

## Σύνθεση, έλεγχος και βαθμονόμηση φασματοσκοπικών φορητών διατάξεων εργαστηρίου στα πλαίσια της τεχνικής της διάχυτης ανάκλασης και του επαγόμενου φθορισμού για μελλοντική χρήση σε ιατρικές δερματολογικές εφαρμογές

Ε. Δρακάκη<sup>1</sup>, Ν. Μερλέμης<sup>2</sup>, Γ. Μήτσου<sup>2</sup>, Ι. Βαμβακάς<sup>2</sup>, Μ. Κομπίτσας<sup>3</sup>  
και Ι. Α. Σιανούδης<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Τομέας Φυσικής –Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Πολυτεχνειούπολη, 15780, Ζωγράφου, email: edrakaki@central.ntua.gr

<sup>2</sup> Εργαστήριο Φυσικής, Τμήμα Μηχανικών Ενεργειακής Τεχνολογίας, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΤΕΙ) Αθήνας, Αγ. Σπυρίδωνος, 12210 Αιγάλεω,  
e-mail: merlemis@teiath.gr, georgesmitsou@yahoo.gr, ibamb@teiath.gr

<sup>3</sup> Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Θεωρητικής & Φυσικής Χημείας, e-mail: mcomp@eie.gr

<sup>4</sup> Τμήμα Οπτικής & Οπτομετρίας, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (ΤΕΙ) Αθήνας,  
Αγ. Σπυρίδωνος, 12210 Αιγάλεω, email: sianoudis@teiath.gr

### Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση και η δοκιμαστική λειτουργία ενός πρότυπου συστήματος για την λήψη μετρήσεων, εναλλακτικά, τόσο με την τεχνική της φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης (Diffused Reflectance Spectroscopy, DRS), όσο και της φασματοσκοπίας επαγόμενου φθορισμού (Light Induced Fluorescence, LIF). Το όλο σύστημα έχει κατασκευαστεί έτσι ώστε να είναι φορητό και η βαθμονόμηση, καθώς και ο έλεγχος του χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να πραγματοποιηθούν μετρήσεις *ex vivo* και *in vivo* δερματικών ιστών. Το ίδιο σύστημα στοχεύει, στο τελικό στάδιο ανάπτυξης του, στη χρήση του ως διαγνωστικό μέσο για την *in vivo* απεικόνιση και ανίχνευση μη μελανωματικών καρκίνων του δέρματος. Η λήψη μετρήσεων φασματοσκοπίας φθορισμού γίνεται με χρήση κατάλληλων πηγών LED ακτινοβολίας UV, ενώ η ίδια συσκευή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ταυτόχρονα και για πραγματοποίηση μετρήσεων φασμάτων διάχυτης ανάκλασης με πηγή LED λευκού φωτός. Η βαθμονόμηση των φασμάτων διάχυτης ανάκλασης πραγματοποιήθηκε στο ορατό και κοντινό υπέρυθρο.

**Λέξεις κλειδιά:** Φασματοσκοπία ανάκλασης, Φασματοσκοπία επαγόμενου φθορισμού, δέρμα, επιδερμίδα, light induced fluorescence, reflectance spectroscopy

### Εισαγωγή

Η έρευνα που αφορά μη επεμβατικές τεχνικές διάγνωσης και συγκεκριμένα τη διάγνωση μη μελανωματικού δερματικού καρκινώματος έχει τα τελευταία χρόνια δώσει σημαντικά αποτελέσματα με την εισαγωγή των τεχνικών της φασματοσκοπίας επαγόμενου φθορισμού (Laser or Light Induced Fluorescence, LIF), καθώς και της φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης [1-6]. Ο μη επεμβατικός χαρακτήρας και των δύο τεχνικών σημαίνει ότι δεν είναι απαραίτητη η εκτομή και αφαίρεση δείγματος ιστών, αναπόφευκτη διαδικασία κατά την βιοχημική ανάλυση που αποτελεί τον χρυσό κανόνα στην διάγνωση μη μελανωματικού δερματικού καρκινώματος [1-3]. Οι προς εξέταση *in vivo* ιστοί ακτινοβολούνται από κατάλληλη πηγή φωτός σε ένα φορητό σύστημα, ανάλογα με την εφαρμοζόμενη τεχνική, λαμβάνοντας υπόψη τις αλλαγές στις οπτικές ιδιότητες, ειδικά όσο αφορά την αιμοσφαιρίνη. Κατά τη

φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης η ακτινοβολία διαχέεται μέσα στον ιστό, ένα μέρος της απορροφάται (ανάλογα με το μήκος κύματος και το βάθος διείσδυσης) και ένα μέρος ανακλάται παράγοντας φάσμα ανάκλασης, το οποίο περιέχει πληροφορία σχετική με τα διάφορα στρώματα που αποτελούν τον ιστό και τη σύσταση του. Αντίστοιχα η φασματοσκοπία επαγόμενου φθορισμού συνίσταται στην χρήση ακτινοβολιών από συμβατικές πηγές LED ή laser στην περιοχή κυρίως του υπεριώδους. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία απορροφάται επιλεκτικά από ενδογενείς φθοροφόρες ουσίες του ιστού και οδηγεί στην εκπομπή φασμάτων φθορισμού, χαρακτηριστικών της σύστασης των δερματικών στρωμάτων και άλλων παραμέτρων (πχ. αιμάτωση, παθογένεια της περιοχής κ.α).

Η τεχνική του επαγόμενου φθορισμού έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στο δέρμα, λόγω της εύκολης πρόσβασης της ακτινοβολίας σε αυτό, η ύπαρξη όμως πολλαπλών στρωμάτων, η ανομοιογένεια και η χωρική διαφοροποίηση των οπτικών ιδιοτήτων του κάθε στρώματος περιπλέκει ιδιαίτερα την ποσοτική επεξεργασία των μετρήσεων ακόμα και στο ίδιο δείγμα δερματικού ιστού [7-8]. Οι δερματικοί ιστοί περιέχουν πληθώρα ενδογενών φθοροφόρων, όπως NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide), αρωματικά αμινοξέα, όπως η Τρυπτοφάνη και δομικές πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη, των οποίων οι οπτικές ιδιότητες εξαρτώνται από το περιβάλλον και την μεταβολική κατάσταση του δερματικού ιστού και συνεπώς η εξέταση τους μπορεί να δώσει πληροφορίες για τυχόν παθογένειες. Τέτοιες παθογένειες είναι για παράδειγμα η ακμή [9], η γήρανση του δέρματος [10], αλλά και αλλοιώσεις, όπως ο μη μελανωματικός καρκίνος του δέρματος [4-6, 11-17].

Η διάγνωση με τη βοήθεια του επαγόμενου φθορισμού φαίνεται να αποτελεί μια αξιόπιστη εναλλακτική, μη επεμβατική διαγνωστική τεχνική σε πραγματικό χρόνο, ιδιαίτερα στη διάκριση νεοπλασματικών και μη νεοπλασματικών ιστών, καθόσον υπάρχει μια γενική συμφωνία από τα ερευνητικά αποτελέσματα στο ότι ο εκπεμπόμενος φθορισμός από φυσιολογικό ιστό είναι διαφορετικής έντασης από το φθορισμό μη φυσιολογικού ιστού, λόγω αλλαγών στις οπτικές και βιοχημικές ιδιότητες των ιστών [18].

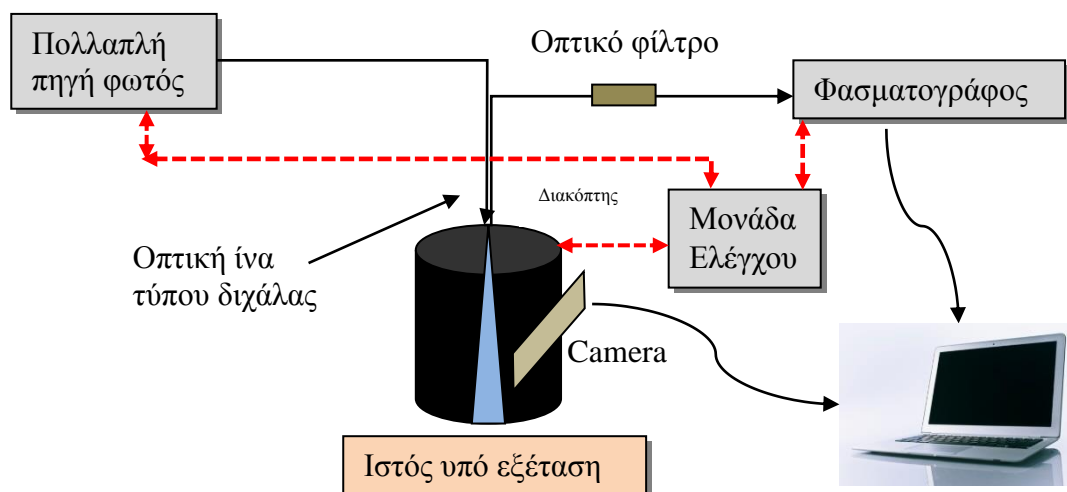
Σε εργασία τους οι L. Brancaloni *et al* [19] παρουσιάζουν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον αυτοφθορισμό δειγμάτων υγιών και μη μελανωματικών δερματικών καρκινωμάτων, τα οποία διεγέρθηκαν με ακτινοβολία 295 και 350 nm. Μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι τα καρκινικά δείγματα παρουσιάζουν φθορισμό μεγαλύτερης έντασης σε σχέση με αντίστοιχα υγιή δείγματα, όταν διεγερθούν με ακτινοβολία μήκους κύματος 295 nm. Αντίθετα τα υγιή δείγματα εμφανίζουν μεγαλύτερη ένταση αυτοφθορισμού όταν διεγερθούν με ακτινοβολία 350 nm. Σύμφωνα με τους ερευνητές οι διαφορές αυτές στην ένταση μπορούν να διαχωρίσουν τα αποτελέσματα με μία ακρίβεια που είναι ίση με 60 και 78 % αντίστοιχα για ακανθοκυτταρικά και βασοκυτταρικά καρκινώματα. Αντίστοιχα οι R. Na *et al* [20] παρατηρούν ότι η ένταση αυτοφθορισμού που εισάγεται με ακτινοβολία διέγερσης στα 370 nm, είναι 53% υψηλότερη για τους υγιείς ιστούς σε σχέση με βασικοκυτταρικά καρκινώματα.

Στην εργασία αυτή παρουσιάζεται ένα σύστημα με το οποίο είναι δυνατή η λήψη, είτε φασμάτων διάχυτης ανάκλασης ή επαγόμενου φθορισμού, ανάλογα με την πηγή φωτός που θα χρησιμοποιηθεί. Η χρήση και των δύο τεχνικών παράλληλα εμπλουτίζει τα διαθέσιμα δεδομένα και αναμένεται να βοηθήσει ιδιαίτερα στην εξαγωγή συμπερασμάτων για την επιτυχημένη διάγνωση του μη μελανωματικού

καρκίνου του δέρματος, στο επόμενο στάδιο της έρευνας, όπου θα γίνουν μετρήσεις σε δείγματα δερματικών ιστών *ex vivo* αλλά και στη συνέχεια *in vivo*.

## Μέθοδος

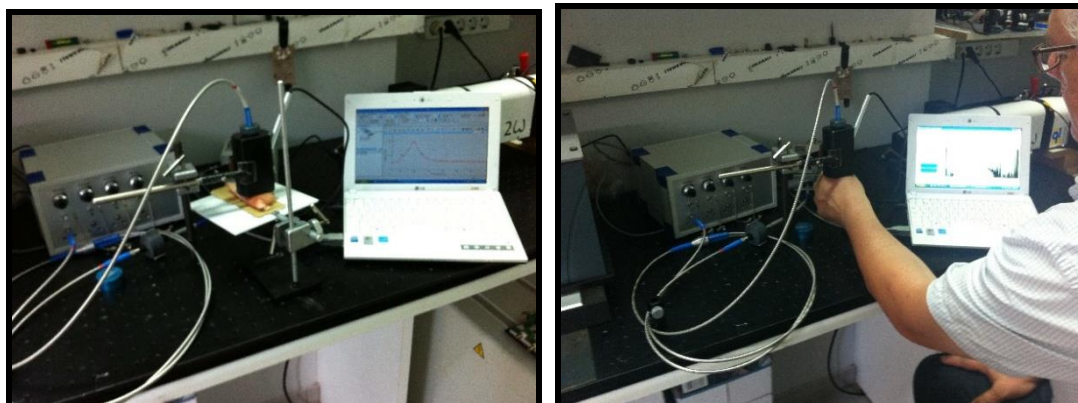
Η πειραματική διάταξη του υπό μελέτη και σχεδίαση πρότυπου συστήματος φαίνεται σχηματικά στο Σχήμα 1. Αποτελείται από την πηγή φωτός, το φασματοόμετρο, την μονάδα ελέγχου, τις οπτικές ίνες με φίλτρο αποκοπής και τον δειγματολήπτη. Η συσκευή οπτικής πηγής αποτελείται από 4 LED ρυθμιζόμενης έντασης, με δυνατότητα εκπομπής λευκού φωτός και UV ακτινοβολίας στα 365 nm, 380 nm και 400 nm και αντίστοιχες εξόδους για οπτικές ίνες (της εταιρείας PRIZMATIX). Για την φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης γίνεται χρήση της πηγής λευκού φωτός, ενώ για την φασματοσκοπία επαγόμενου φθορισμού οι πηγές διέγερσης είναι στο υπεριώδες.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση της διάταξης φασματοσκοπίας διάχυτης ανάκλασης & επαγόμενου φθορισμού.

Οι οπτικές ίνες που χρησιμοποιούνται είναι τύπου διχάλας (bifurcated fiber optics) που καταλήγουν σε κοινό άκρο και οι οποίες συνδέονται με συνδέσμους τύπου SMA905, αφ' ενός με την πηγή φωτός, αφ' ετέρου με το φασματοόμετρο, διοχετεύοντας σ' αυτόν το ανακλώμενο/φθορίζων φως στο δειγματολήπτη (Probe). Οι τύποι οπτικών ινών που χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις είναι QR200-7-UV/NIS-BX της εταιρείας Ocean Optics και FCB-UV400-2 της εταιρείας Avantes. Η συνολική διάμετρος και το αριθμητικό άνοιγμα τους ήταν 200  $\mu\text{m}$  και 0.22 αντίστοιχα, ενώ η διαπερατότητα τους κάλυπτε την περιοχή του ορατού και κοντινού υπεριώθρου (200 – 1100 nm). Στην περίπτωση των μετρήσεων του φθορισμού έχει παρεμβληθεί ανάμεσα στην οπτική ίνα απολαβής του φθορισμού και της εισόδου στον φασματογράφο ένα κατάλληλο οπτικό φίλτρο (cut off, < 380 nm) για την αποκοπή της ακτινοβολίας διέγερσης. Τόσο η πηγή λευκού φωτός όσο και οι πηγές στο υπεριώδες είναι βαθμονομημένες με μέγιστη ένταση ακτινοβολίας περίπου 20  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , οι οποίες παρέχουν τη δυνατότητα ρύθμισης της έντασης μέσω ποτενσιόμετρου στην ίδια την πηγή, όσο και με κάθετη μικρομετρική μετακίνηση της οπτικής ίνας μέσα στο ειδικά σχεδιασμένο δειγματολήπτη. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζονται δύο φωτογραφίες του συστήματος, όπως αυτό χρησιμοποιήθηκε για

την λήψη δοκιμαστικών μετρήσεων επαγόμενου φθορισμού σε δείγματα δερματικού ιστού από χοίρο, αλλά και για *in vivo* μετρήσεις διάχυτης ανάκλασης σε ανθρώπινο δερματικό ιστό.



Σχήμα 2: Φωτογραφίες της πειραματικής διάταξης, ενώ χρησιμοποιείται σε μέτρηση φθορισμού (*ex vivo*) πάνω σε δερματικό ιστό από χοίρο (αριστερά), σε μέτρηση ανάκλασης, *in vivo*, (δεξιά).. Στην πειραματική διάταξη διακρίνονται αριστερά η πολλαπλή πηγή φωτός, στο κέντρο το ειδικά σχεδιασμένο probe, στο οποίο καταλήγουν οι οπτικές ίνες (διέγερσης και ανίχνευσης), πίσω από το probe αμυδρά διακρίνεται ο φορητός φασματογράφος, συνδεδεμένος με ένα φορητό υπολογιστή (δεξιά).

Η καταγραφή και φασματική ανάλυση του ανακλώμενου από το δείγμα φωτός ή του επαγόμενου φθορισμού πραγματοποιείται από το φορητό και συνδεδεμένο με υπολογιστή φασματόμετρο τύπου S2000 της εταιρείας Ocean Optic, με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: ανιχνευτής φωτός CCD αισθητήρας 2048 διευθύνσεων, οπτικό φράγμα 600 γραμμών/mm, φίλτρο για περίθλαση δεύτερης τάξης, σχισμή 25  $\mu\text{m}$ . Η σύνδεση του φασματόμετρου με τον υπολογιστή γίνεται μέσω της θύρας USB.

Στον υπολογιστή, ένα φορητό PC με επεξεργαστή Intel Core2 Duo στα 2.0 GHz, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SpectraSuite της εταιρείας Ocean Optics, για την καταγραφή, καθώς επίσης το λογισμικό OriginPro 8.0 της εταιρείας OriginLab Co για την και επεξεργασία και παρουσίαση των φασμάτων.

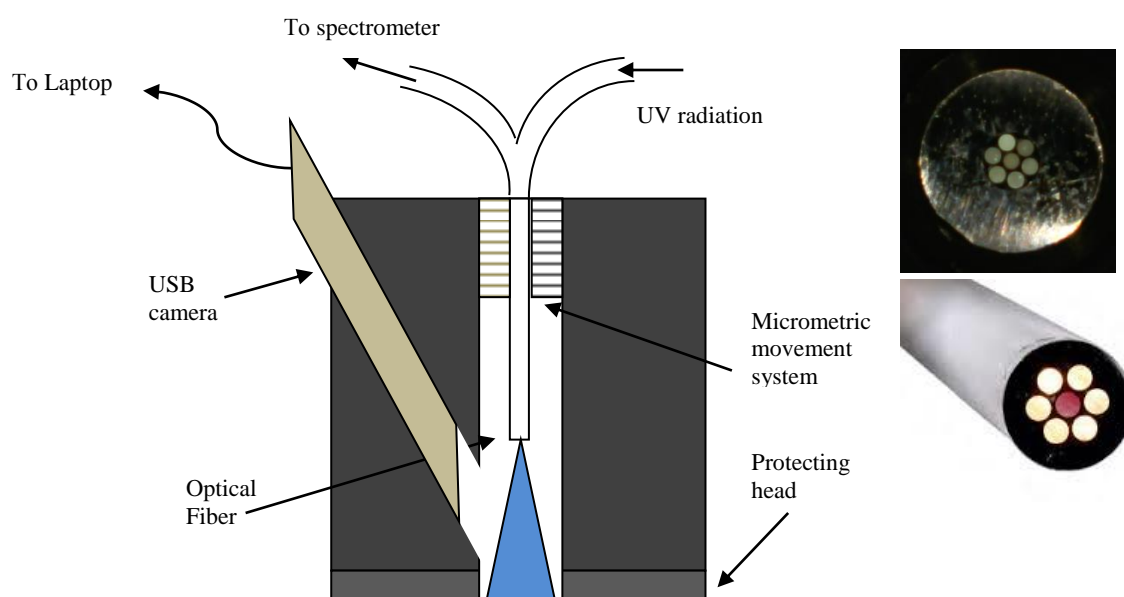
### Δειγματολήπτης (Probe)

Ο δειγματολήπτης είναι ένα σύστημα, στο οποίο προσαρμόζεται το άκρο της οπτικής ίνας κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να διασφαλίζονται κάθε φορά ίδιες συνθήκες μέτρησης με αυτές υπό τις οποίες έγινε η βαθμονόμηση. Ο φωτισμός του σημείου ενδιαφέροντος και η λήψη της ανάκλασης ή/και του φθορισμού που παράγεται γίνεται μέσω της οπτικής ίνας τύπου διχάλας (σχήμα 3). Σημαντικές παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη είναι η γεωμετρία της δέσμης διέγερσης, της επιφάνειας και της λήψης της ανάκλασης (κατακόρυφος προσανατολισμός, διατήρηση σταθερής απόστασης, συσκότισης κλπ).

Η οπτική επόπτευση του σημείου ενδιαφέροντος στην εξεταζόμενη επιφάνεια επιτυγχάνεται με την χρήση μίας USB κάμερας κατάλληλα προσαρμοσμένης στον δειγματολήπτη, η οποία μεταφέρει την εικόνα στην οθόνη του υπολογιστή. Η οπτική ίνα δύναται να μετακινηθεί μικρομετρικά στον κατακόρυφο άξονα, μεταβάλλοντας συνεπώς την επιφάνεια που φωτίζεται (η μέγιστη διάμετρος που μπορεί να φωτιστεί είναι 10 mm). Στην άκρη του δειγματολήπτη υπάρχει προστατευτική, αποσπώμενη

κεφαλή, η οποία εύκολα να καθαριστεί και απολυμανθεί μετά την πραγματοποίηση μέτρησης σε ασθενή.

Για διευκόλυνση στο χειρισμό και για τον έλεγχο της μέτρησης χρησιμοποιείται **Μονάδα Ελέγχου** συγκροτούμενη από έναν μικροελεγκτή τύπου Arduino, ο οποίος θέτει σε λειτουργία λήψης το φασματόμετρο μετά την ενεργοποίηση του διακόπτη (bush button) που βρίσκεται στο σώμα του δειγματολήπτη. Στις μετρήσεις LIF ο μικροελεγκτής ελέγχει και την πηγή φωτός επιβάλλοντας σ' αυτήν παλμική λειτουργία και ακολούθως σκανδαλισμό (trigger) του φασματόμετρου μετά από κάθε παλμό, με δυνατότητα ελέγχου του χρονισμού τους (χρόνος καθυστέρησης ανάμεσα στον παλμό και στην λήψη της μέτρησης).



Σχήμα 3: Σχηματική παρουσίαση του δειγματολήπτη. Στην ένθετη εικόνα φαίνονται οι επτά οπτικές ίνες, εκ των οποίων η κεντρική χρησιμοποιείται για τη διέγερση του δείγματος, ενώ οι περιφερειακές αναλαμβάνουν τη μεταφορά της δευτερογενούς ακτινοβολίας (μετά τη διάχυτη ανάκλαση ή τον φθορισμό) στο φασματόμετρο.

## Διεξαγωγή των μετρήσεων

### α) Βαθμονόμηση μετρήσεων διάχυτης ανάκλασης

Πριν από κάθε σειρά μετρήσεων διάχυτης ανάκλασης προηγείται μια διαδικασία βαθμονόμησης, η οποία δεν είναι παρά η σύγκριση με την ανάκλαση από επιφάνεια αναφοράς, ούτως ώστε να απαλειφθεί ο παράγοντας «πηγή φωτισμού» από τη μέτρηση. Ως επιφάνεια αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το WS-1 της Ocean Optics (σχήμα 4), γνωστό ως Spectralon, ένα εμπορικά διαθέσιμο πρότυπο υλικό διάχυτης ανάκλασης, το οποίο είναι κατασκευασμένο από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE) και το οποίο παρέχει μια ιδανική Lambertian επιφάνεια αναφοράς, κατάλληλη για πειράματα διάχυτης ανάκλασης.



Σχήμα 4: Φωτογραφία από την επιφάνεια του Spectralon που χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση των φασμάτων ανάκλασης.

Το φάσμα της ανάκλασης αποθηκεύεται στον υπολογιστή από το ίδιο το πρόγραμμα ως απόλυτη ιδανική ανάκλαση και στην συνέχεια συγκρίνεται με αυτό της ανάκλασης της εξεταζόμενης δερματικής επιφάνειας. Ο λόγος των δύο φασμάτων εκφράζεται ως εξεταζόμενη διάχυτη ανάκλαση μέσα από το πρόγραμμα συλλογής δεδομένων απευθείας σε ποσοστό [%], βάσει της παρακάτω σχέσης [1].

$$R_{\lambda} \% = \frac{S_{\lambda} - D_{\lambda}}{R_{\lambda} - D_{\lambda}} \times 100\% \quad [1]$$

όπου:  $S_{\lambda}$  η φασματική ένταση του δείγματος,  $D_{\lambda}$  η φασματική ένταση σκότους,  $R_{\lambda}$  η φασματική ένταση στο πρότυπο Spectralon.

#### β) Βαθμονόμηση επαγόμενου φθορισμού

Η ένταση αυτοφθορισμού για μήκη κύματος μέσω των οποίων απεικονίζονται σημαντικές βιολογικές διαφορές μεταξύ υγιών και καρκινικών ιστών μπορεί από μόνη της να αποτελέσει μία διαγνωστική παράμετρο. Επειδή όμως οι τιμές της μπορούν να επηρεαστούν σε μεγάλο βαθμό από αυξομειώσεις της έντασης της ακτινοβολίας διέγερσης, προτιμάται να χρησιμοποιείται ανάλυση των δεδομένων από τις μετρήσεις επαγόμενου φθορισμού, μέσω της μεθόδου της εξομάλυνσης και κανονικοποίησης. Αφού ληφθούν τα σήματα φθορισμού, γίνεται εξομάλυνση και κανονικοποίηση στο μέγιστο της κορυφής τους. Η κανονικοποίηση αυτή διορθώνει τη μεταβολή του προσπίπτοντος φωτός λόγω της απόστασης, της γωνίας μέτρησης, της θέσης της περιοχής ενδιαφέροντος και των συνθηκών φωτισμού. Το τελικό φάσμα είναι λοιπόν μία αδιάστατη καμπύλη η οποία δεν εξαρτάται από την ισχύ της προσπίπτουσας δέσμης διέγερσης.

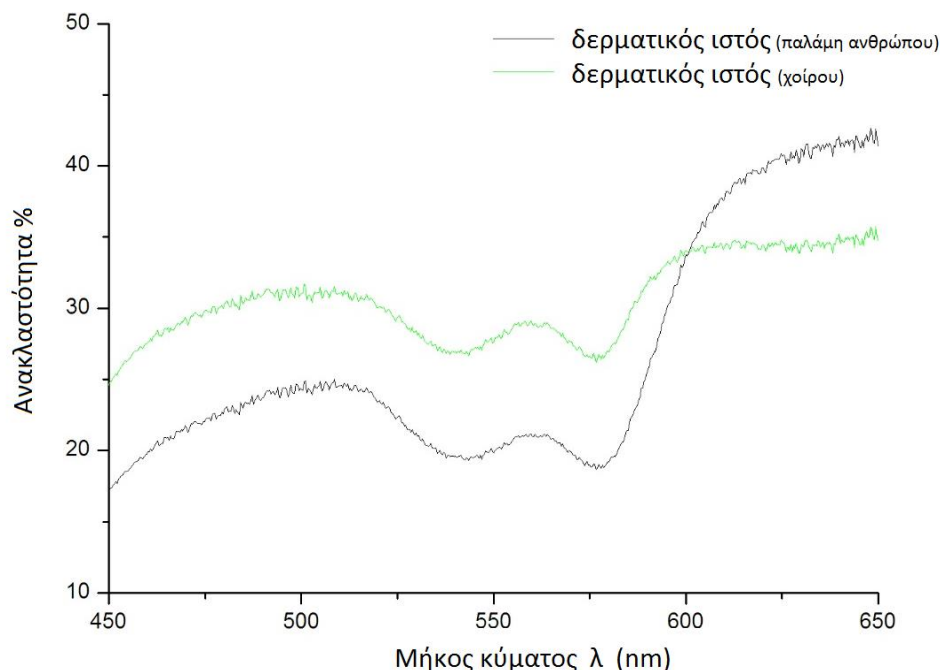
### Μετρήσεις και σχολιασμός

#### α) Μετρήσεις βαθμονόμησης της διάχυτης ανάκλασης.

Στο σχήμα 5 παρουσιάζεται το φάσμα διάχυτης ανάκλασης το οποίο έχει ληφθεί στο εσωτερικό της παλάμης ανθρώπου (in vivo). Παρατηρούμε μια βαθμιαία αύξηση σε σχέση με το μήκος κύματος με ένα βύθισμα στην περιοχή μεταξύ 540 – 580 nm. Η ύπαρξη του μοτίβου “W” (με ελάχιστο στο συγκεκριμένο φάσμα στα 542 nm και στα 576 nm -οι χαρακτηριστικές α και β ζώνες) υποδηλώνει την ύπαρξη αιμοσφαιρίνης στην οξυγονωμένη της μορφή [21, 22, 23].

Η ακτινοβολία διέγερσης συναντά πρώτα την επιδερμίδα. Η μελανίνη στην επιδερμίδα δρα ως ένα φίλτρο, όπου το βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας αυξάνεται με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Το φως το οποίο δεν απορροφάται από την

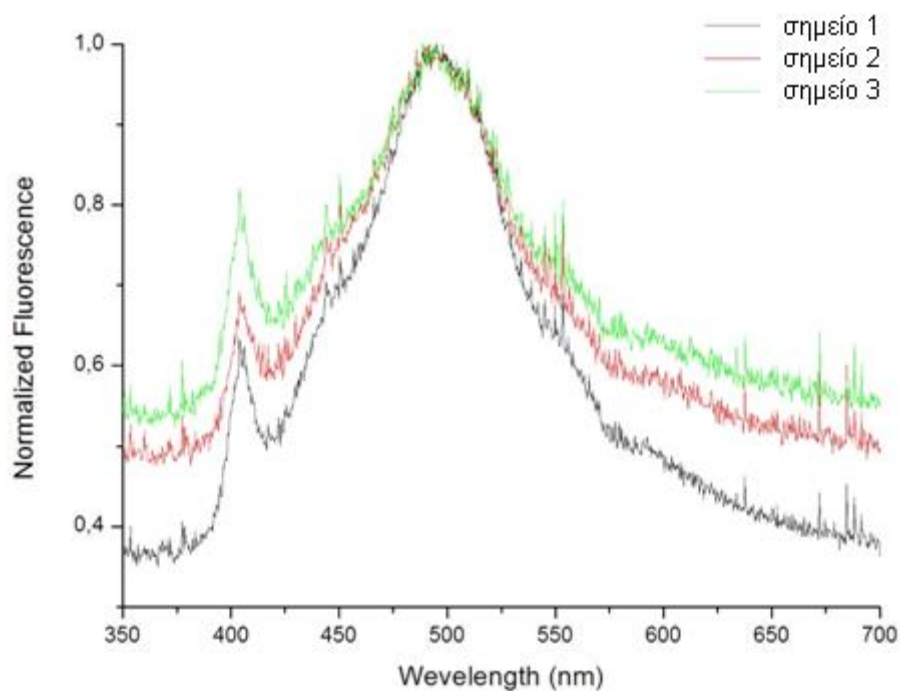
μελανίνη, διαπερνά την επιδερμίδα και φθάνει στο χορίο στο οποίο λαμβάνει χώρα σε μεγάλο ποσοστό η ανάκλαση της ακτινοβολίας. Η αιμοσφαιρίνη στα αγγεία μέσα στο χορίο είναι αυτή που προκαλεί το φασματικό προφίλ “W”, στο φάσμα ανάκλασης. Η οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη έχει χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης στα 420 nm, 542 nm, 560 nm και 576 nm, ακριβώς εκεί όπου παρατηρούμε το “W” προφίλ [10]. Το φάσμα της μη οξυγονωμένης αιμοσφαιρίνης είναι τελείως διαφορετικό, με τις ζώνες α και β έχουν αντικατασταθεί με ένα ευρύ φάσμα συντονισμού (single broad resonance) στα 555 nm.



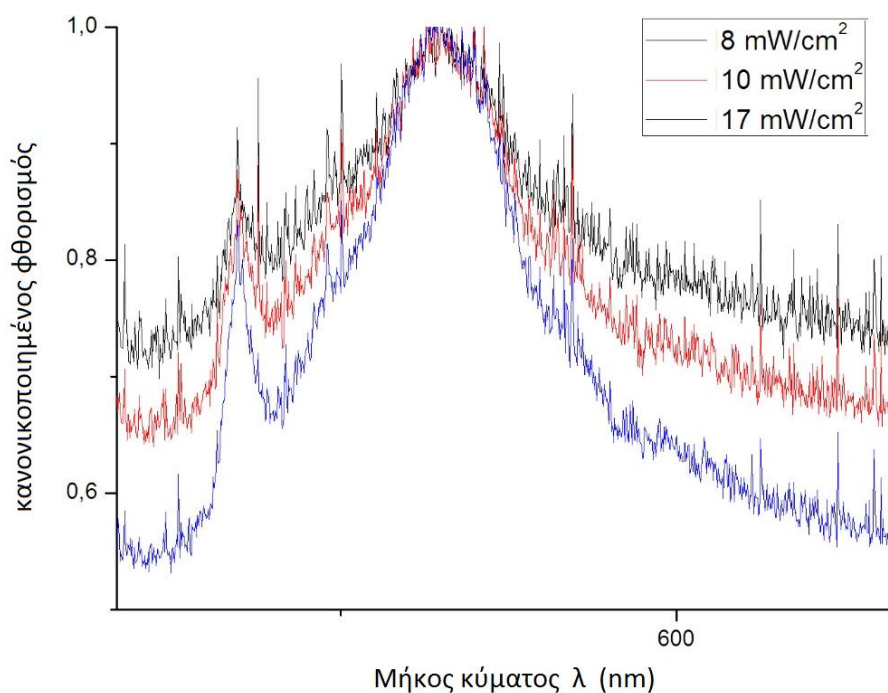
Σχήμα 5: Ενδεικτικό φάσμα διάχυτης ανάκλασης ανθρώπινης παλάμης (*in vivo*) και δερματικού ιστού από χοιρινό (*ex vivo*) μεταξύ 450 και 650 nm. Παρατηρείται ευκρινώς το χαρακτηριστικό μοτίβο W της αιμοσφαιρίνης με ελάχιστα στα 542 nm και 576 nm.

b) Μετρήσεις βαθμονόμησης του επαγόμενου φθορισμού.

Στο σχήμα 6 παρουσιάζονται ενδεικτικά φάσματα επαγόμενου φθορισμού, προερχόμενα από τρεις διαφορετικές περιοχές δερματικού ιστού χοίρου, όπως λήφθηκαν από την πρότυπη συσκευή, μετά από διέγερση με UV στα 365 nm. Η ένταση της ακτινοβολίας ήταν 17 mW/cm<sup>2</sup>. Ο συνολικός χρόνος μέτρησης ήταν 1 s. Τα φάσματα έχουν κανονικοποιηθεί στο μέγιστο του κάθε φάσματος. Για την αποκοπή της ακτινοβολίας διέγερσης των 365 nm χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο οπτικό φίλτρο, μικρό μέρος όμως της ακτινοβολίας παρέμεινε στο φάσμα (η κορυφή στην περιοχή των 400 nm οφείλεται στην ακτινοβολία διέγερσης), δεν αλλοιώνει όμως τα χαρακτηριστικά των τριών φασμάτων φθορισμού, όπου και στις τρεις περιπτώσεις το μέγιστο πραγματοποιείται στην περιοχή των 500 nm. Η κατανομή του φάσματος διαφοροποιείται ελαφρά ανάλογα με τον φωτότυπο του δέρματος όπου το σκουρόχρωμο δέρμα είχε ως αποτέλεσμα ένα στενότερο φάσμα.



Σχήμα 6: Φάσματα επαγόμενου φθορισμού, προερχόμενα από τρία διαφορετικά σημεία δερματικού ιστού χοίρου, διαφοροποιούμενα ως προς την σύσταση και το χρώμα τους: αντιστοιχούν σε ανοιχτόχρωμες, σκουρόχρωμες και κοκκινωπές περιοχές (διέγερση από UV ακτινοβολία στα 365 nm και ένταση  $17 \text{ mW/cm}^2$ )



Σχήμα 7: Ενδεικτικά φάσματα επαγόμενου φθορισμού με διέγερση από UV ακτινοβολία στα 365 nm για τρεις διαφορετικές εντάσεις ακτινοβολίας. Ο συνολικός χρόνος έκθεσης σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 1 sec.



Στο Σχήμα 7 παρουσιάζονται ενδεικτικά τρία φάσματα επαγόμενου φθορισμού από την ίδια περιοχή του δερματικού ιστού, αλλά για διαφορετικές εντάσεις την ακτινοβολίας διέγερσης στα 365 nm. Παρατηρούμε ότι ευκρινές φάσμα είναι δυνατό να ληφθεί με ελάχιστη ένταση 8 mW/cm<sup>2</sup> και συνολικό χρόνο έκθεσης στο 1 sec. Τα επίπεδα αυτά της ακτινοβολίας είναι κατάλληλα για μετρήσεις *in vivo* σε ανθρώπινους ιστούς, βάσει προτεινόμενων επιπέδων ασφάλειας στην υπεριώδη ακτινοβολία UVA.

### Συμπεράσματα

Σχεδιάστηκε και υλοποιήθηκε ένα πρότυπο σύστημα μέτρησης φασμάτων επαγόμενου φθορισμού αλλά και διάχυτης ανάκλασης μετά από διέγερση από υπεριώδη/ορατή ακτινοβολία αντίστοιχα. Το σύστημα έχει μελετηθεί, έτσι ώστε να αποτελέσει ένα φορητό σύστημα για την μελλοντική φωτοδιάγνωση δερματικών κακοηθειών και με τις δύο μεθόδους.

Για τον έλεγχο του συστήματος λήφθηκαν φάσματα διάχυτης ανάκλασης δοκιμαστικά τόσο *ex vivo* όσο και *in vivo* τα οποία συγκρίθηκαν με αυτά της διεθνούς βιβλιογραφίας. Η σύγκριση έδειξε την ταύτιση σε μεγάλο βαθμό των πειραματικών μας αποτελεσμάτων με αυτά της βιβλιογραφίας και συνεπώς την καλή λειτουργία της συσκευής.

Όσον αφορά την λειτουργία του συστήματος με την τεχνική του επαγόμενου φθορισμού έγινε λήψη φασμάτων *ex vivo* από δερματικό ιστό χοίρου και επιβεβαιώθηκε ότι είναι δυνατή η λήψη αξιόπιστων μετρήσεων φθορισμού από το πρότυπο σύστημα στην περιοχή εντάσεων ακτινοβολίας που είναι επιθυμητή για την μελλοντική διάγνωση δερματικών κακοηθειών.

### Ευχαριστίες

Η ερευνητική αυτή προσπάθεια υποστηρίζεται οικονομικά από το ερευνητικό πρόγραμμα "ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ ΙΙ", χορηγία 021215, Κωδικός ΟΠΣ(MIS): 379389, "FluDiaPhoSkinTherapy" που χρηματοδοτείται από το Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ινστιτούτο (ΤΕΙ) Αθήνας.

### Αναφορές

1. Drakaki E, Vergou T, Dessinioti C, Stratigos AJ, Salavastru C, Antoniou C, "Spectroscopic methods for the photodiagnosis of nonmelanoma skin cancer". J Bio med Opt.18(6):61221 (2013).
2. Drakaki E, Kaselouris E, Makropoulou M, Serafetinides AA, Tsenga A, Stratigos AJ, Katsambas AD, Antoniou Ch "Laser induced fluorescence and reflectance spectroscopy for the discrimination of basal cell carcinoma from the surrounding normal skin tissue", Skin Pharmacology and Physiology, 22(3):158-165 (2009).
3. E. G. Borisova; L.A. Avramov, "Laser system for optical biopsy and in-vivo study of the human skin", Proc. SPIE, 4397, 405 (2001). Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. JAMA. 2007; 297:842-57.
4. Wagnieres GA, W.M. Star and B.C. Wilson, "In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications, "Photochem. Photobiol. 68(5), 603–663 (1998).

5. Koenig F, McGovern FJ, Enquist H, Larne R, Deutsch TF and Schomacker KT (1998) "Autofluorescence guided Biopsy for the Early Diagnosis of Bladder-Carcinoma", J. Urology, 159: 1871-1875.
6. Kollias N, Zonios G, Stamatas G: Fluorescence spectroscopy of skin. *Vibrat Spectrosc* 2002; 28: 17–23.
7. Richards-Kortum R, Sevick-Muraca E: Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnostics. *Annu Rev Phys Chem* 1996; 47:555–606.
8. Koenig K, Schneckenburger H, Hemmer J, Tromberg BJ, Steiner RW: In vivo fluorescence detection and imaging of porphyrin producing bacteria in the human skin and in the oral cavity for diagnosis of acne vulgaris, caries, and squamous cell carcinoma. *Proc SPIE Conf Adv Laser Light Spectrosc Diagn Cancer Other Dis*, Los Angeles, 1994, vol 2135, pp 129–138.
9. Kollias N, Gillies R, Moran M, Kochevar I, Anderson R: Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 776–780.
10. Ιωάννης Α. Σιανούδης, Ελένη Δρακάκη, Ιωάννης Βαλαής, Μετρήσεις στο δερματικό ιστό με τη μέθοδο της διάχυτης ανακλαστικής φασματοσκοπίας: μια πρώτη προκαταρκτική προσέγγιση, e-Journal of Science & Technology pp. 43-57, 1, 2006.
11. Brancalion L *et al* 2001, Zeng H *et al* 1998, Zeng H *et al* 2000, Zeng H *et al* 2003, Panjehpour M *et al* 2003, Vo-Dinh T *et al* 2003
12. Brancalion L., Bamberg M.P., Sakamaki T., Kollias N. (2001). "Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy as a possible method to investigate biophysical parameters of stratum corneum *in vivo*". *J Invest. Dermatol.* 116(3): 380-386.
13. Zeng H., McLean D.I., MacAulay C.E., Palcic B. and Lui H. (1998). "Autofluorescence of basal cell carcinoma". *Proc. SPIE.* 3245: 314-317
14. Zeng H., McLean D.I., MacAulay C.E. and Lui H. (2000). "Autofluorescence properties of skin and applications in dermatology," *Proc. SPIE.* 4224: 366-373
15. Panjehpour M, Julius CE, Phan MN, Vo-Dinh T (2002). "Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy for *In Vivo* Diagnosis of Non-melanoma Skin Cancers". *Lasers Surg. Med.* 31(5):367–373.
16. Vo-Dinh T., Panjehpour M., Overholt B. F., Julius C. E., Overholt S. and Phan M.N. (2003). "Laser-induced fluorescence for the detection of esophageal and skin cancer". *Proc. SPIE.* 4958: 67-70
17. Zeng H. and MacAulay C., (2003) in *Handbook of Biomedical Fluorescence*, pp. 315-360 (Marcel Dekker Eds.).
18. Lin WC, Toms SA, Jansen ED, Mahadevan-Jansen A (2001) Intraoperative Application of Optical Spectroscopy in the Presence of Blood. *IEEE J Sel. Top. Quant* 7: 996-1003
19. Brancalion L, Durkin AJ, Tu JH, Manaker G, Kollias N, (2001) In vivo fluorescence spectroscopy of non-melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol* 73:178–183
20. Na R, Stender IM, Wulf HC. Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence. *Acta Derm Venereol* 2001;81: 246–249.
21. Tuchin VV, Zhestkov DM, Bashkatov AN, Genina EA (2004) Theoretical study of immersion optical clearing of blood in vessels at local hemolysis *Opt. Express* 12:2966-2971
22. Stamatas GN, Zmudzka BZ, Kollias N, Beer J (2004) Non-Invasive Measurements of Skin Pigmentation in Situ. *Pigment Cell Res* 17:618-626

23. Borisova E, Petya Pavlova, Elmira Pavlova, Petranka Troyanova, Latchezar Avramov., "Optical Biopsy of Human Skin – A Tool for Cutaneous Tumours' Diagnosis," *Int. J. Bioautomation*, 16(1), 53-72 (2012).

-----

**Design, test and calibration of a portable spectroscopy system that applies the diffused reflectance and the induced fluorescence technique for dermatological medical purposes**

**E. Drakaki<sup>1</sup>, N. Merlemis<sup>2</sup>, G. Mitsou<sup>2</sup>, I. Vamvakas<sup>2</sup>, M. Kompitsas<sup>3</sup> and I. A. Sianoudis<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Physics Dept. –School of Applied Mathematical and Physical Science, National Technical University:  
edrakaki@central.ntua.gr

<sup>2</sup> Physics Laboratory, Dept. Of Energy Technology Engineering, Technological Educational Institute (TEI) of Athens e-mail: merlemis@teiath.gr, georgesmitsou@yahoo.gr, ibamb@teiath.gr

<sup>3</sup> Theoretical & Physical Chemistry Institute, National Hellenic Research Foundation, e-mail:  
mcomp@eie.gr

<sup>4</sup> Dept. Of Optics and Optometry, Technological Educational Institute (TEI) of Athens,  
email: sianoudis@teiath.gr

**Abstract**

The purpose of this work is the design and test operation of a prototype system for taking measurements, alternatively, with both the techniques of the Diffused Reflectance Spectroscopy (DRS) and the Induced Fluorescence Spectroscopy (IFS). The whole setup is so constructed as to be portable, and the calibration and control of the system was used in order to be able to take skin tissue test measurements both ex vivo and in vivo. The same system is aimed at the final stage of development, to be used as a diagnostic tool for in vivo imaging and detection of non-melanoma skin cancers. The IFS measurements were made using suitable light sources of UV radiation (UV LEDs) and the same device can be used for making diffused reflectance measurements using a LED white light source.

Keywords: reflectance spectroscopy, induced fluorescence spectroscopy, skin, light induced fluorescence, reflectance