerful diagnostic tool, which is usually coupled to immunofluorescence techniques, using the highly specific binding of an antibody to its antigen for labelling specific cellular proteins or other molecules within the cell. This method requires the administration of fluorescent dyes. Unfortunately, many of them tend to disrupt the lipid structure of myelin, while considerable shrinkage of myelin sheaths may take place after fixation and dehydration. Moreover, fluorophores are usually expensive and may lose their ability to fluoresce, due to their chemical deterioration under high-power light limiting the examination time of the sample.

A variety of other modern optical methods (coherent anti-stokes raman scattering, CARS; third harmonic generation microscopy) have been used to image neuronal status, axonal alterations, or immune cell trafficking in the EAE mice. Although these imaging systems and methods are quite powerful to detect abnormal areas during MS and EAE, they are expensive, not portable and complicated. Therefore, laser energy and power onto the sample have to be optimized in order to achieve maximum penetration depth of light into the tissue under examination, without affecting the sample.

Spectral imaging is a method which combines two well-established technologies, spectroscopy and imaging. Spectral imaging results in the collection of a three-dimensional data set, consisting of an image group, through the use of the same specimen field, acquired at different wavelength bands. An important advantage of spectral imaging is that it enables the inspection at narrow spectral bands, along a wide spectral range, permitting the direct assessment of invisible or low-contrast features of diagnostic importance. Additionally, it permits the measurement of the spectrum at each point or area of the image. An optimum set-up for the acquisition of multiple spectral images is the coupling of imaging detectors to monochromators. Imaging spectroscopy is generally performed with custom-built instruments due to the lack of commercial instrumentation.

In the present work, a custom-made imaging monochromator coupled to a commercial microscope is used in order to evaluate spinal cord myelin damage. The critical component of the system is an interference filter wheel-based imaging monochromator. The monochromator incorporates a 5 MPixel monochrome CMOS sensor [complementary metal-oxide semiconductor (CMOS)] with 24 interference filters covering the spectral range from visible (400 nm) to near-infrared (1200 nm). The system is sensitive in low light conditions and is easily monitored by the end-user. The developed software is designed in LabView (National Instruments) programming interface and is used for the calibration of the system, for the control of the camera and monochromator and for the spectral image capturing and analysis.

The system operates in two modes: spectroscopic and spectrometric. The spectroscopic mode enables the real-time visualization of desired spectral images while the spectrometric mode performs synchronized spectral scanning, image capturing and calculation of a full spectrum per image pixel. The above-mentioned procedures (real-time visualization, spectral scanning, image capturing and calculation of the spectra) are controlled through the software.

EAE was induced in female C57BL/6 (B6) mice (6–10 weeks) by immunization with 100 mg MOG35–55 peptide emulsified in complete Freud's adjuvant (CFA Sigma) s.c. at the base of the tail, and i.p. injections of 200 ng pertussis toxin (Sigma) at the time of immunization and 48 h later. Mice reaching clinical score 3–4, ten (10) days after immunization were introduced in the study. Five female C57/BL6 mice were used as control-naive mice. Sections of 40 or 50 μm sections were cut longitudinally in a vibratome. The sections were incubated with anti-myelin basic protein (anti-MBP) antibody 1:500 (ab980; Chemicon) and anti-cluster of differentiation 3 (anti-CD3) antibody (eBiosciences, purified rat anti-mouse CD3), followed by incubation with secondary antibodies (Alexa Fluor 488, and 633, Invitrogen) 1:1000 in TBST. Finally, samples were coverslipped using Antifade Gold with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen).

Before of each measurement set, the multispectral imaging microscope system is calibrated. After its successful calibration, spinal cord tissue is scanned for lesion sites and the demyelinated areas are marked and cross-checked with conventional fluorescent imaging methods. Analysis of the collected data show that the differential parameter ($DP(\lambda)$) is a significant, wavelength dependent, diagnostic parameter indicating areas with myelin loss. $DP(\lambda)$ is estimated for each wavelength range of observation. Observation and analysis time, including calibration, lasts for a few minutes.

Tissue imaging with multispectral imaging microscope shows that the backscattered signal is increased in the WM because of the abundant numbers of myelinated axons, while anterior horn neuron cell bodies and dendrites show low reflectance. Moreover, the boundaries between white and grey matter of the spinal cord are clearly depicted. Through selective imaging, the tissue becomes gradually transparent at long wavelengths (infrared spectral region), with the limits between WM and GM hardly detectable in images captured at wavelengths over 800nm.

DAPI is an intrinsically fluorescent stain, which binds the DNA, thus labelling nucleated cells. The density of the fluorescent molecules is increased in a lesioned area, indicating elevated inflammatory cell numbers from the invasion of immune cells, for example, after induction of the autoimmune reaction and permeabilization of the blood–brain barrier with pertussis toxin to facilitate entry of activated immune cells within the CNS. In addition to the use of DAPI as a fluorescent stain, the use of fluorescent antibodies against MBP is also informative. Indeed, MBP is a major component of myelin, which surrounds the axons of neurons in the CNS. The area of the lesion is depicted by a lower MBP fluorescent signal, indicating decreased levels of myelin, presented as black holes (arrows) in the fluorescent background. Staining of spinal cord sections with antibodies against the CD3 antigen, a marker of T lymphocytes in inflamed areas, shows the infiltration of these immune cells associated with myelin loss. The different reflectance between the normal and the lesioned tissue is clearly depicted in images captured with multispectral imaging system.

The accuracy of our system to detect areas with myelin loss was accurate with that of the gold-standard method of immunofluorescence microscopy, through comparative imaging of the same lesions with our microscope system. At the area of the lesion, the backscattered signal is minimized

and the area is demonstrated as a black hole in a significantly lighter background. Comparison of the images captured with a fluorescence microscope and multispectral imaging microscope system clearly shows that the latter accurately detects the area of the lesion.

At the area of the lesion, accumulations of infiltrated cells displace the neighbouring myelinated fibres, and the sheaths of the myelin are disrupted and dilated, resulting in illusive demyelination. It is thus possible that loss of the backscattered signal is attributed to the loss of reflectivity of myelin, to the existence of the concentrated inflammatory cells of the immune response which absorb the incident light, and to the increased density of inflamed blood vessels. A part of the incident light is transmitted directly to the area of the lesion almost unaffected by the damaged myelin fibres, and another part is backscattered depending upon the absorption coefficient and concentration of the accumulated cells and blood vessels within the lesion. Consequently, the area of the lesion loses the prominent reflectance signal shown in the normal WM. The morphology of the area with myelin loss detected with conventional imaging methods is comparable to that obtained with our system.

The estimation of the $DP(\lambda)$ parameter indicates that the maximum discrimination between damaged and normal areas is shown at 500nm. Spectral differences observed between normal and lesioned WM reflect the different densities of various tissue structures and compositions. Indeed, at the area of the lesion, myelin sheaths are dilated/destroyed, thus incident light is less scattered.

Comparison of our method to classical immunofluorescence microscopy methods shows that the sensitivity of our system to detect spinal cord areas with myelin loss is 90.4% and the positive predictive value is 92.2%.

In the last experimental part of this study, the multispectral imaging method is applied for the detection of the destruction of the retina layers of the mouse eye induced through AMPA excitotoxicity. The selective imaging of sections of the control mice (PBS) shows that the retina layers have different spectral and imaging characteristics the one from other. The characteristics of the backscattered signal are altered in the case of induced excitotoxicity and the control group. The backscattered signal of the multispectral imaging at slices with AMPA is almost lost and this phenomenon is associated with partial or complete necrosis of the cells.

Η διάγνωση βασίζεται κυρίως στον οπτικό χαρακτηρισμό μακροσκοπικών μορφοχρωματικών χαρακτηριστικών κάθε ιστικής/κυτταρικής αλλοίωσης και στην *in vitro* ιστολογική ανάλυση του δείγματος με ιστοπαθολογικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους.

Οι οπτικές διαγνωστικές μέθοδοι παρέχουν σήμερα μεγάλες δυνατότητες μη καταστρεπτικής ανάλυσης υλικών βασιζόμενες στα χαρακτηριστικά αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη. Παρατηρούμενες αλλαγές των χαρακτηριστικών αυτών συνδέονται με διάφορες ιστικές αλλοιώσεις (βιοχημικές, μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές) που είναι ενδεικτικές παθολογικών καταστάσεων. Η πληροφορία που λαμβάνεται από το ανθρώπινο οπτικό σύστημα, στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν είναι αρκετή για την ταυτοποίηση της ιστικής αλλοίωσης και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται η *in-vitro* ιστολογική ανάλυση δείγματος του υπό εξέταση ιστού, με ιστοπαθολογικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους.

Η ιστολογική μελέτη συνίσταται κυρίως στην μικροσκοπική μελέτη μορφοχρωματικών χαρακτηριστικών των κυττάρων, όπως η αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος, σχήμα του κυττάρου, βαθμός χρώσεως κλπ. Υπάρχουν όμως διάφορα μειονεκτήματα τα οποία περιορίζουν την αποτελεσματικότητά τους:

- Υπάρχει δυσκολία στη λήψη αντιπροσωπευτικού τμήματος της ιστικής αλλοίωσης αφού σε αρκετές περιπτώσεις τα όρια της ιστικής αλλοίωσης και του υγιούς ιστού δεν είναι εύκολα ανιχνεύσιμα από το ανθρώπινο μάτι.
- Η διαδικασία της ιστολογικής εξέτασης δεν είναι άμεση, γεγονός που επιφέρει προβλήματα, όταν η παράμετρος χρόνος είναι κρίσιμης σημασίας όπως π.χ. κατά τη διάρκεια χειρουργικής επέμβασης. Στην περίπτωση αυτή, παρ' ότι το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται εν μέρει με μεθόδους ταχείας βιοψίας, εντούτοις ο χρόνος που απαιτείται δεν είναι αμελητέος. Συχνά δε, απαιτούνται σειρά ταχείων βιοψιών για την εκτίμηση της υπό εξέταση περιοχής.

Τα προβλήματα που σχετίζονται με την *in vitro* ιστολογική μελέτη οδήγησαν στην εφαρμογή οπτικών φασματοσκοπικών τεχνικών διάγνωσης ιστικών αλλοιώσεων (φασματοσκοπία φθορισμού, διάχυτης ανάκλασης, απορρόφησης και ελαστικής σκέδασης του φωτός από τον ιστό). Αυτές οι τεχνικές βασίζονται στη θεώρηση ότι το ιδιαίτερο οπτικό φάσμα κάποιου ιστού παρέχει πληροφορίες για τη δομή, τη βιοχημική σύσταση και τη λειτουργική του κατάσταση (Papadakis A. *et al*, 2003, Akbari H *et. al*, 2010).

Κάποιες από τις οπτικές φασματοσκοπικές τεχνικές διάγνωσης που χρησιμοποιούνται σήμερα πειραματικά αναφέρονται στη συνέχεια:

- Φασματοσκοπία φθορισμού ιστών με ή χωρίς τη χρήση διαγνωστικών δεικτών
- Φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης του φωτός από τον ιστό
- Φασματοσκοπία Raman

Ο φθορισμός με ή χωρίς τη χρήση διαγνωστικών δεικτών είναι σημαντικό μέσο για τον χαρακτηρισμό των ιστών. Είναι γνωστό ότι διάφορα δομικά χαρακτηριστικά των ιστών δίνουν ιδιαίτερα φασματικά χαρακτηριστικά όταν διεγερθούν με ορισμένο μήκος κύματος φωτός. Η μέτρηση του επαγόμενου φθορισμού τους, παρέχει πληροφορίες για τη βιοχημική κατάσταση του

ιστού (*Barash E. et al 2010*). Η μελέτη των λειτουργικών μεταβολών βασίζεται στη χρησιμοποίηση διαφόρων ουσιών (markers) οι οποίες απορροφούνται επιλεκτικά από τους παθολογικούς ιστούς και οι οποίες δίνουν συγκεκριμένα φασματικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία του ιστού και εν μέρει και με το βαθμό της βλάβης.

Στη φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης και σκέδασης, οι δομικές ιστικές μεταβολές μελετώνται με χρήση μετρήσεων του ελαστικά σκεδαζόμενου φωτός, σε μια ευρεία περιοχή μηκών κύματος. Είναι γνωστό ότι πολλές παθολογικές καταστάσεις σχετίζονται με σημαντικές δομικές αλλαγές στον κυτταρικό και υποκυτταρικό χώρο (μέγεθος και σχήμα κυττάρων, ο λόγος όγκων του πυρήνα και του κυττάρου, κ.τ.λ.) (*Imitola J. et. al. 2011*). Έτσι τέτοιες δομικές αλλαγές αναμένεται να επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στο λαμβανόμενο οπτικό σήμα λόγω εξάρτησης της ελαστικής σκέδασης από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

Τέλος στη φασματοσκοπία Raman, η μελέτη των χαρακτηριστικών μεγίστων στα λαμβανόμενα φάσματα παρέχει πληροφορίες για τη βιοχημική σύσταση του ιστού. Η φασματοσκοπία Raman (spectroscopy Raman), είναι ειδική φασματοσκοπική τεχνική που εφαρμόζεται για την έρευνα και μελέτη στοιχείων και πληροφοριών που αφορούν τη δομή των μορίων, των ιόντων, καθώς και των κρυστάλλων. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στο γνωστό αποκαλούμενο οπτικό φαινόμενο Raman. Η σκέδαση Raman είναι ένα από τα φαινόμενα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και ύλης.

Αν και οι προηγούμενες μέθοδοι οπτικού χαρακτηρισμού των ιστών μπορούν αναμφισβήτητα να αποτελέσουν σημαντικότερη πρόοδο στον τομέα της διάγνωσης παθολογικών καταστάσεων εν τούτοις διάφορα προβλήματα δυσχεραίνουν ουσιαστικά την κλινική τους χρήση. Κάποια από τα προβλήματα αυτά αναφέρονται στη συνέχεια:

- Η χρησιμοποίηση διαγνωστικών δεικτών (markers) συνδέεται με προβλήματα τοξικότητας, μη ικανοποιητικής επιλεκτικής συσσώρευσης τους στους παθολογικούς ιστούς, στο πόσο "ειδικοί" είναι οι χρησιμοποιούμενοι δείκτες για κάθε είδος ιστού, ενώ ο χρόνος που μεσολαβεί για την κατακράτησή τους από τους παθολογικούς ιστούς είναι αρκετά μεγάλος.
- Υπάρχει δυσκολία στην αντιστοίχιση των φασματικών χαρακτηριστικών με το βιολογικό υπόστρωμα λόγω πολυπλοκότητας των ιστών.
- Στις περιπτώσεις που δεν χρησιμοποιούνται δείκτες, η αντίθεση (contrast) μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού είναι χαμηλή.
- Οι φασματοσκοπικές αυτές μέθοδοι παρέχουν σημειακή φασματική πληροφορία, χωρίς τη λήψη χωρικής πληροφορίας και επομένως περιορίζονται στη μελέτη μόνο ομοιόμορφων υλικών. Ο κίνδυνος μελέτης μη αντιπροσωπευτικού δείγματος σε συνδυασμό με την περιορισμένη σημειακή πληροφορία καθιστά τις υπάρχουσες διαγνωστικές τεχνικές οπτικής φασματοσκοπίας προβληματικές.
- Οι μέθοδοι αυτές περιορίζονται κυρίως στο ορατό μέρος του φάσματος με αποτέλεσμα να αγνοείται πιθανή υπάρχουσα πληροφορία που θα μπορούσε να ληφθεί με παρατήρηση σε άλλη φασματική περιοχή (π.χ. στο υπέρυθρο ή το υπεριώδες).
- Απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για τη λήψη και επεξεργασία της οπτικής πληροφορίας και συνεπώς είναι κατάλληλες για τη μελέτη ακίνητων μόνο αντικειμένων.

Στο παρόν ερευνητικό έργο χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι και συστήματα πολυφασματικής απεικόνισης που βασίζονται στα χαρακτηριστικά αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη, σε φυσιολογικό και παθολογικό νευρικό ιστό. Οι μέθοδοι και τα συστήματα αυτά πλεονεκτούν έναντι των μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενων τεχνικών και μεθόδων διάγνωσης, διότι:

- 1) παρέχουν τη δυνατότητα μη καταστρεπτικής ανάλυσης των υλικών
- 2) περιορίζουν ή και εξαλείφουν, σε κάποιες περιπτώσεις, τη χρήση διαγνωστικών δεικτών (markers) η οποία συνδέεται με προβλήματα τοξικότητας και «ειδικότητά» τους για κάθε είδος ιστού.
- 3) αυξάνουν την αντίθεση (contrast) μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού χωρίς χρήση δεικτών.
- 4) παρέχουν χωρική φασματική και επαναλαμβανόμενη πληροφορία και καθίστανται τεχνικές μεγίστης σημασίας ιδιαίτερα στη μελέτη ανομοιομορφων χωρικά υλικών.
- 5) εφαρμόζονται από το υπεριώδες μέρος του φάσματος μέχρι και το υπέρυθρο με αποτέλεσμα να εκτιμάται πιθανή υπάρχουσα πληροφορία που διαφορετικά θα μπορούσε να αγνοηθεί με την απλή παρατήρηση.
- 6) ελαχιστοποιούν το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη λήψη και την επεξεργασία δειγμάτων και συνεπώς είναι κατάλληλες για τη μελέτη ακόμα και κινούμενων αντικειμένων.
- 7) Ειδικά στην περίπτωση νευροεκφυλιστικών νόσων, δεν υπάρχει η τεχνογνωσία για λεπτομερή και συνεχή καταγραφή της απώλειας νευρικών ή γλοιακών κυττάρων, η οποία αποτελεί την κύρια αιτία ανάπτυξης πολλών νόσων.

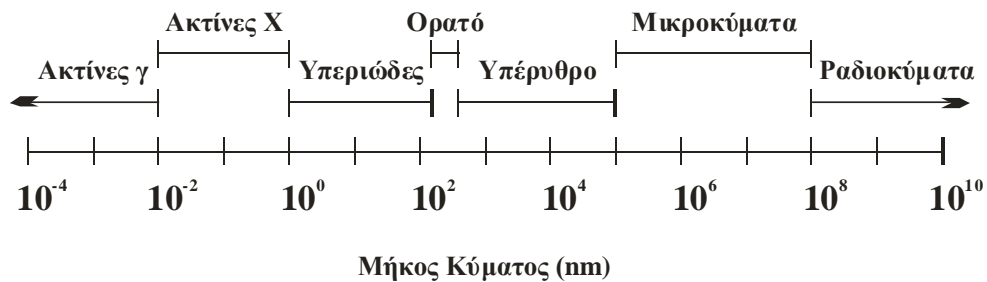
Σκοπός της προτεινόμενης έρευνας είναι η εισαγωγή νέων μη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων βασισμένες στην διεργασίες που συντελούνται κατά την αλληλεπίδραση μη ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τους ιστούς. Γίνεται συσχέτιση των δομικών αλλοιώσεων που παρατηρούνται στο νευρικό ιστό ποντικών με τα φασματικά τους χαρακτηριστικά στην περίπτωση της Πειραματικής Αυτοάνοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE). Λόγω πολυπλοκότητας του νευρικού ιστού, η μη επεμβατική κι ιδιαίτερα η *in vivo* μελέτη των παθολογικών διεργασιών του ιστού απαιτεί τη χρήση απεικονιστικών συστημάτων σε ευρεία φασματική κλίμακα. Αποτελεί επομένως στόχο αιχμής η εξέλιξη και χρήση μη επεμβατικών μεθόδων που θα μπορούσαν να εκτιμήσουν το μέγεθος και την εξέλιξη της νόσου, προσφέροντας υψηλής αξίας γνώση και ανάπτυξη εφαρμοσμένης ιατρικής τεχνολογίας.

Η παρούσα μελέτη της πολυφασματικής απεικόνισης φυσιολογικού και παθολογικού νευρικού ιστού πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της συνεργασίας του *Εργαστηρίου Φαρμακολογίας* της Ιατρικής Σχολής με το *Εργαστήριο Βιοϊατρικής Απεικόνισης* του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας-Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ. Συγκεκριμένα, έγινε μελέτη της μυελίνωσης των νευραξόνων του νωτιαίου μυελού φυσιολογικών ινών και ινών που έχει αναπτυχθεί η EAE –νόσος που αποτελεί το αντίστοιχο ζωϊκό μοντέλο της σκλήρυνσης κατά πλάκας- κι οδηγεί σε σταδιακή απομυελίνωση των κινητικών νευρώνων κι ακόλουθη παράλυση του ζώου. Αρχικά, εκτιμάται το μέγεθος και η εξέλιξη της νόσου με την ανοσοϊστοχημική παρατήρηση ιστών φυσιολογικών και νοσούντων ζώων και ταυτόχρονα αναπτύσσεται συγκριτική παρατήρηση με πολυφασματοσκοπικές μεθόδους, ώστε να χαρακτηρισθούν με φασματοσκοπικά κριτήρια οι αλλοιώσεις και τα ιδιαίτερα

χαρακτηριστικά του ιστού. Η αντιστοίχιση των δομικών αλλοιώσεων σε περιοχές του νευρικού ιστού με τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της απεικόνισης επιτρέπει την αποφυγή ανοσοϊστοχημικών μεθόδων που απαιτούν απομόνωση του ιστού κι επεξεργασία του, οδηγώντας σε πολύ πιο σύντομες κι ήπιες μεθόδους παρατήρησης (*Dortch RD. et. al. 2010, Eijsden P. et. al. 2011, Wang C. et. al. 2011*).

5.1 Φυσικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης φωτός – ύλης

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποτελεί βασικό εφόδιο στη μελέτη της δομής και της δυναμικής της ύλης. Η απορρόφηση από την ύλη του υπεριώδους, του ορατού, του υπέρυθρου φωτός καθώς και των μικροκυμάτων, πληροφορεί για τα ηλεκτρομαγνητικά, ταλαντωτικά και περιστροφικά ενεργειακά επίπεδα των μορίων και σε αρκετές περιπτώσεις ωθεί τους φυσικούς και χημικούς στην κατανόηση και ερμηνεία της δομής πολύπλοκων μορίων.



Εικόνα 5.1.1: Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα διαιρείται σε αρκετές φασματικές περιοχές.

Από την παραπάνω σχηματική παράσταση (εικόνα 5.1.1) γίνεται κατανοητό ότι το ορατό μέρος του φάσματος, στο οποίο είναι ευαίσθητο το ανθρώπινο μάτι, είναι ελάχιστο σε σχέση με τις υπόλοιπες φασματικές περιοχές. Η ορατή περιοχή του φάσματος διακρίνεται σε περιοχές κάθε μία από τις οποίες, αν απομονωθεί, προκαλεί ένα διαφορετικού χρώματος ερεθισμό στο ανθρώπινο μάτι (εικόνα 5.1.2).



Εικόνα 5.1.2: Ορατό μέρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Η ταχύτητα του φωτός (δηλαδή όλης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας), στο κενό ή στον αέρα είναι η ίδια περίπου $3 \cdot 10^8$ m/s, και συμβολίζεται με c . Η ταχύτητα του φωτός ποικίλει ανάλογα με το υλικό στο οποίο διαδίδεται και εξαρτάται από το δείκτη διάθλασης του υλικού, n . Δείκτης διάθλασης ενός υλικού είναι ο παράγοντας ο οποίος συσχετίζει την ταχύτητα του φωτός στο υλικό με την ταχύτητα διάδοσής του στο κενό. Έτσι αν v είναι η ταχύτητά του φωτός στο υλικό τότε αυτή συνδέεται με το δείκτη διάθλασης, n , μέσω της σχέσης:

$$n = \frac{c}{v} \Rightarrow v = \frac{c}{n}$$

Αυτός ο αριθμός είναι χαρακτηριστικά μεγαλύτερος από ένα: όσο υψηλότερος είναι ο δείκτης του υλικού, τόσο περισσότερο επιβραδύνεται το φως. Ο διαθλαστικός δείκτης ορισμένων μέσων μπορεί να είναι διαφορετικός ανάλογα με την πόλωση και την κατεύθυνση της διάδοσης του φωτός στο μέσο. Αυτό είναι γνωστό ως ανισοτροπία. Το ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο φωτός υψηλής έντασης (όπως π.χ. το φως ενός Laser), μπορεί να αναγκάσει το διαθλαστικό δείκτη ενός μέσου να αλλάξει, καθώς το φως διέρχεται μέσα από αυτό (μη γραμμική οπτική).

Οι βασικές διαδικασίες αλληλεπίδρασης φωτός – ατομικών ή μοριακών συστημάτων είναι οι ακόλουθες:

- Συντονισμένη Αλληλεπίδραση (Απορρόφηση, Εκπομπή – Φθορισμός, Διαπερατότητα)
- Ελαστική σκέδαση (Ανάκλαση)
- Ιονισμός ή φωτοηλεκτρικό φαινόμενο

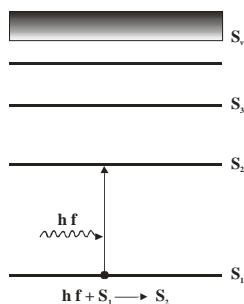
5.1.1 Συντονισμένη Αλληλεπίδραση

5.1.1.1 Απορρόφηση, Εκπομπή – Φθορισμός

Απορρόφηση

Η διέλευση πολυχρωματικής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μέσα από ένα στρώμα κάποιου στερεού, υγρού ή αερίου συνδέεται με τη μεταφορά ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας στα άτομα ή τα μόρια που συγκροτούν το υπό εξέταση δείγμα. Στην περίπτωση αυτή, η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου που θα προκαλέσει τη διέγερση πρέπει να αντιστοιχεί ακριβώς στην ενεργειακή διαφορά μεταξύ δύο ενεργειακών σταθμών του ατόμου ή του μορίου. Το είδος της διέγερσης εξαρτάται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός. Οι ηλεκτρονικές διεγέρσεις επιτυγχάνονται με την απορρόφηση υπεριώδους ή ορατού φωτός, οι ταλαντωτικές με την απορρόφηση υπερύθρου και οι περιστροφικές με την απορρόφηση μικροκυμάτων (*Serway AR, 1990*).

Τα μεμονωμένα άτομα και τα ιόντα έχουν διακριτές ενεργειακές στάθμες. Η απορρόφηση φωτονίου ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος προκαλεί τη διέγερσή του από μία ενεργειακή στάθμη σε κάποια υψηλότερη (εικόνα 5.1.3).



Εικόνα 5.1.3: Σχηματική παράσταση της απορρόφησης

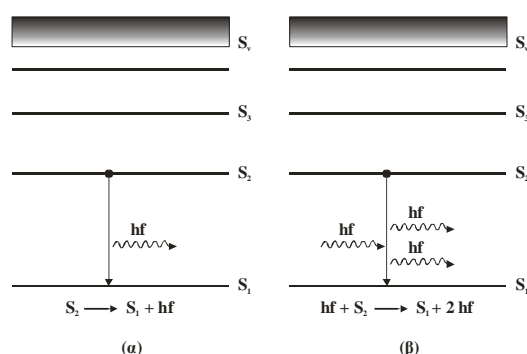
Η διαδικασία που περιγράφεται στην παραπάνω εικόνα αντιστοιχεί στην απλοϊκή περίπτωση που το ηλεκτρόνιο αρχικά βρίσκεται στη χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη (θεμελιώδης στιβάδα). Η ύπαρξη μεγάλου αριθμού ενεργειακών σταθμών στα πολυατομικά μόρια, πολυπλέκει τη διαδικασία της απορρόφησης σε σχέση με την απορρόφηση σε ατομικό επίπεδο. Εδώ, η ολική ενέργεια των μορίων υπολογίζεται από το άθροισμα της ηλεκτρονικής, ταλαντωτικής και περιστροφικής ενέργειας:

$$E = E_{\text{ηλεκτρονική}} + E_{\text{ταλαντωτική}} + E_{\text{περιστροφική}}$$

Η αντιστοίχιση ενός μεγάλου αριθμού ταλαντωτικών και περιστροφικών επιπέδων σε κάθε ηλεκτρονική στιβάδα, έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση από το μόριο φωτονίων σε μια ευρεία ζώνη συχνοτήτων πράγμα που ερμηνεύει το μεγάλος εύρος των μοριακών φασμάτων στο υπεριώδες και ορατό μέρος του φάσματος. Οι ενεργειακές διαφορές μεταξύ των ταλαντωτικών επιπέδων, σε

μια συγκεκριμένη ηλεκτρονιακή στιβάδα, είναι της τάξης των 10^{-3} - 10^{-2} eV, ενώ των περιστροφικών που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο ταλαντωτικό επίπεδο διαφέρουν κατά ένα παράγοντα 10-100eV.

Ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης είναι της τάξης των 10^{-7} s, δηλαδή ο χρόνος που μεσολαβεί πριν να επανεκπεμφθεί από το άτομο ή το μόριο το προσπίπτον φωτόνιο. Η ενέργεια που απορροφήθηκε από το άτομο μπορεί να αποδοθεί είτε με τη μορφή θερμότητας είτε με τη μορφή της ακτινοβολίας. Η αποδιέγερση του ατόμου μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με αυθόρμητη είτε με εξαναγκασμένη εκπομπή. Η εκπομπή ενός φωτονίου εμφανίζεται ως αποτέλεσμα μιας μετάβασης σε μία υψηλά ενεργειακά στάθμη σε κάποια άλλη χαμηλότερη. Όταν ένα φωτόνιο απορροφάται συνήθως δεν εκπέμπεται στο ίδιο μήκος κύματος (εικόνα 5.1.4).



Εικόνα 5.1.4: Σχηματική παράσταση της (α) αυθόρμητης αποδιέγερσης και (β) εξαναγκασμένης αποδιέγερσης.

Στην πρώτη περίπτωση (αυθόρμητη αποδιέγερση), το ηλεκτρόνιο επιστρέφει αυθόρμητα (χωρίς εξωτερική παρέμβαση), στην αρχική του στιβάδα και η συχνότητα (άρα και η ενέργεια), της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι ακριβώς η ίδια με εκείνη της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που διέγειρε το άτομο (ή το μόριο). Με τον τρόπο αυτό εκπέμπεται μόνο ένα φωτόνιο. Στη δεύτερη περίπτωση (εξαναγκασμένη αποδιέγερση), το ηλεκτρόνιο αποδιεγείρεται μετά την πρόσπτωση σε αυτό και ενός δεύτερου φωτονίου, με χαρακτηριστικά όμοια με εκείνου του φωτονίου που το διέγειρε. Το αποτέλεσμα της αποδιέγερσης αυτής είναι η εκπομπή συνολικά δύο φωτονίων με ίδια συχνότητα και ενέργεια.

Εκπομπή-Φθορισμός

Φθορισμός αποκαλείται η εκπομπή φωτός από κάποιο μόριο (ορισμένων υλικών) σε φασματική περιοχή διαφορετική από εκείνη του φωτός διέγερσής του. Η εκπομπή του φωτός από το υλικό μπορεί να επεκτείνεται σε όλη την περιοχή του φάσματος από τα ραδιοκύματα μέχρι και τις ακτίνες γ . Κατά την αποδιέγερση η μετάβαση γίνεται μεταξύ ενεργειακών καταστάσεων με ίδιο σπίν και ολοκληρώνεται σε χρόνο περίπου 10^{-5} s (ή και λιγότερο), από τη στιγμή της διέγερσης.

$$\text{Διέγερση: } S_0 + h \cdot \nu \rightarrow S_1$$

$$\text{Φθορισμός (εκπομπή): } S_1 \rightarrow S_0 + h \cdot \nu$$

όπου $h\nu$ και ν είναι η ενέργεια και η συχνότητα αντίστοιχα, του προσπίπτοντος φωτονίου και h είναι η σταθερά του Planck. Η κατάσταση S_0 είναι η θελεμιώδης στάθμη του ατόμου που φθορίζει και S_1 είναι η πρώτη (ηλεκτρονικά) διεγερμένη. Ένα μόριο που βρίσκεται στην κατάσταση S_1 μπορεί να αποδιεγερθεί με διάφορους τρόπους: αποδιέγερση με εκπομπή θερμότητας, μετάβαση σε ενεργειακά triplet κατάσταση (με διαφορετικό spin δηλαδή) με εκπομπή φωσφορισμού, μετάβαση σε ενεργειακά singlet κατάσταση (με ίδιο spin δηλαδή) με εκπομπή φθορισμού κ.λ.π.

Ο λόγος του αριθμού των μορίων που εκπέμπουν φθορισμό προς τον ολικό αριθμό των μορίων που διεγέρθηκαν είναι γνωστός ως κβαντική ικανότητα του υλικού (κυμαίνεται μεταξύ 0 και 1) και εκφράζεται ως:

$$\Phi = \frac{\# \text{αριθμός φωτονίων που εκπέμπονται}}{\# \text{αριθμός φωτονίων που απορροφώνται}} \Rightarrow \Phi = \frac{K_F}{K_F + K_{ec} + K_{ic} + K_i + K_{pd} + K_d}$$

όπου οι σταθερές K_F , K_{ec} , K_{ic} , K_i , K_{pd} , K_d σχετίζονται με τα ενεργειακά χαρακτηριστικά των ενδομοριακών αποδιεγέρσεων και στην πραγματικότητα εκφράζουν τη δυνατότητα φθορισμού των μορίων. Τα περισσότερα μόρια έχουν κβαντική ικανότητα ίση με 0.

Ο χρόνος ζωής του φθορισμού αναφέρεται στο χρονικό διάστημα που το μόριο του υλικού παραμένει στη διεγερμένη κατάσταση πριν εκπνευθεί το φωτόνιο. Ο φθορισμό ακολουθεί τα χαρακτηριστικά τις κινητικής αποδιέγερσης του απλού εκθετικού:

$$[S_1]_t = [S_1]_0 \cdot e^{-kt}$$

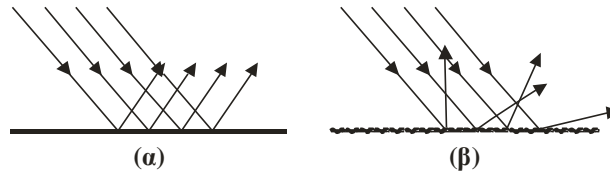
όπου $[S_1]_t$ είναι ο πληθυσμός των διεγερμένων μορίων τη χρονική στιγμή t και $[S_1]_0$ είναι ο πληθυσμός των μορίων της θεμελιώδους κατάστασης τη χρονική στιγμή $t=0$. και k είναι η σταθερά της απλής εκθετικής πτώσης. Ο χρόνος ζωής του φθορισμού ορίζεται ως: $\tau = \frac{1}{k}$. Ο χρόνος ζωής σχετίζεται με τη δυνατότητα αποδιέγερσης του μορίου και κυμαίνεται από ns μέχρι και ps.

Το φάσμα του φθορισμού είναι χαρακτηριστικό για το κάθε υλικό και παρέχει πληροφορίες για τη σύστασή του (Heintzelman DL. et al, 2000, Bijio IJ. et al, 1997).

5.1.1.2 Ανάκλαση και Σκέδαση – Είδη σκέδασης

Όταν μία φωτεινή ακτίνα που διαδίδεται σε ένα μέσο, συναντήσει τη διαχωριστική επιφάνεια ανάμεσα στο αρχικό μέσο διάδοσης και ένα άλλο, τότε ένα μέρος της αρχικής ακτίνας ανακλάται (επιστρέφει), πίσω στο αρχικό μέσο διάδοσης. Στην παρακάτω εικόνα (5.1.5) εικονίζεται η ανάκλαση των ακτίνων του φωτός που προσπίπτουν πάνω σε λεία και στιλπνή επιφάνεια η οποία μοιάζει με κάτοπτρο. Κατά την πρόσπτωση σε λεία επιφάνεια (εικόνα 5.1.5α), οι ανακλώμενες ακτίνες εξακολουθούν να είναι παράλληλες μεταξύ τους. Για το λόγο αυτό η παρατηρούμενη ανάκλαση ονομάζεται κατοπτρική ή κανονική ανάκλαση (specular reflectance). Αν όμως η επιφάνεια πάνω στην οποία προσπίπτουν οι ακτίνες είναι τραχιά και ανώμαλη (π.χ. σωματίδια σε μορφή σκόνης), τότε οι ακτίνες ανακλώνονται προς διαφορετικές κατευθύνσεις και διασκορπίζονται στο γύρω χώρο (εικόνα 5.1.5β). Η ανάκλαση αυτή κατά την οποία οι ακτίνες κατευθύνονται ακανόνιστα προς όλες τις κατευθύνσεις, ονομάζεται διάχυση (diffuse reflectance) (Serway RA,

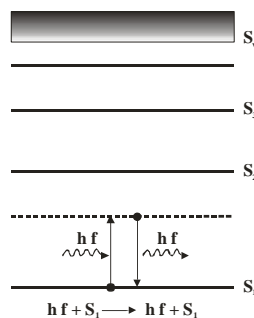
1990). Μια επιφάνεια θα παίζει το ρόλο του κατόπτρου μόνο αν οι ατέλειές της είναι μικρές σε σύγκριση με το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός.



Εικόνα 5.2.5: Σχηματική παράσταση, (α) κατοπτρικής ανάκλασης και (β) διάχυτης ανάκλασης (διάχυσης).

Οι περισσότερες ανακλάσεις που συμβαίνουν στα υλικά είναι συνδυασμός των δύο επιμέρους ανακλάσεων: της κατοπτρικής ανάκλασης και της διάχυσης.

Όταν το φως διαπερνά ένα σύστημα σωματιών, όπως π.χ. ενός αερίου, τα ηλεκτρόνια των ατόμων του αερίου απορροφούν το φως και μετά επανεκπέμπουν ένα μέρος του. Η απορρόφηση και επανεκπομπή αυτή του φωτός σε διαφορετικές κατευθύνσεις από την προσπίπτουσα, ονομάζεται σκέδαση. Η ελαστική σκέδαση του φωτός αναφέρεται στην περίπτωση που η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου δεν ταιριάζει απόλυτα με την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα σε δύο στάθμες του ατόμου/ή μορίου, του υπό εξέταση υλικού. Η βασική ιδέα της σκέδασης παριστάνεται με την εικόνα 5.1.6. Η απορρόφηση του προσπίπτοντος φωτονίου από το μη διεγερμένο άτομο, επιφέρει τη διέγερσή του σε μια “πλασματική” στάθμη (virtual state), με ενέργεια $E_1 + hf$ και η οποία έχει χρόνο ζωής της τάξης των 10^{-14} s. Αυτό το χρονικό διάστημα είναι αρκετά μικρό συγκρινόμενο με το χρόνο ζωής μιας πραγματικής στάθμης (περίπου 10^{-7} s). Στη διάρκεια των 10^{-14} s το φωτόνιο επανεκπέμπεται σε τυχαία διεύθυνση με την ίδια ενέργεια που είχε αρχικά, πριν την απορρόφηση του από το άτομο. Η ελαστική σκέδαση προκύπτει από ανομοιογένειες στο δείκτη διάθλασης ενός μέσου και διακρίνεται κυρίως σε τρεις τύπους σκέδασης: σκέδαση Rayleigh, σκέδαση Mie και σκέδαση Raman.

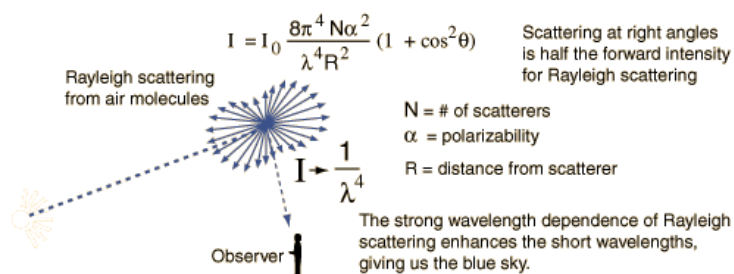


Εικόνα 5.1.6: Σχηματική παράσταση της ελαστικής σκέδασης

Έχει αποδειχθεί θεωρητικά ότι το είδος της σκέδασης σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος του σωματιδίου που σκεδάζει το φως. Μέγιστη σκέδαση επιτυγχάνεται όταν το σκεδάζον σωματίδιο έχει διαστάσεις της τάξης του μήκους κύματος του προσπίπτοντος φωτονίου.

Σκέδαση Rayleigh

Η διασπορά Rayleigh προκαλείται από σωματίδια με διαστάσεις πολύ μικρότερες από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, με μέγεθος μέχρι το ένα δέκατο του μήκους κύματος του φωτός. Η σχηματική αναπαράσταση της σκέδασης Rayleigh εικονίζεται στην εικόνα 5.1.7.



Εικόνα 5.1.7: Σχηματική αναπαράσταση της σκέδασης Rayleigh (Clark RN, 1995)

Η σκέδαση Rayleigh μπορεί να θεωρηθεί ως ελαστική, δεδομένου ότι τις ενέργειες των σκεδαζόμενων φωτονίων δεν αλλάζουν. Η διασπορά στην οποία τα σκεδασμένα φωτόνια έχουν είτε υψηλότερη είτε μικρότερη ενέργεια από τα προσπίπτοντα φωτόνια ονομάζεται σκέδαση Raman.

Η ένταση του φωτός που σκεδαάζεται από διπόλα πολύ μικρότερα από το μήκος κύματος του είναι αρκετά μικρή και μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα με την τέταρτη δύναμη του μήκους κύματος (λ) (Young AT, 1981). Πιο συγκεκριμένα, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από ένα σύνολο N σωματιδίων ανά cm^3 υπολογίζεται από τη σχέση:

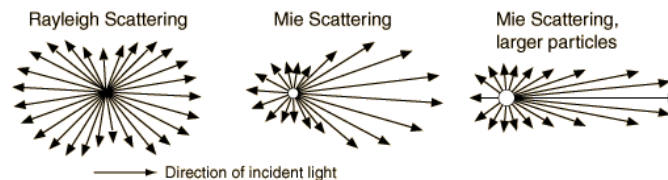
$$I_s = I_o \cdot \frac{8\pi^4}{R^2} \cdot \frac{N \cdot a^2}{\lambda^4} \cdot (1 + \cos^2 \theta)$$

όπου I_s και I_o είναι η ένταση της σκεδαζόμενης και της προσπίπτουσας ακτινοβολίας αντίστοιχα, λ είναι το μήκος κύματος του φωτός, N είναι ο ολικός αριθμός των σκεδαστών ανά cm^3 , a είναι η πολωσιμότητα του φωτός, R είναι η απόσταση από τη θέση των σκεδαστών και θ η γωνία της σκέδασης.

Από την παραπάνω σχέση είναι φανερή η αντίστροφη εξάρτηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός από την τέταρτη δύναμη του μήκους κύματος ($I_s \sim 1/\lambda^4$). Έτσι για παράδειγμα η υπεριώδης ακτινοβολία υφίσταται μεγάλη σκέδαση Rayleigh λόγω του μικρού μήκους κύματός της.

Σκέδαση Mie

Η σκέδαση *Mie* παρατηρείται στην περίπτωση όπου οι διαστάσεις των σωματιδίων του υλικού είναι αρκετά μεγαλύτερες από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός και υπάρχει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στο δείκτη διάθλασης των σωματιδίων αυτών και του περιβάλλοντα χώρου τους. Στην περίπτωση αυτή, η σκέδαση είναι αρκετά μεγαλύτερη από τη σκέδαση *Rayleigh* και η σκέδαση είναι κυρίως μετωπική. Η σκέδαση *Mie* δεν εξαρτάται σημαντικά από το μήκος κύματος.

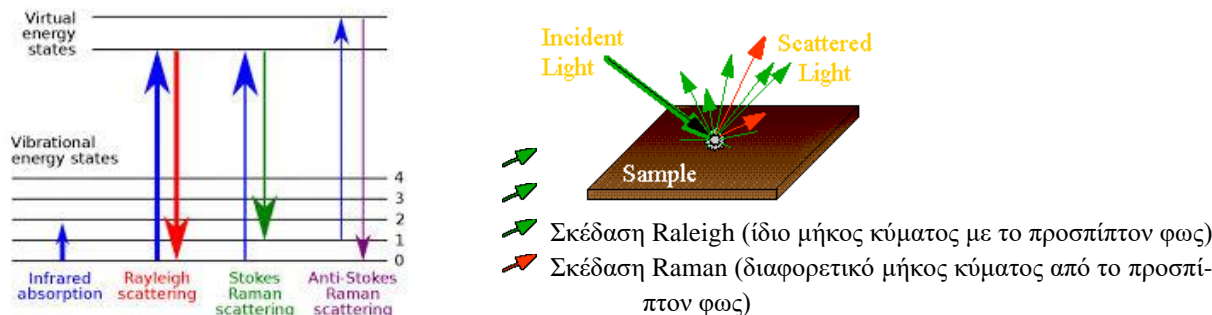


Εικόνα 5.1.8: Σχηματική αναπαράσταση της σκέδασης *Rayleigh* και *Mie* (Clark RN, 1995)

Σκέδαση Raman

Η σκέδαση Raman είναι ένα από τα φαινόμενα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με την ύλη. Όταν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία προσπέσει πάνω σε ύλη, μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που την αποτελούν με αποτέλεσμα την απορρόφηση ή τη σκέδαση φωτός από αυτά. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της σκέδασης Raman είναι η αλλαγή στην συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός (ανελαστική σκέδαση), δηλαδή στο μεγαλύτερο μέρος της η σκεδαζόμενη ακτινοβολία είναι διαφορετική από την προσπίπτουσα όσο αφορά την ενέργεια του προσπίπτοντος και του εκπεμπόμενου φωτονίου. Το ανελαστικά σκεδαζόμενο φως ονομάζεται σκέδαση Raman και προκύπτει από την αλλαγή των κινήσεων σε μοριακό επίπεδο. Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία διαδίδεται προς όλες τις κατευθύνσεις με ένταση σημαντικά χαμηλότερη από την προσπίπτουσα. Η φασματοσκοπία Raman ασχολείται με το φαινόμενο της μεταβολής της συχνότητας του προσπίπτοντος σε ένα μόριο φωτός κατά την ανελαστική σκέδαση αυτού.

Γενικότερα η σκέδαση είναι ένα ιδιαίτερα ασθενές φαινόμενο. Τα περισσότερα φωτόνια σκεδάζονται ελαστικά (*Rayleigh* σκέδαση). Περίπου το 10^{-7} των προσπιπτόντων φωτονίων στο υλικό υπόκεινται στη σκέδαση Raman. Το φαινόμενο Raman εμφανίζεται όταν φως πέφτει επάνω στο μόριο και αλληλεπιδρά με το ηλεκτρικό δίπολο εκείνου του μορίου. Το προσπίπτον φωτόνιο διεγείρει κάποιο από τα ηλεκτρόνια του μορίου σε μια «πλασματική» ενεργειακή κατάσταση (virtual state). Αυτό συμβαίνει γιατί η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου δεν επαρκεί για να το διεγείρει σε μια πραγματική στάθμη. Κατόπιν, σχεδόν αμέσως (σε διάρκεια περίπου 10^{-14} s) ένα άλλο φωτόνιο απελευθερώνεται και το μόριο αποδιεγείρεται σε μια χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας μπορεί να αποθηκευθεί ενέργεια στο μόριο, το οποίο μένει σε ένα υψηλότερο ταλαντωτικό επίπεδο. Μπορεί όμως να γίνει και το αντίθετο δηλαδή το μόριο να χάσει μέρος της ενέργειά του.

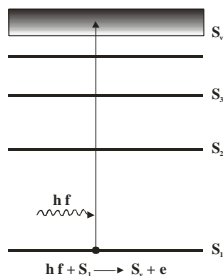


Εικόνα 5.1.9: Σχηματική αναπαράσταση της σκέδασης Raman

Γενικά, η ενέργεια των σκεδαζόμενων φωτονίων είναι είτε μικρότερη είτε μεγαλύτερη από εκείνη των προσπίπτοντων φωτονίων σε αντίθεση με τη σκέδαση Rayleigh, με αποτέλεσμα το φάσμα εκπομπής να είναι μετατοπισμένο σε σχέση με το φάσμα διέγερσης λόγω των μοριακών ταλαντώσεων. Η διαφορά των συχνοτήτων σκεδαζόμενου και προσπίπτοντος φωτός ονομάζεται συχνότητα Raman. Πράγματι, κάποιες από τις συγκρούσεις έχουν ως συνέπεια την κβαντισμένη μετάβαση του μορίου σε ένα υψηλότερο ενεργειακά επίπεδο από το αρχικό με ταυτόχρονη απώλεια ενέργειας του προσπίπτοντος φωτονίου και σκέδασή του με χαμηλότερη συχνότητα από την αρχική (περιοχή γραμμών Stokes). Αν το μόριο βρίσκεται ήδη σε μια ενεργειακή κατάσταση διαφορετική της θεμελιώδους, η αλληλεπίδρασή του με ένα φωτόνιο μπορεί επίσης να προκαλέσει την κβαντισμένη ενεργειακή του μετάβαση σε χαμηλότερο επίπεδο αυτή τη φορά ενώ αντίθετα το προσπίπτον φωτόνιο, έχοντας κερδίσει ενέργεια, σκεδάζεται με υψηλότερη συχνότητα (περιοχή γραμμών antiStokes). Στην εικόνα 5.1.9 φαίνεται μια σχηματική αναπαράσταση της σκέδασης Raman για την καλύτερη κατανόηση του φαινομένου.

5.1.1.3 Ιονισμός ή φωτοηλεκτρικό φαινόμενο

Ως φωτοηλεκτρικό φαινόμενο αναφέρεται η εκπομπή ηλεκτρονίων από κάποια μεταλλική επιφάνεια μετά την απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας. Μια σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου αυτού φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 5.1.10: Σχηματική παράσταση του φωτοηλεκτρικού φαινομένου – ιονισμού

Οι παράμετροι που καθορίζουν την εμφάνιση του φαινομένου είναι η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Το μετρούμενο μέγεθος είναι η ένταση I του ρεύματος των

φωτοηλεκτρονίων. Το ηλεκτρόνιο που εκπέμπεται από το μέταλλο κατά το φαινόμενο του ιονισμού έχει ενέργεια E που υπολογίζεται από τη σχέση:

$$E = h \cdot f - W$$

όπου E είναι η κινητική ενέργεια του εκπεμπόμενου ηλεκτρονίου από το μέταλλο, $h \cdot f$ είναι η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου που προκάλεσε τον ιονισμό και W είναι το έργο εξαγωγής του μετάλλου, παράμετρος που σχετίζεται με το είδος της μεταλλικής επιφάνειας.

Από την παραπάνω σχέση είναι φανερό ότι η ενέργεια των εκπεμπόμενων φωτονίων είναι ανάλογη της συχνότητας του προσπίπτοντος φωτός, είναι ανεξάρτητη από την ένταση του ενώ η αύξηση της προσπίπτουσας έντασης πολύ σπάνια προκαλεί αύξηση στον αριθμό των ηλεκτρονίων που εκπέμπονται με ενέργεια E .

5.1.2 Οπτικές ιδιότητες των ιστών

Ο ανθρώπινος ιστός αποτελεί πολύπλοκο τύπο ύλης και οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασής του με το φως αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Οι κύριες διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στην αλληλεπίδραση αυτή είναι η απορρόφηση και η σκέδαση [Fodor L. et al, 2011 και Cheong WF. et al, 1990]. Έχουν αναπτυχθεί ποικίλα μοντέλα για τη μελέτη της διάδοσης του φωτός στον ιστό των οποίων η αξιοπιστία εξαρτάται από τη σωστή κατανόηση των οπτικών ιδιοτήτων του ιστού. Οι οπτικές παράμετροι λαμβάνονται με τη μετατροπή των ανιχνευόμενων οπτικών σημάτων (π.χ. ανάκλασης), σε παραμέτρους (Cheong WF. et al, 1990) οι οποίες χαρακτηρίζουν τη διάδοση του φωτός στον ιστό. Η διαδικασία αυτή είναι αρκετά περίπλοκη αν σκεφτεί κανείς ότι υπάρχει μια ποικιλία τεχνικών, πειραματικών διατάξεων, διαδικασιών βαθμονόμησης των χρησιμοποιούμενων συστημάτων. Επίσης η εφαρμογή διαφορετικών μοντέλων διάδοσης του φωτός και η ετερογένεια του ιστού συνεισφέρουν δυσμενώς στην προσπάθεια αντικειμενικής συσχέτισης των χαρακτηριστικών του ιστού με τα λαμβανόμενα οπτικά σήματά του.

Το 93%-96% του προσπίπτοντος φωτός στον ιστό που δεν ανακλάται, εισέρχεται στο εσωτερικό του και απορροφάται ή σκεδάζεται (Cheong WF. et al, 1990). Αυτές οι δύο διαδικασίες που συμβαίνουν ταυτόχρονα καθορίζουν τη διάδοση της ακτινοβολίας στον ιστό.

Ο βιολογικός ιστός θεωρείται μη διαυγές ανομοιογενές οπτικό μέσο με πυκνούς πληθυσμούς κέντρων σκέδασης. Γενικά τα βιολογικά δείγματα περιέχουν πολλές δομές με μέγεθος της τάξης του μήκους κύματος, και ως εκ τούτου πρέπει να ληφθούν υπόψη οι πολλαπλές επιδράσεις σκέδασης κατά την εξέταση των οπτικών χαρακτηριστικών τους και όχι μοντέλα διακριτών κέντρων σκέδασης και απορρόφησης (π.χ. θεωρίες "απλής σκέδασης", όπως Rayleigh ή Mie).

Οι βασικές οπτικές παράμετροι για τη μελέτη της διάδοσης φωτεινής ακτινοβολίας σε μαλακό ιστό είναι: ο συντελεστής απορρόφησης μ_a , ο συντελεστής σκέδασης μ_s και ο βαθμός ανισοτροπίας g .

Ο συντελεστής απορρόφησης μ_a έχει διαστάσεις αντιστρόφου μήκους και η αντίστροφη ποσότητα $1/\mu_a$ εκφράζει τη μέση ελεύθερη διαδρομή μέχρι να συμβεί απορρόφηση. Ο συντελεστής σκέδασης μ_s έχει επίσης διαστάσεις αντιστρόφου μήκους ενώ το $1/\mu_s$ δηλώνει τη μέση ελεύθερη διαδρομή που διανύει το φωτόνιο μέχρι να σκεδαστεί. Το άθροισμα των δύο αυτών συντελεστών

δίνει τον ολικό συντελεστή εξασθένισης, μ_t . Ο λόγος του συντελεστή σκέδασης προς τον ολικό συντελεστή εξασθένισης προσδιορίζει μια αδιάστατη ποσότητα g . Οι τιμές που μπορεί να πάρει κυμαίνονται μεταξύ 0 και 1, η τιμή 0 υποδηλώνει έλλειψη σκέδασης ενώ η τιμή 1 έλλειψη απορρόφησης.

Για την περιγραφή των γεγονότων σκέδασης χρησιμοποιείται ο βαθμός ανισοτροπίας g :

$$g = \int_{4\pi} p(s, s')(s, s') d\omega = 1$$

Ο βαθμός ανισοτροπίας g υποδηλώνει την ασυμμετρία στην περίπτωση σκέδασης και μερικές χαρακτηριστικές τιμές που μπορεί να λάβει είναι: 1 για εμπρόσθια σκέδαση κατά την αρχική διεύθυνση, 0 για ισότροπη σκέδαση και -1 για οπισθοσκέδαση. Από το συνδυασμό του συντελεστή σκέδασης και του βαθμού ανισοτροπίας g προκύπτει μια άλλη οπτική παράμετρος για την περιγραφή της σκέδασης, ο ενεργός συντελεστής σκέδασης $\mu_s' = \mu_s(1-g)$. Έχει διαστάσεις αντιστρόφου μήκους και η αντίστροφη ποσότητα $1/\mu_s'$ εκφράζει τη μέση ελεύθερη διαδρομή έως η τροχιά του φωτονίου γίνει τυχαία.

5.1.2.1 Διάδοση του φωτός στους ιστούς

Στους ιστούς, το φως σκεδάζεται και απορροφάται και η μαθηματική περιγραφή των χαρακτηριστικών διάδοσης είναι δυνατόν να γίνει με δυο διαφορετικούς τρόπους, την αναλυτική θεωρία και τη θεωρία μεταφοράς.

Η αναλυτική θεωρία, στηρίζεται σε βασικές εξισώσεις όπως είναι οι εξισώσεις Maxwell ή η κυματική εξίσωση, εισάγει τις ιδιότητες σκέδασης και απορρόφησης και καταλήγει σε διαφορικές ή ολοκληρωτικές εξισώσεις για στατιστικές ποσότητες όπως είναι οι διακυμάνσεις και οι συναρτήσεις συσχέτισης. Έχει αυστηρή μαθηματική δόμηση, είναι όμως πρακτικά αδύνατη η εξαγωγή μιας σχέσης που να έχει συμπεριλάβει πλήρως όλα τα φαινόμενα.

Η θεωρία μεταφοράς (Transport Theory) δεν ξεκινά με τις εξισώσεις Maxwell. Περιγράφει άμεσα τη μεταφορά ισχύος δια μέσου των ιστών. Η ανάπτυξη της θεωρίας είναι ευρεστική (Heuristic) και στερείται της αυστηρότητας της αναλυτικής θεωρίας (Arnfield MR. et al, 1988 και Ishimaru A, 1978, 1989). Η θεωρία μεταφοράς έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς και εφαρμόζεται σε μεγάλο αριθμό πρακτικών προβλημάτων.

Στις ενότητες που ακολουθούν, παρουσιάζονται πρώτα η θεωρία μεταφοράς και μετά η προσέγγιση της διάχυσης.

5.1.2.1.1 Θεωρία Μεταφοράς

Σε όλες σχεδόν τις περιγραφές της θεωρίας μεταφοράς ακτινοβολίας της διάδοσης του φωτός στον ιστό υπάρχουν ουσιαστικά δύο βασικές παράμετροι. Αυτά είναι οι συντελεστές σκέδασης και απορρόφησης, και είναι σημαντικό να δοθεί μια γενική περιγραφή του τι αντιπροσωπεύουν.

Ο συντελεστής σκέδασης είναι αυστηρά δύο συντελεστές που συνδέονται με την μέση ελεύθερη διαδρομή ενός φωτονίου (δηλαδή η απόσταση μεταξύ των κέντρων σκέδασης) και την

κατεύθυνση της σκέδασης. Συνεπώς, αυτή είναι η παράμετρος που επηρεάζει τον ρυθμό και την κατεύθυνση της διάδοσης φωτονίων.

Ο συντελεστής απορρόφησης, όπως θα ήταν αναμενόμενο, συνδέεται με την πιθανότητα ενός φωτονίου που απορροφάται ή το ποσό της ενέργειας που κατατίθεται σε κάθε σύγκρουση. Η εξάρτηση από το μήκος κύματος αυτής της παραμέτρου σχετίζεται με τα φασματικά χαρακτηριστικά του δείγματος και ως εκ τούτου με τα φάσματα απορρόφησης των συστατικών.

Στη θεωρία μεταφοράς, η κύρια παράμετρος που υπολογίζεται, είναι η ακτινοβολία εκφρασμένη σε $W \cdot cm^{-2} \cdot sr^{-1}$ και αντιστοιχεί στην πυκνότητα ροής ακτινοβολίας σε μια συγκεκριμένη κατεύθυνση s κάποιας στερεάς γωνίας (*Arnfield MR. et al, 1988*). Η χρονικά εξαρτημένη διαφορική εξίσωση για την ακτινοβολία καλείται εξίσωση μεταφοράς και δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{n}{c} \cdot \nabla J(r, s) = -(\mu_a + \mu_s) \cdot J(r, s) + \mu_s \cdot \int_{4\pi} p(s, s') L(r, s') d\omega$$

όπου n είναι ο δείκτης διάθλασης του υλικού, c είναι η ταχύτητα του φωτός, $p(s, s')$ είναι η συνάρτηση φάσης του φωτονίου που σκεδάζεται από την κατεύθυνση s στην s' , $d\omega$ είναι η στοιχειώδης στερεά γωνία στην κατεύθυνση s' . Το πρώτο μέλος της παραπάνω εξίσωσης περιγράφει το ρυθμό αλλαγής ροής ακτινοβολίας σε ένα σημείο που καθορίζεται από το διάνυσμα r κατά την κατεύθυνση του μοναδιαίου διανύσματος s . Η αλλαγή αυτή ισούται με την απώλεια λόγω απορρόφησης και σκέδασης συν το κέρδος από τη σκέδαση από όλες τις άλλες διευθύνσεις s' στη διεύθυνση s . Αν η σκέδαση είναι συμμετρική, ως προς την κατεύθυνση του προσπίπτοντος φωτός, η συνάρτηση φάσης μπορεί να τεθεί ως: $p(s, s') = p(\theta)$ με θ τη γωνία στην οποία σκεδάζονται τα φωτόνια. Όμως, στην πράξη, αυτή η ποσότητα που μετράται είναι η ένταση της ακτινοβολίας (μετρημένη σε $W \cdot cm^{-2}$), η οποία προκύπτει από την ολοκλήρωση της ακτινοβολίας σε στερεά γωνία 4π :

$$I(r) = \int_{4\pi} J(r, s) \cdot d\omega$$

Έτσι η ακτινοβολία μπορεί να εκφραστεί με όρους της έντασης: $J(r, s) = I(r) \cdot \delta(\omega - \omega_s)$ όπου $\delta(\omega - \omega_s)$ είναι η συνάρτηση δ της στερεάς γωνίας στη δεδομένη κατεύθυνση s .

Όταν το φως είναι κάθετο στο υλικό, η ακτινοβολία μέσα σε αυτό μπορεί να επιμεριστεί σε μία σύμφωνη (coherent) συνιστώσα και μια συνιστώσα διάχυσης: $J = J_c + J_d$. Η σύμφωνη συνιστώσα της ακτινοβολίας, εξασθενεί λόγω απορρόφησης και σκέδασης του φωτός που διαδίδεται ευθύγραμμο και υπολογίζεται ως: $\frac{dJ_c}{ds} = -\mu_t \cdot J_c$ με λύση: $J_c = I_0 \cdot \delta(\omega - \omega_s) \cdot e^{-d}$ όπου I_0 είναι η προσπίπτουσα

ένταση και d είναι το οπτικό πάχος που ορίζεται ως: $d = \int_0^s \mu_t \cdot ds'$. Η οριακή συνθήκη στην επιφάνεια του υλικού είναι ότι η διάχυτη ακτινοβολία που εισέρχεται σε αυτό είναι μηδέν: $J_d(s) = 0$, όταν το διάνυσμα s έχει φορά προς τα μέσα.

Το κύριο πρόβλημα που καλείται να επιλύσει η θεωρία της μεταφοράς είναι ο υπολογισμός της διάχυτης ακτινοβολίας, αφού τα φωτόνια που σκεδάζονται δε ακολουθούν ένα συγκεκριμένο δρόμο. Δεν υπάρχει γενική αναλυτική λύση για την εξίσωση μεταφοράς. Έτσι, για την επίλυση του προβλήματος, πρέπει να επιλεχθούν ικανοποιητικές στατιστικές προσεγγίσεις, που εξαρτώνται από

την κυρίαρχη διαδικασία της εξασθένησης του φωτός στο υλικό (απορρόφηση ή σκέδαση), από το βαθμό ανισοτροπίας του g κ.α. Κάποιες από τις προσεγγίσεις αυτές είναι η Σκέδαση Πρώτης Τάξης για $J_c \gg J_d$ και η θεωρία Kubelka-Munk για $J_c \ll J_d$ ή η προσομοίωση Monte Carlo. Η Kubelka Munk Θεωρία (KMT) και η Θεωρία διάχυσης των φωτονίων (Photon Diffusion Theory, PDT) είναι και οι δύο παραδείγματα της θεωρίας " μεταφοράς ακτινοβολίας». Όμως, η πιο δημοφιλής και γενική προσέγγιση που εφαρμόζεται σε ισχυρά σκεδαστικά υλικά είναι η προσέγγιση της διάχυσης (diffusion approximation). Γενικότερα θα μπορούσαμε να διακρίνουμε τρεις περιοχές στους ιστούς: (α) περιοχή όπου κυριαρχεί η απορρόφηση, (β) περιοχή όπου κυριαρχεί η σκέδαση και (γ) περιοχή όπου και τα δύο φαινόμενα είναι συγκρίσιμα (*Arnfield MR. et al, 1988 και Ishimaru A, 1978, 1989*).

Για την εξαγωγή της εξίσωσης μεταφοράς έχουν γίνει κάποιες υποθέσεις. Έτσι, απαιτείται ανεξαρτησία των σκεδαστών μεταξύ τους. Η συνάρτηση φάσης μπορεί να περιγράψει συνολικά τη διαδικασία της σκέδασης για όλους τους σκεδαστές. Η κατανομή της ροής της ακτινοβολίας είναι χρονικά σταθερή (μια προσέγγιση αρκετά ικανοποιητική εφόσον η διάρκεια έκθεσης είναι μεγαλύτερη από λίγα nsec). Επίσης έχει γίνει η υπόθεση ότι δεν υπάρχουν στο μέσο άλλες πηγές ακτινοβολίας, σε αντίθετη περίπτωση θα πρέπει στο δεύτερο μέλος της εξίσωσης να υπάρχει και ένας "όρος πηγής". Τέλος τα φωτόνια θεωρούνται μονοενεργειακά, οι σκεδάσεις ελαστικές ενώ αγνοούνται φαινόμενα πόλωσης και φθορισμού.

Ωστόσο, η πιο γενική προσέγγιση που εφαρμόζεται όταν η σκέδαση κυριαρχεί της απορρόφησης είναι η Diffusion Approximation που περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο.

5.1.2.1.2 Προσέγγισης της διάχυση του φωτός

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όταν το φως εισέλθει σε κάποιο υλικό, η ακτινοβολία μπορεί να επιμεριστεί σε μια σύμφωνη συνιστώσα και μια συνιστώσα διάχυσης. Αν το μέσο διάδοσης είναι ιδιαίτερα σκεδαστικό, τότε η ακτινοβολία λόγω της διάχυσης είναι σχεδόν ισοτροπική και έχει μια ευρεία γωνιακή κατανομή. Έτσι, η ακτινοβολία που διαχέεται μπορεί να εκφραστεί ως μια υπέρθεση σφαιρικών αρμονικών. Οι δύο πρώτοι όροι της αποτελούν την προσέγγιση της διάχυσης:

$$J_d = \sum_{n=0}^{\infty} J_n = \frac{1}{4\pi} (I_d + 3 \cdot F_d \cdot s + \dots)$$

όπου I_d είναι η διαχεόμενη ένταση και F_d είναι το διάνυσμα ροής που εκφράζεται ως: $F_d(r) = \int_{4\pi} J_d(r, s) \cdot s \cdot d\omega$. Η διαχεόμενη ένταση, στη συνέχεια, ικανοποιεί την ακόλουθη εξίσωση διάχυσης

$$\frac{n}{c} \cdot \nabla I_d(r) - D \nabla^2 I_d(r) + \mu_a \cdot I_d(r) = S(r)$$

όπου $S(r)$ είναι η πηγή των φωτονίων και D ο συντελεστής διάχυσης που ορίζεται ως:

$$D = \frac{1}{3 \cdot [\mu_a + (1 - g) \cdot \mu_s]}$$

Η διάχυση του φωτός μέσα σε ένα μέσο μπορεί να περιγραφεί από ένα ενεργό συντελεστή εξασθένησης μ_{eff} που δίνεται από τη σχέση: $\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1-g))}$ και ως εκ τούτου η προσέγγιση της διάχυσης δίνει: $I = I_c + I_d = A \cdot e^{-\mu_a z} + B \cdot e^{-\mu_{eff} z}$ όπου $A+B=I_0$.

Όταν μια οπτική δέσμη εισέρχεται σε ένα μέσο, η πρώτη τάξης σκέδαση είναι δεσπόζουσα κοντά στην επιφάνεια ενώ στα βαθύτερα στρώματα του υλικού αυξάνεται η σκέδαση δεύτερης και ανώτερης τάξης. Η λύση της διάχυσης είναι μια προσέγγιση που αντιπροσωπεύει την οριακή περίπτωση όταν κυρίαρχη είναι η πολλαπλή σκέδαση. Είναι επομένως σαφές ότι κοντά στην επιφάνεια (ή για πολύ λεπτά υλικά) η λύση της διάχυσης μπορεί να μην ισχύει.

5.1.2.2 Φασματική περιοχή με υψηλή απορρόφηση

Η απορρόφηση του φωτός στο υπεριώδες οφείλεται στην παρουσία πρωτεϊνών και DNA, στο ορατό και στο εγγύς υπέρυθρο καθορίζεται από τη συγκέντρωση χρωμοφόρων όπως η αιμοσφαιρίνη, ενώ για μεγαλύτερα μήκη κύματος στο υπέρυθρο έντονη απορρόφηση παρουσιάζει το νερό.

Το μέγιστο απορρόφησης για τους αρωματικούς δακτυλίους των πρωτεϊνών εντοπίζεται στην περιοχή του υπεριώδους μεταξύ 260 και 280nm. Η απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης είναι ισχυρά εξαρτώμενη από το μήκος κύματος: αυξάνεται με έναν πολλαπλασιαστικό παράγοντα περίπου 5 από το ιώδες στο κίτρινο και ελαττώνεται κατά 10 και 100 φορές για μετάβαση από το κίτρινο στο κόκκινο ή στο εγγύς υπέρυθρο. Η απορρόφηση του νερού αυξάνεται σημαντικά για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 1.4μm.

Για την επιλογή της περιοχής όπου η απορρόφηση υπερτερεί έναντι της σκέδασης εφαρμόζεται το κριτήριο $\mu_a > 10\mu_s(1-g)$ (Ishimaru A, 1978, 1989). Έτσι για μήκη κύματος $\lambda < 250\text{nm}$ και $\lambda > 2000\text{nm}$ το φαινόμενο της απορρόφησης κυριαρχεί. Στην περίπτωση αυτή και για δέσμη φωτεινής ακτινοβολίας που προσπίπτει κάθετα στην επιφάνεια του ιστού, υπάρχει μικρή πλευρική διάχυση της ακτινοβολίας λόγω της μικρής συνεισφοράς της σκέδασης. Ο ρυθμός ενεργειακής ροής ελαττώνεται με το βάθος, z, ακολουθώντας σε αρκετά καλή προσέγγιση μια απλή εκθετική σχέση (Νόμος του Beer):

$$\psi(z) = \psi_0 \cdot e^{-\mu_a z}$$

Η ακτινοβολία διατηρεί την εμπρόσθια διεύθυνση κατά τη διάδοση της μέσα στον ιστό και με πολύ αργό ρυθμό γίνεται πιο ισότροπη λόγω σκέδασης. Επίσης και πιο σύνθετες γεωμετρίες ακτινοβολίας και μοντελοποίησης ιστού μπορούν εύκολα να μελετηθούν στην περίπτωση που κυριαρχεί το φαινόμενο της απορρόφησης.

5.1.2.3 Φασματική περιοχή με υψηλή σκέδαση

Η σκέδαση κυριαρχεί της απορρόφησης ($\mu_s(1-g) > 10\mu_a$) για μήκη κύματος στην περιοχή του μακρινού ορατού και κοντινού υπέρυθρου (600-1200 nm). Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται σαν "οπτικό παράθυρο" εύκολης διέλευσης της οπτικής ακτινοβολίας. Αυτό συμβαίνει γιατί στην περιοχή αυτή δεν υπάρχει έντονη απορρόφηση από τα βιολογικά μόρια των ιστών. Αν και ο ολικός

συντελεστής εξασθένισης είναι μεγάλος για την περιοχή αυτή, η μεγάλη τιμή της ανάκλασης σε συνδυασμό με την υψηλή τιμή του βαθμού ανισοτροπίας (εμπρόσθια σκέδαση) έχει ως αποτέλεσμα σημαντικό βάθος διείσδυσης στον ιστό.

Στην περίπτωση αυτή ο ρυθμός ενεργειακής ροής δεν παρουσιάζει μια απλή εκθετική εξάρτηση συναρτήσει του βάθους αλλά εμφανίζεται αύξηση της ενεργειακής ροής στην περιοχή κοντά στην επιφάνεια του ιστού, λόγω οπισθοσκέδασης.

Η πυκνότητα ροής ακτινοβολίας $L(r,s)$ που εμφανίζεται στην εξίσωση μεταφοράς μπορεί να γραφεί ως το άθροισμα δύο επιμέρους όρων

$$L(r,s) = L_c(r,s) + L_d(r,s)$$

Ο πρώτος όρος, L_c , αντιπροσωπεύει τα φωτόνια που δεν έχουν αλληλεπιδράσει με τον ιστό και ακολουθεί την εκθετική μείωση που περιγράφει ο νόμος του Beer. Ο δεύτερος όρος αναφέρεται στα φωτόνια που έχουν σκεδαστεί τουλάχιστον μια φορά και μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα άθροισμα άπειρων πολωνύμων Legendre. Στην προσέγγιση της θεωρίας διάχυσης διατηρούνται οι δύο πρώτοι όροι του αθροίσματος (ισότροπης σκέδασης και σκέδασης προς την εμπρόσθια διεύθυνση). Με βάση την προσέγγιση αυτή, προκύπτει από την εξίσωση μεταφοράς, η εξίσωση διάχυσης:

$$(\nabla^2 - \kappa^2)\psi(r) = -Q_o(r)$$

όπου $\psi(r) = \int_{4\pi} L_d(r,s)d\omega$ η ολική διάχυτη (σκεδαζόμενη) ενεργειακή ροή.

Ο όρος πηγής στο δεύτερο μέλος προκύπτει από τη σκέδαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και δίνεται από τη σχέση:

$$Q_c(r) = -3\mu_s \cdot [\mu_a + \mu_s \cdot (1-g) + \mu_t \cdot g] \cdot (1-r_s) \cdot F_o(r) \cdot e^{-\mu_t \cdot z}$$

όπου $F_o(r)$ περιγράφει το προφίλ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ενώ $\kappa = \sqrt{3\mu_a[\mu_a + \mu_s(1-g)]}$ είναι ο συντελεστής διάχυσης.

Η ακρίβεια της εξίσωσης διάχυσης εξαρτάται από το λόγο της σκέδασης προς την απορρόφηση, την ανισοτροπία στη σκέδαση (είναι βασική η υπόθεση ότι L_d είναι μόνο γραμμικά ανισότροπη) καθώς και από την απόσταση από πηγές φωτός και συνοριακές επιφάνειες.

Οι παραπάνω προϋποθέσεις καθώς και περιορισμοί που τίθενται ως προς την αντιμετώπιση σύνθετων γεωμετριών ιστού και ακτινοβόλησης ελαττώνουν το πεδίο εφαρμογής της θεωρίας διάχυσης.

5.1.2.4 Φασματική περιοχή που τα δύο φαινόμενα είναι συγκρίσιμα

Για μήκη κύματος που δεν εμπίπτουν στις περιοχές που αναφέρθηκαν παραπάνω τα φαινόμενα της απορρόφησης και της σκέδασης είναι ισότιμα. Σε αυτή την περίπτωση για την περιγραφή της διάδοσης του φωτός στον ιστό χρησιμοποιούνται είτε ευρεστικές μέθοδοι ή υπολογιστικές μοντελοποιήσεις όπως οι τεχνικές Monte Carlo (Ding C. et al, 2015 και Metropolis N. et al, 1949). Στο πρόβλημα της οπτικής μεταφοράς, η μέθοδος Monte Carlo καταγράφει τη

διαδρομή των φωτονίων καθώς αυτά σκεδάζονται ή απορροφούνται. Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν απαιτεί επιπλέον υποθέσεις ενώ μπορεί να αντιμετωπίσει και σύνθετες μοντελοποιήσεις τόσο ως προς τη γεωμετρία του ιστού όσο και στον υπολογισμό της ενεργειακής ροής κοντά σε συνοριακές επιφάνειες και πηγές [Slyk E. et al, 2015].

Όταν στον ιστό προσπίπτει ακτινοβολία, ένα μικρό ποσοστό, συνήθως 5%, της κάθετα προσπίπτουσας δέσμης ανακλάται από την επιφάνεια (Ανάκλαση Fresnel).

Αυτό οφείλεται στους διαφορετικούς δείκτες διάθλασης του αέρα ($n_0=1$) και του ιστού ($n_0>1$). Το υπόλοιπο της δέσμης διαδίδεται μέσα στον ιστό, σκεδάζεται πολλαπλά και ένα μέρος απορροφάται.

Η σκέδαση προκαλεί αλλαγή στην πορεία διάδοσης του φωτός και είναι η μοναδική φυσική διαδικασία που συντελεί στην επιστροφή του φωτός στην επιφάνεια του ιστού (οπισθοσκεδαζόμενο φως) και στη συμμετοχή του στην ανάκλαση. Η σκέδαση οφείλεται στην ετερογένεια του ιστού με αποτέλεσμα να υπάρχει διαφοροποίηση στο δείκτη διάθλασης των στρωμάτων του. Η ένταση και η διάχυση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα των ανωμαλιών του ιστού, σε σχέση με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, αλλά και από τη διαφορά στους δείκτες διάθλασης τους (Cheong WF. et al, 1990).

Η σκέδαση από μόρια ή μικρά σωματίδια με διαστάσεις μικρότερες από το $1/\lambda^4$, είναι γενικά ασθενής, σχεδόν ισοτροπική (ομοιόμορφα κατανομημένη στο χώρο) και μεταβάλλεται αντιστρόφως ανάλογα με την τέταρτη δύναμη του μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός (σκέδαση Rayleigh). Η σκέδαση από σωματίδια με διαστάσεις περίπου ίσες ή μεγαλύτερες από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (π.χ. κύτταρα του επιθηλίου), είναι ισχυρή και είναι γνωστή ως σκέδαση Mie. Κατά τη σκέδαση Mie το επενεκπεμπόμενο φως διαδίδεται στην κατεύθυνση του προσπίπτοντος. Στους ιστούς εμφανίζονται όλα τα είδη σκέδασης αλλά το είδος της σκέδασης που επικρατεί είναι του τύπου Mie (Arnfield M. R. et al, 1988).

5.1.3 Οπτικές φασματοσκοπικές διαγνωστικές μέθοδοι

Η ασφαλής διάγνωση αρκετών παθήσεων συνοδεύεται, τις περισσότερες φορές, από τη βιοψία των ιστών. Μπορεί να ληφθούν από 20 έως 30 βιοψίες σε μία συνεδρία. Αυτή είναι μία χρονοβόρα (και κατά συνέπεια δαπανηρή) διαδικασία, πράγμα που συνεπάγεται σε κάποιο βαθμό κίνδυνο για τον ασθενή. Οι οπτικές διαγνωστικές τεχνικές προσφέρουν τη δυνατότητα καλύτερης διαχείρισης της νόσου. Η τεχνική της "οπτικής βιοψίας" δεν απαιτεί την αφαίρεση τμήματος του ιστού. Ως εκ τούτου περιορίζεται σημαντικά ο κίνδυνος για την υγεία του ασθενή που σχετίζεται με την αφαίρεση του ιστού. Αυτοί οι κίνδυνοι περιλαμβάνουν την πιθανή μόλυνση ή ακόμα και τη διάτρηση κάποιου οργάνου. Επιπλέον, οι οπτικές διαγνωστικές τεχνικές είναι ταχύτερες από ό,τι η συμβατική μέθοδος της βιοψίας που ακολουθείται από την αναγκαία ιστολογική εξέταση και παρέχουν διάγνωση σε πραγματικό χρόνο και επομένως άμεση εφαρμογή της θεραπείας. Έχει ερευνηθεί μια σειρά φασματοσκοπιών για την οπτική διάγνωση οι οποίες βασίζονται σε μία κοινή αρχή. Η φάσμα ενός δείγματος ιστού περιέχει πληροφορίες σχετικά με τη βιοχημική σύνθεση ή / και η δομή του ιστού. Αυτή η βασική προσέγγιση είναι χρήσιμη για την ανίχνευση του καρκίνου, τον προσδιορισμό του βαθμού κορεσμού του οξυγόνου στο αίμα κ.λ.π. (Mourant JR. et al, 1996).

Είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση ακτινοβολίας-ύλης βασίζεται στη χημική σύνθεση και δομή της ύλης. Για παράδειγμα η αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με ανθρώπινους ιστούς εξαρτάται από την κυτταρική δομή του ιστού και στην περίπτωση παθολογικών καταστάσεων, όπως ιστικών αλλοιώσεων, η αλληλεπίδραση θα είναι διαφορετική από την περίπτωση του υγιούς ιστού. Σ' αυτήν την περίπτωση όταν ένας ιστός διεγείρεται οπτικά, η φασματική κατανομή του φωτός που επανεκπέμπεται περιέχει πληροφορία διαγνωστικής σημασίας. Το ανθρώπινο οπτικό σύστημα δεν μπορεί να διακρίνει αυτήν την πληροφορία εξαιτίας της περιορισμένης φασματικής του ανάλυσης (τριχρωματική όραση) και της δυναμικής περιοχής λειτουργίας του. Κλασικές μέθοδοι διάγνωσης για το χαρακτηρισμό του ιστού αποτελούν οι ιστοπαθολογικές εξετάσεις, οι οποίες διενεργούνται κατόπιν αφαίρεσης δειγμάτων ιστού (βιοψία). Προς αποφυγή των περιορισμών που συναντώνται στις κλασικές μεθόδους βιοψίας, έχουν αναπτυχθεί διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές όπως φθορισμός, σκέδαση Raman, φωσφορισμός, ελαστική σκέδαση κ.α. για το μη παρεμβατικό οπτικό χαρακτηρισμό και την ανάλυση ιστών (οπτική βιοψία). Τα αποτελέσματα τέτοιων αναλύσεων έχουν δείξει ότι ο οπτικός χαρακτηρισμός αποτελεί μια σημαντική διαγνωστική τεχνική.

Η φασματοσκοπία είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που έχει χρησιμοποιηθεί για αρκετές δεκαετίες στη μελέτη και το φασματικό χαρακτηρισμό χημικών συστατικών. Η φυσική αρχή της φασματοσκοπίας είναι η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη. Γενικά, η φασματοσκοπία είναι η μέτρηση της έντασης του φωτός που εκπέμπεται, ή σκεδάζεται από ένα δείγμα, ως συνάρτηση του μήκους κύματος του φωτός, σε υψηλή φασματική ανάλυση, αλλά χωρίς χωρική πληροφορία.

Το φως αποτελείται από ηλεκτρομαγνητικά κύματα που όταν αλληλεπιδρούν με την ύλη απορροφώνται, σκεδάζονται, ανακλώνται ή διαδίδονται μέσα σε αυτήν. Μελετώντας την αλληλεπίδραση του φωτός, με την ύλη, μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες σχετικά με τη δομή της ύλης και γενικότερα την ποιότητα και την ποσότητα αυτής. Η φασματοσκοπία είναι η μελέτη του φωτός ως συνάρτηση του μήκους κύματος που έχει εκπεμφθεί, ή έχει διασκορπιστεί από ένα στερεό, ένα υγρό, ή ένα αέριο. Για την ακριβέστερη ανάλυση της ύλης αναπτύχθηκαν κατάλληλα οπτικά συστήματα, οι φασματογράφοι, που μπορούν να κάνουν αυτόματα, γρήγορα και αξιόπιστα ανάλυση του φάσματος του φωτός αφού αυτό αλληλεπιδράσει με την ύλη. Οι φασματογράφοι αποτελούνται γενικά από μια φωτεινή πηγή (συνήθως κάποιο είδος λαμπτήρα πυρακτώσεως), διάφορα κάτοπτρα που κατευθύνουν την δέσμη, ένα μονοχρωμάτορα με τον οποίο επιλέγουμε το μήκος κύματος που θέλουμε, μια κυψελίδα με το δείγμα και έναν ανιχνευτή.

Στη φυσική με τον όρο φασματοφωτομετρία αποδίδεται η ποσοτική καταγραφή των ηλεκτρομαγνητικών φασμάτων. Ένα φασματοφωτόμετρο είναι ένα φωτόμετρο δηλαδή μια διάταξη που μετρά την ένταση του φωτός ως συνάρτηση του χρώματος ή πιο συγκεκριμένα του μήκους κύματος. Υπάρχουν διάφοροι τύποι φασματοφωτομέτρων. Η διάκρισή τους μπορεί να γίνει είτε με κριτήριο τη φασματική περιοχή που λειτουργούν, είτε με τις τεχνικές μέτρησης που εφαρμόζουν, τον τρόπο καταγραφής του φάσματος κ.α. Άλλα σημαντικά γνωρίσματά τους είναι το φασματικό εύρος τους και η γραμμικότητά τους. Η πιο συνηθισμένη εφαρμογή των φασματοφωτομέτρων είναι στη μέτρηση της απορρόφησης του φωτός αλλά μπορούν να σχεδιαστούν έτσι ώστε να καταγράφουν και την κατοπτρική ή τη διάχυτη ανάκλαση. Οι διαφορετικοί τύποι φασματοφωτομέτρων χρησιμοποιούν διαφορετικές διαδικασίες μέτρησης.

Παρόλο που υπάρχουν ορισμένες διαφορές στις ποικίλες φασματοσκοπικές, ορισμένα από τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται είναι κοινά. Έτσι, οι περισσότερες φασματοσκοπικές διατάξεις περιλαμβάνουν τα παρακάτω 4 εργαλεία:

(1) Ευσταθής πηγή ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας

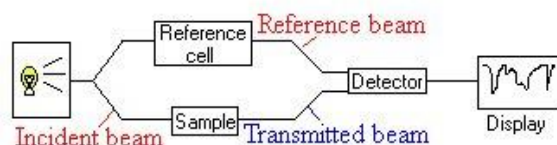
(2) Μια συσκευή που απομονώνει τις “απαγορευμένες” περιοχές του φάσματος για τις μετρήσεις

(3) Έναν ανιχνευτή ακτινοβολίας ή μια διάταξη μετατροπής της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε ηλεκτρικό σήμα και

(4) Έναν επεξεργαστή σήματος και ανάγνωσης, ο οποίος προβάλλει το μετατρεπόμενο σήμα σε ένα παλμογράφο ή σε ένα φασματικό διάγραμμα.

Για το φωτισμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν δυο είδη πηγών ακτινοβολίας, οι λάμπες με συνεχές και οι λάμπες με γραμμικό φάσμα εκπομπής.

Τα περισσότερα φασματοφωτόμετρα χρησιμοποιούν ένα μονοχρωμάτορα για την ανάλυση του φωτός, αλλά υπάρχουν επίσης και φασματοφωτόμετρα που χρησιμοποιούν μια σειρά φωτοανιχνευτών και ειδικά για το υπέρυθρο, αυτά τα φασματοφωτόμετρα βασίζονται στο μετασχηματισμό του σήματος κατά Fourier (και επομένως η αντίστοιχη τεχνική είναι γνωστή ως FTIR).



Εικόνα 5.1.11: Τυπική διάταξη φασματοσκοπίας υπέρυθρου

Οι έλεγχοι που κάνουμε γενικά στα φωτοφασματοφωτόμετρα είναι η ποσοτική ανάλυση, φωτομετρική επαναληψιμότητα και φωτομετρική ακρίβεια. Στην ποσοτική ανάλυση χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα-δείγματα γνωστής συγκέντρωσης φάσματος. Εντοπίζουμε μέσω της συσκευής την κορυφή με την μεγαλύτερη απορρόφηση και προσδιορίζουμε το μήκος κύματος και την απορρόφηση. Αν η καμπύλη δεν είναι ευθεία χρησιμοποιούνται διαλύματα με μικρότερη συγκέντρωση. Τέλος ελέγχουμε την συγκέντρωση ενός άγνωστου διαλύματος.

Για τον έλεγχο της φωτομετρικής επαναληψιμότητας χρησιμοποιούνται γυάλινα ή μεταλλικά φίλτρα με μη εντοπισμένη απορρόφηση, γίνονται αρκετές διαδοχικές μετρήσεις και υπολογίζεται η σταθερά απόκλισης s .

Η φωτομετρική ακρίβεια μετριέται όπως η φωτομετρική επαναληψιμότητα. Γίνονται δέκα μετρήσεις διαδοχικά, με πρότυπα δείγματα που έχουν βαθμονομηθεί σε πρότυπα εργαστήρια, και υπολογίζεται η ακρίβεια ως η διαφορά ανάμεσα στην μέση τιμή των μετρήσεων και της πραγματική τιμής της διαπερατότητας που δίνει το πρότυπο εργαστήριο.

5.1.3.1 Φασματοσκοπία απορρόφησης

Όταν τα άτομα ή τα μόρια απορροφούν το φως τότε διεγείρονται σε μια μεγαλύτερη ενεργειακή στάθμη. Το είδος της διέγερσης εξαρτάται από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Έτσι για παράδειγμα οι ηλεκτρονιακές διεγέρσεις επιτυγχάνονται με την απορρόφηση υπεριώδους ή ορατού φωτός, οι ταλαντωτικές με υπέρυθρο φως και οι περιστροφικές με μικροκύματα. Για τις περισσότερες ουσίες, το ποσό απορρόφησης ποικίλλει με το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, που οδηγεί στην εμφάνιση χρώματος στις χρωστικές ουσίες οι οποίες που απορροφούν συγκεκριμένα μερικά μήκη κύματος.

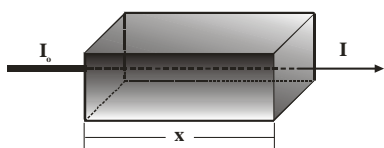
Το φάσμα απορρόφησης ενός ατόμου ή μορίου εξαρτάται από τα ενεργειακά επίπεδα που αντιστοιχούν στη δομή του υλικού και επομένως η μελέτη του φάσματος απορρόφησης επιτρέπει την αναγνώριση των συστατικών του υλικού. Το φάσμα απορρόφησης είναι η απορρόφηση τους φωτός από κάποιο υλικό ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Το φάσμα απορρόφησης είναι χαρακτηριστικό του υλικού και δεν αλλάζει με τη μεταβολή της συγκέντρωσής του. Το φάσμα απορρόφησης καταγράφεται με ένα φασματοφωτόμετρο, το οποίο διαχέει το φως με τη χρήση ενός φράγματος περίθλασης.

Η φασματοσκοπία απορρόφησης χρησιμοποιεί την περιοχή του φάσματος στην οποία το υπό εξέταση υλικό απορροφά. Μετά τη βαθμονόμηση του συστήματος, η απορρόφηση συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του υλικού με τη χρήση του νόμου Beer-Lambert. Η μέθοδος μπορεί να αυτοματοποιηθεί και να χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μέτρηση της συγκέντρωσης ιόντων, π.χ. του νατρίου και του ασβεστίου στο αίμα. Η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού, χρησιμοποιείται πιο συχνά στη μελέτη υγρών υλικών για την ανίχνευση του μοριακού περιεχομένου, ενώ η φασματοσκοπία απορρόφησης υπέρυθρου στη μελέτη υγρών-ημίρρευστων υλικών, ξηρών ή στερεών, για τη λήψη μοριακών και κυρίως δομικών πληροφοριών.

Για την απορρόφηση της ακτινοβολίας σε ομογενή μέσο υπάρχουν δυο νόμοι, ο νόμος του Lambert, που δίνει την τελική ένταση του φωτός αφού περάσει από το δείγμα (συναρτήσει του πάχους του δείγματος), και ο νόμος του Beer, που δίνει την ένταση συναρτήσει της συγκέντρωσης του διαλύματος. Για να υπολογίσουμε την απορρόφηση ακτινοβολίας από τα διαλύματα χρησιμοποιούμε ένα συνδυασμό των δύο νόμων που ονομάζεται νόμος Lambert-Beer. Βάση αυτού ορίζουμε την διαπερατότητα και την απορρόφηση, που αποτελεί την βάση της ποσοτικής ανάλυσης. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των συστατικών του υλικού επιτυγχάνεται με την εφαρμογή του νόμου Beer-Lambert. Μετρώντας την απορρόφηση μιας δέσμης φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος από ένα δείγμα και κατασκευάζοντας την καμπύλη απορρόφησης-συγκέντρωσης, μπορούμε να βγάλουμε χρήσιμα συμπεράσματα για το είδος και τη συγκέντρωση μιας ουσίας που περιέχεται στο δείγμα.

5.1.3.1.1 Διαπερατότητα

Ο όρος διαπερατότητα ενός υλικού σχετίζεται με τη διέλευση της ακτινοβολίας μέσα από την ύλη. Ας θεωρήσουμε μια δέσμη μονοχρωματικού φωτός με ένταση I_0 η οποία προσπίπτει σε ένα υλικό που έχει πάχος x και συγκέντρωση απορροφούντων συστατικών C . Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του φωτός με την ύλη είναι η εξασθένιση της έντασης της δέσμης σε I .



Εικόνα 5.1.12: Βαθμιαία μείωση της έντασης της ακτινοβολίας (από I_0 σε I), κατά τη διέλευσή της μέσα από υλικό πάχους x .

Η διαπερατότητα T του υλικού ορίζεται ως ο λόγος της έντασης της προσπίπτουσας στο υλικό δέσμης προς την ένταση της εξερχόμενης δέσμης από το υλικό.

$$T = I/I_0 \quad \text{ή} \quad \% \text{ Διαπερατότητα, } \%T = 100 \cdot T \quad (1)$$

Η απορρόφηση σχετίζεται με τη διαπερατότητα με τη σχέση:

$$A = -\log T \Rightarrow A = \log \frac{1}{T} \Rightarrow A = -\log(I/I_0) \quad (2)$$

$$A = \log \frac{100}{\%T} \Rightarrow A = 2 - \log \%T \quad (3)$$

Η τελευταία εξίσωση είναι σημαντική επειδή επιτρέπει τον εύκολο υπολογισμό της απορρόφησης από τα την ποσοστιαία διαπερατότητα. Έτσι, εάν όλο το φως περάσει από κάποιο υλικό χωρίς οποιαδήποτε απορρόφηση, τότε η απορρόφηση είναι μηδέν, και η επί τοις εκατό διαπερατότητα είναι 100%. Εάν όλο το φως απορροφηθεί, τότε η επί τοις εκατό διαπερατότητα είναι μηδέν, και η απορρόφηση είναι άπειρη.

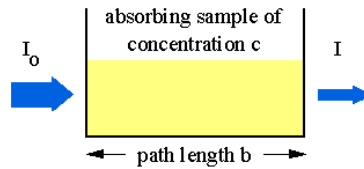
5.1.3.1.2 Νόμος Beer-Lambert

Πολλά μόρια απορροφούν το υπεριώδες ή το ορατό φως. Η απορροφητικότητα ενός διαλύματος αυξάνεται καθώς εξασθενεί ο προσπίπτον φωτεινός παλμός. Ενώ η σχετική ένταση των διάφορων γραμμών απορρόφησης δεν ποικίλλει, σε ένα δεδομένο μήκος κύματος η μετρούμενη απορρόφηση έχει αποδειχθεί ότι είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του υλικού και το πάχος του δείγματος που το φως διαπερνά. Αυτό είναι γνωστό ως νόμος Beer-Lambert.

Ο νόμος Beer-Lambert είναι εμπειρικός και εκφράζει τη γραμμική συσχέτιση μεταξύ της απορρόφησης και της συγκέντρωσης των συστατικών που απορροφούν το φως. Η γενική έκφραση του νόμου Beer-Lambert είναι:

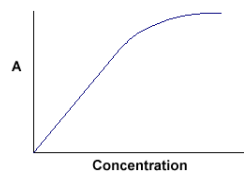
$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot C \quad (4)$$

όπου A είναι η μετρούμενη απορρόφηση του υλικού, $\varepsilon(\lambda)$ είναι ο συντελεστής απορρόφησης που εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός, b είναι το πάχος του υλικού και C η συγκέντρωση του συστατικού που απορροφά το φως.



Εικόνα 5.1.13: Απορρόφηση του φωτός από κάποιο υλικό

Ο τύπος $A = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot C$ αναφέρει ότι η απορρόφηση εξαρτάται από τη συνολική ποσότητα της ουσίας που βρίσκεται στην πορεία του φωτός μέσα στο υλικό. Η γραφική παράσταση της απορρόφησης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση είναι μια ευθεία γραμμή που διέρχεται από την αρχή των αξόνων (0.0). Ο νόμος Beer-Lambert χάνει τη γραμμικότητά του στις υψηλές συγκεντρώσεις των υλικών.



Εικόνα 5.1.14: Απορρόφηση του φωτός σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υλικού

Από τις σχέσεις 1 και 3 προκύπτει η σχέση που συνδέει τη διαπερατότητα με τη συγκέντρωση και τις εντάσεις της προσπίπτουσας και εξερχόμενης από το δείγμα, ακτινοβολίας:

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot C = -\log T = -\log(I/I_0) \Rightarrow \quad (5)$$

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot C}$$

όπου : I είναι η ένταση της προσπίπτουσας στο υλικό ακτινοβολίας

I_0 είναι η ένταση της εξερχόμενης στο υλικό ακτινοβολίας

$\varepsilon(\lambda)$ είναι ο συντελεστής απορρόφησης του υλικού

b είναι το πάχος του υλικού και

C είναι η συγκέντρωση του συστατικού που απορροφά την ακτινοβολία

Οι μονάδες μέτρησης του c και του ε εξαρτώνται από τον τρόπο που εκφράζεται η συγκέντρωση της ουσίας. Εάν το υλικό είναι για παράδειγμα κάποιο αέριο, η συγκέντρωση εκφράζεται ως πυκνότητα (μονάδες του $1/(\text{μήκους})^3$, π.χ. cm^{-3}), οπότε σ' αυτή την περίπτωση το ε είναι η ενεργός διατομή της απορρόφησης και έχει μονάδες $(\text{μήκους})^2$ (π.χ. cm^2).

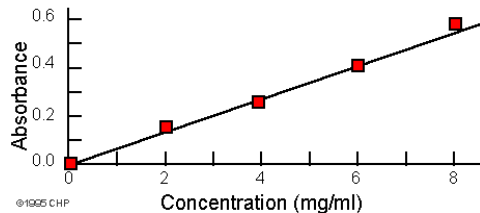
Ο συντελεστής απορρόφησης, ε , ποικίλλει στα διαφορετικά υλικά και επίσης μεταβάλλεται με το μήκος κύματος του φωτός για ένα δεδομένο υλικό. Ο συντελεστής απορρόφησης $\varepsilon(\lambda)$ του υλικού συνδέεται με το συντελεστή απόσβεσης της ακτινοβολίας (extinction coefficient) μέσω της σχέσης:

$$\varepsilon = \frac{4\pi k}{\lambda}$$

όπου: k είναι ο συντελεστής απόσβεσης της ακτινοβολίας και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας.

Η συσχέτιση της συγκέντρωσης της ουσίας με την απορρόφηση (μέσω του νόμου), είναι η βάση της φασματοσκοπίας εύρεσης των ουσιών που εντοπίζονται σε κάποιο υλικό. Τα σύγχρονα

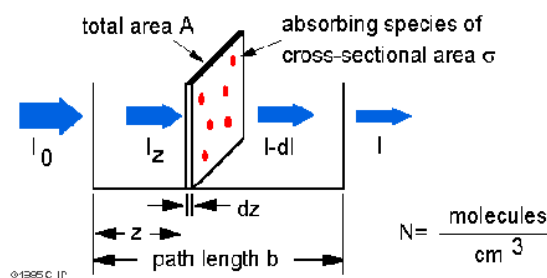
όργανα απορρόφησης μπορούν συνήθως να μετρήσουν είτε την %-διαπερατότητα, είτε την απορρόφηση. Η άγνωστη συγκέντρωση ενός υλικού μπορεί να καθοριστεί με τη μέτρηση του ποσού φωτός που ένα δείγμα απορροφά και εφαρμόζοντας το νόμο του Beer-Lambert. Εάν ο συντελεστής απορρόφησης δεν είναι γνωστός, η άγνωστη συγκέντρωση μπορεί να καθοριστεί χρησιμοποιώντας την καμπύλη βαθμονόμησης της απορρόφησης με τη συγκέντρωση που προήλθε από πρότυπα δείγματα (working curve). Τα πρότυπα δείγματα, είναι δείγματα που



Εικόνα 5.1.15: Φασματική καμπύλη απορρόφησης πρότυπου δείγματος
(Science Hypermedia Home Page)

περιέχουν γνωστή συγκέντρωση ουσίας, είναι εξαιρετικά καθαρά, σταθερά, χωρίς υγρασία και έχουν μοριακό ψηλό βάρος. Παρέχουν μια αναφορά για να καθορίσουν τις άγνωστες συγκεντρώσεις ή για να βαθμονομήσουν τα αναλυτικά όργανα. Η ακρίβεια ενός αναλυτικού οργάνου καθορίζεται από το βαθμό προσέγγισης της μετρηθείσας τιμής με την πραγματική.

Ο νόμος Beer-Lambert μπορεί να προέλθει από μια προσομοίωση, για το συντελεστή απορρόφησης, ενός μορίου με ένα αδιαφανή δίσκο του οποίου η ενεργός-διατομή, σ , αντιπροσωπεύει την αποτελεσματική περιοχή που «βλέπει» το προσπίπτον φωτόνιο, με συχνότητα ν . Εάν η συχνότητα του φωτός είναι μακριά από τη συχνότητα συντονισμού του μορίου, η περιοχή είναι περίπου 0, και αν η συχνότητα προσεγγίζει τη συχνότητα συντονισμού, η περιοχή γίνεται μέγιστη. Παίρνοντας μια απειροελάχιστη διατομή, dz , του δείγματος, έχουμε:



Εικόνα 5.1.16: Διέλευση του φωτός από κάποιο υλικό (Science Hypermedia Home Page)

όπου I_0 είναι η προσπίπτουσα στο δείγμα ένταση για $z=0$, το I_z είναι η ένταση που εισάγεται στην απειροελάχιστη διατομή στο z , dI είναι η ένταση που απορροφάται στην πλάκα, και I είναι η ένταση του φωτός που εξέρχεται από το δείγμα. Κατόπιν, τα φωτόνια που απορροφώνται θα είναι $\sigma \cdot N \cdot A \cdot dz/A$ έτσι,

$$dI/I_z = -\sigma \cdot N \cdot dz$$

Η ολοκλήρωση της σχέσης αυτής για όλη την έκταση του υλικού από $z = 0$ έως $z = b$ δίνει:

$$\ln(I) - \ln(I_0) = -\sigma \cdot N \cdot b \quad \text{ή} \quad -\ln(I/I_0) = \sigma \cdot N \cdot b$$

Αφού N (αριθμός μορίων/cm³) · (1 mole / 6.023x10²³ μόρια) · 1000cm³/liter = c (moles/liter)

και $2.303 \cdot \log(x) = \ln(x)$ τότε

$$-\log(I/I_0) = \sigma \cdot (6.023 \times 10^{20} / 2.303) \cdot c \cdot b \text{ ή } -\log(I/I_0) = A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

όπου $\varepsilon = \sigma \cdot (6.023 \times 10^{20} / 2.303) = \sigma \cdot 2.61 \times 10^{20}$

Ένα φαινόμενο που παρατηρείται επίσης κατά την πτώση μιας ακτίνας στη διαχωριστική επιφάνεια δύο υλικών είναι η διάθλαση (αλλαγή στην αρχική διεύθυνση της προσπίπτουσας στο υλικό ακτίνας). Η διάθλαση αποδίδεται στην διαφορετική ταχύτητα του φωτός στα δύο υλικά λόγω του διαφορετικού δείκτη διάθλασής τους. Ο δείκτης διάθλασης ενός υλικού n , υπολογίζεται από τη σχέση: $n = c/v$ (c : ταχύτητα του φωτός στο κενό ή στον αέρα και v : ταχύτητα του φωτός στο υλικό) και είναι ποσότητα που χαρακτηρίζει ένα υλικό. Ο δείκτης διάθλασης είναι συνάρτηση του μήκους κύματος του φωτός που διαδίδεται στο υλικό.

Εργαστηριακά, αυτό που μετράται συνήθως δεν είναι η διαπερατότητα σε κάποιο υλικό αλλά η ανάκλασή του. Η ανάκλαση συνδέεται με την ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας μέσω της σχέσης:

$$I = I_0 \cdot (1 - R)^2 \cdot e^{-\varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot C}$$

Τα διαφορετικά μόρια απορροφούν ακτινοβολία διαφορετικών μηκών κύματος. Ένα φάσμα απορρόφησης θα παρουσιάσει τις διάφορες ζώνες απορρόφησης που αντιστοιχούν στις δομικές ομάδες που υπάρχουν μέσα στο μόριο.

Αν το υπό εξέταση υλικό περιέχει δύο (π.χ. α και β) ή και περισσότερα συστατικά, που απορροφούν το προσπίπτον φως, τότε η ολική απορρόφηση ($A(\lambda_v)$ σε κάθε μήκος κύματος, v), ισούται με το άθροισμα των απορροφήσεων των επιμέρους συστατικών ($A_\alpha(\lambda_v)$, $A_\beta(\lambda_v)$):

$$\begin{aligned} A(\lambda_v) &= A_\alpha(\lambda_v) + A_\beta(\lambda_v) \Rightarrow \\ A(\lambda_v) &= \varepsilon_\alpha(\lambda_v) \cdot x \cdot C_\alpha + \varepsilon_\beta(\lambda_v) \cdot x \cdot C_\beta \end{aligned} \quad (6)$$

Αν υποθεθεί ότι το πάχος του υλικού διατηρείται σταθερό, τότε μαζί με το συντελεστή απορρόφησης μπορούν να συνδυαστούν σε μια παράμετρο K_λ (σταθερά απορρόφησης). Έτσι:

$$A(\lambda_v) = K_\alpha(\lambda_v) \cdot C_\alpha + K_\beta(\lambda_v) \cdot C_\beta \quad (7)$$

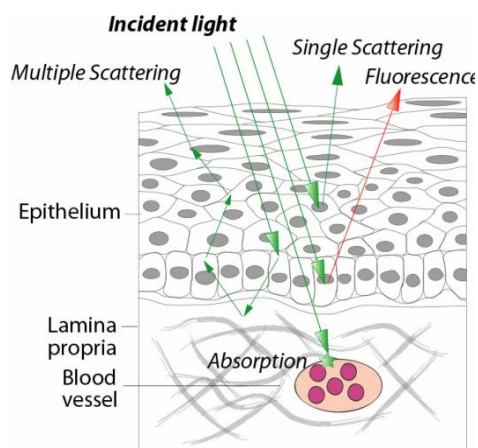
Ο νόμος Beer-Lambert υφίσταται περιορισμούς στη χρήση του λόγω φαινομένων σκέδασης των φωτός από τα συστατικά του υλικού, φθορισμού και φωσφορισμού, αλλαγών στο δείκτη διάθλασης σε υψηλές συγκεντρώσεις συστατικών, πειραματικών σφαλμάτων στη μέτρηση της απορρόφησης, χρήση μη μονοχρωματικής ακτινοβολίας κ.α. Επομένως είναι αναγκαίο στις παραπάνω εκφράσεις του νόμου, να προστεθεί και ένας παράγοντας ($E_{\lambda v}$), για την αντιστάθμιση αυτών σφαλμάτων. Γενικά όμως, προσφέρει ικανοποιητική προσέγγιση στον υπολογισμό της απορρόφησης ομοιογενών υλικών (π.χ. στην περίπτωση μελέτης της απορρόφησης ομοιογενών διαλυμάτων).

$$A(\lambda_v) = K_\alpha(\lambda_v) \cdot C_\alpha + K_\beta(\lambda_v) \cdot C_\beta + E(\lambda_v) \quad (8)$$

5.1.3.2 Φασματοσκοπία ανάκλασης και ελαστικής σκέδασης

Η δέσμη του φωτός καθώς προσπίπτει πάνω στους ιστούς οπισθοσκεδάζεται, απορροφάται και εισχωρεί εντός τους. Το ποια ή ποιες από τις προαναφερθείσες διαδικασίες θα υπερισχύσει εξαρτάται από το τη σύνθεση του εκάστοτε ιστού, την αιμάτωση του, την ύπαρξη χρωμοφώρων, το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός κ.λ.π. Η απορρόφηση του φωτός αποδίδεται κυρίως στα χρωμοφόρα συστατικά του εκάστοτε ιστού, ενώ οι ασυνέχειες στον δείκτη διάθλασης των στρωμάτων ιστού μέσα από τα οποία διαδίδεται το φως οδηγούν στην ύπαρξη των φαινομένων σκέδασης από τους ιστούς (Kumar D. et al, 2004).

Η απορρόφηση του φωτός στο υλικό συμβαίνει σε συγκεκριμένα μήκη κύματος που εξαρτώνται από την βιοχημική σύνθεση του ιστού. Σε αντίθεση, η σκέδαση του φωτός προκαλεί αλλαγές στην τροχιά του προσπίπτοντος φωτός και επηρεάζει όλα τα μήκη κύματος του ορατού φάσματος σε ποικίλους βαθμούς.



Εικόνα 5.1.17: Το φως που εξέρχεται από τον ιστό έχει τροποποιηθεί με τις διαδικασίες της απορρόφησης και της σκέδασης.

Στη φασματοσκοπία ανάκλασης καταγράφεται το φως που έχει διασκορπιστεί από ένα υλικό ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Η φασματοσκοπία ανάκλασης βασίζεται στη διαδικασία της σκέδασης.

Η φασματοσκοπία ανάκλασης είναι μία από τις πιο απλές και εύχρηστες φασματοσκοπικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στη μελέτη των ιστών (Clark RN. et al, 1984). Εξετάζοντας το μήκος κύματος του ανακλώμενου φωτός, μπορούν να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με την απορρόφηση των ιστών. Η φασματοσκοπία ανάκλασης παρέχει ταχεία αξιολόγηση της παθολογίας του ιστού χωρίς την ανάγκη της εκτομής του και ξεπερνά πολλούς περιορισμούς σχετιζόμενους με την επεξεργασία του ιστού και την ιστοπαθολογική διάγνωση. Το φως που προσπίπτει στην επιφάνεια του ιστού υπόκειται σε πολλαπλές σκεδάσεις και σε απορρόφηση, ενώ μέρος του οποίου επιστρέφει μεταφέροντας ποσοτική πληροφορία σχετικά με τη δομή και τη σύσταση του ιστού (Stelzle F. et al, 2010). Το ανακλώμενο φως διατηρεί το ίδιο μήκος κύματος, αν και τα διαφορετικά μήκη κύματος απορροφώνται και αντανακλώνται σε διαφορετικούς βαθμούς. Πολλές παθολογικές καταστάσεις, σχετίζονται με σημαντικές δομικές αλλαγές στο κυτταρικό και υποκυτταρικό χώρο (μέγεθος και σχήμα κυττάρων, ο λόγος του όγκου του πυρήνα προς τον αντίστοιχο του κυττάρου κ.λ.π.). Το λαμβανόμενο φάσμα αναλύεται στα χαρακτηριστικά του με τη χρήση κάποιου

αναλυτικού μοντέλου διάχυσης φωτός και έτσι παρέχεται ποσοτική πληροφορία σχετικά με τα χαρακτηριστικά του υπό εξέταση ιστού, όπως: τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, το βαθμό της οξυγόνωσης της, την πυκνότητα και το μέγεθος των ιστικών συστατικών που προκαλούν τη σκέδαση του φωτός κ.α. (Perelman LT. et al, 1998). Μελέτες έχουν δείξει ότι η φασματοσκοπία ανάκλασης παρέχει πολύτιμες πληροφορίες κυρίως για τη μορφολογία και την *in vivo* διάκριση μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού.

Ένα βασικό πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας ανάκλασης ως μεθόδου για τη μελέτη της κατάστασης ενός ιστού είναι η μεγάλη διαθεσιμότητα και η ευκολία χρήσης των οπτικών οργάνων. Τα συστήματα της φασματοσκοπία ανάκλασης για βιοϊατρικές εφαρμογές περιλαμβάνουν τρία βασικά κομμάτια: μια πηγή φωτός, έναν ανιχνευτή οπτικής ίνας, και ένα φασματόμετρο.

Η πηγή φωτός ενός συστήματος φασματοσκοπίας ανάκλασης επιλέγεται με βάση κυρίως τη φωτεινότητά της και το φασματικό της εύρος. Η ισχύς εξόδου μιας πηγής φωτός πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε το ανακλώμενο σήμα να είναι αρκετά ισχυρότερο από το σήμα θορύβου του υποβάθρου έτσι ώστε να ληφθούν αξιόπιστες μετρήσεις σε λογικά χρονικά περιθώρια. Οι σύμφωνες πηγές φωτός, όπως τα λέιζερ και οι δίοδοι, συνήθως φωτίζουν τον ιστό με σημαντικά μεγαλύτερη ισχύ από τις πηγές λευκού φωτός, ειδικά όταν το φως διοχετεύεται μέσα από οπτικές ίνες. Ενώ η αυξημένη φωτεινότητα προσφέρει τη δυνατότητα λήψης ενός καλύτερου σήματος αναλογικά σε σχέση με το θόρυβο, τα επίπεδα της ισχύος πρέπει να ρυθμίζονται προσεκτικά για να αποτραπεί η θερμική καταστροφή ιστού. Το φασματικό εύρος εκπομπής μιας δεδομένης πηγής φωτός τυπικά καθορίζει την εφαρμογή που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Ορισμένες πηγές φωτός, όπως οι λαμπτήρες τόξου λευκού φωτός, εκτείνονται σε ολόκληρο το ορατό φάσμα, στο υπεριώδες και το εγγύς υπέρυθρο, αλλά μπορεί να παρουσιάσουν ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά, όπως οι απότομες φασματικές κορυφές και η πιθανή θέρμανση του ιστού από το υπέρυθρο φως. Οι σύμφωνες πηγές φωτός, ωστόσο, καλύπτουν ένα μικρότερο φασματικό εύρος, από λιγιστά έως και αρκετές δεκάδες νανόμετρα. Στην περίπτωση ενός μικρού φασματικού εύρους, πρέπει να επιλεγθούν τα πιο κατάλληλα μήκη κύματος διαγνωστικά, για μία συγκεκριμένη εφαρμογή, από εκείνα που εκπέμπει η πηγή. Για πηγές φωτός με ευρυζωνικό φάσμα εκπομπής, είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί ότι όλα τα μήκη κύματος διαδίδονται ικανοποιητικά μέσω του οπτικού συστήματος, αποφεύγοντας τα φαινόμενα διασποράς.

Το δεύτερο σημαντικό κομμάτι του συστήματος της φασματοσκοπίας ανάκλασης είναι ένας καθετήρας οπτικών ινών. Μέσω αυτού του κυματοδηγού φτάνει το προσπίπτον φως στον ιστό και κατόπιν συλλέγεται μέσω αυτού το ανακλώμενο σήμα. Η χρήση λεπτών, εύκαμπτων οπτικών ινών επιτρέπει στο φως να φτάσει σε σχεδόν οποιοδήποτε κοίλο όργανο του σώματος. Αυτοί οι κυματοδηγοί σχεδιάζονται συνήθως για να εφαρμόζουν αβίαστα στα ενδοσκοπία. Η ειδική γεωμετρία και ο σχεδιασμός του κυματοδηγού μπορεί να προσαρμόζεται ώστε να ανταποκρίνεται στις ειδικές ανάγκες κάθε εφαρμογής.

Το φασματόμετρο είναι το κύριο στοιχείο του συστήματος της φασματοσκοπίας ανάκλασης. Η σχισμή του φασματομέτρου διαχωρίζει το λαμβανόμενο σήμα στα επιμέρους μήκη κύματος και ανιχνεύει τις αντίστοιχες εντάσεις χρησιμοποιώντας ένα CCD τσιπ ή κάποιον άλλο ανιχνευτή πολλαπλών καναλιών. Το μέγεθος και ο σχεδιασμός ενός φασματομέτρου υπαγορεύουν τη φασματική ανάλυσή του και το ανιχνεύσιμο φασματικό εύρος. Αυτές οι παράμετροι έχουν μεταξύ τους μία ανταγωνιστική σχέση καθώς η αύξηση στην φασματική ανάλυση επιφέρει μείωση του

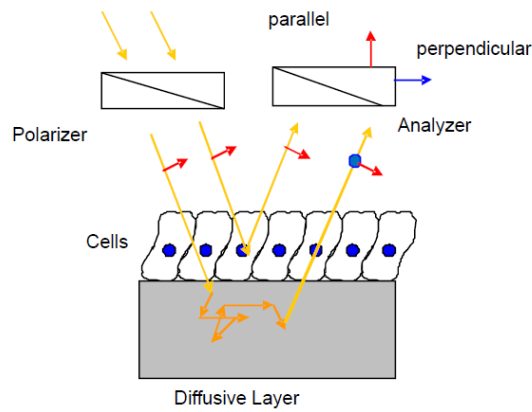
φασματικού εύρους και το αντίστροφο. Τα σύγχρονα φασματομέτρα είναι διαθέσιμα με ανεπτυγμένα λογισμικά ελέγχου που επιτρέπουν την απόκτηση και τη μεταφορά δεδομένων με υψηλή ταχύτητα.

Η χρήση καλύτερων φασματοσκοπικών τεχνικών συνέβαλλε στο χαρακτηρισμό του ιστού με μεγαλύτερη αξιοπιστία. Η πρόοδος στη χρήση μοντέλων προσομοίωσης της αλληλεπίδρασης μεταξύ του φωτός και των ιστών έχει συμβάλλει στη χρήση βελτιωμένων μεθόδων για την ανάλυση των ιστών. Η σύνδεση των φασματικών χαρακτηριστικών του ιστού με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του, παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση του ιστού (*Perelman Lt. et al, 1998*).

Εκείνα τα φωτόνια που ανακλώνται από την επιφάνεια του υλικού ή διαθλώνται από κάποιο μικροσωματίδιο, λέγεται ότι σκεδάστηκαν. Η φασματοσκοπία σκέδασης του φωτός είναι μια μορφή της φασματοσκοπίας ανάκλασης η οποία πληροφορεί σχετικά με τον τρόπο που τα φωτόνια διαδίδονται μέσα στους ιστούς, παρέχοντας γνώση για την εσωτερική δομή τους. Ποσοτικά μορφολογικές πληροφορίες για τον υπό μελέτη ιστό μπορούν να ληφθούν μέσω μιας ουσιαστικότερης ανάλυσης της πόλωσης και της γωνιακής εξάρτησης αυτής από το μήκος κύματος του σκεδαζόμενου φωτός. για τις υπάρχουσες δομές του ιστού εξετάζοντας την ελαστική σκέδαση του φωτός. Η φασματοσκοπία σκέδασης μετρά το βαθμό στον οποίο οι γωνιακές διαδρομές του φωτός επηρεάζονται από τις κυτταρικές δομές όπως οι πυρήνες, τα μιτοχόνδρια κ.α.

Η ελαστική σκέδαση φωτός είναι μια διαδικασία κατά την οποία δεν αλλάζει το μήκος κύματος του φωτός κατά τη διάρκεια της σκέδασης. Κάθε μήκος κύματος του φωτός που προσπίπτει στο δείγμα σκεδάζεται σε διαφορετικό βαθμό από τις υπάρχουσες στον ιστό δομές. Ένα μέρος του φωτός που προσπίπτει στον ιστό οπισθοσκεδάζεται, ή σκεδάζεται ακριβώς στη διεύθυνση του προσπίπτοντος φωτός, και μπορεί να συλλεχθεί από κάποιο ανιχνευτή. Επειδή η ενέργεια διατηρείται κατά τη διάρκεια της εν λόγω σκέδασης, και ως εκ τούτου δεν συμβαίνει μετατόπιση του μήκους κύματος, το είδος αυτό της φασματοσκοπίας ονομάζεται φασματοσκοπία ελαστικής σκέδασης.

Η φασματοσκοπία ελαστικής σκέδασης μετρά συγκεκριμένες φυσικές ιδιότητες με την καταγραφή του ποσού του φωτός που διασκορπίζεται από μια ουσία, σε ορισμένα μήκη κύματος και γωνίες. Στη σκέδαση, τα φωτόνια εισέρχονται στο υλικό, σκεδάζονται μία ή περισσότερες φορές και τελικά άλλα απορροφώνται και άλλα σκεδάζονται από την επιφάνεια και έτσι μπορούν να ανιχνευθούν. Οι πληροφορίες που συλλέγονται είναι σύνθετες, και επειδή η σκέδαση είναι μια μη γραμμική διαδικασία, η εξαγωγή των ποσοτικών πληροφοριών είναι δύσκολη.



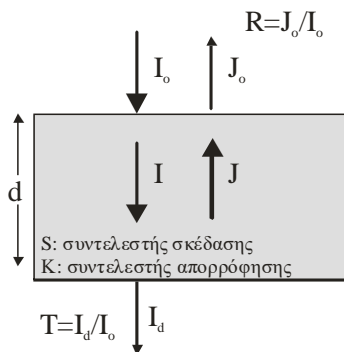
Εικόνα 5.1.18: Το φως που εξέρχεται από τον ιστό έχει έχει υποστεί μερική ή ολική αλλαγή στο επίπεδο πόλωσής του.

Η φασματοσκοπία ελαστικής σκέδασης είναι μία μη επεμβατική οπτική μέθοδος για το χαρακτηρισμό μιας μεγάλης ποικιλίας βιολογικών συστημάτων. Ο ιστός ακτινοβολείται είτε με πολωμένο (Gurjar RS. et al, 2001), είτε με μη πολωμένο φως (Perelman LT. et al, 1998), το οποίο υφίσταται πολλαπλές σκεδάσεις λόγω της ετερογένειας του δείκτη διάθλαση του ιστού (εικόνα 5.1.18). Στη συνέχεια το φάσμα του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός καταγράφεται και αναλύεται παρέχοντας πληροφορίες για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιστού όπως το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων, η διάμετρος του πυρήνα, η πυκνότητά τους και το μέγεθος τους σε σχέση με εκείνο του κυτταροπλάσματος (Perelman LT. et al, 1998) κ.α. Αφού τα κυτταρικά συστατικά που προκαλούν την ελαστική σκέδαση του φωτός έχουν τυπικές διαστάσεις της τάξεως του μήκους κύματος του ορατού και του υπέρυθρου φωτός, οι ιδιότητες της ελαστικής σκέδασης θα εμφανίσουν εξάρτηση από το μήκος κύματος του φωτός διαφορετική από τη Rayleigh σκέδαση ($1/\lambda^4$) (Bijio IJ. et al, 1997).

Η φασματοσκοπία ελαστικής σκέδασης αν και προσεγγίζει τη φασματοσκοπία ανάκλασης αρκετά, διαφέρει από αυτήν. Γενικά, η φασματοσκοπία ανάκλασης αναφέρεται στη συλλογή τόσο του διαχεόμενου φωτός όσο και των επιφανειακών συνιστωσών της ανάκλασης. Στη φασματοσκοπία σκέδασης, το φως που συλλέγεται και αναλύεται έχει υποστεί πολλαπλές σκεδάσεις στο εσωτερικό του ιστού και δεν προέρχεται από απλή επιφανειακή ανάκλαση. Το είδος του φωτός που θα συλλεχθεί καθορίζεται από τη γεωμετρία και την απόσταση της ίνας που συλλέγει το φως από τον υπό εξέταση ιστό (Bijio IJ. et al, 1997) καθώς και από τη χρήση ή μη πολωτικών φίλτρων.

5.1.3.2.1 Μοντέλο Kubelka-Munk

Ένα απλό και εύχρηστο μοντέλο που εφαρμόζεται στον υπολογισμό των συντελεστών απορρόφησης και σκέδασης, είναι εκείνο που προτάθηκε από τους Kubelka-Munk (Kubelka P, 1954).



Εικόνα 5.1.19: Απλοποιημένη σχηματική παράσταση του μοντέλου Kubelka-Munk για τη διάδοση της ακτινοβολίας σε υλικό με συντελεστή σκέδασης S και απορρόφησης K .

Το μοντέλο Kubelka-Munk υποθέτει ότι το υλικό έχει ετερογένειες που είναι μικρές συγκρινόμενες με το πάχος του, έτσι ώστε το προσπίπτον φως να διαχέεται στο υλικό και η κατοπτρική ανάκλαση να μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Γενικά το μοντέλο αυτό, συσχετίζει την ένταση του φωτός που προσπίπτει στο δείγμα (I) και την ένταση του φωτός που εξέρχεται από αυτό (J), με τους συντελεστές οπισθοσκέδασης (S) και απορρόφησης (K):

$$\frac{K}{S} = \frac{[(1 + R^2 - T^2)]}{2 \cdot R} - 1 \quad (1)$$

ή

$$S = \frac{1}{d} \cdot \left[\frac{K}{S} \cdot \left(\frac{K}{S} + 2 \right) \right]^{-\frac{1}{2}} \cdot \coth^{-1} \left[\frac{1 - R \cdot \left(\frac{K}{S} + 1 \right)}{R \cdot \left[\frac{K}{S} \cdot \left(\frac{K}{S} + 2 \right) \right]^{\frac{1}{2}}} \right]$$

όπου T : η διαπερατότητα του υλικού και R : η ανακλαστικότητα του υλικού.

Στην περίπτωση υλικού με θεωρητικά άπειρο πάχος, ή με πολύ μεγάλο πάχος, η διαπερατότητα T μπορεί να θεωρηθεί σχεδόν μηδενική και επομένως η παραπάνω εξίσωση (1) μπορεί να γραφτεί προσεγγιστικά ως:

$$\frac{K}{S} = \frac{(R-1)^2}{2 \cdot R}$$

Επομένως η επανεκπομπή του φωτός από ένα παχύ υλικό εξαρτάται μόνο από τους συντελεστές σκέδασης και απορρόφησης του υλικού. Αν επομένως ο συντελεστής σκέδασης S , θεωρηθεί σταθερός και γνωστός, τότε από την παραπάνω σχέση μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής απορρόφησης του υλικού K , ο οποίος σχετίζεται με τη συγκέντρωση και τη διάχυση των χρωμοφόρων που υπάρχουν στο υλικό.

Πάνω στο μοντέλο των Kubelka-Munk βασίστηκε η μαθηματική προσέγγιση των Wendlandt και Hecht (*Dawson JB. et al, 1980*), για τη φασματοσκοπία ανάκλασης. Η διαπερατότητα ενός υλικού (T), δίνεται από τη σχέση:

$$T = \frac{4 \cdot \beta}{(1 + \beta)^2 \cdot e^{K \cdot d} - (1 - \beta)^2 \cdot e^{-K \cdot d}}$$

ενώ η ανάκλαση R ισούται με:

$$R = \frac{(1 - \beta)^2 \cdot (e^{K \cdot d} - e^{-K \cdot d})}{(1 + \beta)^2 \cdot e^{K \cdot d} - (1 - \beta)^2 \cdot e^{-K \cdot d}}$$

$$\mu \epsilon \beta = \left(\frac{k}{k + 2 \cdot S} \right)^{1/2}$$

$$\text{και} \quad K = [k \cdot (k + 2 \cdot S)]^{1/2}$$

όπου: k είναι το κλάσμα του φωτός που απορροφάται ανά μονάδα διαδρομής στον υλικό

S είναι κλάσμα του φωτός που σκεδάζεται ανά μονάδα διαδρομής στο υλικό,

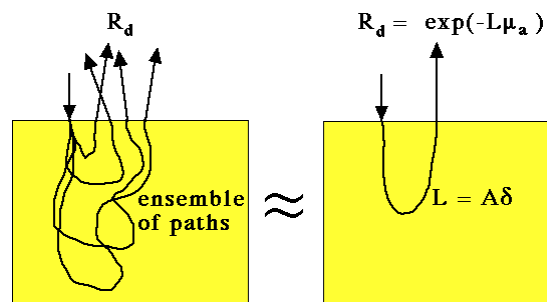
d είναι το πάχος του υλικού

Η εφαρμογή του παραπάνω μοντέλου περιορίζεται στην περίπτωση που το μέγεθος των σωματιδίων που απορροφούν ή σκεδάζουν το φως είναι αρκετά μικρότερο από το πάχος του υλικού ενώ τα σωματίδια αυτά είναι ομοιόμορφα διασκορπισμένα σε όλη την έκταση του υλικού.

Στην περίπτωση που η σκέδαση μέσα στο υλικό είναι αρκετά μικρή ($k \gg S$), τότε $T \sim e^{-kd}$ (Νόμος Beer-Lambert για την απορρόφηση) και $R \sim 0$. Διαφορετικά, αν $k \ll S$, τότε $T = 1/(1+S \cdot d)$ και $R = S \cdot d / (1 + S \cdot d)$. Σε ένα τέλεια ανακλαστικό στρώμα, η $R \rightarrow 1$ και $T \rightarrow 0$, με την προϋπόθεση ότι $S \cdot d \gg 1$.

5.1.3.2 Διάχυτη ανάκλαση από ένα ημιάπειρο υλικό

Όταν τα φωτόνια εισέρχονται σε κάποιο ιστό, σκεδάζονται και εξέρχονται από την επιφάνεια όπου και ανιχνεύονται. Το φως που διαφεύγει καλείται "διάχυτη ανάκλαση", R_d . Η τιμή του R_d εξαρτάται από το συντελεστή απορρόφησης του ιστού, μ_a και από το μήκος της διαδρομής L , των φωτονίων μέσα στον ιστό (εικόνα 5.1.20).



Εικόνα 5.1.20: Το φως αλληλεπιδρά με τον ιστό και ένα μέρος του εξέρχεται από αυτόν ως διάχυτη ανάκλαση.

Η διάχυτη ανάκλαση, R_d συσχετίζεται μεμονωμένα με την λόγο της σκέδασης ως προς την απορρόφηση. Όσο περισσότερα φαινόμενα σκέδασης συμβούν, πριν απορροφηθεί το φωτόνιο, τόσο πιο πιθανό είναι το φωτόνιο που διαφεύγει στην επιφάνεια να ανιχνευθεί ως ανάκλαση. Αν οι συντελεστές της απορρόφησης και της σκέδασης διπλασιαστούν ή υποδιπλασιαστούν, το R_d δεν αλλάζει επειδή η αναλογία σκέδασης προς απορρόφηση παραμένει σταθερή.

Η διάχυτη ανάκλαση από την επιφάνεια ενός ημιάπειρου ομοιογενούς μέσου, με συντελεστή απορρόφησης μ_a [cm^{-1}] και ο μειωμένος συντελεστής σκέδασης μ_s' [cm^{-1}] (reduced scattering coefficient) προσεγγίζεται από την έκφραση:

$$R_d \approx e^{-A \cdot \delta \cdot \mu_a} = e^{-\frac{A}{\sqrt{3(1+N')}}}$$

όπου $N' = \frac{\mu_s'}{\mu_a}$ και $\delta = \frac{1}{\sqrt{3 \cdot \mu_a (\mu_a + \mu_s')}}}$

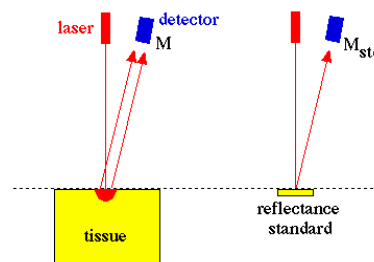
δ είναι το $1/e$ του οπτικού βάθους (optical penetration depth) και N' είναι ο λόγος της μειωμένης σκέδασης (reduced scattering), προς την απορρόφηση.

Ο παράγοντας $A \cdot \delta$ αντιστοιχεί στο προφανές μήκος L , της πορείας των φωτονίων λόγω του συντελεστή απορρόφησης μ_a δηλ, το συνολικό μήκος της διαδρομής των φωτονίων μέχρι να διαφύγουν από τον ιστό μπορεί να προσεγγιστεί από μια μονή διαδρομή με μήκος $L = A \cdot \delta$.

Η τιμή του A δεν είναι σταθερή, και εξαρτάται από το N' δηλ. το λόγο $\frac{\mu_s'}{\mu_a}$ και το συνδυασμό των διαθλαστικών δεικτών των υλικών. Η τιμή του A είναι, κατά προσέγγιση, περίπου 7-8 για τους περισσότερους μαλακούς ιστούς. Για έναν ακριβή υπολογισμό του R_d πρέπει να βρεθεί η ακριβής συνάρτηση συσχέτισης του A ως συνάρτηση του N' .

Υπολογισμός του N' από μετρήσεις της διάχυτης ανάκλασης R_d

Η μέτρηση της R_d είναι ίσως η απλούστερη μέτρηση που κάποιος μπορεί να κάνει σε ένα ημιάπειρο υλικό (Jacques SL, 1999). Η εικόνα 5.1.21 επεξηγεί τον τρόπο που γίνονται οι μετρήσεις σε ένα άγνωστο υλικό (M) με τη βοήθεια ενός υλικού με τυποποιημένο συντελεστή ανάκλασης (M_{std}) του οποίου ο συντελεστής ανάκλασης είναι R_{std} :



Εικόνα 5.1.21: Μετρήσεις ανάκλασης με τη βοήθεια ενός υλικού γνωστής ανακλαστικότητας.

Η διάχυτη ανάκλαση του υλικού υπολογίζεται από τη σχέση:

$$R_d = \frac{M}{M_{std}} \cdot R_{std}$$

Αν οριστεί το R_d τότε μπορεί να γίνει ο υπολογισμός του N' :

$$N' = \frac{A^2}{3(-\ln(R_d))^2} - 1$$

Δεδομένου ότι το A είναι μια συνάρτηση του N' , κάποιος μπορεί να κάνει επαναλαμβανόμενες προσομοιώσεις για να προσδιορίσει το A και το N' από μια δεδομένη καμπύλη διάχυτης ανάκλασης R_d .

5.1.3.3 Φασματοσκοπία φθορισμού-Ανοσοφθορισμός

Η φασματοσκοπία εκπομπής και φθορισμού ανήκει στις μη επεμβατικές διαγνωστικές τεχνικές (Richards-Kortum R. et al, 1994 και Durkin A. et al, 1994). Η εκπομπή φωτός από κάποια υλικά καλείται φθορισμός εάν η μετάβαση των ηλεκτρονίων είναι μεταξύ των καταστάσεων της ίδιας ιδιοπεριστροφής (κατάσταση singlet-singlet) και φωσφορισμός εάν η μετάβαση γίνεται μεταξύ καταστάσεων διαφορετικής ιδιοπεριστροφής (κατάσταση triplet-singlet).

Ο κανόνας του Kirchof, δηλώνει ότι η εκπομπή E , και η ανάκλαση από κάποιο υλικό R , συνδέονται με τη σχέση:

$$E = 1 - R$$

Η φασματοσκοπία εκπομπής χρησιμοποιεί τη φασματική περιοχή στην οποία μια ουσία εκπέμπει ακτινοβολία. Η ουσία απορροφά αρχικά κάποιο ποσό ενέργειας και εκπέμπει στη συνέχεια αυτήν την ενέργεια που προσέλαβε. Στη φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιούνται φωτόνια υψηλής ενέργειας για να διεγερθεί το υλικό το οποίο τελικά θα εκπέμψει χαμηλότερα ενεργειακά φωτόνια. Αυτή η τεχνική βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή σε ιατρικές και βιοχημικές μελέτες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy) και στην απεικόνιση του χρόνου ζωής του φθορισμού κάποιων υλικών. Στη φασματοσκοπία φθορισμού καταγράφεται το εκπεμπόμενο φάσμα. Η μορφή του φάσματος εξαρτάται από τον αριθμό και το είδος των υπαρχόντων φθορίζουσών βιολογικών μορίων στον ιστό. Επίσης η επιλογή του μήκους κύματος του φωτός διέγερσης του ιστού και του μήκους κύματος καταγραφής του φθορισμού καθορίζει ποια χρωμοφόρα συνεισφέρει στο λαμβανόμενο φάσμα και επομένως ποια από τις ουσίες επηρεάζει περισσότερο τη μορφή του φάσματος και τη μέγιστη ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού (Heintzelman DL. et al, 2000).

Η φασματοσκοπία εκπομπής (οπτική ή φθορισμού) χρησιμοποιείται στην ποσοτική μέτρηση ουσιών. Τα άτομα προάγονται σε υψηλά ενεργειακά επίπεδα και στη συνέχεια αποδιεγείρονται στα χαμηλότερα επίπεδα με την εκπομπή του φωτός. Δεδομένου ότι οι μεταβάσεις είναι μεταξύ των ευδιάκριτων επιπέδων ατομικής ενέργειας, οι γραμμές εκπομπής στα φάσματα είναι στενές. Η μελέτη φασμάτων των υλικών με μεγάλη ποικιλία ατόμων απαιτούν φασματόμετρο υψηλής ευκρίνειας. Δεδομένου ότι όλα τα άτομα σε ένα δείγμα διεγείρονται ταυτόχρονα, μπορούν να ανιχνευθούν ταυτόχρονα, και αυτό είναι το σημαντικότερο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας φθορισμού έναντι της φασματοσκοπίας απορρόφησης.

Ένα τυπικό φθορισμόμετρο αποτελείται από την πηγή διέγερσης και ένα ανιχνευτή. Τα μόρια διεγείρονται συνήθως με το UV φως μιας λαμπράς δευτερίου ή ξένου. Το ευρυζωνικό φως διέγερσης διέρχεται από το υπό εξέταση δείγμα. Ο εκπεμπόμενος φθορισμός προσπίπτει σε ένα φωτοπολλαπλασιαστή και τέλος σε ένα μονοχρωμάτορα ή σε ένα μεταβλητό φίλτρο διέλευσης ζώνης και το εκπεμπόμενο φως διαχωρίζεται στα διάφορα μήκη κύματος.

Επιπλέον, για να γίνουν αναλυτικές μετρήσεις πρέπει το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να είναι επιλέξιμο και οι ανιχνευτές ικανοί για να το συλλέξουν. Στα απλά φθορισμόμετρα φίλτρων, τα μήκη κύματος του προσπίπτοντος και του εκπεμπόμενου φωτός επιλέγονται από τα φίλτρα τα οποία επιτρέπουν οι μετρήσεις να γίνουν σε οποιοδήποτε ζευγάρι σταθερών μηκών κύματος.

Ο φθορισμός χρησιμοποιείται στη μελέτη της δομής του DNA και των πρωτεϊνών.

Οι φθορίζοντες δείκτες απορροφώνται επιλεκτικά από τους παθολογικούς ιστούς και οι οποίοι δίνουν συγκεκριμένα φασματικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία του ιστού και εν μέρει με το βαθμό παθογένειάς του. Η ενισχυμένη φασματική αντίθεση μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού ευνοεί την ανάδειξη των ορίων της βλάβης (*Stefanaki IM. et al, 2003 και Stefanidou M. et al, 2000*).

Καταγράφοντας το φθορισμό που επάγεται η πρόσπτωση της υπεριώδους (κυρίως), ακτινοβολίας στον ιστό (ενδογενής φθορισμός), στο αντίστοιχο βάθος (επιπολής και εν τω βάθει χώρο), μπορεί κανένας να διερευνήσει τη βιοχημική κατάσταση του ιστού.

Ο φθορισμός επηρεάζεται από τη βιοχημική σύσταση του ιστού. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο παθολογικός ιστός έχει χαρακτηριστικά φθορισμού διαφοροποιημένα σε σχέση με εκείνα του φυσιολογικού (*Tang GC. et al, 1993*). Η σκέδαση που παρατηρείται στο εσωτερικό του ιστού μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στο φάσμα του λαμβανόμενου φθορισμού. Επίσης ο ιστός περιέχει και μη φθορίζουσες χρωμοφόρες, όπως η αιμοσφαιρίνη. Η απορρόφηση του εκπεμπόμενου φθορισμού των φθορίζουσών χρωμοφόρων από τις μη φθορίζουσες μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση πλασματικών μεγίστων και ελαχίστων στο φάσμα φθορισμού του ιστού (*Bijio II. et al, 1997*) και τη δυσκολία στη διαφορική διάγνωση μεταξύ φυσιολογικού και παθολογικού ιστού.

Στην προσπάθεια να εξαλειφθούν τα παραπάνω προβλήματα, έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα πολυφωτονικού φθορισμού. Αν και η διαγνωστική αξία αυτών των συστημάτων είναι σημαντική εντούτοις αποδεικνύονται πολυδάπανα και περίπλοκα στη χρήση τους.

Η εκπομπή φωτός από τα άτομα ή τα μόρια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κάποιας φθορίζουσας ουσίας σε ένα δείγμα.

Η ένταση της ακτινοβολίας φθορισμού F , σχετίζεται γραμμικά με την ισχύ της προσπίπτουσας στο υλικό, ακτινοβολίας:

$$F = K(P_0 - P)$$

όπου K : σταθερά που εξαρτάται από τη κβαντική ικανότητα της διαδικασίας φθορισμού,

P_0 : είναι η ισχύς του προσπίπτοντος φωτός

P : είναι η ισχύς του φωτός που εξέρχεται από το υλικό.

Ο συνδυασμός των εξισώσεων της απορρόφησης $A = \epsilon(\lambda) \cdot b \cdot C$ και $A = -\log(I/I_0)$ ή $A = -\log(P/P_0)$ δίνει τη σχέση:

$$P/P_0 = 10^{-\epsilon \cdot b \cdot C}$$

Η τελευταία αυτή εξίσωση μαζί με την $F = K(P_0 - P)$ δίνουν τη σχέση μεταξύ της έντασης φθορισμού και της συγκέντρωσης της ουσίας:

$$F = K \cdot P_o (1 - 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot C}) \Rightarrow F = K \cdot P_o \left[2,3 \cdot \varepsilon \cdot b \cdot C - \frac{(2,3 \cdot \varepsilon \cdot b \cdot C)^2}{2!} + \frac{(2,3 \cdot \varepsilon \cdot b \cdot C)^3}{3!} - \dots \right]$$

Στην περίπτωση χαμηλών συγκεντρώσεων (π.χ. $A = \varepsilon(\lambda) \cdot x \cdot C < 0,05$), ο πρώτος όρος της παραπάνω σχέσης γίνεται πιο σημαντικός από τους υπόλοιπους έτσι ώστε, χωρίς μεγάλο σφάλμα, να μπορεί να θεωρηθεί ότι ο εκπεμπόμενος φθορισμός F , σχετίζεται γραμμικά με τη συγκέντρωση C .

$$F = 2,3 \cdot K \cdot \varepsilon \cdot b \cdot C \cdot P_o \quad \text{ή} \quad F = K' \cdot C \cdot P_o$$

Η συσχέτιση αυτή επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των φθορίζουσών μορίων του υπό εξέταση ιστού μόνο στην περίπτωση που η συγκέντρωση των μορίων είναι σχετικά μικρή ($< 0,05$). Το βασικό πλεονέκτημα των μετρήσεων του φθορισμού σε σχέση με εκείνες τις ανάκλασης είναι η μεγαλύτερη ευαισθησία τους γιατί το σήμα φθορισμού έχει εξ' ορισμού μηδενικό υπόβαθρο (background). Ο καθορισμός των άγνωστων συγκεντρώσεων, από το ποσό φθορισμού που ένα δείγμα εκπέμπει, απαιτεί τη βαθμονόμηση του φθορισμόμετρου με ένα δείγμα βαθμονόμησης με γνωστό φθορισμό.

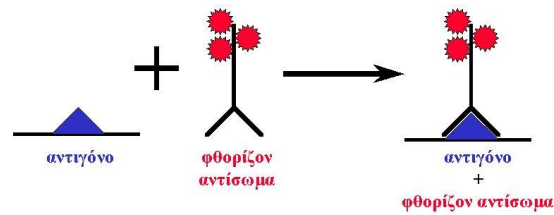
Πολλοί από τους περιορισμούς του νόμου Beer-Lambert ισχύουν και στην περίπτωση της ποσοτικής φθορισμομετρίας (π.χ. η μη γραμμικότητα στη συσχέτιση του σήματος φθορισμού με τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας για μεγάλες τιμές αυτής). Επίσης υπάρχουν και κάποιοι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αξιοπιστία των ποσοτικών μετρήσεων σχετίζονται με την αλλαγή στη θερμοκρασία και του PH, η απορρόφηση του εκπεμπόμενου φθορισμού από τα διεγερμένα μόρια κ.λ.π.

Ανοσοφθορισμός

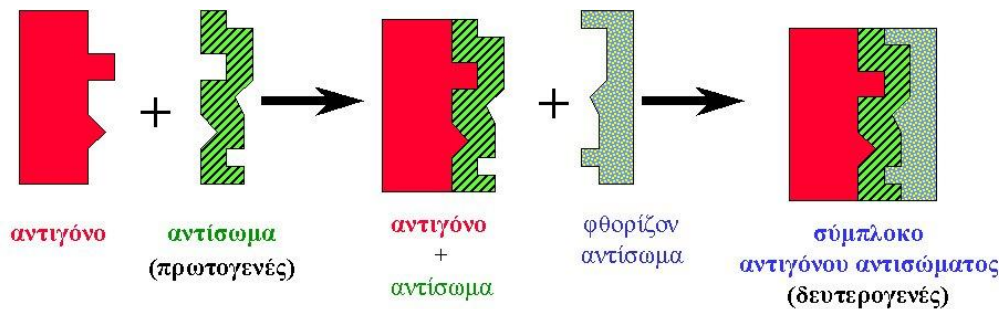
Το φαινόμενο του φθορισμού χρησιμοποιείται στη μικροσκοπία φθορισμού για τη παρατήρηση ουσιών ή κυτταρικών δομών που είτε φθορίζουν από τη φύση τους (αυτοφθορισμός) είτε γίνονται φθορίζουσες με τη χρήση χημικών ουσιών, "χρωστικών", που φθορίζουν.

Οι περισσότερες όμως ουσίες ή κυτταρικές δομές που μας ενδιαφέρουν επιστημονικά δεν εμφανίζουν το φαινόμενο του αυτοφθορισμού. Έτσι αυτές οι δομές θα πρέπει να χρωματισθούν για να εκπέμπουν σήμα φθορισμού. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων μας ενδιαφέρει ο εξειδικευμένος φθορισμός από ορισμένες μόνο περιοχές, ουσίες ή οργανίδια των ιστών.

Ο εξειδικευμένος αυτός φθορισμός μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φθοριοχρωμάτων. Ο φθορισμός που παρατηρείται στα παρασκευάσματα που έχουν χρωσθεί με φθοριοχρώματα αναφέρεται ως "δευτερογενής φθορισμός". Ο ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιεί την υψηλά ειδική δέσμευση ενός αντισώματος στο αντιγόνο του, προκειμένου να βαφτούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες ή άλλα μόρια μέσα στο κύτταρο. Γίνεται επεξεργασία του δείγματος με ένα πρωτεύον αντίσωμα ειδικό για το μόριο πρόκειται να μελετηθεί. Ένα φθοροφόρο μπορεί να συζευχθεί απ' ευθείας με το πρωτεύον αντίσωμα (εικόνα 5.1.22). Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα δευτερογενές αντίσωμα, συζευγμένο με ένα φθοροφόρο, το οποίο θα δεσμευθεί ειδικά με το πρώτο αντίσωμα, τεχνική sandwich (εικόνα 5.1.23).



Εικόνα 5.1.22: Σύνδεση αντιγόνου με φθορίζον αντίσωμα.
(<http://www.aua.gr/fasseas/optika%20mikroskopia.html>)



Εικόνα 5.1.23: Σύνδεση αντιγόνου με το αντίσωμα και στη συνέχεια με φθορίζον αντίσωμα (τεχνική sandwich).

Η χρήση των φθορίζουσών ουσιών απαιτεί τον προσεκτικό χειρισμό τους καθώς οι φθορίζουσες ουσίες μπορεί να χάσουν την ικανότητά τους να φθορίζουν λόγω της εκτεταμένης διάρκειας φωτισμού τους σε μια διαδικασία που ονομάζεται φωτοαποδόμηση. Η φωτοαποδόμηση προκαλείται από την χημική καταστροφή των φθορίζόντων μορίων κατά τη διάρκεια διέγερσης και αποδιέγερσης των ηλεκτρονίων τους. Η φωτοαποδόμηση μπορεί να περιορίσει σοβαρά το χρονικό περιθώριο μελέτης κάποιου δείγματος. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές για να περιοριστεί η φωτοαποδόμηση, όπως με τη χρήση των πιο ανθεκτικών φθοροφόρων, με την ελαχιστοποίηση της απαιτούμενης έντασης του φωτισμού, με τη χρήση χημικών φωτοπροστατευτικών καθαριστών κ.λ.π.

5.1.3.4 Φασματοσκοπία Raman

Μια από τις πιο χρήσιμες εφαρμογές της φασματοσκοπίας σκέδασης είναι η φασματοσκοπία Raman. Η φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιείται κυρίως στη μελέτη των χημικών δεσμών των μορίων αφού παρέχει πληροφορίες για τις ταλαντώσεις τους και κατ' επέκταση στην ταυτοποίηση των μορίων ενός υλικού. Στη βιολογία-ιατρική, η φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιείται για τη μελέτη της δομής βιολογικών υλικών δηλ. για τη μελέτη κυττάρων και πρωτεϊνών (Kong K., et al, 2015) κ.λ.π. Η σκέδαση Raman απαιτεί συσκευές ανίχνευσης με υψηλή ευαισθησία δεδομένου ότι το φαινόμενο είναι ασθενές.

Μια τυπική φασματοσκοπική τεχνική Raman αποτελείται από τις εξής συνιστώσες:

- Μονοχρωματική πηγή ακτινοβολίας (συνήθως Laser συνεχούς ακτινοβολίας) για την καταγραφή των κορυφών που οφείλονται στα δονητικά επίπεδα του υλικού.
- Σύστημα κατεύθυνσης, προσανατολισμού και πόλωσης της ακτινοβολίας (καθρέπτες υψηλής ανακλαστικότητας, φακοί για την εστίαση της δέσμης, πολωτές και αναλυτές για την επιλογή της

καλύτερης γεωμετρίας πόλωσης). Τα μήκη κύματος του σκεδαζόμενου φωτός που είναι κοντά στο μήκος κύματος του Laser (λόγω της σκέδασης αποκόπτονται Raleigh) αποκόπτονται.

- Ένα μονοχρωμάτορα για την ανάλυση του σκεδαζόμενου φωτός, που αποτελείται από καθρέπτες και φράγματα περίθλασης τα οποία διαχωρίζουν το σκεδαζόμενο φως σε μικρές παράλληλες δέσμες διαφορετικής ενέργειας.
- Ηλεκτρονικό σύστημα ανίχνευσης, ενίσχυσης και καταγραφής του σήματος.

Στο λαμβανόμενο φάσμα Raman παρατηρούνται συχνά μετατοπισμένα μήκη κύματος (συχνότητες), σε σχέση με το φάσμα του προσπίπτοντος φωτός, που συνδέονται με τις διαφορετικές ταλαντωτικές ή περιστροφικές κινήσεις των μορίων και του περιβάλλοντός του στο δείγμα. Η μετατόπιση αυτή της συχνότητας του φωτός, δίνεται από τη σχέση: $\Delta\nu = \nu_{\text{προσπ.}} - \nu_{\text{σκεδασ.}}$. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στο λαμβανόμενο φάσμα να εμφανιστούν μέγιστα ή ελάχιστα στις συχνότητες εκείνες που αντιστοιχούν κάποιες μεταβάσεις.

Σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία φθορισμού, τα περισσότερα βιολογικά μόρια μπορούν να μελετηθούν με φασματοσκοπία Raman και να δώσουν συγκεκριμένα φασματικά χαρακτηριστικά.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές τεχνικές σκέδασης Raman. Κάποιες από αυτές περιλαμβάνουν τη φασματοσκοπία Raman κοντινού υπέρυθρου (Near Infrared, NIR), τη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier υπέρυθρου (Fourier Transform Infrared, FT-IR) και τη φασματοσκοπία συντονισμού υπεριώδους (Ultraviolet, UV).

Στη φασματοσκοπία Raman υπέρυθρου, χρησιμοποιείται υπέρυθρο φως στην περιοχή 800-1100nm για τη διέγερση του ιστού. Το πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι η παραγωγή έστω και ελάχιστου φθορισμού ευνοεί την ανίχνευση ακόμα και ασθενούς σήματος Raman ευκολότερα. Στη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier υπέρυθρου γίνεται μετασχηματισμός Fourier του ανιχνευόμενου σήματος προκειμένου να ληφθεί το σήμα Raman. Αυτή η τεχνική οδηγεί σε ενίσχυση του σήματος σε σχέση με το θόρυβο αλλά απαιτεί σχετικά μεγάλο χρόνο συλλογής του σήματος (~30 λεπτά).

Αρκετά βιολογικά μόρια, όπως τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά μέγιστα στα φάσματα Raman τα οποία περιέχουν πληροφορία για τη δομή των μορίων και τον περιβάλλοντα χώρο στον οποίο βρίσκονται. Έτσι, οι μοριακές και κυτταρικές αλλαγές που συμβαίνουν σε παθολογικές περιπτώσεις μπορούν να επιφέρουν την εμφάνιση ευδιάκριτων φασματικών χαρακτηριστικών Raman.

5.2 Δομή του νευρικού συστήματος – Σκλήρυνση κατά πλάκας – Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)

5.2.1 Δομή του νευρικού συστήματος

Το νευρικό σύστημα αποτελεί το σύστημα που ρυθμίζει και ελέγχει τη λειτουργία όλων των οργάνων του ανθρώπινου σώματος, καθώς επίσης και τη μεταξύ τους αρμονική συνεργασία. Αποτελεί επίσης την έδρα των ψυχικών λειτουργιών και επιπλέον μέσω των αισθητήριων οργάνων (μάτι, αυτί, δέρμα, γλώσσα, μύτη) συμβάλλει στην αντίληψη του περιβάλλοντος από τον άνθρωπο.

Αποτελείται κυρίως από εξειδικευμένα κύτταρα, τους νευρώνες οι οποίοι υποδέχονται αισθητικά ερεθίσματα και τα μεταφέρουν στα εκτελεστικά όργανα, δηλαδή τους μυς και τους αδένες (Boron W. et al, 2006).

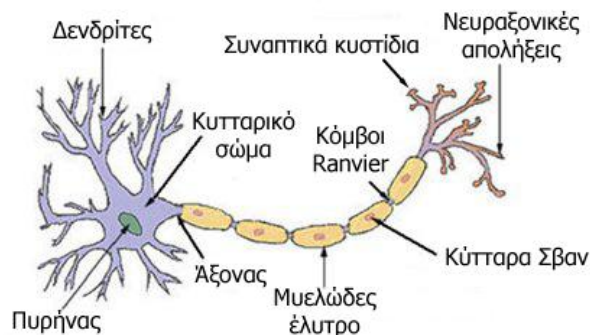
Τα κύτταρα του νευρικού συστήματος

Το νευρικό σύστημα αποτελείται από δύο κατηγορίες κυττάρων, τους νευρώνες και τα νευρογλοιακά κύτταρα.

Οι νευρώνες αποτελούνται από (εικόνα 5.2.1):

- Το Σώμα, το μεγαλύτερο κεντρικό τμήμα του κυττάρου μεταξύ των δενδριτών και του νευράξονα που περιλαμβάνει τον πυρήνα και μεγάλο αριθμό οργανιδίων.
- Το Νευράξονα, που ονομάζεται και νευρίτης ή απλά άξονας, μια λεπτή ίνα που μπορεί να είναι μέχρι και δεκάδες χιλιάδες φορές μεγαλύτερη σε μήκος από τη διάμετρο του σώματος. Αυτή η δομή μεταφέρει τα νευρικά σήματα από τον νευρώνα. Κάθε νευρώνας διαθέτει μόνο ένα άξονα, αλλά αυτός ο άξονας μπορεί να διακλαδίζεται έντονα, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η επικοινωνία με πολλά κύτταρα-στόχους. Εκεί που τελειώνει ο άξονας υπάρχουν σημαντικά στοιχεία τα τελικά κομβία που χρειάζονται για την μεταφορά των πληροφοριών προς άλλους δενδρίτες άλλων νευρώνων.
- Τους δενδρίτες, σχετικά κοντές διακλαδιζόμενες κυτταρικές προεξοχές ή αποφυάδες. Ο κάθε νευρώνας έχει πολλούς δενδρίτες με πολλές διακλαδώσεις. Αυτές οι δομές αποτελούν το δίκτυο με το οποίο ο νευρώνας προσλαμβάνει σήματα από άλλα κύτταρα. Τα κύματα αυτά φτάνουν στους δενδρίτες του κάθε νευρικού κυττάρου από νευρίτες (έναν ή περισσότερους) άλλων νευρικών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό συνδέονται, διακλαδίζονται και συνεργάζονται μεταξύ τους τα νευρικά κύτταρα, κατά ομάδες, για να επιτελέσουν το σκοπό για τον οποίο κατασκευάστηκαν, τη διάδοση των ερεθισμάτων από την περιφέρεια προς το κέντρο (εγκέφαλο) και το αντίστροφο.

Οι νευρώνες διαθέτουν δύο σημαντικές ιδιότητες, την αγωγιμότητα και την διεγερσιμότητα. Μεταδίδουν το ερέθισμα με την μορφή ηλεκτρικών παλμών. Τόσο ο νευράξονας όσο και οι δενδρίτες έχουν τυπικό μέγεθος γύρω στο 1μm, ενώ το Σώμα είναι γύρω στα 25μm, όχι πολύ μεγαλύτερο από τον πυρήνα που περιέχει. Ο νευράξονας ενός κινητικού νευρώνα μπορεί να είναι μεγαλύτερος από 1 μέτρο σε μήκος, συνδέοντας, για παράδειγμα, τη βάση της σπονδυλικής στήλης με τα δάχτυλα των ποδιών (Boron W. et al, 2006).



Εικόνα 5.2.1: Σχηματικό διάγραμμα ενός τυπικού νευρώνα

Οι άξονες των κυττάρων του περιφερειακού νευρικού συστήματος καλύπτονται από ένα μυελώδες έλυτρο, προστατευτικό περίβλημα, που σχηματίζεται από μια μεγάλη αλυσίδα κυττάρων Σβαν (*Schwann*): το σύστημα αυτό διασφαλίζει την διάδοση των ηλεκτρικών παλμών (*Spike*) κατά μήκος του άξονα.

Ο άξονας του νευρώνα συνήθως περιέχει μία χαρακτηριστική ουσία, τη μυελίνη, η οποία καθορίζει και την αγωγιμότητά του. Η μυελίνη παίζει ρόλο μονωτή αποτρέποντας την διαρροή ιόντων στην μεμβράνη του άξονα. Η αλλοίωση της μυελίνης, παρούσα στους νευράξονες, εξαιτίας εσφαλμένης λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, προκαλεί πολλαπλή σκλήρυνση, που οδηγεί στη σταδιακή απώλεια του μυϊκού ελέγχου, της εγκεφαλικής λειτουργίας και της ικανότητας μετάδοσης των μηνυμάτων.

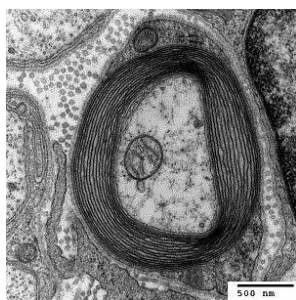
Υπάρχουν και σημεία που ο νευροάξονας εμφανίζεται γυμνός και αυτά ονομάζονται κόμβοι Ρανβιέ. Χαρακτηριστικό των νευρώνων είναι η μεγάλη ασυμμετρία στο σχήμα. Οι νευρώνες κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον αριθμό των αποφυάδων τους και ανάλογα με την λειτουργία τους. Έτσι διακρίνονται σε μονοπολικούς, πολυπολικούς, αισθητικούς, κινητικούς, συνδετικούς.

Τα νευρογλοιακά κύτταρα έχουν υποστηρικτικό ρόλο και βοηθούν στην διατήρηση του περιβάλλοντος των νευρώνων.

Μυελίνη

Η μυελίνη είναι η λευκή λιποειδής ουσία που περιβάλλει το νευράξονα των εμμύλων νευρικών ιών και που αποτελεί το μονωτικό και προστατευτικό περίβλημα τους. Η παρουσία της βελτιώνει την αποδοτικότητα με την οποία οι άξονες άγουν τα δυναμικά ενέργειας, ειδικά στις μεγάλες αποστάσεις που τα νεύρα διασχίζουν, μεταξύ του εγκεφάλου και των άκρων. Οι άξονες των νευρώνων που καλύπτονται από μυελίνη ονομάζονται "εμμύλοι", ενώ αυτοί οι οποίοι δεν περιβάλλονται από αυτήν την ουσία ονομάζονται "αμύελοι". Οι άξονες εγκλείονται κυριολεκτικά στη μυελίνη, η οποία αποτελείται από ομόκεντρες περιελίξεις των μεμβρανών των κυττάρων της γλοίας (εικόνα 5.2.2). Στα περιφερικά εμμύελα νεύρα, η "θήκη" της μυελίνης διακόπτεται κατά τακτά διαστήματα, σχηματίζοντας κοντές μη καλυμμένες περιοχές, που αποκαλούνται κόμβοι του Ranvier. Αυτή η μοναδική ανατομία των εμμύλων νευραξόνων έχει ως αποτέλεσμα έναν τρόπο

διάδοσης της ώσης γνωστό ως "αγωγή με άλμα" (Boron W. et al, 2006) .



Εικόνα 5.2.2: Μικρογράφημα ηλεκτρονίων μετάδοσης ενός νευρίτη μυελίνης.
(Electron Microscopy Facility at Trinity College, Hartford, CT).

Η παθολογική κατάσταση κατά την οποία οι νευράξονες χάνουν το έλυτρο μυελίνης που τους περιβάλλει (η λεγόμενη απομυελίνωση), ονομάζεται πολλαπλή σκλήρυνση (ή σκλήρυνση κατά πλάκας).

5.2.2 Σκλήρυνση κατά πλάκας, ΣκΠ

Η πολλαπλή σκλήρυνση ή σκλήρυνση κατά πλάκας ΣκΠ (*Multiple Sclerosis, MS*), είναι μία από τις πιο κοινές ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ, εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός). Η ΣκΠ είναι μια χρόνια νευρολογική, αυτοάνοση ασθένεια στην οποία το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα προκαλώντας μία φλεγμονώδη απομυελινωτική κατάσταση.

Η μυελίνη είναι ένα παχύ υλικό το οποίο περιβάλλει, μονώνει τα νεύρα, και λειτουργεί ως κάλυμμα των αξόνων του συμβάλλοντας στην προστασία των νευρών καθώς και στη μετάδοση των νευρικών ώσεων. Καθορίζει την ταχύτητα και την ποιότητα με την οποία αυτά τα ερεθίσματα συνδέονται, και επιτρέπουν την εφαρμογή ομαλών, γρήγορων και συντονισμένων κινήσεων με μικρή συνειδητή προσπάθεια. Στην ΣκΠ, η έλλειψη μυελίνης (απομυελίνωση) συνοδεύεται από την ελάττωση της ικανότητας των νευρικών ινών να συνδέουν τα ερεθίσματα από και προς τον εγκέφαλο, και αυτό είναι ο λόγος που υπάρχουν τα ποικίλα συμπτώματα στην ΣκΠ. Η πολλαπλή σκλήρυνση μπορεί να προκαλέσει μια ποικιλία συμπτωμάτων όπως, αλλαγές στην αφή, προβλήματα στην όραση, μυϊκή ατροφία, κατάθλιψη, προβλήματα στον προσανατολισμό και την ομιλία, εξάντληση, νοητική βλάβη, προβλήματα με την ισορροπία και πόνο. Η πολλαπλή σκλήρυνση θα προκαλέσει και αναπηρία σε πολύ σοβαρές περιπτώσεις. Τα σημεία στα οποία έχει χαθεί η μυελίνη (πλάκες ή ελλείψεις) εμφανίζονται ως προσβεβλημένες (ουλές) περιοχές. Στη ΣκΠ αυτές οι ουλές εμφανίζονται σε διαφορετικές στιγμές και περιοχές του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού. Ο όρος Σκλήρυνση κατά Πλάκας σημαίνει πολλαπλές ουλές.

Η κυρίαρχη θεωρία είναι πως η πολλαπλή σκλήρυνση προκαλείται από επιθέσεις του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς στο ΚΝΣ και έτσι η ασθένεια εντάσσεται στην κατηγορία των αυτοάνοσων. Παρ' όλο που είναι γνωστή η περιοχή των ιστών που επηρεάζεται από την πολλαπλή σκλήρυνση, το ακριβές αίτιο της παθογένειας παραμένει άγνωστο.

Η πολλαπλή σκλήρυνση μάλλον συμβαίνει ως αποτέλεσμα συνδυασμού περιβαλλοντολογικών (π.χ. μόλυνση από κάποιον ιό, έλλειψη βιταμίνης D κ.λ.π.) και γενετικών παραγόντων (η πολλαπλή σκλήρυνση ίσως σχετίζεται με μια περιοχή στο χρωμόσωμα 5 καθώς και στα χρωμοσώματα 2, 3, 7, 11, 17, 19, και X).

5.2.3 Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE)

Η Πειραματική Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE), που ονομάζεται επίσης Πειραματική Αλλεργική Εγκεφαλομυελίτιδα, είναι μια οξεία ή χρόνια-υποτροπιάζουσα επίκτητη φλεγμονώδης απομυελινωτική και αυτοάνοση νόσος. Λόγω της ομοιότητας της παθολογίας της EAE με εκείνη της σκλήρυνσης κατά πλάκας σε ανθρώπους, η EAE χρησιμοποιείται ως ένα ζωικό μοντέλο για τη μελέτη αυτής της κατάστασης. Η EAE δεν είναι η σκλήρυνση κατά πλάκας, ούτε είναι μια απλή ασθένεια με ένα μόνο είδος, αλλά οι διαφορετικές μορφές της μοιάζουν πολύ με τις διάφορες μορφές και τα στάδια της MS.

Για την επαγωγή της EAE χορηγείται στα ζώα το σύνολο ή μέρη των διαφόρων πρωτεϊνών που συνθέτουν τη μυελίνη, το μονωτικό περίβλημα που περιβάλλει τα νευρικά κύτταρα (νευρώνες). Μερικές από τις πρωτεΐνες ή τμήματα πρωτεϊνών (αντιγόνων) που χρησιμοποιούνται για την επαγωγή της EAE είναι οι εξής: Βασική Πρωτεΐνη της Μυελίνης (Myelin Basic Protein, MBP), πρωτεΐνη πρωτεολιπιδίου (Proteolipid Protein, PLP), και ολιγοδενδροκυττάρικη μυελίνη της γλυκοπρωτεΐνης (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, MOG).

Αυτές οι πρωτεΐνες επάγουν μία αυτοάνοση απόκριση στα ζώα – δηλ. το ανοσοποιητικό σύστημα του ζώου επιτίθεται στη δική του μυελίνη ως αποτέλεσμα της έκθεσης στην ένεση. Τα ζώα αναπτύσσουν μια διαδικασία ασθένειας που μοιάζει πολύ με τη σκλήρυνση κατά πλάκας (Multiple Sclerosis, MS) σε ανθρώπους

Η EAE έχει προκληθεί σε έναν αριθμό διαφορετικών ειδών ζώων που περιλαμβάνουν ποντικούς, αρουραίους, ινδικά χοιρίδια, κουνέλια, πιθήκους κ.λ.π. Για διάφορους λόγους, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ανοσολογικών μέσων, τη διαθεσιμότητα, τη διάρκεια ζωής, τη γονιμότητα των ζώων και την ομοιότητα της επαγόμενης νόσου με την MS, τα ποντίκια και οι αρουραίοι είναι τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα είδη. Όπως συμβαίνει με τον άνθρωπο και την MS, δεν έχουν όλα τα ποντίκια ή οι αρουραίοι μια φυσική τάση να εκδηλώσουν την EAE. Επιπλέον, διαφορετικές φυλές θα αναπτύξουν διάφορες μορφές της EAE, μερικές από τις οποίες θα αποτελέσουν αποτελεσματικά μοντέλα για τις διάφορες ανθρώπινες μορφές της MS. Οι διάφορες μορφές EAE χρησιμοποιούνται επίσης ως μοντέλα για τα διάφορα στάδια της σκλήρυνσης κατά πλάκας.

Η έρευνα που βασίζεται πάνω στην EAE συνδυάζει μια σειρά από πλεονεκτήματα:

- Επειδή η EAE είναι μια ασθένεια των ζώων επιτρέπει στους ερευνητές (ιδιαίτερα στους

ανοσολόγους) να μελετήσουν την απομυελίνωση (η διαδικασία στηρίζεται στα συμπτώματα της σκλήρυνσης κατά πλάκας), με τρόπους που δεν θα ήταν ηθικά αποδεκτοί σε μελέτες της σκλήρυνσης κατά πλάκας σε ανθρώπους.

- Επιτρέπει στους ερευνητές να δοκιμάσουν πιθανές θεραπείες για τη σκλήρυνση κατά πλάκας ως προς την αποτελεσματικότητα και την ασφάλειά τους χωρίς να θέτουν τις ζωές των ανθρώπων σε κίνδυνο.

- Επιτρέπει στους ερευνητές να πειραματιστούν με διαφορετικούς τρόπους για την πρόκληση της ΕΑΕ προκειμένου να διερευνηθούν οι πιθανές αιτίες πρόκλησης της νόσου.

- Επειδή οι χρόνοι παραγωγής γενεών στα περισσότερα ζωικά είδη είναι μικροί, και επειδή αναπαράγονται πολύ γρήγορα, μπορούν να ληφθούν μεγάλοι πληθυσμοί αυτών των ζώων σε σύντομο χρονικό διάστημα.

5.3 Διαγνωστικές μέθοδοι για τη Σκλήρυνση κατά πλάκας

5.3.1 Τρέχουσες διαγνωστικές μέθοδοι

A) *in-vivo*

Η σκλήρυνση κατά πλάκας (Multiple sclerosis, MS) είναι μια αυτοάνοση ασθένεια που εξασθενίζει τη νευροδιαβίβαση του ΚΝΣ. Τα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου είναι η εστιακή και έντονη απομυελίνωση και η διήθηση της λευκής ουσίας από λεμφοκύτταρα και μονοπύρηνια κύτταρα (McGregor JE. *et al*, 2010). Οι μελέτες για τη ΣκΠ απαιτούν ευαίσθητες και αξιόπιστες απεικονιστικές μεθόδους για τη διερεύνηση των συγκεκριμένων παθολογικών αλλαγών της λευκής ουσίας κατά τη διάρκεια εξέλιξης της νόσου.

Η διάγνωση για την πολλαπλή σκλήρυνση είναι δύσκολη. Ουσιαστικά, σίγουρη διάγνωση μπορεί να γίνει μόνο όταν υπάρχουν αποδείξεις για τουλάχιστον δύο ανατομικά ξεχωριστά απομυελινωτικά γεγονότα που συμβαίνουν τουλάχιστον 30 ημέρες ξεχωριστά.

Η κλινική εικόνα του ασθενούς πολλές φορές αρκεί για να διαγνωστεί η πολλαπλή σκλήρυνση. Εάν ένα άτομο έχει υποστεί δύο ξεχωριστά επεισόδια νευρολογικών συμπτωμάτων ίδιων με αυτών που υπάρχουν στην πολλαπλή σκλήρυνση και το άτομο έχει συνεχείς ανωμαλίες στις ιατρικές του εξετάσεις, η διάγνωση για πολλαπλή σκλήρυνση μπορεί να γίνει χωρίς περαιτέρω εξετάσεις.

Η μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging, MRI) είναι σήμερα η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τη διάγνωση της ΣκΠ. Η μαγνητική τομογραφία είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην ανάδειξη απομυελινωτικών εστιών. Η μαγνητική τομογραφία δίνει πολύ λεπτομερείς εικόνες 'τομών' του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού, δείχνοντας περιοχές σκλήρυνσης (ελλείμματα ή πλάκες). Η μαγνητική τομογραφία δείχνει το μέγεθος, την ποσότητα και την κατανομή των ελλειμμάτων και, μαζί με τα πορίσματα από το ιατρικό ιστορικό και την νευρολογική εξέταση, είναι πολύ σημαντικός δείκτης για την επιβεβαίωση της διάγνωσης για ΣκΠ. Το μειονέκτημα της τεχνικής είναι ότι μπορεί να μην εντοπιστούν όλα τα ελλείμματα, ειδικά στα αρχικά στάδια της νόσου.

Η λήψη εγκεφαλονωτιαίου υγρού μπορεί να συνεισφέρει στον καλύτερο χαρακτηρισμό της νόσου. Το εγκεφαλονωτιαίο υγρό συλλέγεται μετά με οσφυονωτιαία παρακέντηση. Το υγρό λαμβάνεται από την σπονδυλική στήλη και για την ΣκΠ εξετάζονται οι πρωτεΐνες. Στην πλειοψηφία των ατόμων (90%), η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών του εγκεφαλονωτιαίου υγρού με προχωρημένη ΣκΠ είναι παθολογική, και αυτή η εξέταση μπορεί να επιβεβαιώσει τη διάγνωση της ΣκΠ. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες του εγκεφαλονωτιαίου υγρού ατόμων με αρχική ή ήπια ΣκΠ δεν έχουν επηρεαστεί, έτσι ξανά μπορεί να μην είναι ξεκάθαρο το αποτέλεσμα. Συνήθως χρησιμοποιείται όταν τα αποτελέσματα της μαγνητικής τομογραφίας δεν είναι σαφή.

Κατά την τελευταία δεκαετία, έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για να βελτιωθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα στην ανίχνευση των αλλοιώσεων της ΣκΠ. Αυτές οι πρόσθετες τεχνικές NMR - συμπεριλαμβανομένων της φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού (magnetic resonance spectroscopy, MRS), της

μαγνητικής απεικόνισης μεταφοράς (magnetization transfer imaging, MTI), μαγνητικής τομογραφίας διάχυσης και απεικόνισης διάχυσης τανυστή (diffusion weighted and diffusion tensor imaging, DWI και DTI) και της μαγνητικής τομογραφίας συνάρτησης (functional MRI, fMRI) - μας βοήθησαν να κατανοήσουμε καλύτερα τις παθολογικές διεργασίες εντός και εκτός των αλλοιώσεων.

B) ex-vivo

Τα ζωντανά κύτταρα γενικά στερούνται επαρκούς αντίθεσης προκειμένου να μελετηθούν με επιτυχία, δεδομένου ότι οι εσωτερικές δομές του κυττάρου είναι άχρωμες και διαφανείς. Ο πιο κοινός τρόπος για να αυξηθεί η αντίθεση είναι να βαφτούν οι διαφορετικές δομές με επιλεκτικές χρώσεις, αλλά αυτό συνεπάγεται συχνά τη θανάτωση και την σταθεροποίηση του δείγματος. Η χρώση μπορεί επίσης να εισάγει σφάλματα, δηλ. λαμβανόμενο σήμα που προέρχεται από δομικά στοιχεία που προέκυψαν από την επεξεργασία του δείγματος και επομένως δεν αποτελούν θεμιτό στοιχείο του δείγματος.

Μια συνήθης χρώση που χρησιμοποιείται στο οπτικό μικροσκόπιο για την παρατήρηση της μυελίνης είναι το Luxol fast blue (LFB). Το LFB είναι μια φθαλοκυανίνη χαλκού χρωστική ουσία που είναι διαλυτή στην αλκοόλη και έλκεται από βάσεις που βρίσκονται στις λιποπρωτεΐνες του ελύτρου μυελίνης (*Jocelyn BG, 2013 και Humphrey AP. et al, 2013*). Μετά τη χρώση, οι ίνες της μυελίνης εμφανίζονται μπλε, τα νευροπιλήματα εμφανίζονται ροζ, και τα νευρικά κύτταρα εμφανίζονται μοβ. Τα τμήματα των ιστών εμποτίζονται επί παρατεταμένο χρονικό διάστημα (συνήθως όλη τη νύχτα) και στην συνέχεια διαφοροποιούνται με ένα διάλυμα ανθρακικού λιθίου (*Humphrey AP. et al, 2013*). Το LFB χρησιμοποιείται συνήθως στην ανίχνευση της απομυελίνωσης στο ΚΝΣ αλλά δεν μπορεί να διακρίνει τη μυελίνωση στο περιφερικό νευρικό σύστημα (*Oh SJ, 2013*).

Επίσης το ρόλο του δείκτη απομυελίνωσης μπορεί να παίζει η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (Myelin basic protein, MBP) που είναι μια πρωτεΐνη που πιστεύεται ότι είναι σημαντική στη διαδικασία της μυελίνωσης των νευρών στο νευρικό σύστημα. Το έλυτρο της μυελίνης είναι μια πολυεπίπεδη μεμβράνη, μοναδική για το νευρικό σύστημα, που λειτουργεί ως μονωτής για να αυξήσει σημαντικά την ταχύτητα της αγωγιμότητας αξονικής ώσης (*Sakamoto Y. et al, 1987*). Η MBP διατηρεί τη σωστή δομή της μυελίνης αλληλεπιδρώντας με τα λιπίδια της μεμβράνης της μυελίνης (*Deber CM. et al, 1991 και Inouye H. et al, 1991*).

Το ενδιαφέρον για την MBP έχει επικεντρωθεί στο ρόλο της σε απομυελινωτικές ασθένειες, ειδικότερα, στη σκλήρυνση κατά πλάκας (MS). Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει το βασικό ρόλο των αντισωμάτων κατά της MBP στην παθογένεση της σκλήρυνσης κατά πλάκας (*Berger T. et al, 2003*).

Το DAPI είναι μία φθορίζουσα πυρηνική χρώση, που όταν διεγείρεται με υπεριώδες φως εκπέμπει έντονο μπλε φθορισμό όταν δεσμεύεται στο DNA. Το DAPI ενώνεται με τις αζωτούχες βάσεις A=T των χρωμοσωμάτων. Το DAPI δεν είναι ορατό με την κλασική μικροσκοπία διέλευσης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ζώντα ή σταθεροποιημένα κύτταρα ενώ η χρώση των κυττάρων με αυτό επιτρέπει την εύκολη και αποτελεσματική καταμέτρησή τους (*Levenfus I, 2011*).

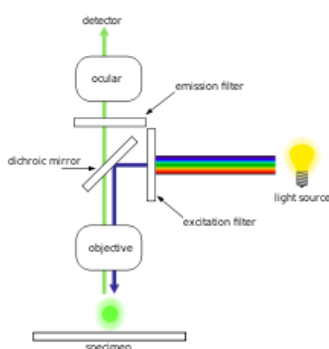
5.3.2 Μικροσκοπία φθορισμού

Όλες οι μέθοδοι μικροσκοπίας φθορισμού βασίζονται την ίδια αρχή. Το δείγμα φωτίζεται με φως συγκεκριμένου μήκους κύματος το οποίο απορροφάται από μία φθορίζουσα ουσία η οποία εκπέμπει φως σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από το φως που απορρόφησε. Προκειμένου ένα δείγμα να είναι κατάλληλο για τη μικροσκοπία φθορισμού πρέπει να είναι φθορίζον. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη δημιουργία ενός φθορίζοντος δείγματος: οι κύριες τεχνικές είναι η χρώση με φθορίζουσες ουσίες ή στην περίπτωση των βιολογικών δειγμάτων, η διέγερση μιας φθορίζουσας πρωτεΐνης. Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο εγγενής φθορισμός ενός δείγματος δηλαδή ο αυτοφθορισμός. Η μικροσκοπία φθορισμού είναι ένα ισχυρό εργαλείο που επιτρέπει την ειδική και ευαίσθητη χρώση ενός δείγματος προκειμένου να ανιχνευθεί η κατανομή των πρωτεϊνών ή άλλων μορίων.

Το φως του φθορισμού συλλέγεται στη συνέχεια από το φακό του μικροσκοπίου. Σε αυτήν την τεχνική χρησιμοποιούνται συνήθως δύο φίλτρα: ένα φίλτρο για το προσπίπτον φως στο δείγμα που εξασφαλίζει τον επιθυμητό «μονοχρωματικό» φωτισμό του, και ένα δεύτερο φίλτρο που κόβει όποια πιθανή συνιστώσα της διεγείρουσας ακτινοβολίας να φθάσει στον ανιχνευτή. Αυτές οι λειτουργίες μπορούν να επιτευχθούν ταυτόχρονα με ένα μόνο διχρωματικό φίλτρο. Η μικροσκοπία φθορισμού βασίζεται σε μια ριζικά διαφορετική προσέγγιση για τη δημιουργία εικόνας σε σύγκριση με τις τεχνικές διέλευσης ή ανακλώμενου φωτός (όπως για παράδειγμα η phase contrast και η differential interference contrast μικροσκοπία). Αυτές οι δύο αντικρουόμενες οπτικές μέθοδοι μικροσκοπίας δίνουν πολύ διαφορετικά αλλά συμπληρωματικά στοιχεία.

Το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ένα οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιεί το φθορισμό και το φωσφορισμό, αντί, ή επιπροσθέτως με την ανάκλαση και την απορρόφηση, για τη μελέτη των ιδιοτήτων των υλικών. Ο όρος «μικροσκόπιο φθορισμού» αναφέρεται σε οποιοδήποτε μικροσκόπιο χρησιμοποιεί φθορισμό για να δημιουργήσει μια εικόνα, είτε πρόκειται για μια απλή διάταξη όπως το μικροσκόπιο του επιφθορισμού (epifluorescence) ή για μια πιο πολύπλοκη διάταξη, όπως ένα συνεστιακό μικροσκόπιο, το οποίο χρησιμοποιεί οπτικές τομές για να ληφθεί καλύτερη ανάλυση της εικόνας του φθορισμού.

Τυπικά συστατικά ενός μικροσκοπίου φθορισμού είναι η πηγή, το φίλτρο διέγερσης, ο διχρωϊκός καθρέφτης (ή διχρωϊκός διαχωριστής δέσμης), και το φίλτρο εκπομπής (εικόνα 5.3.1).



Εικόνα 5.3.1: Σχηματική αναπαράσταση ενός μικροσκοπίου επιφθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού απαιτεί δυνατό και σχεδόν μονοχρωματικό φωτισμό που δεν μπορούν να προσφέρουν κάποιες πηγές φωτός ευρέως φάσματος, όπως είναι οι λάμπες αλογόνου. Χρησιμοποιούνται τρεις βασικοί τύποι πηγής διέγερσης όπως η λάμπα ξένου ή η λάμπα ατμών

υδραργύρου με φίλτρο διέγερσης, τα λέιζερ καθώς και τα LED υψηλής ισχύος. Τα λέιζερ χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε πιο σύνθετες τεχνικές από την απλή μικροσκοπία φθορισμού όπως στην συνεστιακή μικροσκοπία και στη μικροσκοπία φθορισμού με ολική εσωτερική ανάκλαση, ενώ οι λαμπτήρες ξένου και υδραργύρου με φίλτρο διέγερσης ή τα LED χρησιμοποιούνται συνήθως στη μικροσκοπία επιφθορισμού ευρέως πεδίου.

Τα φίλτρα και τα διχροϊκά οπτικά επιλέγονται για να ταιριάζουν με τα φασματικά χαρακτηριστικά της διέγερσης και της εκπομπής της φθορίζουσας ουσίας που χρησιμοποιείται για την μελέτη του δείγματος. Με τον τρόπο αυτό απεικονίζεται μία μόνο φθορίζουσα ουσία κάθε φορά. Οι έγχρωμες εικόνες από διάφορους τύπους φθορίζουσών ουσιών προκύπτουν από το συνδυασμό διαφόρων μονόχρωμων εικόνων.

Σε αντίθεση με τη μικροσκοπία ανάκλασης ή διέλευσης φωτός, η μικροσκοπία του φθορισμού επιτρέπει την παρατήρηση μόνο συγκεκριμένων δομών που έχουν επισημανθεί δια φθορισμού. Για παράδειγμα, παρατηρώντας με το μικροσκόπιο φθορισμού ένα δείγμα ιστού που παρασκευάζεται με χρήση φθορίζουσας χρωστικής του DNA αποκαλύπτεται μόνο η οργάνωση του DNA μέσα στα κύτταρο και δεν αποκαλύπτεται τίποτα άλλο σχετικά με τη μορφολογία του κυττάρου.

Μερικά από τα πλεονεκτήματα της παρατήρησης ή διάγνωσης με μικροσκόπιο φθορισμού είναι:

1. *Ευαισθησία.* Απαιτείται πολύ μικρή συγκέντρωση του φθοριοχρώματος (αραίωση 1/10.000 - 1/100.000) με αποτέλεσμα την προστασία του παρασκευάσματος από τεχνητές αλλοιώσεις (artefacts), κάτι ιδιαίτερα σημαντικό σε ανοσοβιολογικές τεχνικές όπου οι διάφορες χημικές ουσίες μπορεί να επηρεάσουν την αντιγονικότητα του αντιορού.

2. *Εξειδίκευση.* Οι σύγχρονες μέθοδοι προετοιμασίας παρασκευασμάτων, τα νέα φθοριοχρώματα και τα φίλτρα δίνουν ένα μεγάλο βαθμό εξειδίκευσης με αποτέλεσμα η τεχνική να είναι πολύ αξιόπιστη.

3. *Ταχύτητα και ευκολία.* Τα παρασκευάσματα μπορούν να παρατηρηθούν χωρίς σχεδόν καμία προετοιμασία.

4. Οι ίδιες τεχνικές μπορούν να εφαρμοστούν σε όλους τους κλάδους της βιοϊατρικής όπως είναι η ιολογία, μυκητολογία, κυτταρολογία, ανοσοβιολογία, παρασιτολογία κλπ.

5. *Αξιοπιστία* Η μέθοδος είναι πολύ αξιόπιστη λόγω της ευαισθησίας και της εξειδίκευσης των φθοριοχρωμάτων με αποτέλεσμα την ελάττωση των λανθασμένων διαγνώσεων ακόμα και από προσωπικό που δεν έχει μεγάλη εμπειρία.

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η βασική σχεδίαση ενός οπτικού μικροσκοπίου είναι η ίδια για όλα τα οπτικά μικροσκόπια που περιγράφηκαν. Έτσι είναι δυνατόν σε ένα όργανο να υπάρχουν όλοι οι τύποι μικροσκοπίας που αναφέρονται πιο πάνω. Η μετατροπή από τον ένα τύπο στον άλλο είναι συνήθως πολύ εύκολη και γίνεται με την αντικατάσταση ορισμένων φακών.

Οι τύποι των μικροσκοπίων φθορισμού που χαίρουν ευρείας χρήσης είναι ο τύπος του μικροσκοπίου ευρέως πεδίου και του συνεστιακού μικροσκοπίου.

Μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου

Από πλευράς κατασκευής το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ένα κοινό μικροσκόπιο στο οποίο όμως το υπό εξέταση δείγμα μπορεί να φωτιστεί τόσο με ορατή όσο και με υπεριώδη ακτινοβολία. Σε ένα συμβατικό (δηλαδή, ευρέως πεδίου) μικροσκόπιο φθορισμού, ολόκληρο το δείγμα φωτίζεται ομοιόμορφα από μια πηγή φωτός. Όλα τα σημεία του δείγματος που βρίσκονται στην πορεία του φωτός διεγείρονται ταυτόχρονα και ο προκύπτον φθορισμός που ανιχνεύεται από τον φωτοανιχνευτή

του μικροσκοπίου μπορεί να περιλαμβάνει ένα μεγάλο μέρος μη εστιασμένου φωτός από το φόντο. Οι φακοί των μικροσκοπίων αυτών είναι ειδικής κατασκευής, από γυαλί που δεν εμφανίζει "αυτοφθορισμό". Ανάλογα με την τοποθέτηση της πηγής του φωτός τα μικροσκόπια φθορισμού διακρίνονται σε δυο τύπους: α. το μικροσκόπιο φθορισμού διέλευσης (transmitted light fluorescence), και β. το μικροσκόπιο επιφθορισμού (epi-fluorescence).

Ο συνηθέστερος τύπος μικροσκοπίου φθορισμού που χρησιμοποιείται είναι το μικροσκόπιο του επιφθορισμού (δηλαδή η διέγερση και η παρατήρηση του φθορισμού γίνεται από την επάνω πλευρά του δείγματος).

Αυτό το μικροσκόπιο έχει γίνει ένα σημαντικό μέρος του τομέα της βιολογίας, και ανοίγει το δρόμο για πιο προηγμένους τύπους μικροσκοπίων, όπως το συνεστιακό μικροσκόπιο και το μικροσκόπιο φθορισμού ολικής εσωτερικής ανάκλασης (total internal reflection fluorescence microscope, TIRF). Το μικροσκόπιο του επιφθορισμού είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τους πιο κάτω λόγους:

α. Ο αντικειμενικός φακός λειτουργεί και σαν συμπυκνωτής με αποτέλεσμα να μη χρειάζεται ρύθμιση.

β. Στο μικροσκόπιο φθορισμού διελεύσεως, ο φθορισμός παράγεται στα χαμηλότερα τμήματα του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα κατά τη διέλευση της ακτινοβολίας μέσα από το παρασκεύασμα αυτή να διαχέεται. Έτσι με αυτό το μικροσκόπιο μπορούμε να παρατηρήσουμε δείγματα με μικρό μόνο σχετικά πάχος. Αντίθετα στο μικροσκόπιο του επιφθορισμού επειδή και ο φωτισμός και η παρατήρηση γίνονται από την ίδια πλευρά του παρασκευάσματος, η εικόνα του φθορισμού είναι πολύ πιο φωτεινή, με λιγότερο θόρυβο και κατά συνέπεια με καλύτερη ποιότητα.

γ. Στο μικροσκόπιο του επιφθορισμού η προσπίπτουσα ακτινοβολία και η ακτινοβολία από φθορισμό δε συγχέονται. Η πρώτη οδεύει μέσα από το παρασκεύασμα προς τα κάτω και χάνεται, με αποτέλεσμα να μην επηρεάζει την εικόνα του φθορισμού.

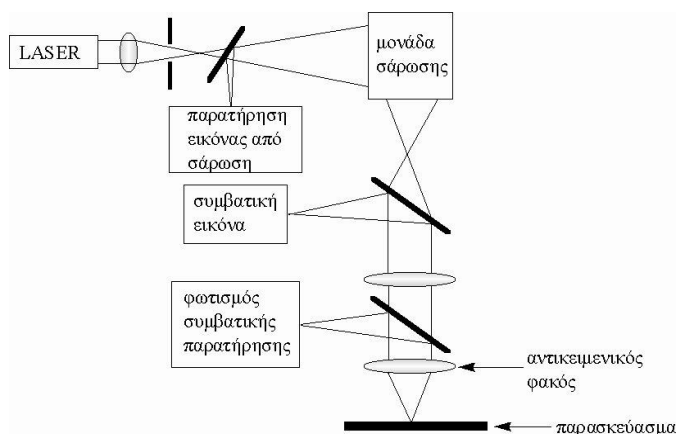
Συνεστιακό μικροσκόπιο

Το συνεστιακό μικροσκόπιο μπορεί να θεωρηθεί μια εξελιγμένη μορφή μικροσκοπίου φθορισμού. Η συνεστιακή απεικόνιση έχει ως στόχο να υπερβεί τους περιορισμούς των παραδοσιακών μικροσκοπίων φθορισμού ευρέως πεδίου.

Η συνεστιακή μικροσκοπία είναι μια τεχνική οπτικής απεικόνισης που χρησιμοποιείται για να αυξήσει την οπτική ανάλυση και την αντίθεση μιας εικόνας χρησιμοποιώντας σημειακό φωτισμό και μία χωρική οπή (spatial pinhole) για την εξάλειψη του φωτός εκτός εστίας, σε δείγματα που είναι παχύτερα από το εστιακό επίπεδο. Αντίθετα με τον κλασικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που γίνεται στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι και ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος, που μπορεί να είναι μικρότερο από 10μm, στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτή φακού για την εξάλειψη του εκτός της εστίας σήματος (εικόνα 5.3.2). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αυτού του τύπου η μικροσκοπία σε συνδυασμό με το φθορισμό. Είναι γνωστό ότι είναι αδύνατον να παρατηρηθούν φθορίζοντα παρασκευάσματα πάχους μεγαλύτερου των 10μm λόγω του δυνατού θορύβου από τα εκτός εστίας σημεία του παρασκευάσματος. Δεδομένου του ότι μόνο το φως που παράγεται από φθορισμό πολύ κοντά στο εστιακό επίπεδο μπορεί να ανιχνευθεί, η οπτική ανάλυση και η αντίθεση (contrast) της εικόνας ενισχύεται και ιδιαίτερα στην κατεύθυνση βάθους του δείγματος είναι πολύ

καλύτερη από εκείνη των μικροσκοπίων ευρέως πεδίου. Επειδή μόνο ένα σημείο στο δείγμα φωτίζεται κάθε φορά, η δισδιάστατη ή η τρισδιάστατη απεικόνιση απαιτεί σάρωση του δείγματος. Με τον τρόπο αυτό ανακατασκευάζονται οι τρισδιάστατες δομές από τις λαμβανόμενες εικόνες. Το τελικό βάθος του εστιακού επιπέδου καθορίζεται κυρίως από το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός διαιρεμένου με το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού, αλλά επίσης και από τις οπτικές ιδιότητες του δείγματος. Τα μικροσκόπια αυτού του τύπου είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην 3D απεικόνιση καθώς και στην απεικόνιση των επιφανειακών χαρακτηριστικών λεπτών τομών.

Ωστόσο, καθώς ένα μεγάλο μέρος του φωτός από το δείγμα φθορισμού είναι αποκλεισμένο από τη χρησιμοποιούμενη οπή, αυτή η αυξημένη ανάλυση έχει το τίμημα της μειωμένης έντασης του σήματος με αποτέλεσμα συχνά να απαιτούνται μακροχρόνιες εκθέσεις του δείγματος στο φως.



Εικόνα 5.3.2: Σχηματική παράσταση της λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου.

Η πλειοψηφία των συνεστιακών μικροσκοπίων φθορισμού βασίζονται στον επιφθορισμό και η σχηματική τους αναπαράσταση φαίνεται στην εικόνα 5.3.2. Το φως διέγερσης εστιάζεται στο δείγμα μέσω του αντικειμενικού φακού. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα εστιάζεται στον ανιχνευτή από τον ίδιο φακό που χρησιμοποιείται για τη διέγερση ο οποίος έχει ένα πολύ υψηλό αριθμητικό άνοιγμα (numerical aperture) για μεγαλύτερη ευαισθησία. Δεδομένου ότι το μεγαλύτερο μέρος του φωτός διέγερσης μεταδίδεται μέσω του δείγματος, στον ανιχνευτή φθάνει μόνο το προσπίπτον φως που ανακλάται μαζί με το εκπεμπόμενο φως του φθορισμού και ως εκ τούτου η μέθοδος αυτή του φθορισμού δίνει υψηλό λόγο σήματος προς θόρυβο. Η χρήση ενός πρόσθετου φίλτρου αποκοπής μεταξύ του δείγματος και του ανιχνευτή, μπορεί να φιλτράρει το ανακλώμενο φως διέγερσης από το φως του φθορισμού.

5.3.3 Εναλλακτικές απεικονιστικές διαγνωστικές μέθοδοι

Αν και η συμβατική μαγνητική τομογραφία (MRI) χρησιμοποιείται κατά κόρον για να εκτιμηθούν οι φλεγμονώδεις και απομυελινωμένες πτυχές στις αλλοιώσεις της σκλήρυνσης κατά πλάκας, έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια νέες τεχνικές οπτικής απεικόνισης προκειμένου να ενισχυθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα της ανίχνευσης της νόσου.

Έτσι, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τεχνικές οπτικής απεικόνισης, συμπεριλαμβανομένης της οπτικής τομογραφίας (optical coherence tomography, OCT) (Kallenbach

K, 2007) και της μικροσκοπίας με αντι-Stokes σκέδαση Raman (coherent anti-Stokes Raman scattering, CARS) (Cheng JX, 2007 και Cheng JX, 2004).

Η OCT μετρά την απώλεια των νευραξόνων και των συνοδών βλαβών που σχετίζονται με την οπτική νευρίτιδα (optic neuritis) στην ΣκΠ (Trip SA, 2005), με καλή συσχέτιση ανάμεσα στη μείωση του πάχους του αμφιβληστροειδούς / του όγκου της ωχράς κηλίδας και της κλινικής εκτίμησης. Η CARS μικροσκοπία επιτρέπει την απεικόνιση της μυελίνης, χωρίς τη χρήση δεικτών. Με το λαμβανόμενο σήμα CARS των δεσμών [CH₂] της μυελίνης καταγράφεται το φασματικό προφίλ των λιπιδίων της καθώς και του περιβάλλοντος της. Το αποτέλεσμα συγκρίνεται με τη φυσιολογική κατάσταση της μυελίνης και κατόπιν προσδιορίζεται ο βαθμός αλλοίωσής της (Wang H, 2005 και Imitola J, 2011). Οι παρατηρήσεις που προκύπτουν προσφέρουν νέες γνώσεις στην οργάνωση της μυελίνης, συμπληρωματικά με εκείνες που προκύπτουν από τη μελέτη σταθερών και αφυδατωμένων ιστών με την electron microscopy. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί μέχρι σήμερα σε ex-vivo μελέτες δειγμάτων νευρικών ιστών και σε in-vivo μελέτες του αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού (Fu Y, et al, 2007).

Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί υψηλής ανάλυσης απεικόνιση με diffusion tensor imaging (DTI) για την παρακολούθηση των ινών της μυελίνης στις φλεγμονώδεις απομυελινωτικές βλάβες και τον προσδιορισμό της παθολογίας στην περιοχή της αλλοίωσης αλλά και σε πιο απομακρυσμένες περιοχές.

Η απώλεια της μυελίνης και των νευραξόνων κυριαρχούν σε πολλές εκφυλιστικές νευρολογικές διαταραχές. Ωστόσο, οι μέθοδοι για την απεικόνισή τους ταυτόχρονα σε ζωντανό ιστό είναι αρκετά περιορισμένες κυρίως λόγω της έλλειψης *in vivo* στρατηγικών χρωματισμού της μυελίνης. Για το λόγο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί η μικροσκοπία βασισμένη στην παραγωγή της τρίτης αρμονικής (THG, third harmonic generation microscopy), μια μη γραμμική τεχνική απεικόνισης της μυελίνης και εντοπισμού των περιοχών απώλειάς της, χωρίς τη χρήση δεικτών (Farrar MJ, et al, 2011).

Οι εναλλακτικές απεικονιστικές μέθοδοι εφαρμόζονται, προς το παρόν, μόνο σε ζωντανό ιστό ζώων με χρόνια πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE). Ωστόσο το υψηλό κόστος αυτών των τεχνικών και η πολυπλοκότητα στη χρήση τους, αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες που δυσκολεύουν την ευρεία χρήση τους.

5.3.4 Απεικονιστική Φασματοσκοπία

Είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση ακτινοβολίας-ύλης βασίζεται στη χημική σύνθεση και δομή της ύλης. Για παράδειγμα η αλληλεπίδραση ακτινοβολίας με ανθρώπινους ιστούς εξαρτάται από την κυτταρική δομή του ιστού και στην περίπτωση παθολογικών καταστάσεων, όπως ιστικών αλλοιώσεων, η αλληλεπίδραση θα είναι διαφορετική από την περίπτωση του υγιούς ιστού. Σ' αυτήν την περίπτωση όταν ένας ιστός διεγείρεται οπτικά, η φασματική κατανομή του φωτός που επανεκπέμπεται περιέχει πληροφορία διαγνωστικής σημασίας. Το ανθρώπινο οπτικό σύστημα δεν μπορεί να διακρίνει αυτήν την πληροφορία εξαιτίας της περιορισμένης φασματικής του ανάλυσης (τριχρωματική όραση) και της δυναμικής περιοχής λειτουργίας του. Κλασικές μέθοδοι διάγνωσης

για το χαρακτηρισμό των ιστών αποτελούν οι ιστοπαθολογικές εξετάσεις, οι οποίες διενεργούνται κατόπιν αφαίρεσης δειγμάτων ιστού (βιοψία).

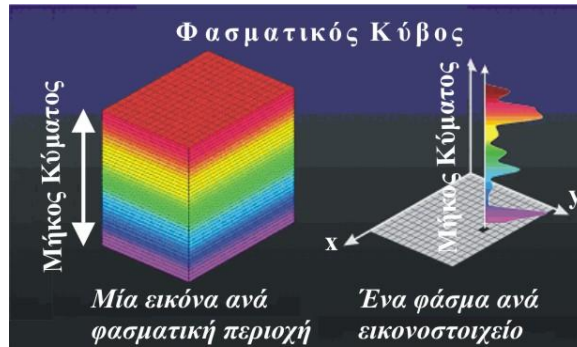
Προς αποφυγή των περιορισμών που συναντώνται στις κλασικές μεθόδους βιοψίας, έχουν αναπτυχθεί διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές όπως φθορισμός, σκέδαση Raman, φωσφορισμός, ελαστική σκάδαση κ.α. για το μη παρεμβατικό οπτικό χαρακτηρισμό και την ανάλυση ιστών (οπτική βιοψία). Τα αποτελέσματα τέτοιων αναλύσεων έχουν δείξει ότι ο οπτικός χαρακτηρισμός αποτελεί μια σημαντική διαγνωστική τεχνική.

Η φασματοσκοπία είναι ένα χρήσιμο εργαλείο που έχει χρησιμοποιηθεί για αρκετές δεκαετίες στη μελέτη και το φασματικό χαρακτηρισμό χημικών συστατικών. Η φυσική αρχή της φασματοσκοπίας είναι η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη. Γενικά, η φασματοσκοπία είναι η μέτρηση της έντασης του φωτός που εκπέμπεται, ή σκεδάζεται από ένα δείγμα, ως συνάρτηση του μήκους κύματος του φωτός, σε υψηλή φασματική ανάλυση, αλλά χωρίς χωρική πληροφορία. Η χωρική πληροφορία είναι πολύ σημαντική για τον οπτικό χαρακτηρισμό μη ομοιόμορφων υλικών και ιδιαίτερα αφού το σημείο από το οποίο επιλέγεται η βιοψία σε τέτοιες τεχνικές αποτελεί υποκειμενική διαδικασία και επηρεάζεται από την ανθρώπινη όραση.

Η απεικόνιση, από την άλλη πλευρά, έχει να κάνει κατά κύριο λόγο με τη λήψη χωρικής πληροφορίας από δισδιάστατο δείγμα. Από μόνη της όμως η απεικόνιση παρέχει περιορισμένη φασματική πληροφορία.

Με την πρόοδο στην τεχνολογία υπολογιστών και των ανιχνευτών αναπτύσσεται, ένας νέος τομέας, εκείνος της απεικονιστικής φασματοσκοπίας (*Vane G, et al. 1993*). Η απεικονιστική φασματοσκοπία συνδυάζει τη συμβατική απεικόνιση με τη φασματοσκοπία.

Η απεικονιστική φασματοσκοπία είναι μια μέθοδος η οποία συγχωνεύει τις δύο καθιερωμένες τεχνολογίες της φασματοσκοπίας και της απεικόνισης για να παράγει ένα ισχυρό εργαλείο για την επέκταση των δυνατοτήτων των βιολογικών και κλινικών μελετών (*Garini Y, et al, 2006, Zeiss microscopy online campus*). Η φασματοσκοπία απεικόνισης είναι μια νέα τεχνική για τη λήψη ενός φάσματος σε κάθε θέση μιας μεγάλης διάταξης χωρικών θέσεων έτσι ώστε κάθε ένα μήκος κύματος να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή μιας εικόνας. Η απεικόνιση παρέχει την ένταση του φωτός σε κάθε εικονοστοιχείο-pixel της εικόνας, $I(x,y)$, καθ' όλη τη ζώνη απόκρισης του ανιχνευτή και ένα τυπικό φασματόμετρο παρέχει ένα μοναδικό φάσμα $I(k)$ από κάποιο υλικό. Συνδυαστικά των παραπάνω, η απεικονιστική φασματοσκοπία βασίζεται στη μέθοδο του φασματικού κύβου δηλαδή της μέτρησης του φάσματος σε κάθε στοιχείο (pixel), μιας διδιάστατης εικόνας. Οι φασματικές εικόνες που λαμβάνονται από ένα σύστημα που βασίζεται στη μέθοδο του φασματικού κύβου, συνθέτουν ένα κύβο πληροφορίας $I_{xy}(\lambda)$, ο οποίος δίνει το πλήρες φάσμα σε κάθε σημείο x, y της εικόνας. Έτσι η απεικονιστική φασματοσκοπία, συνδυάζοντας τη χωρική και τη φασματική πληροφορία, αποτελεί μια νέα μέθοδο για τη μελέτη της δομής και της δυναμικής των λειτουργιών ζωντανών οργανισμών, εφαρμόζοντας ταυτόχρονα αλγορίθμους φασματικής ανάλυσης και επεξεργασίας εικόνας στα δεδομένα του ίδιου κύβου.



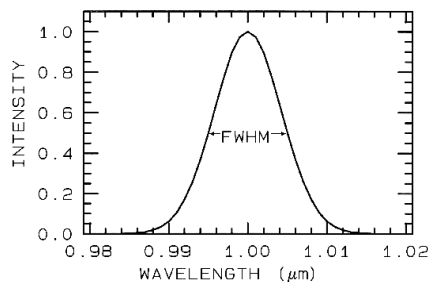
Εικόνα 5.2.5: Η έννοια του φασματικού κύβου. α) Σε κάθε φασματική περιοχή αντιστοιχεί και μία εικόνα, β) Η τρίτη διάσταση της εικόνας αντιστοιχεί στο φάσμα καθενός εικονοστοιχείου (pixel).

Η απεικονιστική φασματοσκοπία έχει πολλά ονόματα, συμπεριλαμβανομένης της φασματομετρίας απεικόνισης, της πολυφασματικής και υπερφασματικής απεικόνισης. Η φασματοσκοπία είναι η μελέτη της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η φασματομετρία είναι η μέτρηση των φωτονίων ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Υπάρχουν 4 γενικές παράμετροι που περιγράφουν την ικανότητα ενός φασματομέτρου: 1) φασματική περιοχή, 2) φασματικό εύρος ζώνης, 3) φασματική δειγματοληψία, και 4) αναλογία σήματος προς θόρυβο (S/N).

Η φασματική περιοχή είναι σημαντική γιατί καθορίζει το είδος των διαγνωστικών εφαρμογών που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα συγκεκριμένο φασματοφωτόμετρο.

Το φασματικό εύρος ζώνης είναι το πλάτος ενός μεμονωμένου φασματικού καναλιού στο φασματομέτρο. Όσο στενότερο είναι το φασματικό εύρος ζώνης, τόσο στενότερα θα είναι το φασματικά χαρακτηριστικά του μετρούμενου φάσματος.

Η μορφή του σχεδιαγράμματος διέλευσης (bandpass profile) είναι επίσης σημαντική. Ιδανικά κάθε κανάλι αποκόβει όλο το φως εκτός μιας δεδομένης στενής σειράς μήκους κύματος, αλλά περιστασιακά, το φως μπορεί να περάσει μέσα από αυτό το εύρος (bandpass π.χ. λόγω της σκέδασης μέσα στο οπτικό σύστημα, ή λόγω της ανεπαρκούς εμπόδισης των φίλτρων). Η συνηθέστερη μορφή σχεδιαγράμματος διέλευσης, στα φασματομέτρα, είναι γκαουσσισιανής μορφής. Το πλάτος του σχεδιαγράμματος διέλευσης ορίζεται συνήθως ως το φασματικό πλάτος της καμπύλης που αντιστοιχεί σε εντάσεις ίσες με το 50% της μέγιστης έντασης, όπως φαίνεται στο, που καλείται πλήρες πλάτος στο μισό του μέγιστο (Full Width at Half Maximum, FWHM).



Εικόνα 5.2.6: Ένα γκαουσσισιανό σχεδιάγραμμα με πλάτος στο μισό της μέγιστης έντασης (FWHM) ίσο με 10nm.

Η φασματική δειγματοληψία είναι η διαφορά στο μήκος κύματος μεταξύ των φασματικών σχεδιαγραμμάτων (spectral bandpass profiles) για κάθε κανάλι στο φασματόμετρο ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Η φασματική δειγματοληψία είναι συχνά συγκεχυμένη με το bandpass, και μαζί ονομάζονται ανάλυση (resolution). Τέλος, ένα φασματόμετρο πρέπει να μετρήσει το φάσμα με αρκετή ακρίβεια για να καταγράψει τις λεπτομέρειες στο φάσμα.

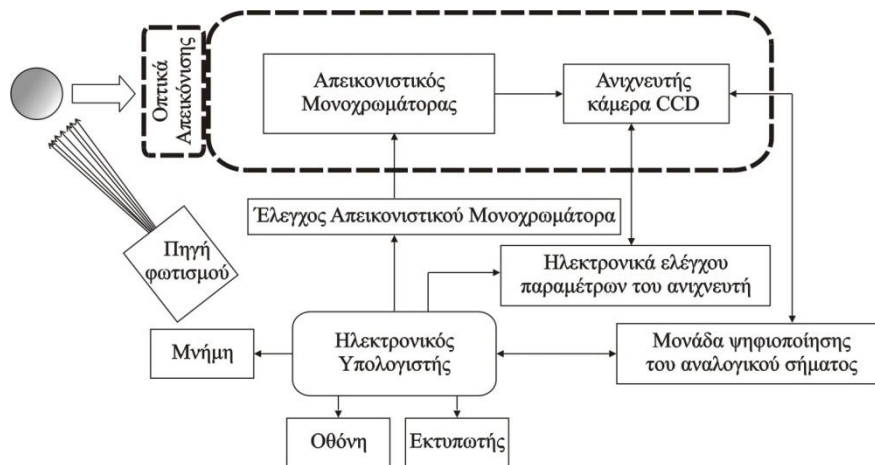
Η αναλογία σήματος προς θόρυβο (S/N) που απαιτείται για να λύσει ένα ιδιαίτερο πρόβλημα θα εξαρτηθεί από τα φασματικά χαρακτηριστικά που θα μελετηθούν. Το S/N εξαρτάται από την ευαισθησία των ανιχνευτών, το φασματικό εύρος ζώνης, και την ένταση του φωτός που απεικονίζεται ή που εκπέμπεται από την επιφάνεια που μετρείται. Μερικά φασματικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα είναι αρκετά ισχυρά και μια αναλογία σήματος/θόρυβο περίπου 10 θα είναι επαρκής για να τα προσδιορίσει, ενώ άλλα είναι αδύνατα, και απαιτείται συχνά ένας λόγος S/N αρκετών εκατοντάδων (ή και υψηλότερος) (Clark RN et al, 2003). Η απεικονιστική φασματοσκοπία χρησιμοποιεί το συνδυασμό της φασματοσκοπίας Fourier με την απεικόνιση με χρήση απεικονιστικού μονοχρωμάτορα, ανιχνευτών (συνήθως μιας κάμερας CCD), μικροσκοπίας και λογισμικού (software) για την ανάλυση της λαμβανόμενης πληροφορίας. Οι ανιχνευτές πυριτίου υψηλής απόδοσης (CCD) έχουν το πλεονέκτημα του χαμηλού θορύβου και της αποθήκευσης δεδομένων σε πολλά κανάλια, τόσο απεικονιστικά όσο και φασματοσκοπικά. Επιπλέον, τα συμβολόμετρα και τα μεταβλητά φίλτρα μπορούν συχνά να αντικαταστήσουν τα φράγματα περίθλασης σε διάφορα φασματοσκοπικά όργανα παρέχοντας τη βελτιωμένη στην απόδοσή τους. Η παρουσία απεικονιστικών ανιχνευτών CCD χαμηλού κόστους, ηλεκτρονικών χαμηλού θορύβου, ισχυρών ηλεκτρονικών υπολογιστών, λογισμικών ανάλυσης εικόνας, έχουν προωθήσει την ανάπτυξη συστημάτων απεικονιστικής φασματοσκοπίας για εφαρμογές την ιατρική και τη βιολογία.

5.3.4.1 Συστήματα φασματικής απεικόνισης

Τα συστήματα απεικονιστικής φασματοσκοπίας διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: σε απεικονιστικά συστήματα μιας ευρείας φασματικής περιοχής, σε συστήματα πολλαπλών φασματικών περιοχών (απεικόνιση σε ένα αριθμό περιοχών) και σε συστήματα υπερ-φασματικής απεικόνισης (απεικόνιση σε μεγάλο αριθμό φασματικών περιοχών), τα οποία παρέχουν φασματική πληροφορία υψηλότερης ανάλυσης από τα προηγούμενα.

Ένα σύστημα φασματικής απεικόνισης αποτελείται από το σύστημα μέτρησης και το λογισμικό για την ανάλυση. Το σύστημα μέτρησης περιλαμβάνει όλα τα οπτικά, τα ηλεκτρονικά και το λογισμικό που απαιτείται για τη λήψη της φασματικής εικόνας. Το λογισμικό ανάλυσης περιλαμβάνει τους μαθηματικούς αλγορίθμους για την επίδειξη των εικόνων στον υπολογιστή και τη φασματική τους ανάλυση.

Η διάταξη ενός τυπικού συστήματος φασματικής απεικόνισης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 5.2.7: Δομή ενός τυπικού συστήματος απεικονιστικής φασματοσκοπίας

Το φως προβάλλεται από το φακό στην οπτική κεφαλή η οποία αποτελείται από δύο κύρια στοιχεία:

α) τον απεικονιστικό μονοχρωμάτωρα, ο οποίος διαχωρίζει το φως στα μήκη κύματος που το συνθέτουν.

β) μια CCD συστοιχία ανιχνευτή, ο οποίος συλλέγει, για όλα τα εικονοστοιχεία ταυτόχρονα, το φως που απαιτείται για να υπολογιστεί το φάσμα σε κάθε σημείο της εικόνας.

Τα οπτικά απεικόνιση (zoom φακός, απλός φακός εστίασης, τηλεσκόπιο κ.α.), συλλέγουν το φως που εκπέμπεται από το αντικείμενο, το εστιάζουν πάνω στη συστοιχία του ανιχνευτή και έτσι αναπαράγεται το πραγματικό είδωλο του αντικειμένου. Το σύστημα συμπληρώνουν τα ηλεκτρονικά ελέγχου του μονοχρωμάτωρα, της κάμερας καθώς και η μονάδα ψηφιοποίησης του αναλογικού σήματος και ο ηλεκτρονικός υπολογιστής.

Η ευαισθησία του οργάνου μπορεί να εκφραστεί: (α) με τον καθορισμό της αναλογίας σήματος/θόρυβο του οργάνου σε ένα ορισμένο σύνολο συνθηκών ή (β) με την ελάχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα μιας ουσίας σε ένα καθορισμένο σύνολο συνθηκών.

Απεικονιστικοί μονοχρωμάτωρες

Το βασικό μέρος ενός συστήματος φασματικής απεικόνισης είναι ο απεικονιστικός μονοχρωμάτωρα, ο οποίος διαχωρίζει το φως που εισέρχεται στον ανιχνευτή στα μήκη κύματος που περιέχει. Το συμβολόμετρο και η συμβολομετρική φασματοσκοπία (ή Φασματοσκοπία Fourier), είναι μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιούν για το διαχωρισμό του φωτός. Οι άλλες μέθοδοι χρησιμοποιούν φράγματα συμβολής και περίθλασης του φωτός (gratings), ή μία σειρά φίλτρων συμβολής για το διαχωρισμό του φωτός.

Σε σύστημα φασματικής απεικόνισης που βασίζεται σε μονοχρωμάτωρα, μόνο ο ένας άξονας της συστοιχίας του ανιχνευτή CCD (ο χωρικός άξονας), παρέχει δεδομένα για το σχηματισμό της εικόνας. Ο άλλος άξονας, ο φασματικός, χρησιμοποιείται για να μετρήσει την ένταση του φωτός που ανακλάται από το μονοχρωμάτωρα. Επομένως, μια εικόνα μπορεί να δημιουργηθεί μόνο μετά από σάρωση του μονοχρωμάτωρα παράλληλα με το φασματικό άξονα του CCD. Η απουσία της δυνατότητας παραγωγής απευθείας δισδιάστατης εικόνας, κάνει αδύνατη την επιλογή της περιοχής

ενδιαφέροντος μέσα στο πεδίο και επομένως της εστίασης και του χρόνου έκθεσης πριν από τη μέτρηση. Η παραγωγή δισδιάστατης εικόνας μπορεί να γίνει μόνο με φασματοσκοπία Fourier ή με φίλτρα η οποία μπορεί να απεικονιστεί, να εστιαστεί και να βελτιωθεί πριν γίνει η μέτρηση. Αυτές οι δύο μέθοδοι παρέχουν δεδομένα εικόνας και στους δύο χωρικούς άξονες x και y ταυτόχρονα, δίνοντας έτσι μια ολοκληρωμένη δισδιάστατη εικόνα. Στις επόμενες παραγράφους γίνεται περιγραφή αυτών των μεθόδων.

Τα πολυφασματικά απεικονιστικά συστήματα υψηλής ανάλυσης έχουν ιδιαίτερες εφαρμογές στην ανίχνευση αντικειμένων με συγκεκριμένα φασματικά χαρακτηριστικά που είναι αδύνατον να ανιχνευτούν με το ανθρώπινο μάτι. Αυτό οφείλεται στο ότι διάφορα υλικά, χρωστικές και χρώματα έχουν φασματικά χαρακτηριστικά που είναι δυνατό να ανιχνευτούν και να γίνουν διακριτές μόνο σε στενές φασματικές περιοχές απεικόνισης ενός πολυφασματικού απεικονιστικού συστήματος υψηλής ανάλυσης. Έτσι είναι εφικτή η ανίχνευση διαφόρων στόχων, οι οποίοι έχουν συγκεκριμένη γεωμετρία όπως και ανακλαστικές ιδιότητες οι οποίες διαφέρουν από αυτές των γύρω αντικειμένων. Αυτός ο τύπος συστήματος δέχεται πολυχρωματικό φως και παρέχει φασματική πληροφορία κατά μήκος μιας διεύθυνσης μιας διδιάστατης συστοιχίας και χωρική πληροφορία κατά μήκος μιας διεύθυνσης. Αυτό το σύστημα παρέχει πολυχρωματική και χωρικά δισδιάστατη πληροφορία σε ένα αισθητήρα με επικάλυψη ενός γραμμικά μεταβαλλόμενου φίλτρου συμβολής. Μονοχρωματικές εικόμες λαμβάνονται σαρώνοντας γραμμικά συγκεκριμένες λωρίδες της διδιάστατης συστοιχίας. Αυτό το σύστημα επιτρέπει φασματική ρύθμιση στο επιθυμητό μήκος κύματος και ταυτόχρονη λήψη απευθείας διδιάστατης μονοχρωματικής εικόνας από μία διδιάστατη συστοιχία.

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι απεικονιστικών φασματόμετρων σάρωσης: αυτά που αναλύουν τη φασματική περιοχή χρησιμοποιώντας διάθλαση και αυτά που χρησιμοποιούν περίθλαση. Οι απαιτήσεις για ένα σύστημα με μεγάλο λόγο σήματος εισόδου προς έξοδο, μικρού μεγέθους και βάρους περιόρισαν τη χρήση των απεικονιστικών φασματόμετρων διάθλασης. Ο λόγος σήματος εισόδου προς έξοδο ενός περιθλαστικού φασματόμετρου είναι μεγαλύτερος από αυτόν ενός φασματόμετρου πρίσματος με ίση φασματική ανάλυση.

Απεικονιστικός μονοχρωμάτορας σάρωσης με γραμμικά μεταβαλλόμενο φίλτρο συμβολής (ΓΜΦΣ)

Ένα φίλτρο συμβολής αποτελείται από πολυστρωματικά λεπτά φιλμ οπτικού δέκτη. Η λειτουργία του βασίζεται στην ενισχυτική και καταστρεπτική συμβολή για τη διάδοση ή την ανάκλαση αντίστοιχα, συγκεκριμένων περιοχών μήκους κύματος. Ένα τέτοιο φίλτρο αποτελείται από ένα υπόστρωμα το οποίο ορίζει το εύρος λειτουργίας. Πάνω στο υπόστρωμα υπάρχει επικάλυψη διαδοχικών λεπτών φιλμ διαφόρων υλικών και πάχους. Τα πολυστρωματικά λεπτά φιλμ εναποτίθενται έτσι ώστε το πάχος κατά μήκος του υποστρώματος να είναι ομοιόμορφο. Το πάχος όμως των στρωμάτων μεταβάλλεται χωρικά κατά μήκος του υποστρώματος με τέτοιο τρόπο ώστε να μεταβάλλεται και το κεντρικό μήκος κύματος διάδοσης καθώς και το εύρος. Ένα τέτοιο φίλτρο λέγεται γραμμικά μεταβαλλόμενο φίλτρο συμβολής (ΓΜΦΣ) όταν το πάχος των στρωμάτων μεταβάλλεται έτσι ώστε το διαδιδόμενο μήκος κύματος να μεταβάλλεται γραμμικά κατά μήκος του φίλτρου.

Τα γραμμικά μεταβαλλόμενα φίλτρα συμβολής είναι ελαφριά, στερεάς κατάστασης και χωρίς κινητά μέρη. Επίσης μπορούν να διαταχθούν έτσι ώστε να καλύπτουν ευρύτερες φασματικές περιοχές λειτουργίας σε ένα σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης. Στο σύστημα αυτό το ΓΜΦΣ μπορεί να τοποθετηθεί στη θέση της ενδιάμεσης εικόνας και ένας φακός απεικόνισης χρησιμοποιείται για να απεικονίσει τη φιλτραρισμένη εικόνα πάνω στον ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής είναι ένα CCD και με τη συμβολή του φίλτρου οι εικόνες του CCD μεταβάλλονται φασματικά. Χωρική σάρωση επιτυγχάνεται με σάρωση της γραμμής όψης του συστήματος μπροστά από το φίλτρο. Η δυνατότητα αλλαγής της μεγέθυνσης από το σύστημα αντισταθμίζει τις διαφορές μεγέθους μεταξύ φίλτρου και ανιχνευτή. Η ακτινοβολία που προέρχεται από πιθανή σκεδαση αποβάλλεται με την τεχνική της επανααπεικόνισης πάνω στον ανιχνευτή. Το ΓΜΦΣ μπορεί όμως να τοποθετηθεί και πάνω στον ανιχνευτή. Αυτό απλοποιεί σημαντικά την κατασκευή του συστήματος, μειώνει το μέγεθος και το βάρος του αλλά δε δίνει τη δυνατότητα ελέγχου της μεγέθυνσης και της αποβολής της ακτινοβολίας που προέρχεται από τυχαία σκέδαση. Τα κύρια πλεονεκτήματα των ΓΜΦΣ είναι η σχετικά μεγάλη οπτική διαπερατότητα και οι μεγάλες γωνίες διαφράγματος. Για παράδειγμα, αν θεωρήσουμε ένα σύστημα διαφράγματος $F/2$ και γωνίας 7.5° ημιεπιπέδου τότε το κεντρικό μήκος κύματος διαπερατότητας θα μεταβάλλεται από 0.1% σε 0.5% κατά μήκος του πεδίου ενώ το εύρος διαπερατότητας θα μεταβάλλεται μόνο από 1%-2% κατά μήκος του πεδίου ανάλογα με τη σχεδίαση του φίλτρου. Επομένως υπάρχει μεταβολή στη διαπερατότητα με τη γωνία πρόσπτωσης της τάξης του 4% της μέγιστης τιμής όταν η γωνία πρόσπτωσης είναι 20° . Αυτά τα πλεονεκτήματα δίνουν τη δυνατότητα σε αυτό το σύστημα να λειτουργεί σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού εκεί που τα άλλα συστήματα δεν μπορούν να λειτουργήσουν.

Το βασικό μειονέκτημα ενός συστήματος ΓΜΦΣ είναι ότι απαιτείται εξαιρετικά σταθερή βάση στήριξης. Τρεις γραμμικοί ανιχνευτές απεικονίζουν το έδαφος σε τρία διαφορετικά φασματικά κανάλια λ_1 , λ_2 και λ_3 . η χρονική διαφορά μεταξύ της απεικόνισης του λ_1 και του λ_3 καναλιού της ίδιας γραμμής εξαρτάται από την ταχύτητα του οχήματος που φέρει το ΓΜΦΣ και την απόσταση του εδάφους από τους ανιχνευτές. Για τη χρονική περίοδο της μετακίνησης πρέπει να διατηρηθεί απόλυτη σταθερότητα στη βάση στήριξης του οχήματος.

Μέθοδοι φασματικού διαχωρισμού βασιζόμενοι σε φίλτρα

Οι μέθοδοι διαχωρισμού με φίλτρα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) αυτές που χρησιμοποιούν σειρά φίλτρων διαφορετικού μήκους κύματος και β) αυτές που χρησιμοποιούν ρυθμιζόμενα φίλτρα. Στην πρώτη περίπτωση, η σειρά των φίλτρων τοποθετείται σε ένα τροχό, ο οποίος περιστρέφεται μπροστά από την κάμερα. Τα ρυθμιζόμενα φίλτρα που είναι ακουστοοπτικά (AOTFs) ή υγρών κρυστάλλων (LCTFs), δεν έχουν κινούμενα μέρη και μπορούν να ρυθμιστούν σε οποιοδήποτε μήκος κύματος μέσα στη φασματική περιοχή λειτουργίας τους. Ένα πλεονέκτημα της χρήσης ρυθμιζόμενων φίλτρων είναι η ικανότητα για μέτρηση της έντασης μιας εικόνας σε οποιαδήποτε επιθυμητή σειρά σάρωσης μηκών κύματος. Τα ρυθμιζόμενα φίλτρα όμως, έχουν μειονεκτήματα: περιορισμένη φασματική περιοχή λειτουργίας (τυπικά $\lambda_{\max} = 2 \cdot \lambda_{\min}$), ευαισθησία στη θερμοκρασία, χαμηλή οπτική απόδοση, ευαισθησία στην πόλωση, ενώ στην περίπτωση των ακουστοοπτικών φίλτρων υπάρχει μετατόπιση στην εικόνα κατά τη διάρκεια της σάρωσης.

Παρ' όλα αυτά τόσο τα ακουστοοπτικά φίλτρα (AOTFs) όσο και τα φίλτρα υγρών κρυστάλλων (LCTFs), έχουν χρησιμοποιηθεί σε απεικονιστικά συστήματα.

5.3.4.2 Ανιχνευτής CCD (Charge-Coupled Device)

Σήμερα, οι περισσότερες ψηφιακές απεικονιστικές μηχανές χρησιμοποιούν είτε ένα αισθητήρα εικόνας CCD ή ένα CMOS αισθητήρα. Και οι δύο τύποι αισθητήρων συλλέγουν το φως και το μετατρέπουν σε ηλεκτρικά σήματα.

Ένας αισθητήρας εικόνας CCD είναι μια αναλογική συσκευή. Όταν το φως πέφτει πάνω στο τσιπ μετατρέπεται σε μικρά ηλεκτρικά φορτία. Τα ηλεκτρικά φορτία μετατρέπονται στη συνέχεια σε διαφορά δυναμικού ενός εικονοστοιχείου κάθε φορά καθώς διαβάζονται από το τσιπ. Πρόσθετα κυκλώματα στην κάμερα μετατρέπουν την τάση σε ψηφιακή πληροφορία.

Η CCD κάμερα είναι ένα από τα πιο βασικά τμήματα ενός φασματικού απεικονιστικού συστήματος. Η λειτουργία της καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό τη λειτουργία και την απόδοση του όλου συστήματος. Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται μια ποιοτική περιγραφή μερικών από τις πιο βασικές παραμέτρους των ανιχνευτών CCD.

Χωρική Ανάλυση. Η χωρική ανάλυση της κάμερας απεικόνισης καθορίζεται από τον αριθμό των εικονοστοιχείων στο X και Y άξονα (ανάλυση), το μέγεθος και την πυκνότητα των εικονοστοιχείων (pixels) και τέλος από το λόγο των διαστάσεων και το μέγεθος του CCD (μετράται σε μήκος διαγωνίου). Το μέγεθος του στοιχείου της συστοιχίας του ανιχνευτή είναι τυπικά από 6μm-25μm. Μικρό μέγεθος εικονοστοιχείου μπορεί να δίνει αυξημένη χωρική ανάλυση αλλά ταυτόχρονα μικρό λόγο σήματος προς θόρυβο και μικρή δυναμική κλίμακα. Επομένως επιλέγοντας μια CCD συστοιχία με μικρά pixels επιτυγχάνουμε εικόνα με καλύτερη χωρική ανάλυση. Το πολύ μικρό μέγεθος pixel, όμως έχει μικρότερη χωρική ικανότητα για αποθήκευση φωτο-ηλεκτρονίων και αφού η χωρικότητα ορίζει τη δυναμική περιοχή του ανιχνευτή (ο λόγος του μέγιστου προς το ελάχιστο σήμα που μπορεί να μετρήσει ταυτόχρονα), το μέγεθος του εικοστοιχείου είναι ανάλογο της δυναμικής περιοχής. Επομένως οι CCD συστοιχίες με μεγαλύτερα pixels έχουν αναλογικά μεγαλύτερη δυναμική περιοχή. Σε πολλές εφαρμογές απαιτείται δυναμική περιοχή για το διαχωρισμό χημικών συστατικών που παρουσιάζουν πολύ λεπτές φασματικές διαφορές. Επομένως χωρική ανάλυση και δυναμική περιοχή δρουν ανταγωνιστικά ανάλογα με τις απαιτήσεις της εφαρμογής. Η ενεργός ανάλυση του CCD είναι δυνατόν να μειωθεί αθροίζοντας ηλεκτρονικά τα εικονοστοιχεία (ανάγνωση επιπροσθέσεως-binning readout) κατά μια διάσταση. Η ηλεκτρονική άθροιση των εικονοστοιχείων αντίστροφα, επιφέρει αύξηση της δυναμικής περιοχής, μείωση του θορύβου και του χρόνου ανάγνωσης της πληροφορίας.

Φασματική Απόκριση. Η φασματική απόκριση της CCD κάμερας είναι συνάρτηση του ενεργειακού χάσματος του υλικού που χρησιμοποιείται στις κάμερες. Πρακτικά η φασματική περιοχή λειτουργίας ενός τυπικού CCD ανιχνευτή εκτείνεται από 400nm – 1100nm με μέγιστες κβαντικές αποδόσεις μεταξύ 40%-50% με δυνατότητες αύξησης της φασματικής απόκρισης στην περιοχή του υπεριώδους.

Θόρυβος CCD κάμερας. Τρεις είναι οι κύριες πηγές θορύβου σε μια κάμερα: ο φωτονικός θόρυβος (photon shot noise), ο θόρυβος φορτίου σκότους (dark charge noise) και ο θόρυβος ανάγνωσης του CCD (readout noise). Ο φωτονικός θόρυβος είναι αποτέλεσμα στατιστικών διακυμάνσεων στο σήμα

και είναι ανάλογος με την τετραγωνική ρίζα του σήματος. Ο θόρυβος φορτίου σκότους από την άλλη πλευρά προκαλείται από ηλεκτρόνια τα οποία διεγείρονται από τη θερμότητα του CCD. Για να κρατηθεί ο θόρυβος αυτός σε χαμηλά επίπεδα, ειδικά όταν ο χρόνος μεταφοράς και διαβάσματος των δεδομένων από το CCD είναι αρκετά μεγάλος, απαιτείται ψύξη της κάμερας (θερμοηλεκτρικά ή με υγρό άζωτο). Ο θόρυβος ανάγνωσης του CCD προέρχεται από τα ηλεκτρονικά εξόδου του CCD. Ο θόρυβος αυτός κρατείται χαμηλός όταν ο ρυθμός καταγραφής της κάμερας (readout rate), είναι χαμηλός, ενώ υψηλοί ρυθμοί καταγραφής συνοδεύονται με υψηλό θόρυβο.

5.3.4.3 Ανιχνευτής CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor)

Οι πρώτοι αναλογικοί αισθητήρες για το ορατό φως ήταν οι σωλήνες βιντεοκάμερας. Οι τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι είτε συσκευές ημιαγωγών συζευγμένου φορτίου (CCD) είτε συσκευές συμμετρικών ημιαγωγών οξειδίου-μετάλλου (CMOS), είτε ημιαγωγών οξειδίου του μετάλλου τύπου N (NMOS, το Live MOS).

Ο όρος CMOS επίσης αναφέρεται και ως συμπληρωματικός-συμμετρικός ημιαγωγός οξειδίου-μετάλλου (ή COS-MOS). Οι λέξεις συμπληρωματικός-συμμετρικός αναφέρονται στο γεγονός ότι ένα τυπικό CMOS χρησιμοποιεί συμπληρωματικά και συμμετρικά ζεύγη ημιαγωγών οξειδίου-μετάλλου τύπου p και τύπου n.

Όπως ο CCD αισθητήρας έτσι και ο CMOS συλλέγει το φως και το μετατρέπει σε ηλεκτρικά σήματα. Ένα τσιπ απεικόνισης CMOS είναι ένα είδος ενεργού αισθητήρα εικονοστοιχείων που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τη διαδικασία των ημιαγωγών. Τα συζευγμένα ηλεκτρικά κυκλώματα στον CMOS αισθητήρα μετατρέπουν τη φωτεινή ενέργεια σε μία τάση. Πρόσθετα κυκλώματα επί του τσιπ μπορεί να περιληφθούν για τη μετατροπή της τάσης σε ψηφιακά δεδομένα. Δύο σημαντικά χαρακτηριστικά των συσκευών CMOS είναι η υψηλή αντοχή στο θόρυβο, η χαμηλή κατανάλωση ισχύος [Fairchild semiconductor corporation Americas, 1983] και η μικρή παραγωγή θερμότητας.

Υπάρχουν πολλές παράμετροι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της απόδοσης του αισθητήρα εικόνας, συμπεριλαμβανομένων του δυναμικού εύρους, της αναλογίας σήματος προς θόρυβο και της ευαισθησία σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού. Για αισθητήρες συγκρίσιμων τύπων, ο λόγος σήματος-προς-θόρυβο και της δυναμική περιοχής βελτιώνονται καθώς αυξάνεται το μέγεθος.

Η δυναμική περιοχή (dynamic range, DR ή DNR) είναι η αναλογία μεταξύ των μεγαλύτερων και των μικρότερων δυνατών τιμών μιας μεταβαλλόμενης ποσότητας ενός σήματος, π.χ. ήχου και φωτός. Μετριέται ως κλάσμα, ή ως βάση-10 (ντεσιμπέλ) ή βάση-2 (bits) σε λογαριθμική κλίμακα.

Ο λόγος σήματος προς θόρυβο (Signal-to-Noise Ratio, SNR) είναι ένα μέτρο που χρησιμοποιείται στον τομέα της επιστήμης και της μηχανικής που συγκρίνει το επίπεδο του επιθυμητού σήματος σε σχέση με το επίπεδο θορύβου του περιβάλλοντος. Ορίζεται ως ο λόγος της ισχύος σήματος προς την ισχύ του θορύβου και συχνά εκφράζεται σε ντεσιμπέλ. Μια αναλογία μεγαλύτερη από 1:1 (ποσότητα μεγαλύτερη από 0 dB) δείχνει περισσότερο σήμα από το θόρυβο.

Οι έννοιες του σήματος-προς-θόρυβο και της δυναμικής περιοχής είναι στενά συνδεδεμένες. Το δυναμικό εύρος μετρά την αναλογία μεταξύ του ισχυρότερου μη-παραμορφωμένου σήματος σε

ένα κανάλι και το ελάχιστο διακριτό σήμα, το οποίο για πολλούς λόγους είναι το επίπεδο θορύβου. Το SNR μετρά την αναλογία μεταξύ ενός αυθαίρετου επιπέδου σήματος (όχι απαραίτητα του πιο ισχυρού σήματος) και του θορύβου. Η μέτρηση σήματος-προς-θόρυβο απαιτεί την επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού σήματος ή κάποιου σήματος αναφοράς.

Το SNR λαμβάνεται συνήθως ως ο μέσος όρος σήματος-προς-θόρυβο, καθώς είναι πιθανό ότι οι στιγμιαίες τιμές σήματος-προς-θόρυβο θα είναι σημαντικά διαφορετικές.

Η διάγνωση αρκετά συχνά βασίζεται κυρίως στον οπτικό χαρακτηρισμό μακροσκοπικών μορφοχρωματικών χαρακτηριστικών κάθε ιστικής/κυτταρικής αλλοίωσης και στην ιστολογική ανάλυση του δείγματος με ιστοπαθολογικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους.

Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην μικροσκοπική μελέτη μορφοχρωματικών χαρακτηριστικών των κυττάρων (σχήμα του κυττάρου, ο βαθμός χρώσεως κλπ). Υπάρχουν όμως μειονεκτήματα που περιορίζουν την αποτελεσματικότητά τους:

- Υπάρχει δυσκολία στη λήψη αντιπροσωπευτικού τμήματος της αλλοίωσης λόγω των δυσδιάκριτων ορίων της με τον υγιή ιστό από το ανθρώπινο μάτι, ειδικά στην περίπτωση του νευρικού ιστού όπου τα υγιή και μη νευρικά κύτταρα δε διαχωρίζονται.
- Η διαδικασία της ιστολογικής εξέτασης δεν είναι άμεση, γεγονός που επιφέρει προβλήματα, όταν η παράμετρος χρόνος είναι κρίσιμης σημασίας.

Τα προβλήματα που σχετίζονται με την *ex vivo* ιστολογική μελέτη οδήγησαν στην εφαρμογή οπτικών φασματοσκοπικών τεχνικών διάγνωσης ιστικών αλλοιώσεων (φασματοσκοπία φθορισμού, διάχυτης ανάκλασης, απορρόφησης και ελαστικής σκέδασης του φωτός από τον ιστό). Αυτές οι τεχνικές βασίζονται στη θεώρηση ότι το ιδιαίτερο οπτικό φάσμα κάποιου ιστού παρέχει πληροφορίες για τη δομή, τη βιοχημική σύσταση και τη λειτουργική του κατάσταση (Papadakis A. et al, 2003, Akbari H. et al, 2008). Έτσι για παράδειγμα, η μέτρηση του επαγόμενου φθορισμού διαφόρων δομικών χαρακτηριστικών των ιστών, παρέχει πληροφορίες για τη βιοχημική κατάσταση του ιστού (Barash E. et al, 2010). Στη φασματοσκοπία σκέδασης μελετώνται οι αλλαγές στο λαμβανόμενο οπτικό σήμα λόγω εξάρτησης της ελαστικής σκέδασης από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, στην περίπτωση δομικών ιστικών και κυτταρικών μεταβολών σε παθολογικές καταστάσεις (μέγεθος και σχήμα κυττάρων, ο λόγος όγκων του πυρήνα και του κυττάρου κ.τ.λ.) (Imitola J. et al, 2011).

Ειδικά στην περίπτωση του νευρικού ιστού, λόγω της πολυπλοκότητάς του, η μη επεμβατική κι ιδιαίτερα η *in vivo* μελέτη των παθολογικών διεργασιών του ιστού απαιτεί τη χρήση απεικονιστικών συστημάτων σε ευρεία φασματική κλίμακα. Αποτελεί επομένως στόχο αιχμής η εξέλιξη και χρήση μη επεμβατικών μεθόδων που θα μπορούσαν να εκτιμήσουν το μέγεθος και την εξέλιξη των νόσων του νευρικού συστήματος, προσφέροντας υψηλής αξίας γνώση και ανάπτυξη εφαρμοσμένης ιατρικής τεχνολογίας.

Η σκλήρυνση κατά πλάκας χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και βλάβες απομυελίνωσης στη λευκή ουσία του κεντρικού νευρικού συστήματος (Bo L, 2009), που οδηγεί σε μόνιμες νευρολογικές αναπηρίες (επακόλουθη αδυναμία στην κινητική λειτουργία και στην αισθητήρια αντίληψη (Franklin RJ. et al, 2008 και Bannerman PG. et al, 2005). Η βασική έρευνα για τη σκλήρυνση κατά πλάκας έχει πραγματοποιηθεί κυρίως στο ζωικό μοντέλο της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) (Tafreshi AP. et al, 2005).

Οι τρέχουσες διαγνωστικές τεχνικές απεικόνισης στην ΕΑΕ, περιορίζονται είτε στη συμβατική είτε στη συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού σε σταθεροποιημένους ιστούς που δείχνουν

νευρωνικές, αξονικές αλλοιώσεις (*Quarles RH. et al, 2006 και Imitola J. et al, 2011*), τη διήθηση των ανοσοκυττάρων (*Evans CL. et al, 2005*), ή σε μια ποικιλία των σύγχρονων μεθόδων (Coherent ant-Stokes Raman scattering - CARS, Diffusion Tensor Imaging, Third Harmonic Generation Microscopy) (*Wang H. et al, 2005 και Farrar MJ. et al, 2011*).

Η μικροσκοπία φθορισμού (ευρέως πεδίου και συνεστιακή) είναι ένα ισχυρό διαγνωστικό εργαλείο το οποίο συνήθως βασίζεται σε τεχνικές ανοσοφθορισμού. Ο ανοσοφθορισμός είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιεί την άκρως ειδική δέσμευση ενός αντισώματος στο αντιγόνο του με σκοπό να αναδειχθούν ειδικές πρωτεΐνες ή άλλα μόρια μέσα στο κύτταρο.

Σκοπός της προτεινόμενης έρευνας είναι η εισαγωγή νέων μη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων βασισμένες στην διεργασίες που συντελούνται κατά την αλληλεπίδραση μη ιοντίζουσας ακτινοβολίας με τους ιστούς. Γίνεται συσχέτιση των αλλοιώσεων της μυελίνης του νευρικού ιστού ποντικών με ΕΑΕ, με τα φασματικά της χαρακτηριστικά.

Η φασματική απεικόνιση συνδυάζει τη φασματοσκοπία και την απεικόνιση. Κάθε ένα από αυτά τα πεδία έχει αναπτυχθεί καλά και χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένων των βιοεπιστημών. Ο συνδυασμός αυτών των τεχνικών δεν είναι, ωστόσο, κάτι τετριμμένο, κυρίως επειδή απαιτεί τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου (3D) συνόλου δεδομένων που περιέχει πολλές εικόνες του ίδιου αντικειμένου, όπου κάθε μία από αυτές μετρείται σε ένα διαφορετικό μήκος κύματος. Αυτό σημαίνει επίσης ότι ο συνολικός χρόνος αποκτήσεως του συνόλου των δεδομένων είναι μεγάλος πράγμα που έρχεται σε αντίθεση με τις απαιτήσεις πολλών βιο-ιατρικών εφαρμογών. Συνεπώς, το ουσιαστικό ζητούμενο είναι να ληφθούν εικόνες υψηλής ποιότητας σε ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα.

Μια βέλτιστη τεχνική για την απόκτηση πολλαπλών φασματικών εικόνων είναι η σύζευξη των ανιχνευτών απεικόνισης με απεικονιστικούς μονοχρωμάτορες. Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την εκμετάλλευση της ανάκλασης και του φθορισμού των δειγμάτων σε φασματικές ζώνες, που κυμαίνονται από το υπεριώδες έως το υπέρυθρο χρησιμοποιώντας ένα μόνο σύστημα κάμερας.

Μια σημαντική συνέπεια του συνδυασμού της απεικόνισης με τη φασματοσκοπία είναι ότι επιτρέπει την επιθεώρηση σε στενές φασματικές ζώνες, μιας περιοχής με ευρύ φασματικό εύρος και την άμεση εκτίμηση των «αόρατων» ή με χαμηλή αντίθεση χαρακτηριστικών με υψηλή διαγνωστική σημασία. Με βάση τα ανωτέρω, φαίνεται ότι η απεικονιστική φασματοσκοπία ανάκλασης και φθορισμού, σε συνδυασμό με διάφορες υπολογιστικές μεθόδους για φασματική ανάλυση και σύγκριση δεδομένων, αποτελεί ένα πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο πολλά υποσχόμενο.

Στη διάρκεια των χρόνων έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος από συστήματα φασματικής απεικόνισης βασίζονται σε μονοχρωμάτορες είτε απεικόνισης είτε φωτισμού του δείγματος (*Marvin E. et al, 2008*).

Οι μονοχρωμάτορες φωτισμού που χρησιμοποιούνται στην αναλυτική φασματοσκοπία βασίζονται σε πρίσματα διασποράς του φωτός. Παρ' όλα αυτά, εμφανίζουν μειονεκτήματα που σχετίζονται με τη χαμηλή απόδοση φωτός, ανομοιόμορφη απόκριση, περιορισμένη φασματική περιοχή εμβέλειας κλπ (*Palmer C, 1995*).

Σε άλλες περιπτώσεις, η τεχνολογία που εφαρμόζεται στους μονοχρωμάτορες φωτισμού περιλαμβάνει μία πηγή φωτός και ένα σύνολο οπτικών φίλτρων που εναλλάσσονται στην διαδρομή της δέσμης φωτός που φωτίζει το αντικείμενο. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται μια κάμερα για να

συλλέξει τη φασματική εικόνα (εξ). Αν και απλή ως τεχνική, ο μονοχρωματικός φωτισμός πάσχει από ορισμένα μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, τα συστήματα που βασίζονται σε αυτή τη διαμόρφωση δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην απεικονιστική φασματοσκοπία φθορισμού και η διαδικασία λήψης εικόνας συχνά επηρεάζεται από τις συνθήκες φωτός του περιβάλλοντος (Thoury M. et al, 2011).

Μια βέλτιστη τεχνική για την απόκτηση πολλαπλών φασματικών εικόνων είναι η σύζευξη των ανιχνευτών απεικόνισης με απεικονιστικούς μονοχρωμάτορες. Η τεχνολογία αυτή επιτρέπει την εκμετάλλευση της ανάκλασης και του φθορισμού των δειγμάτων σε φασματικές ζώνες, που κυμαίνονται από το υπεριώδες στο υπέρυθρο χρησιμοποιώντας ένα μόνο σύστημα κάμερας. Αυτή η τεχνική παρέχει μεγάλες δυνατότητες διάγνωσης, αν και οδηγεί συχνά σε εικόνες υψηλής χωρικής αλλά περιορισμένης φασματικής πληροφορίας (Thoury M. et al, 2011 και Casini A. et al, 1999).

Αν και φασματική απεικόνιση προσδίδει σημαντικά πλεονεκτήματα και πολλά εμπορικά μικροσκόπια, που είναι σήμερα διαθέσιμα, βασίζονται σε αυτή την τεχνική, η τιμή αγοράς και η πολυπλοκότητά τους αποτελούν μερικούς σημαντικούς περιορισμούς στην ευρεία χρήση τους.

Στη συγκεκριμένη εργασία παρουσιάζεται ένα νέο μικροσκόπιο πολυφασματικής απεικόνισης με τη σύζευξη ενός συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης ενσωματωμένου σε ένα εμπορικό μικροσκόπιο. Το βασικό συστατικό του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης που χρησιμοποιείται είναι ένας μονοχρωμάτορας με τροχό φίλτρων διέλευσης (Papadakis V. et al, 2011). Το όλο σύστημα, χαμηλού κόστους παραγωγής, μπορεί να παρέχει αξιόπιστες μετρήσεις με υψηλή χωρική και φασματική ανάλυση. Ο μονοχρωμάτορας ενσωματώνει ένα μονόχρωμο 5MPixel αισθητήρα CMOS με φασματική ανάλυση 30 φίλτρων που καλύπτουν το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα από την περιοχή τους υπεριώδους (400 nm) μέχρι το εγγύς υπέρυθρο (1200 nm).

Το σύστημα είναι ευαίσθητο σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού και εύκολο να ελεγχθεί από τους χρήστες. Το λογισμικό λειτουργίας έχει αναπτυχθεί σε LabView (National Instruments) προγραμματισμό, επιτρέποντας στους χρήστες να χειριστούν εύκολα και να τροποποιήσουν τον κωδικό του, όταν κριθεί απαραίτητο.

Παρουσιάζουμε επίσης τα αποτελέσματα από την εφαρμογή του πολυφασματικού μικροσκοπίου στη μελέτη της μυελίνης των νευρώνων του νωτιαίου μυελού ποντικών σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς στη διάρκεια Πειραματικής Αλλεργικής Εγκεφαλομυελίτιδας (EAE - ένα πειραματικό ζωικό μοντέλο για μελέτη της σκλήρυνσης κατά πλάκας, MS). Τα ευρήματα που ελήφθησαν με το πολυφασματικό μικροσκόπιο συγκρίνονται με εκείνα που πάρθηκαν με συστήματα και μεθόδους ανοσοχημείας και κλασικού ανοσοφθορισμού που αποτελούν ακόμα και σήμερα τα εγκυρότερα εργαλεία που χρησιμοποιούνται στη μελέτη του νωτιαίου μυελού.

Αντιθέτως με τις κλασικές μεθόδους μικροσκοπίας και ανοσοχημείας, η μέθοδος απεικόνισης που εφαρμόστηκε επιτρέπει τη μελέτη της νευρωνικής απομυελίνωσης με ελάχιστες ανάγκες για ειδική επεξεργασία του προς μελέτη ιστού. Η μέθοδος μας επιτρέπει την απεικόνιση και μελέτη της μυελίνης σε σχεδόν *in vivo* συνθήκες, χωρίς οποιαδήποτε:

1) συρρίκνωση των θηκών της, ή καταστροφή της δομής του λιπιδίου της που προκαλείται από εξωγενείς χρωστικές,

2) χρήση δαπανηρών χρωστικών οι οποίες, σε πολλές περιπτώσεις, εισάγουν διαγνωστικές επιπλοκές από την ανεπαρκή διάχυσή τους και τη μη-ειδική δέσμευσή τους στο περιβάλλον του ιστού κατά τη διάρκεια της *in vivo* μελέτης και

3) φόβο για καταστροφή του ιστού από την υψηλή ενέργεια του προσπίπτοντος φωτός καθώς η ενέργεια του φωτός που χρησιμοποιείται είναι πολύ χαμηλή, χωρίς την ανάγκη χρήσης λέιζερ υψηλής ισχύος ή / και μεγάλους χρόνους φωτισμού του δείγματος.

Εκτός των προαναφερθέντων, το σύστημα και η διαγνωστική μέθοδος που αναπτύχθηκε παρέχει σημαντικές διαγνωστικές πληροφορίες υπερνικώντας τα κοινούς περιορισμούς ακόμα και της μικροσκοπίας υπέρυθρου (π.χ. χαμηλή χωρική ανάλυση που προκαλείται από την ισχυρή απορρόφηση του υπέρυθρου φωτός λόγω της παρουσίας του ύδατος στα βιολογικά δείγματα) και παρέχει σημαντικές διαγνωστικές πληροφορίες (*Imitola J. et al, 2006*). Τέλος το γεγονός ότι το φως συλλέγεται στην πάνω επιφάνεια του ιστού αφού αλληλεπιδράσει με εκείνον (στην οπίσθια κατεύθυνση) επιτρέπει δυνητικά, τη μελλοντική χρήση του συστήματος και της μεθόδου στην *in vivo* απεικόνιση ζωικών ιστών.

7.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα πειράματα στα ποντίκια είχαν λάβει την έγκριση της Διεύθυνσης Κτηνιατρικής του Ηρακλείου και διεξήχθησαν σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Ένωσης, του Πανεπιστημίου Κρήτης και των επιτροπών δεοντολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ). Όλες οι ερευνητικές δραστηριότητες έγιναν με την αυστηρή τήρηση των οδηγιών του νόμου 2010/63/ΕΕ της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς. Η στέγαση των ποντικιών στις εγκαταστάσεις του ΙΤΕ (αριθμός άδειας για την εγκατάσταση των ζώων: 3044) ήταν σε πλήρη συμφωνία με τις τοπικές και διεθνείς νομοθεσίες των ζώων.

Τα θηλυκά ποντίκια C57 / BL6 διατηρήθηκαν σε περιβάλλον με περιοδικά εναλλασσόμενο φωτισμό κάθε 12h (τα φώτα άναβαν στις 7 π.μ.) και με κατά βούληση πρόσβαση σε τροφή και νερό. Τα ζώα εξοικειώθηκαν με τις συνθήκες στέγασης για 1 εβδομάδα πριν από την πραγμάτωση των πειραματικών διαδικασιών.

Επαγωγή της ΕΑΕ

Η ΕΑΕ επάχθηκε σε θηλυκά ποντίκια C57BL/6 (B6) (6-10 εβδομάδων). Η ανοσοποίηση έγινε με 100 mg πεπτιδίου MOG35-55 γαλακτωματοποιημένου σε ανοσοενισχυτικό του Freud (CFA Freud's adjuvant, Sigma) χορηγούμενο υποδόρια, στη βάση της ουράς, καθώς και με ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις των 200 ng τοξίνη του κοκκύτη (Sigma) κατά το χρόνο της ανοσοποίησης και 48 ώρες αργότερα. Για τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια που 10 ημέρες μετά την ανοσοποίηση κατέληξαν στην κλινική βαθμολογία 3-4. Η κλινική βαθμολογία της ΕΑΕ ορίζεται ως ακολούθως: 0: δεν υπάρχει νόσος, 1: χαλαρή ουρά, 2: αδυναμία του οπισθίου σκέλους, 3: παράλυση οπισθίου σκέλους, 4: παράλυση οπίσθιου και πρόσθιου σκέλους και 5: προθανάτια κατάσταση.

Πέντε θηλυκά ποντίκια C57/BL6 χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου και τα οποία ανοσοποιήθηκαν μόνο με το CFA και την τοξίνη του κοκκύτη.

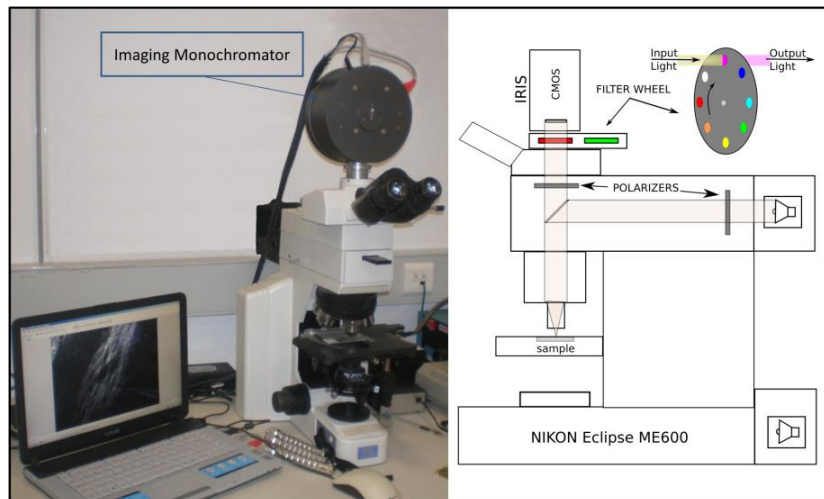
Ανοσοφθορισμός και ιστολογία

Τα ποντίκια αναισθητοποιήθηκαν βαθιά με νατριούχο πεντοβαρβιτάλη (Dolethal, 0.7 ml/kg.) που τους χορηγήθηκε διακαρδιακά, εμπλουτισμένη με ηπαρινισμένο αλατούχο διάλυμα για 3min. Στη συνέχεια τους χορηγήθηκε επίσης παραφορμαλδεΰδη 4%, κορεσμένο πικρικό οξύ 15%, και γλουταραλδεΰδη 0.05% σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) 0,1 M. Συλλέχθηκαν τμήματα από τη σπονδυλική στήλη των ποντικιών αυτών και διατηρήθηκαν στο ίδιο μονιμοποιητικό διάλυμα όλη τη νύκτα στους 4°C. Τα δείγματα πλύθηκαν επιμελώς με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) 0,1M και κατόπιν κόπηκαν με κρυστόμο σε διαμήκεις τομές των 40 ή 50μm. Οι τομές διατηρήθηκαν σε PBS 0,1M με αζίδιο του νατρίου 0,05% στους 4°C μέχρις να υποβληθούν στη μελέτη για ανοσοφθορισμό. Ελεύθερα αιωρούμενες τομές υπεβλήθησαν σε αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με εμποτισμό μίας ώρας σε 5% ορό αλόγου με 0,1% TBST (tris-buffered saline triton). Ακολούθως εμποτίστηκαν όλη τη νύκτα στους 4°C με το αντίσωμα της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης, anti-MBP 1:500 (ab980; Chemicon), το αντίσωμα anti-cluster of

differentiation 3 (anti-CD3, ebiosciences purified Rat anti-mouse CD3) και τέλος με δευτερογενή αντισώματα (Alexa Fluor 488, and 633; 1:1000 σε TBST 0.1%). Οι τομές με την MBP ανοσοχρώση επαναμονοποιήθηκαν σε παγωμένη ακετόνη για 10 λεπτά πριν από τον εμποτισμό με το διάλυμα αποκλεισμού των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης. Τέλος τα δείγματα επικαλύφθηκαν με Antifade Gold με DAPI (Invitrogen) και οι εικόνες αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας είτε μικροσκόπιο φθορισμού (Leica DMLB) εξοπλισμένο με μια φωτογραφική μηχανή DC300 F ή με ένα συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica TCS SP2 Model).

7.2 Σύστημα Πολύ-φασματικής μικροσκοπίας

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το μικροσκόπιο πολυφασματικής απεικόνισης που χρησιμοποιήθηκε (εικόνα 1). Τα κύρια δομικά στοιχεία του μικροσκοπίου πολυφασματικής απεικόνισης είναι: το κυρίως μικροσκόπιο και η διάταξη του απεικονιστικού μονοχρωμάτορα.



Εικόνα 7.2.1: Το μικροσκόπιο πολυφασματικής απεικόνισης.

Ο απεικονιστικός μονοχρωμάτορας είναι τοποθετημένος στην κορυφή του μικροσκοπίου.

Το κυρίως μικροσκόπιο (NIKON Eclipse ME600) είναι εξοπλισμένο με επίπεδους αχρωματικούς αντικειμενικούς φακούς, μια μονάδα φωτισμού και ένα ζεύγος πολωτών [Nikon Microscope ME600 with DIC: Available online]. Ο πρώτος πολωτής είναι τοποθετημένος στη διαδρομή του φωτός, πριν από το επίπεδο του δείγματος και πολώνει το προσπίπτον στο δείγμα φως. Ο δεύτερος πολωτής-αναλυτής τοποθετείται στην οπτική οδό μεταξύ του δείγματος και της κάμερας και πολώνει το οπισθοσκεδαζόμενο φως. Ο πρώτος πολωτής διαθέτει έναν τροχό στο άκρο του καθιστώντας δυνατή τη μεταβολή της κατεύθυνσης της πόλωσης για την επίτευξη της βέλτιστης απεικόνισης χωρίς φαινόμενα κορεσμού της εικόνας. Στην πράξη χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί τύποι πολωτών προκειμένου να πολωθεί τόσο το ορατό όσο και το υπέρυθρο φως.

Το όλο σύστημα απεικόνισης διαθέτει ενσωματωμένο ένα τροχό φίλτρων στον οποίο βασίζεται ο μονοχρωμάτορας απεικόνισης. Η ρύθμιση του μήκους κύματος της απεικόνισης γίνεται ηλεκτρονικά με τη χρήση του υπολογιστή. Στον τροχό των φίλτρων (Εικ. 1) έχει τοποθετηθεί ένα φίλτρο ορατού φωτός (400nm-700nm) και 29 φίλτρα διέλευσης ζώνης (Omega Optical). Τα φίλτρα καλύπτουν το φασματικό εύρος 400 nm-1200nm ως ακολούθως: 13 φίλτρα με εύρος ζώνης 25nm και 25 nm βήμα αλλαγής στο ορατό φάσμα (400 έως 700 nm) και 10 φίλτρα με εύρος ζώνης 25 nm και 50 nm βήμα αλλαγής στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος (700-1200 nm). Όλα τα φίλτρα είναι φτιαγμένα κατά παραγγελία, έτσι ώστε κάθε φίλτρο, επιλεκτικά, να παρέχει μικρό χρωματικό σφάλμα στο σύστημα, επιτρέποντας σε όλα τα μήκη κύματος να έχουν περίπου το ίδιο εστιακό σημείο. Ο τροχός των φίλτρων είναι τοποθετημένος σε ένα περίβλημα από αλουμίνιο, το οποίο παρέχει εύκολη πρόσβαση στις υποδοχές των φίλτρων σε περίπτωση αλλαγής τους, ανάλογα με την εφαρμογή που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί το σύστημα. Ο χρόνος που απαιτείται για την περιστροφή του τροχού των φίλτρων και την σταθεροποίησή του σε νέα θέση φίλτρου είναι της

τάξης των 30ms. Ο ανιχνευτής που είναι ενσωματωμένος στο σύστημα είναι ένας μονόχρωμος CMOS αισθητήρα των 5MPixel (χωρική ανάλυση 2560x1920 εικονοστοιχεία, UI-5480CP-M-GL, IDS GmbH) με φασματική ευαισθησία μεταξύ 400-1200 nm.

Λογισμικό συστήματος

Το χρησιμοποιούμενο λογισμικό είναι σχεδιασμένο με το πρόγραμμα LabView (National Instruments) και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο τόσο της κάμερας και του μονοχρωμάτορα όσο και για τη λήψη και περαιτέρω ανάλυση των εικόνων.

Το σύστημα λειτουργεί με δύο τρόπους: φασματοσκοπικά και φασματομετρικά. Η φασματοσκοπική λειτουργία επιτρέπει τη λήψη, σε πραγματικό χρόνο, των επιθυμητών φασματικών εικόνων ενώ η λειτουργία της φασματομετρίας εκτελεί τη συγχρονισμένη φασματική σάρωση, τη λήψη εικόνας και τον υπολογισμό ενός πλήρους φάσματος σε κάθε εικονοστοιχείο της εικόνας του υπό μελέτη δείγματος (*Papadakis V. et al, 2011*).

Οι προαναφερθείσες διαδικασίες, δηλ. η απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο, η φασματική σάρωση, η αποθήκευση των συλλεγομένων εικόνων και ο υπολογισμός των φασμάτων, ελέγχονται μέσω του λογισμικού. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί τρία μεμονωμένα προγράμματα:

A) Το πρώτο πρόγραμμα χρησιμοποιείται για τον περιορισμό και σχεδόν την κατάργηση του σκοτεινού θορύβου και για την αντιστάθμιση της εξάρτησης της απόκρισης των ηλεκτρο-οπτικών μερών του συστήματος από το μήκος κύματος (flat field correction). Ο σκοτεινός θόρυβος προέρχεται από τη μεγάλη διάρκειας έκθεσης του ανιχνευτή στο φως.

Προκειμένου να εξαλειφθεί ο σκοτεινός θόρυβος, αποθηκεύεται στο σύστημα μια *μαύρη εικόνα* που λαμβάνεται απλά με το φράξιμο του αντικειμενικού φακού. Με τον τρόπο αυτό καταγράφεται η σταθερή εικόνα των θερμικών ηλεκτρονίων. Η θερμική εξάλειψη του θορύβου επιτυγχάνεται στη συνέχεια αφαιρώντας τη μαύρη-εικόνα από τα καταγεγραμμένα δεδομένα. Σε γενικές γραμμές, το επίπεδο θορύβου του αισθητήρα εξαρτάται από το χρόνο που εκείνος συλλέγει φως. Το μέγιστο επίπεδο του σκοτεινού θορύβου που αντιστοιχεί σε συλλογή φωτός για χρόνο 2000 ms είναι μικρότερο από 10/255 και παραμένει σταθερό αν δεν αλλάξει η θερμοκρασία του ανιχνευτή και ο χρόνος συλλογής φωτός. Άλλες πηγές θορύβου, όπως ο θόρυβος Poisson (ή shot noise) (*Garini Y. et al, 2006*) υπάρχουν σε επίπεδα χαμηλότερα από την ευαισθησία του συστήματος.

Η αντιστάθμιση της εξάρτησης της απόκρισης των ηλεκτρο-οπτικών μερών του συστήματος από το μήκος κύματος (flat field correction) πραγματοποιείται, μετά από την εξάλειψη του σκοτεινού θορύβου. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας χρησιμοποιείται, πριν από κάθε σύνολο μετρήσεων, μια λευκή κάρτα αναφοράς με μέγιστη ανακλαστικότητα, που κατασκευάστηκε στο εργαστήριό μας, ως ένα δείγμα βαθμονόμησης. Η κάρτα είναι κατασκευασμένη από λιθοπόνιο (ZnS 30%, BaSO₄ 70%) με ομοιόμορφη ανακλαστικότητα σε όλη τη φασματική περιοχή που μελετάται. Αρχικά, η κάρτα τοποθετείται στο οπτικό πεδίο, του συστήματος και ξεκινά η συλλογή των εικόνων της σε όλα τα μήκη κύματος. Οι αποθηκευμένες φασματικές εικόνες της λευκής κάρτας βαθμονόμησης, *λευκές εικόνες* χρησιμοποιούνται για τη διόρθωση των λαμβανομένων εικόνων του ιστού.

Μετά τη συλλογή της *μαύρης* και των *λευκών εικόνων*, οι ρυθμίσεις του όλου συστήματος απεικόνισης παραμένουν αναλλοίωτες για όλη τη διάρκεια της διαδικασίας μελέτης του δείγματος.

Β) Το δεύτερο πρόγραμμα χρησιμοποιείται για να διορθωθούν πιθανές μετατοπίσεις του οπτικού πεδίου, λόγω εστίασης της εικόνας που λαμβάνει χώρα σε κάθε μήκος κύματος. Η τεχνική βασίζεται σε ένα βασικό αλγόριθμο αναγνώρισης προτύπων: ο χρήστης πρέπει να επιλέξετε από ένα έως τρία χαρακτηριστικά σημεία επάνω στην εικόνα. Κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης, το λογισμικό ανιχνεύει αυτόματα τα επιλεγμένα σημεία πάνω σε κάθε εικόνα και αυτόματα μετατοπίζει την εικόνα στη σωστή θέση ώστε η θέση αυτών των σημείων να παραμένει σταθερή.

Γ) Το τρίτο πρόγραμμα εκτελεί την εξαγωγή ενός πλήρους φάσματος για κάθε εικονοστοιχείο της εικόνας. Αυτή η διαδικασία βασίζεται σε ένα αλγόριθμο (φάσμα από pixel), ο οποίος μπορεί να διαχειριστεί το σύνολο των βαθμονομημένων εικόνων (φασματικός κύβος) και επιτρέπει την εξαγωγή ενός πλήρους φάσματος ανάκλασης από οποιοδήποτε επιλεγμένο εικονοστοιχείο μεμονωμένα ή από κάποια επιλεγμένη περιοχή της εικόνας.

Το σύστημα που βαθμονομείται συνολικά τόσο για την απεικόνιση όσο και για τη φασματοσκοπία επιτρέπει τη συλλογή δεδομένων με αντικειμενικό και επαναλαμβανόμενο τρόπο. Δηλαδή μετά από την σάρωση και συλλογή των εικόνων οποιουδήποτε δείγματος, λαμβάνεται ένας φασματικά και χωρικά αντικειμενικά σωστός φασματικός κύβος.

7.3 Πρωτόκολλο μετρήσεων

Όταν η διαδικασία βαθμονόμησης του συστήματος έχει ολοκληρωθεί με επιτυχία, το υπό εξέταση δείγμα τοποθετείται στο οπτικό πεδίο του φακού και οι υπό εξέταση περιοχές σημειώνονται προκειμένου να διασταυρωθούν με εκείνες που εντοπίζονται με τη χρήση των συμβατικών απεικονιστικών μεθόδων φθορισμού. Στη συνέχεια λαμβάνονται και αποθηκεύονται, διαδοχικά, οι φασματικές εικόνες από το δείγμα. Η διαδικασία συλλογής και αποθήκευσης της εικόνας συγχρονίζεται με τη ρύθμιση του κάθε φίλτρου, ενώ ο χρόνος έκθεσης του ανιχνευτή αλλάζει σε κάθε ζώνη απεικόνισης σύμφωνα με το ήδη καταγεγραμμένο σύνολο δεδομένων της βαθμονόμησης.

Η ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν έδειξε ότι η Παράμετρος Διαφοροποίησης της Έντασης (ΠΔΕ) είναι μια σημαντική παράμετρος που διαγνωστικά δείχνει την απώλεια της μυελίνης και ορίζεται ως εξής:

$$\text{ΠΔΕ}(\lambda) = -\log(I(\lambda)_{\text{lesion}} / I(\lambda)_{\text{wm}})$$

όπου το I_{lesion} αντιπροσωπεύει την ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός από τον αλλοιωμένο ιστό σε κάποια φασματική περιοχή και I_{normal} αντιπροσωπεύει την ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός από τον παρακείμενο υγιή ιστό, στην ίδια φασματική περιοχή. Η ΠΔΕ(λ) εξαρτάται από το μήκος κύματος και υπολογίστηκε για κάθε φασματική ζώνη. Οι τιμές που προκύπτουν μελετώνται συγκριτικά με σκοπό να εντοπιστεί η φασματική περιοχή που διαφοροποιούνται, με τον καλύτερο τρόπο, οι φυσιολογικές από τις αλλοιωμένες περιοχές.

Ο συνολικός χρόνος μελέτης του δείγματος ιστού που περιλαμβάνει την βαθμονόμηση του συστήματος και την επεξεργασία των λαμβανομένων εικόνων είναι της τάξης των λίγων λεπτών.

Όταν η ανωτέρω περιγραφείσα διαδικασία της πολυφασματικής απεικόνισης του δείγματος έχει ολοκληρωθεί, λαμβάνει χώρα η ιστοπαθολογική και βιοχημική ανάλυση του δείγματος με τεχνικές συμβατικής μικροσκοπίας φθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα μικροσκόπια: Leica DMLB με ενσωματωμένη κάμερα DC300 F (οπτικό μικροσκόπιο) και Leica Model TCSSP2 (συνεστιακό μικροσκόπιο). Τα αποτελέσματα της μελέτης που λαμβάνονται με αυτές τις τεχνικές αξιολογούνται συγκριτικά με εκείνα που προέρχονται από την εφαρμογή του μικροσκόπιου της πολυφασματικής απεικόνισης.

Στη διατριβή αυτή παρουσιάζεται ένα πρότυπο μικροσκόπιο πολυφασματικής απεικόνισης και μία μέθοδος για την απεικόνιση, σε ευρεία φασματική περιοχή (400-1200nm), της μυελίνης του νευρικού ιστού ποντικών με πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE). Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί μια νέα, γρήγορη και αποδοτική προσέγγιση για πολλά βιοϊατρικά και άλλου τύπου διαγνωστικά προβλήματα. Το βασικό συστατικό του χρησιμοποιούμενου συστήματος είναι ένας μονοχρωμάτορας με συνδυασμό φίλτρων διέλευσης. Λόγω της υψηλής απόδοσης του μονοχρωμάτορα, δεν υπάρχει ανάγκη φωτισμού υψηλής ισχύος και, ως εκ τούτου δεν απαιτείται η χρήση πηγών φωτός που εκπέμπουν θερμότητα, επιβλαβών για τα οπτικά εξαρτήματα της συσκευής και τον υπό μελέτη ιστό. Οι προδιαγραφές του παραπάνω συστήματος, σε συνδυασμό με το σχετικά χαμηλό κόστος του, διευκολύνει την κλινική εφαρμογή του στη φασματική μικροσκοπία.

Τα φασματικά μικροσκόπια που έχουν αναπτυχθεί γενικά και βασίζονται σε άλλες τεχνολογικές προσεγγίσεις (Thoury, M. et al, 2011), απαιτούν πολύ μεγαλύτερες χρονικές περιόδους (30-40 λεπτά) για την απόκτηση φασματικών εικόνων και δεδομένων και παρέχουν σάρωση σε πολύ μικρότερο φασματικό εύρος. Ορισμένα από αυτά (μεταβλητά φίλτρα υγρών κρυστάλλων, Liquid Crystal Tunable Filters, ακουστο-οπτικά μεταβλητά φίλτρα κ.α.) χαρακτηρίζονται από γρήγορη φασματική σάρωση (χιλιοστά του δευτερολέπτου), αλλά λόγω της χαμηλής διαπερατότητας τους (3% -25%) απαιτείται μεγάλος χρόνος έκθεσης στο φως της κάμερας προκειμένου να ληφθεί μια εικόνα με ικανοποιητική φωτεινότητα και ποιότητα πράγμα που τελικά καθορίζει το συνολικό χρόνο χρήσης του συστήματος.

Ανεξάρτητα για την τεχνολογική προσέγγιση που εφαρμόζεται στους μονοχρωμάτορες των μικροσκοπίων, γενικά, πολλά από αυτά τα συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την κάλυψη των βιοϊατρικών διαγνωστικών απαιτήσεων.

Η σκλήρυνση κατά πλάκας χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και εμφάνιση περιοχών που έχουν υποστεί απομυελίνωση στη λευκή ουσία του ΚΝΣ (Bo L, 2009) γεγονότα που οδηγούν σε μόνιμη νευρολογική αναπηρία (Franklin R.J. et al, 2008 και Bannerman P.G. et al, 2005). Η λευκή ουσία (WM: white matter) είναι ένα από τα δύο βασικά συστατικά του κεντρικού νευρικού συστήματος και αποτελείται κυρίως από νευρογλοιακά κύτταρα και εμύελους νευράξονες. Η φαιά ουσία (GM: grey matter) είναι το δεύτερο κύριο συστατικό του ΚΝΣ που αποτελείται από νευρωνικά κυτταρικά σώματα, νευροπλήματα, νευρογλοιακά κύτταρα και τριχοειδή αγγεία (Kolb B. et al, 2009). Η έρευνα στην πολλαπλή σκλήρυνση έχει προχωρήσει σημαντικά με την χρήση του μοντέλου της EAE σε ποντίκια (Steinbrecher A. et al, 2005), η οποία προσομοιάζει σε μέγιστο βαθμό τις ανθρώπινες νευρο-ανοσολογικές ασθένειες.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η καταστροφή των νευρικών ινών της μυελίνης στο νωτιαίο μυελό ποντικών με EAE, χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο πολυφασματικής απεικόνισης και μια μέθοδο επεξεργασίας των λαμβανομένων δεδομένων. Η αποτελεσματικότητα του συστήματος και της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκαν για να εντοπίσουν και να αναδείξουν περιοχές με απώλεια μυελίνης συγκρίθηκε με τις καθιερωμένες μεθόδους ανοσοφθορισμού και τη χρήση οπτικού και συνεστιακού μικροσκοπίου.

Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη του φθορισμού των δειγμάτων είναι τρεις: ο anti-MBP, ο DAPI και ο CD3.

Η βασική πρωτεΐνη της μυελίνης (MBP: myelin basic protein) είναι μια πρωτεΐνη που διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της μυελίνωσης των νευρών στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το κλασικό γονίδιο MBP που βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 18 (*Saxe DF. et al, 1985*) και εντοπίζεται στο ΚΝΣ και σε διάφορα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος. Αποτελεί σημαντικό δομικό συστατικό του ελύτρου της μυελίνης των ολιγοδενδροκυττάρων και των κυττάρων Schwann στο νευρικό σύστημα. Το έλυτρο της μυελίνης είναι μια πολυστρωματική μεμβράνη, μοναδική για το νευρικό σύστημα, που λειτουργεί ως μονωτής για να αυξήσει σημαντικά την ταχύτητα αγωγιμότητας της αξονικής ώσης (*Sakamoto Y. et al, 1987*). Η MBP διατηρεί τη σωστή δομή της μυελίνης, αλληλεπιδρώντας με τα λιπίδια που υπάρχουν στη μεμβράνη της μυελίνης (*Deber CM. et al, 1991 και Kirschner IH. et al, 1991*).

Η MBP βρίσκεται στο επίκεντρο της μελέτης διαφόρων απομυελινωτικών ασθενειών, ιδίως, της σκλήρυνσης κατά πλάκας (MS). Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει το ρόλο αντισωμάτων ενάντια στην MBP, στην παθογένεση της σκλήρυνσης κατά πλάκας (*Berger T. et al, 2003*).

Το DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) είναι μια εγγενώς φθορίζουσα χρωστική η οποία δεσμεύεται στο DNA των νουκλεϊκών οξέων και με τον εκπεμπόμενο φθορισμό του αναδεικνύει την ύπαρξη εμπύρηνων κυττάρων. Η πρόσδεση του DAPI στο DNA επιφέρει περίπου 20-πλάσια ενίσχυση του φθορισμού του. Ο μπλε φθορισμός του ξεχωρίζει έντονα από τον πράσινο, κίτρινο, ή κόκκινο φθορισμό κάποιων άλλων χρωστικών.

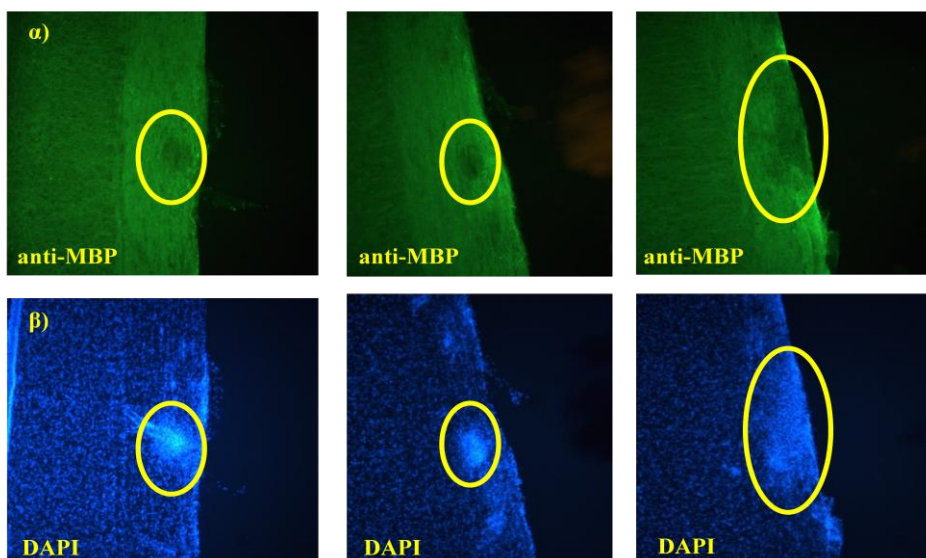
Η διείδυση των T-κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, στην κατεστραμμένη περιοχή του νωτιαίου μυελού, μπορεί να αποτυπωθεί μέσω του φθορισμού του CD3. Ο υποδοχέας αντιγόνου των T λεμφοκυττάρων (TCR: cell antigen receptor) αναγνωρίζει τα ξένα αντιγόνα. Αυτή η αναγνώριση επιφέρει την εμφάνιση ενδοκυτταρικών σημάτων που προκαλούν αλλαγή στο κύτταρο και τη μετάβασή του από μια λανθάνουσα σε μια ενεργοποιημένη κατάσταση. Μεγάλο μέρος αυτής της διαδικασίας σηματοδότησης μπορεί να αποδοθεί σε ένα σύμπλοκο πολλαπλών υπομονάδων πρωτεϊνών που συσχετίζει άμεσα με τον TCR. Αυτό το συγκρότημα έχει ονομαστεί συστάδα διαφοροποίησης 3, CD3 (cluster of differentiation 3).

Μελετήθηκαν συνολικά 36 τομές που προέρχονταν από 15 ποντίκια στα οποία η ΕΑΕ είχε αναπτυχθεί και φθάσει σε κλινική βαθμολογία 3-4 (28 τομές) και 5 ποντίκια που προέρχονταν από την ομάδα ελέγχου (8 τομές). Οι προαναφερθείσες τομές μελετήθηκαν τόσο με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης όσο και με το οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού και το σύστημα του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού. Οκτώ τομές δεν έδειξαν καμία απώλεια μυελίνης και 28 τομές είχαν 56 περιοχές με απώλεια μυελίνης (διαγνωσμένες σύμφωνα με τις συμβατικές τεχνικές του ανοσοφθορισμού και της ανοσοχημείας).

8.1 Απεικόνιση του φθορισμού τομών νευρικού ιστού με οπτικό και συνεστιακό μικροσκόπιο

Απεικόνιση του φθορισμού με οπτικό μικροσκόπιο

Κατά τη μελέτη ενός δείγματος με οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού, το υπό εξέταση δείγμα φωτίζεται ομοιόμορφα και ολόκληρο από μια πηγή φωτός και έτσι είναι άμεσα ορατό. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται ο φθορισμός των δεικτών anti-MBP και DAPI μιας τομής νευρικού ιστού ποντικίου με EAE.



Εικόνα 8.1.1: Απεικόνιση του φθορισμού, με οπτικό μικροσκόπιο, τομής νευρικού ιστού ποντικίου με EAE με χρήση του δείκτη anti-MBP (α) και DAPI (β).

α) Στην περιοχή της βλάβης ο φθορισμός είναι μειωμένος λόγω των κατεστραμμένων νευρικών ιών και κατ' επέκταση της απουσίας της βασικής δομικής πρωτεΐνης της μυελίνης, MBP και β) Στην περιοχή της βλάβης ο φθορισμός του DAPI είναι έντονος λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης εμπύρηνων ανοσοκυττάρων που επάγεται η καταστροφή των νευρικών ιών. Στην περιοχή γύρω από τη βλάβη, ο φθορισμός είναι σχεδόν ανύπαρκτος πράγμα που μαρτυρά την παρουσία των απύρηνων κυττάρων της μυελίνης.

Η περιοχή της βλάβης εντοπίζεται εντός του κίτρινου κύκλου.

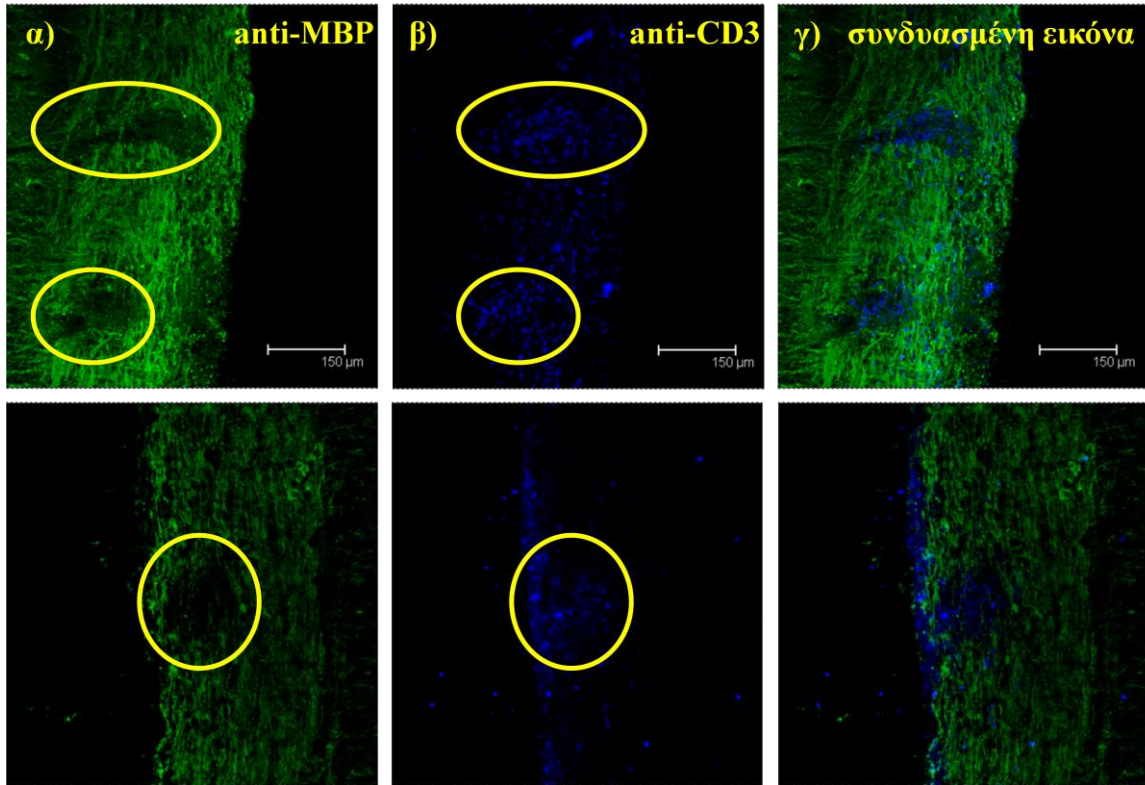
Στην εικόνα 8.1.1α απεικονίζεται ο φθορισμός της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP), ενός σημαντικού δείκτη των δομών μυελίνης (Kolb B. et al, 2009 και Imitola J. et al, 2006) και στην εικόνα 8.1.1β απεικονίζεται ο φθορισμός του DAPI που καταγράφηκαν με ένα συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο.

Στην περιοχή της βλάβης ο φθορισμός της MBP είναι μειωμένος λόγω των κατεστραμμένων νευρικών ιών και κατ' επέκταση της απουσίας της βασικής δομικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP) από την περιοχή (εικόνα 8.1.1α). Επίσης, στην περιοχή της βλάβης ο φθορισμός του DAPI είναι έντονος λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης εμπύρηνων ανοσοκυττάρων που επάγεται η αυτοάνοση αντίδραση λόγω της καταστροφής των νευρικών ιών (εικόνα 8.1.1β). Στην περιοχή γύρω από τη βλάβη, ο φθορισμός είναι σχεδόν ανύπαρκτος πράγμα που μαρτυρά την παρουσία των απύρηνων κυττάρων της μυελίνης.

Απεικόνιση του φθορισμού με συνεστιακό μικροσκόπιο

Το συνεστιακό μικροσκόπιο προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι του συμβατικού οπτικού μικροσκοπίου συμπεριλαμβανομένου του έλεγχου του βάθους πεδίου και της ικανότητας συλλογής σειριακών οπτικών τομών υψηλής ανάλυσης ακόμα και από παχιά δείγματα.

Στην παρακάτω εικόνα 8.1.2 φαίνονται οι εικόνες φθορισμού από μια τομή νωτιαίου μυελού ποντικού με ΕΑΕ.



Εικόνα 8.1.2: Απεικόνιση του φθορισμού, με συνεστιακό μικροσκόπιο, τομής νευρικού ιστού ποντικού με ΕΑΕ με χρήση του δείκτη anti-MBP και CD3.

α) Στην περιοχή της βλάβης ο φθορισμός του anti-MBP είναι μειωμένος λόγω των κατεστραμμένων νευρικών ινών και κατ' επέκταση της απουσίας της βασικής δομικής πρωτεΐνης της μυελίνης, MBP και β) Στην περιοχή της βλάβης ο φθορισμός του CD3 είναι έντονος λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης των T-λεμφοκυττάρων που επάγεται η ανοσολογική απόκριση, γ) Συγχώνευση των εικόνων α και β.

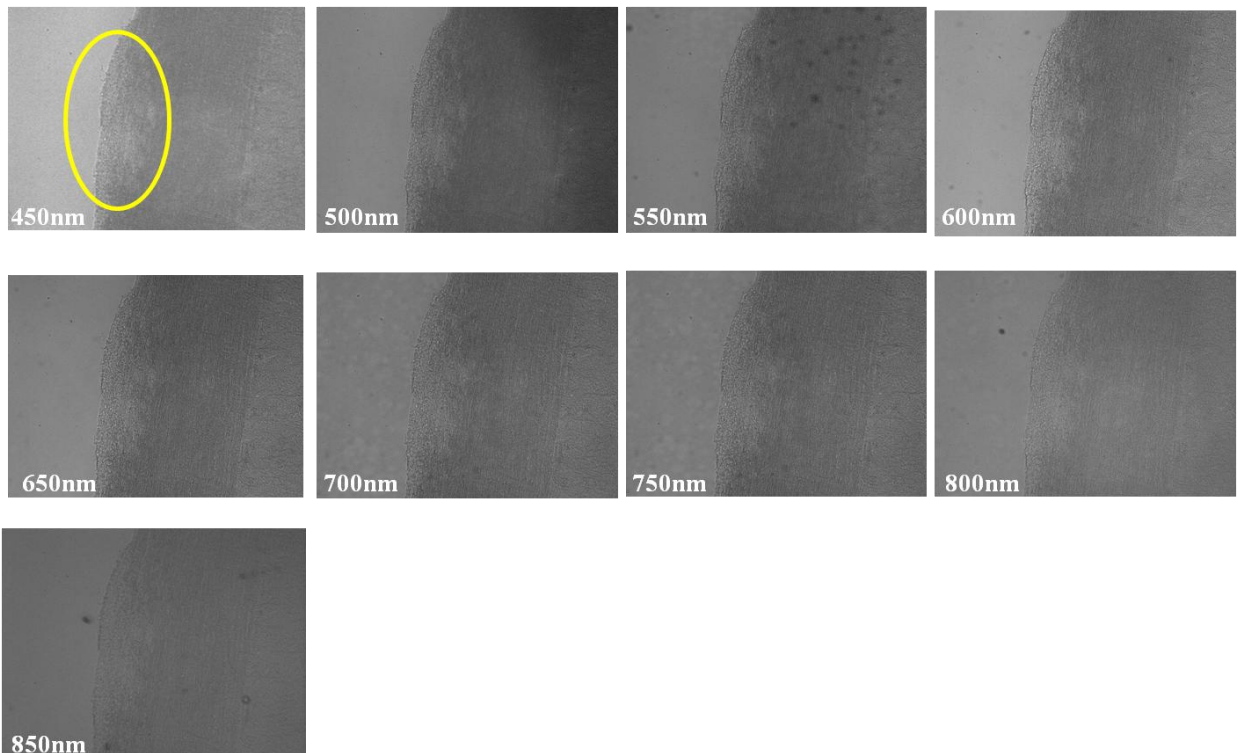
Η περιοχή της βλάβης εντοπίζεται εντός του κίτρινου κύκλου.

Όπως και στην εικόνα 8.1.1α που καταγράφηκε με το συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού έτσι και στην εικόνα 8.8.2α που λήφθηκε με το συνεστιακό μικροσκόπιο, ο φθορισμός της MBP διαχέεται εντός του ιστού, εκτός από την περιοχή της βλάβης, όπου η μυελίνη είναι απύσχα. Στην εικόνα 8.1.2β φαίνεται ο φθορισμός του CD3, ενός δείκτη που αναδεικνύει τη διείσδυση των T λεμφοκυττάρων της ανοσολογικής απόκρισης, στις περιοχές που εμφανίζουν απώλεια μυελίνης (Exley M. et al, 1999).

8.2 Απεικόνιση της ανάκλασης τομών νευρικού ιστού με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης

Όταν μία φωτεινή ακτίνα που διαδίδεται σε ένα μέσο, συναντήσει τη διαχωριστική επιφάνεια ανάμεσα στο αρχικό μέσο διάδοσης και ένα άλλο, τότε ένα μέρος της αρχικής ακτίνας ανακλάται (επιστρέφει), πίσω στο αρχικό μέσο διάδοσης. Καθώς τα φωτόνια εισέρχονται σε ένα υλικό, μερικά ανακλώνται από τις επιφάνειες υλικού, κάποια περνάνε μέσα από το υλικό, και μερικά απορροφώνται. Γενικά, η φασματοσκοπία ανάκλασης αναφέρεται στη συλλογή τόσο του διαχέομενου φωτός όσο και των επιφανειακών συνιστωσών της ανάκλασης. Δηλαδή ένα μέρος του φωτός που συλλέγεται και αναλύεται έχει υποστεί πολλαπλές σκεδάσεις στο εσωτερικό του ιστού και κάποιο άλλο μέρος προέρχεται από την απλή επιφανειακή ανάκλαση. Το είδος του φωτός που θα συλλεχθεί στην περίπτωση της απεικόνισης καθορίζεται από τη χρήση ή μη πολωτικών φίλτρων. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση πολωτικών φίλτρων στην πορεία του φωτός που προσπίπτει στον ιστό και στην πορεία του φωτός που φτάνει στον ανιχνευτή επιτρέπει τη συλλογή του φωτός που προέρχεται κυρίως από την εσωτερική σκέδαση του στον ιστό. Αντίστοιχα, η μη χρήση πολωτικών φίλτρων ενισχύει τη λαμβανόμενη πληροφορία από την επιφάνεια του ιστού.

Σε αρκετές βλάβες έγινε αρχικά η απεικόνισή τους βασισμένη στην ανάκλαση του φωτός. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται μία τυπική σειρά απεικόνισης τομής νευρικού ιστού ποντικού με ΕΑΕ που καταγράφηκε με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης.



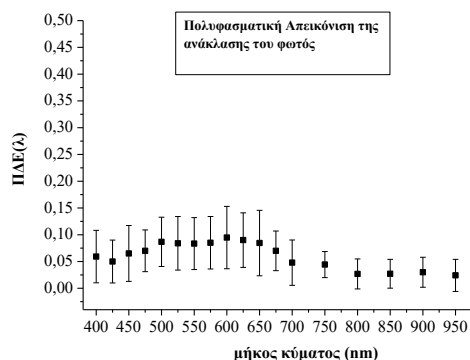
Εικόνα 8.2.1: Πολυφασματική απεικόνιση βασισμένη στην ανάκλαση του φωτός, τομής νευρικού ιστού ποντικού με ΕΑΕ. Η περιοχή της βλάβης (κίτρινος κύκλος) είναι δυσδιάκριτη λόγω του επιφανειακά ανακλώμενου φωτός που φτάνει στον ανιχνευτή.

Από τις εικόνες της ανάκλασης που ελήφθησαν σε ποικίλες φασματικές περιοχές φαίνεται ότι η περιοχή της βλάβης είναι δυσδιάκριτη σε σχέση με την περιβάλλουσα υγιή περιοχή. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι το συλλεγόμενο φως που φτάνει στον ανιχνευτή και που έχει τη μεγαλύτερη ένταση είναι αυτό που έχει υποστεί κυρίως επιφανειακή ανάκλαση. Στον ανιχνευτή φτάνει και φως που έχει υποστεί σκέδαση εντός του ιστού, αλλά λόγω εξασθένησης της έντασής του «υπερκαλύπτεται» από το επιφανειακά ανακλώμενο φως.

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η λαμβανόμενη οπτική πληροφορία από τις εικόνες της πολυφασματικής απεικόνισης υπολογίστηκε, για το σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκαν, και παραστάθηκε γραφικά η παράμετρος ΠΔΕ (παραμέτρος διαφοροποίησης της έντασης) σε συνάρτηση με το μήκος κύματος. Η ΠΔΕ ορίζεται από την ακόλουθη μαθηματική σχέση:

$$ΠΔΕ(λ) = -\log(I(λ)_{lesion} / I(λ)_{wm})$$

όπου το I_{lesion} αντιπροσωπεύει την ένταση του ανακλώμενου φωτός από τον αλλοιωμένο ιστό σε κάποια φασματική περιοχή και I_{normal} αντιπροσωπεύει την ένταση του ανακλώμενου φωτός από τον παρακείμενο υγιή ιστό, στην ίδια φασματική περιοχή. Η ΠΔΕ(λ) εξαρτάται από το μήκος κύματος και υπολογίστηκε για κάθε φασματική ζώνη. Τα αποτελέσματα αναπαριστώνται στο γράφημα 8.2.1.

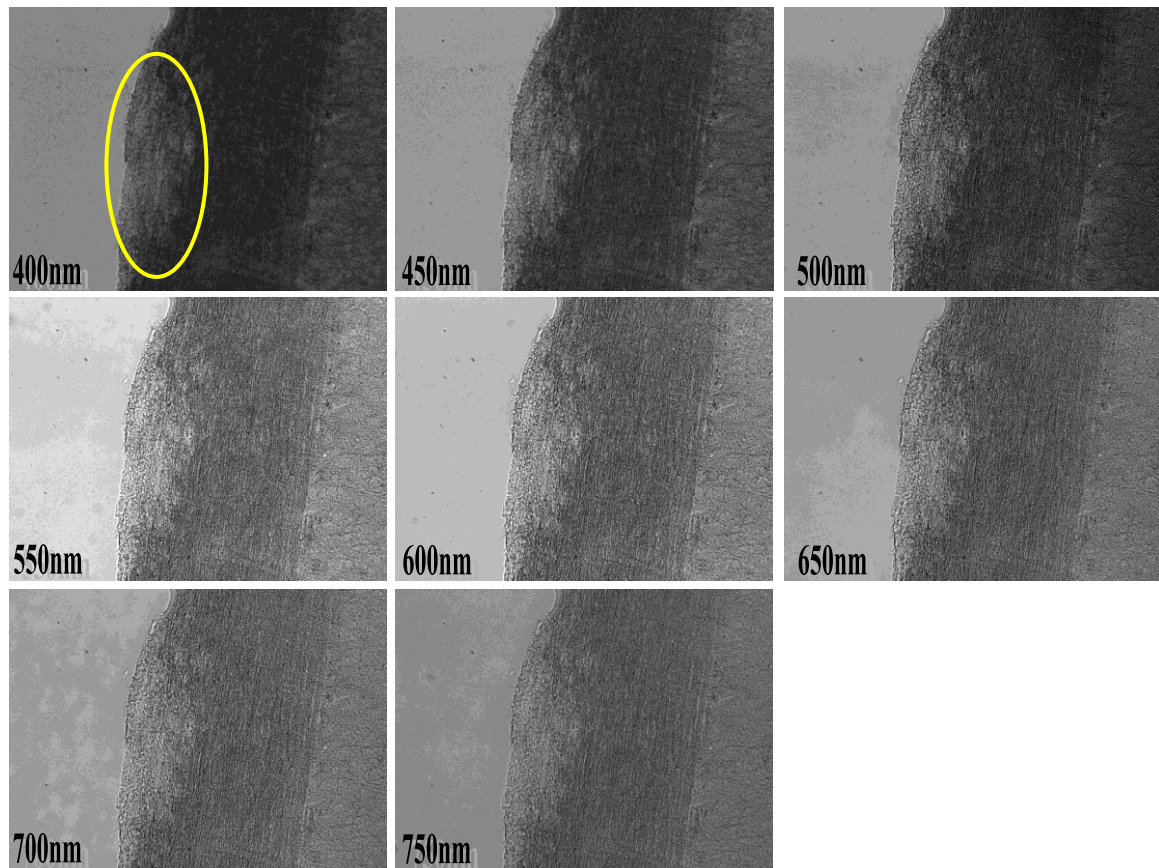


Γράφημα 8.2.1: Γραφική παράσταση της παραμέτρου διαφοροποίησης της έντασης (ΠΔΕ) και της τυπικής απόκλισης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος στην περίπτωση της απεικόνισης της ανάκλασης του φωτός. Η ΠΔΕ δεν παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές.

Όπως προαναφέρθηκε, η περιοχή της βλάβης (κίτρινος κύκλος στις εικόνες 8.2.1) είναι δυσδιάκριτη συγκριτικά με την περιβάλλουσα υγιή περιοχή. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από τη γραφική παράσταση της ΠΔΕ, αφού δεν υπάρχει μεγάλη διακύμανση στις τιμές της παραμέτρου. Πιο συγκεκριμένα οι τιμές κυμαίνονται από το 0,03-0,09 και τα σφάλματα των μετρήσεων είναι αρκετά αυξημένα. Τα μη ικανοποιητικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την καταγραφή της ανάκλασης των τομών του νευρικού ιστού οδήγησαν στην εκ νέου απεικόνιση του συνόλου των τομών των νευρικών ιστών των πονικιών με ΕΑΕ με βάση την απεικόνιση της διαπερατότητας της κάθε τομής.

8.3 Απεικόνιση της διαπερατότητας τομών νευρικού ιστού με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης

Προκειμένου να διερευνηθεί ο βέλτιστος τρόπος απεικόνισης των βλαβών σε τομές του νευρικού ιστού ποντικών με ΕΑΕ, έγινε απεικόνιση της διαπερατότητας των τομών σε ποικίλες φασματικές περιοχές. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται μία τυπική σειρά απεικόνισης τομής νευρικού ιστού ποντικού με ΕΑΕ που συλλέχθηκε με το πολυφασματικό μικροσκόπιο.



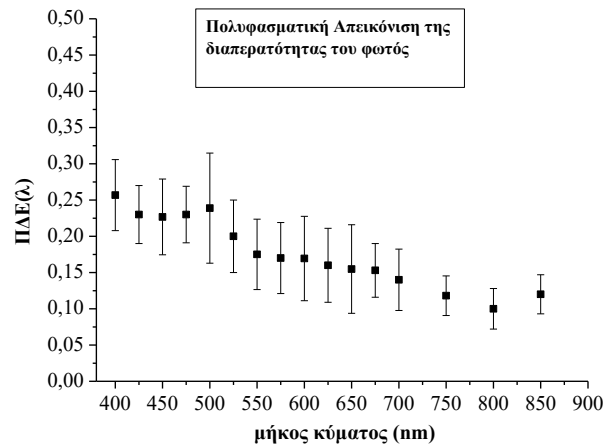
Εικόνα 8.3.1: Απεικόνιση με το πολυφασματικό μικροσκόπιο της διαπερατότητας τομής νευρικού ιστού ποντικού με ΕΑΕ σε ποικίλες φασματικές περιοχές. Στον κίτρινο κύκλο εντοπίζεται η περιοχή με τη βλάβη της μυελίνης.

Από τις εικόνες της διαπερατότητας είναι φανερό ότι η περιοχή της βλάβης (κίτρινος κύκλος) είναι ευδιάκριτη συγκριτικά με την περιβάλλουσα υγιή περιοχή.

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η λαμβανόμενη οπτική πληροφορία από τις εικόνες της πολυφασματικής απεικόνισης υπολογίστηκε, για το σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκαν, και παραστάθηκε γραφικά η παράμετρος ΠΔΕ (παραμέτρου διαφοροποίησης της έντασης) σε συνάρτηση με το μήκος κύματος. Η ΠΔΕ ορίζεται από την ακόλουθη μαθηματική σχέση:

$$\text{ΠΔΕ}(\lambda) = -\log(I(\lambda)_{\text{lesion}} / I(\lambda)_{\text{wm}})$$

όπου το I_{lesion} αντιπροσωπεύει την ένταση του ανακλώμενου φωτός από τον αλλοιωμένο ιστό σε κάποια φασματική περιοχή και I_{normal} αντιπροσωπεύει την ένταση του ανακλώμενου φωτός από τον παρακείμενο υγιή ιστό, στην ίδια φασματική περιοχή. Η ΠΔΕ(λ) εξαρτάται από το μήκος κύματος και υπολογίστηκε για κάθε φασματική ζώνη. Τα αποτελέσματα αναπαριστώνται στο γράφημα 8.3.1.



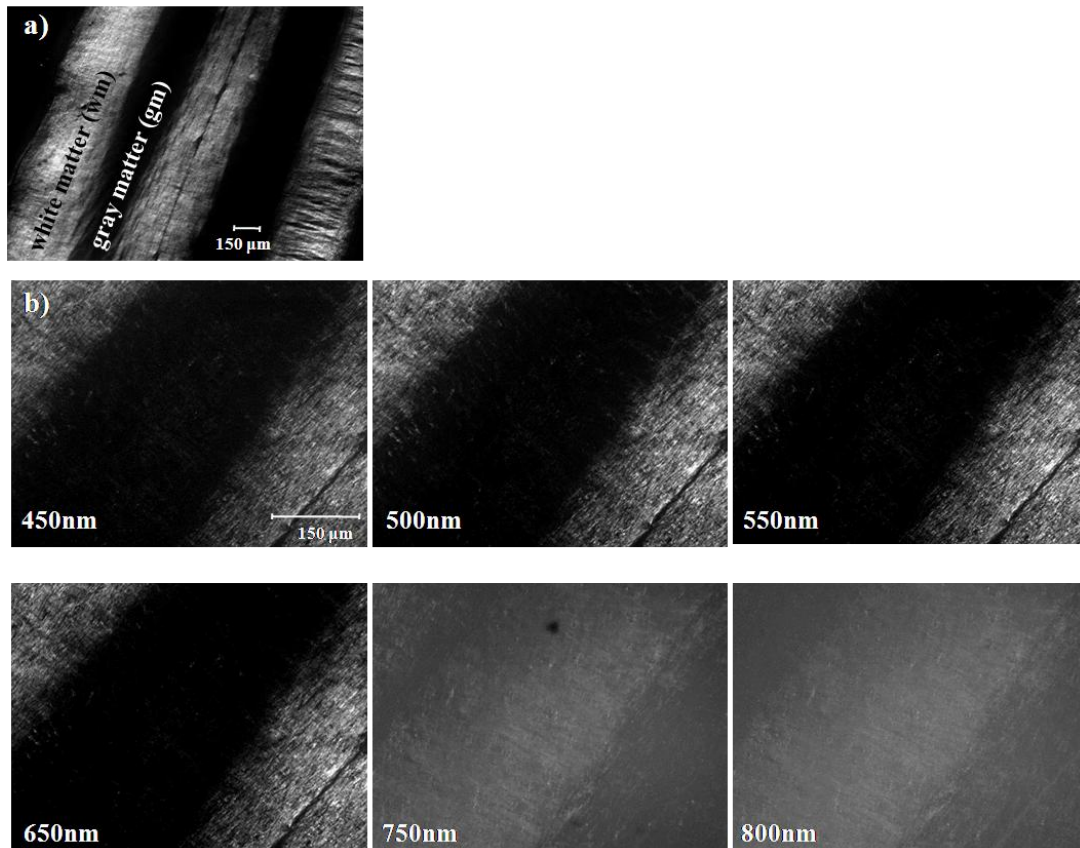
Γράφημα 8.3.1:Γραφική παράσταση της παραμέτρου διαφοροποίησης της έντασης (ΠΔΕ) και της τοπικής απόκλισης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος στην περίπτωση της απεικόνισης της διαπερατότητας του φωτός.

Όπως προαναφέρθηκε, από τις εικόνες της διαπερατότητας είναι φανερό ότι η περιοχή της βλάβης είναι ευδιάκριτη συγκριτικά με την περιβάλλουσα υγιή περιοχή. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από τη γραφική παράσταση της ΠΔΕ, αφού υπάρχει ικανοποιητική διακύμανση στις τιμές της παραμέτρου. Πιο συγκεκριμένα οι τιμές κυμαίνονται από το 0,1-0,26. Αν και η πολυφασματική απεικόνιση της διαπερατότητας του φωτός αναδεικνύει ικανοποιητικά την περιοχή στην οποία η μυελίνη έχει υποστεί βλάβη η μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί στην *in vivo* μελέτη δειγμάτων που είναι και ο απώτερος στόχος της έρευνας.

8.4 Απεικόνιση της σκέδασης τομών νευρικού ιστού με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης

Ένα μέρος του φωτός που συλλέγεται από τον ανιχνευτή και αναλύεται έχει υποστεί πολλαπλές σκεδάσεις στο εσωτερικό του ιστού και κάποιο άλλο μέρος προέρχεται από απλή επιφανειακή ανάκλαση. Το φως που προέρχεται από την επιφανειακή ανάκλαση φέρει πληροφορίες για την επιφανειακή κατάσταση του ιστού. Το φως που έχει υποστεί πολλαπλές σκεδάσεις στο εσωτερικό του ιστού και εξερχόμενο φτάνει στον ανιχνευτή ονομάζεται απισθοσκεδαζόμενο φως (backscattered light) και φέρει σημαντικές πληροφορίες για την εσωτερική δομή του ιστού. Προκειμένου να ενισχυθεί η εν τω βάθει πληροφορία και να περιοριστεί η επιφανειακή πληροφορία, έγινε χρήση 2 ζευγαριών πολωτών (ένα ζευγάρι πολωτών για την απεικόνιση στο ορατό μέρος του φάσματος και ένα ζευγάρι για την απεικόνιση στην υπέρυθη περιοχή). Ο πρώτος πολωτής χρησιμεύει για την πόλωση του προσπίπτοντος φωτός στο δείγμα και ο δεύτερος πολωτής (αναλυτής) πολώνει το φως που επιστρέφει από το δείγμα, αφού αλληλεπιδράσει με τον υπό μελέτη ιστό. Ρυθμίζοντας το επίπεδο πόλωσης του αναλυτή μπορεί να επιτευχθεί η μεγιστοποίηση της λαμβανόμενης οπτικής πληροφορίας.

Στην εικόνα 8.4.1 φαίνεται ένα επιλεγμένο σύνολο τυπικών εικόνων οπισθοσκεδαζόμενου φωτός που συλλέχθηκε με το πολυφασματικό μικροσκόπιο σε διάφορες φασματικές περιοχές. Η τομή του νευρικού ιστού έχει πάχος 40μm και ελήφθη από φυσιολογικό ποντίκι. Η τομή απεικονίστηκε αρχικά στην περιοχή των 500nm (εικόνα 8.4.1a) με ένα 5× αντικειμενικό φακό και κατόπιν σαρώθηκε με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης (εικόνα 8.4.1b) και ένα 10× αντικειμενικό φακό.



Εικόνα 8.4.1: Εικόνες φυσιολογικού τμήματος νωτιαίου μυελού που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης, (a) Τυπική εικόνα που ελήφθηκε στην περιοχή των 500nm με ένα 5× φακό. Η απεικόνιση του νωτιαίου μυελού στη διεπαφή μεταξύ λευκής ουσίας (white matter, wm) και φαιάς ουσίας (gray matter, gm) δείχνει την αυξημένη ένταση του οπισθοσκεδαζόμενου σήματος στη λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού, (b) Επιλεγμένες τυπικές εικόνες, σε ποικίλες φασματικές περιοχές, με μεγαλύτερη μεγέθυνση 10×. Η επιλεκτική απεικόνιση αναδεικνύει τα όρια μεταξύ της λευκής και της φαιάς ουσίας σε τομές του νευρικού ιστού. Το πάχος της τομής είναι 50μm.

Η λευκή ουσία (white matter, wm) είναι το ένα από τα δύο βασικά συστατικά του κεντρικού νευρικού συστήματος και αποτελείται κυρίως από νευρογλοιακά κύτταρα και μυελινωμένους νευράξονες. Η φαιά ουσία (grey matter, gm) είναι το δεύτερο κύριο συστατικό του κεντρικού νευρικού συστήματος, που αποτελείται από σώματα νευρωνικών κυττάρων, νευροπλημμμάτων (δενδρίτες και αμύελους νευροάξονες), νευρογλοιακά κύτταρα (αστρογλοία και ολιγοδενδροκύτταρα) και τριχοειδή αγγεία (Kolb B. et al, 2009). Η φαιά ουσία περιέχει νευρικά κυτταρικά σώματα, σε αντίθεση με τη λευκή ουσία, η οποία δεν περιέχει και ως επί το πλείστον περιέχει εμμύελα νευροαξονικά τμήματα (Malik Z. et al, 1998).

Είναι σαφές από την εικόνα 8.4.1a, ότι το οπισθοσκεδαζόμενο σήμα αυξάνεται στην περιοχή της λευκής ουσίας, λόγω των άφθονων νευραξόνων, ενώ το πρόσθιο σώμα των νευρικών κυττάρων και οι денδρίτες έχουν χαμηλή ανακλαστικότητα. Η επιλεκτική απεικόνιση αναδεικνύει με σαφήνεια τα όρια μεταξύ της λευκής και της φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού (εικόνα 8.4.1a).

Στην εικόνα 8.4.2b, επιλέχθηκαν τυπικές εικόνες της ίδιας τομής φυσιολογικού ιστού που ελήφθησαν με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης. Το πάχος της συγκεκριμένης τομής είναι 40μm. Το οπισθοσκεδαζόμενο σήμα είναι σαφώς αυξημένο στην περιοχή της λευκής ουσίας. Ο ιστός γίνεται σταδιακά διαφανής σε μεγάλα μήκη κύματος (υπέρυθρη φασματική

περιοχή), με τα σύνορα μεταξύ της wm και της gm να είναι δύσκολα ανιχνεύσιμα σε εικόνες πάνω από τα 800nm.

8.5 Συγκριτικά αποτελέσματα μετρήσεων στο νευρικό ιστό

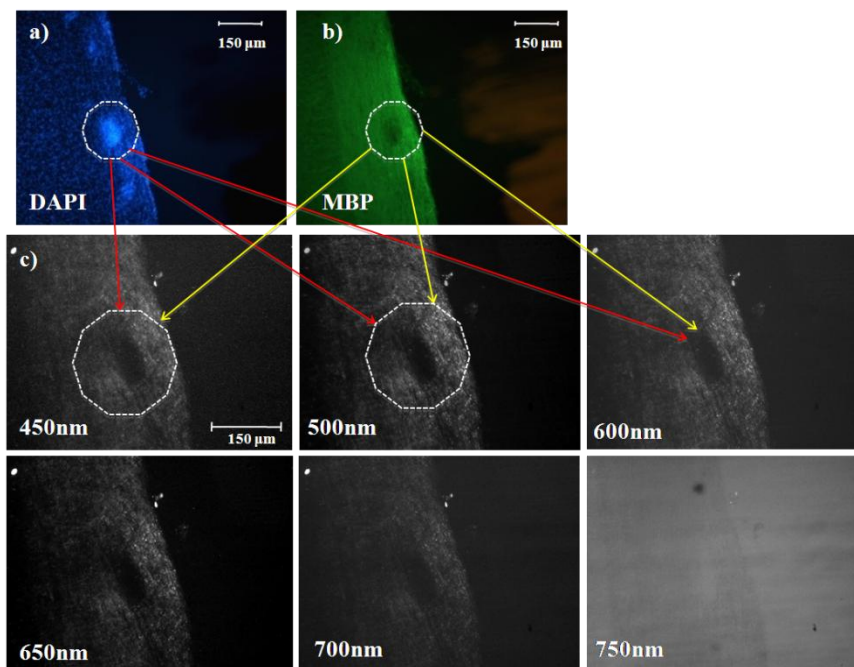
Η αξιοπιστία των λαμβανόμενων αποτελεσμάτων με το πολυφασματικό μικροσκόπιο ελέγχθηκε συγκριτικά με εκείνα που ελήφθησαν με το οπτικό και το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού και τις εφαρμοζόμενες με αυτά μεθόδους, μέσω της συγκριτικής απεικόνισης αλλοιωμένων περιοχών σε ιστούς νωτιαίου μυελού ποντικών με πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (EAE). Στη σκλήρυνση κατά πλάκας και στην EAE, η απομυελίνωση και η νευρωνική δυσλειτουργία συνδέονται με φλεγμονώδεις αλλοιώσεις (Holleya J. et al, 2010).

Σύγκριση αποτελεσμάτων μικροσκοπίου πολυφασματικής απεικόνισης με εκείνα του οπτικού μικροσκοπίου

Η διαγνωστική αποτελεσματικότητα του συστήματος μικροσκοπίου πολυφασματικής απεικόνισης συγκρίθηκε με εκείνη του οπτικού μικροσκοπίου φθορισμού βασισμένου σε τεχνικές ανοσοφθορισμού.

Σε ένα οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού, το σύνολο του δείγματος φωτίζεται ταυτόχρονα και ομοιόμορφα από μια πηγή φωτός και η εικόνα του είναι άμεσα ορατή.

Στην εικόνα 8.5.1 φαίνεται ο φθορισμός του DAPI (εικόνα 8.5.1a) και της MBP (εικόνα 8.5.1b) που καταγράφηκε με ένα οπτικό μικροσκόπιο. Η ίδια περιοχή της βλάβης απεικονίστηκε και με το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης (εικόνα 8.5.1c).



Εικόνα 8.5.1: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ενός τμήματος ιστού πάχους 40μm που προέρχεται από τον νωτιαίο μυελό ενός ποντικού με EAE. Οι κύκλοι δείχνουν τη περιοχή με βλάβης της μυελίνης a) φθορισμός του DAPI που απεικονίστηκε με συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού και ένα 20× αντικειμενικό φακό, b) φθορισμός της MBP που απεικονίστηκε με συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού και ένα 20× αντικειμενικό φακό, c) εικόνες που συλλέχθηκαν σε διαφορετικές φασματικές περιοχές με το μικροσκόπιο πολυφασματικής απεικόνισης (αντικειμενικός φακός 10×) και που αναδεικνύουν την περιοχή της βλάβης με πλήρη απώλεια του οπισθοσκεδαζόμενου σήματος.

Στην εικόνα 8.5.1a φαίνεται ο φθορισμός του DAPI σε τομή του νωτιαίου μυελού ποντικού που απεικονίστηκε με συμβατικό μικροσκόπιο φθορισμού. Το DAPI αποτελεί εγγενώς φθορίζον μόριο που ενώνεται με τη διπλή έλικα του DNA και έτσι αναδεικνύει τα εμπύρρινα κύτταρα μέσω του φθορισμού του. Η πυκνότητα των φθορίζοντων μορίων στην περιοχή της βλάβης είναι αυξημένη σε σχέση με τη γειτονική περιοχή. Η αυξημένη διείσδυση των κυττάρων στην περιοχή της βλάβης είναι αποτέλεσμα της επαγωγής της ανοσολογικής απόκρισης και της αύξησης της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που επέφερε η χορήγηση της τοξίνης του κοκκύτη.

Εκτός από τη χρήση του DAPI, ως φθορίζουσα χρωστική χρησιμοποιήθηκαν και τα αντισώματα της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (myelin basic protein, MBP). Η MBP είναι η βασική πρωτεΐνη της μεμβράνης του κεντρικού νευρικού συστήματος και θεωρείται ότι είναι πολύ σημαντικός δείκτης στη διαδικασία της απομυελίνωσης των νευρών καθώς περιβάλλει τους άξονες των νευρώνων στο ΚΝΣ (Kolb B. et al, 2009 και Imitola J. et al, 2006). Η εικόνα 8.5.1b δείχνει το φθορισμό της MBP. Στην περιοχή της βλάβης δεν ανιχνεύεται ο φθορισμός των anti-MBP κάτι που υποδεικνύει την απουσία της μυελίνης. Η βλάβη παρουσιάζεται ως μια μαύρη τρύπα επάνω στον πράσινο φθορισμού του υποβάθρου.

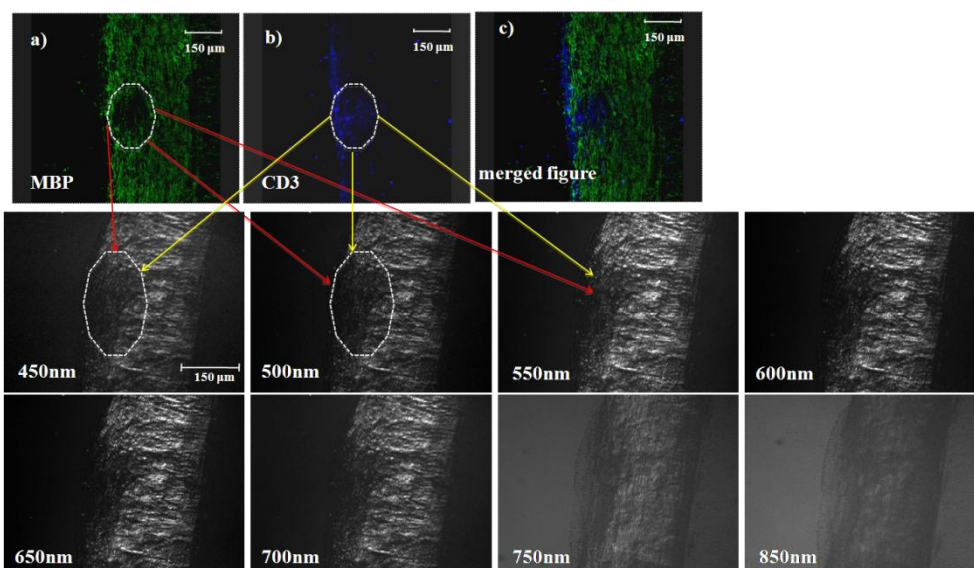
Η διαγνωστική ακρίβεια του συστήματος του πολυφασματικού μικροσκοπίου ελέγχθηκε συγκριτικά με εκείνη του συμβατικού οπτικού μικροσκοπίου φθορισμού, μέσω της συγκριτικής απεικόνισης των ίδιων βλαβών. Στην εικόνα 8.5.3c φαίνεται ένα τυπικό σύνολο εικόνων της παραπάνω βλάβης που λήφθηκε με το πολυφασματικό μικροσκόπιο. Σε αυτές τις εικόνες, η περιοχή με κατεστραμμένη μυελίνη παρουσιάζεται ως μαύρη τρύπα σε ένα ανοιχτόχρωμο φόντο και τα όρια της βλάβης είναι καλά καθορισμένα στις περισσότερες από τις παρουσιαζόμενες φασματικές ζώνες. Η προσβεβλημένη περιοχή γίνεται βαθμιαία διαφανής και είναι δύσκολα ανιχνεύσιμη στην εικόνα των 750nm, λόγω του περιορισμένου πάχους της τομής (40μm).

Συγκρίνοντας την εικόνα που καταγράφηκε με το μικροσκόπιο φθορισμού, εικόνα 8.5.1a, με τις εικόνες που έχουν ληφθεί με το πολυφασματικό μικροσκόπιο, εικόνα 8.5.1c, μπορεί εύκολα να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το πολυφασματικό σύστημα αναδεικνύει την περιοχή με απώλεια μυελίνης με πολύ ικανοποιητικό τρόπο. Τα ίδια συμπεράσματα προέρχονται από τη σύγκριση των εικόνων που έχουν ληφθεί με το μικροσκόπιο φθορισμού και το δείκτη anti-MBP και το (Εικ. 1b) και των αντίστοιχων εικόνων που ελήφθησαν με το πολυφασματικό μικροσκόπιο (εικόνα 8.5.1c).

Σύγκριση αποτελεσμάτων μικροσκοπίου πολυφασματικής απεικόνισης με εκείνα του συνεστιακού μικροσκοπίου

Η συνεστιακή μικροσκοπία προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι της συμβατικής οπτικής μικροσκοπίας περιλαμβανομένου του ελέγχου του βάθους του πεδίου, της ικανότητας συλλογής σειριακά οπτικών τομών από παχιά δείγματα, την υψηλής ποιότητας εικόνα κλπ.

Στην εικόνα 8.5.2 φαίνονται οι εικόνες που έχουν ληφθεί από μία νέα τομή του ιστού του νωτιαίου μυελού ποντικού με ΕΑΕ.



Εικόνα 8.5.2: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ενός τμήματος ιστού που προέρχεται από τον νωτιαίο μυελό ενός ποντικού με EAE (πάχος τομής 50μm). Οι κύκλοι υποδεικνύουν την περιοχή της βλάβης a) εικόνα της τομής που δείχνει το φθορισμό της MBP που λήφθηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο και ένα 20× αντικειμενικό φακό b) εικόνα της τομής που δείχνει το φθορισμό του CD3 που λήφθηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο και ένα 20× αντικειμενικό φακό c) συγχώνευση των εικόνων a και b, d) εικόνες που λήφθηκαν με το πολυφασματικό μικροσκόπιο σε διαφορετικές φασματικές περιοχές και οι οποίες δείχνουν την πλήρη απώλεια του οπισθοσκεδαζόμενου σήματος.

Στη συγκεκριμένη σειρά μελετών χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες MBP και CD3.

Όπως και στην περίπτωση της συμβατικής μικροσκοπίας φθορισμού (εικόνα 8.5.1b) έτσι και στη συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού (εικόνα 8.5.2a), ο φθορισμός της MBP διαχέεται εντός του ιστού, εκτός από την περιοχή της βλάβης, όπου η μυελίνη είναι απύσχα.

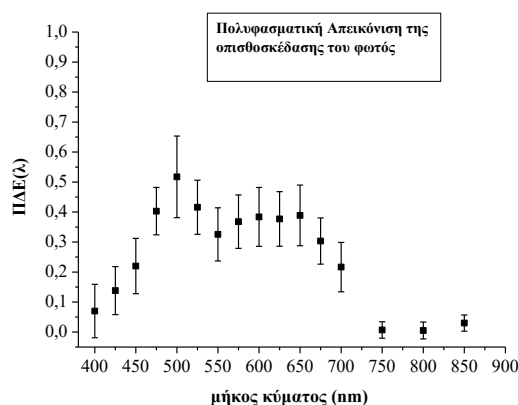
Προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα εμπύρνα κύτταρα που συγκεντρώθηκαν στην περιοχή της βλάβης έγινε χρώση των τομών του νωτιαίου μυελού με αντισώματα έναντι του αντιγόνου CD3. Στην ανοσολογία το anti-CD3 προσδένεται στη μεμβράνη των T-λεμφοκυττάρων και ουσιαστικά σε κανένα άλλο κυτταρικό τύπο. Λόγω της υψηλής εξειδίκευσής του καθίσταται ένας χρήσιμος δείκτης των T-λεμφοκυττάρων (Exley M. et al, 1999) που συσσωρεύονται σε περιοχές φλεγμονής και χρησιμοποιήθηκε για να απεικονιστεί η διήθηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η διήθηση των T λεμφοκυττάρων που είναι εμφανής μέσα από το φθορισμό του δείκτη CD3, εντοπίζεται στην αλλοιωμένη περιοχή λόγω της απώλεια της μυελίνης (εικ. 8.5.2b). Μολονότι η συνεστιακή μικροσκοπία είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τις βιολογικές μελέτες, ο φθορισμός που χρησιμοποιείται ευρέως φαίνεται να έχει σημαντικούς περιορισμούς λόγω του αυξημένου, εκτός εστίας, θορύβου.

Η ίδια περιοχή της τομής απεικονίστηκε με το σύστημα του πολυφασματικού μικροσκοπίου, σε διαφορετικά μήκη κύματος (εικ. 8.5.2d). Στις αυτές φαίνεται η διαφορετική ανακλαστικότητα μεταξύ της φυσιολογικής περιοχής και της περιοχής που παρουσιάζει απώλεια μυελίνης. Η σύγκριση των εικόνων αυτών με εκείνες του φθορισμού (εικ. 8.5.2a, b) πιστοποιεί την αποτελεσματικότητα της πολυφασματικής απεικόνισης στον εντοπισμό περιοχών με απώλεια μυελίνης.

Αν και οι αλλοιωμένες περιοχές του νωτιαίου μυελού απεικονίζονται ως μια μαύρη τρύπα στην ορατή φασματική περιοχή (εικ. 8.5.1c, 8.5.2d), αυτό αναστρέφεται στην υπέρυθη φασματική

ζώνη. Η περιοχή με τη βλάβη της μυελίνης φαίνεται να είναι πιο ανοιχτόχρωμη από εκείνη της γειτονικής φυσιολογικής περιοχής.

Σε μια προσπάθεια να ποσοτικοποιηθεί το λαμβανόμενο σήμα του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός, υπολογίστηκε η παράμετρος διαφοροποίησης της έντασης (ΠΔΕ) ως προς το μήκος κύματος, για κάθε σύνολο επιλεγμένων περιοχών. Κάθε σημείο του φάσματος ΠΔΕ(λ) υπολογίστηκε μέσω της μέσης τιμής της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός όλων των εικονοστοιχείων των περιοχών του ενδιαφέροντος. Οι επιλεγμένες περιοχές περικλείονταν σε μια ελλειπτική ζώνη, εντός και εκτός της βλάβης. Τα εικονοστοιχεία των δύο ελλειπτικών περιοχών είχαν επιλεγεί χειροκίνητα: η πρώτη περιοχή να περικλείει τη μεγαλύτερη δυνατή επιφάνεια στην περιοχή της βλάβης και η δεύτερη να περικλείει μία περιοχής ισοδύναμης έκτασης φυσιολογικού ιστού περί της βλάβης. Το σύνολο των μετρήσεων αυτών επαναλήφθηκε από δύο διαφορετικούς χρήστες. Το ενσωματωμένο λογισμικό στο πολυφασματικό μικροσκόπιο υπολογίζει και προβάλλει στην οθόνη του υπολογιστή, την ΠΔΕ(λ) από μετρήσεις της έντασης των εικονοστοιχείων για κάθε σύνολο επιλεγμένων εικόνων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην ακόλουθη γραφική παράσταση:



Γράφημα 8.5.1: Ποσοτικοποίηση του σήματος στις απομυελωμένες περιοχές τομών του νωτιαίου μυελού ποντικών με EAE: η παράμετρος διαφοροποίησης της έντασης (ΠΔΕ) (\pm SD, τυπική απόκλιση) σε σχέση με το μήκος κύματος. Η ΠΔΕ(λ) μεγιστοποιείται στα 500nm, υποδεικνύοντας το μήκος κύματος στο οποίο επιτυγχάνεται η μέγιστη διάκριση μεταξύ βλάβης και παρακαείμενης φυσιολογικής περιοχής.

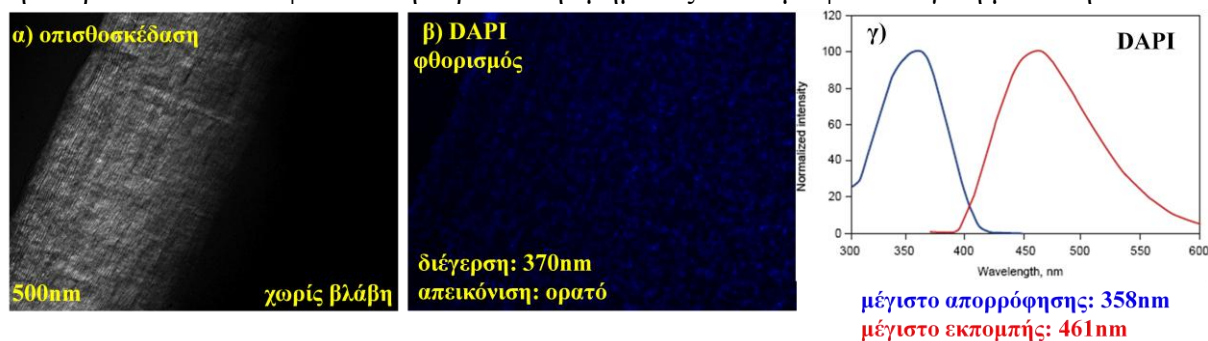
Στο παραπάνω γράφημα παρουσιάζονται οι ΠΔΕ(λ) τιμές (\pm SD) σε συνάρτηση με το μήκος κύματος που προήλθαν από τη μελέτη ενός αριθμού δειγμάτων τομών από ιστό ποντικών με EAE. Η παράμετρος διαφοροποίησης της έντασης (ΠΔΕ(λ)) αποκτά τη μέγιστη τιμή της στην περιοχή του ορατού φάσματος πράγμα που σημαίνει ότι ο ιστός πρέπει να απεικονιστεί στην περιοχή των 500nm προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη ανάδειξη των αλλοιωμένων περιοχών.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ευαισθησία και η θετική πρόγνωση της μεθόδου στον εντοπισμό των περιοχών που η μυελίνη είναι απύσχα, μελετήθηκαν 36 τομές νευρικού ιστού. Σε 8 τομές δεν παρουσιάστηκε απώλεια μυελίνης και σε 28 τομές εντοπίστηκαν περιοχές με κατεστραμμένη μυελίνη. Η διάγνωση αυτή ορίστηκε και επιβεβαιώθηκε με βάση τις κλασικές μεθόδους ανοσοφθορισμού που ακολουθεί η μικροσκοπία φθορισμού. Το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης εντόπισε αποτελεσματικά 47 από τις 56 βλάβες που είχαν διαγνωστεί με τις πρότυπες μεθόδους ανοσοφθορισμού (αληθώς θετικά, true positives: TP). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε δεν εντόπισε 5 περιοχές με βλάβες (ψευδώς αρνητικά, false negative: FN), ενώ σε τέσσερις αλλοιωμένες περιοχές, τα αποτελέσματα της ανάλυσης ήταν ασαφή, λόγω της

καταστροφής του ιστού κατά τη διάρκεια σταθεροποίησης του δείγματος (ψευδώς θετικό, false positive: FP). Έτσι, η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε στο 90,4% ($TP / (TP + FN)$) και η θετική προγνωστική αξία στο 92,2% ($PPV = TP / (TP + FP)$) σε σύγκριση με τις μεθόδους του ανοσοφθορισμού που εφαρμόστηκαν.

Σε μια τελική προσπάθεια προκειμένου να διερευνηθούν οι περαιτέρω δυνατότητες του μικροσκοπίου της πολυφασματικής απεικόνισης, στο τελευταίο κομμάτι της μελέτης έγινε επιλεκτική απεικόνιση του φθορισμού των δεικτών που είχαν εφαρμοστεί στις τομές, με αυτό. Ως πηγές διέγερσης χρησιμοποιήθηκαν LEDs με διαφορετικό μήκος κύματος εκπομπής και η απεικόνιση του φθορισμού έγινε σε διάφορες φασματικές περιοχές, ανάλογα με το μέγιστο εκπομπής του κάθε δείκτη.

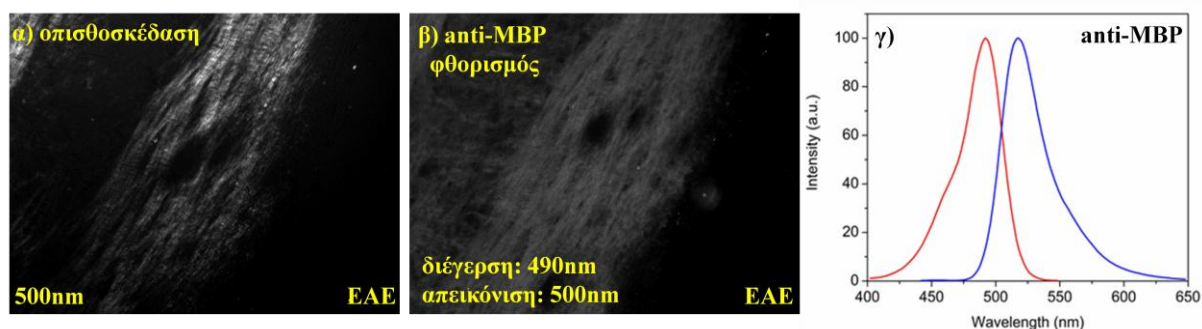
Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η περίπτωση τμήματος ιστού με φυσιολογική μυελίνη.



Εικόνα 8.5.3: απεικόνιση ιστού με φυσιολογική κατανομή μυελίνης, με το πολυφασματικό μικροσκόπιο: α) του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός στη φασματική περιοχή των 500nm, β) του φθορισμού του δείκτη DAPI στο ορατό και με διέγερση στα 370nm, γ) φάσμα απορρόφησης και εκπομπής του δείκτη DAPI.

Στην εικόνα 8.5.3α απεικονίστηκε το οπισθοσκεδαζόμενο φως από φυσιολογική τομή ποντικού στη φασματική περιοχή των 500nm. Στην εικόνα 8.5.3β φαίνεται ο φθορισμός του δείκτη DAPI που καταγράφηκε σε όλη την περιοχή του ορατού φωτός με διέγερση του ιστού στα 370nm. Όπως φαίνεται από την εικόνα 8.5.3γ το φάσμα εκπομπής του DAPI είναι αρκετά ευρύ και καλύπτει όλη σχεδόν την περιοχή του ορατού.

Στην εικόνα 8.5.4 φαίνεται η περίπτωση τμήματος ιστού του νωτιαίου μυελού ποντικού με ΕΑΕ.



Εικόνα 8.5.4: απεικόνιση με το πολυφασματικό μικροσκόπιο: α) του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός στη φασματική περιοχή των 500nm, β) του φθορισμού του anti-MBP δείκτη στα 500nm και με διέγερση στα 490nm, γ) φάσμα απορρόφησης και εκπομπής του anti-MBP δείκτη.

Στην εικόνα 8.5.4α απεικονίστηκε το οπισθοσκεδαζόμενο φως από τομή ποντικού με ΕΑΕ στη φασματική περιοχή των 500nm. Στην εικόνα 8.5.4β φαίνεται ο φθορισμός του δείκτη anti-MBP

που καταγράφηκε στην περιοχή των 500nm. Όπως φαίνεται από την εικόνα 8.5.4β ο φθορισμός εκτείνεται σε όλη τη φυσιολογική περιοχή ενώ η περιοχή της βλάβης στερείται φθορισμού κάτι που είναι απόλυτα συμβατό με εκείνο το μοτίβο που παρατηρείται στις εικόνες 8.5.1b και 8.5.2a που ελήφθησαν με το οπτικό και το συνεστιακό μικροσκόπιο αντίστοιχα.

8.6 Μελέτη της καταστροφής των κυτάρων του βυθού του οφθαλμού με την πολυφασματική απεικόνιση

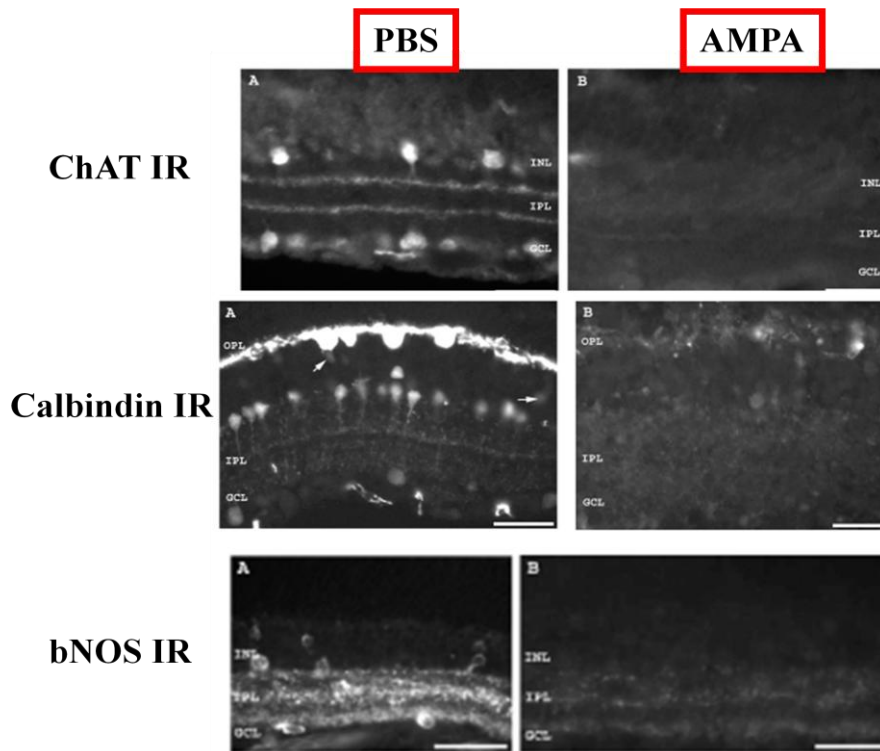
Η αμφιβληστροειδής ισχαιμία οδηγεί σε νεοαγγείωση και απώλεια των κυττάρων του αμφιβληστροειδή χιτώνα ενώ εμπλέκεται σε πολλές παθήσεις του οφθαλμού όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια (καταστροφή των αμακρινικών και των γαγγλιακών κυττάρων), η προώρη αμφιβληστροειδοπάθεια, ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας με την πάροδο των ετών και το γλαύκωμα (καταστροφή των γαγγλιακών κυττάρων) (Osborne *et al.*, 2004). Παρά την ταχεία ανάπτυξη νέων φαρμακολογικών και χειρουργικών τεχνικών, η θεραπεία που εφαρμόζεται οδηγεί πολύ συχνά σε χαμηλής ποιότητας τελική οπτική οξύτητα (Ferrara N. *et al.*, 2006). Μόλις πρόσφατα, δόθηκε έμφαση στη θεραπεία της νευροεκφύλισης (ισχαιμία επαγόμενη από εξωγενή τοξικότητα-απόπτωση) και στα φλεγμονώδη συστατικά των παθήσεων του αμφιβληστροειδούς. Αυτές οι συνιστώσες αποτελούν τη βάση των μηχανισμών που οδηγούν στο θάνατο των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, στη μείωση της οπτικής οξύτητας και στην τύφλωση.

Νέες νευροπροστατευτικές στρατηγικές έχουν πρόσφατα μελετηθεί για την πρόληψη του θανάτου των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (Kokona D. *et al.*, 2012).

Στην προσπάθεια να ελεγχθεί η πολυφασματική απεικόνιση στον εντοπισμό της καταστροφής των κυττάρων του αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού, απεικονίστηκε μια σειρά τομών στις οποίες είχε επαχθεί τοξικότητα με τη χρήση του AMPA ((RS)-alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hydrobromide) με μεθόδους ανοσοφθορισμού και με τη μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης. Η τοξικότητα που επάγεται η χορήγηση του AMPA θεωρείται ότι αποτελεί ένα πολύ καλό μοντέλο μελέτης της καταστροφής των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς (αμακρινικών και οριζόντιων), χρήσιμο στην κατανόηση των αρχικών γεγονότων της παθοφυσιολογίας της ισχαιμίας αλλά και για τη δοκιμή νέων νευροπροστατευτικών ουσιών έναντι στην τοξικότητα του AMPA.

Οι ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν βασίστηκαν στη χρήση των αντισωμάτων των δεικτών ChAT (choline acetyltransferase), bNOS (brain nitric oxide synthetase) και calbindin. Η εφαρμογή του AMPA επέφερε την απώλεια του σήματος των bNOS, ChAT και calbindin, 24 ώρες μετά την εφαρμογή του. Στα ποντίκια που χρησιμοποιήθηκαν ως την ομάδα ελέγχου χορηγήθηκε PBS (phosphate-buffer saline).

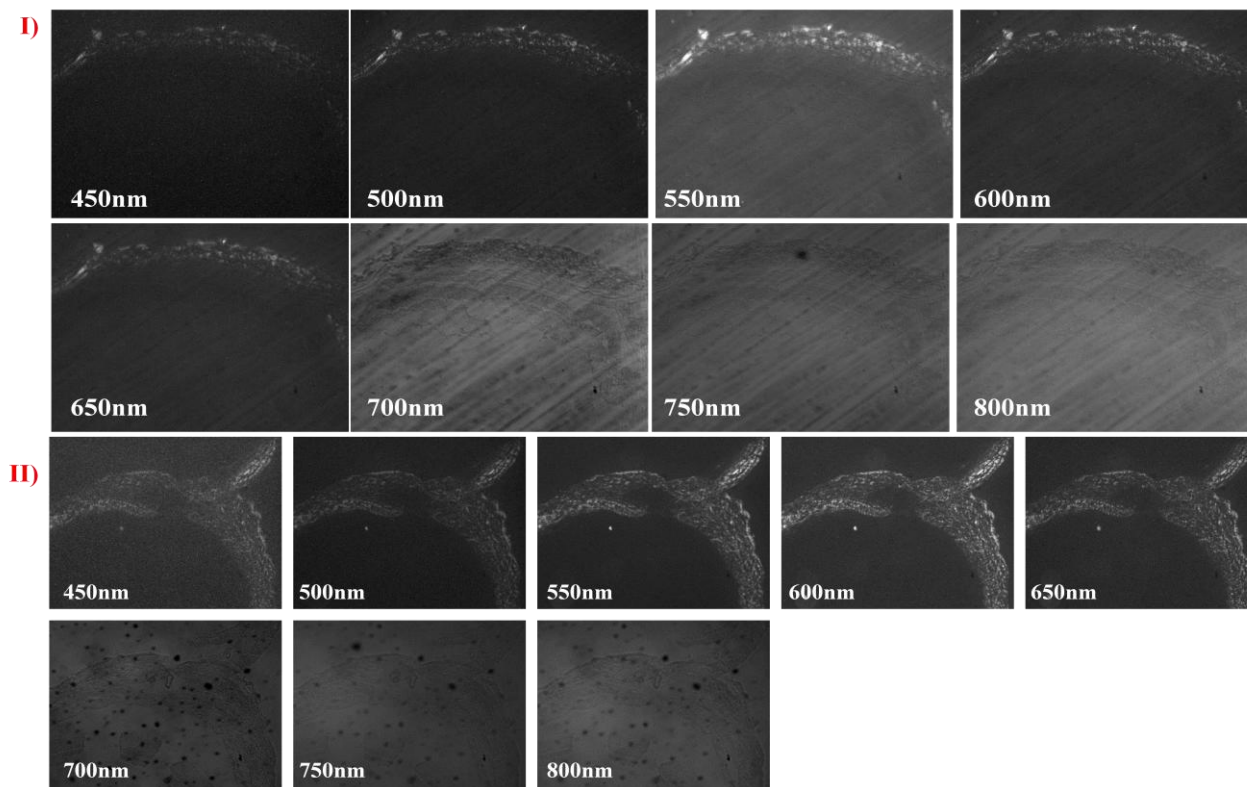
Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται ο φθορισμός των προαναφερθέντων δεικτών σε τομές του αμφιβληστροειδούς που εφαρμόστηκε το PBS και το AMPA και που ελήφθησαν με συνεστιακό μικροσκόπιο.



Εικόνα 8.6.1: Απεικόνιση της καταστροφής των κυττάρων του αμφιβληστροειδούς που επιφέρει η επαγόμενη τοξικότητα της χορήγησης του AMPA. (A) Απεικόνιση της ανοσοαντιδραστικότητας του δείκτη ChAT, Calbindin και bNOS σε τομές ελέγχου με PBS και (B) σε τομές με AMPA. Scale bar: 20 μ m. Τα προβαλλόμενα δεδομένα προέρχονται από τη διδακτορική διατριβή της κα Δ. Κοκονά [Kokona D, Charalampopoulos I. et al. *The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement*. *Neuropharmacology*. 2012; 62: 2106-2117].

Στις τομές ελέγχου (PBS, A) η ανοσοαντιδραστικότητα του δείκτη ChAT εντοπίζεται στα αμακρινικά κύτταρα της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας (INL: inner nuclear layer), στα μετατοπισμένα αμακρινικά κύτταρα της στιβάδας των γαγγλιακών κυττάρων (GCL: ganglion cell layer) και στην εσωτερική δικτυωτή στιβάδα (IPL: inner plexiform layer) (εικ. 8.6.1A). Παρατηρήθηκε πλήρης απώλεια της ανοσοαντιδραστικότητας του δείκτη ChAT στις τομές του αμφιβληστροειδούς στις οποίες χορηγήθηκε AMPA (εικ. 8.6.1B). Η calbindin είναι μια πρωτεΐνη δέσμευσης του ασβεστίου η οποία συνιστά ένα κλασικό κυτταρικό δείκτη για τα οριζόντια κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, για τα κωνικά διπολικά και για τα αμακρινικά κύτταρα που περιέχουν την calbindin. Στην παρούσα μελέτη η ανοσοαντιδραστικότητα του δείκτη calbindin-IR εντοπίστηκε στα οριζόντια κύτταρα της απομακρυσμένης εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας (INL) και στις διαδικασίες τους στην εξωτερική δικτυωτή στιβάδα (OPL), σε ένα μικρό πληθυσμό κωνικών διπολικών κυττάρων καθώς και στα αμακρινικά κύτταρα της εσωτερικής κοκκώδους στιβάδας (INL) που περιέχουν την calbindin, τομών ελέγχου. Στις τομές του αμφιβληστροειδούς στις οποίες χορηγήθηκε το AMPA δεν παρατηρήθηκε ανοσοαντιδραστικότητα της calbindin (Kokona D. et al, 2012). Τέλος, ο δείκτης bNOS-IR εντοπίστηκε στα αμακρινικά κύτταρα στην INL και στην GCL στιβάδα και στις διαδικασίες της IPL στιβάδας στις τομές που είχε γίνει εφαρμογή του PBS. Η χορήγηση του AMPA στο υαλώδες υγρό προκάλεσε την εξασθένηση της ανοσοαντιδραστικότητας του bNOS-IR.

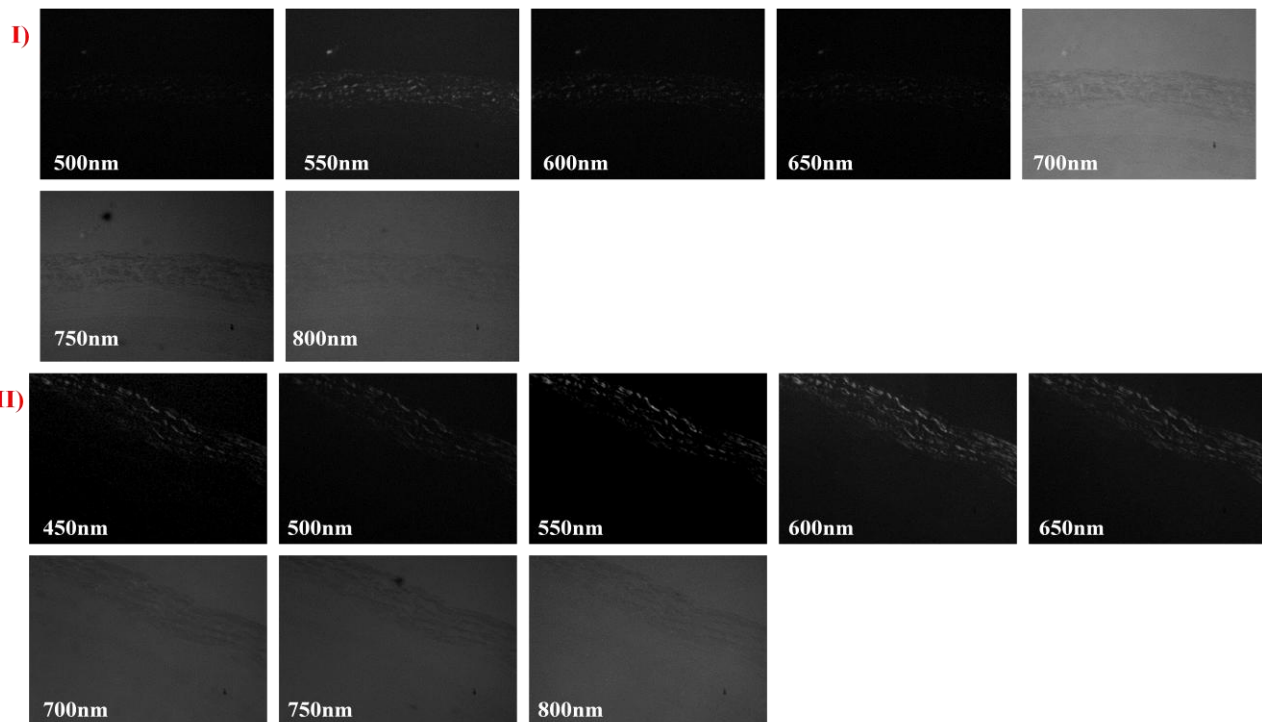
Προκειμένου να ελεγχθεί η ισχύς της πολυφασματικής απεικόνισης στην ανίχνευση του κυτταρικού θανάτου που επάγεται η τοξικότητα της χορήγησης του AMPA έγινε σάρωση των τομών με το αναπτυχθέν πολυφασματικό μικροσκόπιο. Στην εικόνα 8.6.2 απεικονίζονται μερικές τυπικές εικόνες από δύο διαφορετικές τομές που ελήφθησαν με το πολυφασματικό μικροσκόπιο και οι οποίες ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (PBS).



Εικόνα 8.6.2: Πολυφασματική απεικόνιση δύο τομών (I και II) του αμφιβληστροειδούς ποντικών που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (PBS). Οι τομές απεικονίζονται επιλεκτικά σε διάφορες φασματικές ζώνες. Τα κύτταρα των ποικίλων στιβάδων του αμφιβληστροειδούς παρουσιάζουν μεταβλητή ανακλαστικότητα ανάλογα με τα ιδιαίτερα φασματικά χαρακτηριστικά του ιστού. Η αποτελεσματικότερη απεικόνιση των στιβάδων επιτυγχάνεται στην ορατή περιοχή του φάσματος, ενώ στην περιοχή του υπερύθρου οι τομές γίνονται διαφανείς.

Στις παραπάνω εικόνες φαίνεται ότι οι τομές του αμφιβληστροειδούς ποντικών της ομάδας ελέγχου εμφανίζουν μεταβλητή ανακλαστικότητα, ανάλογα με τη φασματική ζώνη της απεικόνισης. Η διαφοροποίηση της έντασης του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός που συλλέγεται από τον ανιχνευτή οφείλεται στα διαφορετικά δομικά συστατικά του ιστού.

Κατόπιν έγινε απεικόνιση τομών του αμφιβληστροειδή ποτικών στις οποίες είχε επαχθεί τοξικότητα με τη χορήγηση του AMPA. Στην εικόνα 8.6.3 απεικονίζονται μερικές τυπικές εικόνες από δύο διαφορετικές τομές που ελήφθησαν με το πολυφασματικό μικροσκόπιο.



Εικόνα 8.6.3: Πολυφασματική απεικόνιση δύο τομών (I και II) του αμφιβληστροειδούς ποντικών στα οποία έχει επαχθεί τοξικότητα με τη χορήγηση του AMPA. Οι τομές απεικονίζονται επιλεκτικά σε διάφορες φασματικές ζώνες. Τα κύτταρα όλων των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική ανακλαστικότητα.

Στις παραπάνω εικόνες φαίνεται ότι οι τομές του αμφιβληστροειδούς ποντικών στα οποία έχει επαχθεί τοξικότητα με τη χορήγηση του AMPA παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική ανακλαστικότητα σε όλες σχεδόν τις φασματικές ζώνες της απεικόνισης. Το οπισθοσκεδαζόμενο φως που παρουσίασαν κάποιες στιβάδες του αμφιβληστροειδή από τις τομές ελέγχου με PBS (εικ. 8.6.2), χάνεται κατόπιν της χορήγησης του AMPA πράγμα που υποδηλώνει τη δομική διαφοροποίηση των ιστών και κατ' επέκταση την απώλεια κάποιων κυτταρικών συστατικών.

Η σκλήρυνση κατά πλάκας χαρακτηρίζεται από φλεγμονή και από περιοχές με βλάβες στη μυελίνη της λευκής ουσία του ΚΝΣ (Bo L, 2009), κατάσταση που οδηγεί σε μόνιμη νευρολογική αναπηρία (Franklin RJ. et al, 2008, Bannerman PG. et al, 2005). Η λευκή ουσία (white matter, WM) είναι ένα από τα δύο συστατικά του ΚΝΣ και αποτελείται κυρίως από νευρογλοιακά κύτταρα και εμυελλους νευράξονες. Η φαιά ουσία (grey matter, GM) είναι το δεύτερο κύριο συστατικό του ΚΝΣ, που αποτελείται από τα κυτταρικά σώματα των νευρώνων, τους δενδρίτες, τα νευρογλοιακά κύτταρα και τα τριχοειδή αγγεία (Kolb B. et al, 2009). Η έρευνα στην πολλαπλή σκλήρυνση έχει προχωρήσει σημαντικά με την χρήση του ζωικού μοντέλου της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) (Steinbrecher A. et al, 2005), η οποία προσομοιάζει τις ανθρώπινες νευροανοσολογικές παθήσεις.

Στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η καταστροφή των νευρικών ινών της μυελίνης στο νωτιαίο μυελό των ποντικών με EAE, χρησιμοποιώντας ένα σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης και μια νέα μέθοδο που αναπτύχθηκε για το σκοπό αυτό. Έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων του συστήματος για την ανίχνευση των περιοχών με απώλεια μυελίνης με εκείνα που ελήφθησαν με εφαρμογή των πρότυπων μεθόδων του ανοσοφθορισμού που εφαρμόζονται ευρέως διαγνωστικά. Βρέθηκε ότι η μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να εντοπίσει με ακρίβεια τις περιοχές με απώλεια της μυελίνης με ευαισθησία 90,4% και με θετική προγνωστική αξία 92,2%.

Η απεικόνιση του ιστού με το πολυφασματικό μικροσκόπιο (εικ. 8.4.1a) δείχνει ότι το οπισθοσκεδαζόμενο σήμα αυξάνεται στην περιοχή της λευκής ουσίας λόγω του μεγάλου αριθμού των μυελινωμένων νευραξόνων, ενώ τα σώματα των νευρικών κυττάρων και οι δενδρίτες της φαιάς ουσίας παρουσιάζουν χαμηλή ανάκλαση. Επιπλέον, τα διαχωριστικά όρια μεταξύ λευκής και φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού απεικονίζονται με ευκρίνεια. Μέσω της επιλεκτικής απεικόνισης (εικ. 8.4.1b), ο ιστός γίνεται σταδιακά διαφανής σε μεγάλα μήκη κύματος (υπέρυθρη φασματική περιοχή), με τα όρια μεταξύ λευκής και φαιάς ουσίας να γίνονται δύσκολα ανιχνεύσιμα σε εικόνες που αντιστοιχούν σε φασματικές ζώνες πάνω από τα 800 nm.

Στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της EAE και της ΣκΠ εμπλέκεται μία ποικιλία νευρογλοιακών κυττάρων και κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που προωθούν την απομυελίνωση και την καταστροφή των αξόνων. Ωστόσο, κάποια από αυτά τα κύτταρα διαθέτουν και αντι-φλεγμονώδεις και/ή ρυθμιστικές ιδιοτητές σχετικά με την αναστολή της εξέλιξης της νόσου και της αποκατάστασης των ιστών που επλήγησαν (Duffy S. et al, 2014). Η αγγειογένεση που έχει παρατηρηθεί στην περιοχή της βλάβης παίζει επίσης διττό και καθοριστικό ρόλο: στην εξέλιξη της νόσου και στη δημιουργία βλαβών από τη μία πλευρά και από την άλλη πλευρά στις διαδικασίες αποκατάστασης των περιοχών που επλήγησαν (Holleya J. et al, 2010). Η εμπλοκή αυτών των παραγόντων καθορίζει την εικόνα της περιοχής της βλάβης και την εμφάνιση της απομυελίνωσης.

Το DAPI είναι μια εγγενώς φθορίζουσα χρωστική, η οποία συνδέεται με τη διπλή έλικα του DNA και έτσι αναδεικνύει τα εμπύρηννα κύτταρα. Η πυκνότητα των φθορίζοντων μορίων είναι αυξημένη στις αλλοιωμένες περιοχές (εικ. 8.5.1a), υποδεικνύοντας τον αυξημένο αριθμό εμπύρηνων κυττάρων στην περιοχή της βλάβης, μετά την επαγωγή της αυτοάνοσης αντίδρασης και της αύξησης

της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που επέφερε η χορήγηση της τοξίνης του κοκκύτη. Εκτός από το DAPI, ως φθορίζουσα χρωστική χρησιμοποιήθηκαν και τα αντισώματα έναντι της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (myelin basic protein, MBP) (εικ. 8.5.1b). Πράγματι, η MBP είναι ένα σημαντικό συστατικό της μυελίνης, λιποπρωτεϊνικής φύσης, η οποία περιβάλλει τους άξονες των νευρώνων στο ΚΝΣ (*Kolb B. et al, 2009*). Η περιοχή της αλλοίωσης χαρακτηρίζεται από ένα χαμηλότερο σήμα φθορισμού των αντισωμάτων της MBP, που δείχνει τα μειωμένα επίπεδα της μυελίνης. Οι περιοχές με αλλοιωμένη μυελίνη παρουσιάζονται ως μαύρες τρύπες σε ένα φθορίζον φόντο.

Η διαγνωστική ακρίβεια του συστήματος της πολυφασματικής απεικόνισης στον εντοπισμό των αλλοιωμένων περιοχών ελέγχθηκε με τη βοήθεια του συμβατικού μικροσκοπίου φθορισμού και των συζευγμένων με αυτό τεχνικών ανοσοφθορισμού, μέσω της συγκριτικής απεικόνισης των ίδιων αλλοιώσεων. Η προαναφερθείσα περιοχή (εικ. 8.5.1a, b) απεικονίζεται επίσης με το πολυφασματικό μικροσκόπιο (εικ. 8.5.1c). Η συγκεκριμένη τομή του νωτιαίου μυελού καθίσταται διαφανής για απεικόνιση σε φασματική περιοχή άνω των 700nm, κυρίως λόγω του περιορισμένου πάχους της (40μm). Στην περιοχή της βλάβης, το οπισθοσκεδαζόμενο σήμα ελαχιστοποιείται και η περιοχή απεικονίζεται ως μια μαύρη τρύπα σε ένα σημαντικά πιο ανοιχτόχρωμο υπόβαθρο. Η σύγκριση των εικόνων που συλλέγονται με το μικροσκόπιο του φθορισμού (εικ. 8.5.1a, b) και με το σύστημα του πολυφασματικού μικροσκοπίου (εικ. 8.5.1c) δείχνει σαφώς ότι το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης ανιχνεύει με ακρίβεια την περιοχή της βλάβης.

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα εμπύρνα κύτταρα που συγκεντρώθηκαν στην περιοχή της βλάβης έγινε χρώση των τομών του νωτιαίου μυελού με αντισώματα έναντι του αντιγόνου CD3. Το CD3 (σύμπλεγμα διαφοροποίησης 3) T-κυττάρου συν-υποδοχέας είναι μια πρωτεΐνη της μεμβράνης όλων των ώριμων T-κυττάρων. Το anti-CD3 είναι επομένως ένας απόλυτα εξειδικευμένος δείκτης και δείχνει ότι τη διείδυση των T λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (εικ. 8.5.2b) συνδέεται με την απώλεια της μυελίνης (*Exley M. et al, 1991*). Η διαφορετική ανακλαστικότητα μεταξύ της κανονικής περιοχής και της περιοχής της βλάβης αποτυπώνεται ξεκάθαρα στις εικόνες που ελήφθησαν με το αναπτυχθέν σύστημα του πολυφασματικού μικροσκοπίου (εικ. 8.5.2d).

Το φάσμα απορρόφησης μίας ποικιλίας κυττάρων (π.χ. iP_s, HeLa, PC12, COS 7) έχει μελετηθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες. Πολλά από τα κύτταρα αυτά εμφανίζουν μια σχεδόν σταθερή απορρόφηση στο ορατό φασματικό εύρος (*Arai Y. et al, 2015*), ενώ τα B λεμφοκύτταρα που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση έχουν μεταβλητή απορρόφηση στο ορατό μέρος του φάσματος (*Malik Z. et al, 1998*). Επίσης, φαίνεται ότι ο πυρήνας του κυττάρου δεν επηρεάζει σημαντικά την απορρόφηση του φωτός στο ορατό φασματικό εύρος (*Malik Z. et al, 1998 και ECE532 Biomedical Optics*).

Αν και οι αγγειακές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στη ΣκΠ έχουν επισημανθεί εδώ και πολλά χρόνια, ωστόσο, η ιδέα ότι το αγγειακό σύστημα μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη των αλλοιώσεων της ΣκΠ έχει μόλις πρόσφατα προβληματίσει (*Holleya J. et al, 2010*). Όταν τα φωτόνια προσπέσουν πάνω σε ένα αιμοφόρο αγγείο υφίστανται σημαντική απορρόφηση από την αιμοσφαιρίνη του αίματος (*ECE532 Biomedical Optics*). Είναι γνωστό ότι το αίμα και τα συστατικά του είναι ισχυροί απορροφητές φωτονίων στη φασματική ζώνη μεταξύ 540-580nm (*ECE532 Biomedical Optics και Bosschaart N. et al, 2014*).

Τέλος η μυελίνη παρουσιάζει σημαντική απορρόφηση των φωτονίων στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος πράγμα που οφείλεται στη μεγιστοποίηση της απορρόφησης που παρουσιάζουν οι δεσμοί CH_2 στη συγκεκριμένη ζώνη (Wang H. et al, 2005). Επιπλέον, το σήμα ανάκλασης της κανονικής λευκής ουσίας στο ορατό μέρος του φάσματος, είναι αυξημένο λόγω της ομαλής παρουσίας ενός μεγάλου αριθμού εμμύελων νευραξόνων (Evans CL. et al, 2005). Στην περιοχή της βλάβης, τα συσσωρευμένα κυττάρα του ανοσοποιητικού που έχουν διεισδύσει εκτοπίζουν τις γειτονικές εμμύελους ίνες, και τα έλτρα της μυελίνης διαταράσσονται και διαστέλλονται (Imitola J. et al, 2011) με αποτέλεσμα την εμφάνιση της εικόνας της απομυελίνωσης (Freund J. et al, 1947).

Με βάση τα προαναφερθέντα μπορεί να ειπωθεί ότι η απώλεια του σήματος της οπισθοσκεδαζόμενης ακτινοβολίας αποδίδεται στην απώλεια της ανακλαστικότητας των ινών της μυελίνης, στην ύπαρξη των συγκεντρωμένων φλεγμονωδών κυττάρων της ανοσολογικής απόκρισης τα οποία απορροφούν το προσπίπτον φως, και στην αυξημένη πυκνότητα των αιμοφόρων αγγείων στην περιοχή της φλεγμονής, στην περίπτωση βέβαια που η μελέτη γινόταν *in vivo*. Ένα μέρος του προσπίπτοντος φωτός στην περιοχή της βλάβης περνάει μέσα από την περιοχή της βλάβης σχεδόν ανεπηρέαστο από τις κατεστραμμένες ίνες μυελίνης, και ένα άλλο μέρος οπισθοσκεδαάζεται ανάλογα με τον συντελεστή απορρόφησης και την συγκέντρωση των συσσωρευμένων κυττάρων και των αιμοφόρων αγγείων εντός της βλάβης. Κατά συνέπεια, η περιοχή της βλάβης χάνει το εξέχον σήμα ανάκλασης που εμφανίζεται στην περιοχή της άθικτης λευκής ουσίας [εικ. 8.5.1c, 8.5.2d].

Ωστόσο, η *ex vivo* διενέργεια της παρούσας μελέτης στερείται της ροής του αίματος και μιας δραστηκής αγγείωσης, και, ως εκ τούτου εδώ, το αίμα δε συμβάλλει σημαντικά στην απορρόφηση των φωτονίων. Πράγματι, η διαδικασία της σταθεροποίησης των τομών η οποία έχει προηγηθεί έχει αφαιρέσει το αίμα. Αξίζει ωστόσο, να σημειωθεί ότι η εμπλοκή των αιμοφόρων αγγείων στο οπισθοσκεδαζόμενο σήμα μπορεί να αξιολογηθεί προσεκτικά μόνο σε *in vivo* συνθήκες.

Γενικότερα όμως η μορφολογία της αλλοιωμένης περιοχής που ανιχνεύεται με τις συμβατικές μεθόδους απεικόνισης (ανοσοφθορισμός-μικροσκοπία φθορισμού) είναι συγκρίσιμη με εκείνη που λαμβάνεται με το αναπτυχθέν μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης. Ωστόσο, μια περαιτέρω αξιολόγηση του πολυφασματικού συστήματος στο ορατό φάσμα είναι απαραίτητη, χρησιμοποιώντας φίλτρα με στενότερο εύρος ζώνης από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ταυτοποιηθεί η συνεισφορά του καθενός παράγοντα που επηρεάζει το οπισθοσκεδαζόμενο σήμα, ξεχωριστά. Επιπλέον είναι απαραίτητη και η μελέτη παχύτερων τομών ιστού στο ερυθρό και το εγγύς υπέρυθρο, όπου η απορρόφηση των αγγείων και των άλλων κυττάρων ελαχιστοποιείται (Arai Y. et al, 2015 και Malik Z. et al, 1998 και ECE532 Biomedical Optics).

Οι περιοχές του νωτιαίου μυελού στις οποίες η μυελίνη έχει υποστεί αλλοίωση απεικονίζονται ως μαύρες τρύπες στην ορατή περιοχή του φάσματος (εικ. 8.5.1c, 8.5.2d). Ωστόσο, η εικόνα αυτή είναι ανεστραμμένη στην υπέρυθη φασματική ζώνη. Η περιοχή με τη βλάβη της μυελίνης φαίνεται να είναι πιο ανοιχτόχρωμη από εκείνη της γειτονικής φυσιολογικής περιοχής. Η χρήση των δύο πολωτών και η ρύθμιση του κάθετου επιπέδου πόλωσης μεταξύ τους επιτρέπει να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η παρατηρούμενη αναστροφή δεν οφείλεται στην ανάκλαση του υποστηρικτικού υλικού του δείγματος, αφού η εφαρμοζόμενη κάθετη πόλωση επιτρέπει μόνο στο οπισθοσκεδαζόμενο φως να περάσει στον αισθητήρα. Η παρατηρούμενη αναστροφή της ανάκλασης του ιστού ανάμεσα στο ορατό και το υπέρυθρο δεν έχει ακόμη κατανοηθεί ικανοποιητικά και χρειάζεται περαιτέρω αξιολόγηση με χρήση παχύτερων τομών ιστού. Είναι πιθανό αυτό να

οφείλεται στη μείωση της απορρόφησης του φωτός από τα κυττάρια που έχουν συγκεντρωθεί στην περιοχή της βλάβης και στην αύξηση της απορρόφησης της μυελίνης στο υπέρυθρο που υπάρχει στην περιβάλλουσα υγιή λευκή ουσία (Wang H. et al, 2005 και Arai Y. et al, 2015 και Malik Z. et al, 1998). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι εικόνες του υπέρυθρου είναι, σε κάποιο βαθμό, θολές λόγω της επιστροφής στον ανιχνευτή των συνιστωσών του φωτός οι οποίες προέρχεται από διαφορετικά βάθη του ιστού με τον οποίο αλληλεπίδρασαν. Το αποτέλεσμα αυτό της θόλωσης των εικόνων ενισχύεται στις περιπτώσεις υψηλής μεγέθυνσης λόγω του μικρού βάθους πεδίου.

Ο υπολογισμός της παραμέτρου διαφοροποίησης της έντασης (ΠΔΕ(λ)) (γράφημα 8.5.1) υποδεικνύει ότι η μέγιστη διάκριση μεταξύ των περιοχών με καταστραμμένη και άθικτη μυελίνη εντοπίζεται στη φασματική ζώνη περί των 500nm. Αυτό το συμπέρασμα είναι αρκετά ασφαλές, καθώς η περιοχή των 500nm είναι μακριά από το κοντινό υπέρυθρο, όπου το συλλεγόμενο σήμα θα μπορούσε να επηρεαστεί από την απορρόφηση άλλων παριστάμενων μορίων στον ιστό (δηλ. το νερό). Οι φασματικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των κανονικών και των αλλοιωμένων περιοχών της λευκής ουσίας αντικατοπτρίζουν τη διαφορετική πυκνότητα των δομών του ιστού καθώς και την ετερογένεια στη σύστασή του. Πράγματι, στην περιοχή της βλάβης, τα έλτρα της μυελίνης έχουν διασταλλεί/καταστραφεί και έτσι το προσπίπτον φως διασπείρεται ελάχιστα (Imitola J. et al, 2011) σε αντιδιαστολή με τις περιοχές που έχουν φυσιολογική κατανομή μυελίνης στις οποίες η ανακλαστικότητα είναι μέγιστη. Οι μεγάλες τιμές των σφαλμάτων (που αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση) στην ορατή περιοχή του φάσματος είναι πιθανόν να οφείλονται στη χωρική ετερογένεια της βλάβης, δηλαδή στη διαστολή και στην καταστροφή των ινών της μυελίνης αλλά ακόμα και στη διαφορετική συγκέντρωση των ανοσολογικών κυττάρων, ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Οι τιμές της τυπικής απόκλισης μικραίνουν στην υπέρυθρη περιοχή, όπου ο ιστός γίνεται πιο διαφανής και το οπισθοσκεδαζόμενο φως λιγοστεύει, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι διαφορές μεταξύ των αλλοιωμένων και των φυσιολογικών περιοχών.

Εν κατακλείδη μπορεί να ειπωθεί ότι στην παρούσα εργασία εκτιμήθηκε η καταστροφή των νευρικών ινών της μυελίνης στο νοτιαίο μυελό ποντικών με ΕΑΕ, χρησιμοποιώντας ένα οπτικό μικροσκόπιο, ένα συνεστιακό μικροσκόπιο και ένα μικροσκόπιο πολυφασματικής απεικόνισης. Το μικροσκόπιο της πολυφασματικής απεικόνισης συνδυάζει ένα μονοχρωμάτορα φασματικής απεικόνισης με ένα εμπορικά διαθέσιμο μικροσκόπιο. Το προκύπτον σύστημα είναι εύκολο στη χρήση, φορητό και χαμηλού κόστους. Το νέο αυτό σύστημα και η μέθοδος που εφαρμόστηκε αξιολογήθηκαν στην ανίχνευση απομυελινωμένων περιοχών σε τομές νευρικών ιστών ποντικών με ΕΑΕ. Τα λαμβανόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μέγιστη διαφορά μεταξύ της φυσιολογικής και της αλλοιωμένης περιοχής επιτυγχάνεται με απεικόνιση των τομών στη φασματική περιοχή περί των 500nm για τομές ιστού με μέγιστο πάχος τα 50μm. Δείγματα ιστών με μεγαλύτερα πάχη από 40-50μm πιθανόν να απαιτούν επιπλέον φασματική σάρωση για τον καθορισμό του βέλτιστου μήκους κύματος στο οποίο η παράμετρος διαφοροποίησης μεγιστοποιείται. Στη συνέχεια συγκρίθηκε η ευαισθησία του μικροσκοπίου της πολυφασματικής απεικόνισης σε σχέση με την ευαισθησία των καθιερωμένων μεθόδων ανοσοφθορισμού στον εντοπισμό περιοχών που εμφάνιζαν απώλεια μυελίνης. Βρέθηκε ότι η προτεινόμενη μέθοδος εντοπίζει τις περιοχές με καταστροφή της μυελίνης με ευαισθησία 90,4% και θετική προγνωστική αξία 92,2%.

Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου της πολυφασματικής απεικόνισης που εφαρμόστηκε είναι η ανδείξη των περιοχών με απώλεια μυελίνης χωρίς την ανάγκη χρήσης φθοριοσημασμένων χρωστικών και με τη χρήση φωτός μικρής ενέργειας χωρίς να ελλοχεύει ο φόβος της

φωτοκαταστροφής του ιστού. Επιπλέον, η αύξηση της αντίθεσης και η σαφής ανάδειξη των αλλοιωμένων περιοχών που επιτυγχάνεται απλά με την απεικόνιση σε συγκεκριμένες φασματικές ζώνες παραγκωνίζει κάποια διαγνωστικά προβλήματα που πιθανόν να προκύπτουν από τη φωτοκαταστροφή των δεικτών και τη μη-ειδική σύνδεσή τους στα μόρια. Η δυνατότητα απεικόνισης της μυελίνης χωρίς καμία χρήση δεικτών απλοποιεί την προετοιμασία του δείγματος, έτσι ώστε να παρέχεται, δυνητικά, η προοπτική για τη μελέτη ζωντανών ιστών και ζώων. Επιπλέον, πολλά από τα ευρήματα είναι σε συμφωνία με εκείνα που προέρχονται από άλλα συστήματα απεικόνισης και εφαρμοζόμενες μεθόδους που είναι πιο πολύπλοκα και δαπανηρά και που βασίζονται στη χρήση σύμφωνων πηγών φωτός (laser). Στη χρήση τέτοιων πηγών φωτός υποκρύπτεται η πιθανότητα διατάραξης της αρχιτεκτονικής της μυελίνης και της ακεραιότητας των ιστών καθώς χρησιμοποιούν, για τη μελέτη, φως υψηλής ισχύος (*Kolb B. et al, 2009 και Exley M. et al, 1999*).

Στο τελευταίο πειραματικό κομμάτι της παρούσας διατριβής έγινε εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης στην ανίχνευση της καταστροφής των στιβάδων του αμφιβληστροειδή χιτώνα του ματιού ποντικών κατόπιν επαγωγής τοξικότητας με τη χορήγηση AMPA. Με επιλεκτική απεικόνιση των τομών των ποντικών που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (PBS) φάνηκε ότι οι στιβάδες του αμφιβληστροειδή χιτώνα έχουν διαφορετικά φασματικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους, μέσω της καταγραφής του οπισθοσκεδαζόμενου φωτός από αυτές. Τα φασματικά χαρακτηριστικά αυτά αλλοιώνονται στην περίπτωση τομών στις οποίες επάχθηκε τοξικότητα, με φυσική συνέπεια η σχεδόν ολική απώλεια του οπισθοσκεδαζόμενου σήματος της πολυφασματικής απεικόνισης να σχετιστεί με την μερική ή ολική νέκρωση των κυττάρων.

9.1 Μελλοντικοί Στόχοι

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις *ex vivo* δοκιμές του μικροσκοπίου της πολυφασματικής απεικόνισης είναι ενθαρρυντικά και σχεδόν επιβάλλουν την *in vivo* διερεύνησή τους. Άλλωστε η απομυελίνωση είναι μια προοδευτική και ενίοτε παροδική διεργασία, ειδικά στην πολλαπλή σκλήρυνση κατά πλάκας. Οι δυναμικές διαδικασίες όπως εκείνη της απομυελίνωσης δεν μπορούν να μελετηθούν πλήρως και σε πραγματικό χρόνο χρησιμοποιώντας σταθερούς ιστούς (Wang H. *et al*, 2005). Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η μελέτη της απομυελίνωσης *in vivo*, σε διάφορα στάδια εξέλιξης της νόσου. Οι *in vivo* δοκιμές μπορούν επίσης να αποκαλύψουν το ρόλο των αιμοφόρων αγγείων, ως κύριων συστατικών της μορφολογίας του ιστού, σε απομυελινωτικές ασθένειες καθώς και των κυττάρων της ανοσολογικής απόκρισης.

Απώτερος στόχος της όλης μελέτης είναι η ανάπτυξη ενός γρήγορου απεικονιστικού, μη επεμβατικού, χαμηλού κόστους, διαγνωστικού εργαλείου που σε πραγματικό χρόνο, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην παρακολούθηση των ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας, στην αξιολόγηση της εξέλιξης της νόσου και της ανταπόκρισης των ασθενών στην εφαρμοζόμενη θεραπεία. Τέλος, θα μπορούσε να προσφέρει νέα διαγνωστικά εργαλεία και σε άλλες νευροεκφυλιστικές καταστάσεις, όπως η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια ή αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (Charalampopoulos I. *et al*, 2008 και Lazaridis I. *et al*, 2011) κ.λ.π.

- Akbari H, Kosugi Y, et al. **A novel method for artery detection in laparoscopic surgery.** *Surg Endosc.* 2008; 22: 1672-7.
- Akbari H, Kosugi Y, et al. **Detection and analysis of the intestinal ischemia using visible and invisible hyperspectral imaging.** *IEEE Trans Biomed Eng.* 2010; 57: 2011-7.
- Arnfield MR, Tulip J, et al. **Optical propagation in tissue with anisotropic scattering.** *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.* 1988; 35: 372–381.
- Arai Y, Yamamoto T, et al. **Spectral Fingerprinting of Individual Cells Visualized by Cavity-Reflection-Enhanced Light-Absorption Microscopy.** *Plos One.* 2015; 10: e0125733- e0125746.
- Bannerman PG, Hahn A, et al. **Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice.** *Brain.* 2005; 128: 1877-1886.
- Barash E, Dinn S, et al. **Multiplexed analysis of proteins in tissue using multispectral fluorescence imaging.** *IEEE Trans Med Imaging.* 2010; 29: 1457-62.
- Berger T, Rubner P, et al. **Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event.** *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 139–45.
- Bijio IJ, Mourant RJ. **Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy.** *Phys Med. Biol.* 1997; 42: 803-814.
- Bo L. **The histopathology of grey matter demyelination in multiple sclerosis.** *Acta Neurol Scand Suppl.* 2009; 189: 51-57.
- Boron W & Boulpaep E. **Ιατρική Φυσιολογία. εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης.** 2006.
- Bosschaart N, Edelman G, et al. **A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood.** *Lasers Med Sci.* 2014; 29: 453-479.
- Casini A, Lotti F, et al. **Image spectroscopy mapping technique for non-invasive analysis of paintings.** *Studies in conservation.* 1999; 44: 39-48.
- Charalampopoulos I, Remboutsika E, et al. **Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival.** *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19: 300-307.
- Cheng JX. **Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy.** *Appl Spectrosc* 2007; 61: A197–208.
- Cheng JX, Xie XS. **Coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy: instrumentation, theory, and applications.** *J Phys Chem B.* 2004; 108: 827–40.
- Cheong WF, Prahi SA, et al. **A review of the optical properties of biological tissues.** *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.* 1990; 26: 2166–2185.
- Clark RN. **Reflectance spectra.** In: *AGU reference shelf 3, rock physics and phase relations, a handbook of physical constants*, (TJ Ahrens, Ed.) 1995; pp: 178-188, (invited book chapter).
- Clark RN, Roush TL. **Reflectance spectroscopy: Quantitative analysis techniques for remote sensing applications.** *J. Geophys. Res.* 1984; 89: 6329-6340.

- Clark RN, Swayze GA, et al. **Imaging spectroscopy: Earth and planetary remote sensing with the USGS Tetracorder and expert systems.** *J. Geophys. Res.* 2003; 108: 5131-5141.
- Dawson JB, Ellis DJ, et al. **A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by in vivo skin.** *Phys. Med. Biol.* 1980; 25: 695–709.
- Deber CM, Reynolds SJ. **Central nervous system myelin: structure, function, and pathology.** *Clin. Biochem.* 1991; 24: 113–34.
- DeBoy CA, Zhang J, et al. **High resolution diffusion tensor imaging of axonal damage in focal inflammatory and demyelinating lesions in rat spinal cord.** *Brain.* 2007; 130: 2199-2210.
- Ding C, Shi S, et al. **Analysis of Light Transport Features in Stone Fruits Using Monte Carlo Simulation.** *PLoS One.* 2015. 15; 10: e0140582.
- Dortch RD, Apker GA, et al. **Compartment-specific enhancement of white matter and nerve ex vivo using chromium.** *Magn Reson Med.* 2010; 64: 688-97.
- Duffy S, Lees J, et al. **The Contribution of Immune and Glial Cell Types in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis.** *Multiple Sclerosis International.* 2014; 2014: 17 pages.
- Durkin AJ, Jaikumar S, et al. **Relation between fluorescence spectra of dilute and turbid samples.** *Appl. Opt.* 1994; 33: 414–23.
- ECE532 Biomedical Optics: Available online <http://omlc.org/classroom/ece532/class3/muaspectra.html>
- Evans CL, Potma EO, et al. **Chemical imaging of tissue in vivo with video-rate coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 16807-16812.
- Exley M, Terhorst C, et al. **Structure, assembly and intracellular transport of the T cell receptor for antigen.** *Semin Immunol.* 1991; 3: 283-297.
- Fairchild Semiconductor Corporation Americas. **CMOS, the Ideal Logic Family, Application Note 77.** 1983; Available online: <https://www.fairchildsemi.com/application-notes/AN/AN-77.pdf>.
- Farrar MJ, Wise FW, et al. **In Vivo Imaging of Myelin in the Vertebrate Central Nervous System Using Third Harmonic Generation Microscopy.** *Biophysical Journal.* 2011; 100: 1362–1371.
- Ferrara N, Damico L., et al. **Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration.** *Retina.* 2006; 26: 859e870.
- Fodor L, Elman M, et al. **Aesthetic Applications of Intense Pulsed Light,** *Springer-Verlag London Limited;* 2011, chapter 2: 11-14.
- Franklin RJ, Kotter MR. **The biology of CNS remyelination: the key to therapeutic advances.** *J Neurol.* 2008; 255: 19-25.
- Freund J, Stern E R, et al. **Isoallergic Encephalomyelitis and Radiculitis in Guinea Pigs After One Injection of Brain and Mycobacteria in Water-in-Oil Emulsion.** *J. Immunol.,* 1947; 57: 179-194.
- Fu Y, Talavage TM, et al. **New imaging techniques in the diagnosis of multiple sclerosis.** *Expert Opin Med Diagn.* 2008; 2: 1055–1065.
- Fu Y, Wang H, et al. **Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of myelin degradation reveals a calcium dependent pathway in lyso-PtdCho induced demyelination.** *J Neurosci Res.* 2007; 85: 2870–81.
- Gao L, Kester T, et al. **Snapshot Image Mapping Spectrometer (IMS) with high sampling density for hyperspectral microscopy.** *Optics Express,* 2010; 18: 14330-14344.

- Garini Y, Young IT, et al. **Spectral imaging: principles and applications.** *Cytometry A*. 2006; 69: 735-47.
- Gurjar RS, Backman V, et al. **Imaging human epithelial properties with polarized light-scattering spectroscopy.** *Nature Medicine*. 2001; 7, 1245-8.
- Haraguchi T, Shimi T, et al. **Spectral imaging fluorescence microscopy.** *Genes to Cells*. 2002; 7: 881–887.
- Heintzelman DL, Utzinger U, et al. **Optimal Excitation Wavelengths for In vivo Detection of Oral Neoplasia Using Fluorescence Spectroscopy.** *Photochemistry and Photobiology*. 2000; 72: 103-113.
- Holleya J, Newcombe J, et al. **Increased blood vessel density and endothelial cell proliferation in multiple sclerosis cerebral white matter.** *Neuroscience Letters*. 2010; 470: 65-70.
- Humphrey A.P., Dehner L. P, et al. **The Washington Manual of Surgical Pathology: Department of Pathology and Immunology.** *Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri.* Lippincott Williams & Wilkins. 2008; pp. 681.
- Imitola J, Chitnis T, et al. **Insights into the molecular pathogenesis of progression in multiple sclerosis: potential implications for future therapies.** *Arch Neurol*. 2006; 63: 25-33.
- Imitola J, Côté D, et al. **Multimodal coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy reveals microglia-associated myelin and axonal dysfunction in multiple sclerosis-like lesions in mice.** *J Biomed Opt*. 2011; 16: 021109-11.
- Inouye H, Kirschner DA. **Folding and function of the myelin proteins from primary sequence data.** *J. Neurosci. Res*. 1991; 28: 1–17.
- Ishimaru A. **Diffusion of light in turbid material.** *Appl. Opt*. 1989; 28: 2210-2215.
- Ishimaru A. **Wave Propagation and Scattering in Random Media.** Academic Press, Vol. I, New York, 1978.
- Jacques SL. **Reflectance from a semi-infinite medium.** 1999. *Available on line:* <http://omlc.org/news/may99/rd/>
- Jocelyn Bruce-Gregorios. **Histopathologic Techniques.** *Goodwill Trading Co., Inc.*; 2006, 2nd ed. pp. 241.
- Levenfus, I. **An efficient method for counting DAPI-stained cells using Fiji.** *Scientific Essay*, 2011, 6 Pages.
- Kallenbach K, Frederiksen J. **Optical coherence tomography in optic neuritis and multiple sclerosis: a review,** *Eur J Neurol*. 2007; 14: 841–9.
- Kokona D, Charalampopoulos I. et al. **The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) protects the retina from AMPA-induced excitotoxicity: NGF TrkA receptor involvement.** *Neuropharmacology*. 2012; 62: 2106-2117.
- Kokona D, Mastrodimitou N. et al. **Pasireotide (SOM230) protects the retina in animal models of ischemia induced retinopathies.** *Experimental Eye Research*. 2012; 103: 90-98.
- Kolb B, Wishaw IQ. **The organization of the nervous system.** In *Fundamentals of Human Neuropsychology*; 2009 6th ed.; Linsmeier, C., Ed. Worth Publishers: New York, pp. 58-59.
- Kong K, Kendall C, et al. **Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection.** *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015; 89: 121–134.

Kubelka P. **New contribution to the optics of intensely light-scattering materials. Part II. Non homogeneous layers.** *J. Opt. Soc. Am.* 1954; 44: 330–335.

Kumar D, Srinivasan R, et al. **Optical characterization of mammalian tissues by laser reflectometry and Monte Carlo simulation.** *Medical Engineering & Physics.* 2004; 26: 363–369.

Lakowicz JR. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** 2006; Springer 3rd edition.

Lazaridis I, Charalampopoulos I, et al. **Neurosteroid dehydroepiandrosterone interacts with nerve growth factor (NGF) receptors, preventing neuronal apoptosis.** *PLoS Biol.* 2011; 9: e1001051.

Malik Z, Rothmann C, et al. **Spectral Morphometric Characterization of B-CLL Cells Versus Normal Small Lymphocytes.** *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry,* 1998; 46: 1113-1118.

Marvin E. Klein BJA, et al. **Quantitative Hyperspectral Reflectance Imaging.** *Sensors* 2008; 8: 5576-5618.

McGregor JE, Wang Z, et al. **Microscopy of myelination.** *In: Microscopy: Science, Technology applications and education.* 2010ed; book series-number 4 vol.2, Méndez-Vilas A, Díaz J, pp. 1185-1195.

Metropolis N, Ulams S. The Monte Carlo method. *J Am Stat Assoc.* 1949; 44:335-41.

Morris HR, Hoyt CC, et al. **Imaging spectrometers for Fluorescence and Raman microscopy: Acousto-optic and liquid crystal tunable filters.** *Appl. Spectrosc.* 1994; 48: 857-866.

Mourant JR, Bigio IJ, et al. **Elastic scattering spectroscopy as a diagnostic tool for differentiating pathologies in the gastrointestinal tract: Preliminary testing.** *Journal of Biomedical Optics.* 1996; 1: 192–199.

Nikon Microscope ME600 with DIC: Available online <http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/nikon-me600/dic.html>

Oh JS. **Color Atlas of Nerve Biopsy Pathology.** *CRC Press.* 2002; pp.191.

Osborne, N.N., Casson, R.J., et al. **Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies.** *Prog. Retina. Eye Res.* 2004; 23: 91e147.

Palmer C. **Diffraction gratings: "The crucial dispersive component".** *Spectroscopy,* 1995; 10: 14-15.

Papadakis A, Stathopoulos E, et al. **A novel spectral microscope system: application in quantitative pathology.** *IEEE Trans Biomed Eng.* 2003; 50: 207-17.

Papadakis V, Orhanos Y, et al. **"IRIS"; a novel spectral imaging system for the analysis of Cultural Heritage objects.** *In Proceedings of SPIE, O3A: Optics for Arts, Architecture and Archaeology III,* Luca Pezzati; Salimbeni, R., Eds. 2011; 8084: 80840W-80841.

Perelman LT, Backman V, et al. **Observation of periodic fine structure in reflectance from biological tissue: a new technique for measuring nuclear size distribution.** *Physical Review Letters.* 1998; 80: 627-33.

Pesce AJ, Rosen CG, et al. **Fluorescence spectroscopy: an introduction for biology and medicine.** *Yale J Biol Med.* 1973; 46: 326–327.

Quarles RH, Macklin WB, et al. **Myelin formation, structure, and biochemistry.** *In Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects;* 7th ed.; Siegel, G. J.; Alberts, R. W.; Brady, S.; Price, D., Eds.; Elsevier Academic Press: New York, NY., 2006; pp. 51-71.

Richards-Kortum R, Mitchell MF, et al. **In vivo fluorescence spectroscopy: Potential for noninvasive, automated diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and use as a surrogate endpoint biomarker.** *J Cell Biochem Suppl.* 1994; 19: 111–9.

Sakamoto Y, Kitamura K, et al. **Complete amino acid sequence of PO protein in bovine peripheral nerve myelin.** *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 4208–14.

Saxe DF, Takahashi N, et al. **Localization of the human myelin basic protein gene (MBP) to region 18q22->qter by in situ hybridization.** *Cytogenet. Cell Genet.* 1985; 39: 246–9.

Schulman SG. **Fluorescence and phosphorescence spectroscopy: physicochemical principles and practice.** *Pergamon press Ltd.* 1979.

Serway AR. **Physics for Scientists and Engineers with Modern Physics.** *Saunders Golden Sunburst Series, Saunders College Publishing, Third Edition.* 1990, vol III, p.p. 207-208.

Shoemaker DP, Garland CW et al. **Experiments in Physical Chemistry.** 1996 6th ed., McGraw-Hill, New York, NY, pp. 389 - 397.

Słyk E, Rżysko W, et al. **Structure and phase behaviour of diblock copolymer monolayers investigated by means of Monte Carlo simulation.** *J Phys Condens Matter.* 2015. 21; 27: 415101

Stefanaki IM, Georgiou S, et al. **In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy in condylomata acuminata.** *Br J Dermatol.* 2003; 149:972-6.

Stefanidou M, Tosca A, et al. **In vivo fluorescence kinetics and photodynamic therapy efficacy of delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins in basal cell carcinomas and actinic keratoses; implications for optimization of photodynamic therapy.** *Eur J Dermatol.* 2000; 10: 351-6.

Steinbrecher A, Weber T, et al. **Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Rat Spinal Cord: Lesion Detection with High-Resolution MR Microscopy at 17.6 T.** *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005; 26: 19-25.

Stelzle F, Tangermann-Gerk K, et al. **Diffuse reflectance spectroscopy for optical soft tissue differentiation as remote feedback control for tissue-specific laser surgery.** *Lasers Surg Med.* 2010; 42: 319-325.

Tafreshi AP, Mostafavi H, et al. **Induction of experimental allergic encephalomyelitis in C57/BL6 Mice: an animal model for multiple sclerosis.** *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2005; 4: 113-117.

Tang GC, Oz MC, et al. **Native fluorescence spectroscopy of thymus and fat tissues.** *Proc. SPIE* 1993; 1887: 165–8.

Thoury M, Echard JP, et al. **Synchrotron UV-Visible Multispectral Luminescence Microimaging of Historical Samples.** *Anal Chem,* 2011; 83: 1737–1745.

Trip SA, Schlottmann PG, et al. **Retinal nerve fiber layer axonal loss and visual dysfunction in optic neuritis.** *Ann Neurol.* 2005; 58: 383–91.

Young AT. **Rayleigh scattering.** *Applied Optics.* 1981; 20: 533-535.

Yu J, Chao TH, et al. **Acousto-optic tunable filter (AOTF) imaging spectrometer for NASA applications: System issues.** *Proc. SPIE – Opt. Inf.-Process. Syst. Archit. II.* 1990; 1347.

Vane G, Duval JE, et al. **Imaging spectroscopy of the earth and other solar system bodies.** *In : C.M. Pieters and P.A.J. Englert (Eds.), Remote Geochemical Analyses: Elemental and Mineralogical Composition, Cambridge University Press, Cambridge.* p.p. 121-144.

van Eijsden P, Otte WM, et al. **In vivo diffusion tensor imaging and ex vivo histologic characterization of white matter pathology in a post-status epilepticus model of temporal lobe epilepsy.** *Epilepsia.* 2011; 52: 841-5.

Wallace MB, Wax A, et al. **Reflectance Spectroscopy.** *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2009; 19: 233–242.

Wang C, Wu C, et al. **Longitudinal Near-Infrared Imaging of Myelination.** *The Journal of Neuroscience*, 2011; 31: 2382–2390.

Wang H, Fu Y, et al. **Coherent anti-stokes Raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues.** *Biophys J.* 2005; 89: 581-591.

Zeiss Microscopy Online Campus. Available online: <http://zeiss-campus.fsu.edu/articles/spectralimaging/introduction.htm>.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στα πλαίσια της συνεργασίας του ερευνητικού εργαστηρίου της φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και του εργαστήριου της Πολυφασματικής Απεικόνισης του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Laser του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας Ηρακλείου.

Πρώτα και κύρια θα ήθελα να ευχαριστίσω, όσο πιο θερμά γίνεται, τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής εκπόνησης της διατριβής, τον Καθηγητή Φαρμακολογίας Α. Γραβάνη, τον Καθηγητή Φυσικής και Πρόεδρο του ΙΤΕ Κ. Φωτάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας Ι. Χαραλαμπίδου που δέχτηκαν να εργαστώ μαζί τους. Η συνεργασία αυτή με γέμισε χαρά όχι μόνο γιατί μου έδωσαν την ευκαιρία να ολοκληρώσω με επιτυχία τις ανησυχίες που από πολλά έτη είχα πάνω στον τομέα της έρευνας, αλλά κυρίως γιατί πλαισιώθηκε από το ήθος και την ακεραιότητα των χαρακτήρων τους.

Στη συνέχεια οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον φίλο πρώτα από όλα και κατόπιν συνεργάτη και μέντορα Δρ. Βασίλη Παπαδάκη, ερευνητή του Πανεπιστημίου Delf της Ολλανδίας, που χωρίς την ουσιαστική βοήθειά του και μάλιστα σε καίρια εποχή, το όνειρο της ολοκλήρωσης της διδακτορικής διατριβής μου θα φάνταζε ουτοπικό.

Είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων σε όλους όσους συνέβαλλαν με το δικό τους τρόπο και με ώθησαν στην ολοκλήρωση της διατριβής: στον Καθηγητή Γενικής Χειρουργικής Ο. Ζώρα, στη γραμματέα των μεταπτυχιακών σπουδών κα Σ. Φλουρή και σε όλους τους τότε συνοδοιπόρους και νυν Διδάκτορες του Πανεπιστημίου Κρήτης κ.κ. Π. Ευσταθόπουλο, Ι. Λαζαρίδη, Μ. Ιωάννου, Δ. Κοκονά και Ι. Πεδιαδιτάκη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την με κάθε τρόπο βοήθειά της και ιδιαίτερα τον αδερφό μου που πάντα ήταν πρόθυμος να μοιραστεί τα προβλήματα και τις δυσκολίες που μου παρουσιάστηκαν. Χωρίς την ηθική του συμπαράσταση και τις παρεναίσεις του τα πράγματα θα ήταν δύσκολα...