



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



EIROPAS SAVIENĪBA

ESF projekts

Inovatīvas biomedicīnisko attēlu iegūšanas un apstrādes tehnoloģijas InBiT

Elektronikas un datorzinātņu institūts un Latvijas
Universitāte

Dainis Jakovels

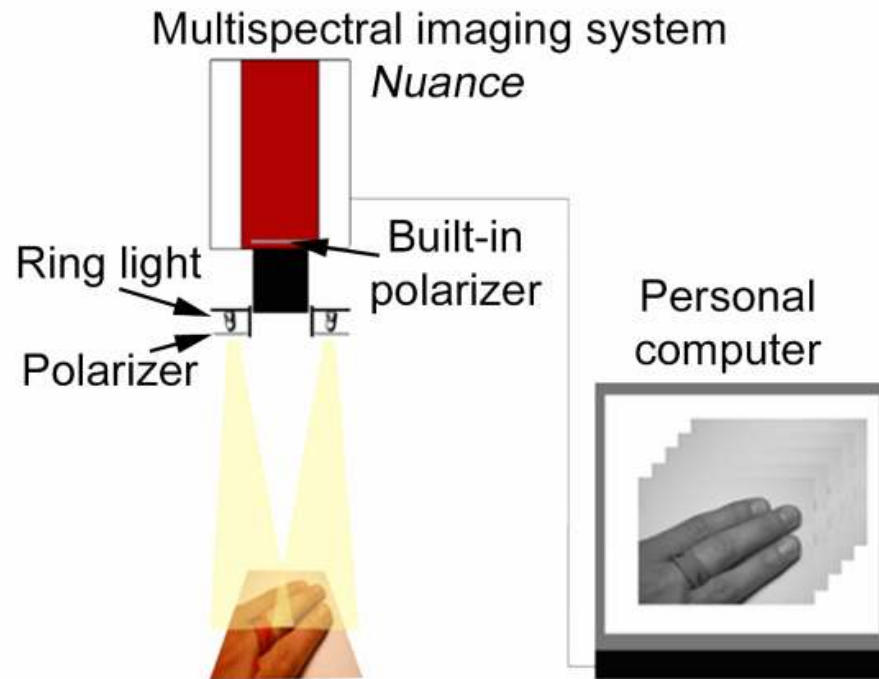
Projekta zinātniskais vadītājs no LU puses

dainis.jakovels@lu.lv

Projekta numurs 2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014.

Background

Multispectral imaging device



Spectral scanning: 450 – 950 nm range, 10 nm step, 15 nm bandwidth

Clinical study: 221 skin lesions

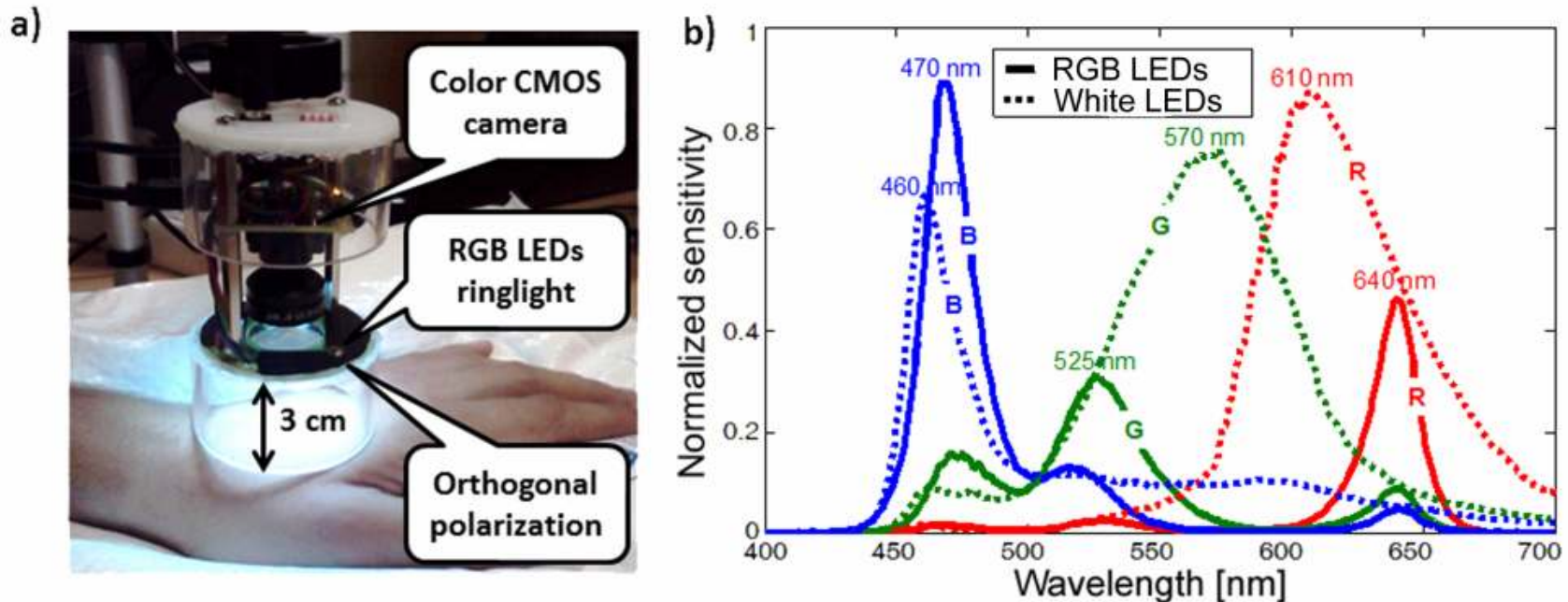
(31 melanoma, 158 benign pigmented lesions, 32 vascular lesions)

- **D.Jakovels**, J.Spigulis. 2-D mapping of skin chromophores in the spectral range 500-700 nm. *Journal of Biophotonics* 3(3), 125-9, 2010.
- I.Kuzmina, I.Diebele, **D.Jakovels**, J.Spigulis, L.Valaine, J.Kapostins, A.Berzina. Towards noncontact skin melanoma selection by multispectral imaging analysis. *Journal of Biomedical Optics* 16, 060502, 2011.

Background

RGB imaging device

with LED ring light illumination



Clinical study: monitoring of 31 vascular lesions phototherapy

- **D.Jakovels**, J.Spigulis. RGB Imaging Device for Mapping and Monitoring of Haemoglobin Distribution in Skin. *Lithuanian Journal of Physics* 52(1), 50-54, 2012.
- **D.Jakovels**, I.Kuzmina, A.Berzina, L.Valaine, J.Spigulis. Non-contact Monitoring of Vascular Lesion Phototherapy Efficiency by RGB Multispectral Imaging. *Journal of Biomedical Optics* 18(12), 126019, 2013.

Background

SkImager



- Spigulis, Janis, et al. "SkImager: a concept device for in-vivo skin assessment by multimodal imaging." *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 63.3 (2014): 213-220.

Par InBiT projektu

Projekta vispārīgais mērķis:

Veicināt papildu cilvēkresursu piesaisti zinātnei, veidojot jaunu starpdisciplināru zinātnisko grupu, kuras zinātniskajam un pētnieciskajam darbam piesaista jaunus zinātniekus un ārvalstu zinātniekus. Izveidota grupa izstrādās un aprobēs jaunas tehnoloģijas un ierīces biomedicīnisko attēlu iegūšanai un apstrādei.

Projekta specifiskais (zinātniskais) mērķis:

Izstrādāt un klīniski aprobēt inovatīvas metodes un ierīces neinvazīvai multimodālu ādas attēlu veidošanai un apstrādei, lai identificētu un klasificētu specifiskus ādas bojājumus, kā arī lai nodrošinātu bezkontakta sirdsdarbības un asinsrites monitoringu.

Projekta izpildes termiņš: 2013.gada 1.septembris – 2015.gada 31.augusts.

Projekta kopējais finansējums: 349396 LVL, no tā ESF finansējums 323086 LVL.

Projekta mājas lapa: <http://www.edi.lv/lv/projekti/es-projekti/11120-inbit/>

InBiT komanda

starpdisciplināra zinātniskā grupa

Projekta zinātniskais vadītājs

Aivars Lorencs (Ints Mednieks)	EDI	matemātikas doktors
--------------------------------	-----	---------------------

Jaunie zinātnieki

Jekaterina Bula	EDI	inženierzinātņu doktors
Kristīne Azarjana	EDI	medicīnas doktors
Mindaugas Tamošiūnas	ASI	fizikas doktors, ārvalstu zinātnieks
Dainis Jakovels	ASI	fizikas doktors, proj. zin. vad. no LU

Doktoranti

Inga Saknīte	ASI	fizikas doktorants
Gita Krieviņa	EDI	bioloģijas doktorants
Dmitrijs Bļizņuks	ASI	inženierzinātņu doktorants
Roberts Kadiķis	EDI	inženierzinātņu doktorants

Pārējais zinātniskais personāls

Juris Siņica-Siņavskis	EDI	matemātikas maģistrs
------------------------	-----	----------------------

InBiT pētāmā tehnoloģija

Jauna multimodāla biomedicīnas datu attēlošanas tehnoloģija, kas apvienos vairākas attēlu iegūšanas metodes (remisijas un fluorescences spektrālo attēlošanu, kā arī lāzerspeklu un/vai bezkontakta fotopletismogrāfijas attēlošanu) un dažādas attēlu apstrādes metodes ādas parametru kvantitatīvai novērtēšanai un ādas veidojumu klasifikācijai. Ar jauno metodi būs iespējams gūt daudz pilnīgāku ādas stāvokļa novērtējumu – ādas sastāva (hromoforu un fluoroforu) koncentrācijas un asins apgādes (asins plūsmas) kvantitatīvu novērtējumu un ādas veidojumu (piem., labdabīgo dzimumzīmju un ļaundabīgo melanomu) kvalitatīvu novērtējumu jeb klasifikāciju.

Multimodāla biomedicīnas datu attēlošanas tehnoloģija, kas apvieno:

- remisijas spektrālo attēlošanu,
- fluorescences spektrālo attēlošanu,
- lāzerspeklu attēlošanu.

Mērķa objekts – āda.

InBiT rezultātu prezentācijas konferencēs

- **Advanced Optical Materials and Devices 2014** (25.-27.08.2014., Rīga, Latvija) –
Dainis Jakovels,
Mindaugas Tamošiūnas
- **Electronics 2014** (16.-18.06.2014., Palanga, Lietuva) –
Juris Siņica-Siņavskis
- **OSA Biomedical Optics 2014** (26.-30.04.2014., Maiami, ASV) –
Inga Saknīte
- **SPIE Photonics Europe 2014** (14.-17.04.2014., Brisele, Beļģija) –
Dainis Jakovels,
Inga Saknīte
- **Developments in Optics and Communications 2014** (9.-12.04.2014., Rīga, Latvija) –
Dainis Jakovels,
Inga Saknīte

8 no 12 solītajām prezentācijām

InBiT rezultātu publikācijas

- Aivars Lorencs, Ints Mednieks and Juris Sinica-Sinavskis “Simplified Classification of Multispectral Image Fragments” **ELEKTRONIKA IR ELEKTROTEHNIKA**, ISSN 1392-1215, VOL. 20, NO6, 2014, lpp. 136-139.
- Inga Saknite*, Dainis Jakovels, Janis Spigulis “Diffuse reflectance and fluorescence multispectral imaging system for assessment of skin” Konferenču SPIE Photonics Europe 2014, 14 - 17 April 2014, Brussels, Belgium. **Proc. of SPIE** Vol.9129 lpp. 91293H-1 līdz 91293H-6.
- Dainis Jakovels*, Inga Saknite, Janis Spigulis “Implementation of laser speckle contrast analysis as connection kit for mobile phone for assessment of skin blood flow”, SPIE Photonics Europe 2014, 14 - 17 April 2014, Brussels, Belgium, **Proc. of SPIE** Vol.9129 lpp. 91293I-1 līdz 91293I-8.
- D. Jakovels “Mobile phone based laser speckle contrast imager for assessment of skin blood flow”, pieņemts publicēšanai **Proc. of SPIE**.
- M. Tamošiūnas “Application of fluorescence spectroscopy and multispectral imaging for non-invasive estimation of GFP transfection efficiency”, , pieņemts publicēšanai **Proc. of SPIE**.

1+4 no 2+2 solītajām publikācijām

InBiT seminārs

13:15–13:30 Reģistrācija un ievads

13:40–14:00 Kristīne Azarjana

Ādas veidojumu diagnostika klīniskajā praksē

14:00–14:20 Inga Saknīte

LU ASI izstrādātā aparatūra ādas veidojumu remisijas un fluorescences attēlu iegūšanai, laboratorijas izpētes rezultāti

14:20–14:40 Roberts Kadiķis

Algoritmi multispektrālo attēlu reģistrācijai un veidojumu segmentācijai

14:40–15:00 Juris Siņica-Siņavskis

Ādas hromoforu kartēšanas problēmu risinājumi un iegūtie rezultāti

15:00–15:30 Kafijas pauze

15:30–15:50 Dainis Jakovels

Lāzerspeklu izmantošana asins plūsmas novērtēšanai ādā

15:50–16:10 Mindaugas Tamošiunas

Fluorescences spektroskopijas izmantošana in vivo elektroforēzes un sonoforēzes efektivitātes novērtēšanai zāļu ievadīšanai šūnās

16:10–16:30 Aivars Lorencs

Melanomas / dzimumzīmes klasifikācijas metode, izmantojot neliela skaita spektrālo joslu informāciju

16:30–16:50 Diskusija

Prasības praksē plaši izmantojamai melanomas detektēšanas aparatūrai (diskusija)



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



EIROPAS SAVIENĪBA

ESF līdzfinansēta projekta „Inovatīvas biomedicīnisko attēlu iegūšanas un apstrādes tehnoloģijas (InBiT)”
vienošanās Nr.2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Ādas veidojumu diagnostika klīniskajā praksē

Dr. med. Kristīne Azarjana
dermatologs

EDI

RSU

Lāzerplasikas klīnika

Projekts "Inovatīvas biomedicīnisko attēlu iegūšanas un apstrādes
tehnoloģijas (InBiT)"

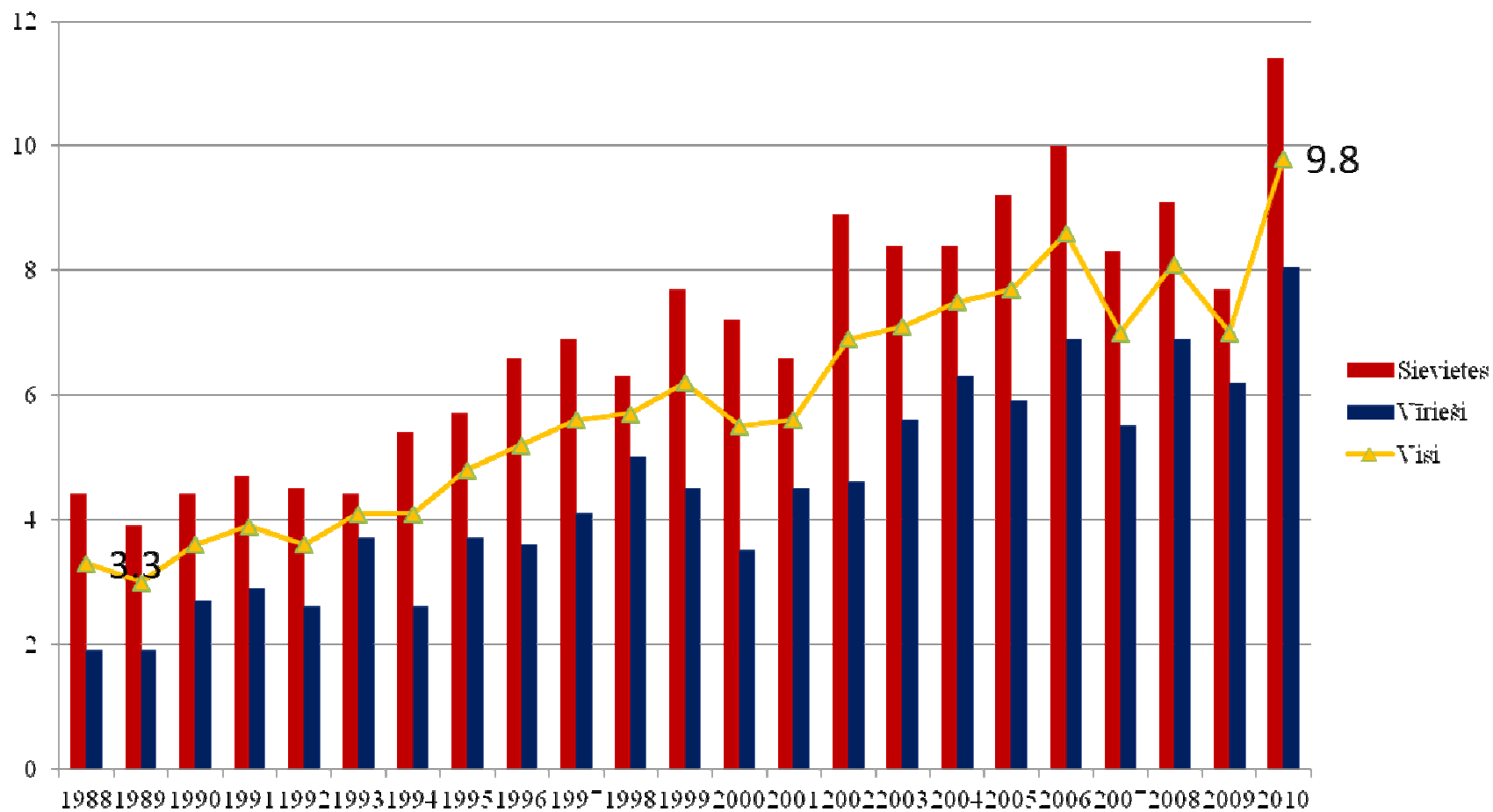
Nr. 2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014

Rīga, 05.12.2014.

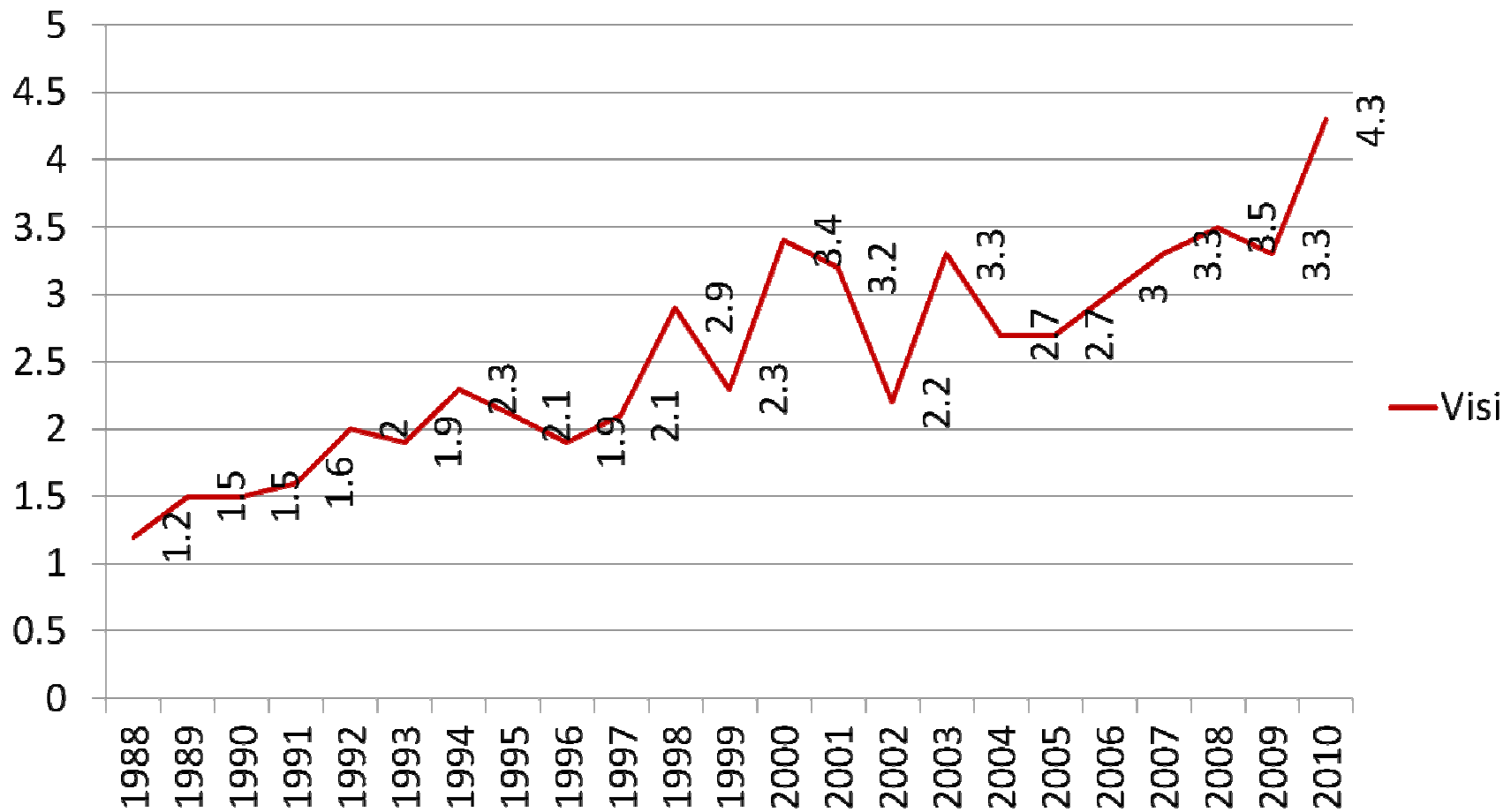
ĀDAS MELANOMA



Melanomas incidence Latvijā uz 100 000 iedzīvotāju laika posmā no 1988. līdz 2010. g.



Mirstība no melanomas Latvijā uz 100 000 iedzīvotāju laika posmā no 1988. līdz 2010. g.



MELANOMAS PROGNOSTISKIE FAKTORI UN RISKA GĒNI*

- Klīniskie prognostiskie faktori:
 - pacienta vecums
 - pacienta dzimums
 - audzēja lokalizācija
- Histoloģiskie prognostiskie faktori:
 - melanomas veids
 - melanomas *Breslow* biezums
 - čūlošana
 - pigmenta klātbūtne
- Melanomas riska gēni:
 - augstas penetrances melanomas riska gēnu mutācijas (*CDKN2A*, *CDK4*)
 - polimorfismi zemas penetrances melanomas riska gēnos (*MC1R*, *TYR*, *ASIP*...)

*Klīniskajā praksē par mutācijām tiek uzskatītas izmaiņas gēnos, kas izraisa slimības attīstību, savukārt izmaiņas, kas slimību nerada, sauc par polimorfismiem [*Cotton*, 2002].

Breslow thickness

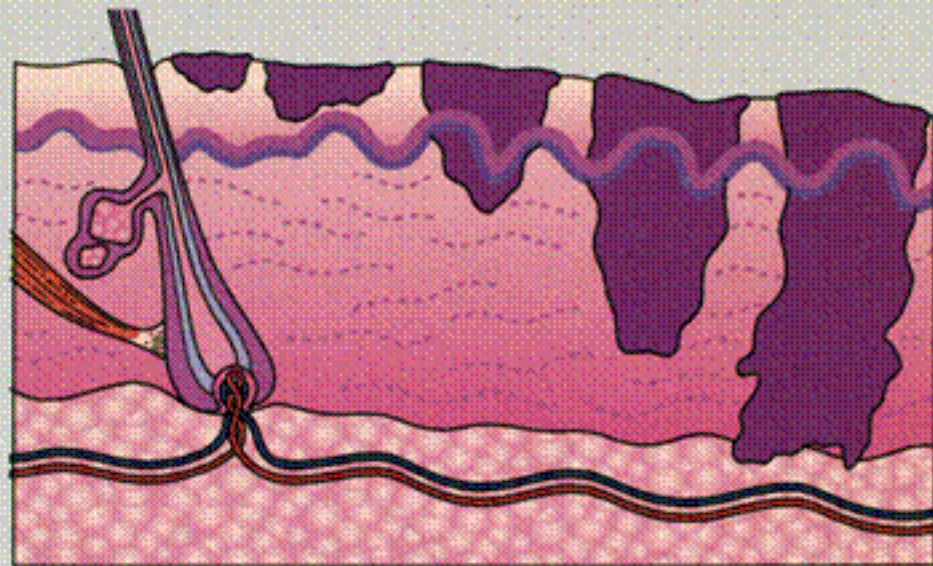
< 0.76 mm

0.76–1.49 mm

1.50–2.49 mm

2.50–4.00 mm

> 4 mm



Positive nodes
on elective neck
dissection

0%

5%

16%

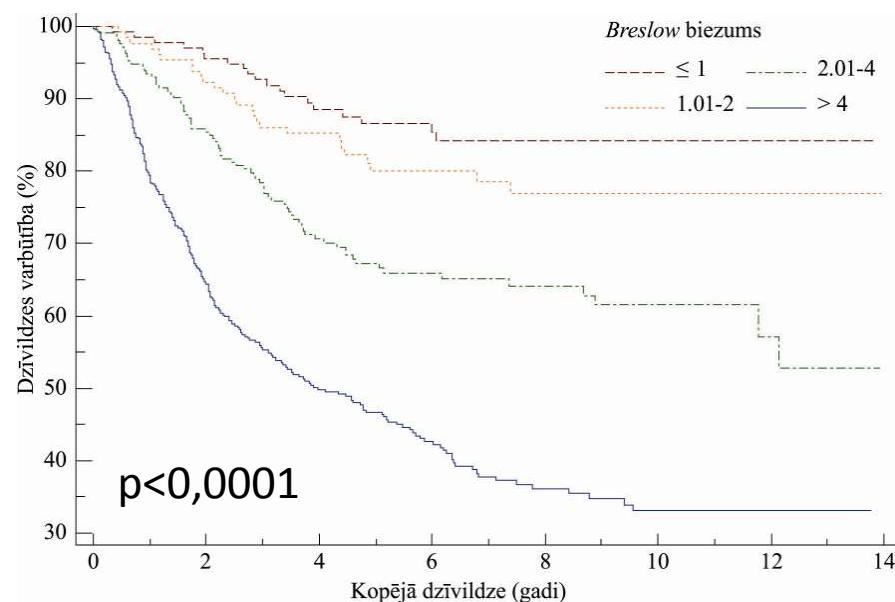
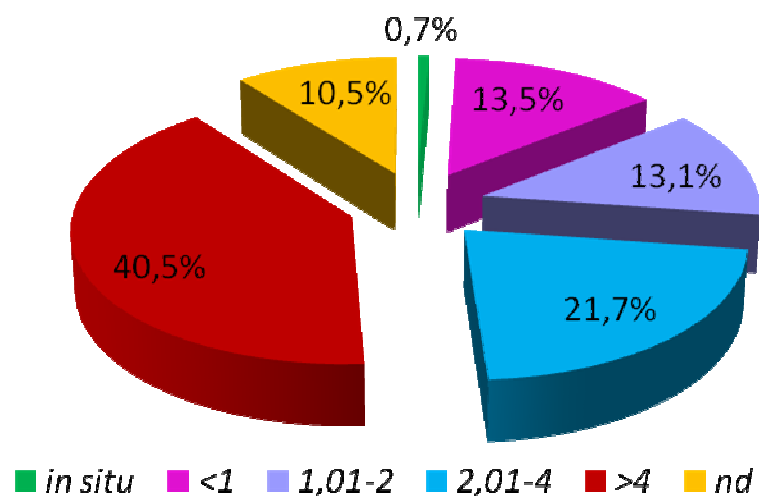
24%

36%

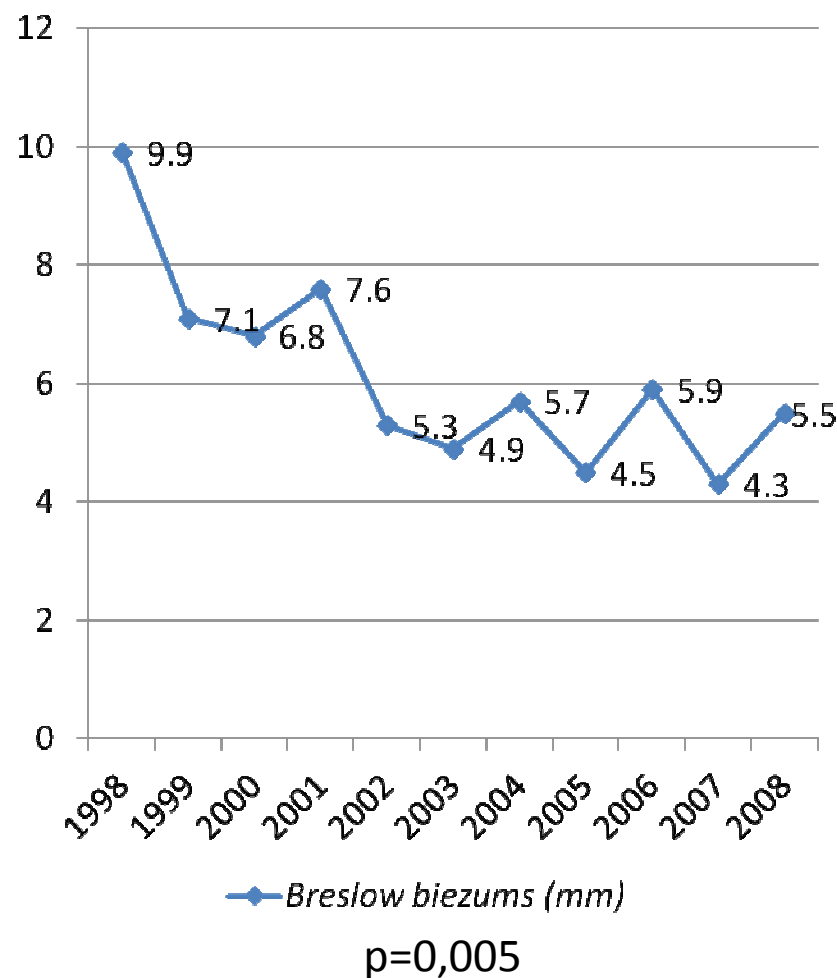
5 gadu dzīvildze melanomas pacientiem atkarībā no Breslow biezuma

Breslow biezums (mm)	5 gadu dzīvildze (%)
< 1,5	93
1,5 – 3.5	67
>3,5	37

ANALIZĒTO MELANOMU HISTOLOĢISKĀS PAZĪMES UN DZĪVILDZES RĀDĪTĀJI: **BRESLOW BIEZUMS** (RAKUS LOC, 1998. - 2008.g.)



Vidējo Breslow biežumu izmaiņas pa gadiem



Ādas veidojumu izmeklēšana

- Histoloģiskā (morfoloģiskā)
- Klīniskā – ABCDE kritēriji
- Dermoskopiskā

A Asimetrija



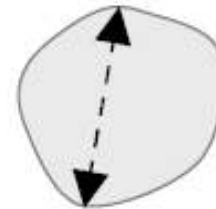
B Border – nelīdzenas malas



C Color – krāsas izmaiņas



D Diametrs > 5mm



E Evolution – morfoloģiskas izmaiņas īsā laika periodā



Dermatoskopija

- Dermatoskopija (dermoskopija, epiluminiscentā mikroskopija) – *in vivo* diagnostiska metode melanomas agrīnai diagnostikai un pigmentveidojumu diferenciāldiagnostikai.
- Dermoskopija ļauj identificēt daudzas struktūras, krāsas un asinsvadus, kas nav izvērtējami ar neapbruņotu aci.
- Dermatoskopijas pielietošana palielina diagnostikas precizitāti par 5-30% atkarībā no ādas veidojuma veida un ārsta pieredzes.

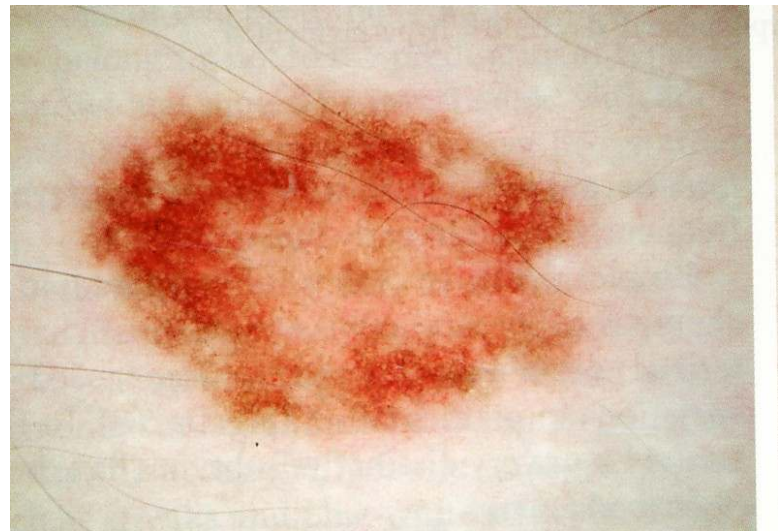
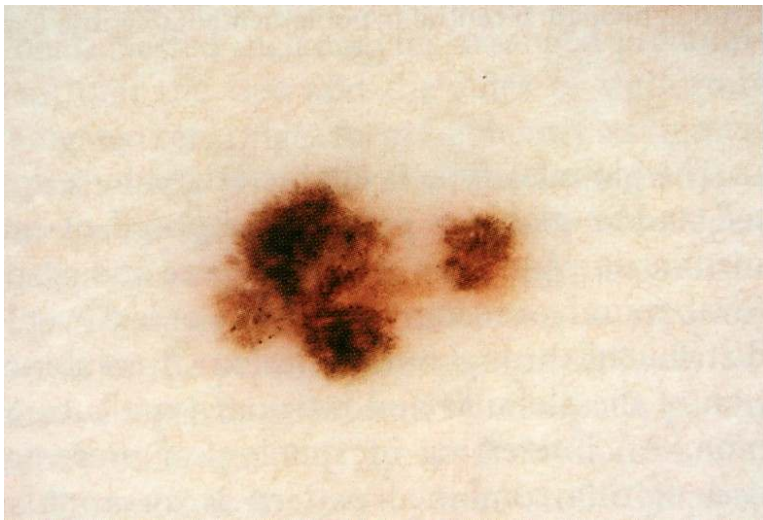




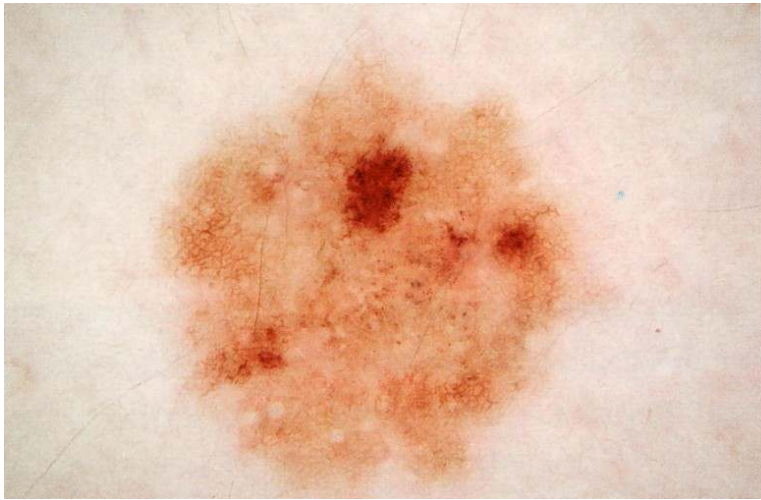
Atipisko (displastisko) molu sindroms



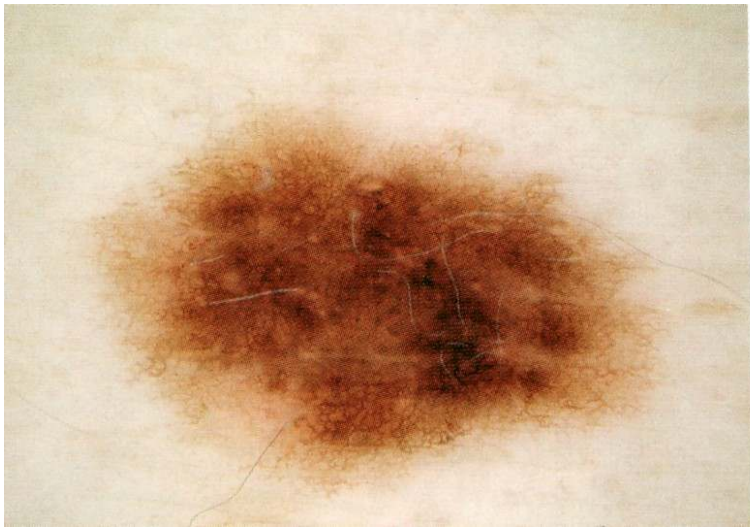
Dispalstisks nevus



Dispalstisks nevus



Dispalstisks nevus



Melanocītu veidojumi

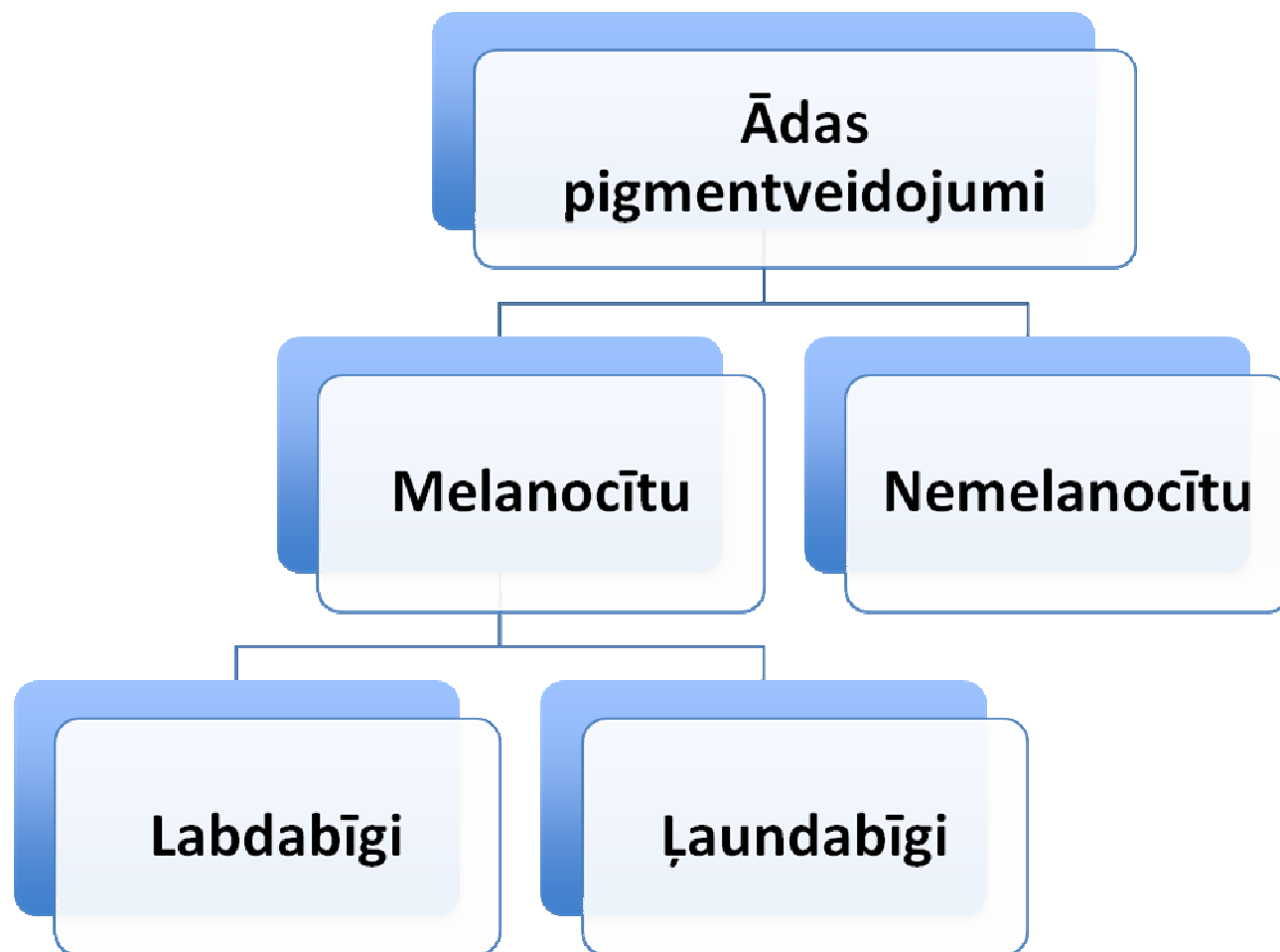
“Neglītā pīlēna” pazīme
(*Ugly duckling*)



10 biežākie ādas veidojumi, kuri var līdzināties melanomai

- Dermatofibroma
- Hemangioma
- Lentigo
- Seborejiskā keratoma
- Bazālo šūnu karcinoma
- Reed/Spitz nēvus
- Melanocītu nēvus
- Iedzimts nēvus
- Zilai nēvus

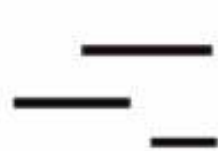
Ādas pigmentveidojumu diferenciāldiagnostika



Pazīme



Pamatelementi



Līnijas



punkti



pikas

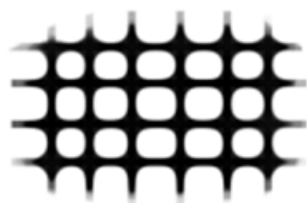


apļi



pseudopodas

A



B



C



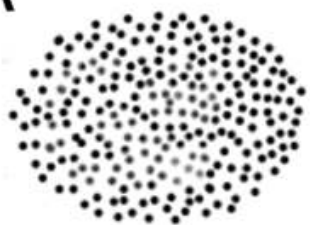
D



E



A



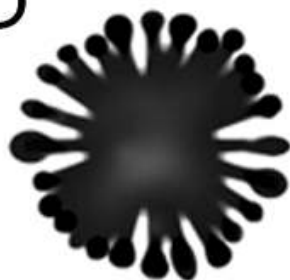
B



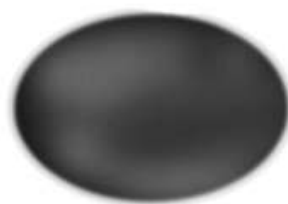
C



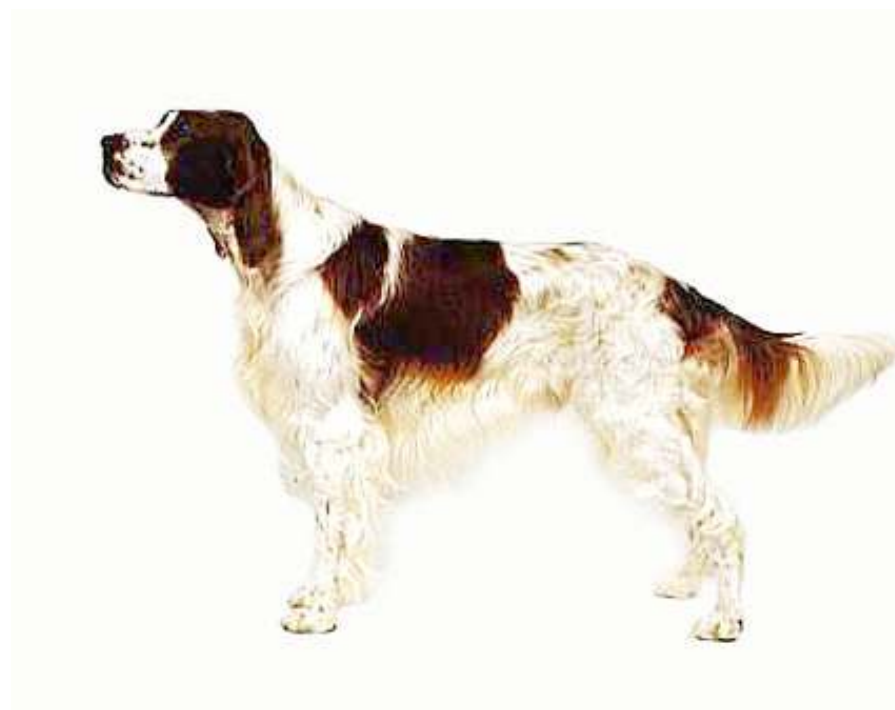
D

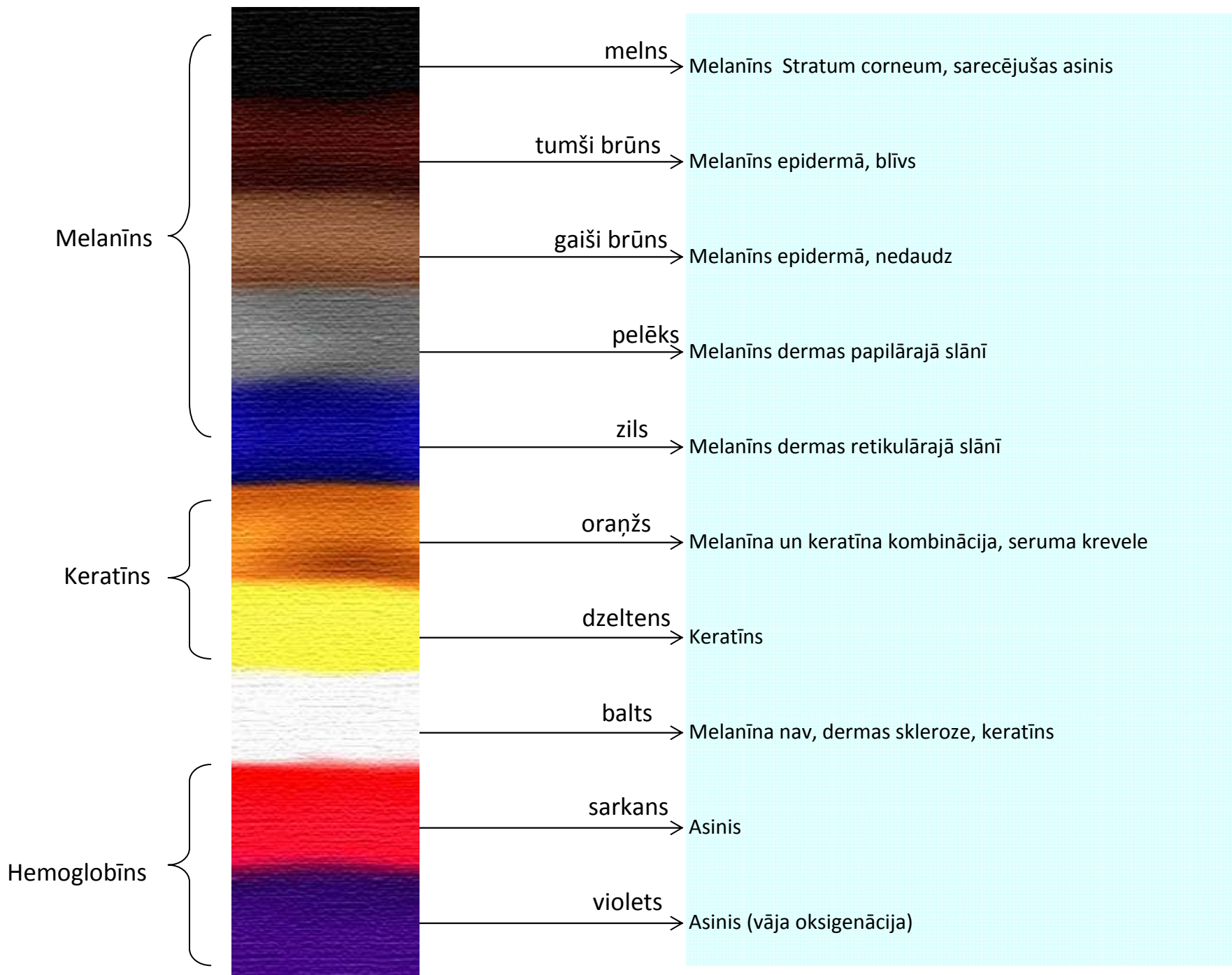


E



Krāsas





Pazīmju analīze

Pazīme + Krāsa = Diagnoze

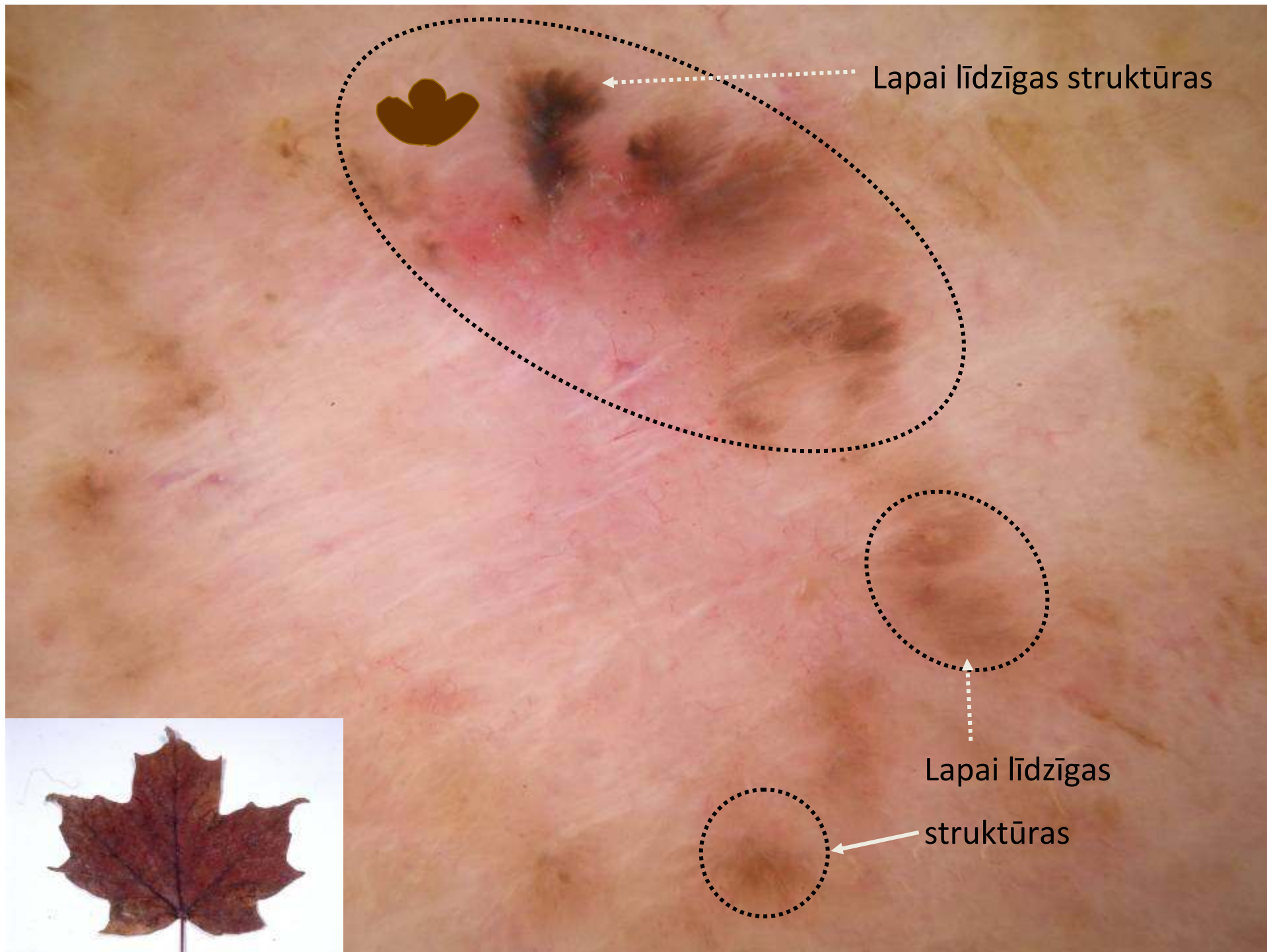
Bruġakmens pazime





Maple-Leaf-like Areas



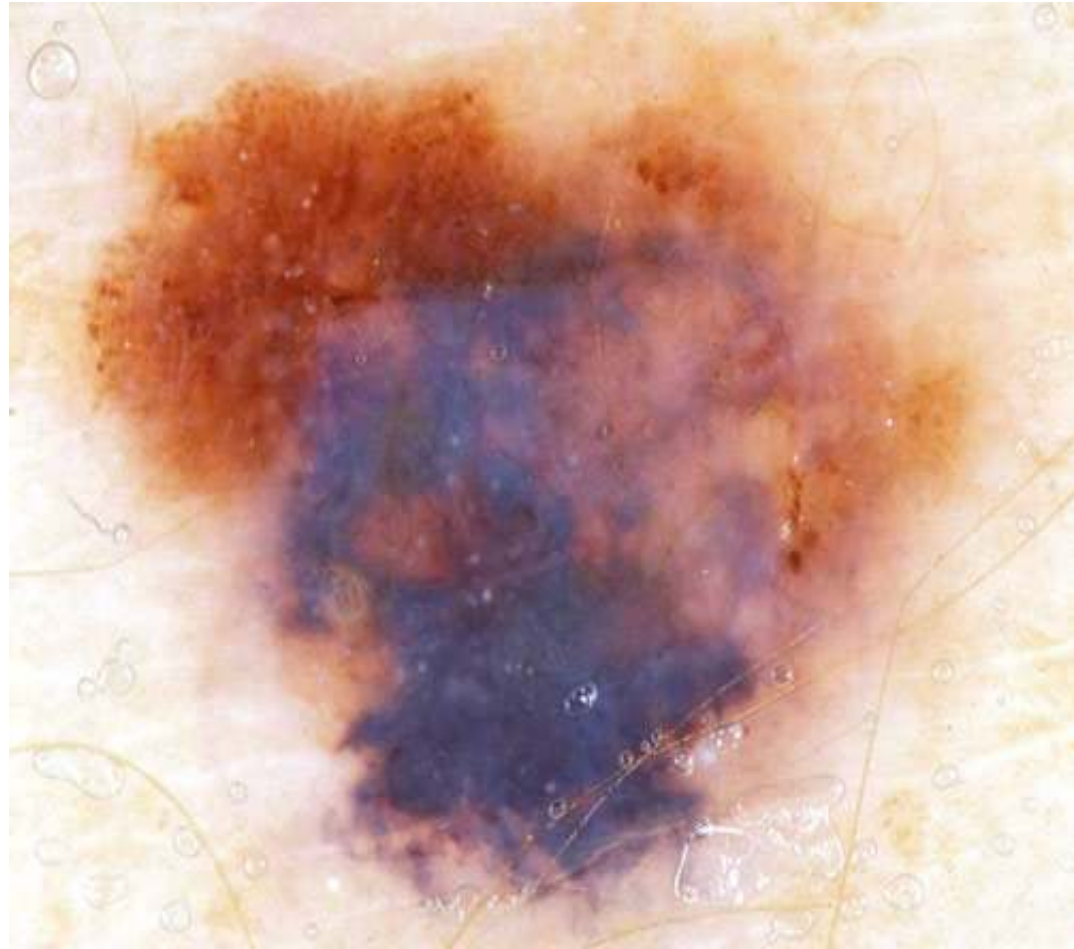


Lapai līdzīgas struktūras

Lapai līdzīgas
struktūras

Bālgans plivurs



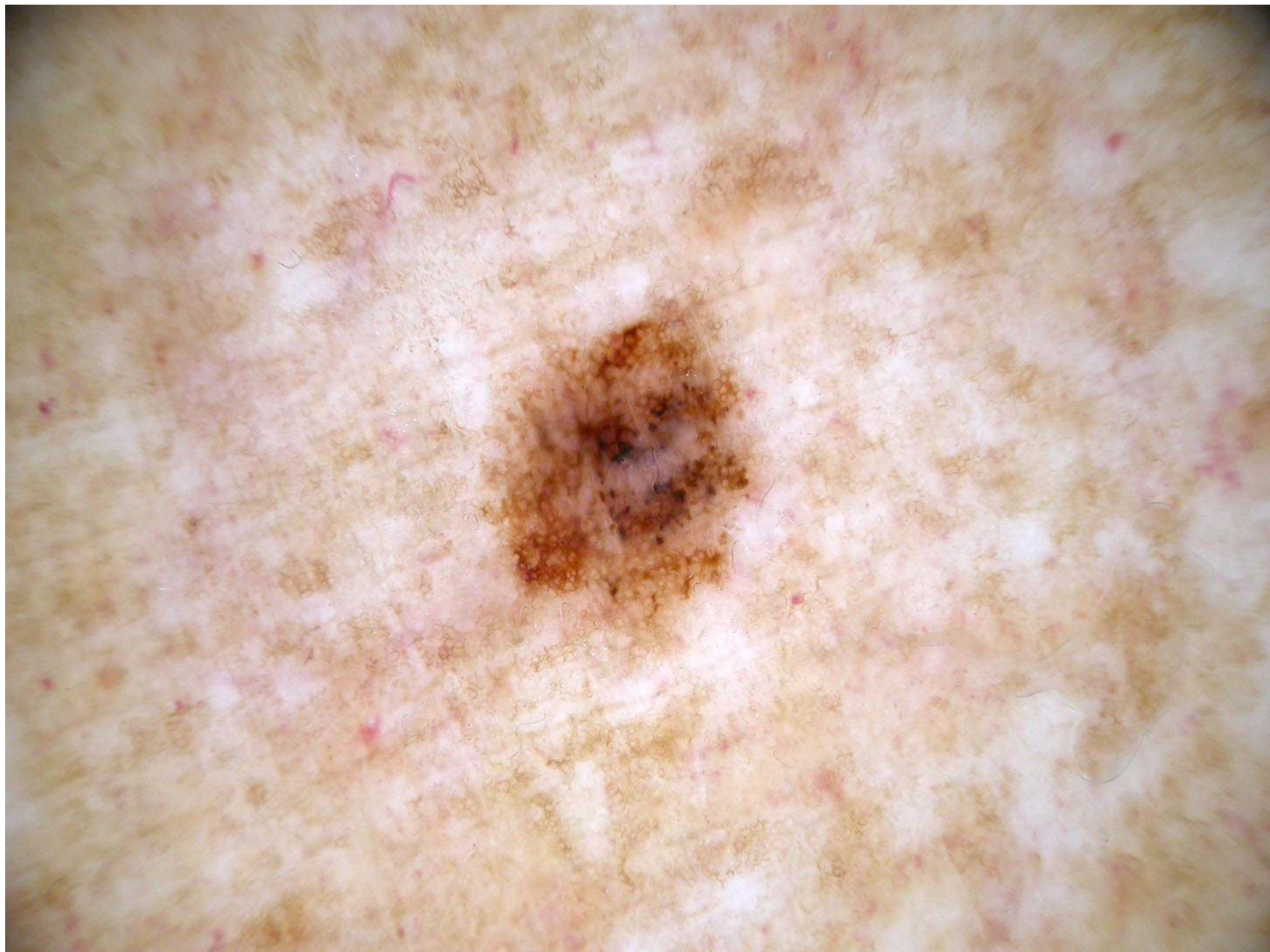


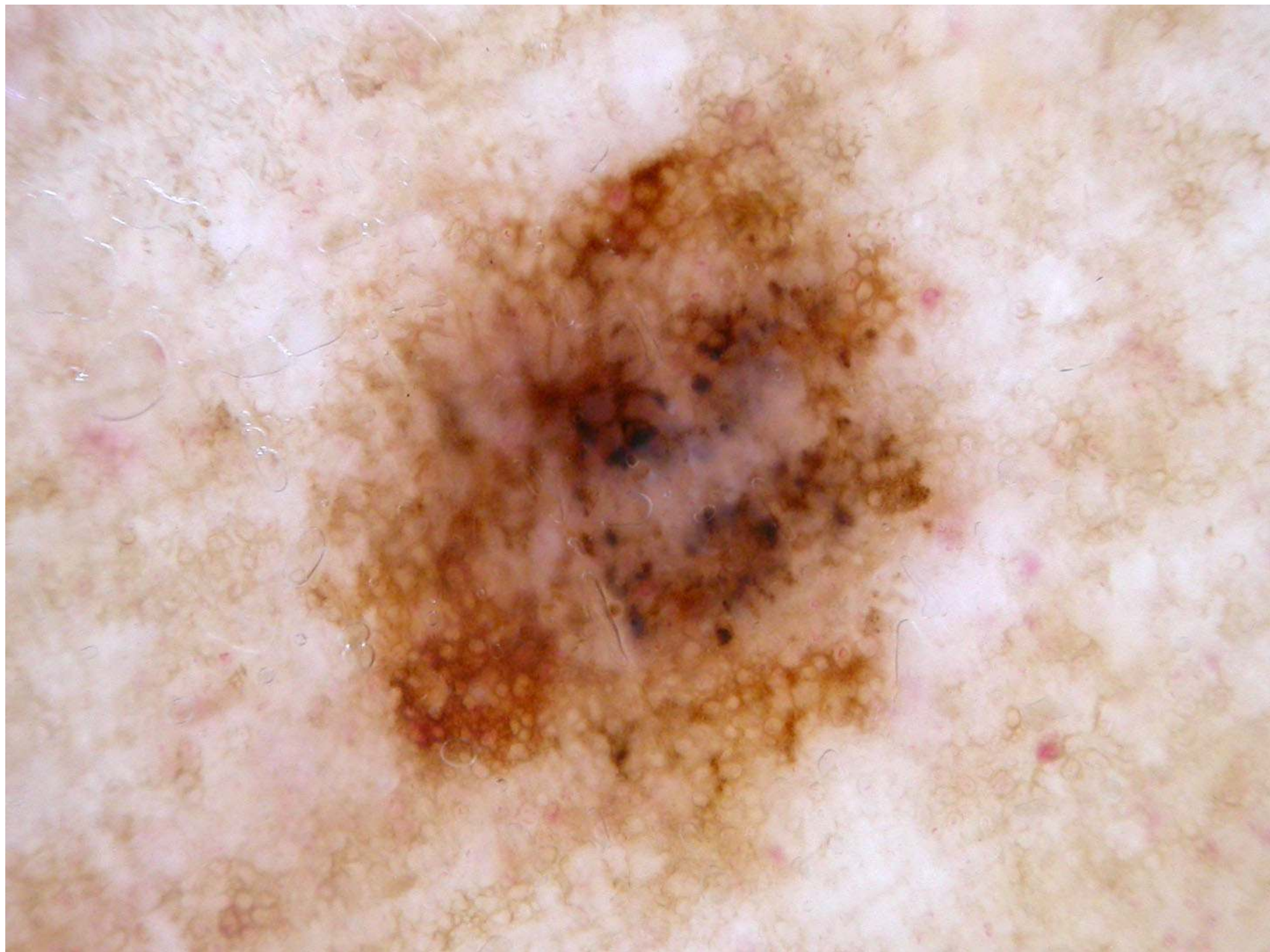


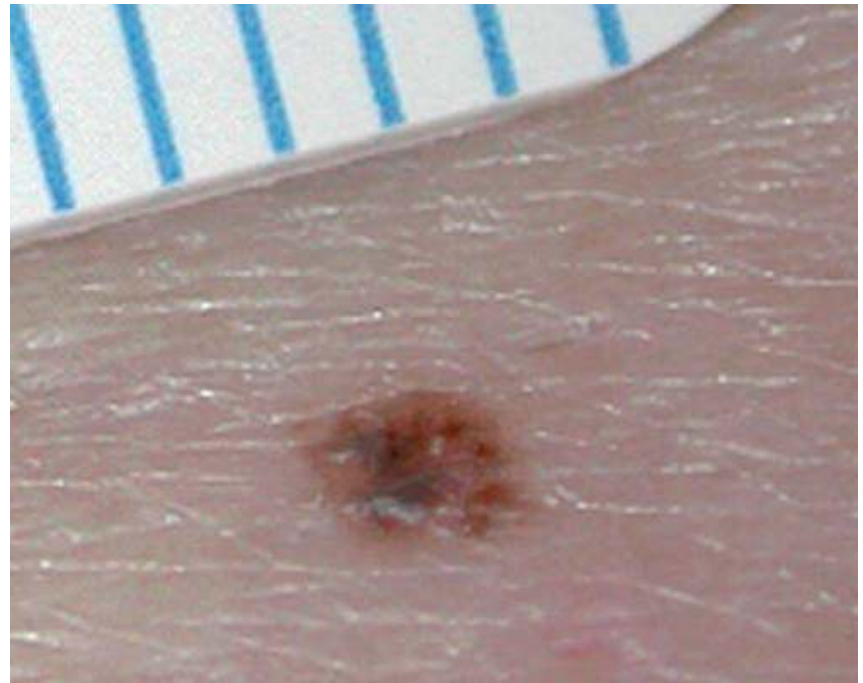






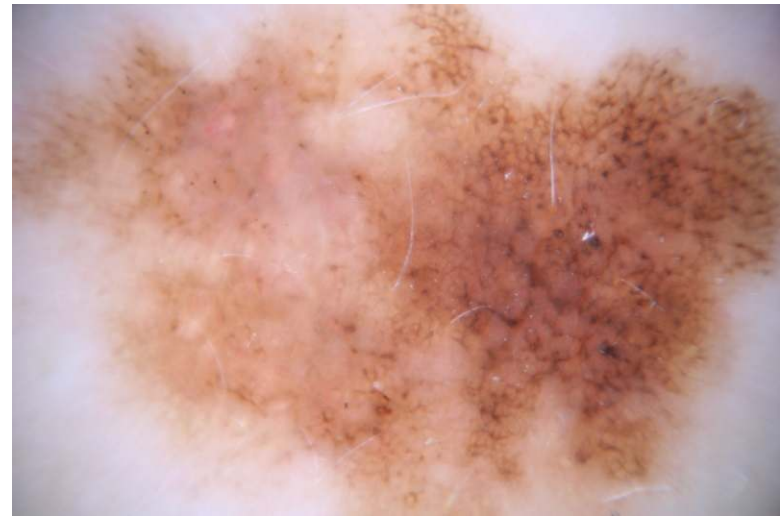








Melanoma



3 punktu algoritms
3 - point checklist

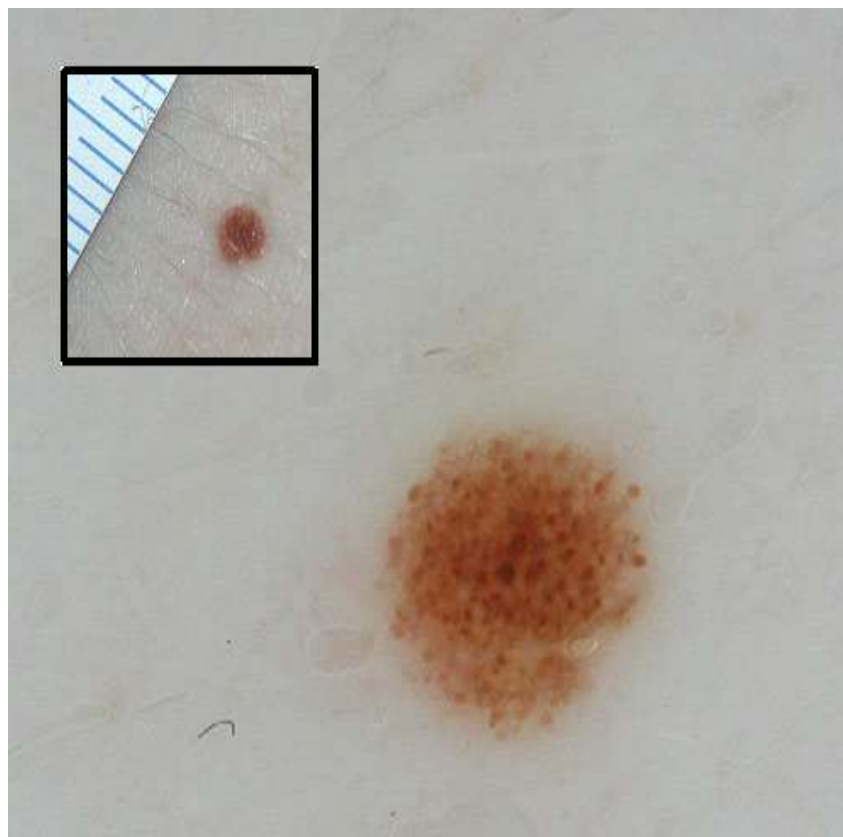
Kritēriji	Punktu skaits
• Asimetrija (pēc krāsas un struktūrām)	1
• Atipisks pigmenta tīklojums	1
• Zili-baltās struktūras	1
• Vērtējums:	
• 0 -1 labdabīgs veidojums	
• ≥ 2 aizdomīgs	

Metodes jūtība: 91,0%

Metodes specifiskums: 71,9%

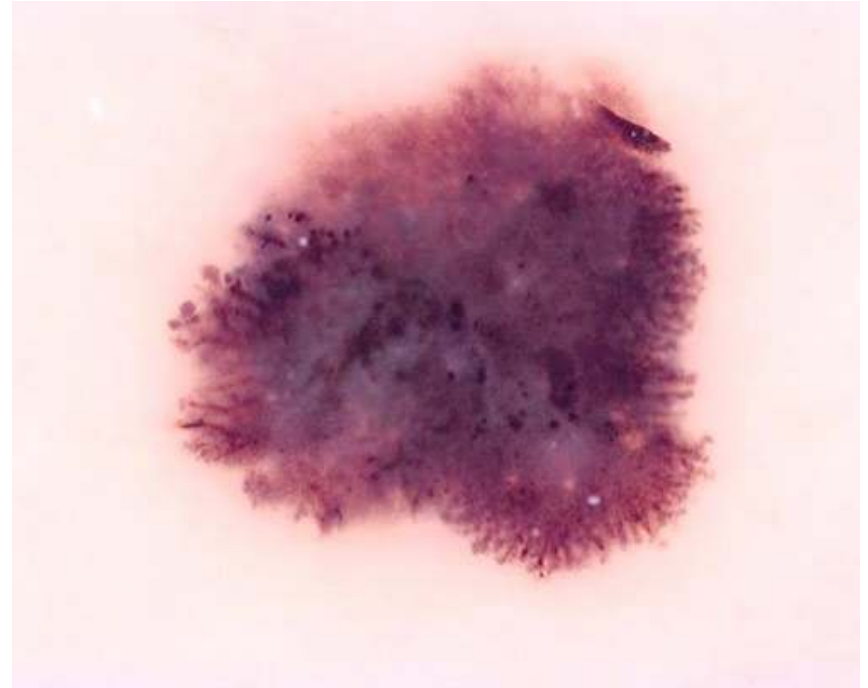
Asimetrija



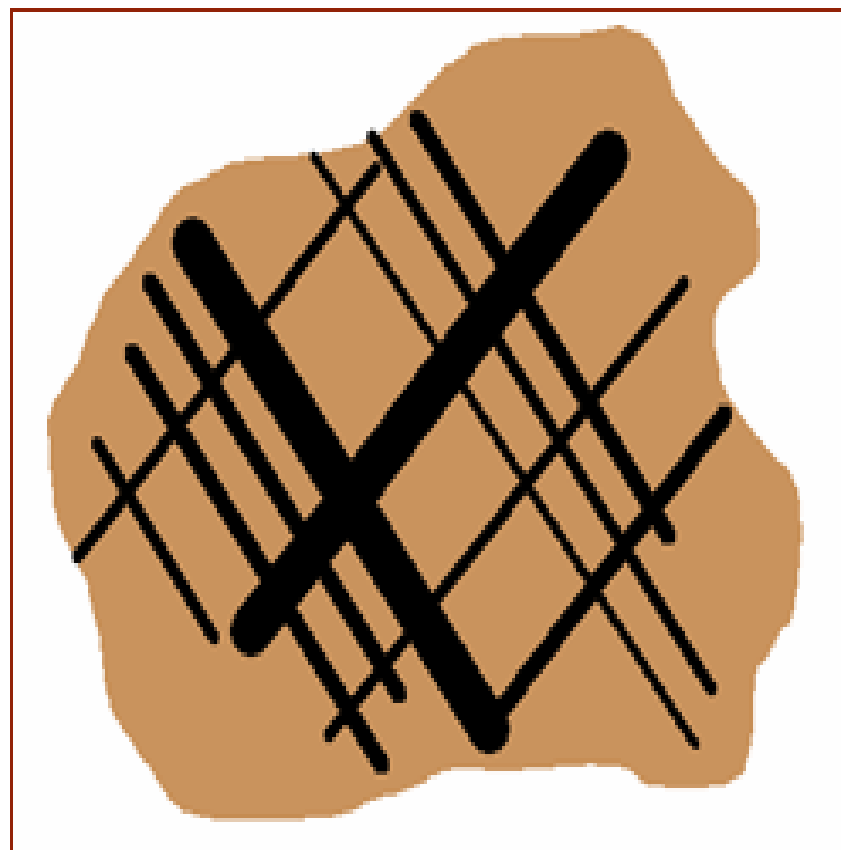
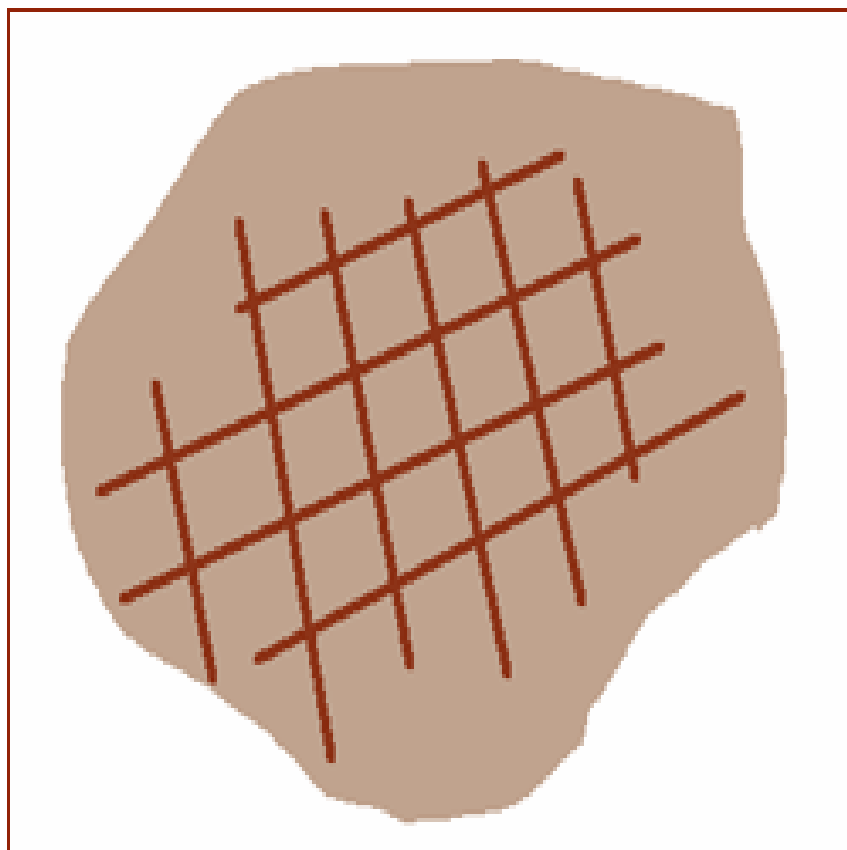


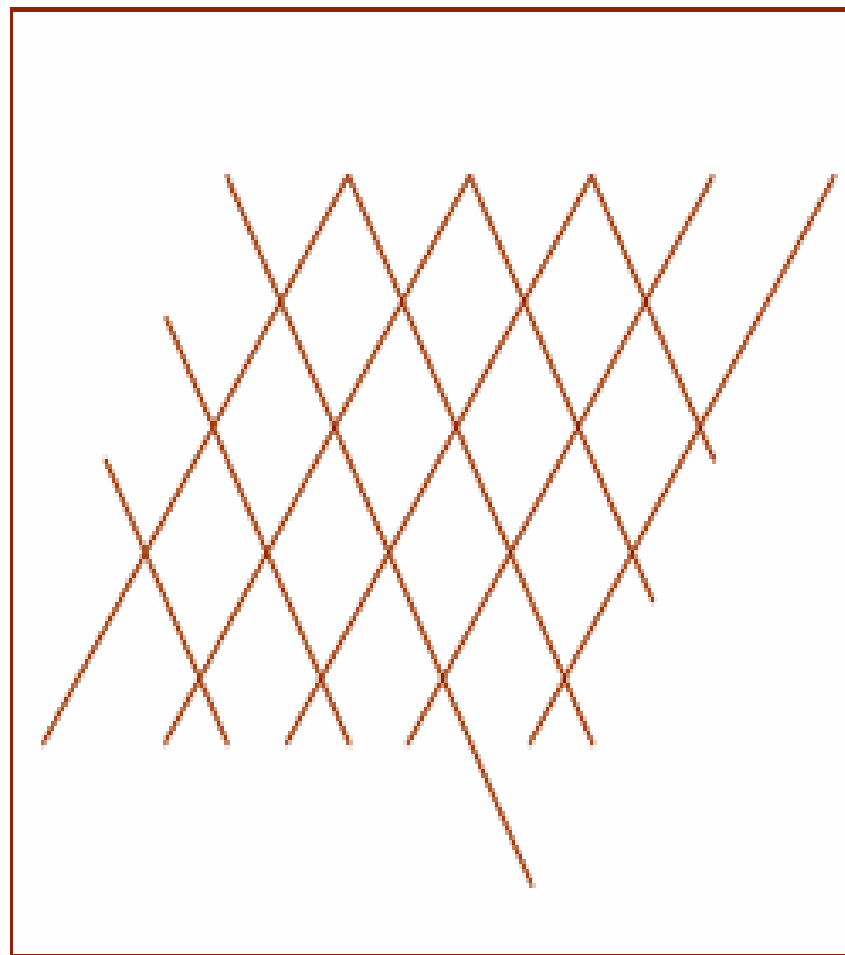
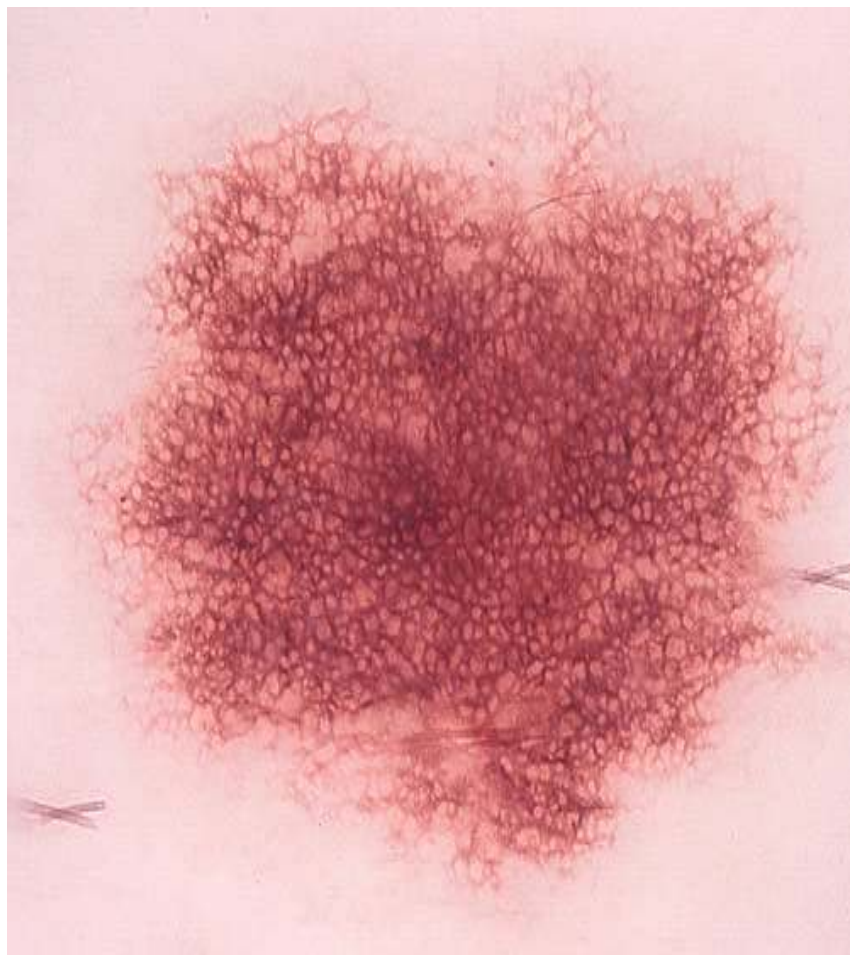


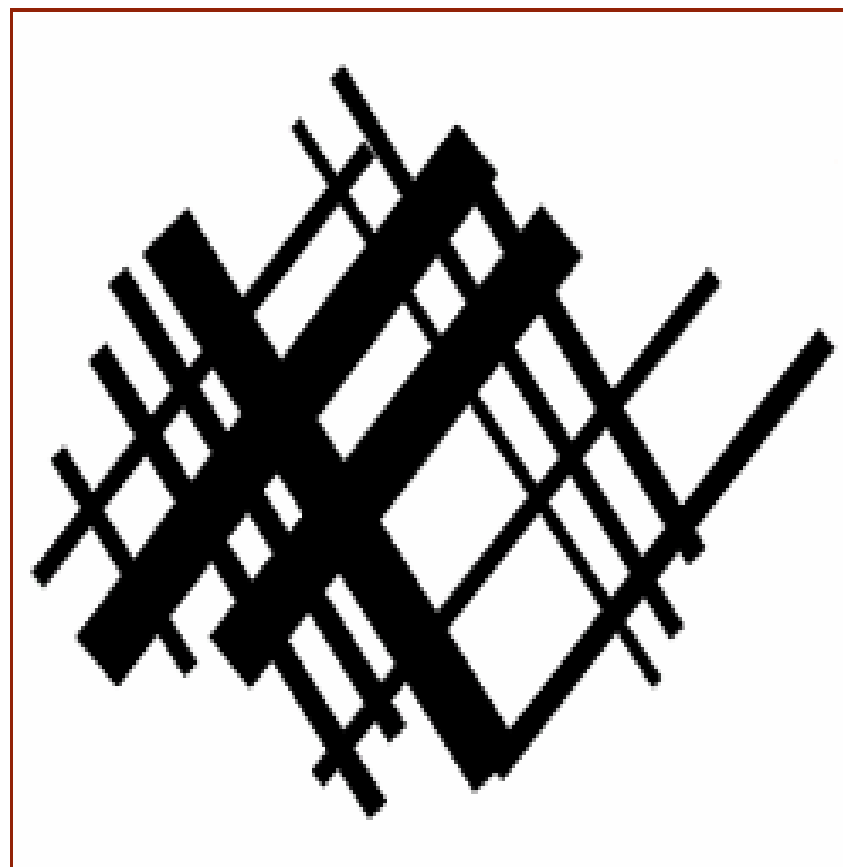
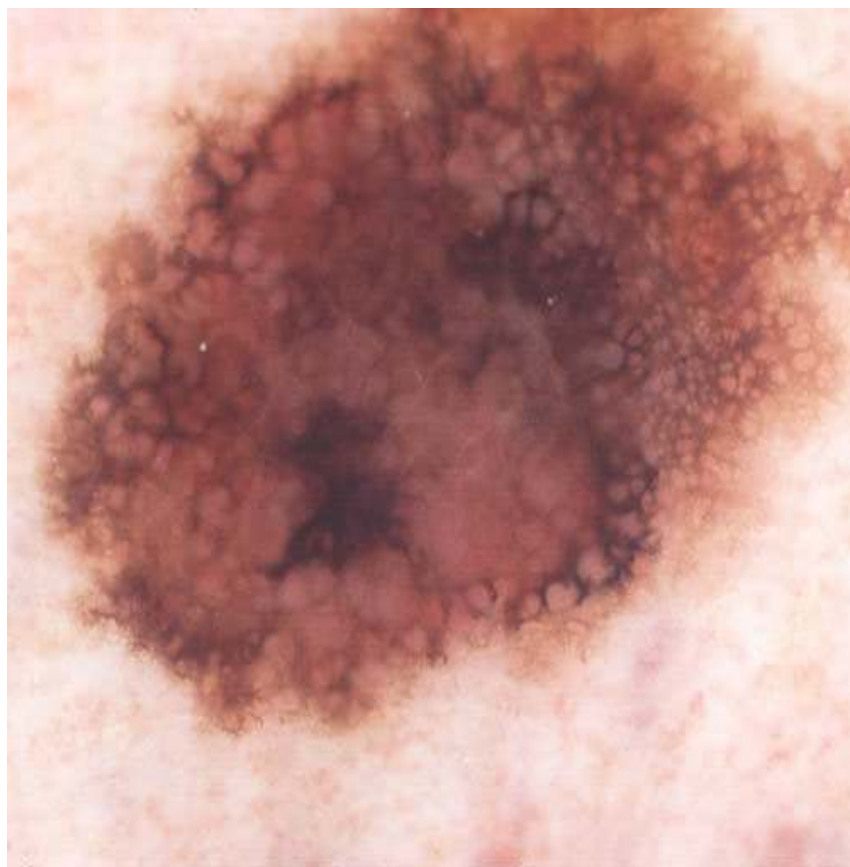




Atipisks pigmenta tīklojums



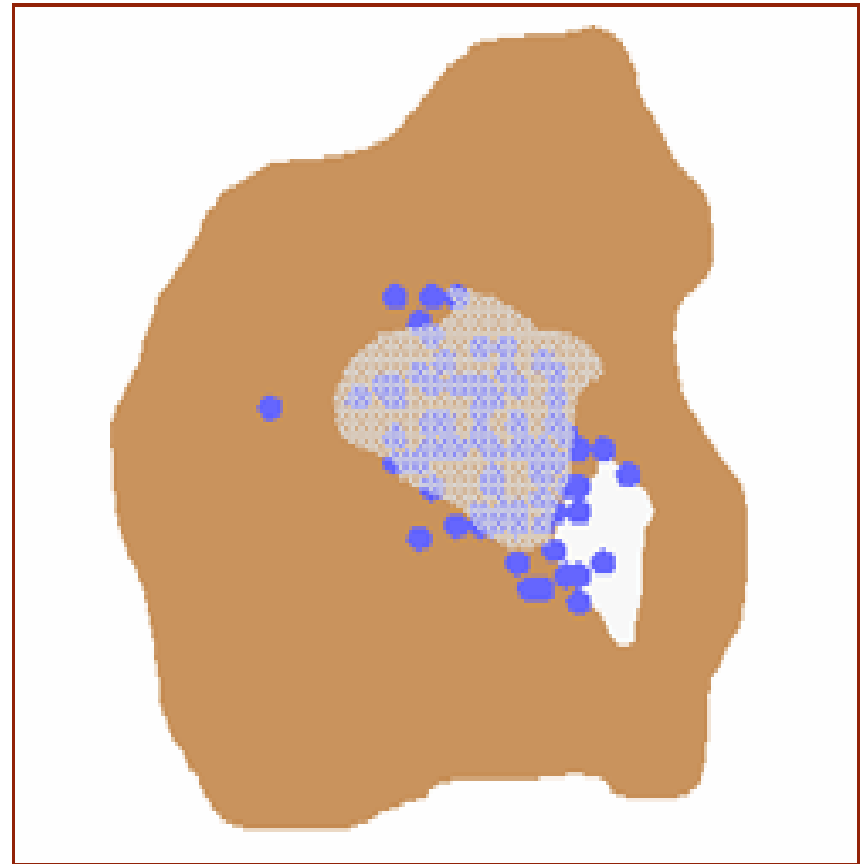


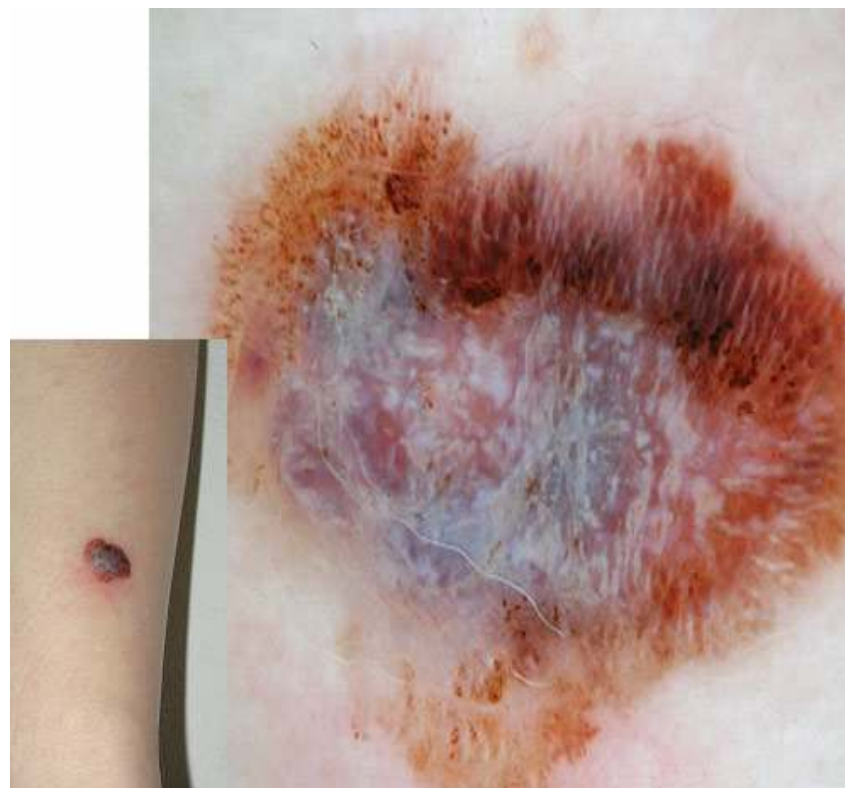




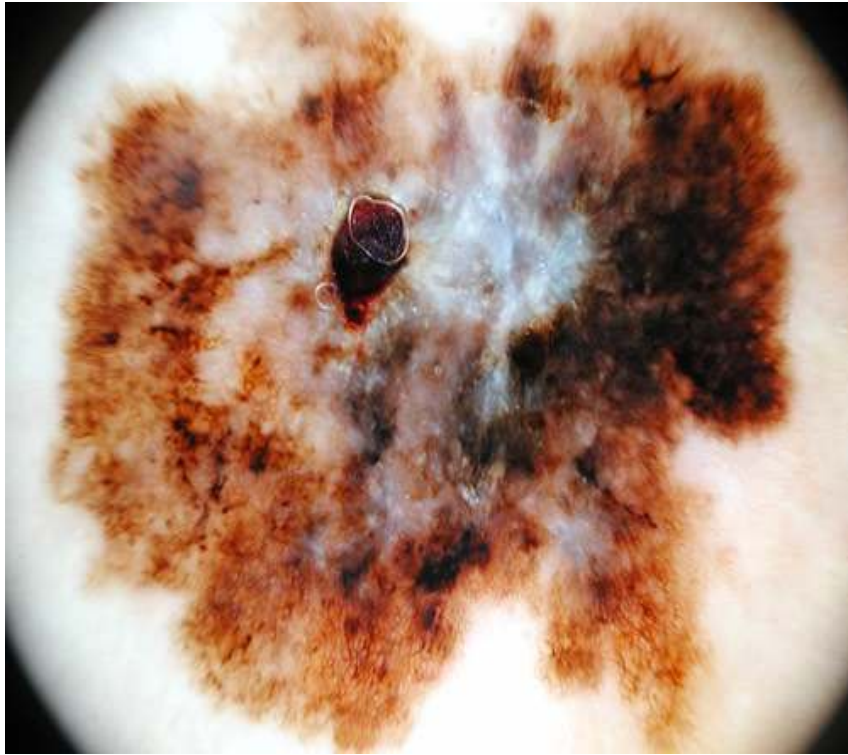


Zili-baltās struktūras







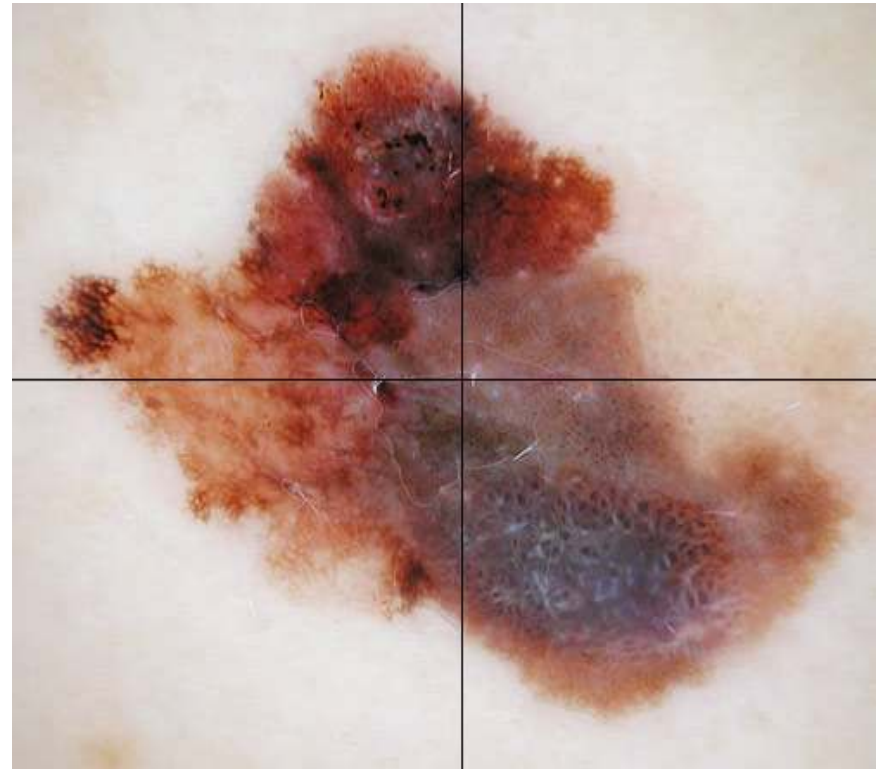


1.

Asimetrija	1
Atipisks pigmenta tīklojums	1
<u>Zili-baltās struktūras</u>	<u>1</u>
Vērtējums	3

Veidojums ir ļaundabīgs

**Šī ir invazīva melanoma
(audzēja biezums - 0,75 mm)**

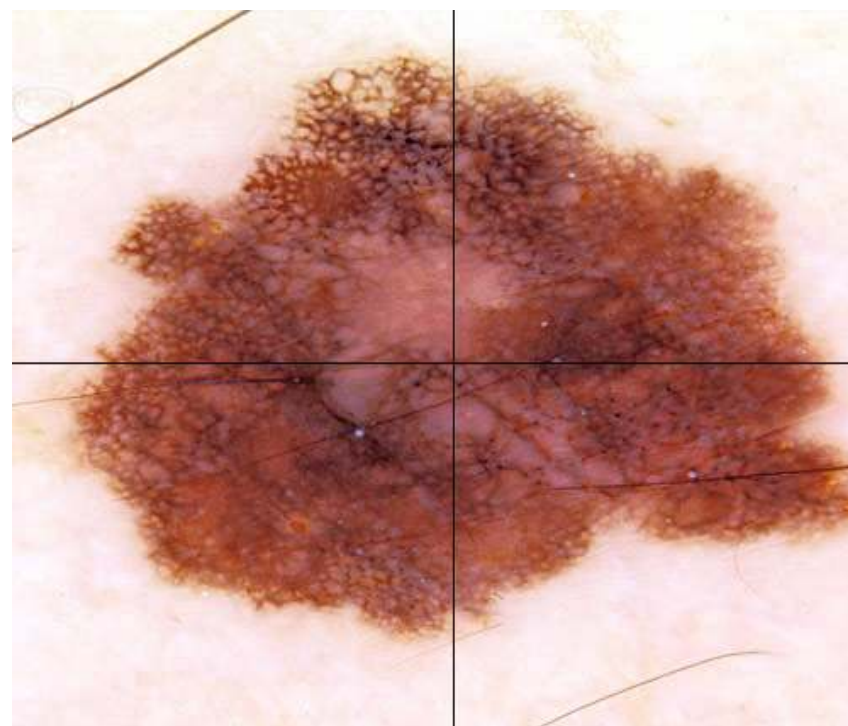


2.

Asimetrija	1
Atipisks pigmenta tīklojums	1
<u>Zili-baltās struktūras</u>	<u>0</u>
Vērtējums	2

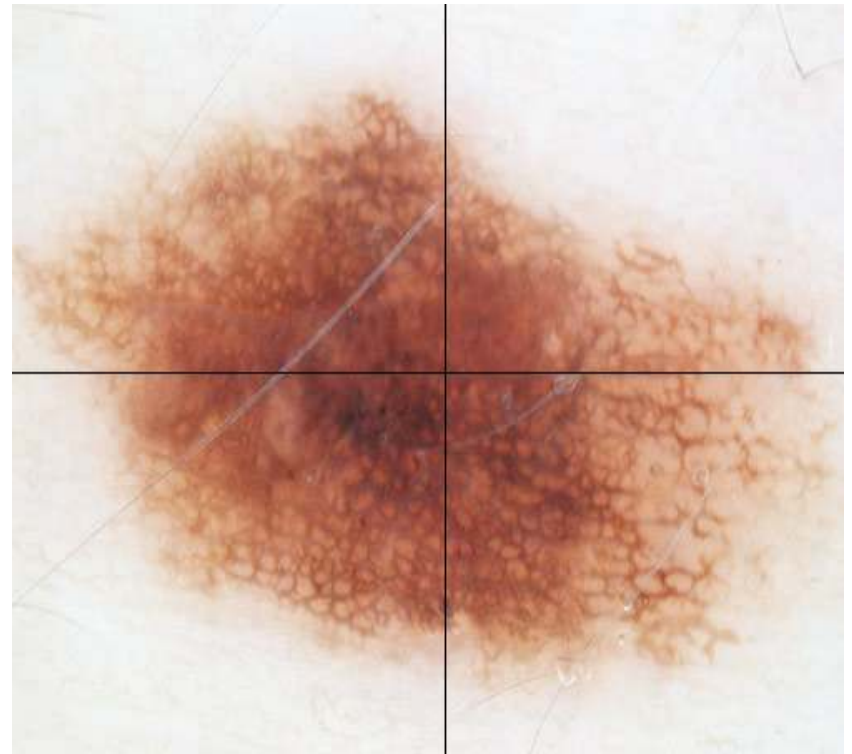
Veidojums ir ļaundabīgs

Dg: *Melanoma in situ*



3.

Asimetrija	1
Atipisks pigmenta tīklojums	1
<u>Zili-baltās struktūras</u>	<u>0</u>
Vērtējums	2



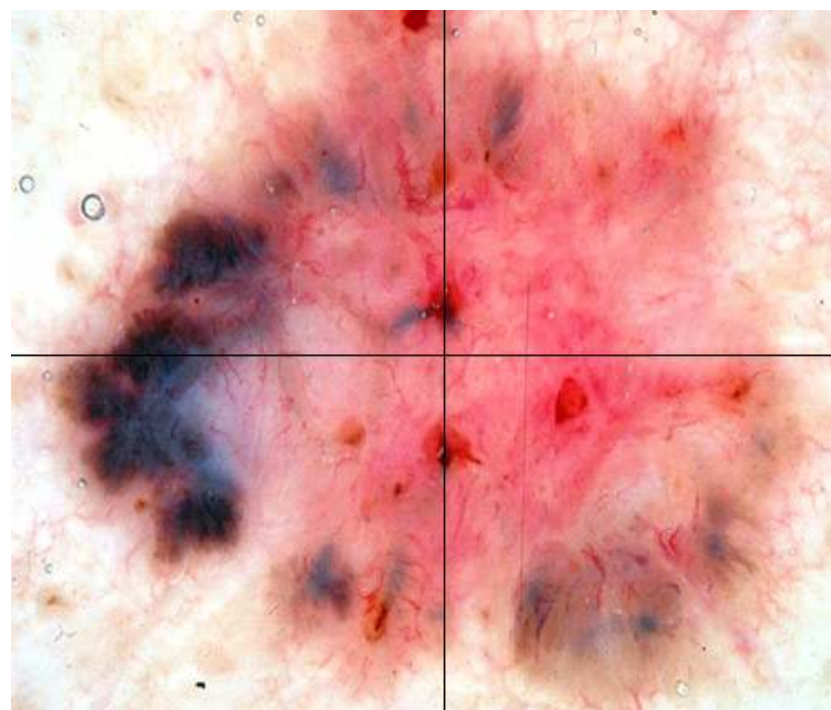
**Dg: iegūts melanocītu
*nevus***

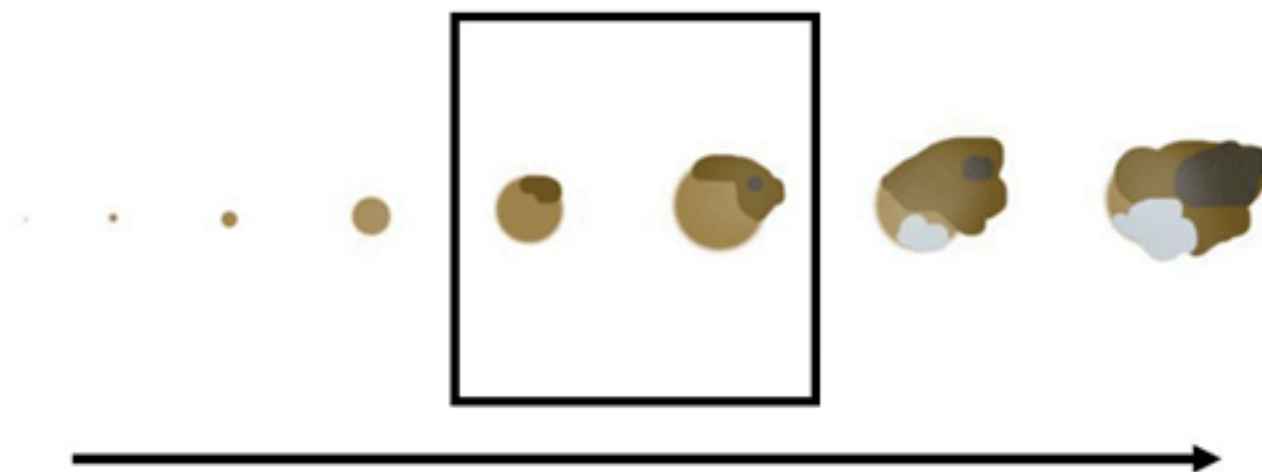
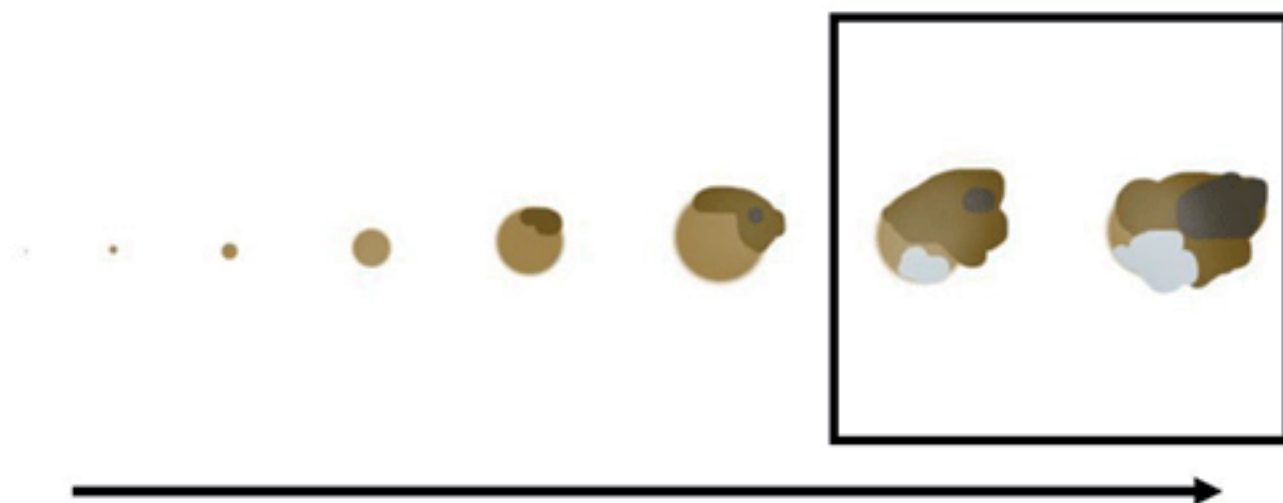
4.

Asimetrija	1
Atipisks pigmenta tīklojums	0
<u>Zili-baltās struktūras</u>	<u>1</u>
Vērtējums	2

Veidojums ir ļaundabīgs

Dg: Bazālo šūnu karcinoma





Paldies par uzmanību!



LU ASI IZSTRĀDĀTĀ APARATŪRA ĀDAS VEIDOJUMU REMISIJAS UN FLUORESCENCES ATTĒLU IEGŪŠANAI, LABORATORIJAS IZPĒTES REZULTĀTI

INGA SAKNĪTE

MSC. PHYS.

RĪGA, 5.12.2014.

SATURS

- IEVADS
- JAUNAS MAKETIERĪCES IZVEIDE
 - GAISMAS AVOTA IZVĒLE
 - MĒRĪJUMU REŽĪMI
- LABORATORIJAS MĒRĪJUMI
 - PĒTĀMIE ĀDAS VEIDOJUMI – ATIPISKAS DZIMUMZĪMES
 - MĒRĪJUMU GAITĀ
 - DATU PIRMAPSTRĀDE
- REZULTĀTI UN SECINĀJUMI

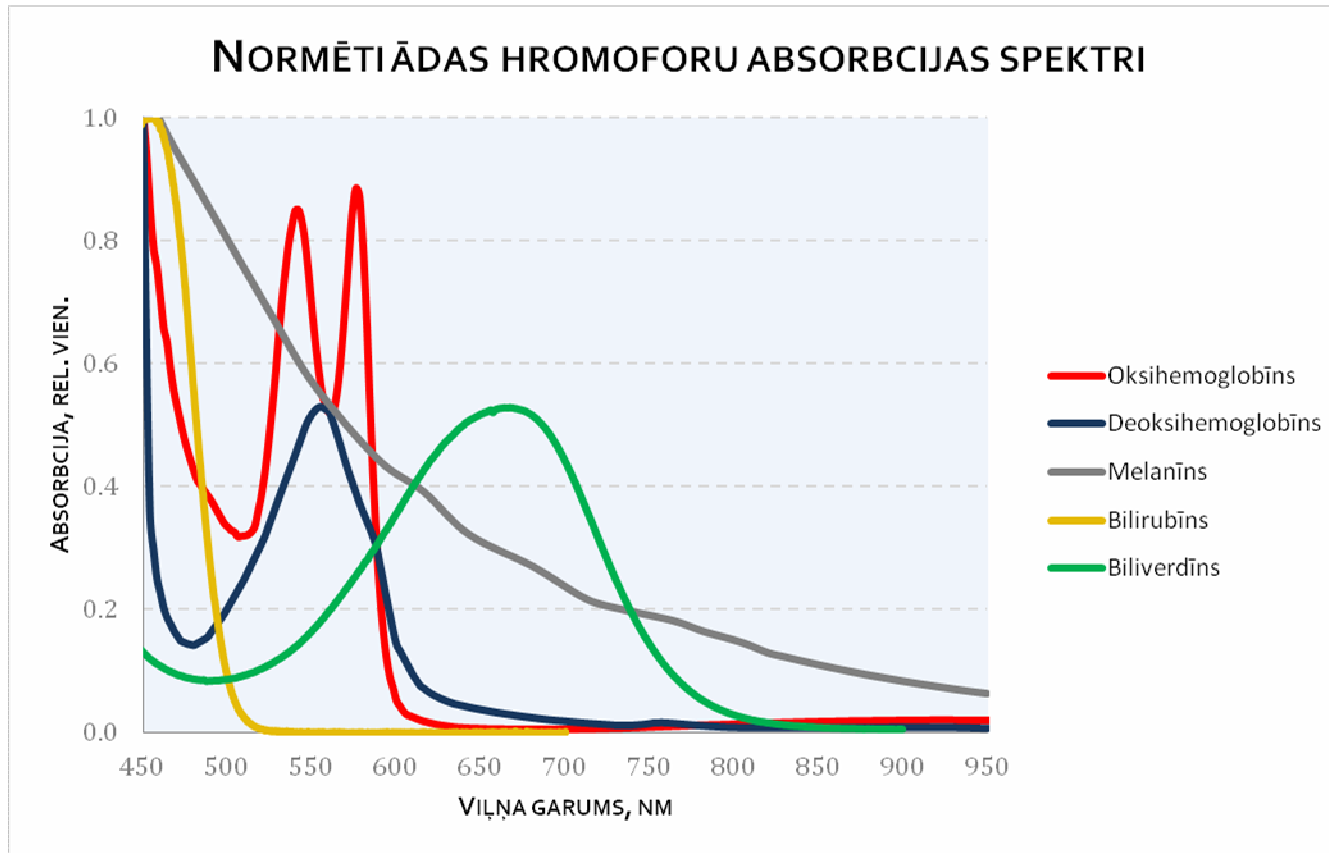
IEVADS

- UZDEVUMS:
 - IZVEIDOT JAUNU MAKETIERĪCI
MULTIMODĀLAI ĀDAS DIAGNOSTIKAI
- IEPRIEKŠĒJA PIEREDZE:
 - SKIMAGER U.C.
- JAUNAS IDEJAS:
 - REMISIJAS, FLUORESCENCES
SPEKTRĀLĀ ATTĒLOŠANA UN
LĀZERSPEKLU ATTĒLOŠANA
- MĒRĪJUMU OBJEKTS:
 - ATIPISKAS DZIMUMZĪMES

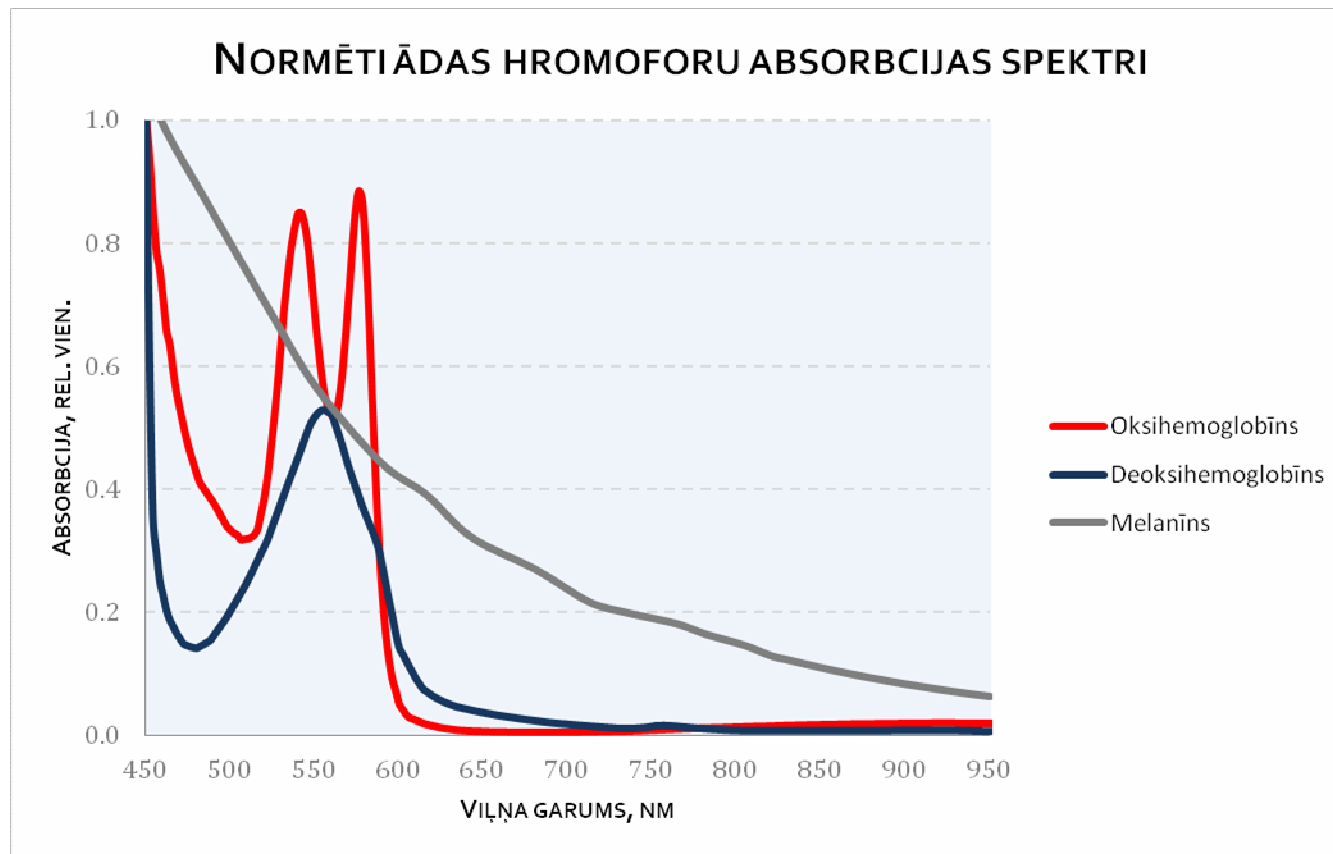


RĪGA, 5.12.2014.

IEVADS



IEVADS



RĪGA, 5.12.2014.

JAUNAS MAKETIERĪCES IZVEIDE



CRI NUANCE
MULTISPEKTRĀLĀS
ATTĒLOŠANAS KAMERA
(450-950 NM)
KAMERAS
GABARITIS
GAISMA AVOTS
DIFUZORS

10 cm



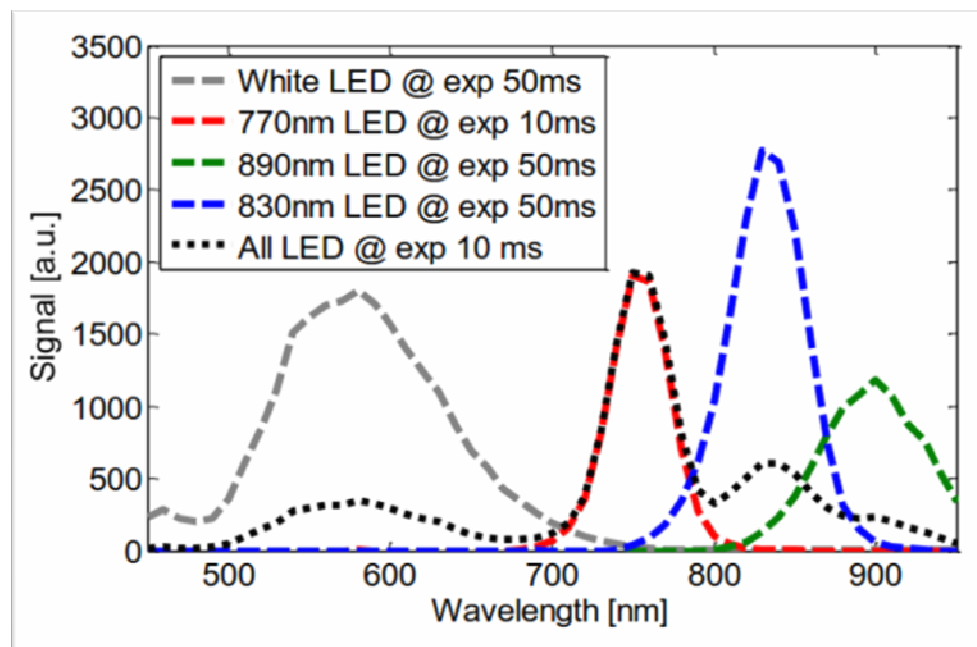
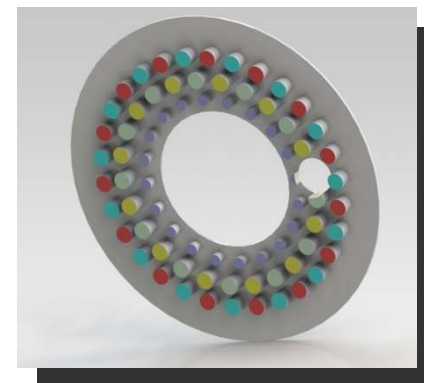
ĀDA



DATORS AR
NUANCE
PROGRAMMATŪRU

GAISMAS AVOTA IZSTRĀDE

- IEKŠĒJAIS APLIS
 - 19 X **405 NM** DIODES
FLUORESCENCES MĒRĪJUMIEM
- VIDĒJAIS APLIS
 - 12 X **770 NM** DIODES
 - 12 X **839 NM** DIODES
- ĀRĒJAIS APLIS:
 - 15 X **BALTĀS GAISMAS**
DIODES
 - 15 X **890 NM** DIODES
- LĀZERMODULIS **650 NM**
SPEKLU MĒRĪJUMIEM



MĒRĪJUMU REŽĪMI

- REMSIJA (DIFŪZĀ ATSTAROŠANĀS)
 - VIĻŅA GARUMU DIAPAZONS: 450-950 NM AR SOLI 10 NM;
 - EKSPŌZĪCIJAS LAIKS: PIELĀGOTS
 - 1 ATTĒLU MASĪVA UZŅEMŠANAS LAIKS: 30-40 SEKUNDES
 - GAIŠMAS AVOTS: VISAS DIODES (IZŅEMOT 405 NM)
- FLUORESCENCE
 - VIĻŅA GARUMU DIAPAZONS: 450-950 NM AR SOLI 10 NM
 - EKSPŌZĪCIJAS LAIKS: 200 MS
 - 4X4 PIKSEĻU APVIENOŠANA VIENĀ
 - 1 ATTĒLU MASĪVA UZŅEMŠANAS LAIKS: 20-30 SEKUNDES
 - GAIŠMAS AVOTS: 405 NM DIODES
- LĀZERSPEKĻU ATTĒĻOŠANA
 - EKSPŌZĪCIJAS LAIKS: 5 MS
 - 2 ATTĒLU (650 UN 660 NM) UZŅEMŠANA
 - GAIŠMAS AVOTS: 650 NM LĀZERDIODE

LABORATORIJAS MĒRĪJUMI

- UZSAUKUMS: WWW.LU.LV
- 5 MĒNEŠI
17. FEBRUĀRIS – 16. JŪNIJS
(2014)

	Dzimumzīme ir asimetriska – novelciet iedomātu līniju pa vidu dzimumzīmei un pāvērojiet, vai tā izvietojas simetriski abās pusēs līnijai
	Dzimumzīmes robežlīnija ir nelīdzena
	Dzimumzīmes pigmentācija (krāsa) nav vienmērīga
	Dzimumzīmes izmērs ir virs 5 mm
	Dzimumzīme laika gaitā mainās – kļūst lielāka, maina krāsu, rada nepatīkamas sajūtas utt.

LU zinātnieki aicina piedalīties pētījumā par pigmentētiem ādas veidojumiem jeb dzimumzīmēm

Inga Saknīte, Atomfizikas un spektroskopijas institūts
02.06.2014

Drukāt
Sašaurināt tekstu
Sadalīt tekstu
kolonnās

Katru gadu palielinās pacientu skaits, kuriem tiek diagnosticēta melanoma jeb ļaundabīgais ādas audzējs. Efektīvākais veids, kā sevi pasargāt no smagās saslimšanas ir regulāra un savlaicīga dzimumzīmju pārbaude. Latvijas Universitātes Atomfizikas un spektroskopijas institūta (LU ASI) zinātnieki veic pētījumu par pigmentētiem ādas veidojumiem un piedāvā iespēju brīvprātīgiem saņemt bezmaksas ārsta konsultāciju un veikt diagnostiku.

LU ASI aicina pieteikties brīvprātīgos pētījumam par pigmentētiem ādas veidojumiem. Pētījuma laikā ir iespēja saņemt bezmaksas konsultāciju pie ārsta dermatologa. Konsultācijas laikā speciālists veiks dzimumzīmju diagnostiku, izmantojot dermatoskopu un LU ASI izstrādātu aparātu. Izmeklējums būs absolūti nesāpīgs, neinvazīvs un organismam negatīvas sekas neradošs. Viss process aizņem laiku līdz 20 minūtēm. Piedalīšanās pētījumā ir brīvprātīga un bezmaksas.

Lai piedalītos pētījumā, Jums jāatbilst šādiem kritērijiem

1. Vecums no 30 gadiem;
2. Nav grūtniecības vai barošanas ar krūti;
3. Uz ķermeņa sastopamas dzimumzīmes. Īpaši gaidīsim Jūs gadījumos, ja dzimumzīme atbilst kādai no attēlā redzamajiem gadījumiem.

Pētījums tiek realizēts Latvijas Universitātes Atomfizikas un spektroskopijas institūtā, Rīgā, Šķūņu ielā 4, 2. stāvā.

Iepriekšēja pieteikšanās, zvanot pa tel. nr. +371 26342896 (darba dienās no plkst. 9.00-16.00) vai rakstot e-pastu uz petijums.inbit@gmail.com

Tuvākais plānotais pieņemšanas laiks: 5. jūnijs no plkst. 10.00 - 13.00

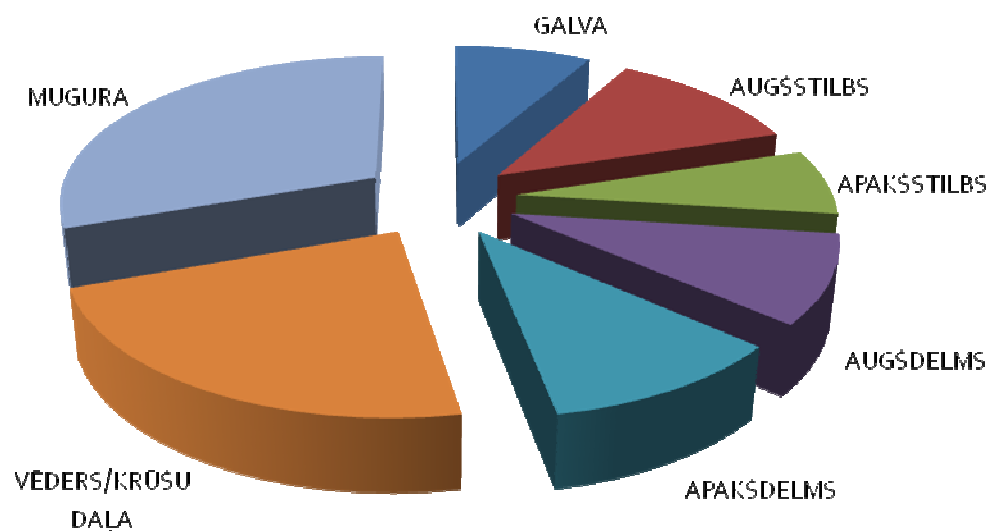


IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

RĪGA, 5.12.2014.

LABORATORIJAS MĒRĪJUMI

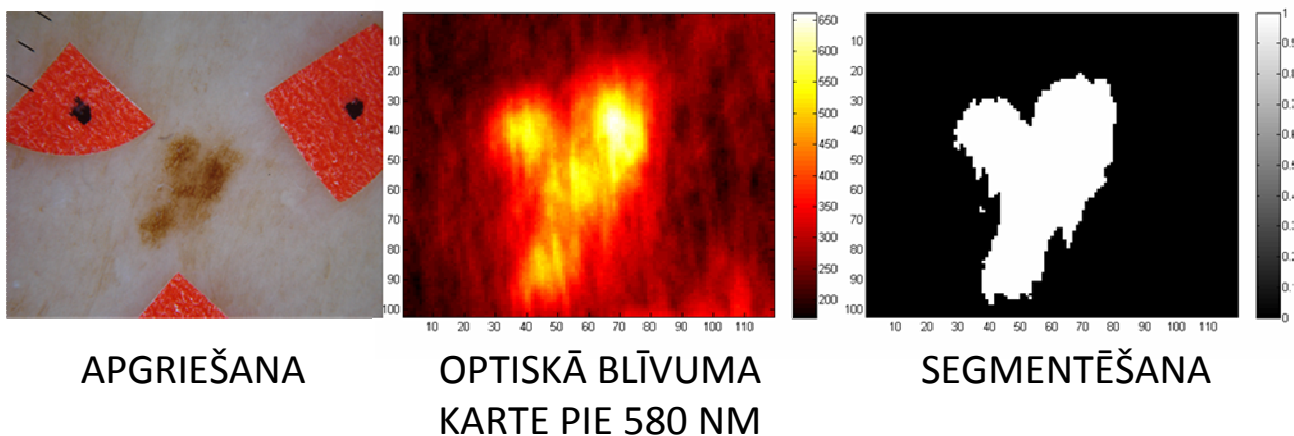
- 75 MĒRĪJUMU DALĪBNIEKI
- 85 VEIDOJUMI
 - 36 TIPISKAS DZIMUMZĪMES
 - 42 ATIPISKAS DZIMUMZĪMES
 - 5 CITA VEIDA



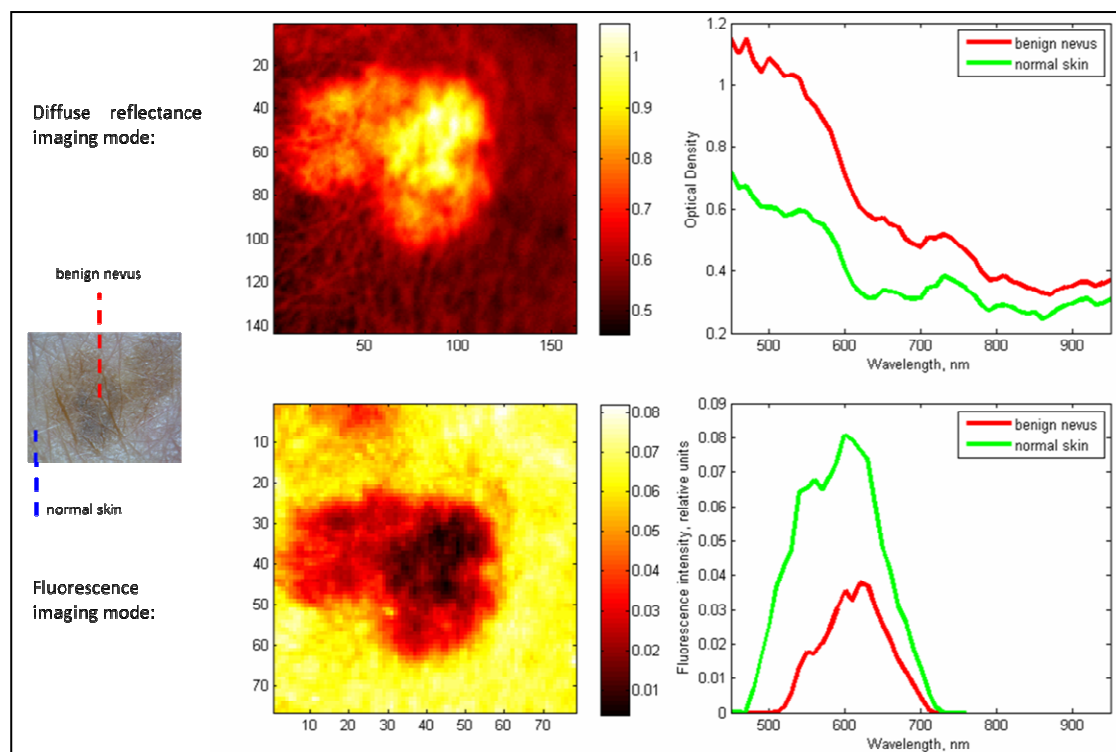
RĪGA, 5.12.2014.

DATU PIRMAPSTRĀDE

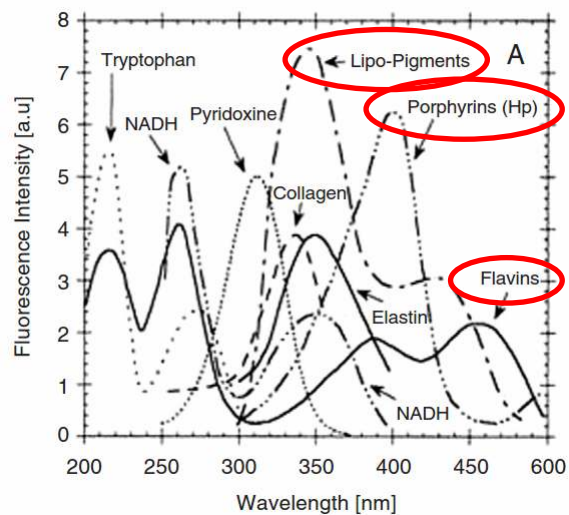
- ATTĒLU MASĪVS (GAN REMISIJAS, GAN FLUORESCENCES)
- ATTĒLA APGRIEŠANA (*CROP*)
- ATTĒLA REĢISTRĒŠANA AR *IMAGEJ*
- VEIDOJUMA (UN NORMĀLAS ĀDAS) SEGMENTĒŠANA
- VIDĒJĀ SPEKTRA APRĒĶINS VEIDOJUMAM UN NORMĀLAI ĀDAI



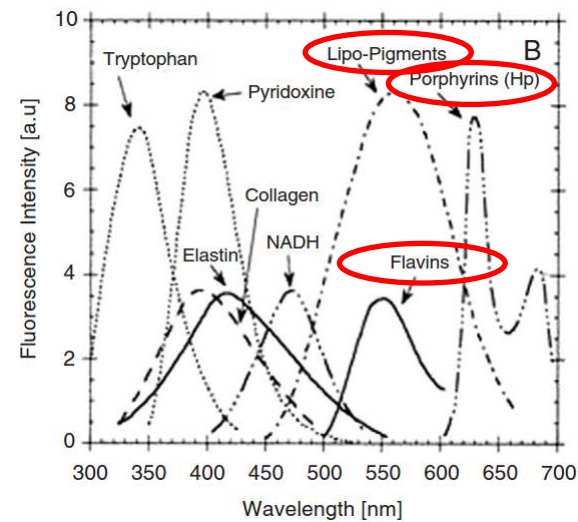
REZULTĀTI – TIPIŠKA DZIMUMZĪME



FLUOROFORU ABSORBCIJAS UN EMISIJAS SPEKTRI

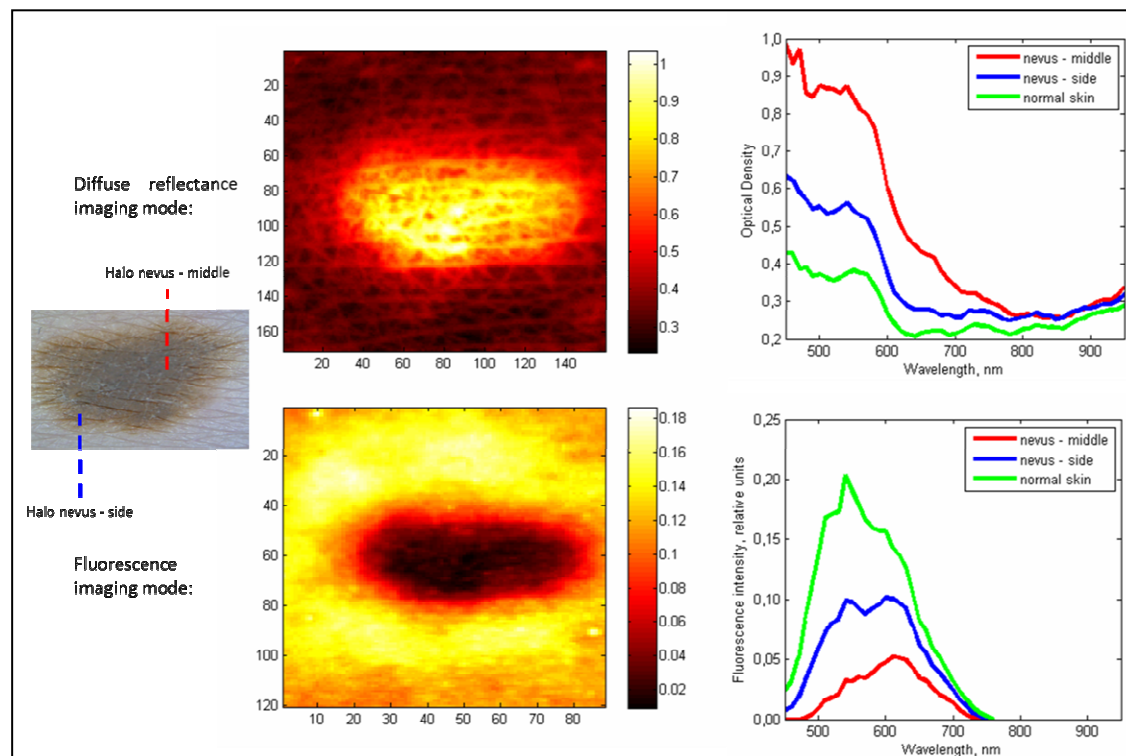


ABSORBCIJA

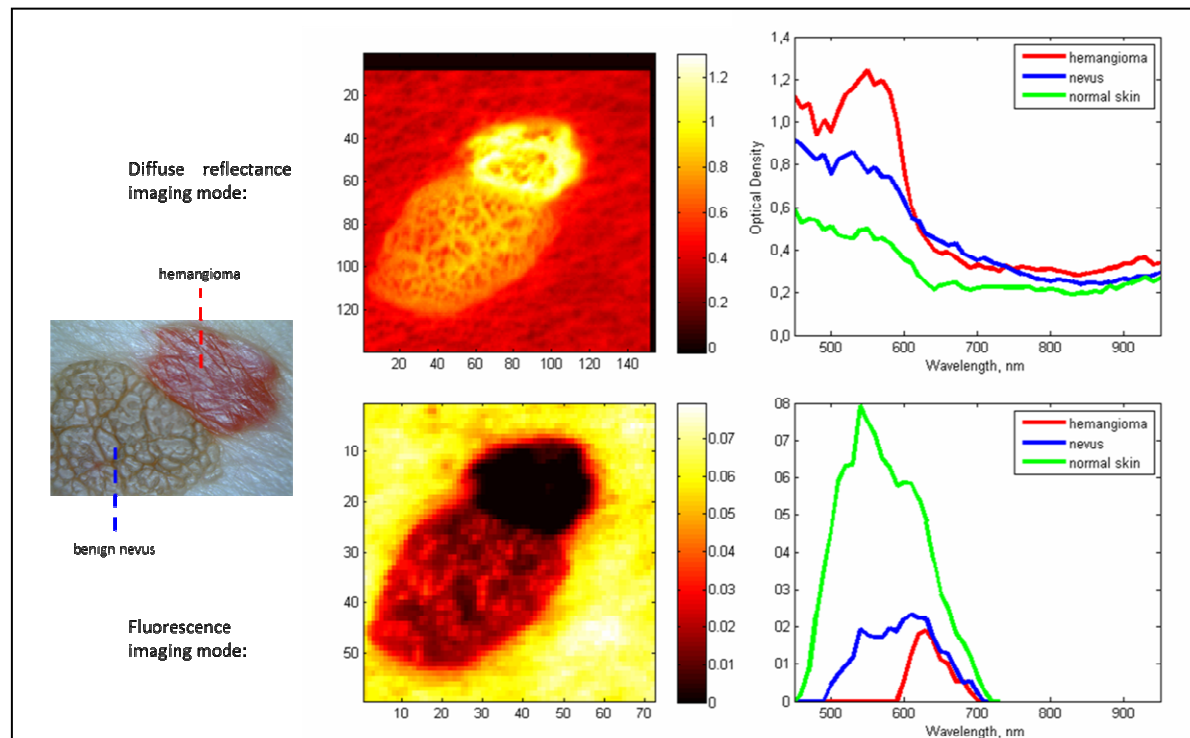


EMISIJA

REZULTĀTI – HALO NĒVUSS



REZULTĀTI – HEMANGIOMA UN DZIMUMZĪME



NOBEIGUMĀ

- TIKA IZVEIDOTA JAUNA MAKETIERĪCE ĀDAS VEIDOJUMU PĒTĪŠANAI
- VEIKTI LABORATORIJAS MĒRĪJUMI, KUROS UZŅEMTI 36 TIPISKU UN 42 ATIPISKU VEIDOJUMU REMISIJAS UN FLUORESCENCES ATTĒLU MASĪVI
- APLŪKOTI DAŽI INTERESANTĀKIE VEIDOJUMI
- TIPISKU UN ATIPISKU VEIDOJUMU ATŠĶIRŠANA AR KLASIFIKĀCIJAS METODĒM

PĒTĪJUMS TIEK VEIKTS EIROPAS SOCIĀLĀ FONDA
PROJEKTA „INOVATĪVAS BIOMEDICĪNISKO ATTĒLU
IEGŪŠANAS UN APSTRĀDES TEHNOLOĢIJAS” IETVAROS.
Nr.2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014.



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

INGA.SAKNITE@LU.LV

RĪGA, 5.12.2014.



Algoritmi multispektrālo attēlu reģistrācijai un veidojumu segmentācijai

Roberts Kadiķis

Projekts

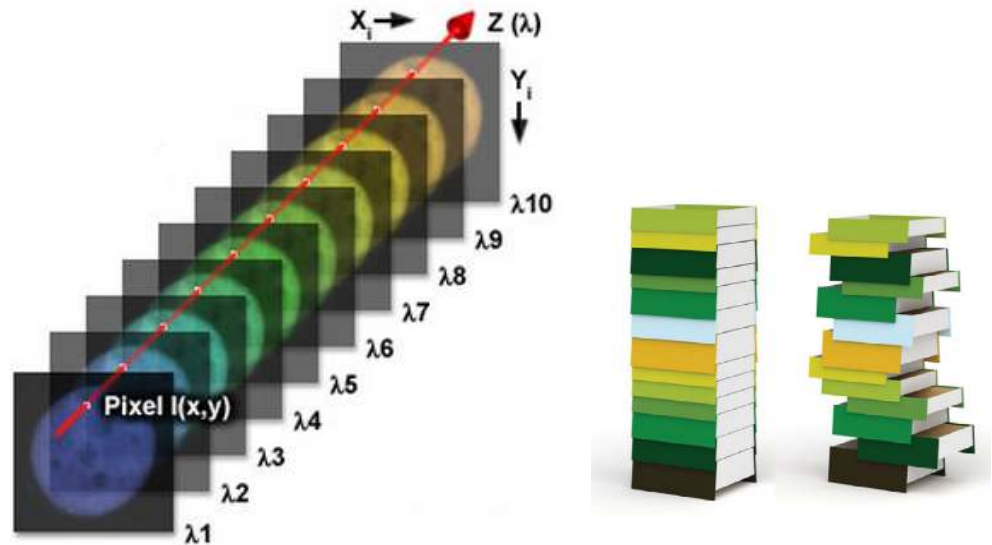
Inovātīvas biomedicīnisko attēlu iegūšanas un apstrādes tehnoloģijas
(InBiT)

Nr. 2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014

Motivācija

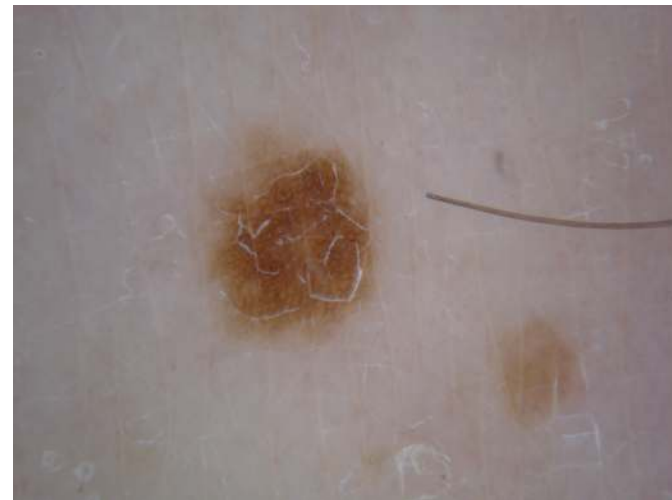
REĢISTRĀCIJA

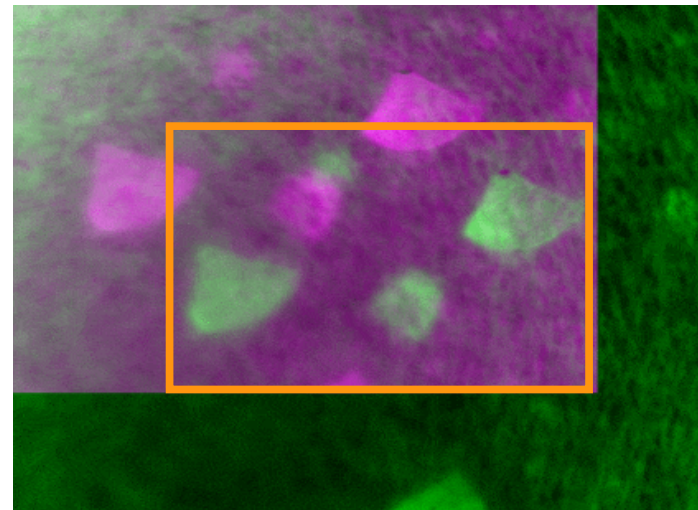
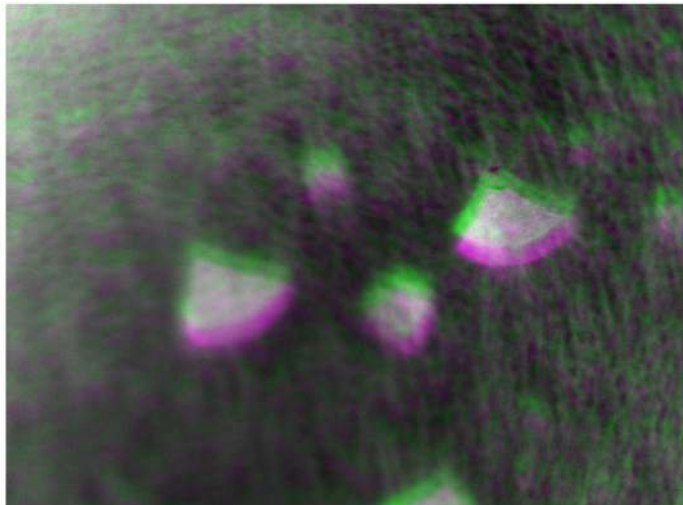
- ♦ Dažādo viļņa garuma attēlu uzņemšana notiek secīgi laikā. Pacienta kustību rezultātā, šie attēli var būt nobīdījušies viens pret otru.



SEGMENTĀCIJA

- ♦ Pikseļu klasificēšana – veidojumam atbilstošie pikseļi vai veidojumam neatbilstošie pikseļi.

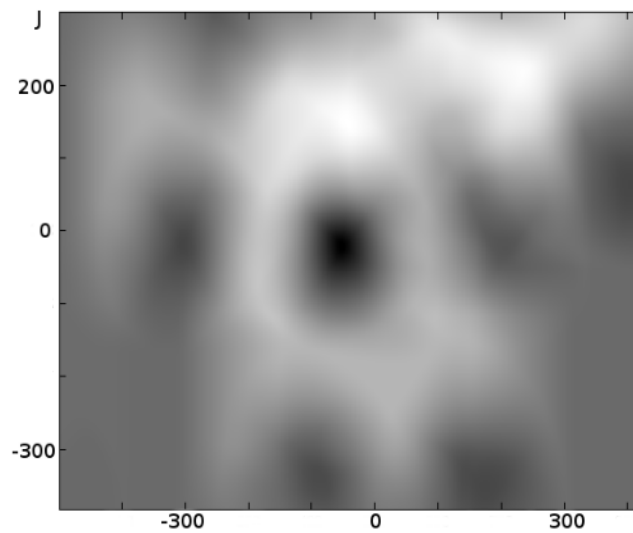




♦ Pie katras nobīdes (i,j) :

$$N(i,j) = \sum (I_1(x,y) - I_2(x,y))$$

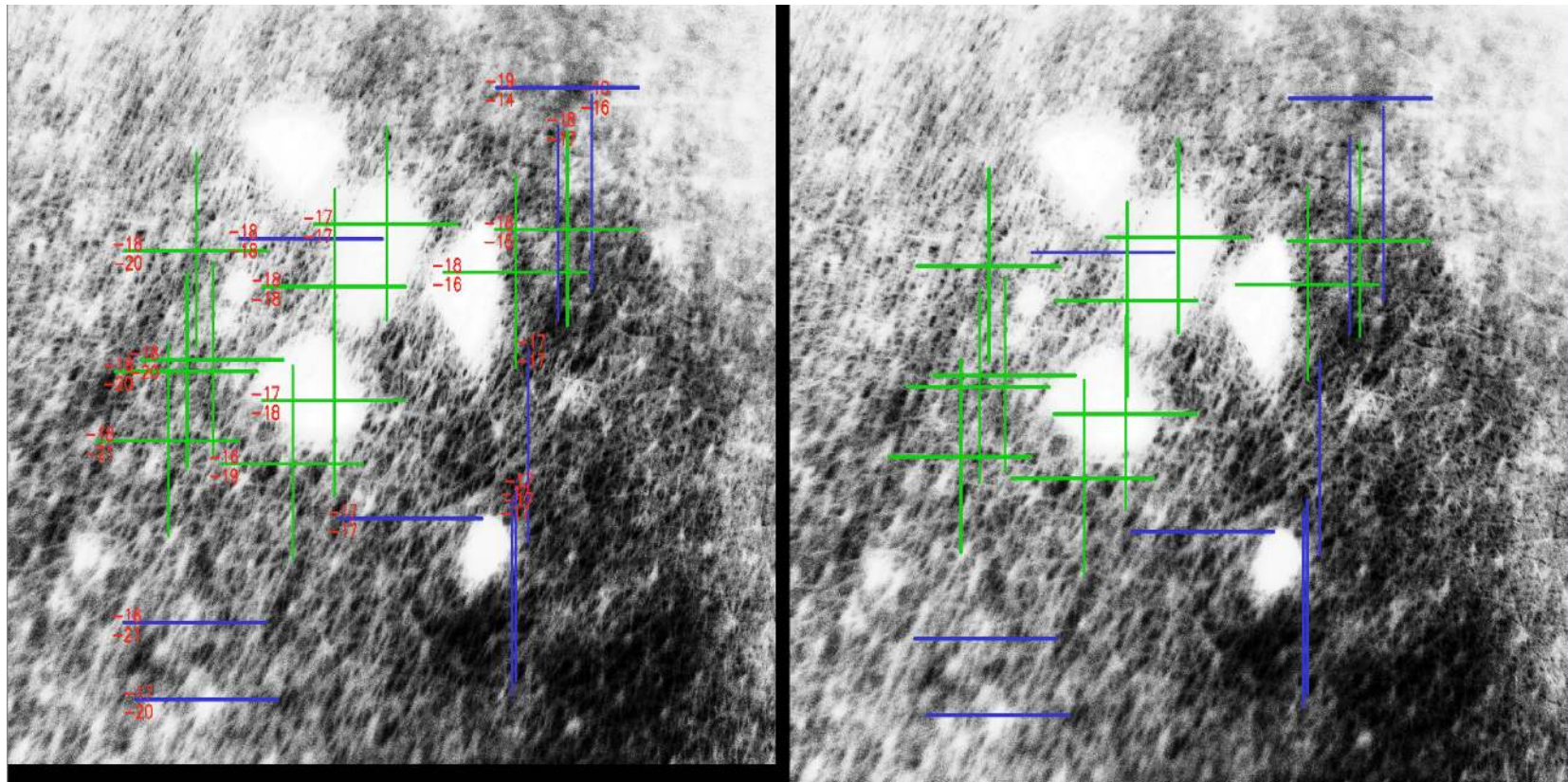
- ♦ $N(i,j)$ – pikseļa intensitāte nobīžu attēlā
- ♦ $I_1(x,y)$ – pikseļa intensitāte jau reģistrētā attēlā
- ♦ $I_2(x,y)$ – pikseļa intensitāte reģistrējamā attēlā



$(i-2, j-2)$				
	110	100	50	→
	170	(i,j)	56	
	300	200	70	
$(i+2, j-2)$				

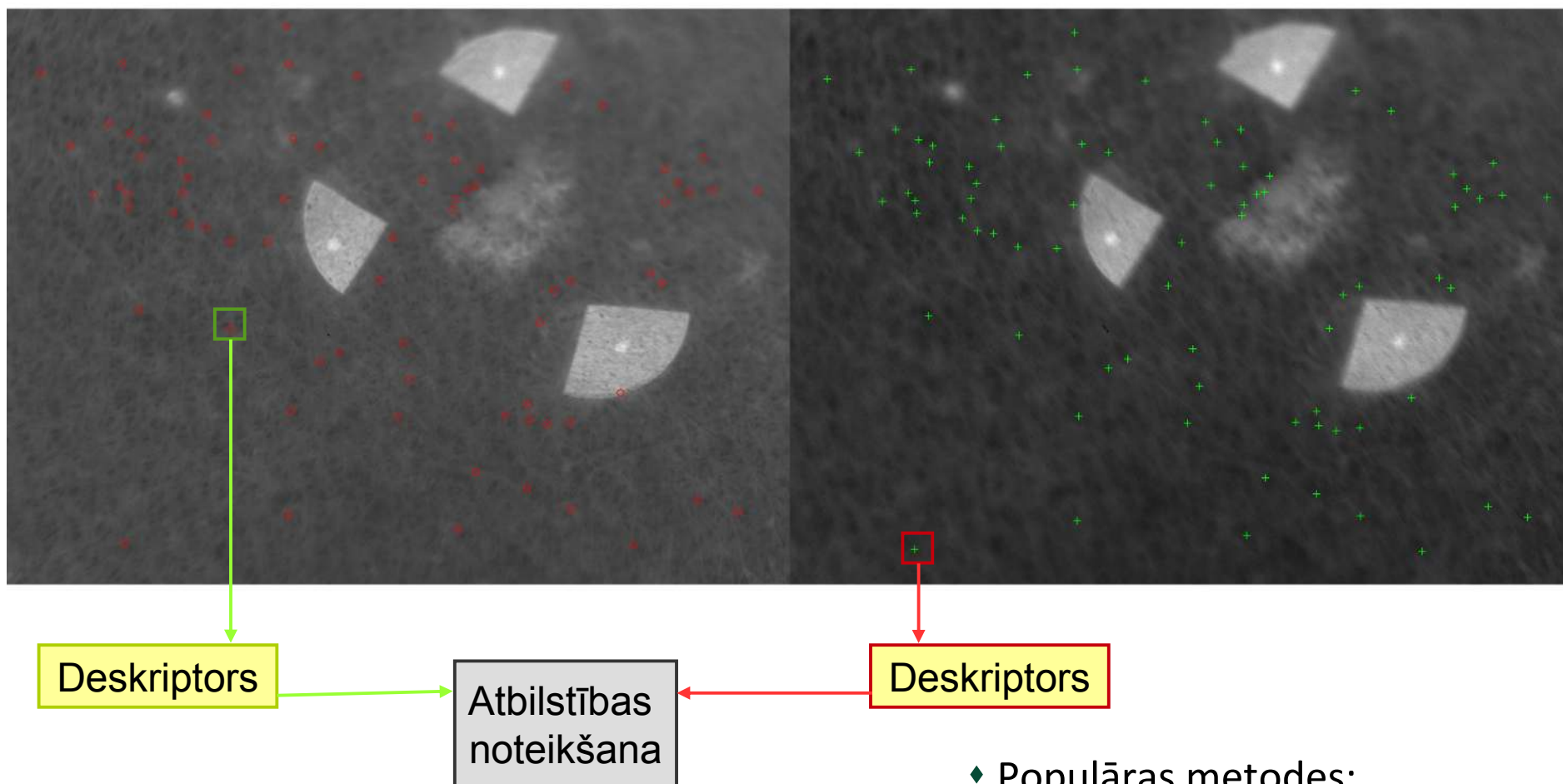
Apgabalu bīdīšana

- ♦ Tiek bīdīti vairāki apgabali (šauri taisnstūri un krusti)
- ♦ Katrs apgabals atrod savu minimumu



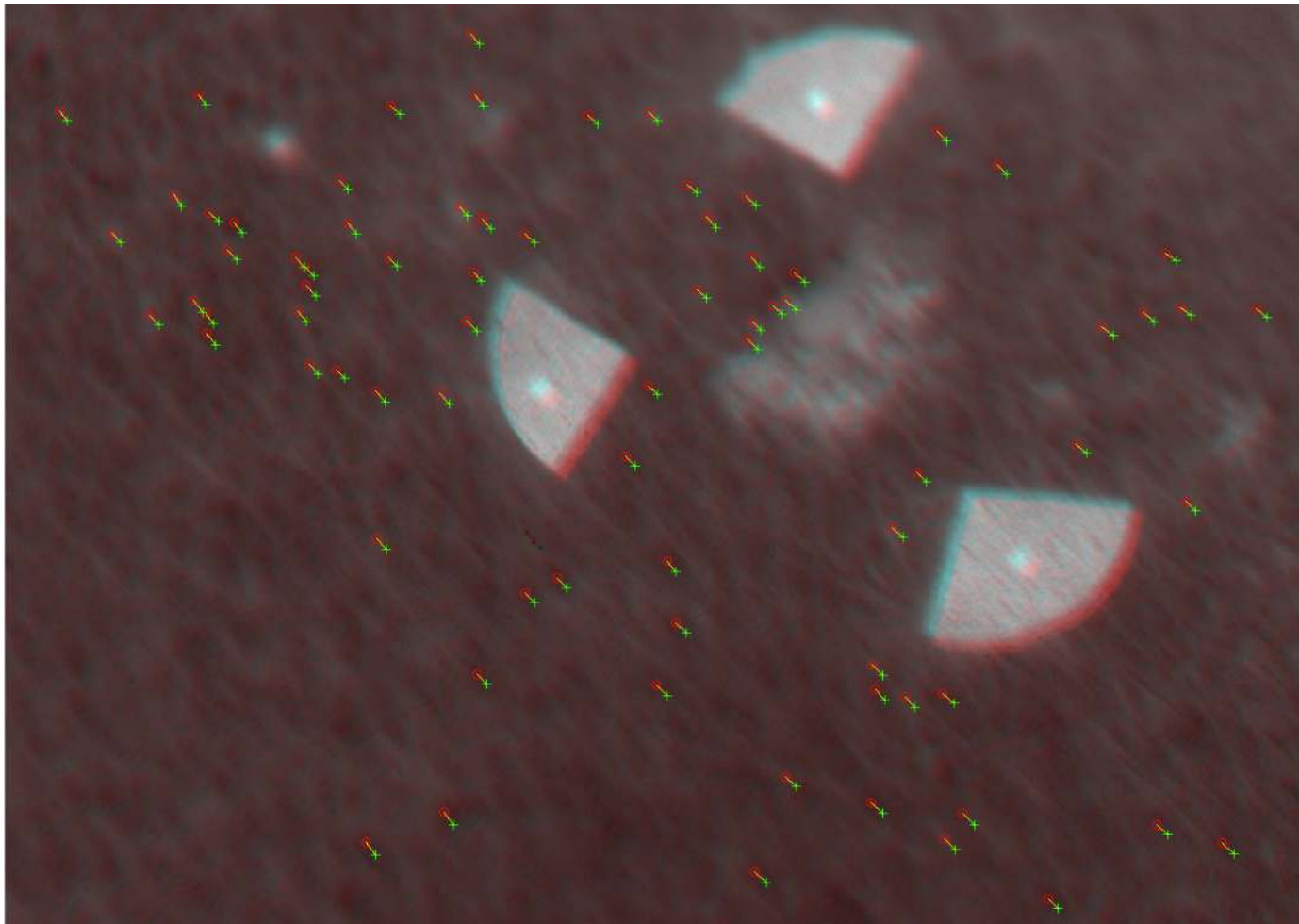
- ♦ Attēlos tiek atrasti raksturīgie punkti
- ♦ Atskaites attēls (jau reģistrēts)

- ♦ Reģistrējamais attēls



- ♦ Populāras metodes:
 - SIFT, SURF, ORB

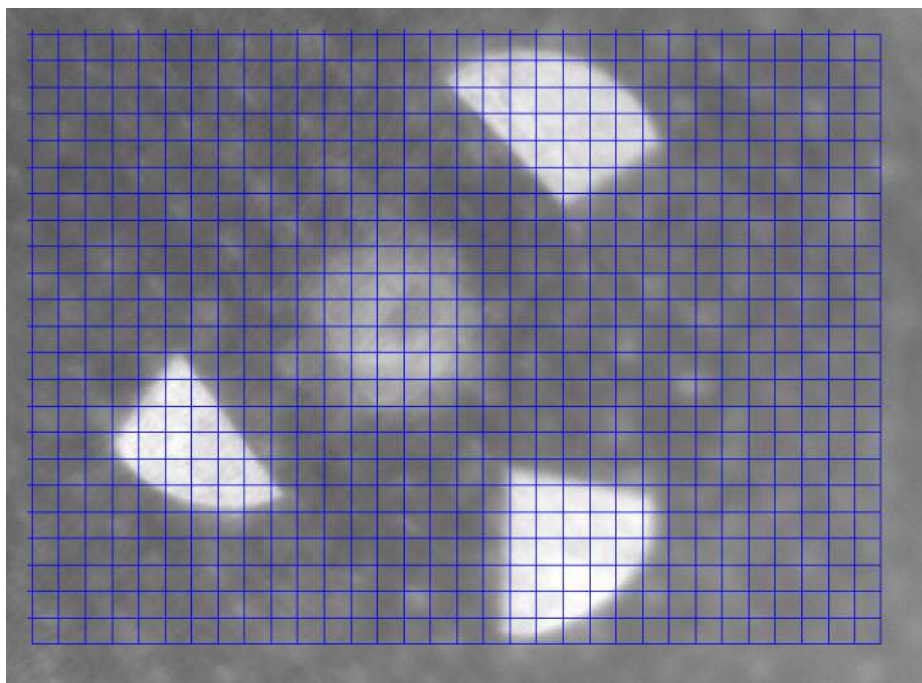
- ♦ No atrastajiem punktu pāriem tiek noteikta attēlu transformācija



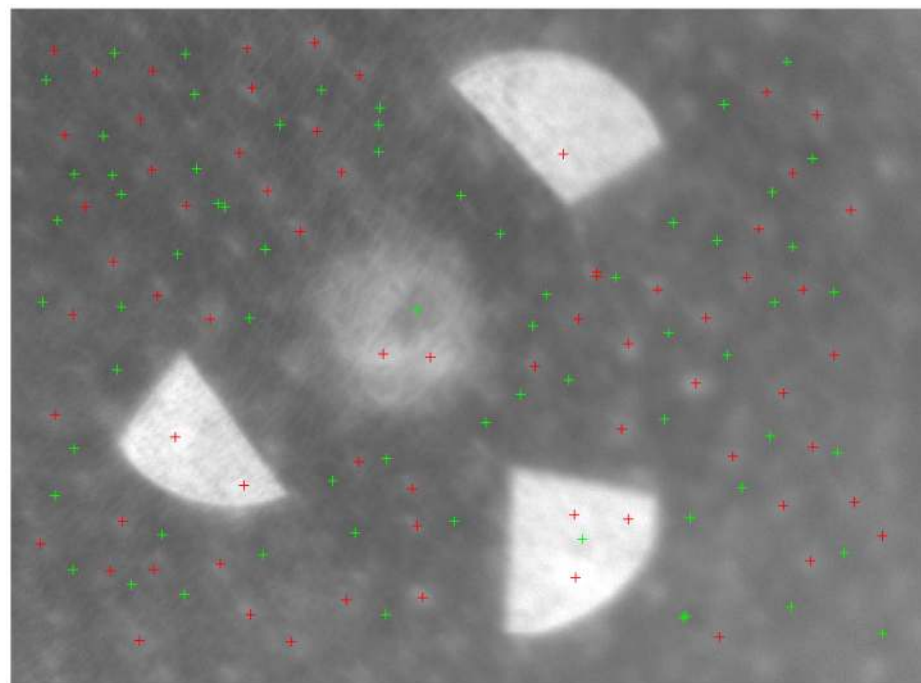
Lokālo ekstrēmu metode

Efektīva ekstrēmu atrašana

- ♦ Attēls tiek sadalīts vienmērīgos apgabalos

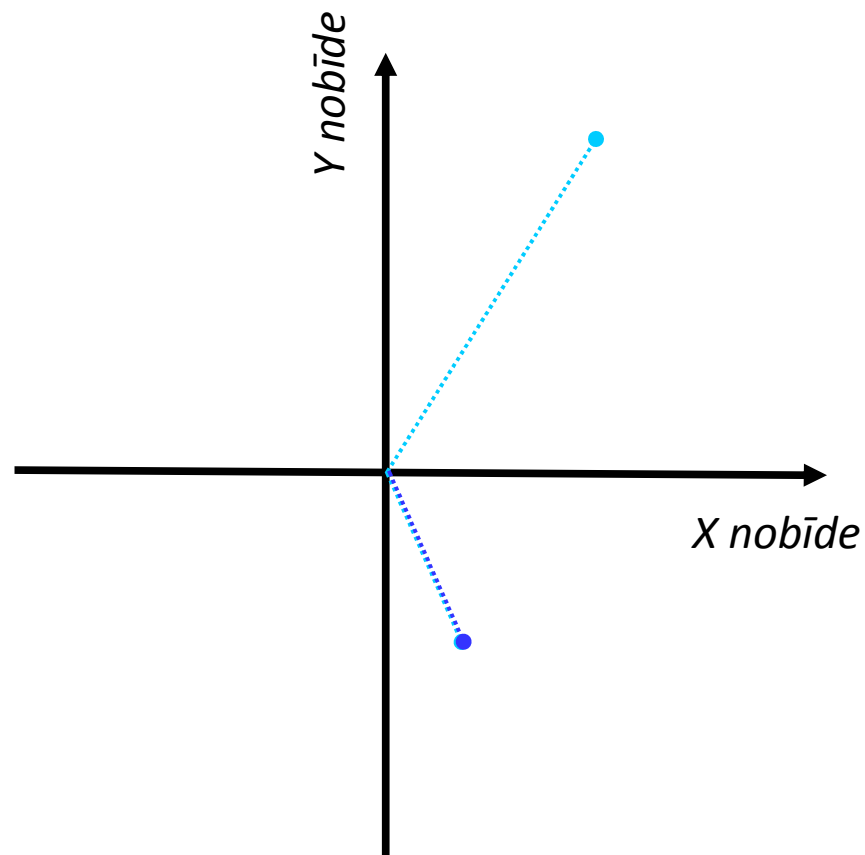
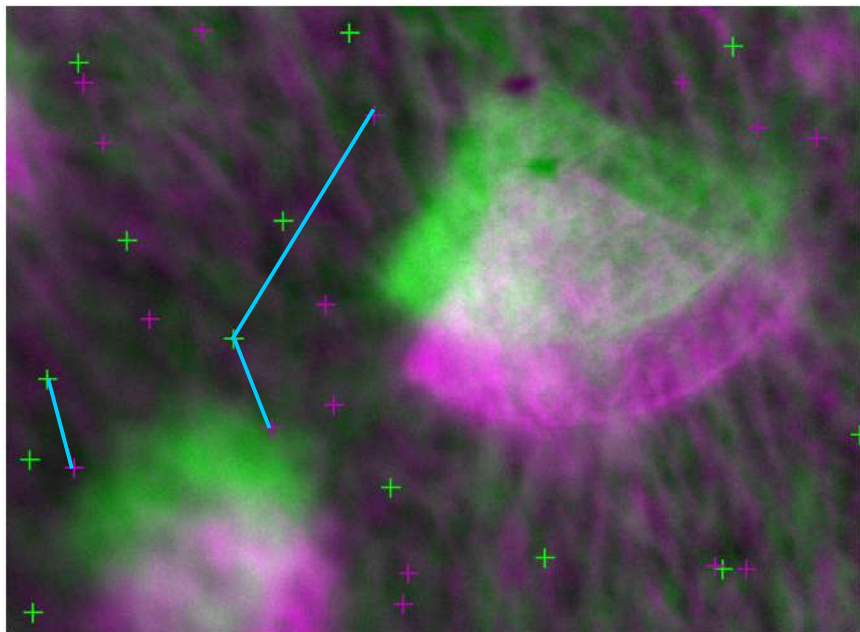


- ♦ Katrā apgabalā tiek atrasti pikseļi ar lielāko un mazāko intensitātes vērtību



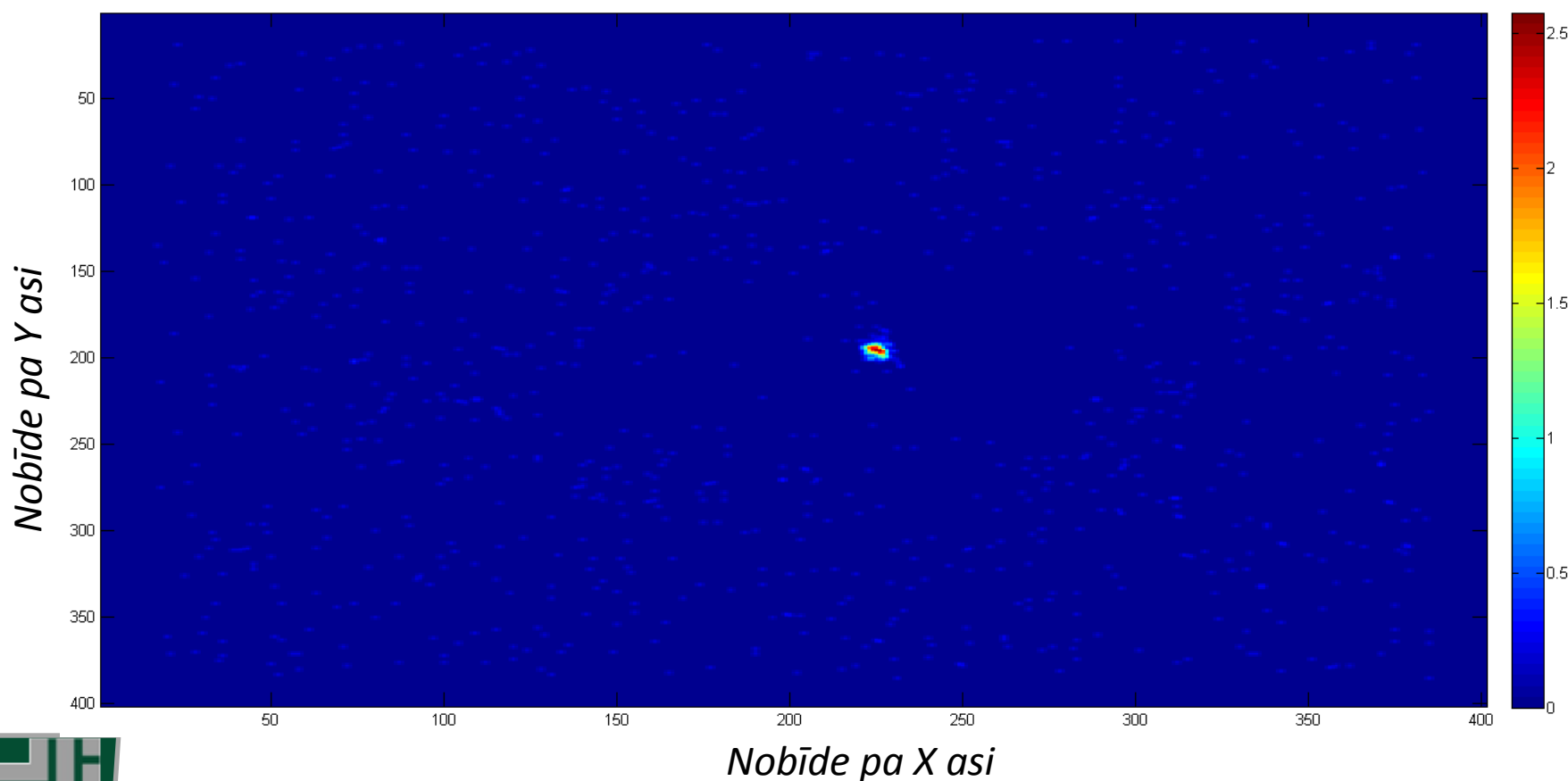
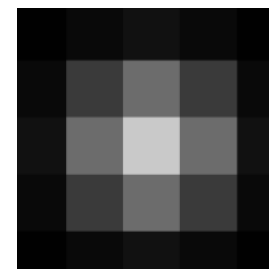
Lokālo ekstrēmu metode

- ♦ Nobīžu telpā tiek atlikts attālums starp katru 1. attēla maksimumu un katru 2. attēla maksimumu.



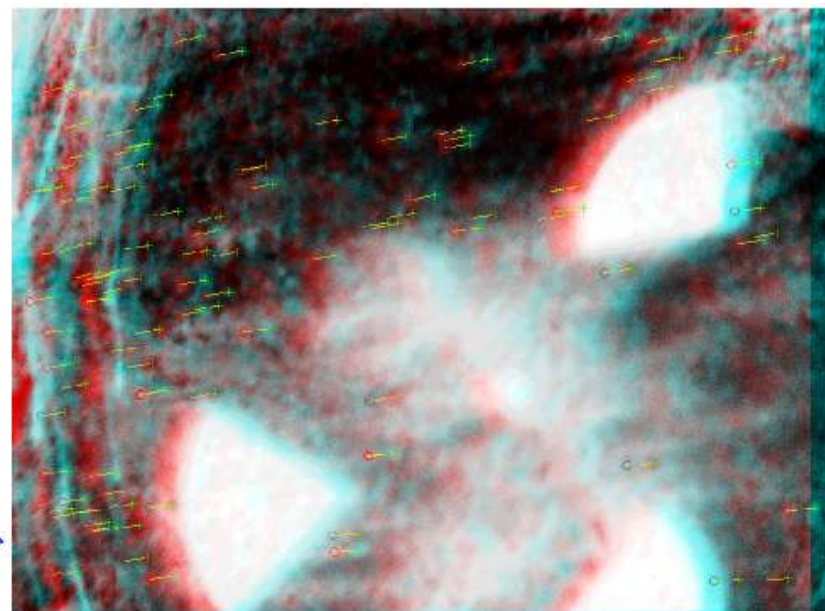
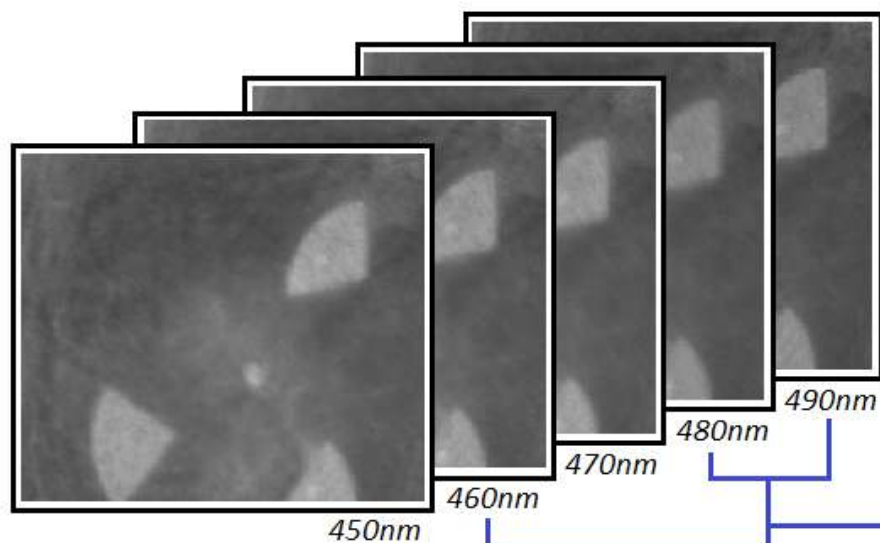
Atrasto ekstrēmu salīdzināšana

- ♦ Registrējamo attēlu savstarpējo nobīžu telpa



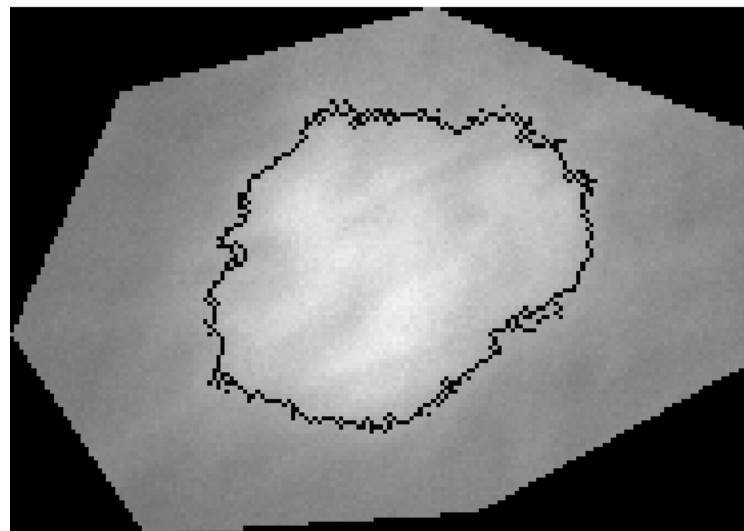
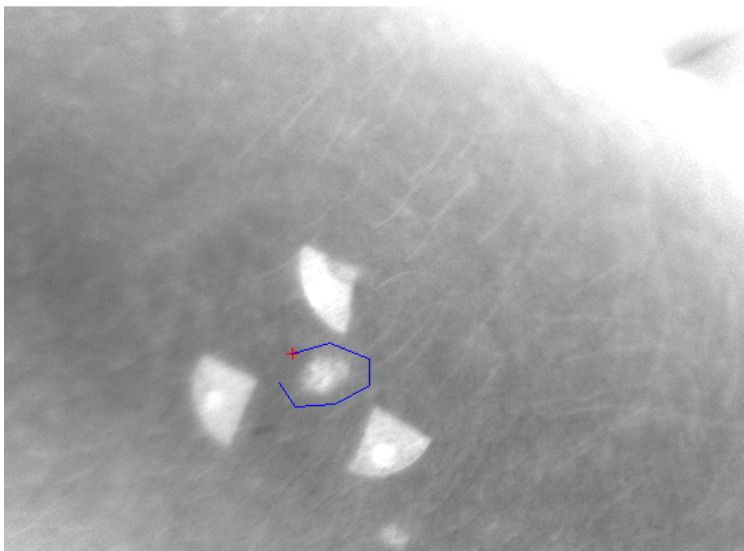
Attēlu apstrādes secība

- ♦ Salīdzināt attēlu n ar pirmo attēlu (450nm)
- ♦ Salīdzināt attēlu n ar iepriekšējo ($n-1$)
- ♦ Salīdzināt attēlu n ar ($n-1$) un ($n-3$)



♦ OpenCV C++, MATLAB

Metode	Veiksmīga reģistrācija	Vidējais laiks 51 attēla reģistrēšanai (sekundes)
Apgabalu bīdīšanas metode	30 / 90	70
ORB raksturīgie punkti	15 / 90	43
Apgabalu bīdīšana + ORB raksturīgie punkti	34 / 90	92
Lokālo ekstrēmu nobīžu metode	61 / 90	22



- ♦ Otsu metodē pikseļi tiek sadalīti tādējādi, ka fona un priekšplāna pikseļu izkriežu summa ir minimāla

$$\sigma_w^2 = W_f \sigma_f^2 + W_b \sigma_b^2$$

W_f – priekšplāna (veidojuma) pikseļu skaits

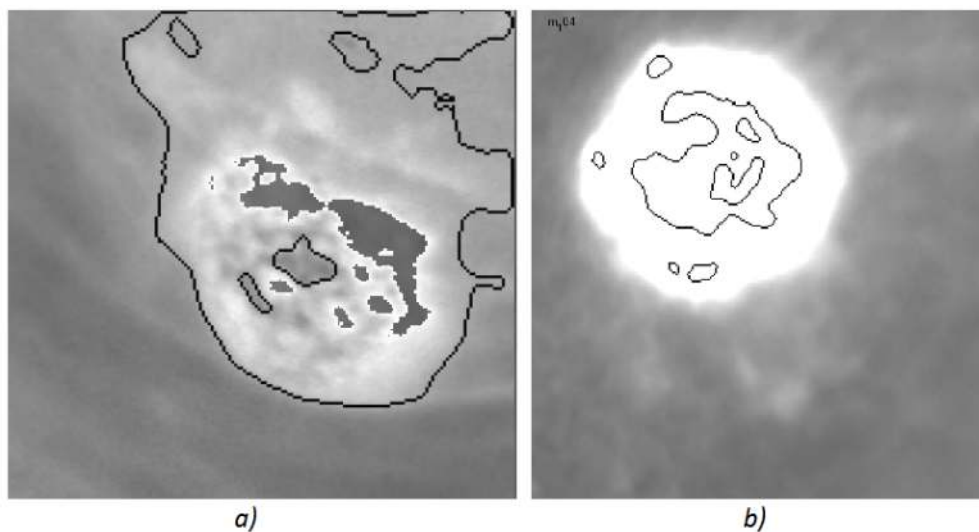
W_b – fona (ādas) pikseļu skaits

σ_f^2 – priekšplāna pikseļu dispersija

σ_b^2 – fona pikseļu dispersija

σ_w^2 – svaroto dispersiju summa

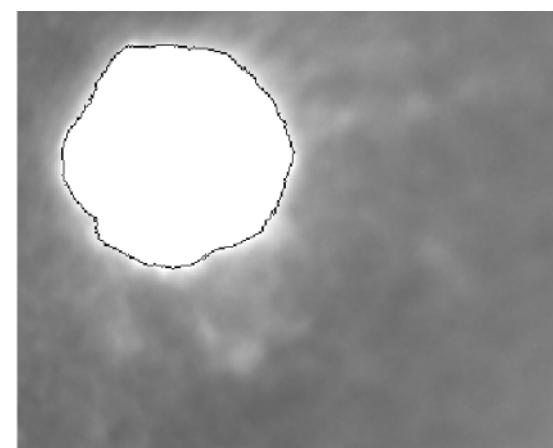
- ♦ Sastopamās segmentēšanas kļūdas:



- ♦ Ādas apgabals tiek segmentēts kā veidojums
- ♦ Daļa no veidojuma tiek segmentēta kā āda

- ♦ Morfoloģiskā robežas paplašināšana

- ♦ Segmentācija pēc cita viļņa garuma attēla



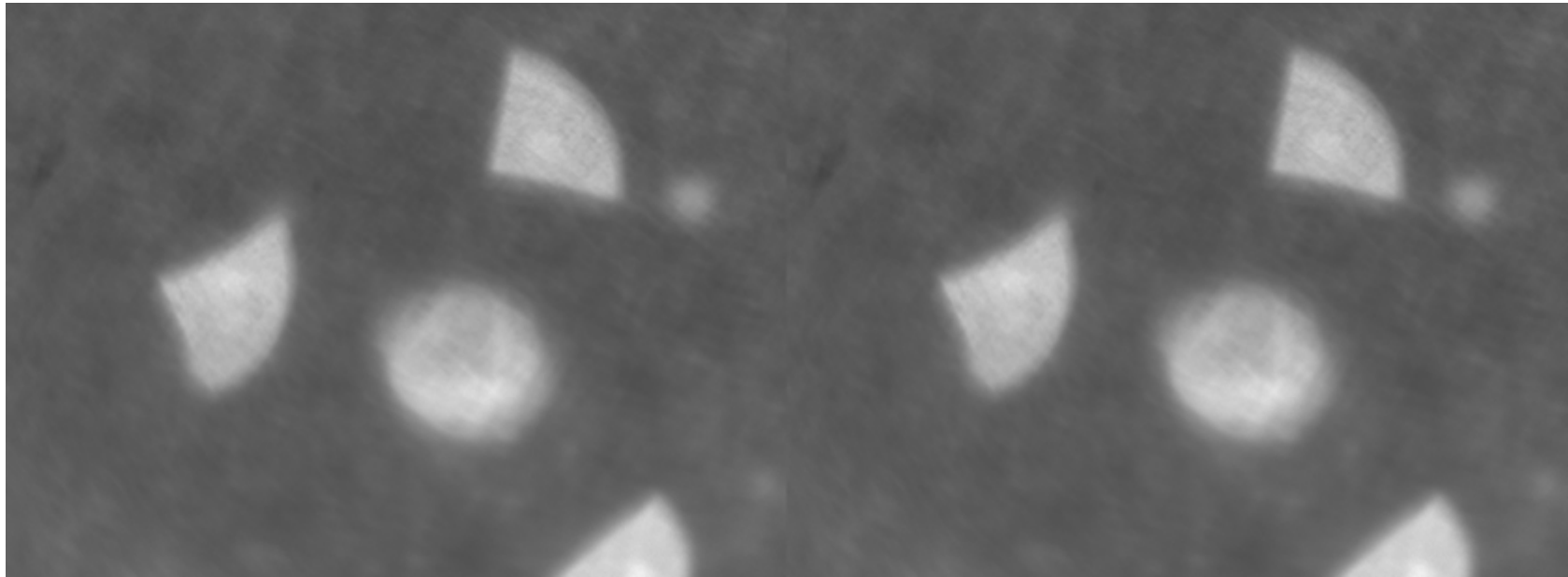
Secinājumi / Turpmākie darbi

- ♦ Pacientu datu reģistrēšanai pietiek ar nobīdes noteikšanu starp dažādo viļņa garumu attēliem
- ♦ No īstenotajām reģistrācijas metodēm veiksmīgākā ir attēlu lokālo ekstrēmu salīdzināšana
- ♦ Lokālo ekstrēmu reģistrācijas algoritma paplašināšana (rotācijas un izmēra maiņas noteikšana)
- ♦ Segmentācijas rezultāta uzlabošana
- ♦ Segmentācijas automatizācija



Paldies par uzmanību!

- ♦ Attēli pirms un pēc reģistrācijas:



Ādas hromoforu kartēšanas problēmu risinājumi un iegūtie rezultāti

Juris Siņica – Siņavskis

Zinātniskais asistents

Elektronikas un datorzinātņu institūts

e-pasts: jss@edi.lv

5/12/2014

**Seminārs: «Ādas attēlu iegūšanas un apstrādes tehnoloģijas, to
izmantošana medicīniskajā diagnostikā»**

*ESF līdzfinansēta projekta „Inovatīvas biomedicīnisko attēlu iegūšanas un apstrādes tehnoloģijas (InBiT)” vienošanās Nr.2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014

Saturs

- Regresijas modelis
- Gradianta metode
- Ādas hromoforu kartes
- Melanomu un nevusu attēlu pikseļu kategoriju detektēšana, klasifikācijas rezultāti
- Turpmākie pētījumi

Regresijas modelis

$$f(x) = u_1 f_1(x) + u_2 f_2(x) + u_3 f_3(x) + u_4 f_4(x)$$

- $f_j(x)$ - bāzes funkcijas j -tai hromoforai, kur x ir spektrālā josla.
Piezīme: bāzes funkciju vietā mums ir dotas tabulētas vērtības kā oksihemoglobīna, deoksihemoglobīna un melanīna absorbcijas koeficienti, $f_4(x) = \text{const}$
- u_1, u_2, u_3, u_4 ir nezināmie koeficienti, kuri atkarīgi no pētāmā pikseļa
- Aproximējam optisko blīvumu $OD(\lambda) = -\log(I(\lambda)/I_0(\lambda))$

$I(\lambda)$ - no ādas atstarotās gaismas intensitāte

$I_0(\lambda)$ - no baltas lapas atstarotās gaismas intensitāte

λ - spektrālās joslas viļņa garums

Motivācija: novērst regresijas modeļa optiskā blīvuma aproksimācijas rezultātā iegūtās absorbcijas spektra negatīvās vērtības

Gradianta metode

$$\mathbf{u} = (F^T F)^{-1} F^T \mathbf{y}$$

Regresijas koeficientu novērtējumi pēc MKM formulas

$$\mathbf{u} = (u_1, u_2, u_3, u_4)^T$$

Nezināmo koeficientu novērtējumi

$$F = (f_{ij}) = f_j(x_i) \quad j = \overline{1,4}$$

Hromoforu tabulētās absorbcijas koeficientu vērtības j -tai hromoforai un i -tai spektrālajai joslai ar viļņa garumu x_i

$$\mathbf{y} = (y_1, y_2, \dots, y_n)^T$$

Viena attēla pikseļa optiskā blīvuma vektors

$$J(u_1, u_2, u_3, u_4) = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2$$

aproximācijas precizitātes mērs OD

$$G(\mathbf{u}_0) = \left(\frac{dJ(\mathbf{u}_0)}{du_1}, \frac{dJ(\mathbf{u}_0)}{du_2}, \frac{dJ(\mathbf{u}_0)}{du_3}, \frac{dJ(\mathbf{u}_0)}{du_4} \right)$$

Gradients punktā $\mathbf{u}_0$

Pieeja: J minimizācija balstīta uz pakāpenisku tuvinājumu konstrukciju minimuma punktam $\mathbf{u}^*$, ejot gradientam pretējā virzienā un garantējot, ka $\mathbf{u}^*$ būs ar pozitīvām vērtībām

Regresijas modelis

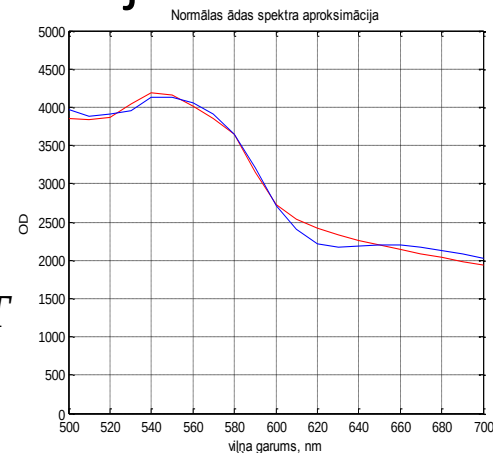
Spektrālo joslu viļņu garumi izvēlēti 500-700nm ar 10 nm soli

Tiek aprēķināta fona kompensējamā daļa u_4 , kura tiek izslēgta no attēla, izlīdzinot sākotnējā attēla vienmērīgo apgaismojumu

Tiek aprēķināti novērtējumi u_1 , u_2 un u_3

$$f(x) = u_1 f_1(x) + u_2 f_2(x) + u_3 f_3(x)$$

$$\mathbf{u} = (F^T F)^{-1} F^T (\mathbf{y} - \bar{\mathbf{u}}_4) \quad \mathbf{u} = (u_1, u_2, u_3)^T$$

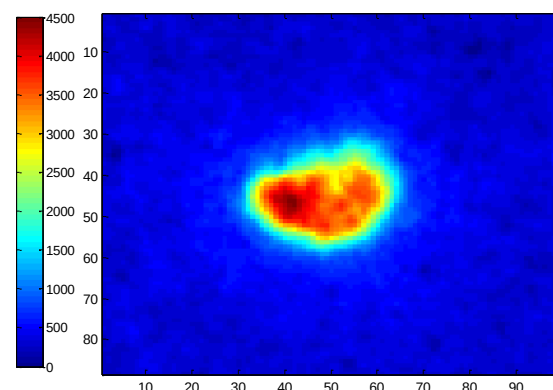
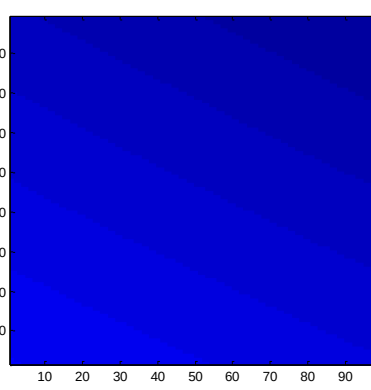
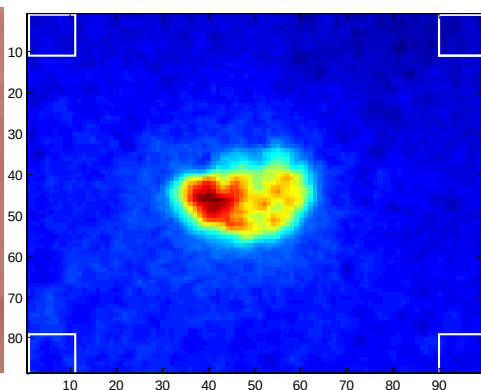


Plakana nevusa attēls

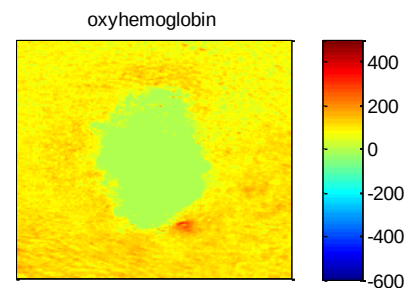
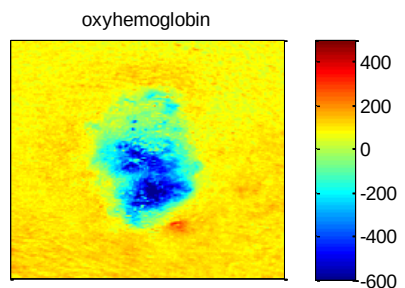
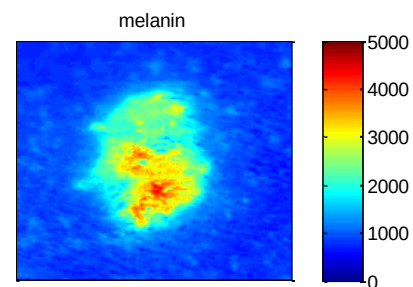
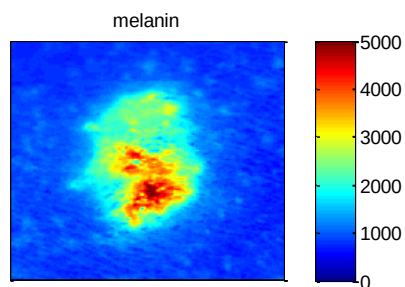
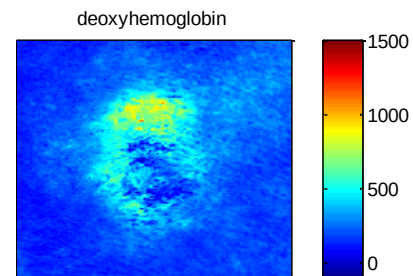
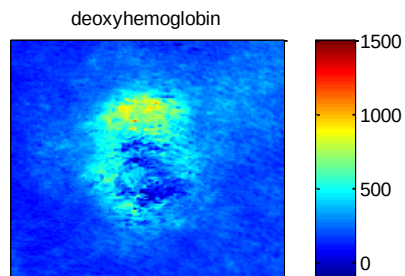
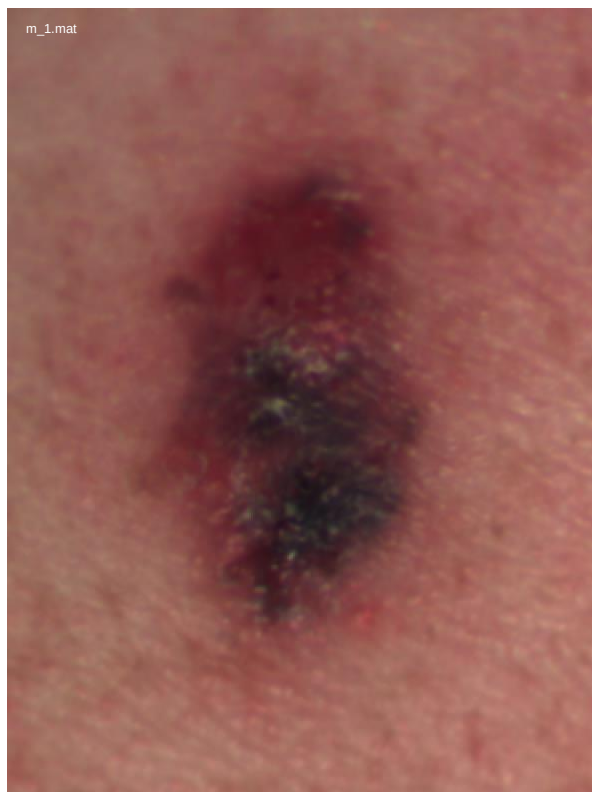
Novērtējuma u_4 attēls

Lineāra interpolācija

$\mathbf{y} - \bar{\mathbf{u}}_4$ attēls 640nm joslā



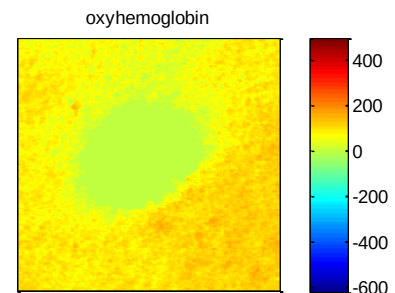
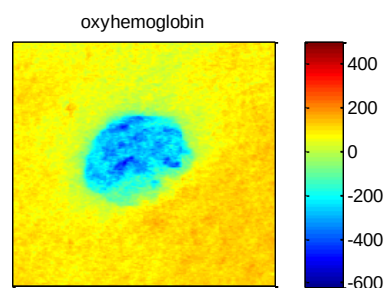
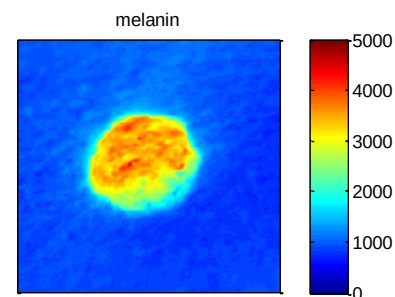
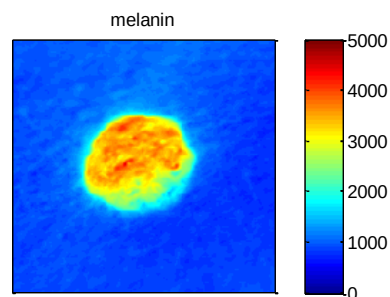
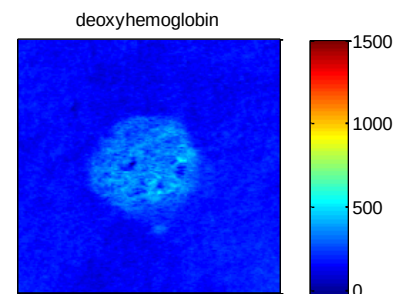
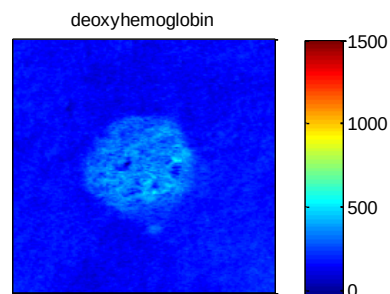
Melanomas attēla hromoforu kartes



legūtas izmantojot
MKM

legūtas izmantojot
optimizācijas algoritmu

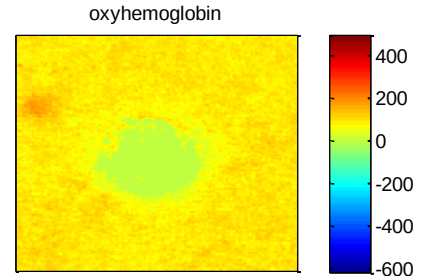
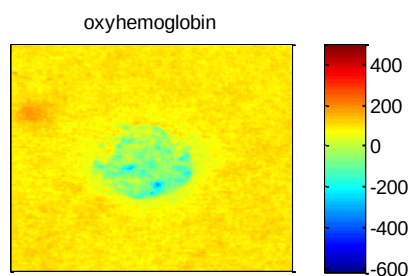
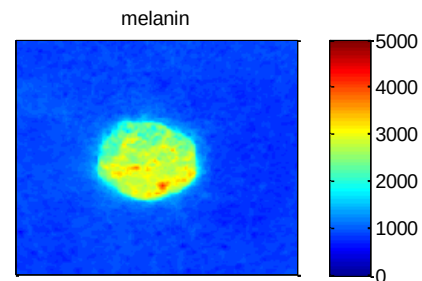
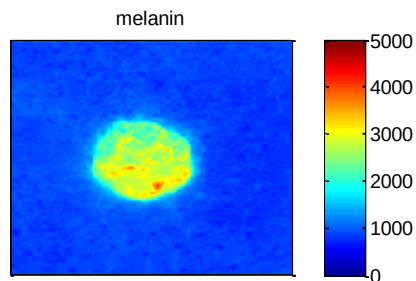
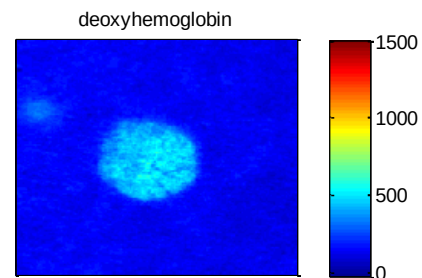
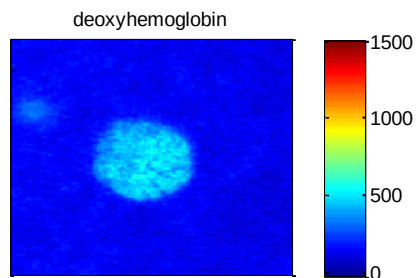
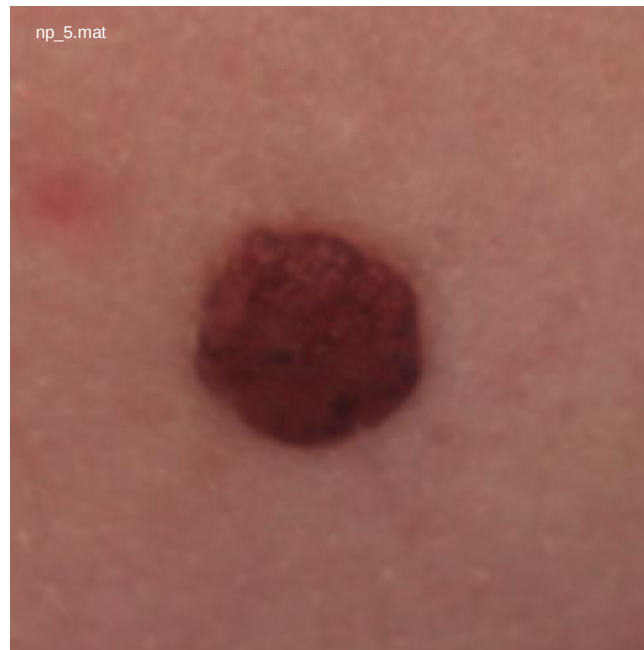
Piepacelta nevusa attēla hromoforu kartes



legūtas izmantojot
MKM

legūtas izmantojot
optimizācijas algoritmu

Plakana nevusa attēla hromoforu kartes

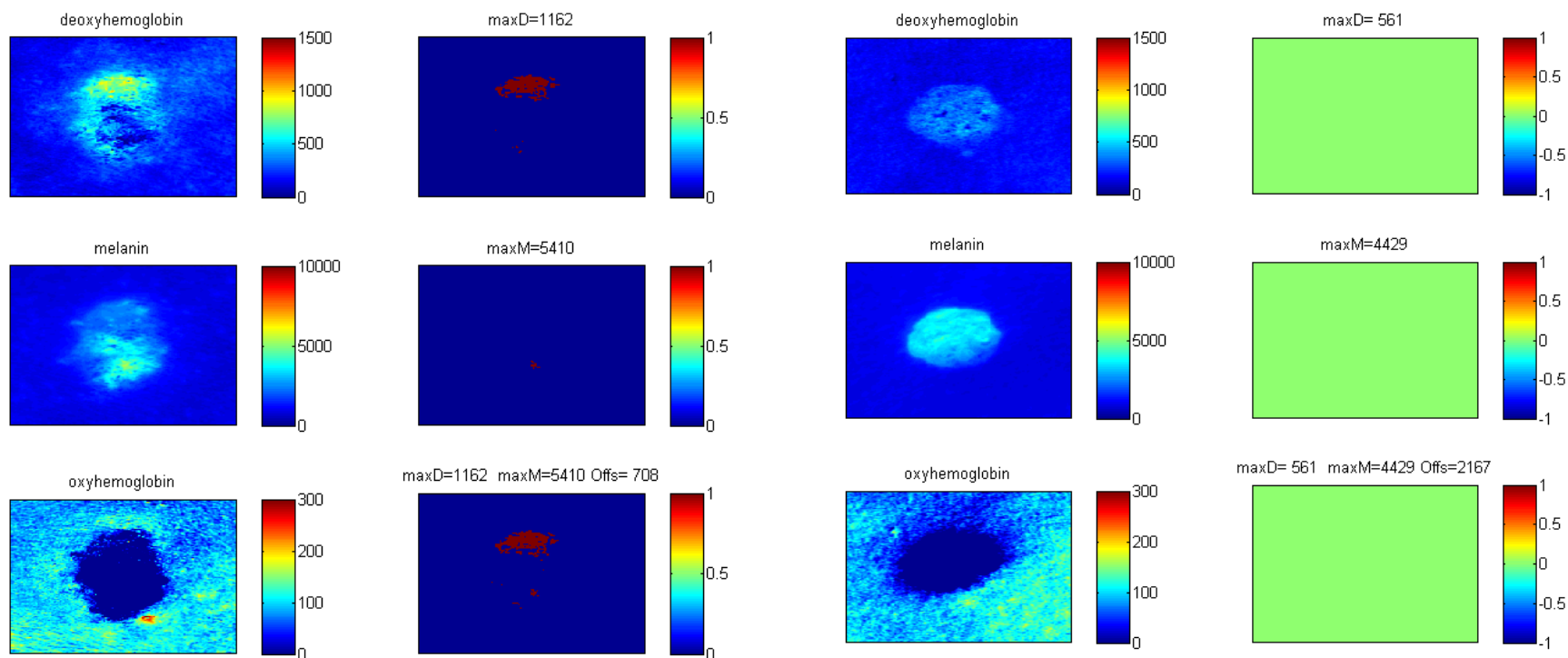


legūtas izmantojot
MKM

legūtas izmantojot
optimizācijas algoritmu

Melanomu un nevusu attēlu pikseļu kategoriju detektēšana

Empīriskā ceļā tika izvēlētas pieļaujamās deoksihemoglobīna (650) un melanīna (5000) relatīvās koncentrācijas vērtības

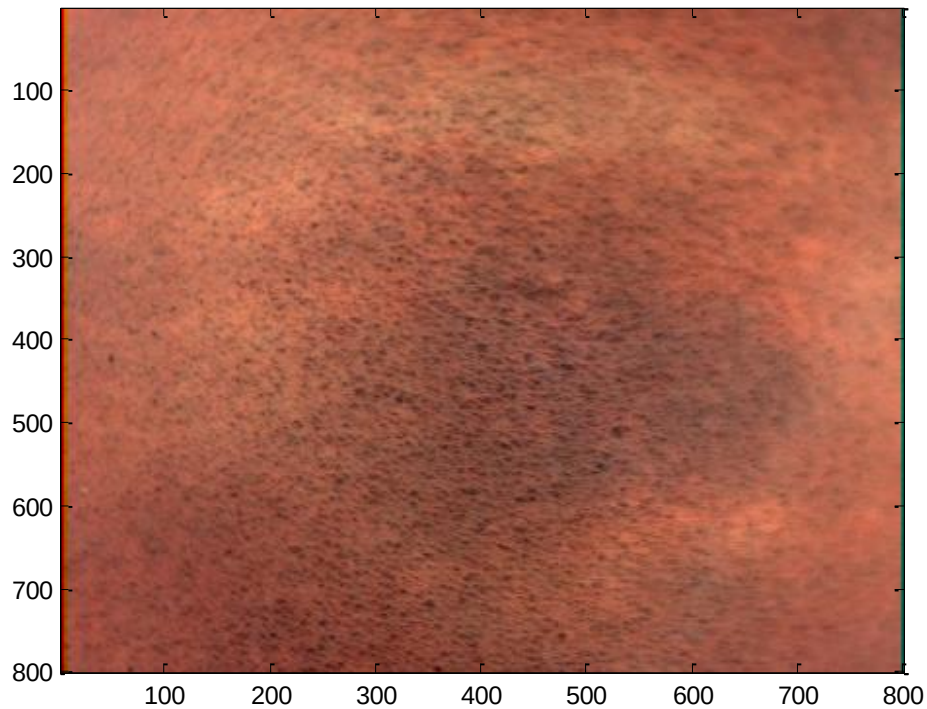


sensitivitāte- 100%

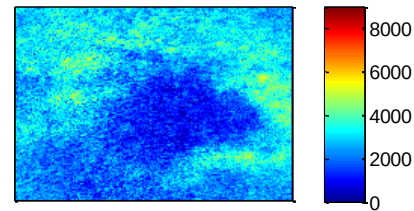
8 no 94 nevusiem arī tika atzīti par melanomām (specificitāte- 91.5%).

Turpmākie pētījumi

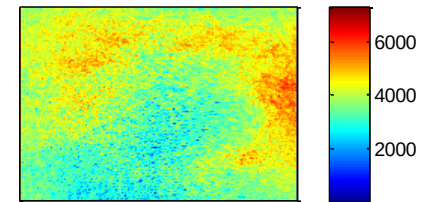
Zilumu hromoforu kartes



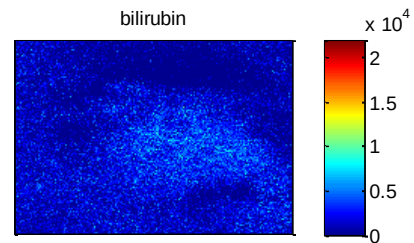
deoxyhemoglobin



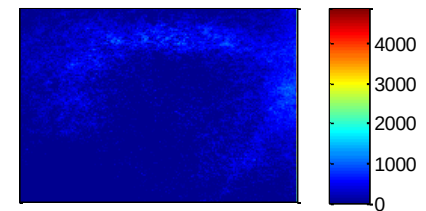
melanin



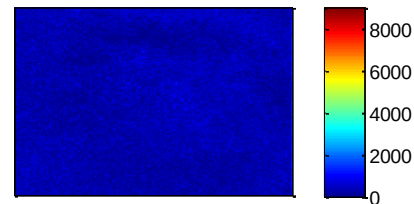
bilirubin



biliverdin



oxyhemoglobin



Paldies par Jūsu uzmanību!



LATVIJAS
UNIVERSITĀTE
ANNO 1919

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Laser speckle imaging for assessment of skin blood flow using mobile phone

Dainis Jakovels

Biophotonics Laboratory

Institute of Atomic Physics and Spectroscopy

University of Latvia

E-mail: dainis.jakovels@lu.lv

European Social Fund project “Innovative biomedical image acquisition and processing technologies”

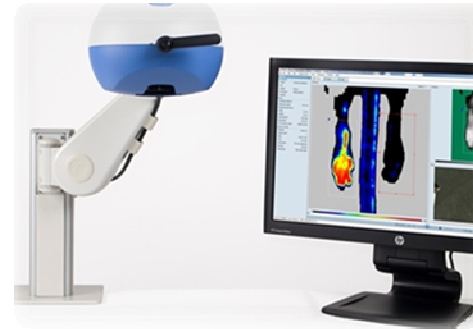


Motivation

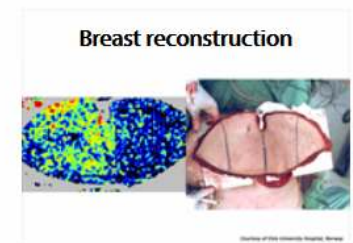
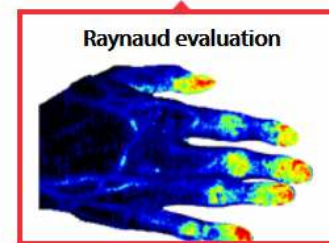
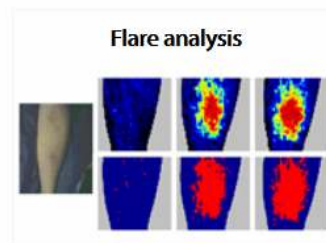
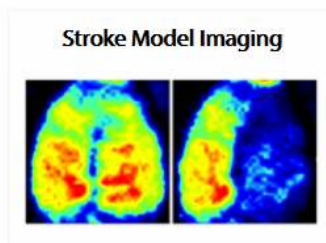
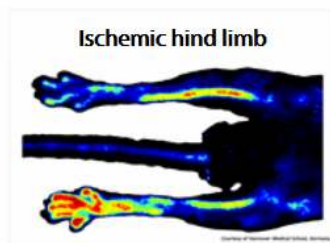
Commercially available laser Doppler imagers



moorLDI-2 Laser Doppler Imager
from Moor Instruments
<http://gb.moor.co.uk/>



PeriCam PSI System
from Perimed AB
<http://www.perimed-instruments.com/>



www.perimed-instruments.com

Motivation

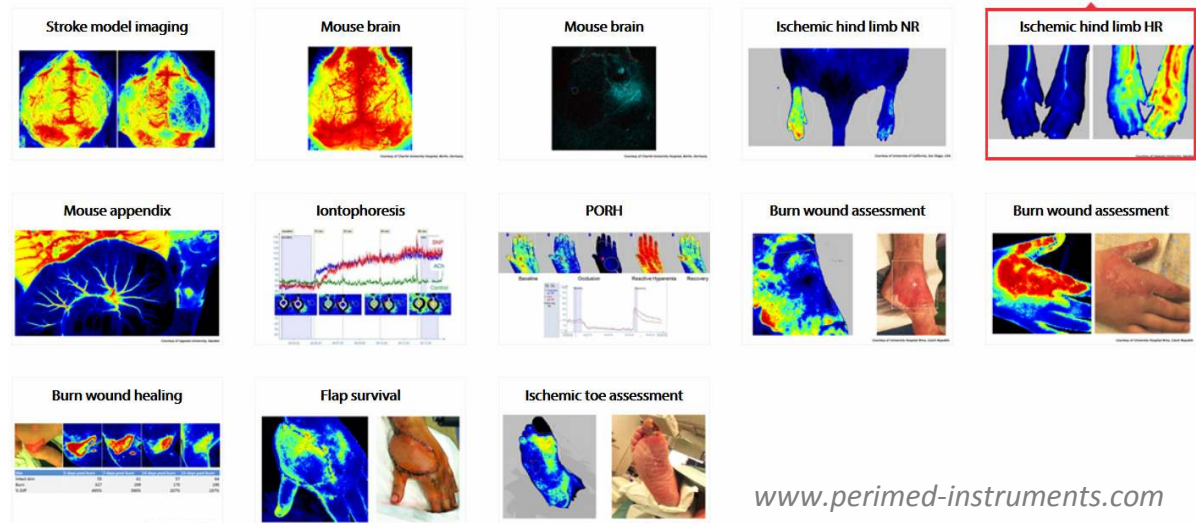
Commercially available laser speckle contrast imagers



moorFLPI-2 Speckle Contrast Imager
from Moor Instruments
<http://gb.moor.co.uk/>



PeriCam PSI System
from Perimed AB
<http://www.perimed-instruments.com/>



Motivation

Mobile phone based solutions for health monitoring



*Handyscope dermascope
from FotoFinder
<http://www.handyscope.net>*



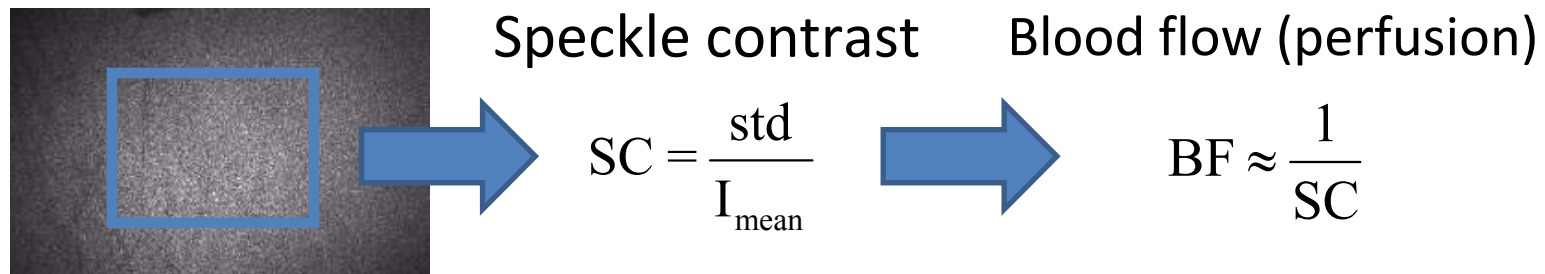
*AliveCore ECG monitor
from AliveCore
<http://www.alivecor.com>*



*Gmate Smart glucometer
from Gmate
<http://www.gmate.com>*

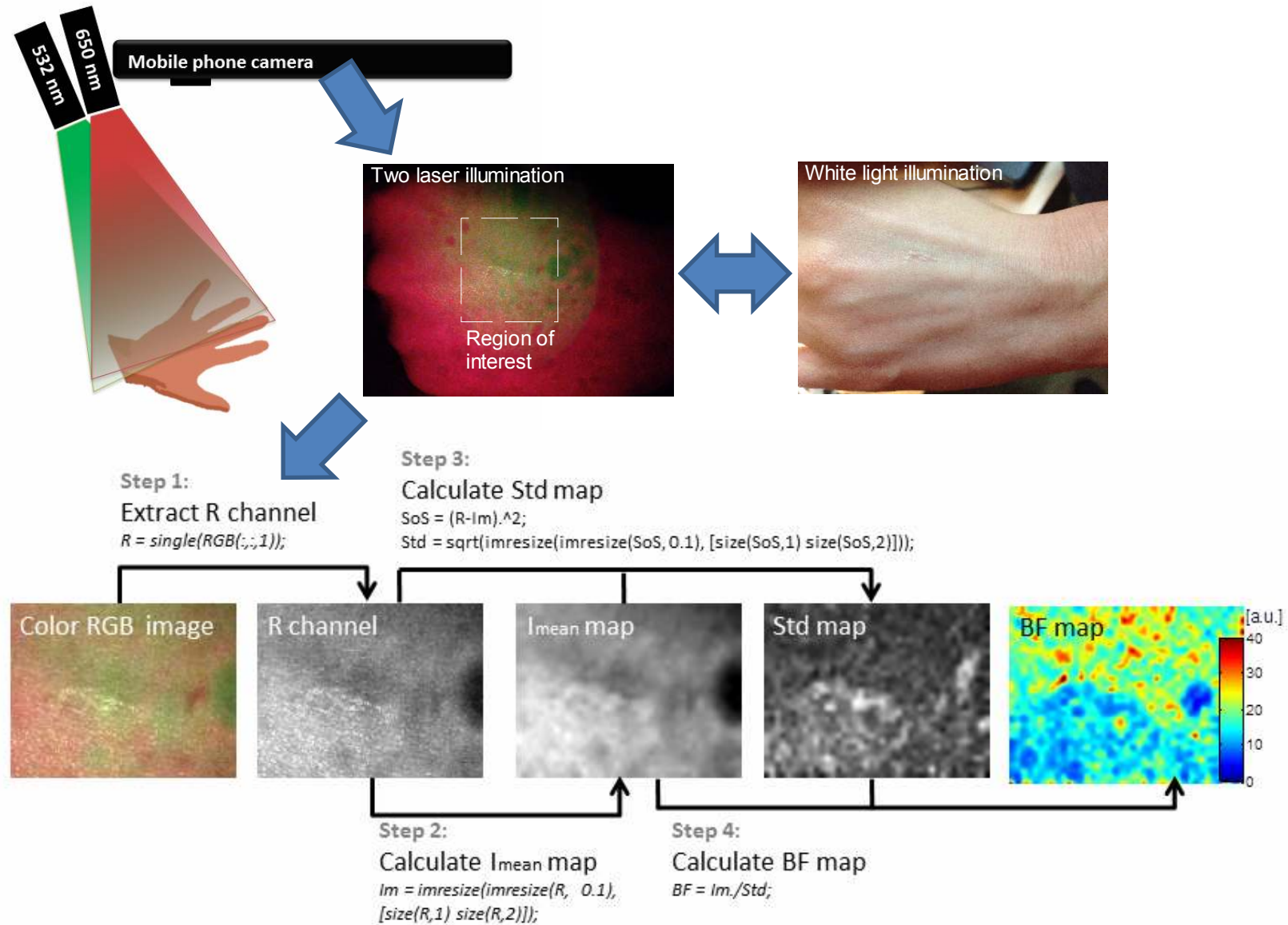
Laser speckle contrast analysis (LASCA)

Theory



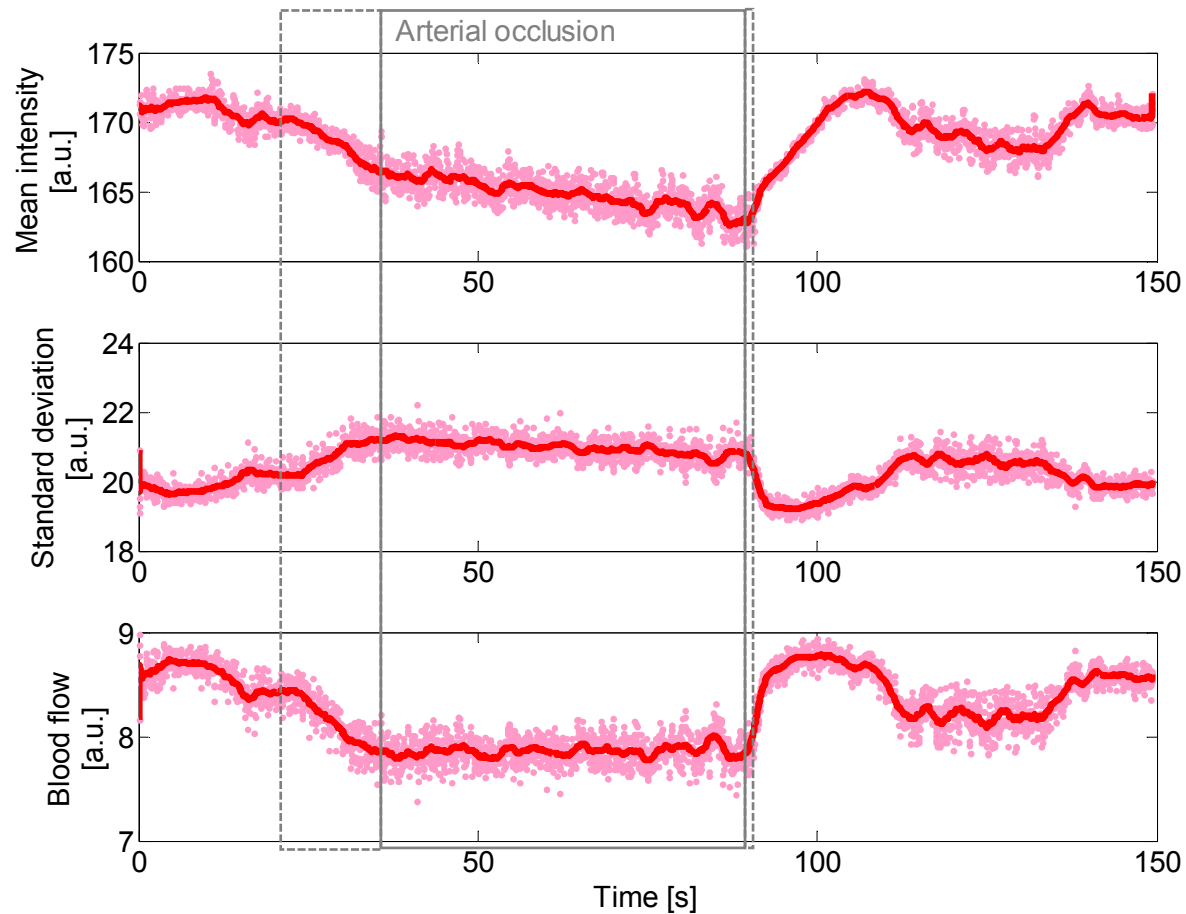
J.D. Briers, S. Webster, „Laser speckle contrast analysis (LASCA): a nonscanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow,” J. Biomed. Opt. 1, 174-179 (1996)

Experimental setup and LASCA algorithm



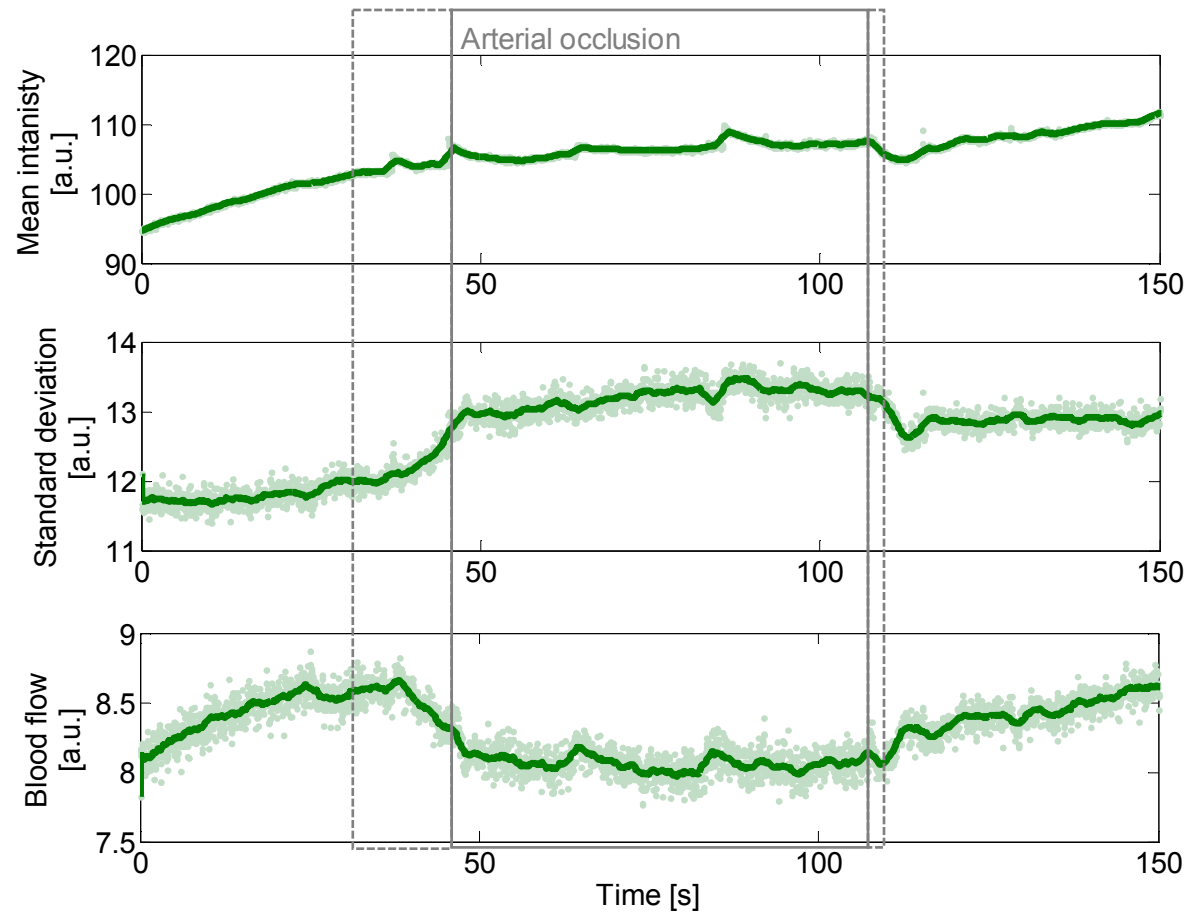
Arterial occlusion test

650 nm laser illumination



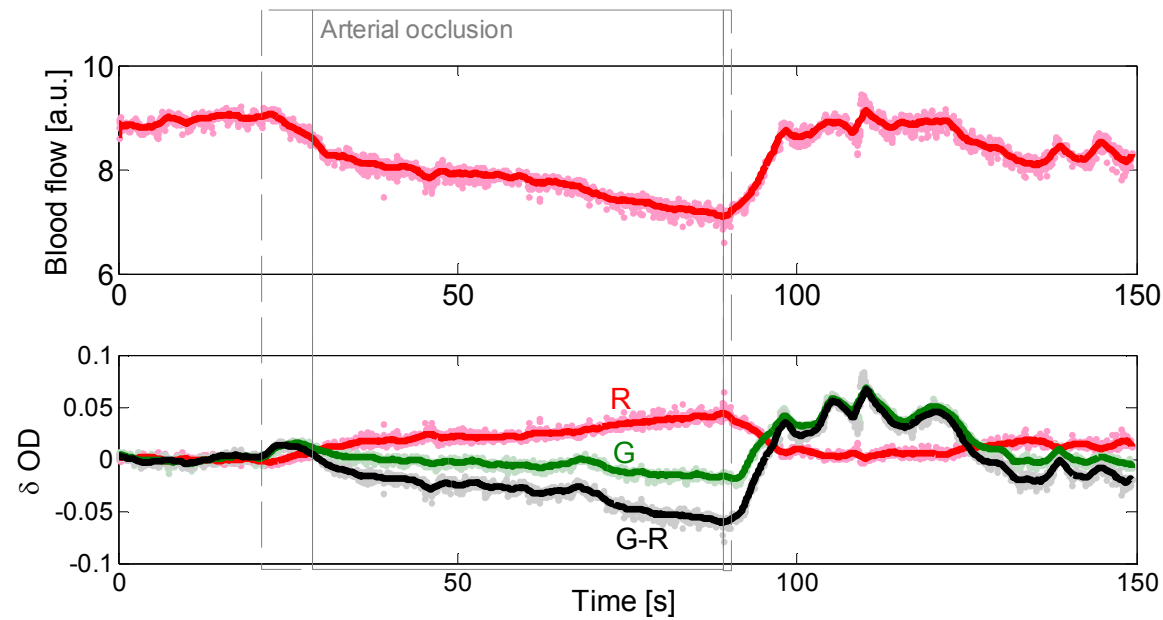
Arterial occlusion test

532 nm laser illumination



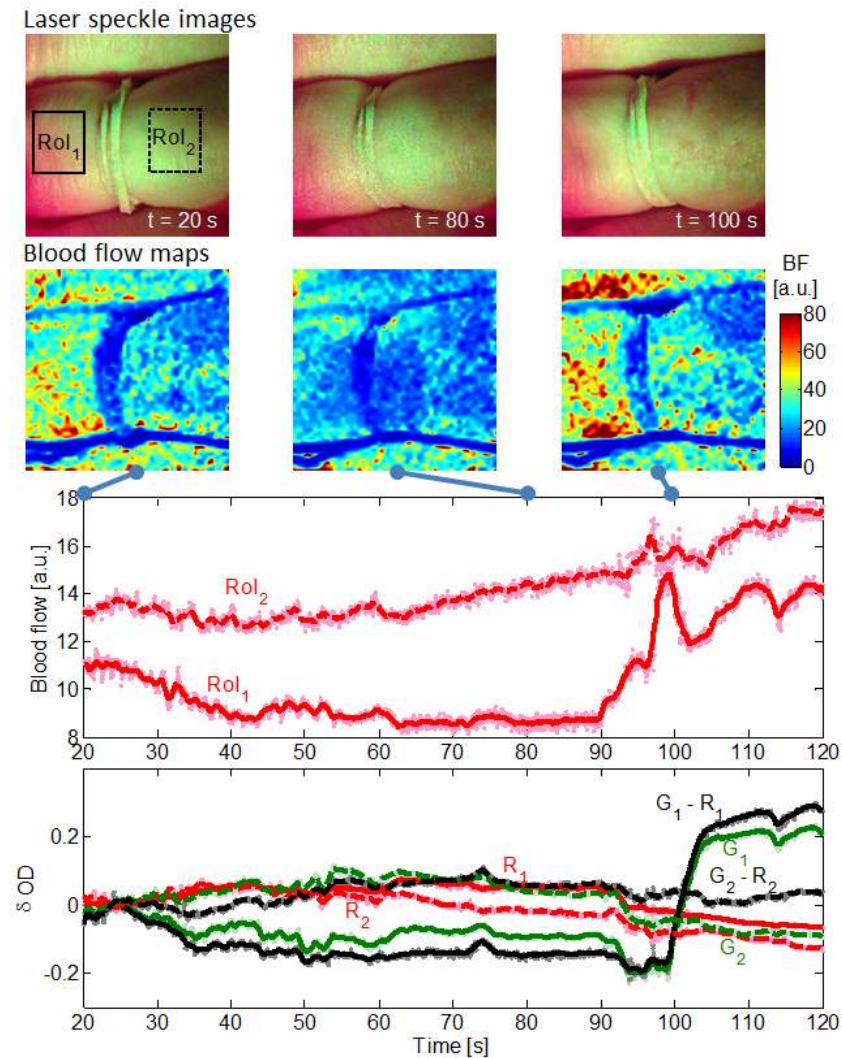
Arterial occlusion test

Dual (650 and 532 nm) laser illumination

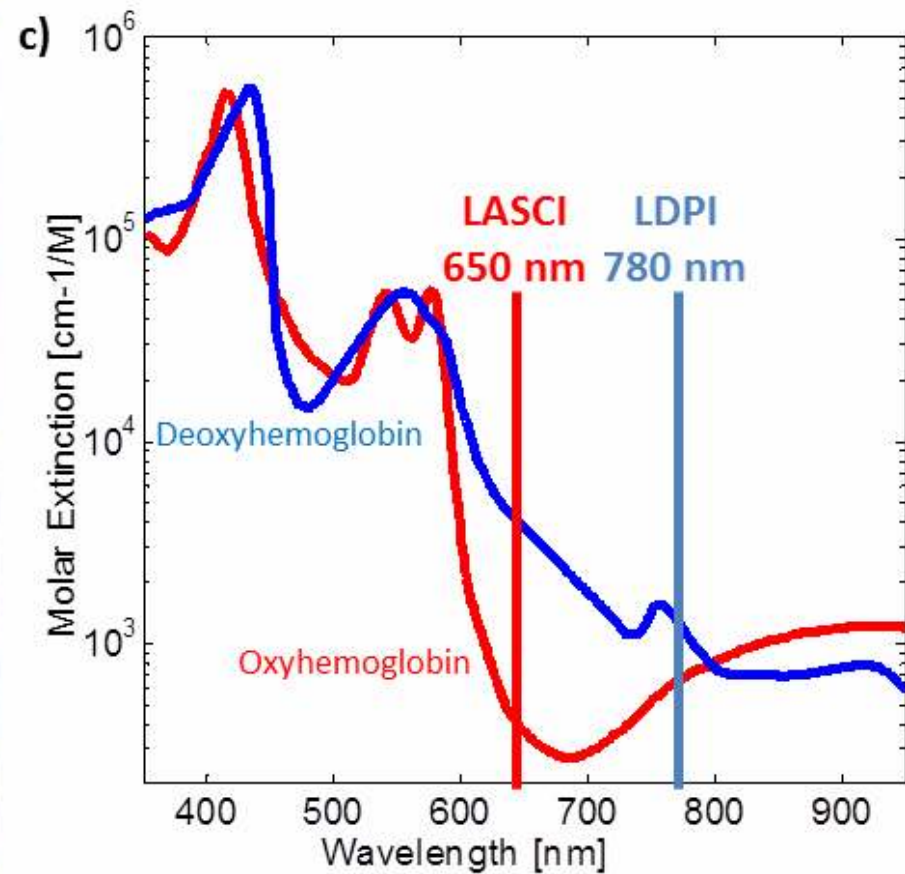
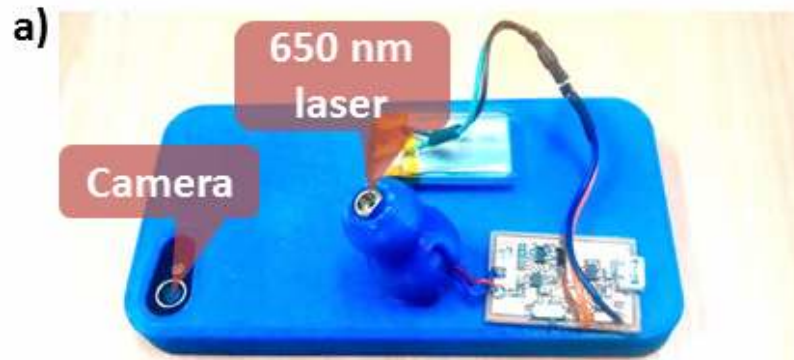


Finger occlusion

Dual (650 and 532 nm) laser illumination

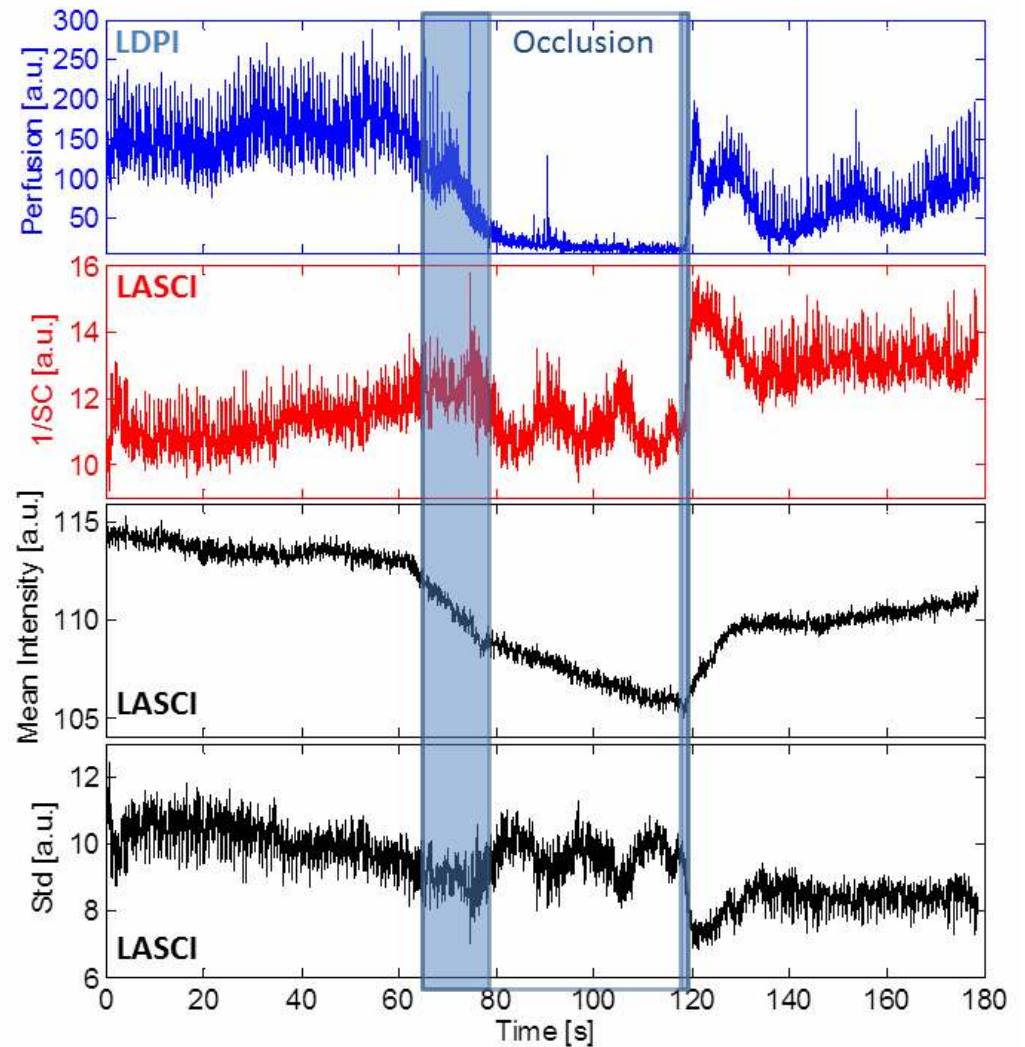
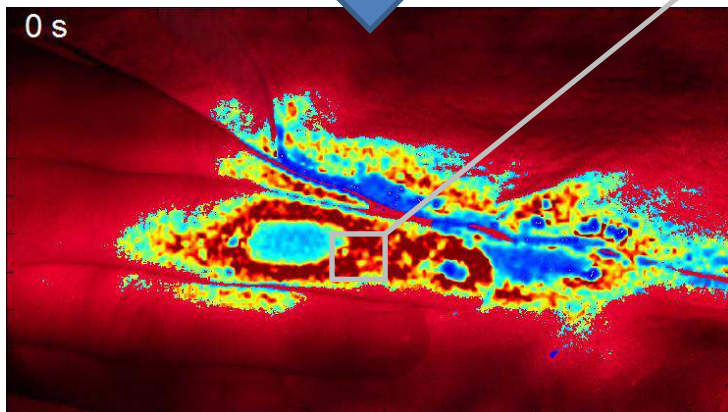


LASCI connection kit for mobile phone



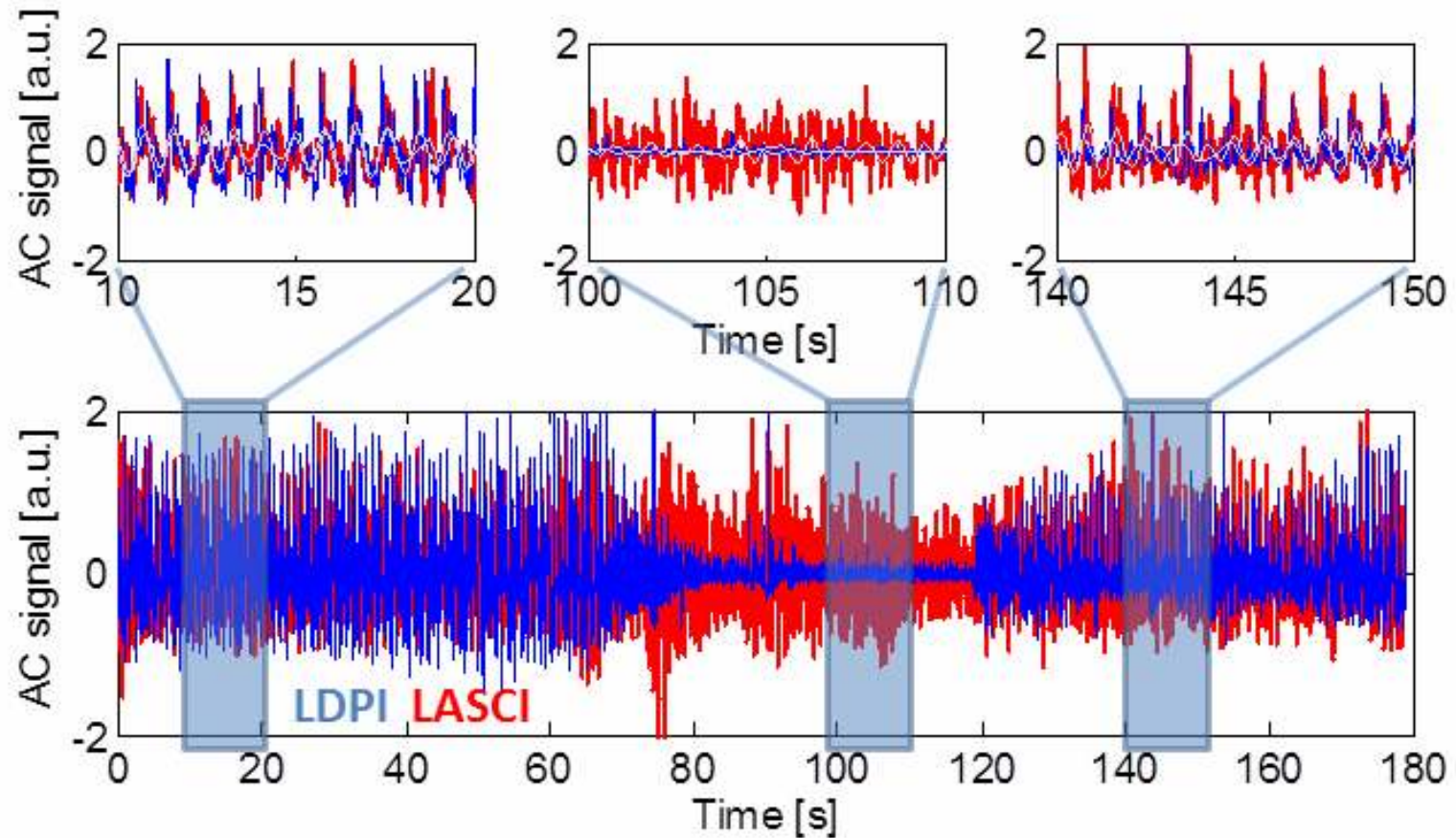
Arterial occlusion test

180...200 mmHg



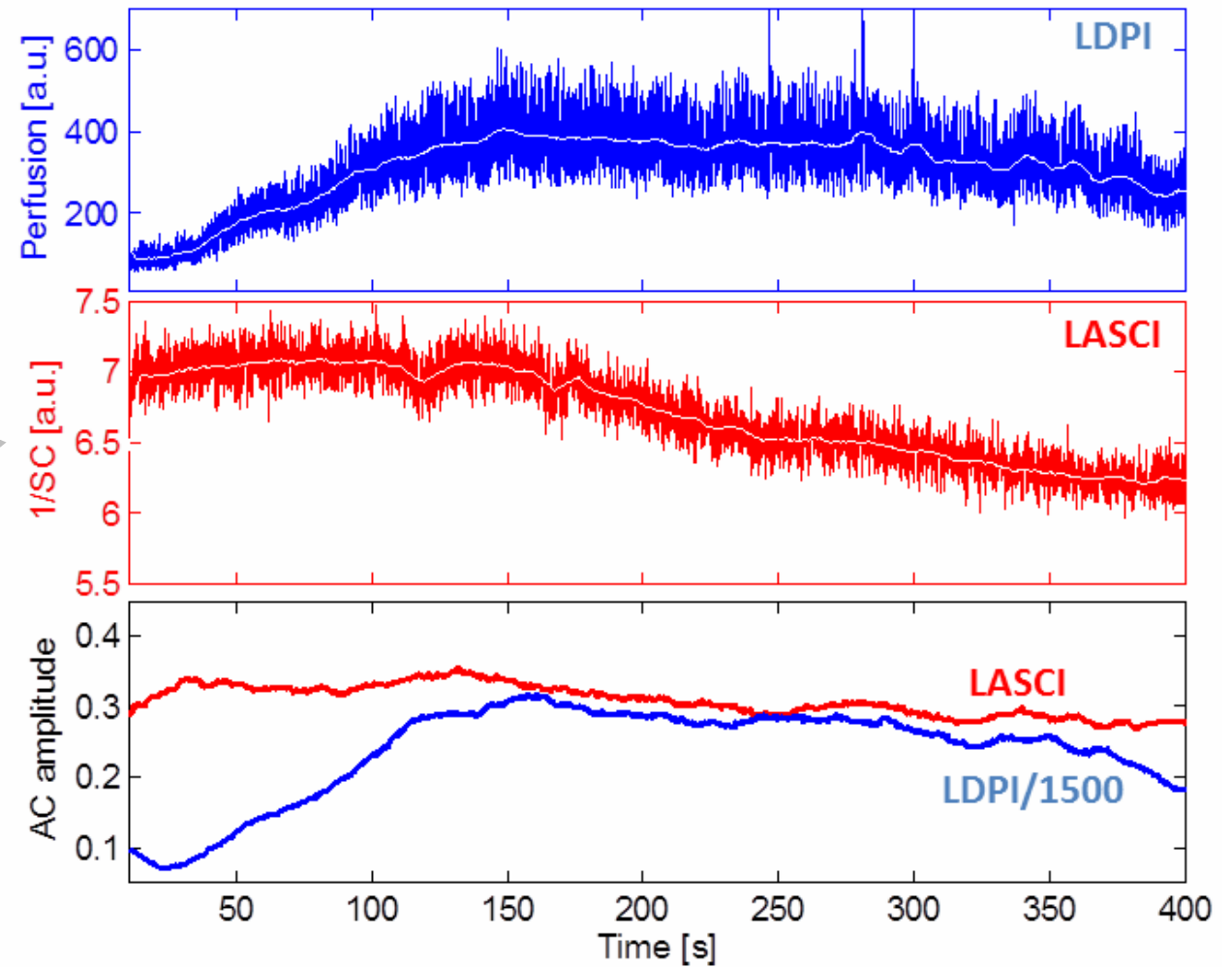
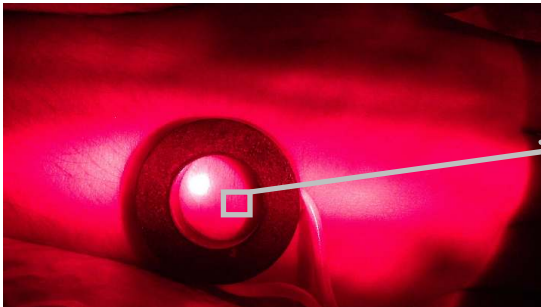
Arterial occlusion test

180...200 mmHg



Heat test

44°C



Conclusions



- ✓ Simple dual (650 and 532 nm) wavelength LASCA device based on mobile phone camera was build and tested by arterial occlusion showing its potential for primary fast monitoring and mapping of skin blood flow and implementation as connection kit for smartphone.
- ✓ Blood flow values can be calculated from intensity signal in red (R) channel where 650 nm laser is detected. Green (G) channel can be used to provide more information about hemoglobin content. ΔOD signal in R channel corresponds well with deoxyhemoglobin concentration changes, but ΔOD difference between G and R channels represents oxyhemoglobin changes.
- ✓ Comparison measurements of mobile phone based LASCI and commercially available LDPI showed that LASCI device could provide satisfactory results in case of arterial occlusion and can be used for further extraction of PORH parameters. But heat test demonstrated difference between both techniques - LASCI could be characterized as superficial, but LDPI has deeper sampling depth.
- ✓ LASCI device could be used for observation and analysis of alternating signal component of blood flow that is related to heart rate.

Publicity



- ✓ Dainis Jakovels, Inga Saknite, Janis Spigulis “Implementation of laser speckle contrast analysis as connection kit for mobile phone for assessment of skin blood flow”, **SPIE Photonics Europe 2014**, 14 - 17 April 2014, Brussels, Belgium, Proc. of SPIE 9129, 91293I (2014).
- ✓ Dainis Jakovels, Inga Saknite, Gita Krievina, Janis Zaharans, Janis Spigulis “Mobile phone based laser speckle contrast imager for assessment of skin blood flow”. **Eighth International Conference on Advanced Optical Materials and Devices (AOMD-8)** 25-27 August 2014, Riga, Latvia, Proc. of SPIE 9421, 94210J (2014).

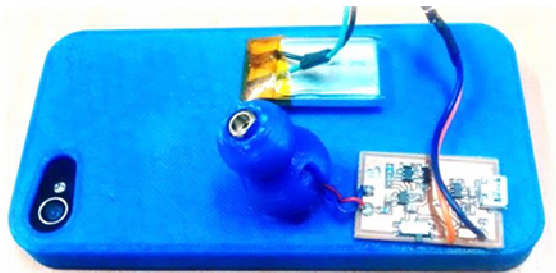
Acknowledgements



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



This study was supported by the European Social Fund project
“Innovative biomedical image acquisition and processing technologies”,
grant #2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014.



Dainis Jakovels

dainis.jakovels@lu.lv

Application of fluorescence spectroscopy and multispectral imaging for non-invasive estimation of GFP transfection efficiency

Mindaugas Tamošiūnas, Saulius Šatkauskas

*Biophysical research group, Faculty of Natural Sciences,
Vytautas Magnus University, Vileikos 8, Kaunas, LT-44404,
Lithuania*



VYTAUTO DIDŽIOJO
UNIVERSITETAS
MCMXXII

Dainis Jakovels, Inga Saknīte, Aleksejs Ļihačovs

*Institute of Atomic Physics and Spectroscopy, University of
Latvia, 19 Rainis Blvd. Riga, LV-1586, Latvia*



ATOMFIZIKAS UN SPEKTROSKOPIJAS INSTITŪTS

Roberts Kadiķis

*Institute of Electronics and Computer Science, 14 Dzerbenes St.,
LV-1006, Riga, Latvia*



Elektronikas un datorzinātņu institūts

Transfection = Introduction of DNA into mammalian cells

Gene is transcribed and translated into protein = “expressed”

Gene vectors can be viral

Infection: use recombinant viruses to deliver DNA

Retroviruses, adenoviruses

or non-viral

Electroporation – electric field temporarily disrupts cell plasma membrane barrier.

Sonoporation – direct propelling of DNA mediated by ultrasound

induced microbubble cavitation.

Carrier-mediated introduction of the DNA - positively charged carrier molecules (e.g. **liposomes, micelles**) are mixed with the DNA

Biolistics (gene gun) - fire DNA coated particles into cell

Gene therapy applications

- Curing genetic diseases
- Correcting cancer genes
- Inducing cancerous cells to make toxins so they kill themselves
- Blocking viral genes (e.g. HIV)
- Creating stem cells from somatic cells

Viral vectors

Advantages

long-term expression
low toxicity
high capacity
low antivector immunity
(allowing repeat administration)

Problems

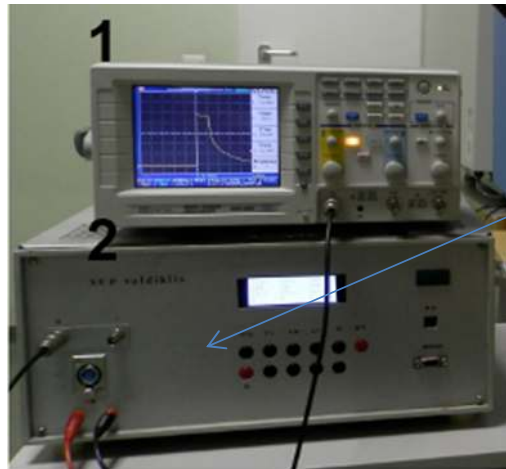
Lack of cell specificity.
Strong immune response
Do not insert into genome
Resulting in normal gene function alteration

Non-viral vectors

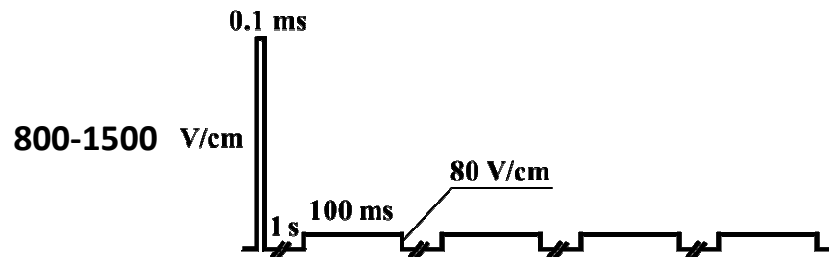
non-toxic
no immune response

need to improve the delivery efficiency.

Electroporation setup



High voltage generator

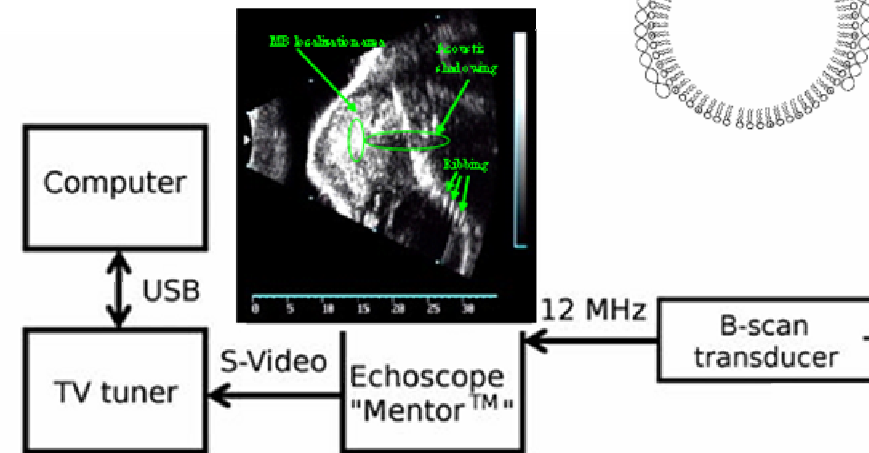
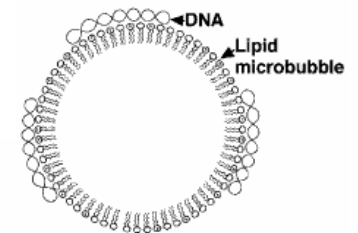


Sonoporation setup



Ultrasound generator

US diagnostic setup (B-Scan)



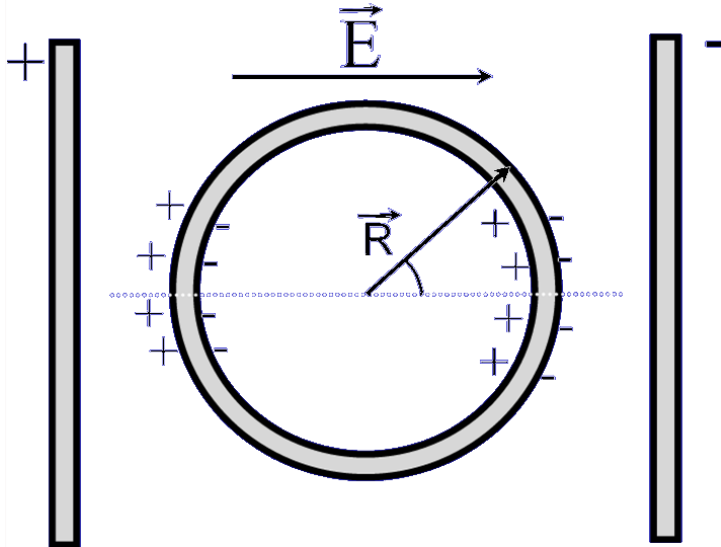
Electroporation and sonoporation protocols adapted from :

1. Šatkauskas et al. Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. Mol Ther;5:133–40 (2002).
2. Tamošiūnas et al. Microbubble sonodestruction rate as a metric to evaluate sonoporation efficiency, Journal of Ultrasound in Medicine, 31(12), 1993-2000 (2012).

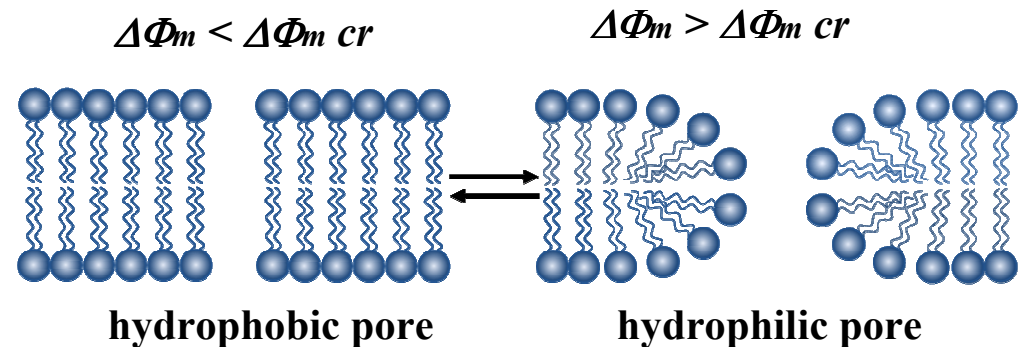
Electroporation: basic principles

When cell is subjected to external electric field E , transmembrane potential $\Delta\Phi_m$ is induced. $\Delta\Phi_m$ is basically dependent on cell radius R and strength of electric field E .

$$\Delta\Phi_m = 1.5 ER \cos\alpha$$

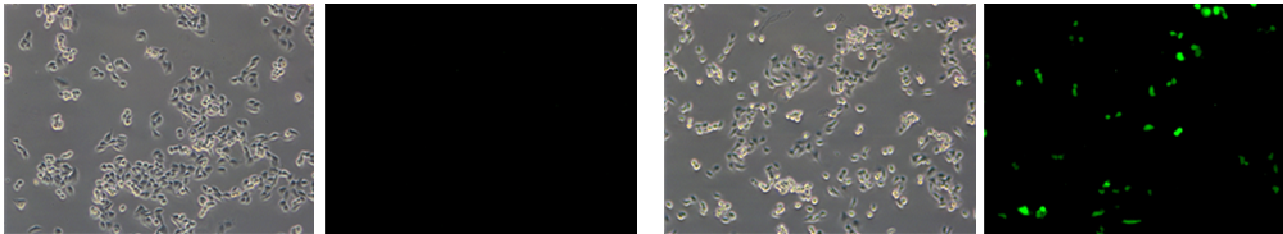
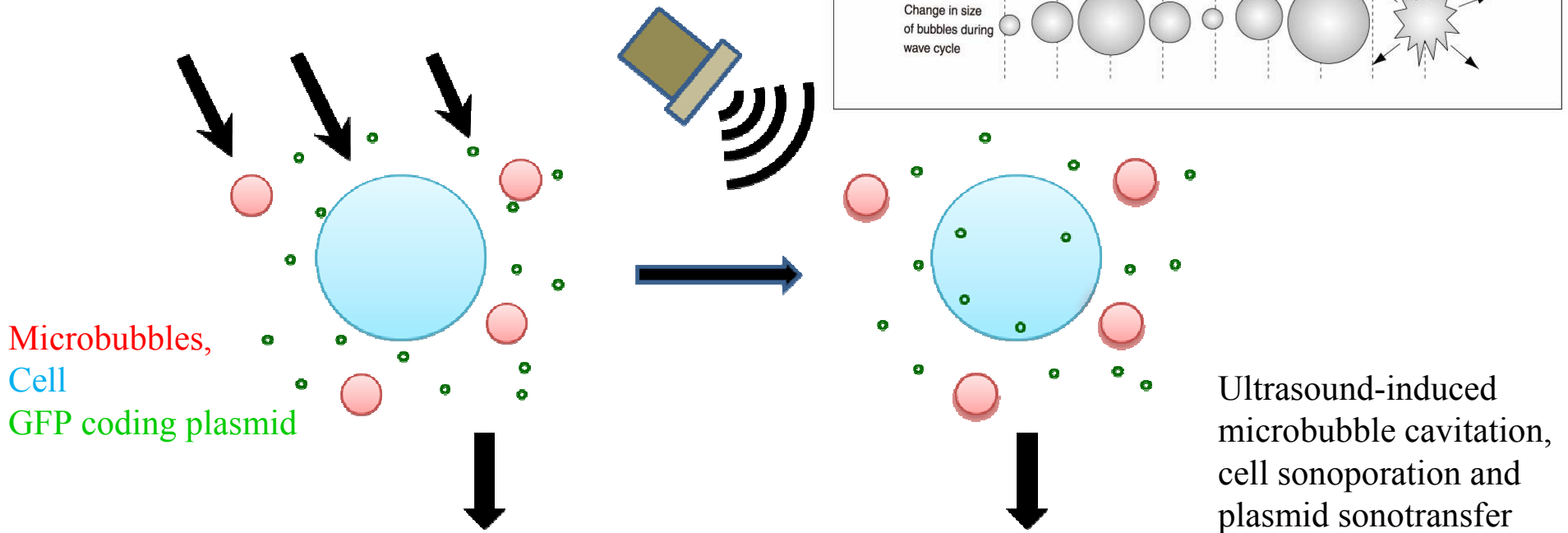
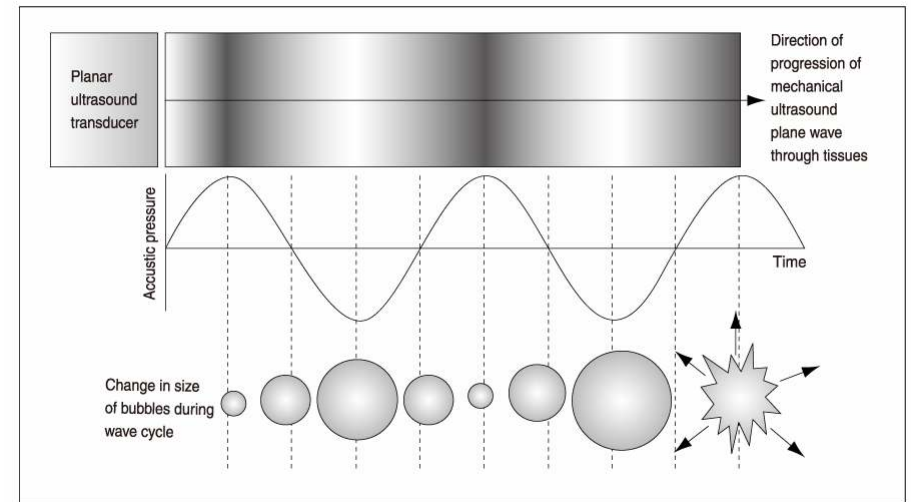


When induced transmembrane potential exceeds critical value $\Delta\Phi_{m_cr}$, which is between 0.4–1.2 V, permeability of the membrane drastically increases, formation of hydrophilic pores is induced.



Sonoporation: basics

(*sono-* means ultrasound)



The CHO cell suspension was supplemented with microbubbles and exposed to US, operating at the frequency of 880 kHz, with a 100% duty cycle and with an output peak negative pressure at 500kPa for 30s.

The objective:

to apply non-invasive optical diagnostic methods for the evaluation of GFP transfection efficiency in vivo, facilitating the transfer with various combinations of high voltage (HV) and low voltage (LV) electric pulses, ultrasound (sonoporation) and electrosonoporation.

To reach these goals following tasks have been raised:

- i) to detect the fluorescence intensity from the surface of the skin;
- ii) to estimate a correlation of the detected fluorescence intensity to the actual fluorescence intensity on the surface muscle;
- iii) to determine the particular parameters allowing to compare the efficiency of GFP transfection for different experimental conditions;
- iv) according to those parameters, to compare the efficiency of GFP transfer after electroporation and after sonoporation.

Experiment design

Mice of C57BL line (female and male, with a body weight of 16-23 g., age 6-36 weeks) were used as the experimental animals.

4 - 6 mice per group;

GFP plasmid inoculated into TA muscle (both legs)



GFP plasmid injection:

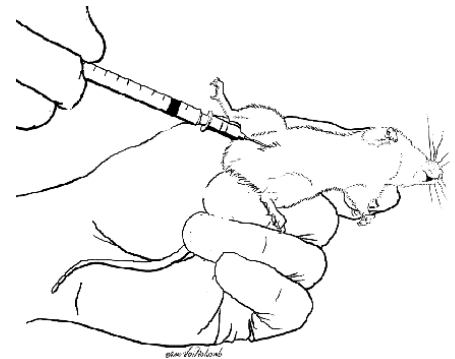
Initial GFP plasmid concentration: 1 mg/ml;

(10 μ g diluted in 10 μ l 0.9% NaCl)

Diluted 5 times before injection as 40 μ l of 0.9% NaCl

or 40 μ l Sonovue microbubbles were added .

GFP plasmid was inoculated approximately 5 minutes before electroporation or sonoporation.

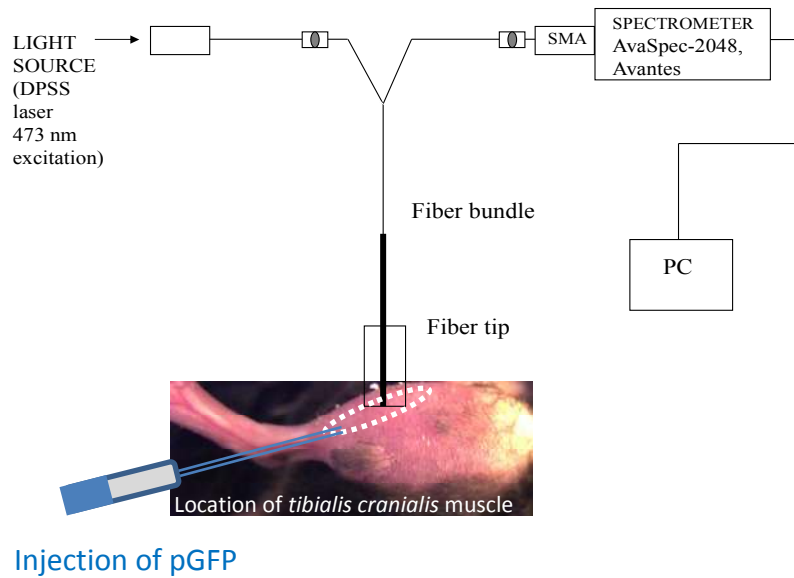


Experimental protocol

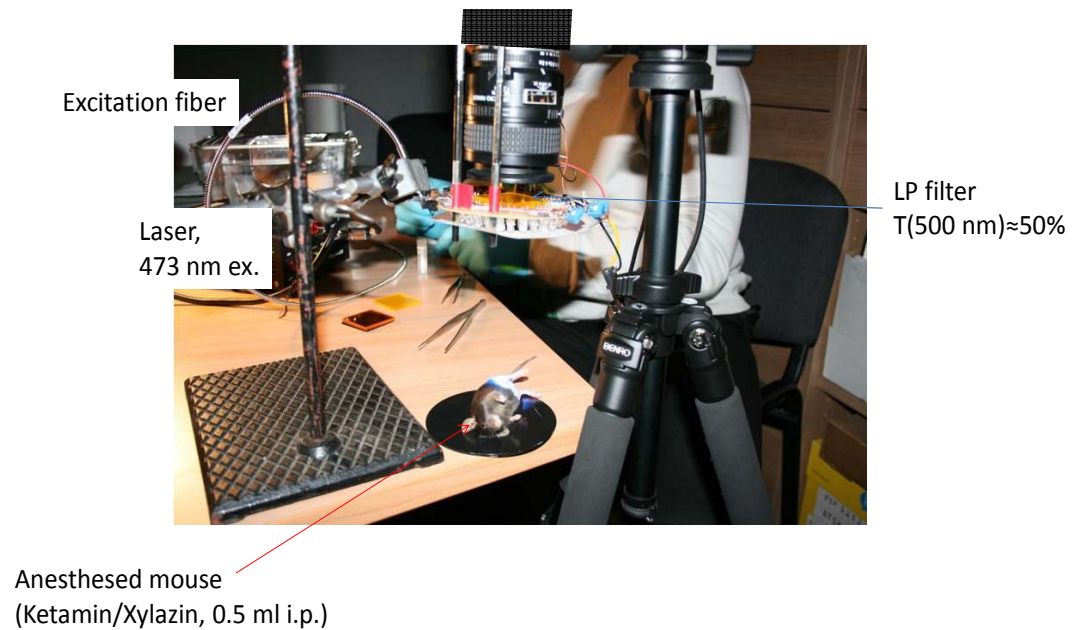
- 1st gr. Control mice (GFP);
- 2nd gr. GFP +EP (1 HV: 800 V/cm; 100 μ s);
- 3rd gr. GFP+ EP (1HV)+EP(4LV: 80 V/cm; 100 ms);
- 4th gr. GFP+ EP (4LV);
- 5th gr. GFP + SP (2W/cm²; 20% DC; 5 min);
- 6th gr. GFP+SP (2W/cm²; 100% DC; 5 min);
- 7th gr. GFP+ SP (100% DC)+EP(1HV);
- 8th gr. GFP + EP(1HV) + SP (100% DC);

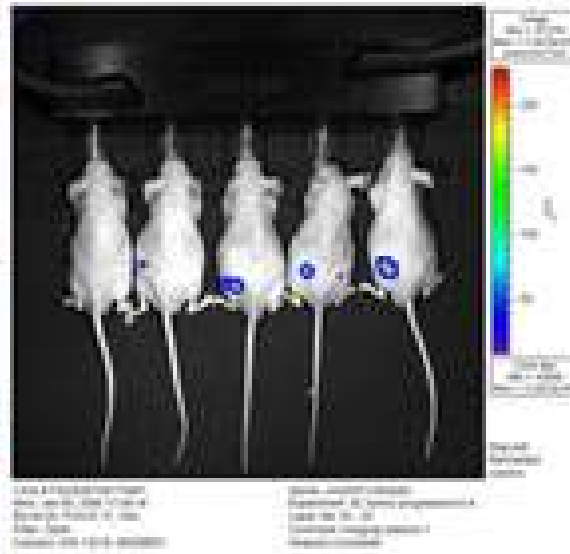
Diagnostic setup

Fluorescence point measurements



Multispectral imaging

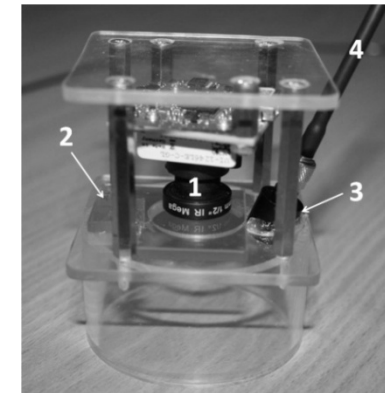
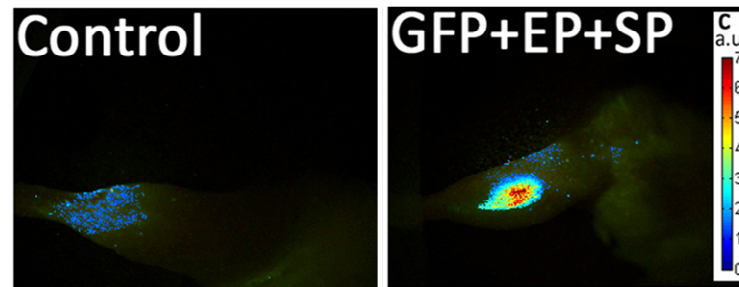
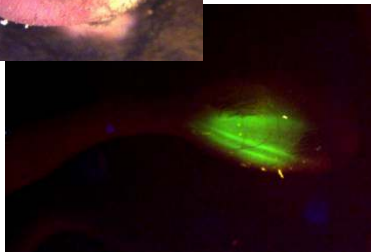




Up to date, the commercial live mouse imaging systems are more expensive and sophisticated:

The CSB Xenogen IVIS Imaging System 100 consists of a back-illuminated CCD camera with a closed-cycle refrigeration system, a camera controller, and a light-tight box for bioluminescence imaging. The field of view can be adjusted from 10-25 cm to allow for imaging of two to five mice at a time on a heated platform.

reducing costs for imaging apparatus?

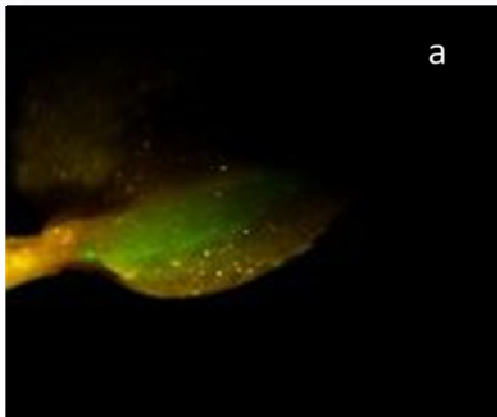


IDS UI 1241LE-C-HQ

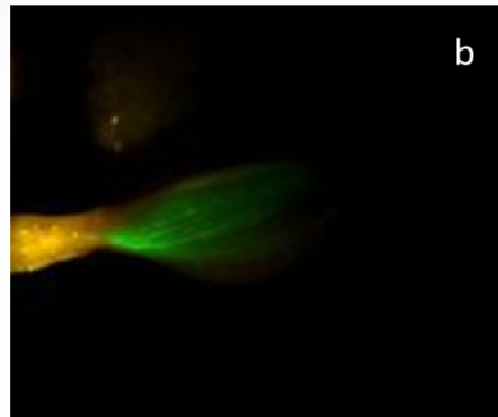
D. Jakovels, A. Lihachev, J. Spigulis, S. Šatkauskas, M. Tamošiūnas, C. W. Lo, W. S. Chen. Assessment of efficiencies of electroporation and sonoporation methods by fluorescence RGB imaging method// in Biophotonics—Riga 2013, edited by Janis Spigulis, Ilona Kuzmina, Proceedings of SPIE Vol. 9032 (SPIE, Bellingham, WA, 2013) 9032-4.

Results: muscle model

Skin covers the GFP
transfected TA muscle

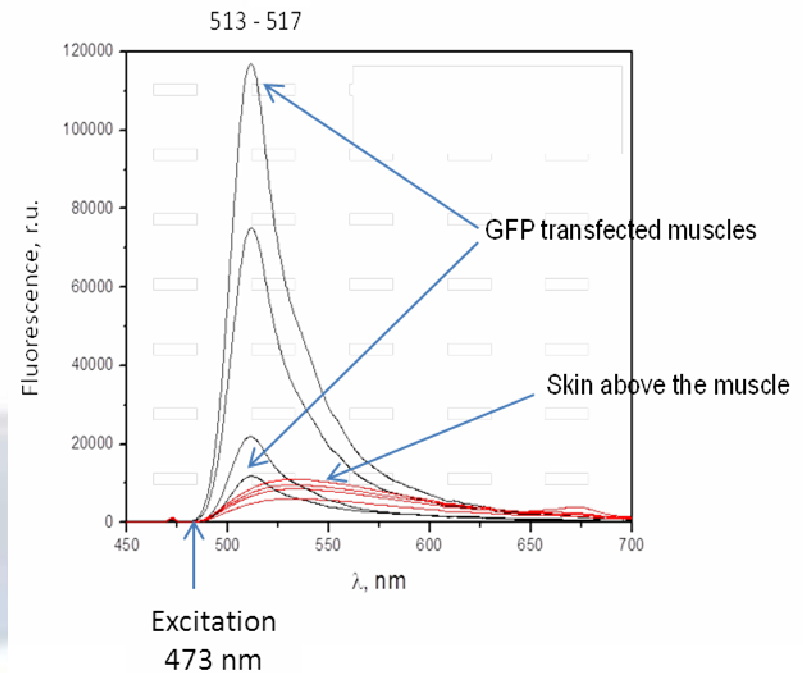
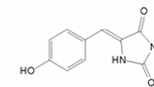


Fluorescence of the
TA muscle surface
(the skin is removed)



GFP chromophore

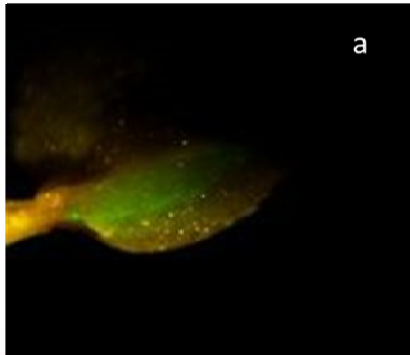
5-(4-hydroxybenzylidene)-2,4-imidazolidinedione



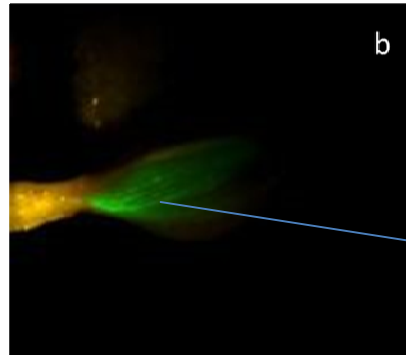
Results: fluorescence spectra analysis

Correlation revealed from spectral data...

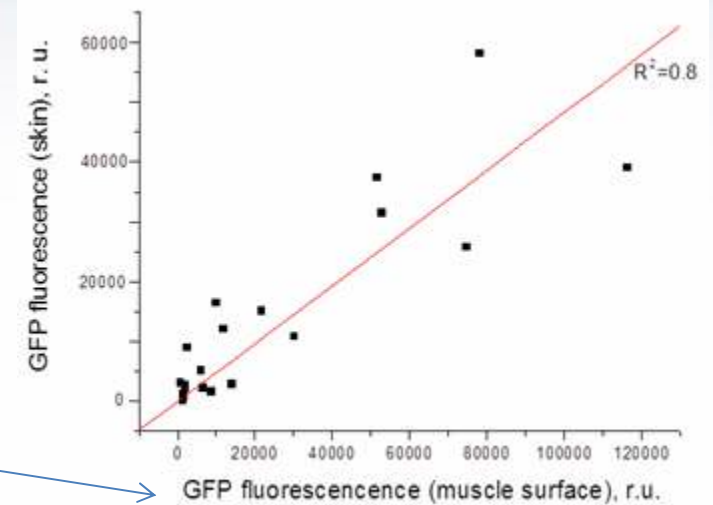
Skin covers the GFP transfected TA muscle



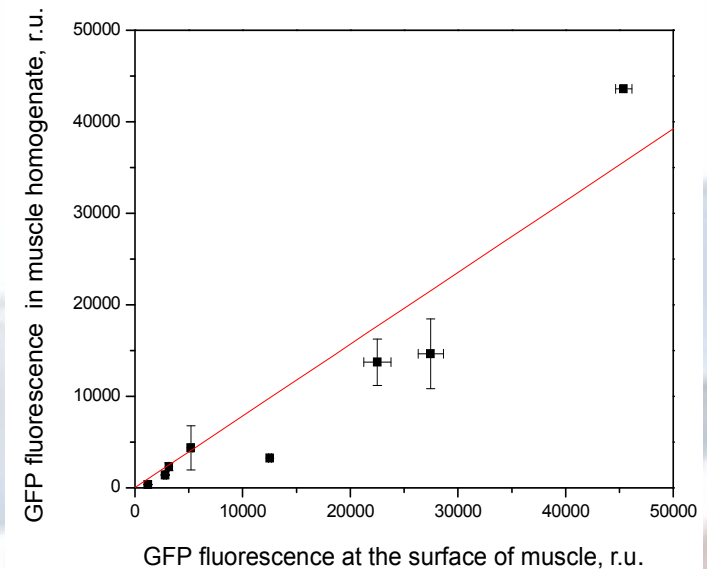
Fluorescence of the TA muscle surface (the skin is removed)



Comparison between GFP fluorescence intensity measured from the skin covering muscle and muscle surface



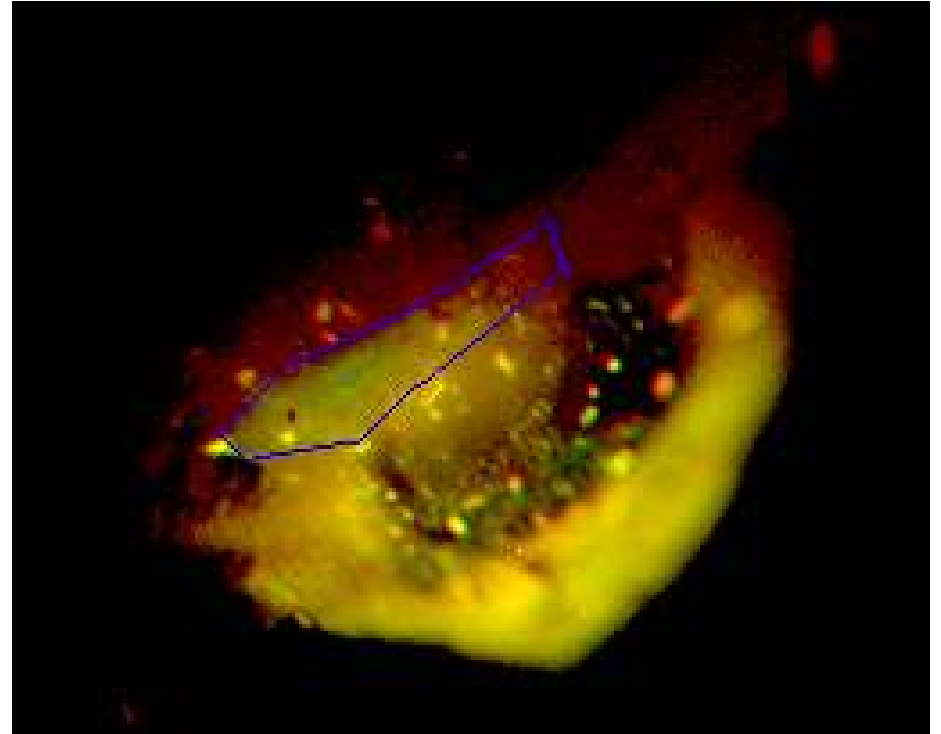
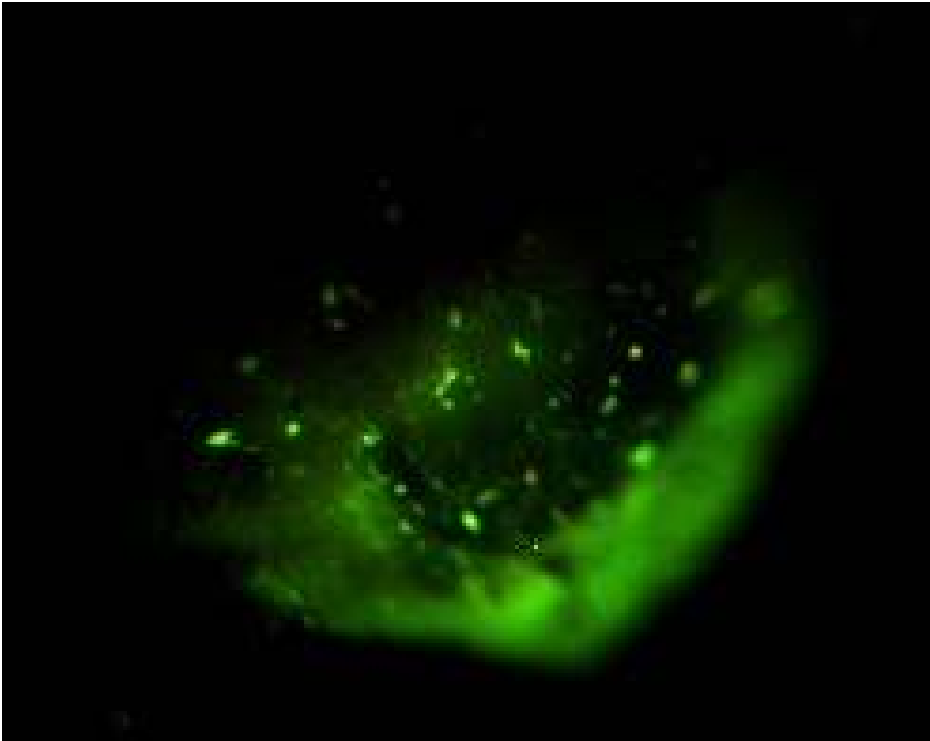
Comparison between GFP fluorescence intensity measured in TA muscle homogenate and TA muscle surface



Analysis of multispectral images in vivo

Raw RGB

GFP fluorescence (green)



The parameters acquired:

1) Muscle area

2) Muscle diameter

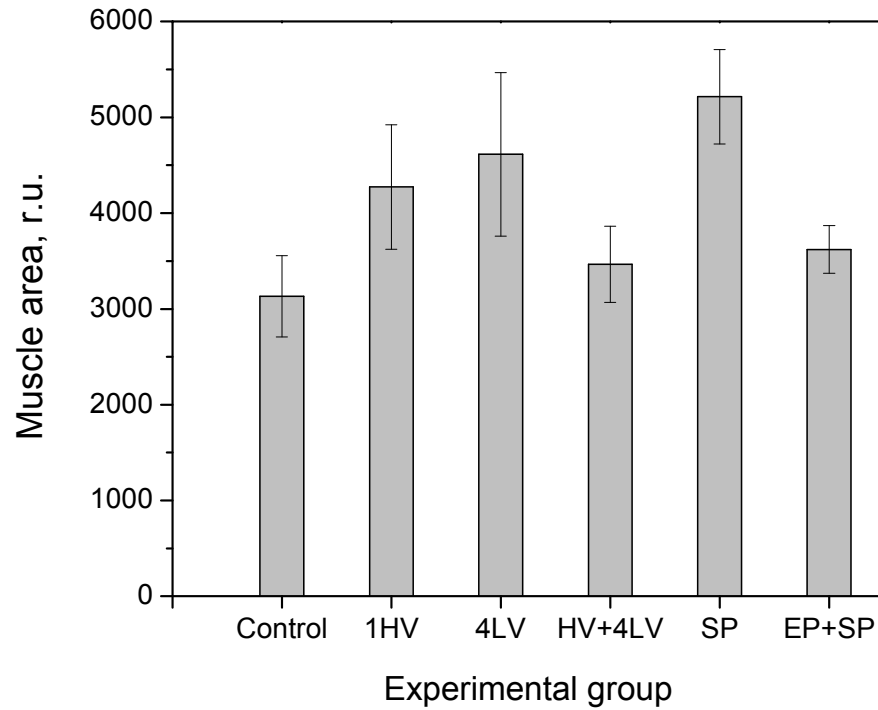
3) Area of GFP fluorescent region;

4) Mean intensity of fluorescent region in the 510 nm spectral band image;

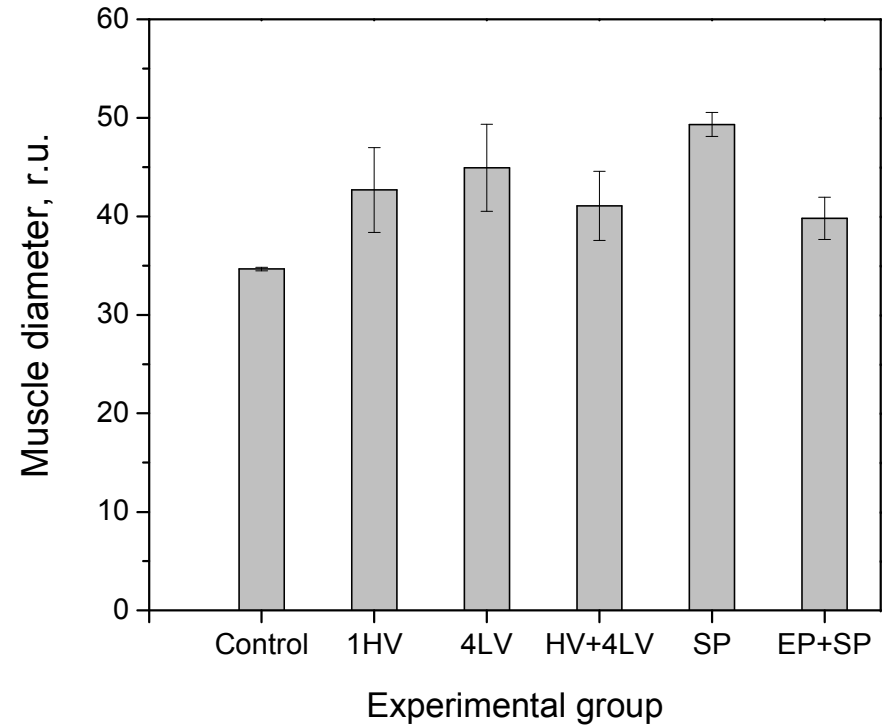
5) Sum intensity of fluorescent region in the 510 nm spectral band image;

Parameters derived from *in vivo* measurements:

1st parameter: muscle area

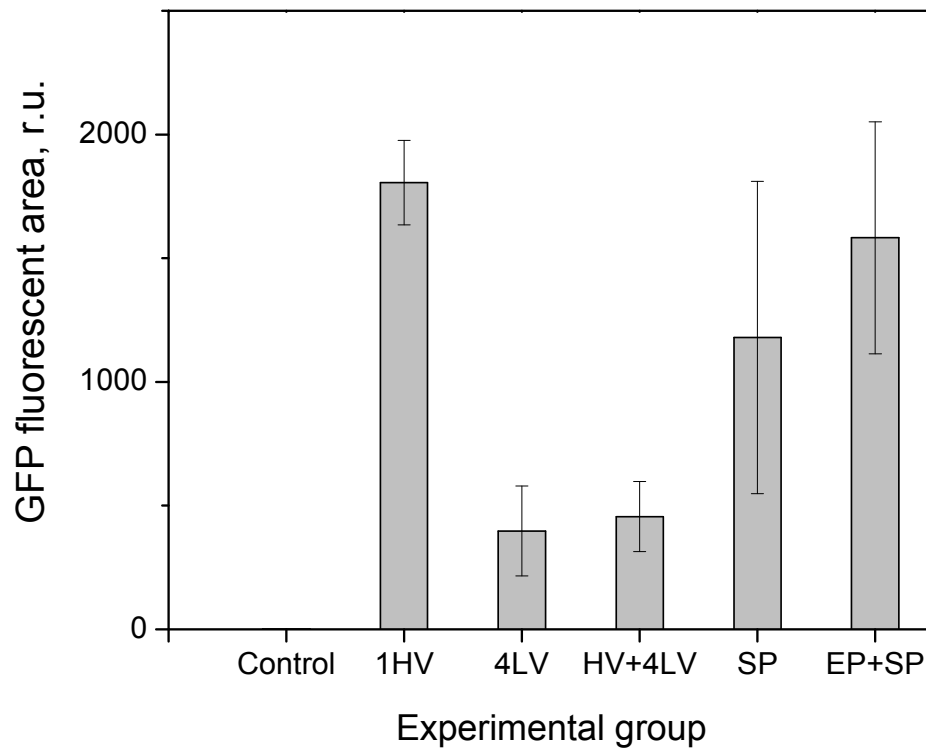


2nd parameter: muscle diameter



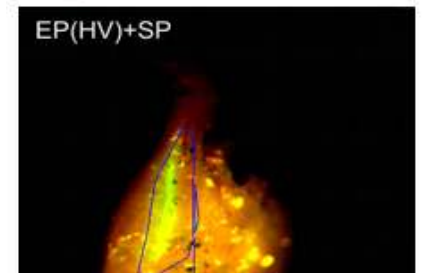
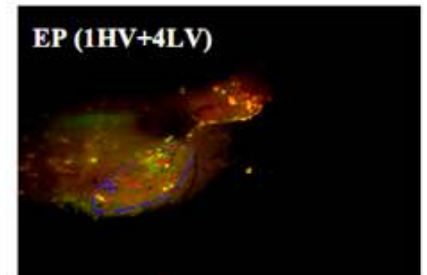
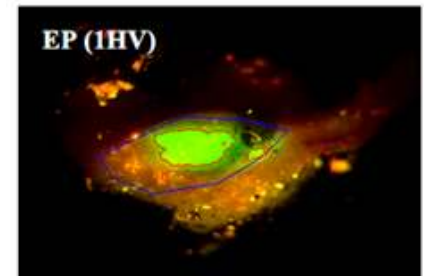
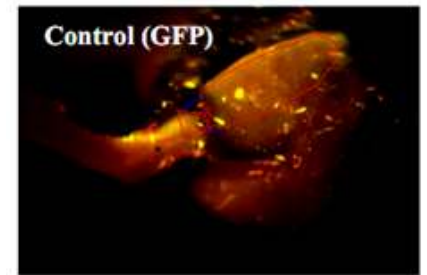
Parameters derived from *in vivo* measurements:

3rd parameter: GFP fluorescence area



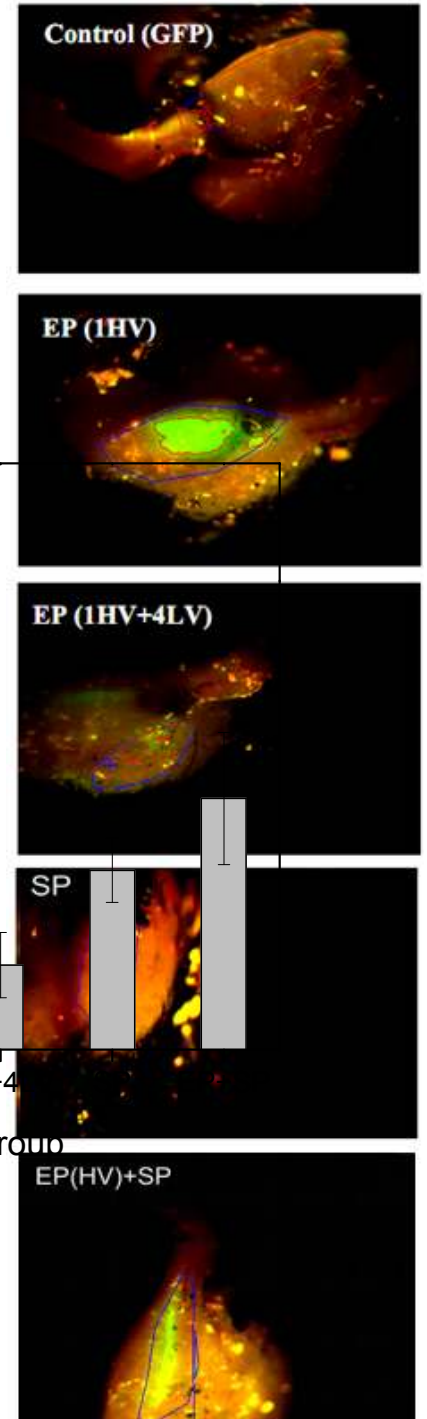
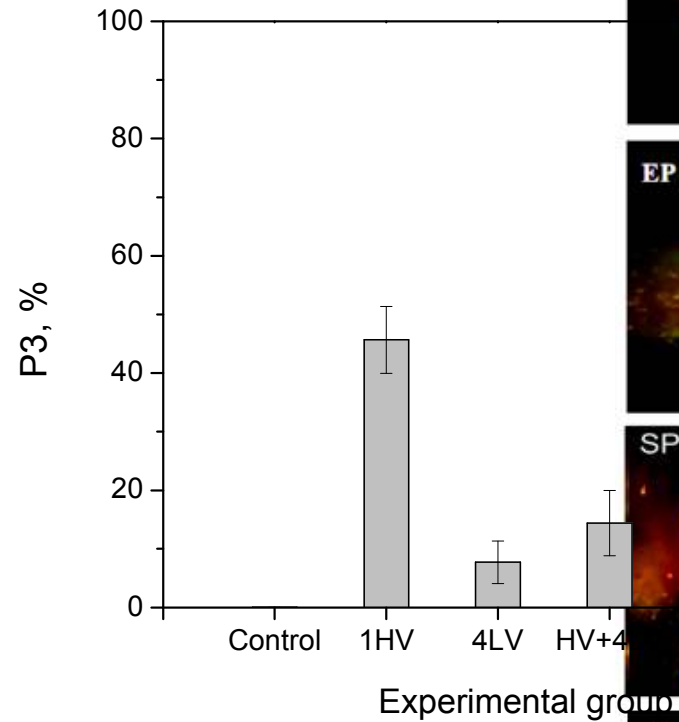
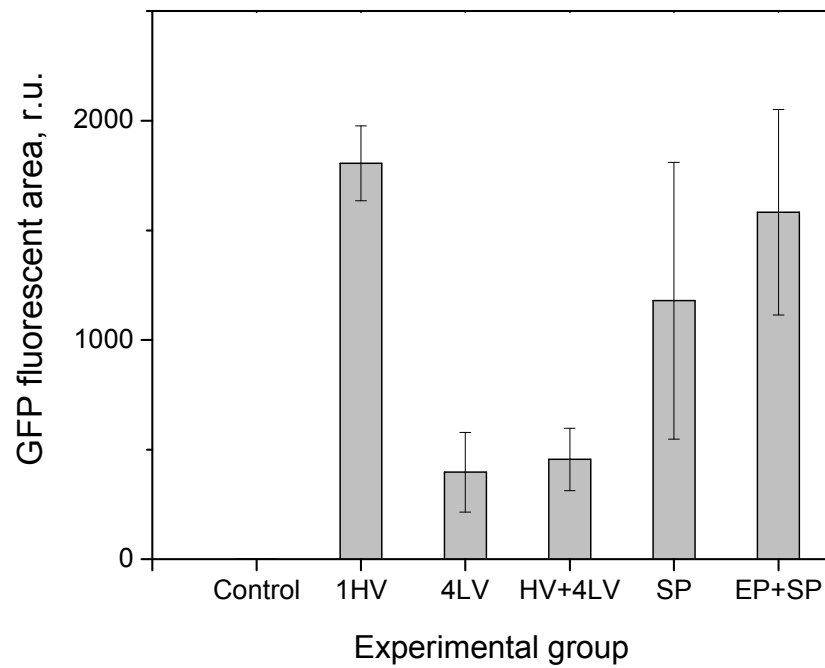
(3) and (4) parameters are similar with:

Tevz et al. Gene electrotransfer into murine skeletal muscle: a systematic analysis of parameters for long-term gene expression. TCRT 2008 Apr;7(2):91-101.



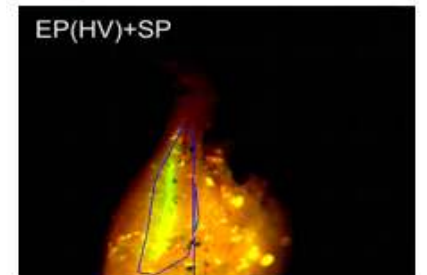
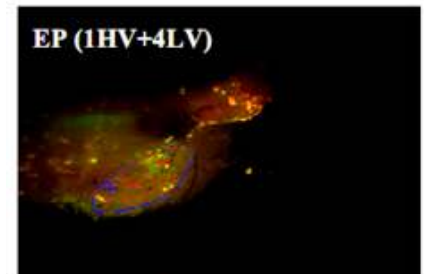
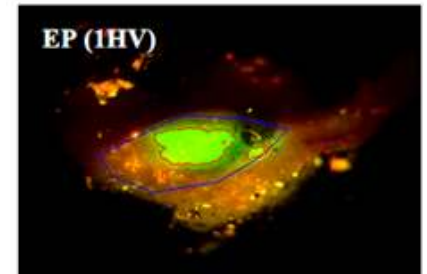
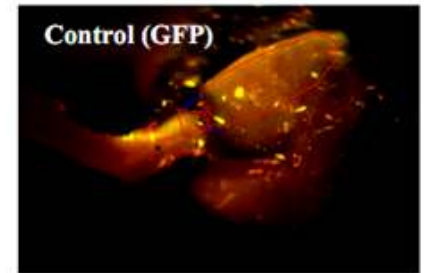
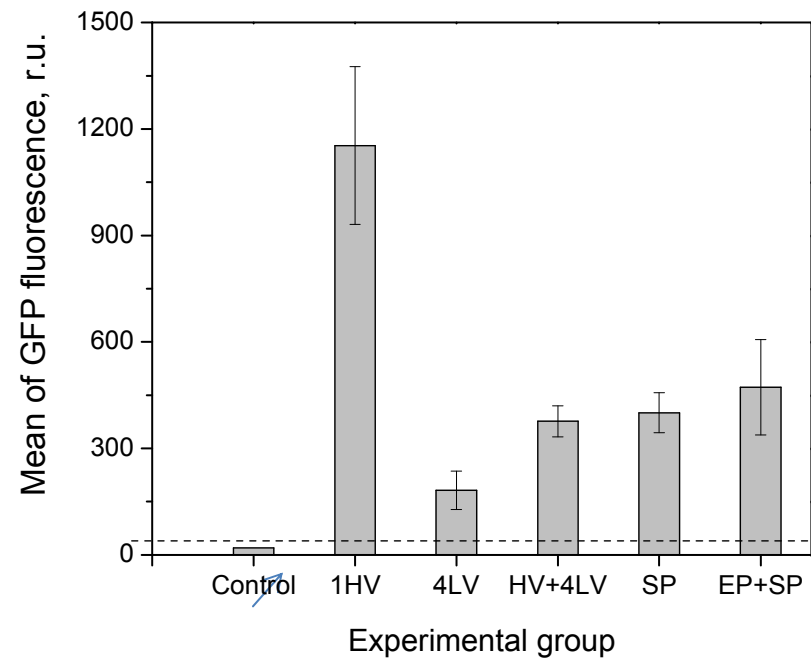
Parameters derived from *in vivo* measurements:

3rd parameter: GFP fluorescence area



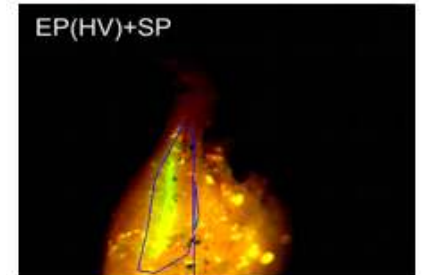
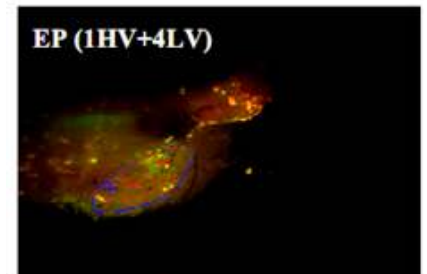
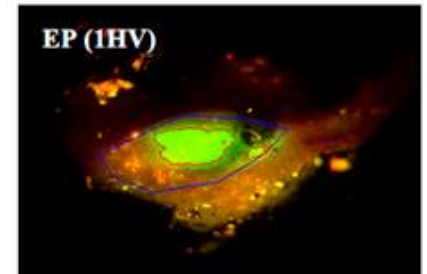
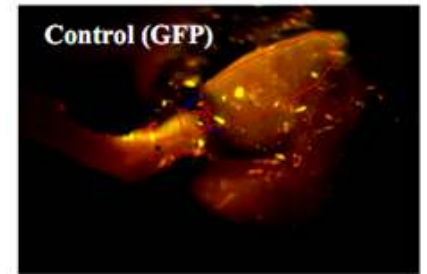
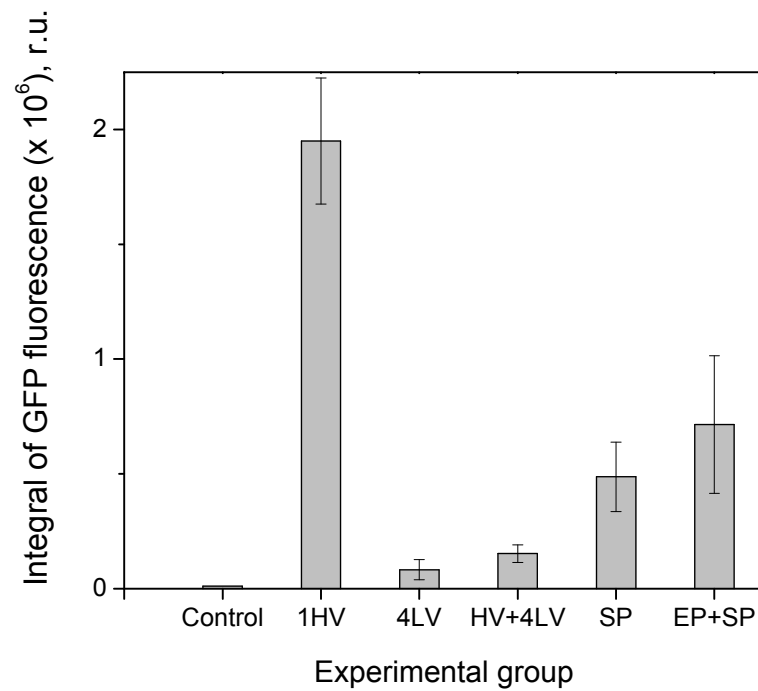
Parameters derived from *in vivo* measurements:

4th parameter: mean of GFP fluorescence



Parameters derived from *in vivo* measurements:

5th parameter: integral of GFP fluorescence



Multispectral imaging *in vivo* ↔ Multispectral imaging *ex vivo*

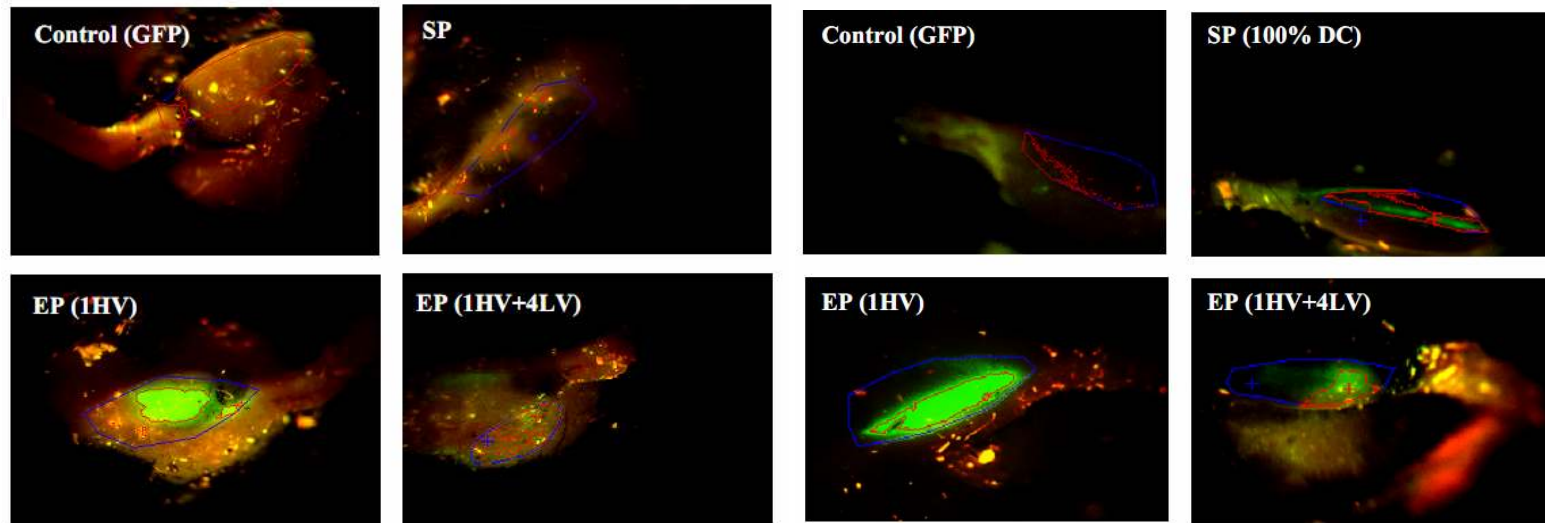
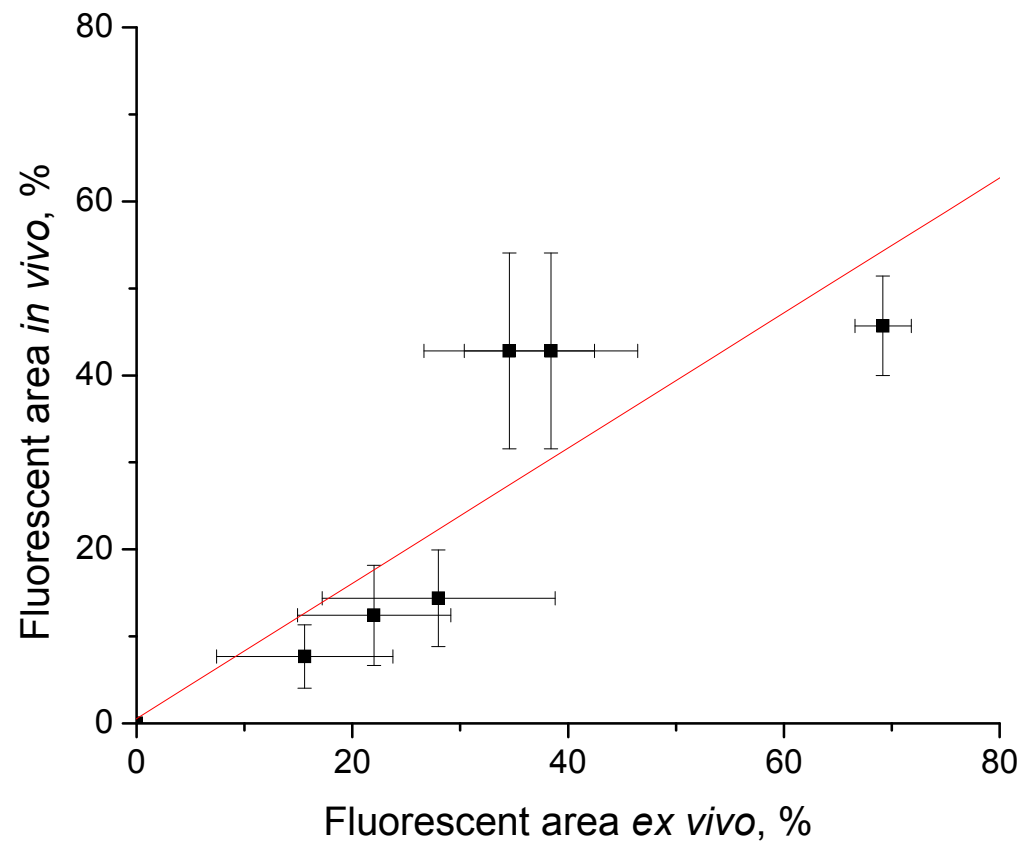


Table 1. Results of multispectral image analysis.

Parameter, r.u. Group	GFP fluorescent area of the muscle (%) (3 rd parameter)		Mean of GFP fluorescence, r.u. (4 th parameter)	
	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>
GFP	0	0	15	0
GFP+SP (20%)	0	< 1	0	0
GFP+SP (100%)	12 ±6	22 ±7	400 ±56	304±170
GFP+EP (4LV)	8 ± 4	16± 8	182 ±54	98 ±50
GFP+EP (1HV)	46 ± 6	69 ± 3	1046 ± 220	1192 ± 131
GFP+EP (1HV+4LV)	14 ± 6	28 ±10	376 ±44	360 ±149
GFP+EP(1HV)+SP(100%)	43 ±11	38 ±8	472 ±134	326 ±97

Multispectral imaging *in vivo* ↔ Multispectral imaging *ex vivo*

3rd parameter: GFP fluorescent area of the muscle (%)

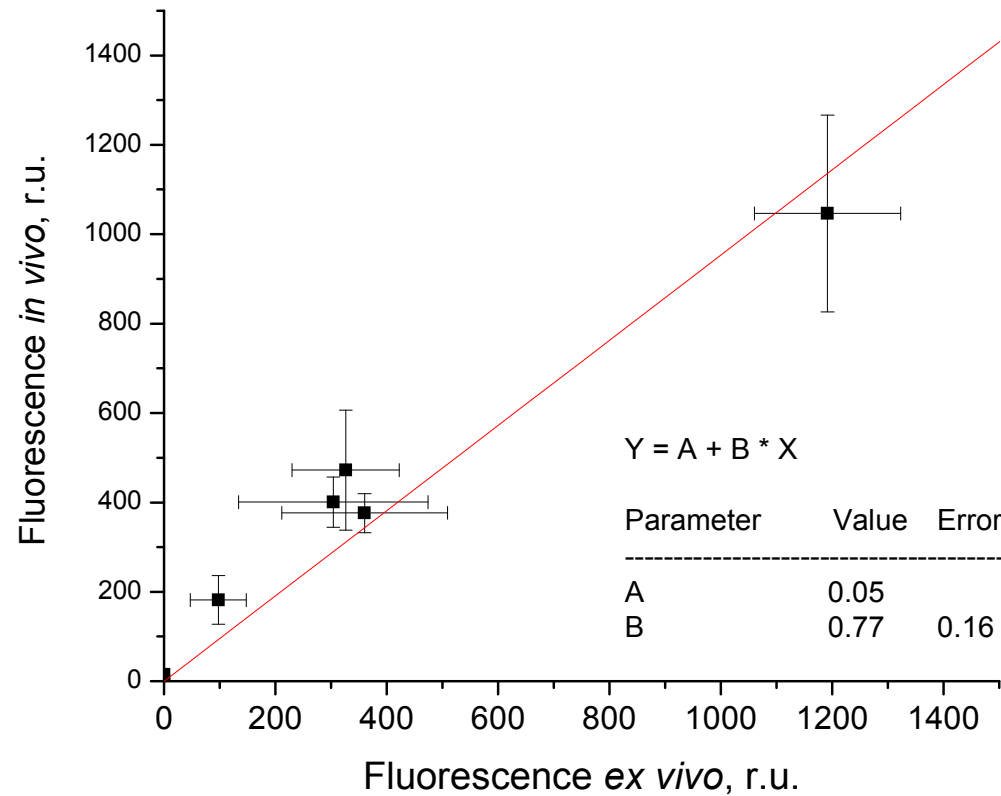


Multispectral imaging *in vivo*



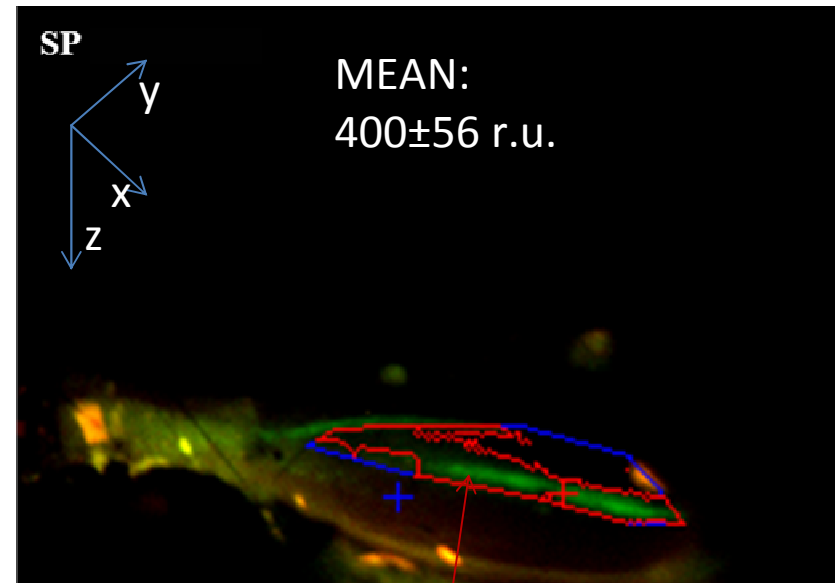
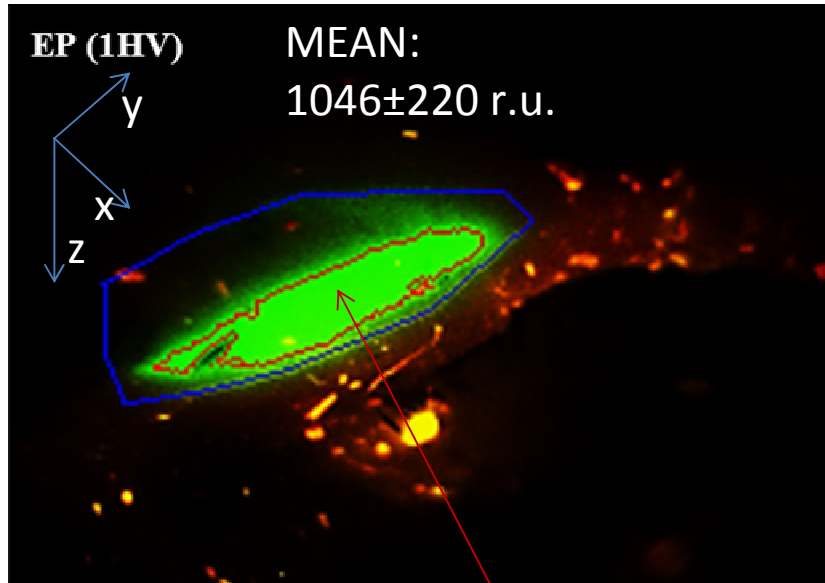
Multispectral imaging *ex vivo*

4th parameter: mean of GFP fluorescence

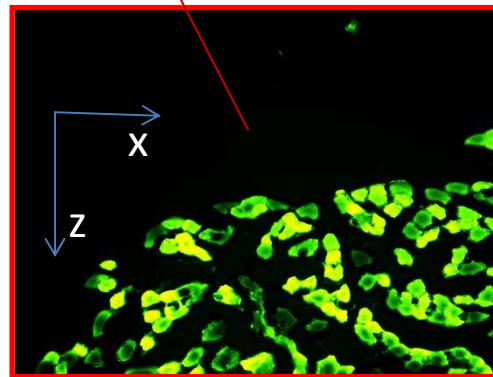


Type of transfection: **stable**

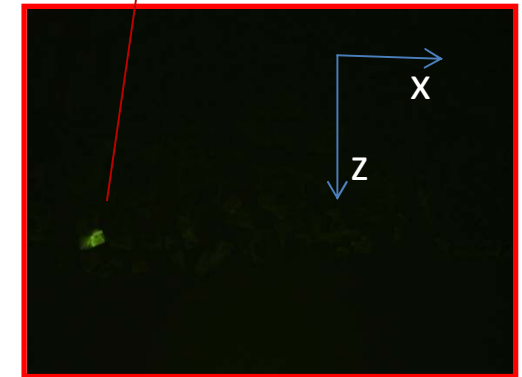
(Integration of the transfected DNA into the cell genome)



**Data from
hystological
sections**



[multiple fibers are left fluorescent]

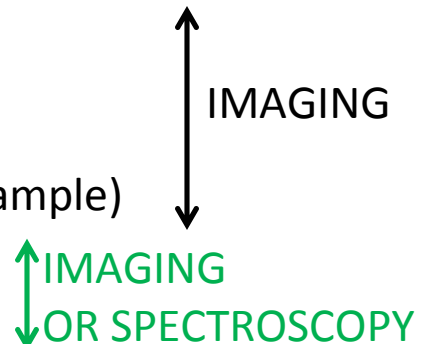


[only single fibers are left fluorescent]

From diagnostics point of view, would it be possible to correlate fluorescence for results 2D non-invasive measurements (spectroscopy, imaging) and 2D (muscle cross section)?

Experiment setup: Fluorescence microscopy of muscle histological sections

The parameters:

- 1 -
 - 2 Muscle cross- section area (→ muscle diameter)
 - 3 Percentage of GFP positive fibers
 3-1 Area of GFP positive fibers/ total area of muscle)
 3-2 Number of GFP positive fibers/total no of fibers in the sample)
 4. Mean fluorescence intensity of GFP;
 5. Integral fluorescence intensity of GFP.
- 

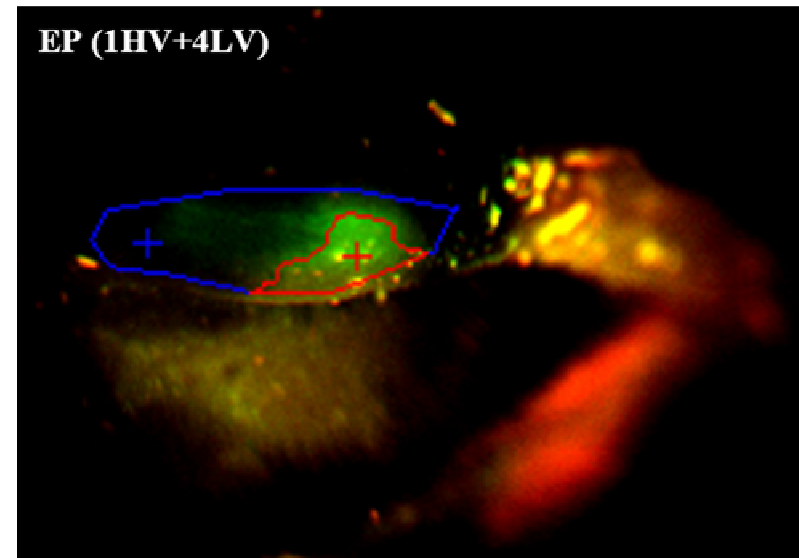
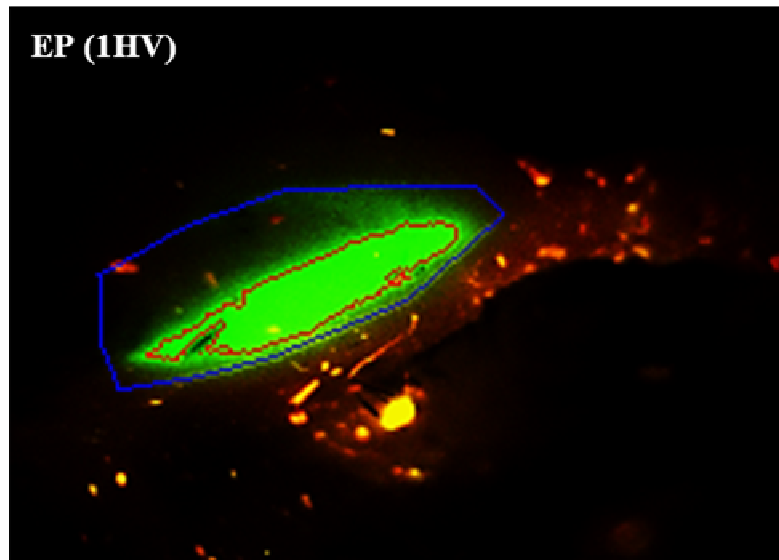
The parameters acquired *in vivo*:

- 1) Muscle area (manual selection)
 - 2) Muscle diameter
 (useful for calibration of 4th & 5th parameter – fluorescence intensity)
 - 3) Percentage of GFP positive fibers
 3-1 Area of GFP fluorescent region/ total area of manual selection;
 - 4) Mean intensity of fluorescent region in the 510 nm spectral band image;
 - 5) Sum intensity of fluorescent region in the 510 nm spectral band image;
- 



- Such experimental mice model and registration device has proved its suitability for non-invasive estimation of GFP transfection efficiency, possibly offering us the updates on GFP transfection protocols for transfection efficiency increase.
- The significant increase of GFP transfection efficiency in skeletal muscle by application of electroporation in comparison to sonoporation has been revealed by using non-invasive multispectral imaging;

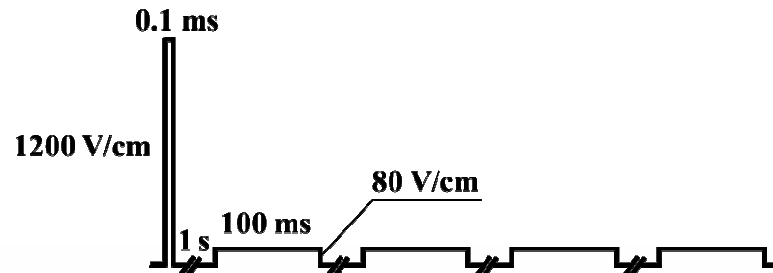
- The observation that no LV is needed to obtain efficient gene transfer is at least surprising..



The comparison between 1HV and 1HV+4LV did not reveal the significant difference for the mean value of GFP fluorescence;

- ... and this gives us the opportunity to address some of the mechanisms underlying gene electrotransfer.

pDNA must be electrophoretically relocated or enters the cell via endocytosis pathway



pDNA is directly propelled

Ultrasound:

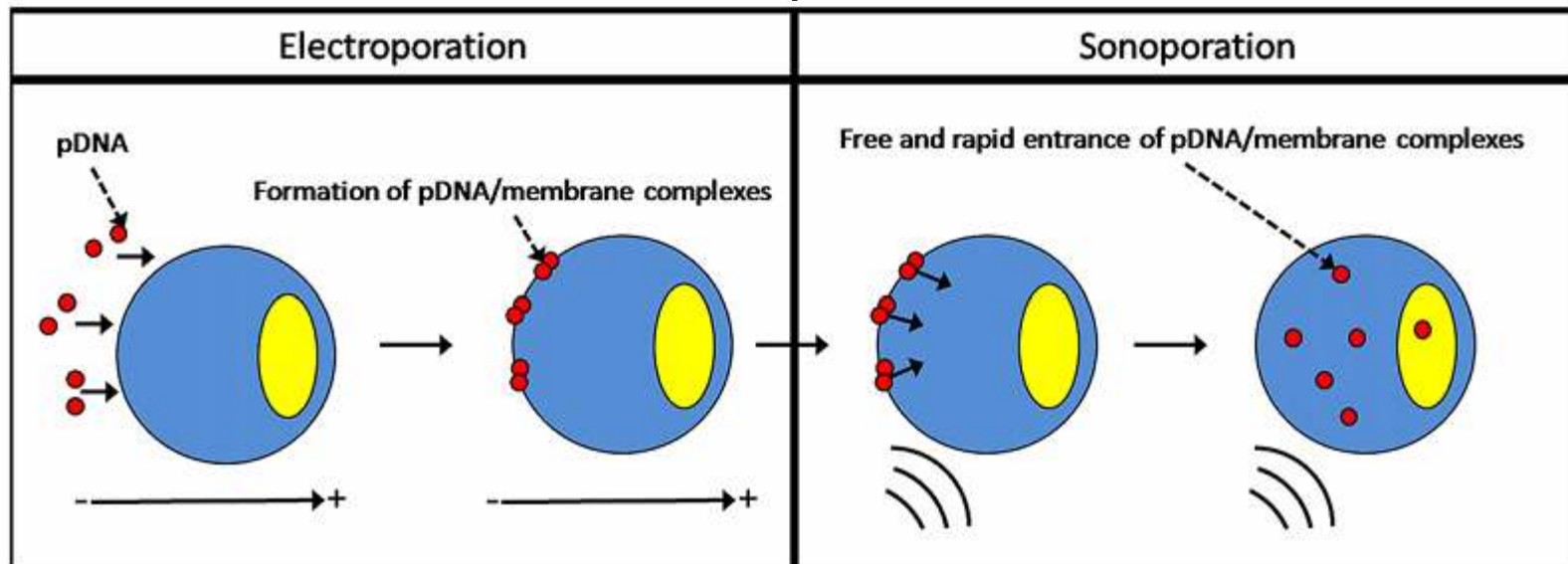
Transducer: cylindrical, focused.

Pulse duration: 1, 2, 5, and 10 cycles;

Optison concentration 4.5×10^6 MB/ml.

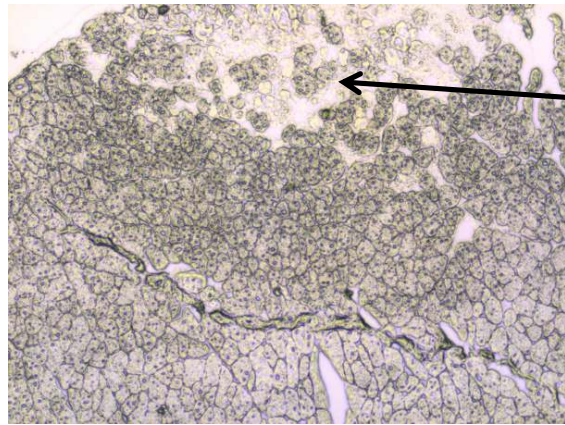
Acoustic pressure: 0.09 – 0.25 – 0.48 – 0.79 – 1.09 – 1.32 MPa

Total US exposure time: 60s (but the MB were destroyed in first few seconds);

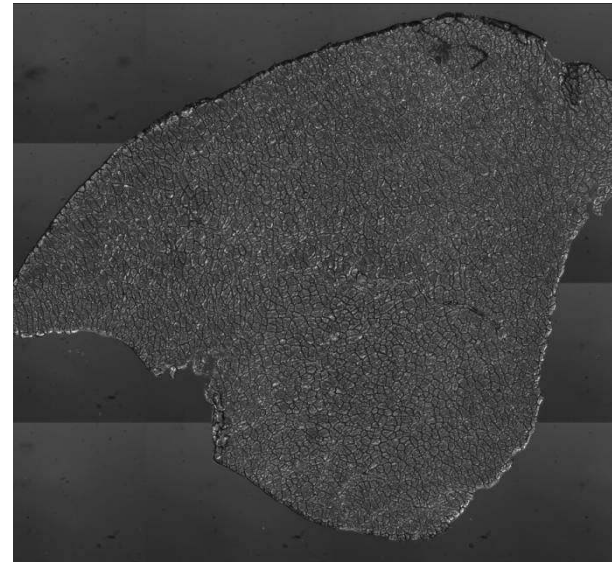
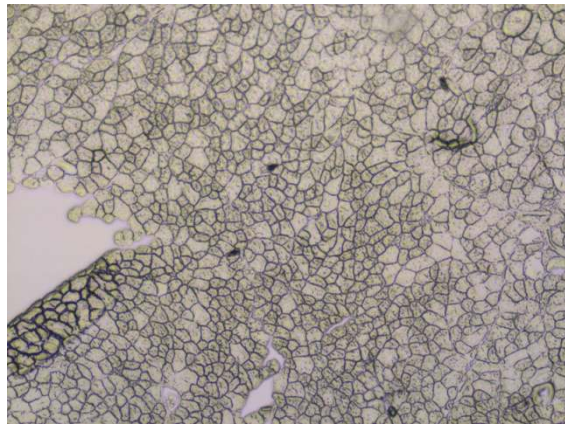


According to our data, the high efficiency in gene electrotransfer achieved by single HV pulse (and without HV+LV pulse combination) implies that it is important to destabilize the membrane.

Evaluation of EP, SP and EP+SP damage to the muscle fibers



← Muscle fiber damage

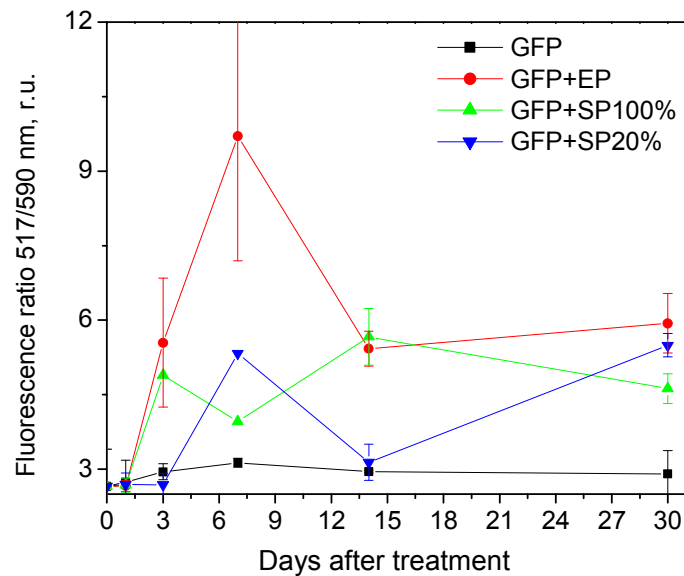
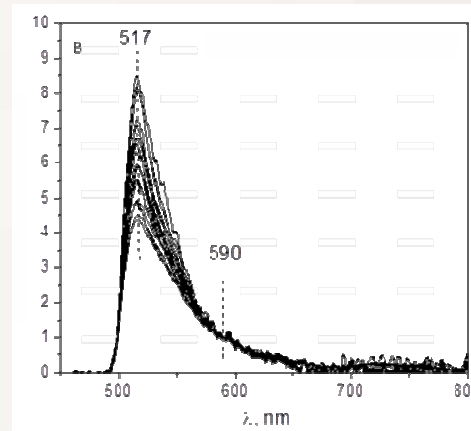
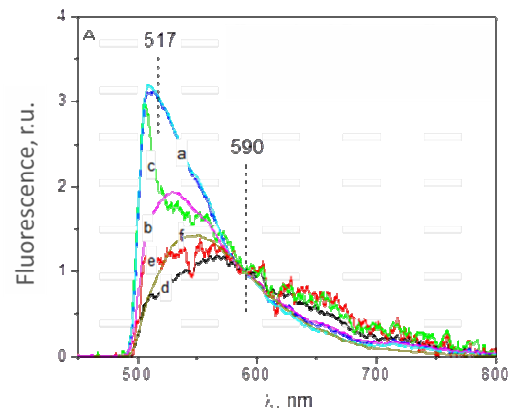


The experimental protocol from:

Devor ST¹, Faulkner JA. Regeneration of new fibers in muscles of old rats reduces contraction-induced injury. J Appl Physiol 1999;87(2):750-6.

Non invasive estimation of GFP transfection kinetics

Spectra normalization:



More accurate detection if it is possible to correlate the parameters from

*fluorescence parameters derived from *in vivo spectral* measurements (e.g. 3, 4 parameter – simplest case)

*fluorescence parameters derived from microscopy of muscle histological sections

Conclusions

In conclusion, our study leads to the new strategies for GFP transfection efficiency quantification in vivo. Using the GFP coding plasmid, we demonstrate the suitability of fluorescence spectroscopy and hyperspectral imaging method and the selected muscle model for non-invasive quantification of GFP transfection efficiency.

Our study showed that both electroporation and sonoporation methods are feasible for mice muscle transfection. However, evaluation of mean GFP fluorescence intensity revealed that in comparison with sonoporation, electroporation (with the single HV electric pulse) resulted in more intense GFP signal during the long term period of GFP expression.

Acknowledgements

This work was supported by European Social Fund project “Innovative technologies for acquisition and processing of biomedical images (InBit)” No. 2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014.



- Gene Therapy is a technique for correcting defective genes that are responsible for disease development

There are four approaches:

1. A normal gene inserted to compensate for a nonfunctional gene.
2. An abnormal gene traded for a normal gene
3. An abnormal gene repaired through selective reverse mutation
4. Change the regulation of gene pairs

Disease	Target cell
Severe combined immunodeficiency	Bone marrow cells or T-lymphocytes
Duchenne dystrophy	Muscle
Hemophilia	Liver, muscle
Cystic fibrosis	Lung Cells
Cancer	Many cell types
Neurological diseases: Parkinson's/ Alzheimers	Nerve Cells
Infectious diseases: AIDS, hepatitis B	White Blood Cells

Problems with Gene Therapy

- Short Lived
 - Hard to rapidly integrate therapeutic DNA into genome and rapidly dividing nature of cells prevent gene therapy from long time
 - Would have to have multiple rounds of therapy
- Immune Response
 - new things introduced leads to immune response
 - increased response when a repeat offender enters
- Viral Vectors
 - patient could have toxic, immune, inflammatory response
 - also may cause disease once inside
- Multigene Disorders
 - Heart disease, high blood pressure, Alzheimer's, arthritis and diabetes are hard to treat because you need to introduce more than one gene
- May induce a tumor if integrated in a tumor suppressor gene because insertional mutagenesis

Acknowledgements



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



This study was supported by the European Social Fund project
“Innovative biomedical image acquisition and processing technologies”,
grant #2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014.



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



EIROPAS SAVIENĪBA

Melanomas / dzimumzīmes klasifikācijas metode, izmantojot neliela skaita spektrālo joslu informāciju

Dr.habil.math. Aivars Lorencs

Projekta zinātniskais vadītājs

Elektronikas un datorzinātņu institūts

e-pasts: lorencs@edi.lv

5/12/2014

**Seminārs: «Ādas attēlu iegūšanas un apstrādes tehnoloģijas, to
izmantošana medicīniskajā diagnostikā»**

*ESF līdzfinansēta projekta „Inovātīvas biomedicīnisko attēlu iegūšanas un apstrādes tehnoloģijas (InBiT)” vienošanās Nr.2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014

Lietotā simbolika

Attēlu skaits: 32 melanomas, 94 nevusi

Vispārīgā situācijā: m melanomu attēli, n nēvusu attēli

p -tās melanomas pikseļu optisko blīvumu vidējā vērtība j -tajā joslā $\mu_j(p)$ $p = \overline{1, m}$

q -tā nevusa pikseļu optisko blīvumu vidējā vērtība j -tajā joslā $\nu_j(q)$ $q = \overline{1, n}$

p -tās melanomas pikseļu optisko blīvumu sadalījuma standartnovirze j -tajā joslā $\bar{\mu}_j = \frac{1}{m} \sum_{p=1}^m \mu_j(p)$

q -tā nevusa pikseļu optisko blīvumu sadalījuma standartnovirze j -tajā joslā

$$\bar{\nu}_j = \frac{1}{n} \sum_{q=1}^n \nu_j(q)$$

Joslu karakteristiku kritiskās zonas

$$a_{j1} = \min_p \mu_j(p)$$

$$b_{j1} = \min_p s_j(p)$$

$$a_{j2} = \max_q \nu_j(q)$$

$$b_{j2} = \max_q \sigma_j(q)$$

$$\forall j = \overline{1,51} \quad a_{j1} < a_{j2} \quad \text{un} \quad b_{j1} < b_{j2}$$

Sliekšņu definīcija

Ja δ ir reāls skaitlis, kas apmierina nosacījumu $a_{j1} < \delta < a_{j2}$, tad

$c_{j1}(\delta)$ ir $\mu_j(p)$ skaits, kas mazāks par δ ;

$c_{j2}(\delta)$ - $\nu_j(q)$ skaits, kas lielāki vai vienādi par δ .

Ja δ' ir reāls skaitlis, kas apmierina nosacījumu $b_{j1} < \delta' < b_{j2}$, tad

$d_{j1}(\delta')$ - $s_j(p)$ skaits, kas mazāks par δ' ;

$d_{j2}(\delta')$ - $\sigma_j(q)$ skaits, kas lielāki vai vienādi par δ' .

Ja δ dod minimālo vērtību summai $c_{j1}(\delta) + c_{j2}(\delta)$, tad to apzīmē ar δ_j ;

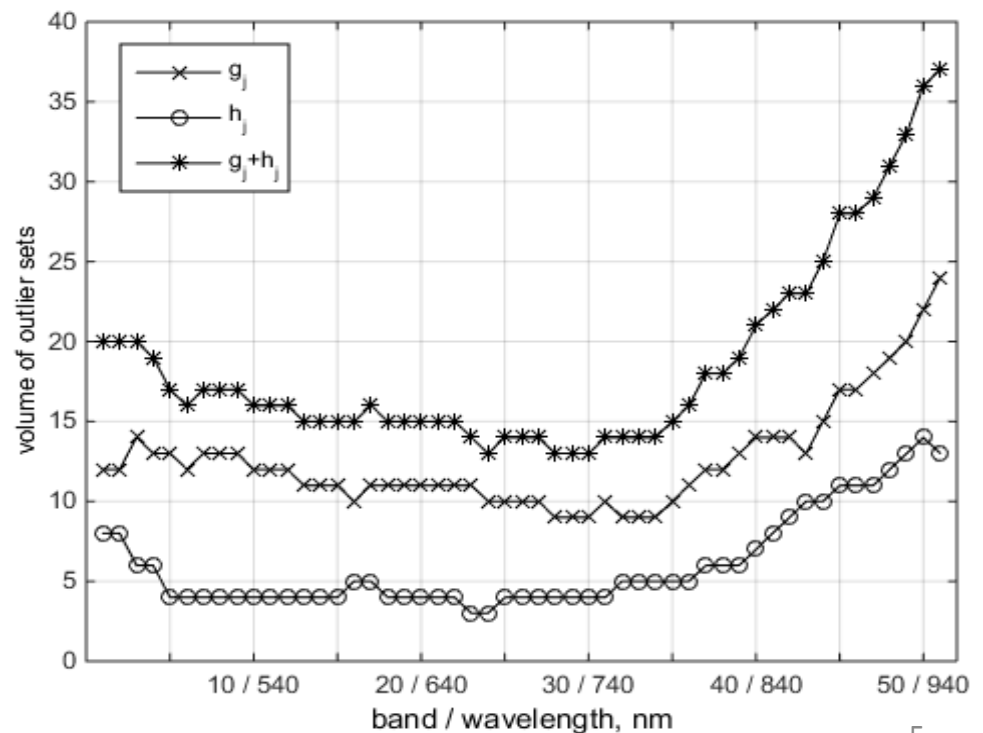
Ja δ' dod minimālo vērtību summai $d_{j1}(\delta') + d_{j2}(\delta')$, tad to apzīmē ar δ'_j ;

Joslu izvēle

Definējam: $g_j = c_{j1}(\delta) + c_{j2}(\delta)$

$$h_j = d_{j1}(\delta') + d_{j2}(\delta')$$

Joslu j sauksim par informatīvāku par joslu k , ja $h_j < h_k$ vai $h_j = h_k$ un $g_j < g_k$

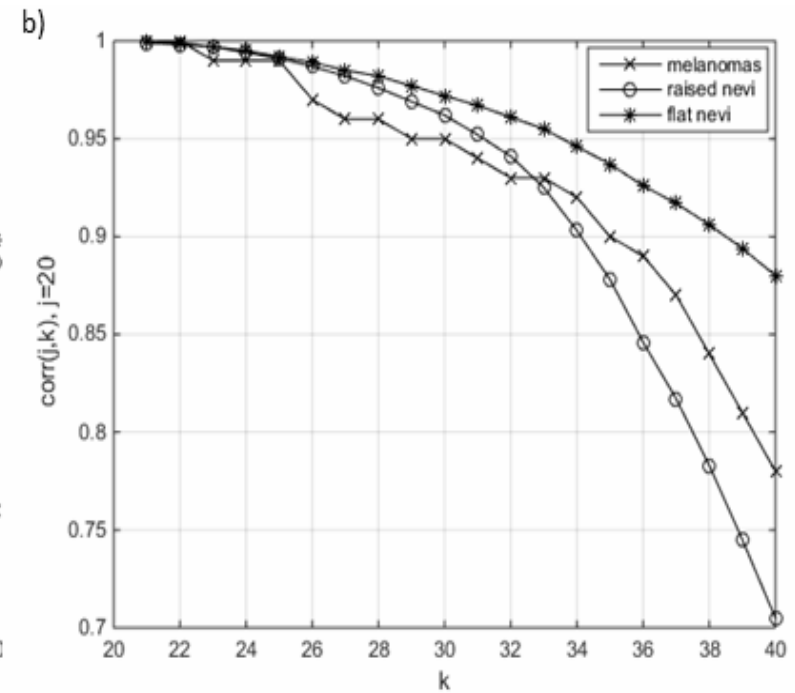
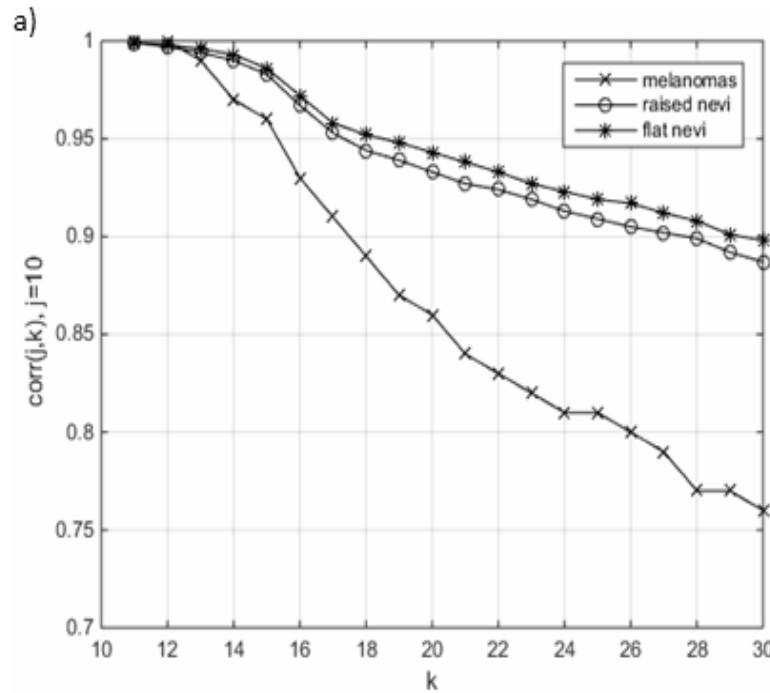


Joslu korelētība

$$corr_M(j,k) = \frac{\sum_{p=1}^m (m-1)^{-1} (\mu_j(p) - \bar{\mu}_j) \cdot (\mu_k(p) - \bar{\mu}_k)}{s_j \cdot s_k}$$

$$corr_N(j,k) = \frac{\sum_{q=1}^n (n-1)^{-1} (v_j(q) - \bar{v}_j) \cdot (v_k(q) - \bar{v}_k)}{\sigma_j \cdot \sigma_k}$$

$$corr(j,k) = \frac{m \cdot corr_M(j,k) + n \cdot corr_N(j,k)}{m+n}$$



Klasifikācijas kārtulas

X – konkrēta attēla prezentētais ādas reģions

α_j – X pikseļu optiskā blīvuma vidējā vērtība j -tajā joslā

β_j – X pikseļu optiskā blīvuma vērtību sadalījuma standartnovirze j -tajā joslā

$I(\alpha_j)$ – izteikuma $\alpha_j > \delta_j$ patiesuma vērtība

$I(\beta_j)$ – izteikuma $\beta_j > \delta_j'$ patiesuma vērtība

Ja izteikums patiess, tad tā vērtība 1, pretējā gadījumā – 0.

Klasifikācijas kārtulā atšķirīgiem izteikumiem pierakstīti atšķirīgi svara koeficienti.

Ja klasifikatora bāzes joslu triplets ir (10,20,40), tad klasifikācijas kārtula formulēta šādi:

X – melanoma, ja

$$\sum_{j \in \{10, 20, 40\}} \left(\frac{3}{21} I(\alpha_j) + \frac{4}{21} I(\beta_j) \right) > 0.5 \quad (1)$$

Ja (1) neizpildās, tad X – nevuss. Šo klasifikatoru apzīmēsim ar W_1 .

Analoģiska kārtula bāzes joslu tripletam (10,20,30), kuru apzīmēsim ar W_2 .

Stabilitātes problēma

Izvēlētā bāzes joslu tripleta katru pamatjoslu j paplašina ar blakus joslu $j-1$ un $j+1$ pievienošanu.

Reģiona X patvaļīga pikseļa z optisko blīvumu j -tajā joslā apzīmējam ar $e_z(j)$, $j = 1, 51$.

Izvēlētā joslu tripleta pamatjoslu paplašinājums notiek pēc principa:

pikseļa z optiskā blīvuma vērtība $e_z(j)$ tiek aizstāta ar optiskā blīvuma vērtību

$$0.25e_z(j-1) + 0.5e_z(j) + 0.25e_z(j+1)$$

Klasifikatora konstrukcija tālāk noris pēc iepriekš aprakstītās shēmas. Ja pamatjoslu triplets ir $(10, 20, 40)$, tad iegūtais klasifikators apzīmēts ar W_1' . Ja pamatjoslu triplets ir $(10, 20, 30)$, tad iegūtais klasifikators apzīmēts ar W_2' .

Testēšanas rezultāti

	W_1	W_2	W_1'	W_2'
Melanoma	0	0	0	0
Nevuss	5	4	1	1