



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



EIROPAS SAVIENĪBA

Eiropas Sociālais fonds

Prioritāte: 1.1. Augstākā izglītība un zinātne

Pasākums: 1.1.1. Zinātnes un pētniecības potenciāla attīstība

Aktivitāte: 1.1.1.2. Cilvēkresursu piesaiste zinātnei

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

Projekta sākuma datums: 01.09.2013.g.

Projekta beigu datums: 31.08.2015.g.

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

ESF finansējuma saņēmējs: Elektronikas un datorzinātņu institūts (EDI)

Sadarbības partneris: Latvijas Universitātes Atomfizikas un spektroskopijas institūts (ASI)

Projekta aktivitātes Nr.2 "Pētījumi" progresu pārskats

Pārskata numurs Nr.4. par periodu no 01.07.2014.g līdz 31.10.2014.g.

Projekta zinātniskais vadītājs: Aivars Lorencs, Dr.hab.math.

Projekta zinātniskie darbinieki: Kristīne Azarjana, Dr.med.

Jekaterina Bule, Dr.sc.ing.

Gita Krieviņa, doktorante

Inga Saknīte, doktorante

Dainis Jakovels, Dr.phys.

Juris Siņica-Siņavskis, Mag.math.

Mindaugas Tamošiunas, Dr.phys.

Roberts Kadiķis, Mag. sc. ing..

SATURS

1.	Kopsavilkums	3
2.	Ievads.....	4
3.	Ādas veidojumu multispektrālo attēlu reģistrācijas un segmentācijas algoritmu izstrāde un realizācija.....	5
3.1.	Reģistrācija ar attēlu apgabalu bīdīšanu	5
3.2.	Reģistrācijas algoritmu īstenošana C++ valodā.....	6
3.3.	Attēlu reģistrācija ar lokālo ekstrēmu atbilstības atrašanu	7
3.3.1.	Efektīva lokālo ekstrēmu atrašana	7
3.3.2.	Attēlu nobīdes atklāšana, salīdzinot šo attēlu ekstrēmu punktus.....	9
3.3.3.	Jaunā reģistrācijas algoritma lietošana	10
4.	Augstas kvalitātes klasifikācijas metodes izstrāde, izmantojot informāciju no neliela skaita spektra joslām	11
4.1.	Izmantojamo spektra joslu atlasē principu	11
4.2.	Spektra joslu korelētības novērtēšana.....	13
4.3.	Klasifikācijas kvalitātes jautājumi	15
4.4.	Klasifikācija no divu spektra joslu datiem.....	15
4.5.	Metodes izmantošana vairāku attēlu iegūšanas tehnoloģiju datu kopīgai izmantošanai	16
5.	Elektroforēzes un sonoforēzes efektivitātes novērtēšana, izmantojot fluorescences multispektrālos attēlus	16
6.	Lāzerspeklu attēlošanas ierīce uz mobilā telefona bāzes.....	17
7.	Ādas mitruma noteikšana, izmantojot ūdens absorbciju tuvā infrasarkanā spektra apgabalā..	19
7.1.	Literatūrā atrodamās ūdens ekstinkcijas koeficientu vērtības	19
7.2.	Dažādu optisko šķiedru caurlaidības salīdzinājums	21
7.3.	Atstarotās gaismas mērījumi ar caurspīdīgu Petri trauciņu	22
7.4.	Ūdens absorbcijas mērījumi ādai, izmantojot mitru salveti.....	24
8.	Bilirubīna kartēšanas algoritma pilnveide	29
9.	Secinājumi	31
10.	Literatūras saraksts	31
	Pielikumi	32

1. Kopsavilkums

Periodā no **1.7.2014. – 31.10.2014.** projekta InBiT aktivitātes "Pētījumi" ietvaros veikti šādi darbi:

1. Sagatavots iesniegšanai zinātnisks raksts ar metodi melanomu atšķiršanai no dzimumzīmēm, balstoties uz ādas veidojumu attēliem neliela skaita (3 vai pat 2) spektra joslās. Izveidots sliekšņu tipa klasifikators, kura lēmumkārtulā tiek pārbaudītas ādas veidojumu pikseļu optiskā blīvuma vidējās vērtības un standartnovirzes izvēlētajās spektrālajās joslās. Rakstā pamatota mērķtiecīga spektra joslu un veidojumu atšķiršanai izmantoto sliekšņu izvēle. Metodes pārbaude attiecībā pret pieejamo ādas veidojumu attēlu kopu (32 melanomu un 94 dzimumzīmju attēli) parādījusi, ka labākajā piedāvātajā realizācijas variantā iespējams sasniegt ļoti augstu klasifikatora kvalitāti (iegūta tikai viena klasifikācijas kļūda) (aktivitāte 2.2).
2. Turpināti eksperimenti ar pelēm šūnu apvalka elektroporozes un sonoporozes efektivitātes izpētei zāļu ievadīšanai. Iegūtie rezultāti prezentēti 8. starptautiskajā konferencē "Advanced Optical Materials and Devices" (25.-27.augusts, Rīga) (aktivitāte 2.1).
3. Turpināta vēdera dobuma 3D datortomogrāfijas attēlu apstrādes programmas izstrāde, fokusējoties uz objektu tilpuma noteikšanas algoritmu, ko var apmācīt, izmantojot manuāli atzīmētas objektu robežas (aktivitāte 2.2).
4. Pabeigta multispektrālā attēla reģistrācijas algoritma izstrāde un realizācija MATLAB vidē (aktivitāte 2.2).
5. Algoritmi ādas veidojumu multispektrālo attēlu automātiskai reģistrācijai un ādas veidojumu segmentācijai pārrakstīti C++ valodā, izmantojot OpenCV bibliotēku. Tas nepieciešams ātrdarbības palielināšanai un programmatūras realizācijai dažādās vidēs (aktivitāte 2.2).
6. Veikti eksperimentāli pētījumi ādas mitruma noteikšanai, izmantojot Ocean Optics NIR spektrometru diapazonā 900-1700 nm (aktivitāte 2.2).
7. Turpināti pētījumi bilirubīna satura noteikšanai ādā sasitumu vecuma noteikšanai. Uzlabots hromoforu kartēšanas algoritms bilirubīna koncentrācijas noteikšanai (aktivitāte 2.2).
8. Turpināti pētījumi lāzerspeklu izmantošanā asins plūsmas novērtēšanai ādā. Rezultāti prezentēti konferencē "Advanced Optical Materials and Devices" (aktivitāte 2.4).
9. Sagatavoti publicēšanai 2 raksti "SPIE Proceedings" (aktivitāte 2.4):
 - a. D. Jakovels, I. Saknīte, G.Krievina, J. Zaharans, J. Spigulis, "Mobile phone based laser speckle contrast imager for assessment of skin blood flow,"
 - b. M. Tamošiūnas, D. Jakovels, A. Ļihačovs, A. Kilikevičius, J. Baltušnikas, R. Kadikis, S. Šatkauskas, "Application of fluorescence spectroscopy and multispectral imaging for non-invasive estimation of GFP transfection efficiency."
10. Publicēti 2 raksti "SPIE Proceedings" (aktivitāte 2.4):
 - a. Dainis Jakovels, Inga Saknīte, Janis Spigulis, "Implementation of laser speckle contrast analysis as connection kit for mobile phone for assessment of skin blood flow," Proceedings of SPIE 9129 (2014).
 - b. Inga Saknīte, Dainis Jakovels, Janis Spigulis, "Diffuse reflectance and fluorescence multispectral imaging system for assessment of skin," Proceedings of SPIE 9129 (2014).
11. Projekta pētnieciskā darbība apspriesta 3 zinātnisko dalībnieku semināros.

2. Ievads

Šis pārskats veltīts projekta ceturtnā posma laikā veiktajiem pētījumiem. Šajā laikā tika turpināti uzsāktie pētījumi, par iegūtajiem rezultātiem ziņots zinātniskā konferencē un gatavotas zinātniskās publikācijas.

Ādas veidojumu klasifikācijas metode (melanomu atšķiršanai no dzimumzīmēm) attīstīta, panākot klasifikatora augstu kvalitāti. Izpētīta spektra joslu informativitāte šī uzdevuma risināšanai un pamatota mērķtiecīga izmantojamo spektra joslu izvēle, kas ņem vērā to savstarpējo korelāciju. Izveidots klasifikators, kas izmanto ādas veidojumu optiskā blīvuma attēlus tikai 3 spektrālajās joslās un tai pašā laikā nodrošina ļoti mazu kļūdīšanās varbūtību. Izmantojot izstrādāto metodi, pieejamās ādas veidojumu attēlu kopas (32 melanomu un 94 dzimumzīmju attēli) ietvaros iegūta tikai viena klasifikācijas kļūda.

Perioda laikā turpināta attēlu reģistrācijas un segmentācijas algoritmu izstrāde. Pabeigta multispektrālā attēla reģistrācijas algoritma izstrāde un realizācija MATLAB vidē. Algoritmi ādas veidojumu multispektrālo attēlu automātiskai reģistrācijai un ādas veidojumu segmentācijai pārrakstīti C valodā, izmantojot OpenCV bibliotēku.

ASI tika uzsākti eksperimenti ādas mitruma novērtēšanai, izmantojot Ocean Optics NIR spektrometru diapazonā 900-1700 nm, kā arī turpināti pētījumi bilirubīna satura noteikšanai ādā sasitumu vecuma noteikšanai. Uzlabots hromoforu kartēšanas algoritms bilirubīna koncentrācijas noteikšanai.

Pārskata periodā turpināti darbi, kas saistīti ar elektroforēzes un sonoforēzes efektivitātes izpēti zāļu ievadīšanai šūnās. Piedāvāti šīs efektivitātes novērtēšanai izmantojamie parametri, kas ir aprēķināmi no *in vivo* un *in vitro* iegūtiem fluorescences attēliem. Rezultāti prezentēti konferencē "Advanced Optical Materials and Devices" un publicēti SPIE Proceedings rakstā.

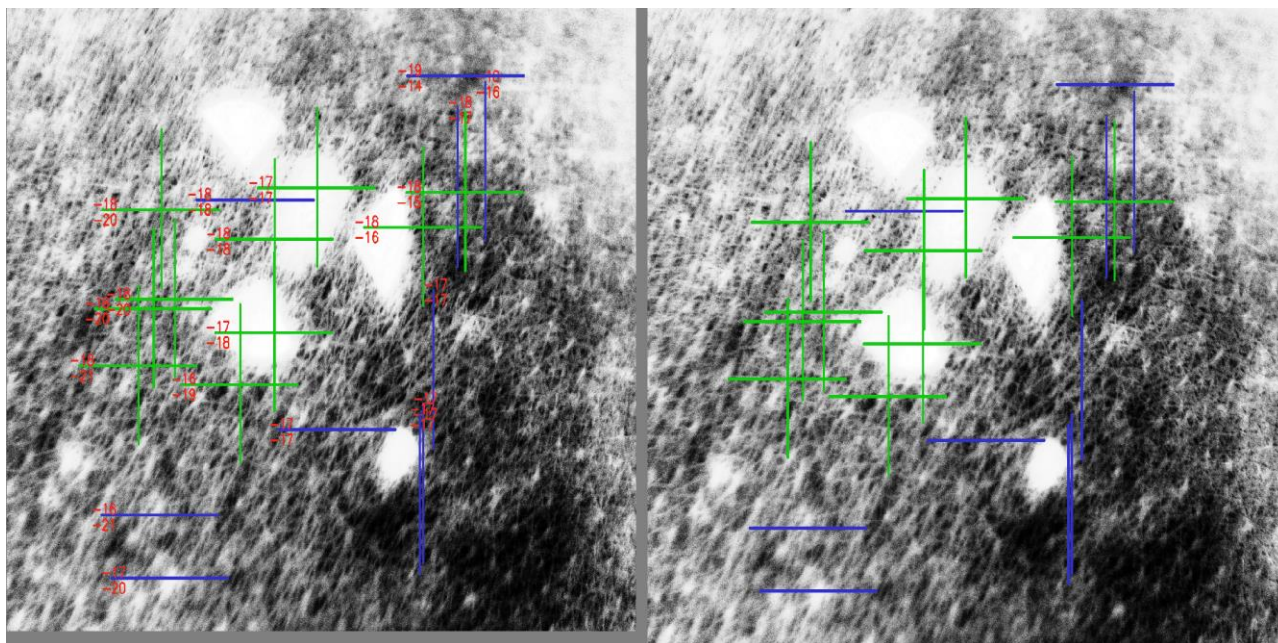
Perioda laikā projekta rezultāti prezentēti starptautiskā konferencē "Advanced Optical Materials and Devices". Perioda laikā tika publicēti 2 un sagatavoti publicēšanai 2 zinātniski raksti izdevumiem "SPIE Proceedings".

3. Ādas veidojumu multispektrālo attēlu reģistrācijas un segmentācijas algoritmu izstrāde un realizācija

Iepriekšējos pārskata periodos tika pētītas divas automātiskas multispektrālo attēlu reģistrācijas metodes – savstarpēji atbilstošo raksturīgo punktu atrašana reģistrējamajos attēlos; kā arī reģistrējamo attēlu bīdīšana vienam pret otru, meklējot nobīdīto attēlu pikseļiem atbilstošo skaitlisko vērtību absolūto starpību summas minimumu, kas izklāsta īsuma dēļ turpmāk tekstā tiks saukts par pikseļu starpības minimumu. Šajā periodā tika pētītas iespējas padarīt minētās metodes efektīvākas attiecībā pret nepieciešamajām skaitļošanas jaudām, lai gala lietotājam nebūtu ilgi jāgaida rezultāts. Lai to panāktu, izpētītās metodes tika īstenotas C++ kodā; raksturīgo punktu aprakstīšanas metode SURF tika aizstāta ar ORB metodi; attēlu bīdīšanas metode tika modificēta, īstenojot to kā nelielu attēlu apgabalu bīdīšanu. Raksturīgo punktu metode tika apvienota ar attēlu bīdīšanas metodi, lai palielinātu reģistrācijas precizitāti. Papildus esošo metožu uzlabojumiem, tika izstrādāta jauna reģistrācijas metode, kas, līdzīgi attēlu bīdīšanas metodei, ļauj kompensēt tikai attēlu savstarpējo nobīdi (nespēj kompensēt rotāciju vai izmēra maiņu), tomēr ir būtiski ātrāka par iepriekš īstenotajām reģistrācijas metodēm.

3.1. Reģistrācija ar attēlu apgabalu bīdīšanu

Attēlu bīdīšana vienam pret otru un to pikseļu starpības minimuma meklēšana ir lēna, kā arī ne vienmēr šādi atrastais minimums norāda uz patieso nobīdi starp attēliem. Pārskata periodā šis algoritms tika uzlabots - bīdot nevis veselus attēlus vienam pret otru, bet gan bīdot vairākus pirmā attēla apgabalus attiecībā pret otru attēlu. Eksperimentāli veiksmīgas apgabalu formas izrādījās šauri taisnstūri un krusti.



Att. 3.1. Bīdīšanas apgabali jau reģistrētā attēlā, kā arī to ticamākā atrašanās vieta reģistrējamajā attēlā.

Attēlā 3.1. parādīti līnijveida un krustveida apgabali, kas pēc nejaušības principa tiek izgriezti no jau reģistrētā ieejas attēla. Sākot no apgabalu sākotnēji definētajām koordinātēm, katrs no šiem apgabaliem tiek "alkatīgi" bīdīts attiecībā pret attēla 3.1. labajā pusē attēloto reģistrējamo attēlu,

atrodot apgabala un attēla pikseļu atšķirības minimumu. Sarkanie skaitļi pie katra no apgabaliem parāda meklētās attēlu nobīdes rezultātu (labāko x un y koordinātes nobīdi) konkrētajam apgabalam.

Lai noteiktu kopējo attēla nobīdi, visas apgabalu noteiktās nobīdes tiek sagrupētas pēc to vērtību līdzības. Ja divu apgabalu nobīdes $[x \ y]$ izpilda nosacījumus:

$$\begin{aligned} |x_1 - x_2| &< 4 \\ |y_1 - y_2| &< 4 \end{aligned} ,$$

tiek pieņemts lēmums, ka abiem apgabaliem atrasta vienāda labākā nobīde. Salīdzinot visas atrastās nobīdes, tiek iegūta ticamākā kopējā nobīde, par kuru liecina vislielākais atsevišķo apgabalu skaits ar vienādu nobīdi. Starp šādu apgabalu kopas R nobīžu vērtībām var būt nelielas atšķirības, tādēļ galējie nobīdes x un y lielumi tiek aprēķināti kā modas no kopas R apgabalu x un y nobīdēm. Dalot kopā R iekļauto apgabalu skaitu pret kopējo apgabalu skaitu, tiek iegūts nobīdes gala rezultāta ticamības koeficients, kura maksimālā iespējamā vērtība ir 1. Tātad, jo vairāk apgabalu liecina par konkrētu nobīdi, jo ticamāka tā ir. Ja vairākām ticamākajām nobīdēm ir vienāda ticamība, par gala rezultātu tiek izvēlēta viena no nobīdēm pēc nejaušības principa – šāds rezultāts var būt nepareizs, bet ļoti iespējams, ka arī tā ticamības koeficients būs mazs.

3.2. Reģistrācijas algoritmu īstenošana C++ valodā

Pārnesot algoritmus uz C++ kodu, tika lietota datora redzes bibliotēka OpenCV. Šajā bibliotēkā, līdztekus attēla ievades un izvades funkcijām, iestrādātas vairākas reģistrācijai noderīgas priekšapstrādes funkcijas. Piemēram, pirms raksturīgo punktu meklēšanas attēliem I tika veikta histogrammas izlīdzināšana ar funkcijas *equalizeHist(I)* palīdzību. OpenCV iestrādātas arī raksturīgo punktu atklāšanas un aprakstīšanas metodes SURF, ORB, BRIEF u.c.

ORB metode attēla raksturīgo punktu atrašanai un aprakstīšanai tiek piedāvāta rakstā [1]. Autori eksperimentāli parāda, ka metode ir būtiski ātrāka par jomā populārajām SIFT un SURF metodēm, bet lielā daļā gadījumu raksturīgo punktu atrašanas un atbilstošo punktu pāru atrašanas rezultāts ir līdzvērtīgs. Papildus priekšrocība ORB metodei salīdzinājumā ar SIFT un SURF ir iespēja to brīvi lietot bez licenču pirkšanas arī ārpus pētniecības.

OpenCV ļauj modificēt vairākus parametrus ORB metodē. Lai uzlabotu reģistrācijas veikšanas ātrumu, sākotnējais aprakstāmo raksturīgo punktu skaits ORB metodē tiek uzstādīts neliels - 250. Pirmajā multispektrālā masīva attēlā atrastie punkti **P1** un to deskriptori tiek saglabāti salīdzināšanai ar nākamo attēlu punktiem **P2**. Salīdzināšanā tiek noteikts, kuri no pirmā attēla punktiem tika atrasti arī otrajā attēlā. OpenCV piedāvā iebūvētas klases deskriptoru salīdzināšanai - *BFMatcher* klase veic salīdzināšanu ar pilnu pārlasi, kamēr *FlannBasedMatcher* klasē tiek pielietota FLANN (Fast Approximate Nearest Neighbor Search Library) salīdzināšanas metode, kas daudzu punktu gadījumā var būt ātrāka par pilnu pārlasi.

Ne visi punktu pāri ar līdzīgiem deskriptoriem ir viens un tas pats punkts dažādos attēlos. Pieņemot, ka nobīde starp pēc viļņa garuma tuviem attēliem nav liela, tiek atmesti punktu pāri, kas norāda uz pretējo. Palikušie punkti tiek izmantoti, lai atrastu ģeometrisku projekciju, kas otrā attēla punktus **P2** pārvietotu uz to atbilstošajām koordinātēm **P1** pirmajā attēlā. 3×3 izmēra transformācijas matricas ieguve notiek ar OpenCV funkcijas *findHomography(P1, P2, CV_RANSAC)* palīdzību. Pēdējais funkcijas arguments norāda, ka homogrāfijas aprēķinā tiek izmantota RANSAC metode, kas atsijā ticamākajai transformācijai neiederīgos punktu pārus.

Analizējot iegūto transformācijas matricu, dažkārt var noteikt nepareiza rezultāta iegūšanu. Ja matricas elementi, kas atbilst par rotāciju vai mērogošanu, ir lieli, iegūtā transformācijas matrica visticamāk nav pareiza, jo attēlu iegūšanas laikā lielas un asas pacientu kustības nav gaidāmas. Šādā gadījumā reģistrētajā attēlā raksturīgie punkti tiek meklēti no jauna, par 500 palielinot aprakstāmo punktu skaitu. Punktu sapārošana notiek tāpat kā iepriekš. Punktu skaits var vēl tikt vairākas reizes palielināts, pirms tiek pieņemts lēmums, ka konkrētais attēls ar raksturīgo punktu metodi netiks reģistrēts.

Ja tiek iegūta derīga transformācijas matrica, attēls tiek reģistrēts, un, transformētā attēla raksturīgie punkti tiek pievienoti pirmā attēla punktu vektoram **P1**. Punktu vektora **P1** un atbilstošā deskriptoru vektora garums palielinās ar katru noreģistrēto attēlu, līdz vektors sasniedz noteiktu izmēru. Turpmāk vektorā tiek dzēsti vecākie elementi, atbrīvojot vietu nākamo attēlu punktiem. Šādā veidā nākamais attēls tiek reģistrēts, balstoties uz vairākiem iepriekšējiem attēliem.

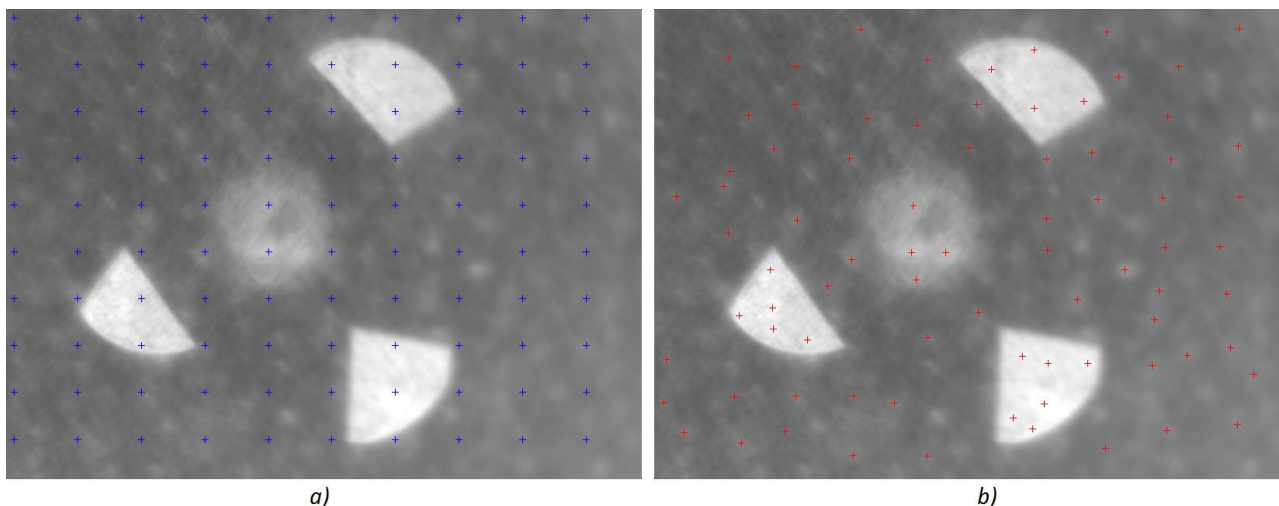
Ja pēc visu attēlu apstrādes ir palikuši nepiereģistrēti attēli, tiem tiek pielietota apgabalu bīdīšanas metode. Šī reģistrācijas metode tiek pielietota ātrāk, ja ar raksturīgo punktu analīzes palīdzību nav izdevies pierēģistrēt deviņus attēlus pēc kārtas. Bīdīšanas metodē tiek lietoti 20 taisnstūra un krusta formas apgabali, kā tas parādīts attēlā 3.1. Metodes pielietošana konkrētam attēlam tiek pieņemta par izdevušos, ja iegūtās attēlu nobīdes ticamības koeficients ir lielāks vai vienāds ar 0.2. Pretējā gadījumā apgabalu bīdīšana tiek veikta arī pret spektrā tālākiem veiksmīgi reģistrētiem attēliem, jo iespējamais sliktais ticamības koeficients var liecināt par to, ka tuvākais reģistrētais attēls ir izplūdis. Lai īstenotu apgabalu bīdīšanas metodi C++ kodā, tika izveidota apgabalu klase *Patch*. Tā ļauj definēt apgabala izmērus, formu un koordinātes, kā arī iekļauj funkciju *match()*, kas atrod apgabala nobīdi starp diviem attēliem.

3.3. Attēlu reģistrācija ar lokālo ekstrēmu atbilstības atrašanu

Pārskata periodā tika izstrādāta arī jauna reģistrācijas metode, kas ir ātrāka par C++ kodā īstenoto, iepriekšējā nodaļā aprakstīto metodi. Jaunajā metodē tiek noteikti un salīdzināti raksturīgi punkti starp attēliem, bet atšķirībā no ORB, SURF un līdzīgajām metodēm, šie punkti ir attēla lokālie minimumi un maksimumi, kā arī šajā metodē netiek veikta punktu pāru meklēšana ar punktu deskriptoru palīdzību.

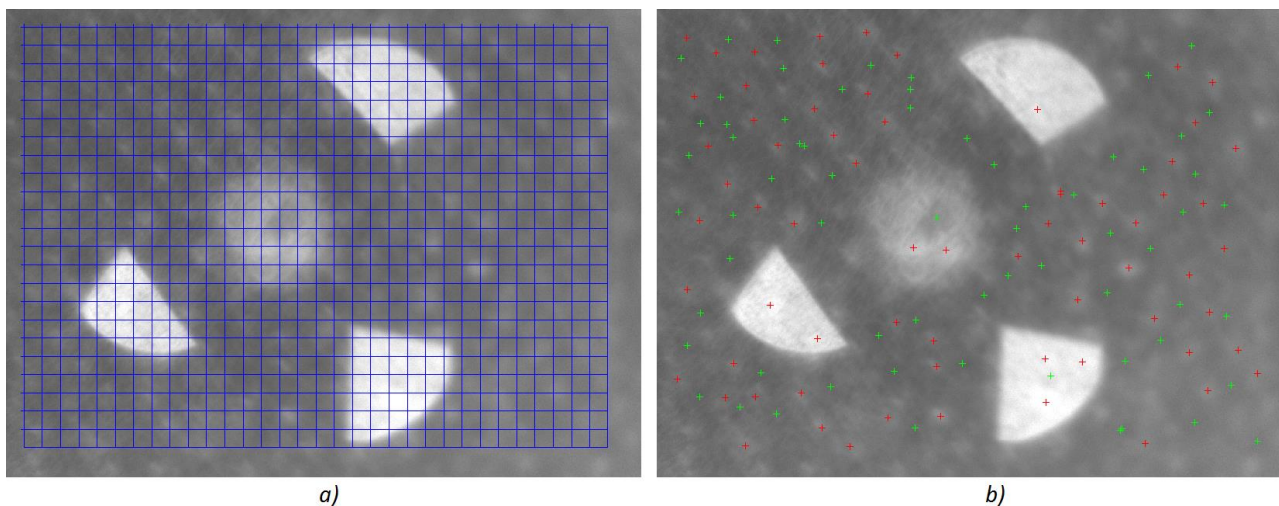
3.3.1. Efektīva lokālo ekstrēmu atrašana

Lokālo ekstrēmu atrašanai sākotnēji tika izmantots "alkatīgās" meklēšanas algoritms. Šajā gadījumā attēlā tiek patvaļīgi izvietoti meklēšanas punkti, kas iteratīvi pārvietojas, līdz nonāk attēla lokālajā ekstrēmā. Mūsu gadījumā ieejas attēlā ekstrēma meklēšanas punkti tiek izvietoti ar konstantu soli (att. 3.2.a). Gadījumā, kad tiek meklēti attēla lokālie maksimumi, ap katru meklēšanas punktu noteiktā apgabalā tiek meklēts pikselis ar lielāko intensitātes vērtību. Nākamajā iterācijā maksimālā vērtība tiek meklēta ap iepriekš atrasto punktu. Ja ap punkta šī brīža koordinātēm netiek atrasta neviena par šī punkta intensitāti lielāka vērtība, tiek pieņemts lēmums, ka konkrētais punkts ir lokālais maksimums. Attēlā 3.2.b parādīts lokālo maksimumu meklēšanas rezultāts. Daži sākotnējie punkti no attēla 3.2.a var nonākt vienā un tajā pašā lokālajā maksimumā. Līdzīgā veidā tiek atrasti arī lokālie minimumi.



Att. 3.2. Lokālo maksimumu meklēšana: a) meklēšanas punktu sākotnējā izvietošana; b) atrastie lokālie maksimumi (meklēšanas punktu atrašanās vietas pēc "alkatīgās" maksimumu meklēšanas).

Veidojot programmas MATLAB vidē, tās bieži iespējams padarīt ātrākas, aizvietojot programmu iteratīvos ciklus (*for*, *while*) ar matricu darbībām. Šādi tika izveidots alternatīvs un ātrāks veids lokālo ekstrēmu atrašanai. Otrajā metodē ieejas attēls tiek sadalīts mazos apgabalos, kā parādīts attēlā 3.3.a. Katra apgabala maksimums vai minimums tiek atrasts ar efektīvām MATLAB funkcijām *min()* un *max()*. Ja apgabala minimums vai maksimums atrodas uz apgabala robežas, tiek pieņemts lēmums, ka šajā apgabalā attiecīgā ekstrēma nav. Pretējā gadījumā apgabala minimums vai maksimums ir arī attēla lokālais ekstrēms. Attēlā 3.3.b parādīti ar šo metodi atrastie lokālie ekstrēmi.



Att. 3.3. Efektīva lokālo ekstrēmu meklēšana: a) attēla sadalīšana apgabalos; b) atrastie lokālie maksimumi (sarkani) un minimumi (zaļi).

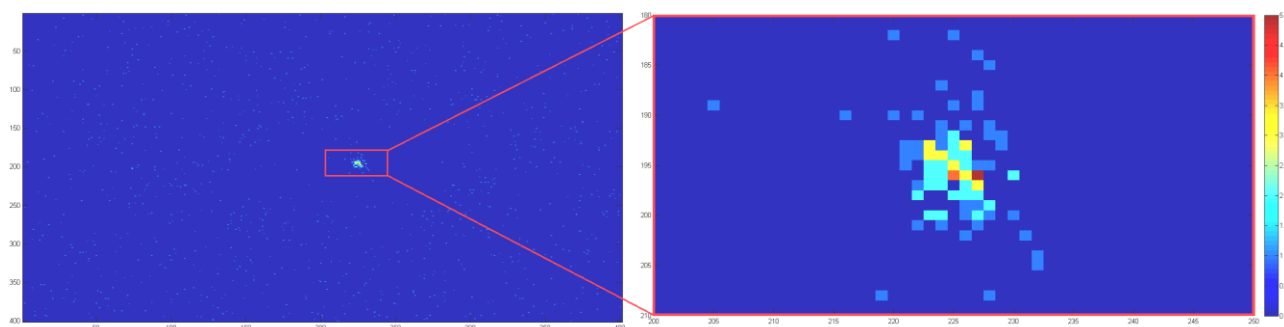
Līdz ar lokālajiem ekstrēmiem var tikt atrasti un tālāk reģistrācijas algoritmā pielietoti arī citi raksturīgi attēla punkti. Sākotnējā algoritma versijā raksturīgie punkti tika papildināti ar stūra punktiem, kas atrasti ar Harisa stūru atklāšanas metodi. Tomēr, testējot algoritmu ar ādas multispektrālajiem attēliem, tika secināts, ka stūru punktu meklēšana būtiski palēnina algoritmu, tajā pašā laikā nepalielinot iespēju attēlus veiksmīgi reģistrēt.

3.3.2. Attēlu nobīdes atklāšana, salīdzinot šo attēlu ekstrēmu punktus

Attēlu savstarpējās nobīdes noteikšana balstās uz pieņēmumu, ka būtiska noteikto ekstrēmu daļa abos attēlos atbilst kopējam punktam uz ādas. Šādā gadījumā, ja iegūst nobīdes starp visiem pirmā attēla raksturīgajiem punktiem **P1** un visiem otrā attēla punktiem **P2**, būtiskai daļai šo nobīžu jābūt ar vienādām vērtībām. Šī biežākā nobīde visticamāk atbilst arī attēlu kopīgajai nobīdei, un piedāvātajā metodē to var atrast atsevišķi nemeklējot, kuri lokālie punkti no pirmā attēla atbilst lokālajiem punktiem otrajā.

Lai nobīdes atrašanas algoritms būtu ātrs, pēc iespējas vairāki tā soļi tiek īstenoti kā matricu darbības. Pirmā attēla lokālie minimumi un maksimumi tiek apvienoti vienā $2 \times m$ izmēra matricā **P1**, kur matricas kolonnas atbilst punkta x un y koordinātēm, bet m ir attēlā atrasto ekstrēmu skaits. Otrā attēla ekstrēmi glabājas matricā **P2** ar izmēru $2 \times n$. Visām matricas **P2** kolonnām (punkta (x, y) koordinātēm) tiek izveidotas $2 \times m$ matricas **Ri**, kuru pirmās rindas visi elementi ir x , un, otrās rindas elementi ir y . Katra **Ri** matrica tiek atņemta no pirmā attēla punktu matricas **P1**. Iegūtās starpību matricas tiek sastīķētas kopējā matricā **N** ar izmēru $2 \times (m \cdot n)$, kas ir visu iespējamo nobīžu matrica.

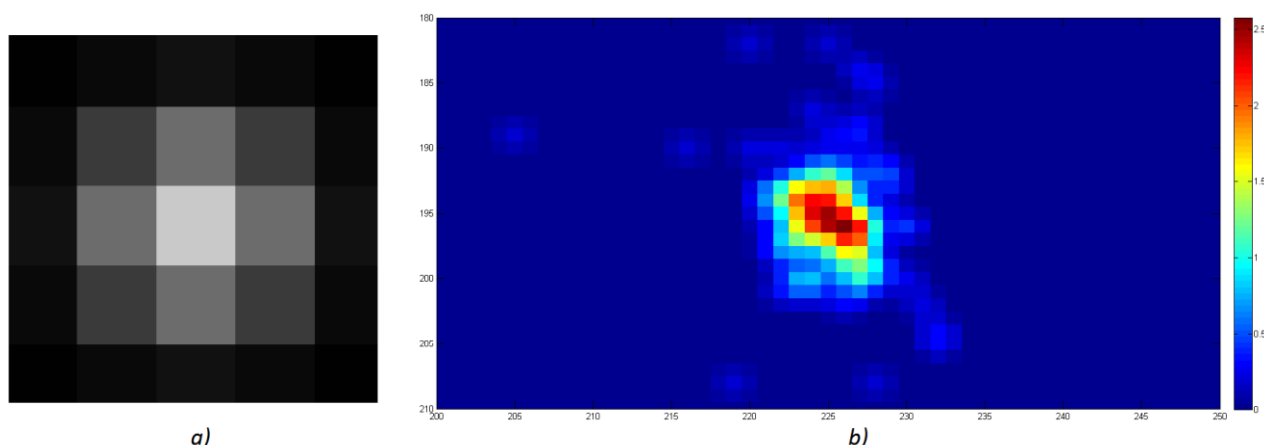
Pārāk lielas nobīdes (virs 200 pikseļiem x vai y virzienā) matricā **N** tiek ignorētas, pieņemot, ka šādas nobīdes ir maz ticamas. Visi pārējie **N** punkti tiek lietoti, lai izveidotu jaunu attēlu (att. 3.4). Sākotnēji jaunajā attēla visiem pikseļiem ir nulles vērtības. Katra **N** punkta x un y koordinātes tiek lietotas, lai attiecīgā pikseļa vērtību jaunajā attēlā palielinātu par konkrētu lielumu. Līdz ar to, ja vairākas nobīdes **N** ir vienādas, jaunajā attēlā pikselim ar šai nobīdei atbilstošām koordinātēm būs lielāka vērtība. Tā kā nobīdes pa x un y asi var būt arī negatīvas, tad patiesībā jaunā attēla punktu koordinātes ir nobīdītas par 200 pikseļiem pa x un y asi (jaunā attēla pikselis (1, 1) atbilst nobīdei **N** matricā (-200, -200)). Jaunā attēla asis atbilst iespējamām nobīdēm pa x un y asi, savukārt pikseļu intensitāte norāda uz konkrētās nobīdes ticamību. Pikselis ar lielāko vērtību, visticamāk, norāda uz meklēto nobīdi. Šī pikseļa atrašanās vietu var efektīvi atrast ar funkciju *max()*.



Att. 3.4. Iespējamo nobīžu attēls, kur pikseļa intensitāte norāda uz konkrētas nobīdes biežumu starp pirmā un otrā ieejas attēla raksturīgajiem punktiem.

Vairākas nobīdes matricā **N** var būt ļoti tuvas, tomēr atšķirīgas viena no otras trokšņu un dažādu kameras kustību dēļ. Attēlā 3.4 var novērot, ka pastāv divas tuvas un ļoti ticamas iespējamās labākās nobīdes. Lai vidējotu šādu tuvu nobīžu ietekmi attēla 3.4 veidošanā, tika pieņemts, ka viena pikseļa vietā katrs **N** punkts ietekmē lielāku apgabalu iespējamo nobīžu telpā. Šīs ietekmes imitēšanai izmantots Gausa formas elements. Tas nozīmē, ka katra **N** punkta balss papildina nobīžu attēlu ar 3.5.a attēlā parādītā Gausa formas elementa vērtībām konkrētā punkta apkārtnē, nevis ar vienu pikseļa balsi kā iepriekš. Šādā veidā iegūtais rezultāts parādīts att. 3.5.b, kurā tad tiek meklēts

globālais maksimums. Konkrētajā piemērā meklētā nobīde starp ieejas attēliem ir $227-200 = 27$ pikseļi pa X asi un $196-200 = -4$ pikseļi pa Y asi.



Att. 3.5. (a) Gausa formas elements, ko lietojam viena pikseļa vietā, b) nobīžu attēls, kas iegūts, lietojot Gausa formas elementu.

3.3.3. Jaunā reģistrācijas algoritma lietošana

Lai MATLAB vidē lietotu jauno reģistrēšanas algoritmu, nepieciešami projektā izstrādātie koda faili: *pcmRegistration.m*; *findLocalMinMax2.m*; *findPoints.m*; *matchPoints.m*; *loadDirImages.m*. Tad to var izsaukt dažādos veidos, izmantojot sekojošas komandas:

```
>> pcmRegistration( pathOrImages )
```

- Kā ieejas parametru *pathOrImages* var padot mapi, kur atrodas attēli, piemēram, *pathOrImages* = 'C:\Atteli\3-1\'. Šādā gadījumā reģistrētie attēli tiks automātiski saglabāti jaunā mapē 'C:\Atteli\3-1 reg\'. Parametrs *pathOrImages* var būt arī *cell* tipa mainīgais, kur katrā šūnā ir attēls. Vēl ieejas parametrs var būt *mat* tipa mainīgais, kurā ir visu viļņa garumu attēli no konkrētā mērījuma. Ja ieejā ir šādā veidā padoti attēli nevis mapes adrese, tad reģistrētie attēli netiek saglabāti uz cietā diska.

```
>> imagesReg = pcmRegistration( pathOrImages )
```

- Šajā gadījumā programma izvada *cell* tipa mainīgo *imagesReg* ar reģistrētajiem attēliem.

```
>> imagesReg = pcmRegistration( pathOrImages, showResult )
```

- Ja papildus ieejas mainīgais *showResult* == *true*, tad pēc algoritma izpildes MATLAB video veidā attēlo reģistrācijas rezultātu.

```
>> imagesReg = pcmRegistration( pathOrImages, showResult, outputPath )
```

- Trešais neobligātais parametrs *outputPath* ir mape, kurā var konkrēti norādīt rezultātu saglabāšanas adresi. Ja pirmais ieejas parametrs bija ieejas attēlu atrašanās vieta, tad ar trešo ieejas parametru var mainīt rezultātu saglabāšanas vietu. Ja *pathOrImages* ir attēli, nevis mape, tad rezultātu saglabāšanu failos var nodrošināt, tikai lietojot ieejas parametru *outputPath*.

4. Augstas kvalitātes klasifikācijas metodes izstrāde, izmantojot informāciju no neliela skaita spektra joslām

Iepriekšējā posma pārskatā [4] aprakstīta klasifikatora izstrāde melanomu atšķiršanai no dzimumzīmēm, izmantojot 3 spektra joslu datus. Pārskata posmā pētījumi papildināti ar joslu informativitātes un savstarpējās korelācijas analīzi, kas ļauj mērķtiecīgi izvēlēties izmantojamās spektra joslas. Veikta klasifikatora kvalitātes analīze, kā arī iegūti eksperimentāli rezultāti, izmantojot tikai 2 spektra joslu datus.

4.1. Izmantojamo spektra joslu atlases principi

Kā jau aprakstīts iepriekšējā posma pārskatā, melanomu-nēvusu klasifikators tika veidots kā sliekšņa tipa klasifikators. Tā kā mūsu rīcībā ir m melanomu attēli, sanumurēti secībā no 1 līdz m , un n nēvusu attēli - no 1 līdz n , apzīmējam p -tās melanomas pikseļu optisko blīvumu vidējo vērtību j -tajā spektra joslā ar $\mu_j(p)$, bet ar $\nu_j(q)$ - q -tā nēvusa pikseļu optisko blīvumu vidējo vērtību j -tajā joslā. Tālāk ar $s_j(p)$ apzīmējam p -tās melanomas pikseļu optisko blīvumu sadalījuma standartnovirzes vērtību j -tajā joslā, bet ar $\sigma_j(q)$ - q -tā nēvusa pikseļu optisko blīvumu sadalījuma standartnovirzes vērtību j -tajā joslā. Definējam

$$a_{j1} = \min_{p=1,m} \mu_j(p), a_{j2} = \max_{q=1,n} \nu_j(q), b_{j1} = \min_{p=1,m} s_j(p), b_{j2} = \max_{q=1,n} \sigma_j(q) \quad (1)$$

Kā jau tas bija sagaidāms, izrādījās, ka visiem $j = \overline{1,51}$ $a_{j1} < a_{j2}$ un $b_{j1} < b_{j2}$. Projektējamā klasifikatora sliekšņi tika meklēti pēc šāda principa: par j -tās joslas sliekšni Δ_j tika izvēlēts reāls skaitlis Δ , $a_{j1} < \Delta < a_{j2}$, kas deva mazāko vērtību kopu $U_{j1}(\Delta)$ un $U_{j2}(\Delta)$ apjomu summai, t.i., $|U_{j1}(\Delta)| + |U_{j2}(\Delta)|$, kur $U_{j1}(\Delta) = \{\mu_j(p) \mid \mu_j(p) < \Delta\}$, $U_{j2}(\Delta) = \{\nu_j(q) \mid \nu_j(q) \geq \Delta\}$. Analogi tika definēti sliekšņi Δ' spektrālo joslu standartnovirzēm. Reālo skaitli Δ'_j izvēlējamies par sliekšni j -tās joslas standartnovirzēm, ja $b_{j1} < \Delta' < b_{j2}$ un $|V_{j1}(\Delta')| + |V_{j2}(\Delta')|$ vērtība ir minimāla salīdzinājumā ar citām iespējamām Δ' vērtībām, kur $V_{j1}(\Delta') = \{s_j(p) \mid s_j(p) < \Delta'\}$, $V_{j2}(\Delta') = \{\sigma_j(q) \mid \sigma_j(q) \geq \Delta'\}$.

Ja melanomu un nēvusu detektēšanas pamatā liktu tikai vienas spektra joslas sniegto informāciju, tad par informativitātes rādītāju konkrētai joslai j , $1 \leq j \leq 51$, varētu kalpot skaitļu pāris (g_j, h_j) , kur

$$g_j = |U_{j1}(\Delta_j)| + |U_{j2}(\Delta_j)| \quad (2)$$

un

$$h_j = |V_{j1}(\Delta'_j)| + |V_{j2}(\Delta'_j)|. \quad (3)$$

Protams, šo rādītāju vērtības nav kaut kas absolūts, jo skaitļu g_j un h_j aprēķinu pamatā ir mūsu rīcībā esošie 32 melanomu un 94 nēvusu attēli. Aprēķinātie joslu informativitātes rādītāji prezentēti 1.tabulā. Pilnīgu sakārtojumu šajā datu kopā varētu panākt ar nosacījumu, ka pāris (g_k, h_k) seko aiz pāra (g_j, h_j) , ja $h_k > h_j$ vai $h_k = h_j$ un $g_k > g_j$. Pie šo nosacījumu izpildes varētu rakstīt: $(g_j, h_j) < (g_k, h_k)$. Tātad augstāka informativitāte tiks piedēvēta joslām, kuras atradīsies šī sakārtojuma sākumā.

1.tabula. Joslu informativitātes rādītāji un klasifikatoros izmantotie sliekšņi.

Josla	g	h	Δ_1	Δ_2
1	12	8	9322	852
2	12	8	9866	746
3	14	6	10164	823
4	13	6	10042	847
5	13	4	10234	958
6	12	4	10666	994

7	13	4	10317	1139
8	13	4	10272	1154
9	13	4	9948	1163
10	12	4	10214	1083
11	12	4	10044	1098
12	12	4	9868	1106
13	11	4	9947	1105
14	11	4	9613	1212
15	11	4	8779	1270
16	10	5	8257	1096
17	11	5	7629	1137
18	11	4	7533	1243
19	11	4	7282	1215
20	11	4	6533	1181
21	11	4	6421	1140
22	11	4	6045	1044
23	11	3	5630	1061
24	10	3	5533	1028
25	10	4	5300	878
26	10	4	5077	840
27	10	4	4670	860
28	9	4	4720	903
29	9	4	4574	879
30	9	4	4432	843
31	10	4	4186	810
32	9	5	4323	676
33	9	5	4158	641
34	9	5	4026	604
35	10	5	3891	572
36	11	5	3822	549
37	12	6	3705	495
38	12	6	3635	501
39	13	6	3476	487
40	14	7	3341	453
41	14	8	3412	414
42	14	9	3359	400
43	13	10	3461	390
44	15	10	3387	391
45	17	11	3423	371
46	17	11	3534	362
47	18	11	3586	333
48	19	12	3744	322
49	20	13	3794	309
50	22	14	3664	315
51	24	13	3799	344

1.tabulas dati rāda, ka mūsu izvēlētais spektrālo joslu trijnieks satur divas joslas, kuras atrodas tuvu šāda sakārtojuma sākumam. Tās ir 10. un 20. josla, kuras prezentē skaitļu pāri $g_{10} = 12$, $h_{10} = 4$, $g_{20} = 11$, $h_{20} = 4$.

Interesanti atzīmēt, ka šīs divas joslas (10. un 20.) gandrīz precīzi atbilst tām divām joslām, kuras savā pētījumā kā informatīvas izvirzītas darbā [2]. Tā kā 40. joslas raksturlielumu pāris $g_{40} = 14$, $h_{40} = 7$, tad šīs joslas iekļaušana komplektā kļūst diskutabla. Taču jāņem vērā, ka komplektā iekļautajām joslām jābūt ar savstarpēji papildinošu informāciju. Ja divu joslu korelācija ir pozitīva un tuvu 1, to abu iekļaušana vienā komplektā jāvērtē kā slikti motivēta pat tajā gadījumā, kad to individuālā informativitāte ir augsta.

4.2. Spektra joslu korelētības novērtēšana

Kvantitatīvs šādas korelētības novērtējums tomēr saistīts ar zināmām problēmām. Pats primitīvākais j -tās un k -tās joslas korelētības rādītājs $corr(j, k)$ aprēķināms pēc formulas

$$corr(j, k) = \frac{1}{|j - k|}. \quad (3)$$

Jau krietni saturīgāks $corr(j, k)$ būtu aprēķināms pēc formulas

$$corr_M(j, k) = \frac{\sum_{p=1}^m (m-1)^{-1} (\mu_j(p) - \bar{\mu}_j) \cdot (\mu_k(p) - \bar{\mu}_k)}{s_j \cdot s_k}, \quad (4)$$

kur

$$\bar{\mu}_j = \frac{1}{m} \sum_{p=1}^m \mu_j(p); \quad \bar{\mu}_k = \frac{1}{m} \sum_{p=1}^m \mu_k(p),$$

$$s_j^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{p=1}^m (\mu_j(p) - \bar{\mu}_j)^2, \quad s_k^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{p=1}^m (\mu_k(p) - \bar{\mu}_k)^2.$$

Analoģisku $corr(j, k)$ varam izskaitļot attiecībā uz nēvusu kopu, t.i., izskaitļot $corr(j, k)$ pēc formulas

$$corr_N(j, k) = \frac{\sum_{q=1}^n (n-1)^{-1} (v_j(q) - \bar{v}_j) \cdot (v_k(q) - \bar{v}_k)}{\sigma_j \cdot \sigma_k}. \quad (5)$$

No atsevišķajiem joslu j un k korelētības novērtējumiem varam veidot vienotu $corr(j, k)$ pēc formulas

$$corr(j, k) = \frac{m \cdot corr_M(j, k) + n \cdot corr_N(j, k)}{m + n} \quad (6)$$

Iespējamais joslu pāru skaits mūsu gadījumā ir $C_{51}^2 = 1275$. No visa pāru skaita $corr(j, k)$ tika aprēķināts šādiem pāriem: (10, 11), (10, 12), ..., (10, 30) un (20, 21), (20, 22), ..., (20, 40). Aprēķinu rezultāti prezentēti 2.tabulā.

2.tabula. Spektra joslu korelācijas koeficienti.

Korelācijas koeficienti melanomām $corr_M$

j/k	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
10	1,00	1,00	0,99	0,97	0,96	0,93	0,91	0,89	0,87	0,86

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
10	0,84	0,83	0,82	0,81	0,81	0,80	0,79	0,77	0,77	0,76

j/k	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
20	1,00	1,00	0,99	0,99	0,99	0,97	0,96	0,96	0,95	0,95
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
20	0,94	0,93	0,93	0,92	0,90	0,89	0,87	0,84	0,81	0,78

Korelācijas koeficienti piepaceltiem nevusiem $corr_N$

j/k	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
10	0,999	0,997	0,994	0,990	0,983	0,967	0,953	0,944	0,939	0,933
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
10	0,927	0,924	0,919	0,913	0,909	0,905	0,902	0,899	0,892	0,887

j/k	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
20	0,999	0,998	0,997	0,994	0,991	0,987	0,982	0,976	0,969	0,962
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
20	0,952	0,941	0,925	0,903	0,878	0,846	0,817	0,783	0,745	0,705

Korelācijas koeficienti plakaniem nevusiem $corr_N$

j/k	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
10	0,999	0,998	0,996	0,993	0,986	0,972	0,958	0,952	0,948	0,943
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
10	0,938	0,933	0,927	0,923	0,919	0,917	0,912	0,908	0,901	0,898

j/k	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
20	1,000	0,999	0,997	0,995	0,992	0,989	0,985	0,982	0,977	0,972
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
20	0,967	0,961	0,955	0,946	0,937	0,926	0,917	0,906	0,894	0,880

Tā kā $corr_M(10, 20) = 0,86$, tad varam uzskatīt, ka joslu 10 un 20 informācijas viena otru nedaudz papildina. Jau nopietnāku savstarpējo papildinājumu sniedz joslu pāris (10, 30), jo $corr_M(10, 30) = 0,76$. Par attaisnojumu iekļaut 40. joslu tripletā (10, 20, 40) var kalpot $corr_M(20, 40) = 0,78$, $corr_N(20, 40) \leq 0,88$. Acīmredzot savstarpēju informācijas papildinājumu sniedz arī joslu triplets (10, 20, 30). Šādam risinājumam par labu runā arī fakts, ka $corr_N(20, 30) \leq 0,98$.

Pārskata periodā tika uzlabota klasifikatorā izmantoto sliekšņu noteikšanas metode un sliekšņi tika precizēti (to vērtības norādītas 1.tabulā). Izmantojot šīs sliekšņu vērtības un joslu tripletu (10, 20, 30) bez joslu paplašināšanas, izveidotais klasifikators pareizi noteica visas melanomas, bet kļūdaini pieskaitīja melanomām arī 4 nēvus. Gadījumā, kad joslas tika paplašinātas līdzīgi kā darbā [4, sadaļa 4.1] apvienojot pamatjoslas ar blakus esošajām joslām un nosvarojot tās ar koeficientiem 0,25; 0,5; 0,25, iegūtais klasifikators ļāva pareizi noteikt visas melanomas un kļūdaini pieskaitīja melanomām tikai 1 nēvu. Tas uzskatāms par klasifikatora labas kvalitātes apliecinājumu, lai gan iegūts, izmantojot vienus un tos pašus attēlus klasifikatora konstrukcijai un pārbaudei.

4.3. Klasifikācijas kvalitātes jautājumi

Melanomu un nēvusu diskriminācijas procedūru iespējams veidot ne tikai kā sliekšņu tipa klasifikatoru, bet arī kā SVM dizainu. Šo variantu savā pētījumā izmantojuši publikācijas [3] autori. Lai gan viņu iegūtais rezultāts (diskriminators, kas balstīts uz 9 spektra joslām), sasniedz vērā ņemamu sensitivitātes un specifitātes vērtējumu (sensitivitāte 1 un specifitāte 0,72), tas tomēr nav uzskatāms par pēdējo vārdu šajā problemātikā – diskriminatoru veidošanā, kas balstītos uz nedaudzu spektrālo joslu sniegto informāciju. Mūsu pētījumā spektra joslu skaits samazināts trīs reizes un tāad sastāv no tikai 3 spektra joslām. Svara koeficienti, kuri pierakstīti raksturlielumu (vidējo vērtību un standartnoviržu) indikācijām, noteikti uz sekojoša postulāta pamata: standartnoviržu informativitāte visumā ir augstāka par vidējo vērtību informativitāti.

Diskutablais jautājums par dizaina un testa kopu sakritību vai atšķirību mūsu gadījumā atrisināms atkarībā no izvēlēta skatupunkta. Ja klasifikatora spektra joslu komplekts un sliekšņu Δ_j un Δ'_j vērtības noteiktas, izejot no mūsu rīcībā esošām melanomu un nēvusu attēlu kopām A un B, bet pēc tam šis klasifikators testēts uz A un B bāzes, tad dizaina un testa kopas sakrīt. Ja turpretī spektra joslu komplekts un klasifikatora sliekšņi Δ_j un Δ'_j izvēlēti neatkarīgi no A un B datiem, bet konkrēta klasifikatora kvalitāte tiek testēta, izmantojot A un B datus, tad A un B veido tikai testa kopu pāri, un iegūtie klasifikācijas rezultāti kalpo par pamatu konkrētā klasifikatora kvalitātes vērtējumam. Par kvalitatīvāko atzīsim to, kuram sensitivitātes un specifitātes novērtējumi būs augstāki.

Lai klasifikatoru pielietojumu eksperimentā iegūtos rezultātus varētu izmantot sensitivitātes un specifitātes statistiskos punktveida novērtējumos, mums jāpieņem šāds reālo situāciju idealizējošs postulāts: konkrēta klasifikatora pielietojums katrai melanomai (resp., katram nēvusam) raksturojas ar vienu un to pašu kļūdīšanās varbūtību p_M (resp., q_N). Tādā gadījumā sensitivitātes (resp., specifitātes) statistiskais novērtējums dotajam klasifikatoram būs aprēķināms pēc maksimālās patīkamības principa. Ja, piem., klasifikators no 32 melanomām nepareizi klasificē vienu, tad sensitivitātes novērtējums $\hat{s}_{w_1}$ būs vienāds ar $1 - 1/32 = 0,9687$, bet ja tas no 94 nēvusiem nepareizi klasificēja piecus, specifitātes novērtējums pēc maksimālās patīkamības principa $\hat{s}_{p_{w_1}} = 1 - 5/94 = 0,9468$.

Gadījumā, ja visas 32 melanomas klasificētas pareizi, uz eksperimentu rezultātu pamata klasifikatora sensitivitāte nav novērtējama pēc maksimālās patīkamības principa/metodes, jo funkcijas p^{32} , kas definēta segmentā $[0,1]$ neeksistē maksimuma punkts. Vienlaikus atzīmēsim, ka šāds klasifikācijas rezultāts ar pietiekami lielu varbūtību realizēsies arī tad, ja īstā sensitivitāte būs 0,99. Šāda notikuma varbūtība ir lielāka vai vienāda ar 0,7249. Bet īstā sensitivitāte nevar būt mazāka par 0,85, jo šāda notikuma varbūtība mazāka par 0,0055.

Lai gan daži autori [3] runā par viņu izveidoto klasifikatoru sensitivitātes vērtību 1, šāda apgalvojuma pamatojums nav iegūstams no konkrēta eksperimenta rezultātiem. Tā, piemēram, ja klasifikators 7 melanomas eksperimentā klasificē kā melanomas, tad sensitivitātes novērtējums $\hat{s} = 1$ uzskatāms par ļoti apšaubāmu sensitivitātes novērtējumu, jo šādu eksperimenta rezultātu ar pietiekami augstu varbūtību iespējams iegūt arī tad, ja īstais sensitivitātes rādītājs būtu 0,96. Šī varbūtība lielāka par 0,75. Par 100% -tīgu sensitivitāti varam runāt tikai tajā gadījumā, ja šāds rādītājs nopamatots teorētiski, balstoties uz noteiktiem fizikāliem parametriem.

4.4. Klasifikācija no divu spektra joslu datiem

Ņemot vērā, ka korelācijas koeficients joslu pārim (10,30) attiecībā uz melanomām ir 0,76, interesi izraisa klasifikators, kura pamatā būtu tikai šīs divas joslas. Šo joslu sliekšņu vērtības Δ_j un Δ'_j

atrodamas 1.tabulā (joslu informativitātes tabulā). Formulējam klasifikācijas kārtulu ar nosacījumu, ka attēls tiek klasificēts kā melanoma tad un tikai tad, ja

$$\sum_{j \in \{10, 30\}} (0.24 I(\alpha_j) + 0.26 I(\beta_j)) \geq 0.48, \quad (7)$$

kur α_j, j piederīgs pie $\{10, 30\}$, ir apskatāmās melanomas vai nēvusa pikseļu optiskā blīvuma vidējā vērtība j -tajā joslā, bet β_j, j piederīgs pie $\{10, 30\}$, ir standartnovirzes vērtība j -tajā joslā, bet $I(\alpha_j), I(\beta_j)$ – izteikumu $\alpha_{10} \geq \Delta_{10}, \alpha_{30} \geq \Delta_{30}, \beta_{10} \geq \Delta'_{10}, \beta_{30} \geq \Delta'_{30}$ vērtības (=1, ja izteikums ir patiess, =0, ja aplams). Apzīmēsim šo klasifikatoru ar simbolu w_3 . Ja līdzīgi kā darbā [4, sadaļa 4.1] apvienojam pamatjoslas ar blakus esošajām joslām, nosvarojot tās ar koeficientiem 0,25; 0,5; 0,25, tad iegūstam klasifikatoru w'_3 . Šo klasifikatoru pielietojumi mūs rīcībā esošajiem melanomu un nēvusu attēliem pie manuālās segmentācijas deva šādus rezultātus: abi klasifikatori visas melanomas klasificēja pareizi, klasifikators w_3 nepareizi klasificēja 10 nēvusos, bet klasifikators w'_3 nepareizi klasificēja 6 nēvusos. Jāsecina, ka divu spektrālo joslu izmantošana klasifikācijas kvalitāti tomēr samazina. Jāievēro, ka specifitātes punktveida novērtējums šajā gadījumā būs ne mazāks par 0,89.

4.5. Metodes izmantošana vairāku attēlu iegūšanas tehnoloģiju datu kopīgai izmantošanai

Jāatzīmē, ka izstrādātā klasifikācijas metode ļauj kopīgi izmantot attēlus, kas iegūti, izmantojot dažādas tehnoloģijas. Tā kā ādas veidojumu statistiskie raksturlielumi tiek iegūti neatkarīgi katram konkrētās spektra joslas attēlam, netiek ieviesti ierobežojumi attiecībā pret atsevišķu attēlu iegūšanas veidu. Piemēram, klasifikācijai var izmantot arī pētāmo objektu fluorescences attēlus. Lai klasifikācijā izmantotu šo attēlu sniegto informāciju, tajos jāsegmentē tie paši pētāmie objekti, jānosaka objektu pikseļu vidējās vērtības un standartnovirzes un jāaprēķina klasifikatorā izmantojamās sliekšņu vērtības, izmantojot apmācībai pieejamos attēlus. Ja tas paveikts, var izveidot klasifikatoru, kura lēmuma kārtulā tiek ņemtas vērā attiecīgo izteikumu vērtības. Papildus tam, katra klasifikācijai izmantota attēla izteikumu vērtībām var piemērot svara koeficientus, ar kuru palīdzību var ņemt vērā šī attēla informativitāti, kas saistīta ar tā iegūšanas tehnoloģijas īpatnībām. Šāda pieeja ir vispārīga un to var izmantot dažādu klasifikācijas uzdevumu risināšanai gan biomedicīnā, gan arī citās pielietojumu jomās.

5. Elektroforēzes un sonoforēzes efektivitātes novērtēšana, izmantojot fluorescences multispektrālos attēlus

Elektroforēze un ultraskaņas ierosināta sonoforēze var tikt izmantota DNS plazmīdu ievadīšanai šūnās, kas paver jaunas iespējas gēnu terapijā un vēža ārstēšanā. Tomēr minētās metodes joprojām ir izpētes stadijā – ir nepieciešams vairāk eksperimentālo datu, lai izskaidrotu DNS ievadīšanas mehānismu, kā arī novērtētu efektivitāti. Projekta ietvaros tika pētītas vienkāršas un lētas biomedicīniskās attēlošanas tehnoloģijas, kas ļauj neinvazīvi novērtēt proteīnu ievadīšanu šūnās reālā laikā, tādējādi samazinot izmantojamo dzīvnieku skaitu laboratorijas pētījumos. Izveidotā multimodālā maketierīce tika izmantota fluorescences attēlošanas režīmā, lai novērtētu zaļā fluorescējošā proteīna (GFP) ievadīšanas efektivitāti peles *tibialis cranialis* muskuļa šūnās.

Fluorescences spektrālā attēlošana un arī punkta mērījumi tika izmantoti *in vivo* GFP fluorescences intensitātes novērtēšanai. Spektrālo attēlu apstrādes rezultātā tika iegūti GFP ievadīšanas efektivitāti raksturojoši parametri – GFP fluorescences intensitāte, fluorescējošās virsmas laukums. Tika novērota pozitīva korelācija starp fluorescences intensitāti *in vivo* un *in vitro*, kā arī fluorescējošo muskuļa šķiedru skaitu (terapijas pozitīvo rezultātu), kas demonstrēja fluorescences spektrālās attēlošanas izmantojamību terapijas efekta uzticamai un neinvazīvai novērtēšanai. Tādējādi ir iespējams monitorēt GFP fluorescences kinētiku interešu objektos visā to dzīves garumā.

Tika demonstrēta arī vienkārša un lēta fluorescences attēlošanas maketierīce, kuras pamatā ir krāsu kamera, lāzers un optiskie filtri, tādējādi aizvietojot dārgos komerciālos risinājumus, piemēram, CSB Xenogen IVIS Imaging System 100, CRI Maestro system, Leica FCM 1000.

Minētajos pētījumos tika demonstrēts, ka elektroforēze un sonoforēze ir efektīvas terapijas metodes zāļu/gēnu ievadīšanai šūnās. Tika novērots, ka labāku terapijas rezultātu (intensīvāku GFP fluorescences signālu, tātad arī labāku proteīnā ievadīšanu šūnā) var novērot, izmantojot elektroforēzi, jo īpaši vienu augsta sprieguma elektrisko impulsu (800 V/cm, 0.1 ms).

Vairāk informācijas par minēto pētījumu var rast zinātniskā publikācijā (kopija atrodama arī 1. pielikumā):

M. Tamošiūnas; D. Jakovels; A. Ļihačovs; A. Kilikevičius; J. Baltušnikas, et al. "Application of fluorescence spectroscopy and multispectral imaging for non-invasive estimation of GFP transfection efficiency", Proc. SPIE 9421, Eighth International Conference on Advanced Optical Materials and Devices (AOMD-8), 94210M (October 22, 2014); doi:10.1117/12.2083895; <http://dx.doi.org/10.1117/12.2083895>

6. Lāzerspeklu attēlošanas ierīce uz mobilā telefona bāzes

Asins plūsmas, perfūzijas novērtēšana ir svarīgs parametrs ādas stāvokļa novērtējumam, kā arī sniedz informāciju par kopējo asinsrites stāvokli. Lāzera Doplera perfūzijas attēlošana (Laser Doppler perfusion imaging – LDPI) un lāzerspeklu kontrasta attēlošana (Laser speckle contrast imaging – LASCI) ir optikas tehnoloģijas ādas perfūzijas novērtēšanai, kas īstenotas arī komerciālos produktos. Tomēr pieejamās LDPI un LASCI ierīces ir dārgas un samērā lielas izmēros, lai būtu plaši pieejamas. Minēto tehnoloģiju īstenošanai uz mobilā telefona bāzes būtu potenciāls primārajā diagnostikā.

Projekta ietvaros tika izstrādāta un demonstrēta vienkārša un lēta LASCI sistēma, kas kalpo kā adapteris mobilajam telefonam. Izveidotā maketierīce tika testēta laboratorijas apstākļos, novērojot pēcoklūzijas hiperēmiju un termālo hiperēmiju, kā arī salīdzināta ar komerciāli pieejamu LDPI sistēmu.

Izveidotās LASCI ierīces pamatā ir 650 nm lāzera modulis. Mērījumu rezultāti demonstrē, ka tā var tikt izmantota primāram ādas stāvokļa monitoringam. Šādas ierīces var arī tikt lietotas izglītošanas nolūkam, piemēram, laboratorijas darbos medicīnas vai medicīnas fizikas studentiem. Salīdzinošajos mērījumos ar LDPI ierīci tika novērots, vienkāršā LASCI ierīce var kalpot kā alternatīva pēcoklūzijas hiperēmijas monitoringam. Siltuma testā bija novērojamas atšķirības starp abām perfūzijas novērtēšanas pieejām, kas demonstrē, ka LASCI sniedz informāciju par asins plūsmu ādas kapilāros, bet LDPI arī no dziļākiem slāņiem.

LASCI ierīce var arī tikt izmantota asins pulsāciju novērošanai. LU ASI iepriekšējos pētījumos demonstrēts, kas pulsa amplitūda var tikt izmantota lokālās anestēzijas iedarbības noteikšanai.

Tomēr LASCI tehnoloģijai ir arī savi trūkumi – tā ir jutīga pret kustībām, pētāmās virsmas izliekumiem un kameras iestatījumiem. Pētāmajam objektam jābūt miera stāvoklī. Vienmērīga lāzera apgaismojuma nodrošināšana joprojām ir izaicinājums, kas ierobežo attēlošanas iespējas. Mobilā telefona kameras pašregulācija var radīt nepatiesu rezultātu, tāpēc nākamais solis ierīces attīstībā būtu mobilā telefona programmas izveide kameras vadībai un datu apstrādei.

Vairāk informācijas par minēto pētījumu var rast zinātniskā publikācijā (kopija atrodama 2. pielikumā):

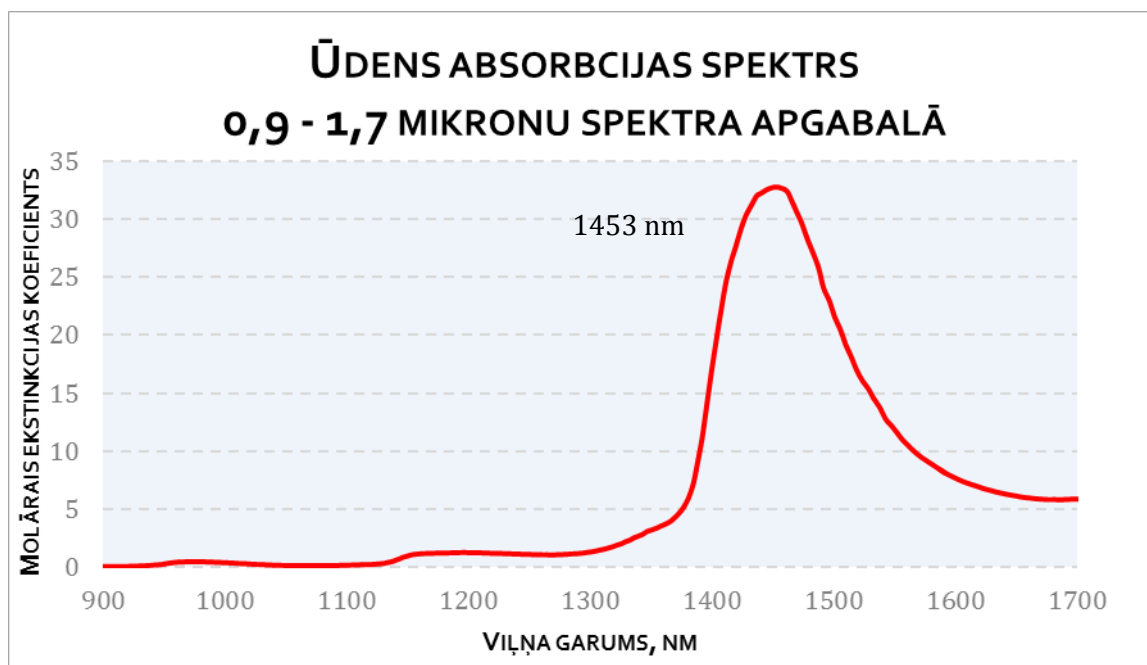
Dainis Jakovels; Inga Saknite; Gita Krievina; Janis Zaharans and Janis Spigulis, "Mobile phone based laser speckle contrast imager for assessment of skin blood flow ", Proc. SPIE 9421, Eighth International Conference on Advanced Optical Materials and Devices (AOMD-8), 94210J (October 22, 2014); doi:10.1117/12.2084681; <http://dx.doi.org/10.1117/12.2084681>.

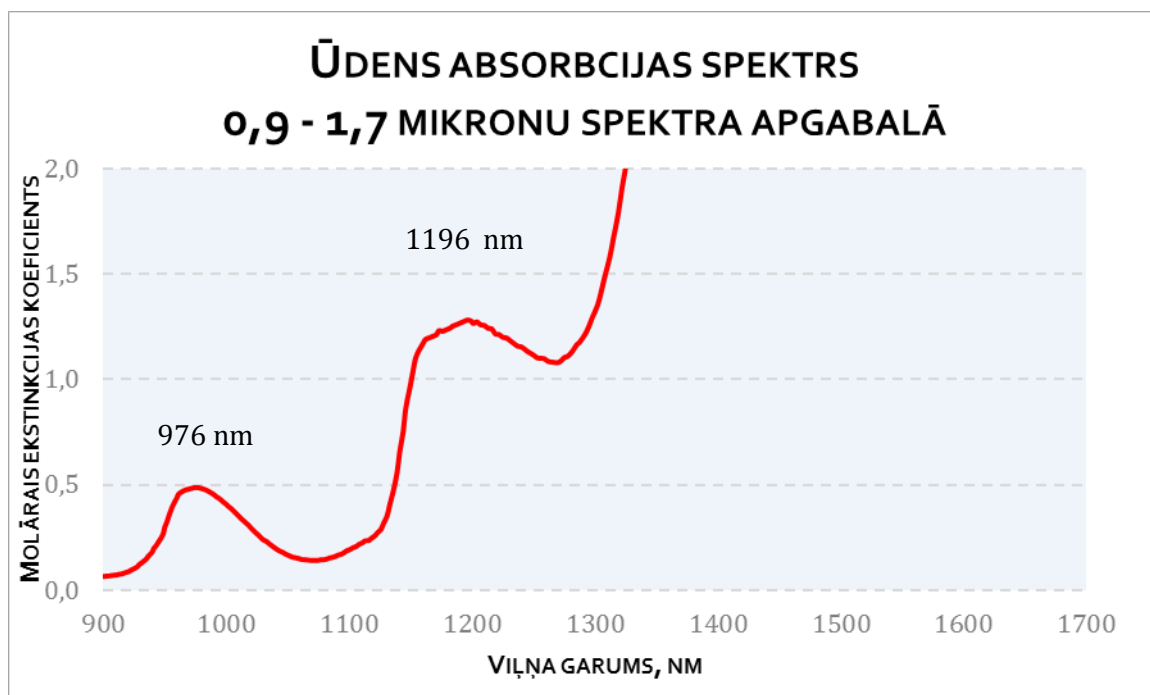
7. Ādas mitruma noteikšana, izmantojot ūdens absorbciju tuvā infrasarkanā spektra apgabalā

Pārskata periodā tika veikti mērījumi ādas mitruma noteikšanai, izmantojot tuvo infrasarkanā spektra apgabalu. Tuvais infrasarkanais spektra apgabals diapazonā no ~1-2 mikrometriem ir ar izteiktiem ar ūdens absorbciju saistītiem maksimumiem un minimumiem. Galvenie absorbcijas maksimumi ir pie 1200 nm, 1450 nm un 1900 nm. Tas nozīmē, ka šis spektra apgabals varētu potenciāli būt izmantojams ādas mitruma noteikšanā, jo ādas absorbcijas spektram vajadzētu mainīties atkarībā no tā, cik daudz ūdens ir ādas virsējos slāņos. Tādējādi salīdzinot, piemēram, ādas absorbcijas spektru 1450 nm apkārtnē, kur novērojams izteikts ar ūdens absorbciju saistīts maksimums, un 1300 nm apkārtnē, kur novērojams ar ūdens absorbciju saistīts minimums, vajadzētu spēt novērtēt relatīvu ādas mitruma parametru. Šī pētījuma mērķis ir atrast tos tuvā infrasarkanā spektra viļņa garumu diapazonus, kurus būtu vislabāk izmantot ādas mitruma novērtēšanai.

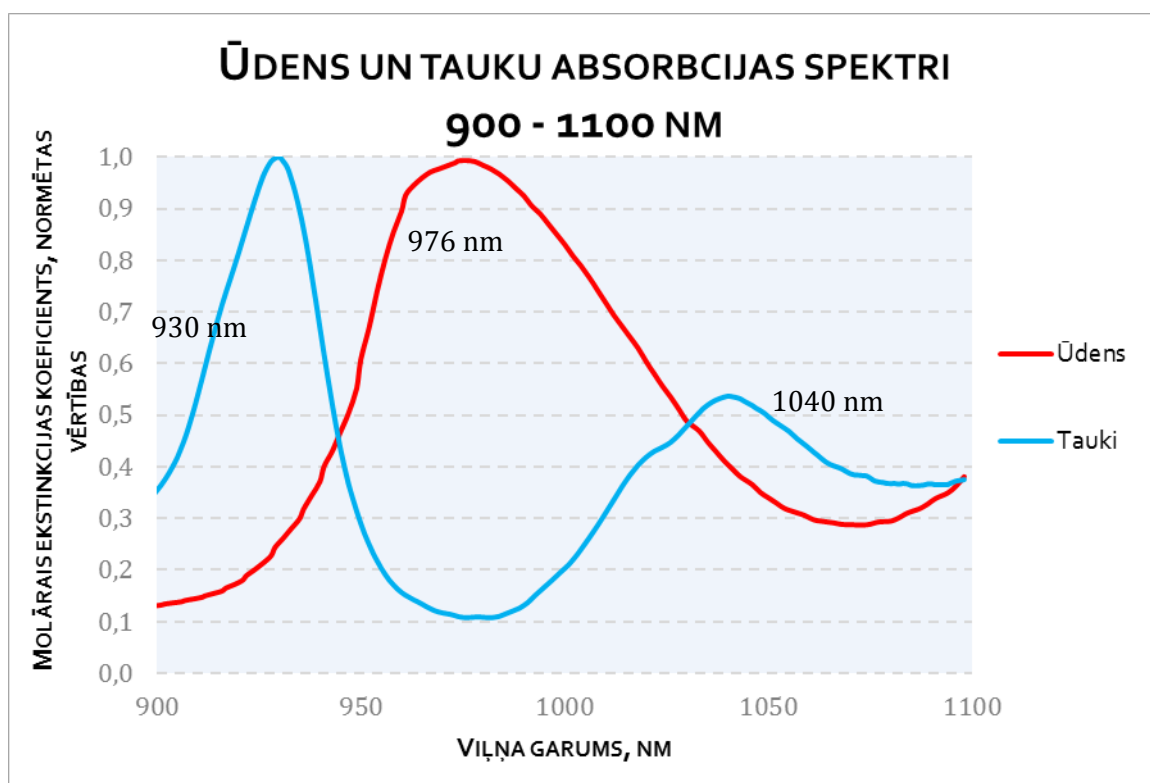
Ādas mitruma neinvazīvai novērtēšanai ir liela praktiska nozīme. Piemēram, kosmētikas industrijā šobrīd nav nekādu iespēju neinvazīvā veidā novērtēt dažādu mitrinošu ādas krēmu iedarbību. Kosmētikas kompānijas ir ieinteresētas šādas metodes izmantošanā, jo tas ļautu tām novērtēt dažādu krēmu efektivitāti un tos salīdzināt.

7.1. Literatūrā atrodamās ūdens ekstinkcijas koeficientu vērtības





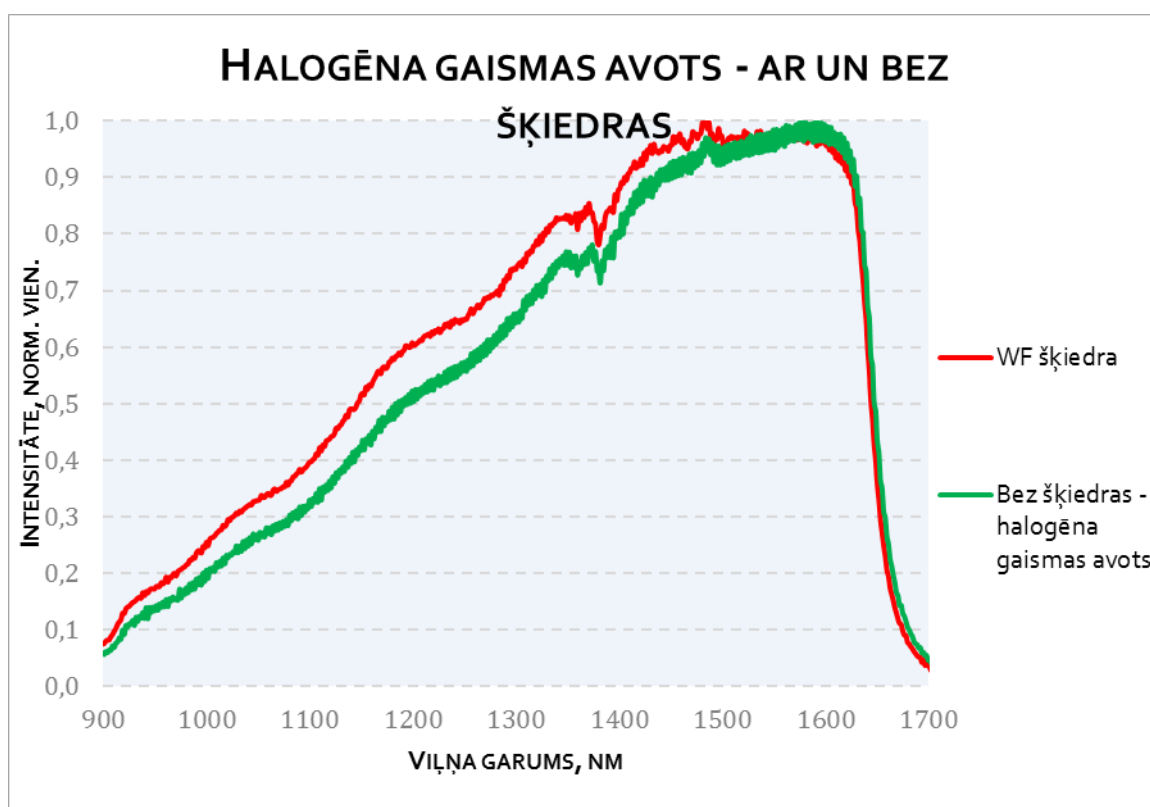
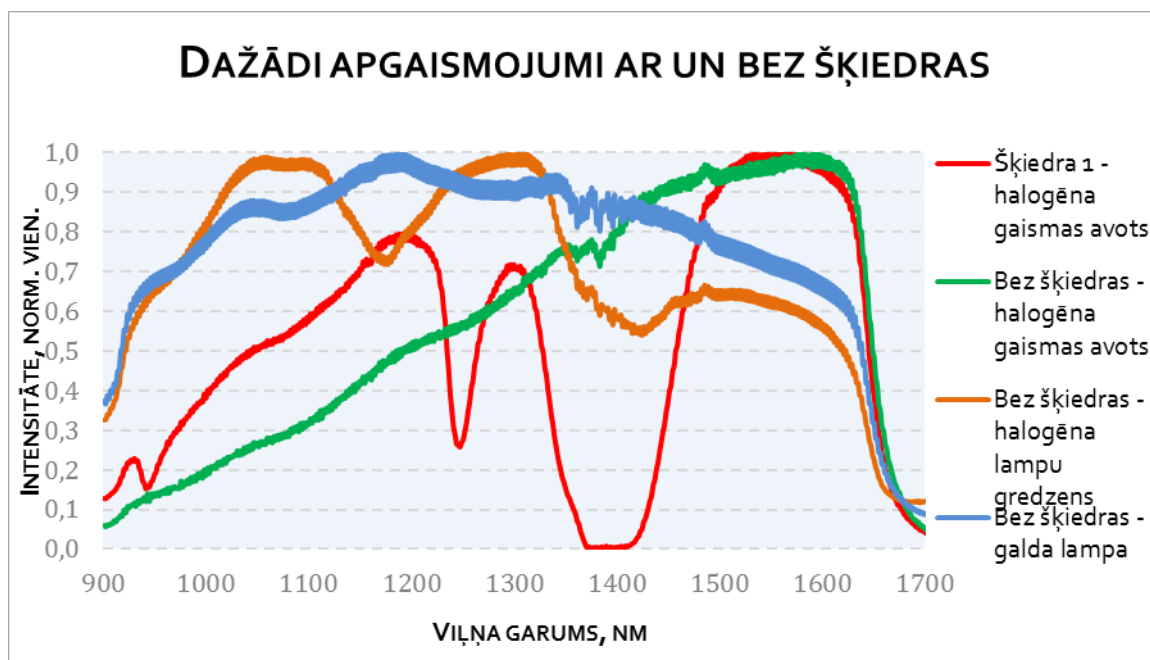
Salīdzinājumam – ūdens un tauku absorbcijas spektri 900 – 1100 nm diapazonā.



7.2. Dažādu optisko šķiedru caurlaidības salīdzinājums

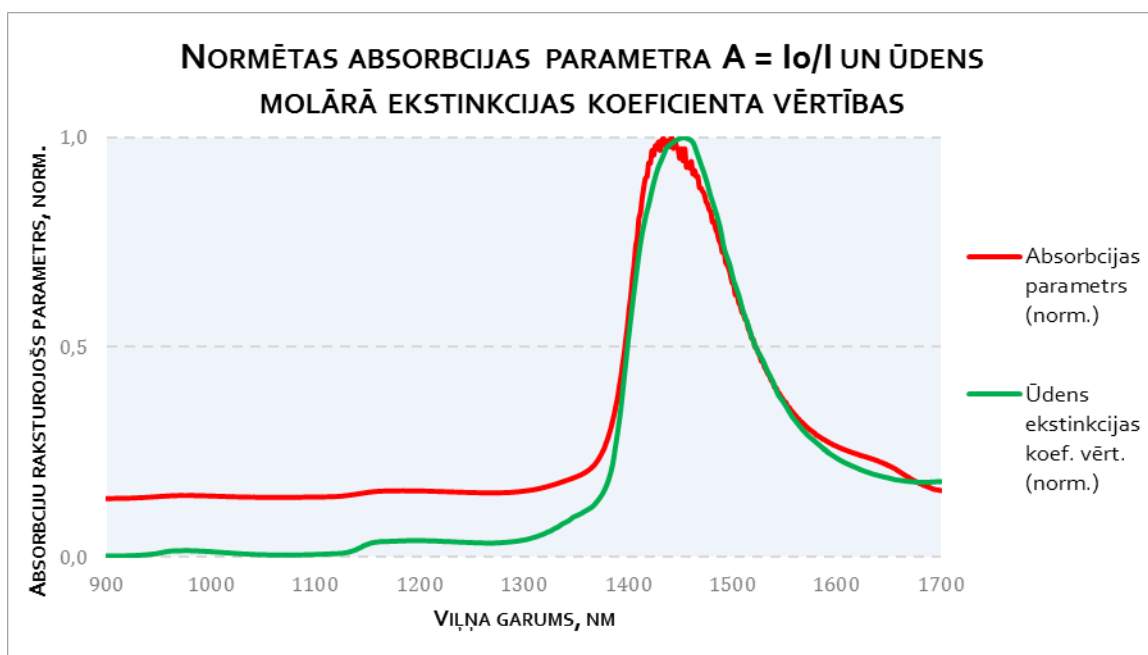
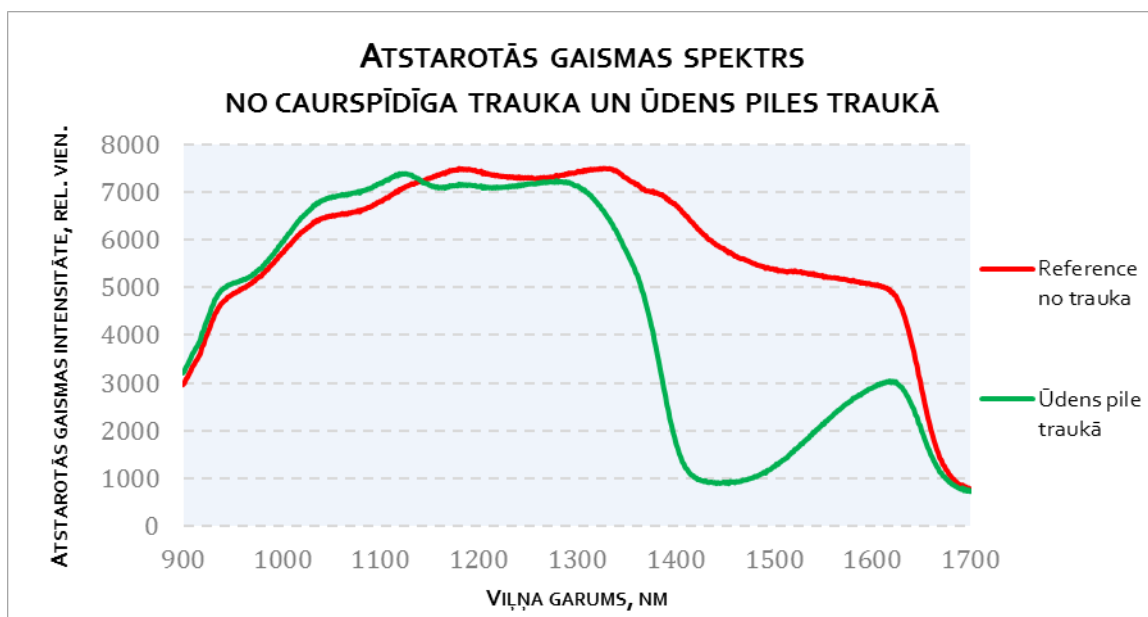
Tā kā ādas mitruma mērījumi notiek tuvajā infrasarkanajā spektra diapazonā un tajos ir jāizmanto optiskās šķiedras, tad sākotnēji tika pārbaudīta dažādu laboratorijā pieejamo šķiedru caurlaidība šajā spektra diapazonā.

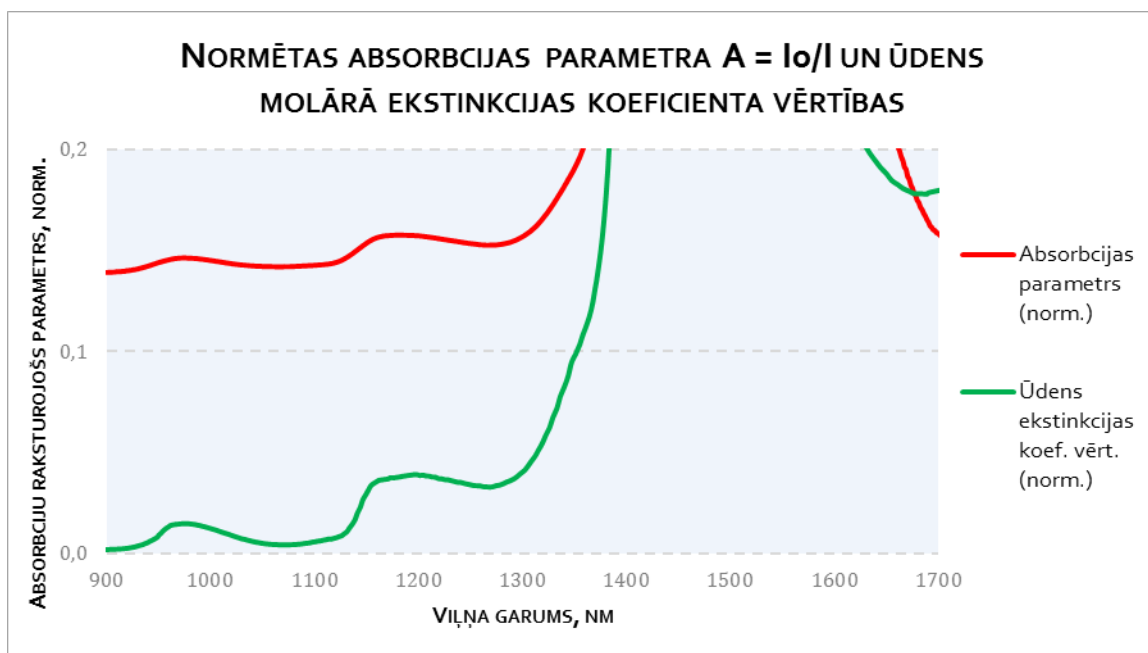
Mērījumiem tika izmantots *Ocean Optics NirQuest512* spektrometrs ar detektēšanas spēju diapazonā 900 – 1700 nm. Tika izmēģinātas dažādas šķiedras; no pieejamajām šim diapazonam der tikai 3, kuras ir t.s. WF šķiedras (*Water Free*). Tās ir silīcija šķiedras, kuru izstrādē izmantota īpaša tehnoloģija, lai šķiedrā pašā nebūtu ūdens absorbcija tuvajā infrasarkanajā spektra diapazonā.



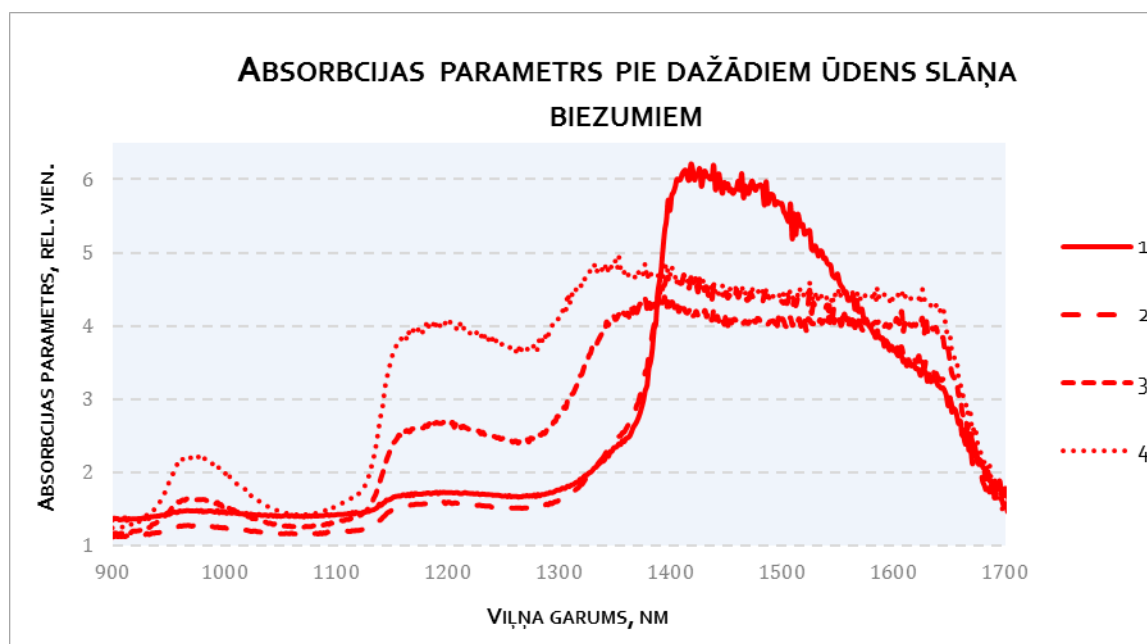
7.3. Atstarotās gaismas mērījumi ar caurspīdīgu Petri trauciņu

Tika izmantota Y veida WF šķiedra un halogēna lampu gredzena gaismas avots. Petri trauciņš tika novietots uz balta papīra lapām. Šķiedras gals – apmēram 2 cm attālumā no Petri trauka apakšas. Sākumā tika izmērīta atstarotās gaismas intensitāte I_0 tukšam Petri trauciņam, pēc tam – atstarotās gaismas intensitāte I , kad trauciņā ir ieliets ūdens ~1 mm slānī. Grafikos parādīti gan iegūtie atstarotās gaismas intensitāšu spektri, gan absorbcijas parametrs, kas aprēķināts šādi: $A = \frac{I_0}{I}$.





Tika veikti mērījumi, lai salīdzinātu absorbcijas parametra izmaiņas, mainot ūdens daudzumu Petri trauciņā, kur 1 – aptuveni 1 mm biezs ūdens slānītis, 2 – aptuveni 2mm, utt.



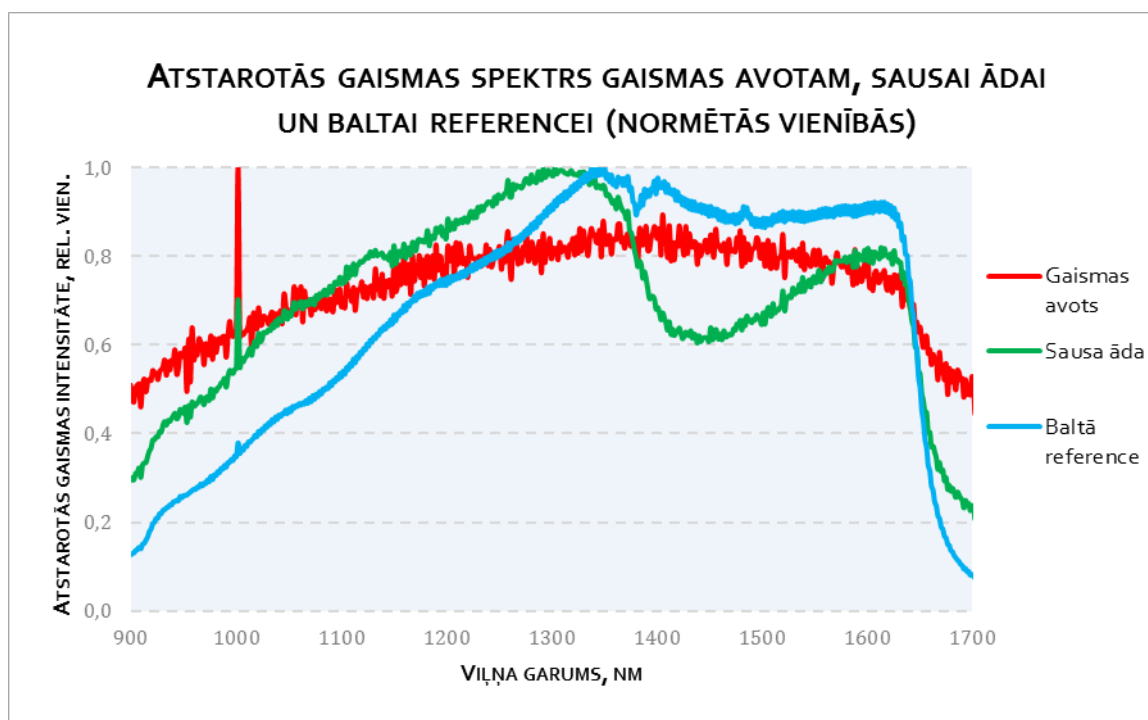
Redzams, ka pie 976 nm un 1196 nm ūdens absorbcijas maksimumiem absorbcijas parametra vērtība pieaug, pieaugot ūdens slāņa biezumam (izņemot pirmos 2 mērījumus), savukārt pie 1453 nm maksimuma tas nav redzams, jo atstarotās gaismas intensitātes spektrā nebija redzams maksimums pie šī viļņa garuma, kas norāda uz to, ka starojums tika absorbēts un netika atstarots atpakaļ tik lielā mērā, lai redzētu izteiktu maksimumu tieši pie 1453 nm.

7.4. Ūdens absorbcijas mērījumi ādai, izmantojot mitru salveti

Tika izmantota Y veida WF šķiedra. Tika veikti divi eksperimenti: 1) kā gaismas avotu izmantojot halogēna gaismas avotu, kurā ievietots viens Y šķiedras atzars; 2) kā gaismas avotu izmantojot halogēna lampu gredzenu – šajā gadījumā gaismas avota starojums netika vadīts caur šķiedru, tikai uztverts caur šķiedru.

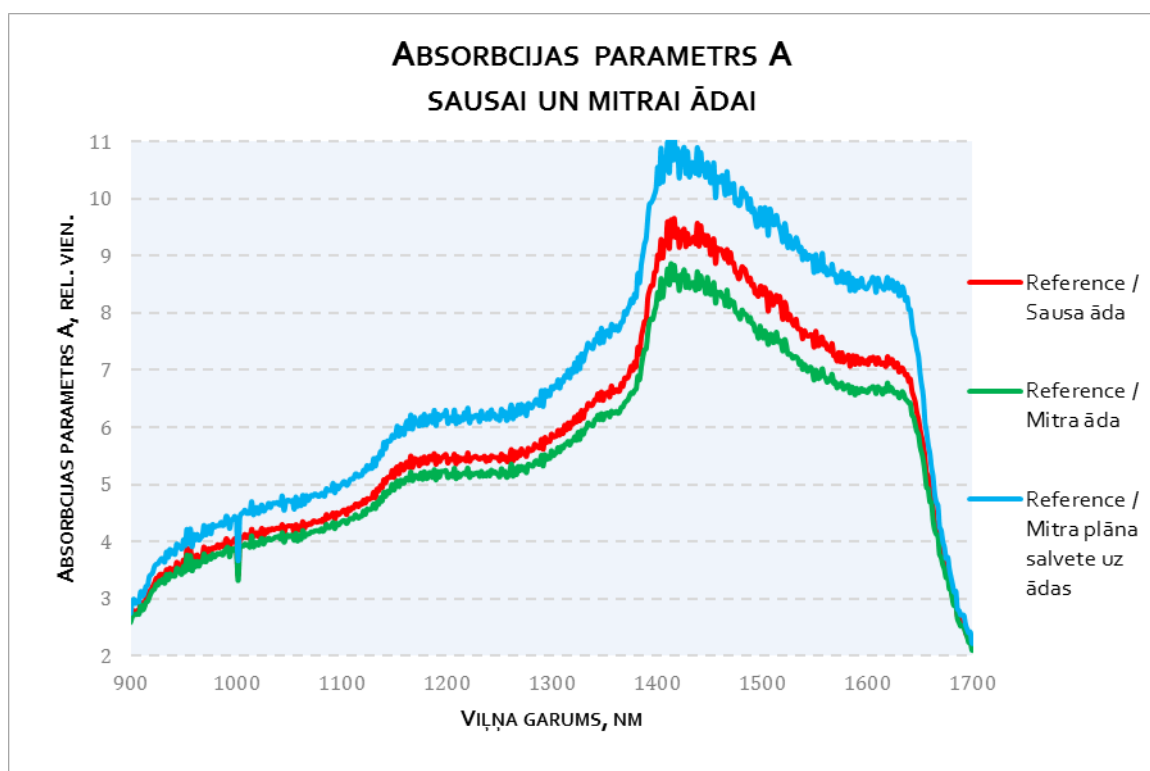
Šķiedras gals tika novietots ~2 cm attālumā no rokas apakšdelma. Kā references (gaismas avota) spektrs tika izmantots atstarotās gaismas spektrs no balta kartona references, kas tika novietota uz rokas. Pēc tam tika uzņemts sausas ādas atstarotās gaismas spektrs. Pēc tam āda tika noklāta ar mitru salveti, salveti pēc tam noņemot un uzreiz uzņemot atstarotās gaismas spektru no mitrās ādas. Tika uzņemts atstarotās gaismas spektrs arī no ādas, kad uz tās uzklāta mitra, plāna salvete.

1) Halogēna gaismas avots

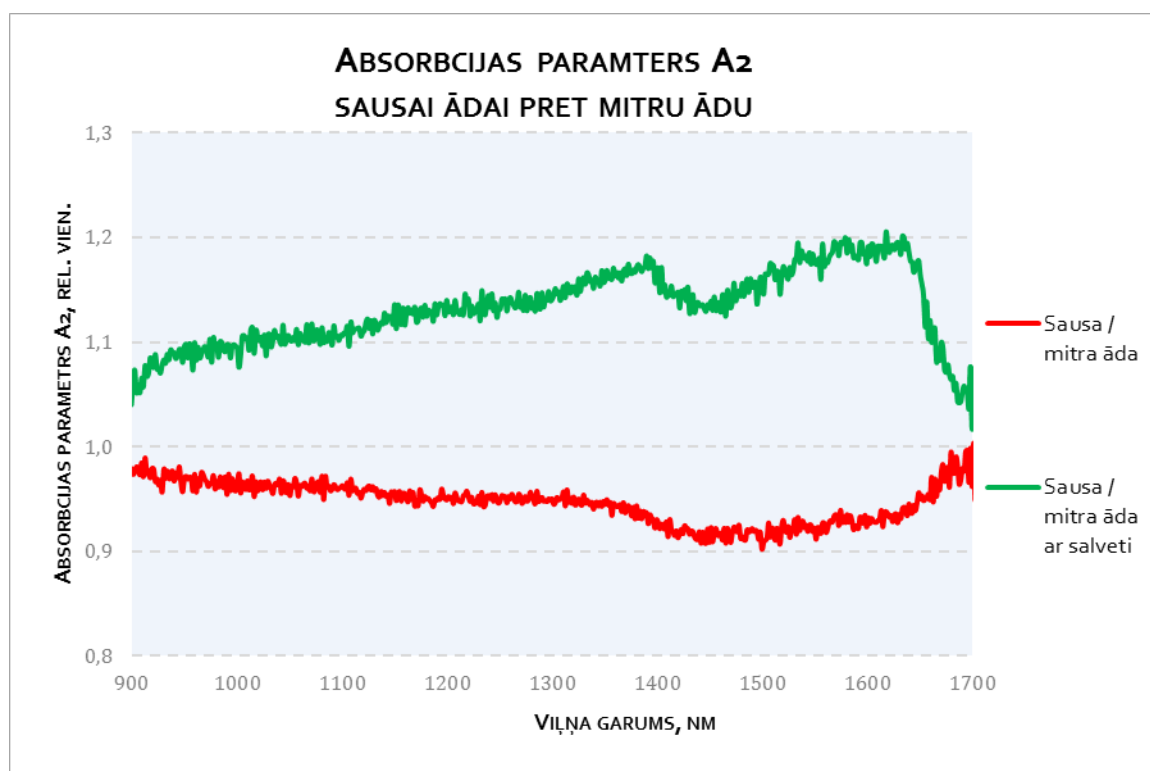


Redzams, ka arī sausas ādas atstarotās gaismas spektrā parādās 1450 nm minimums.

Absorbcijas izmaiņām sausiai un mitrai ādai tika izmantota formula: $A = \frac{I_0}{I}$, kur I_0 – atstarotās gaismas spektrs no balta papīra.

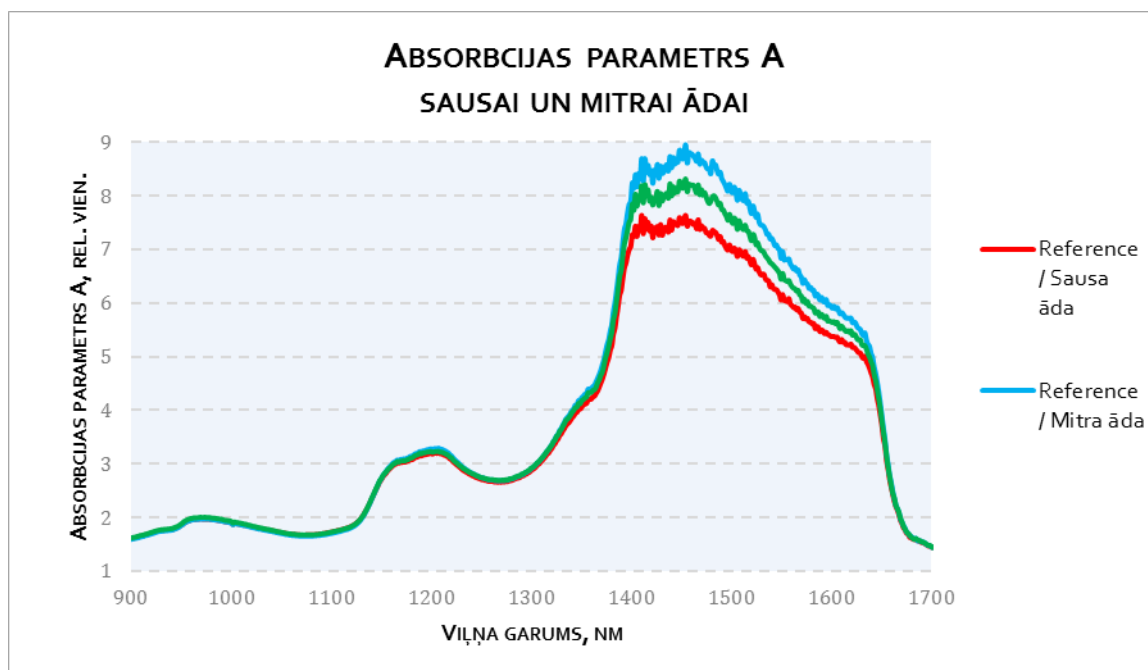


Tika izmēģināta arī attiecība mitrai pret sausu ādu, par referenci izmantojot sausu ādu: $A_2 = I_s/I$, kur I_s - atstarotās gaismas spektrs sausiai ādai, I – atstarotās gaismas spektrs mitrai ādai vai mitrai ādai ar salveti.

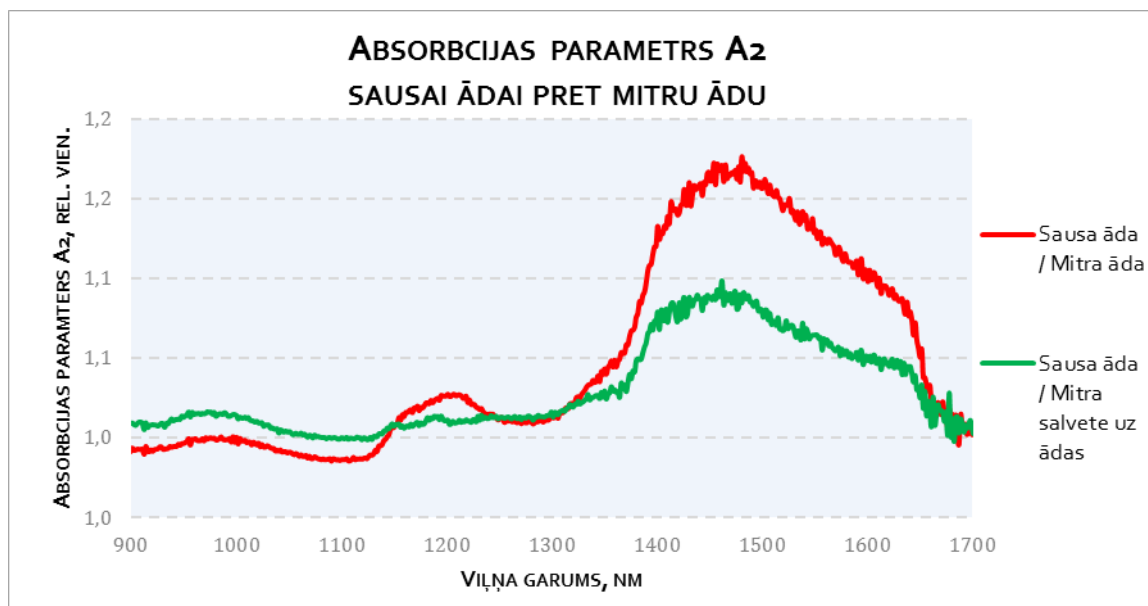


2) Halogēna lampu gredzens. Šķiedra novietota $\sim 45^\circ$ leņķī attiecībā pret ādas virsmu.

Absorbcijas parametrs A: $A = I_0/I$, kur I_0 – balta papīra reference, uzlikta uz ādas.

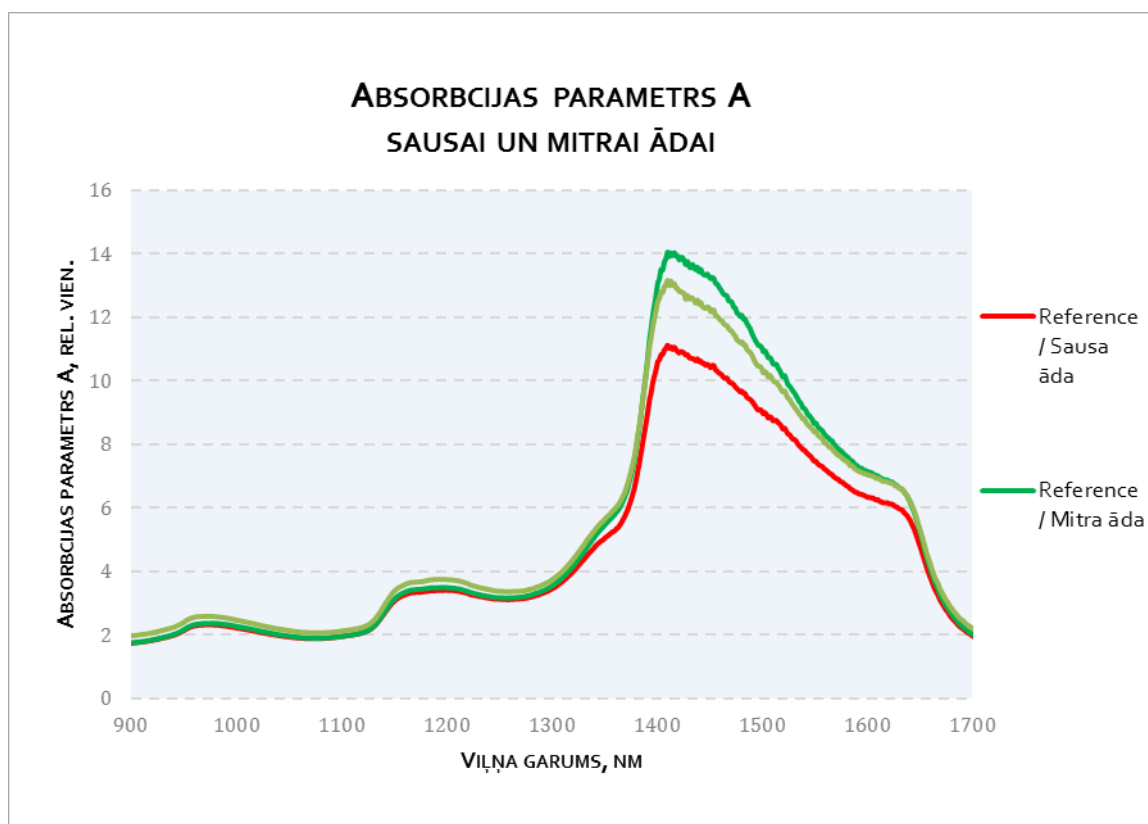


Absorbcijas parametrs A₂: $A_2 = I_0/I$, kur I_0 – sausas ādas atstarotās gaismas spektrs.

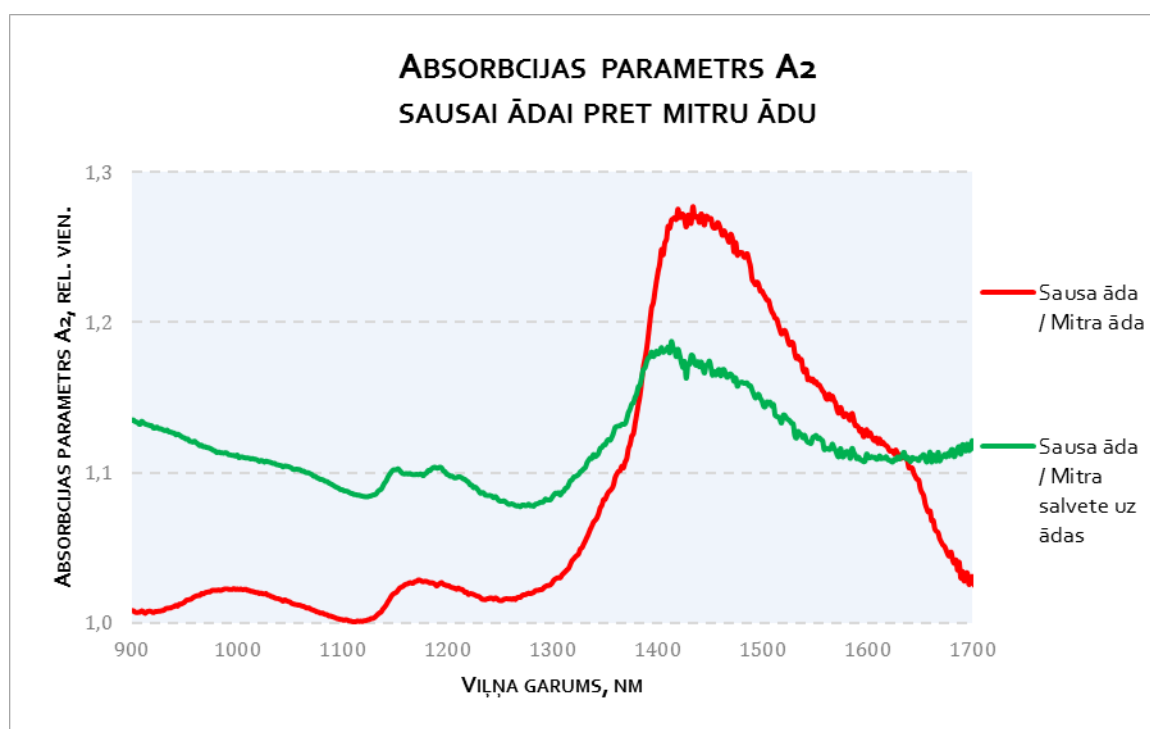


- 3) Halogēna lampu gredzens. Šķiedra novietota perpendikulāri attiecībā pret ādas virsmu.

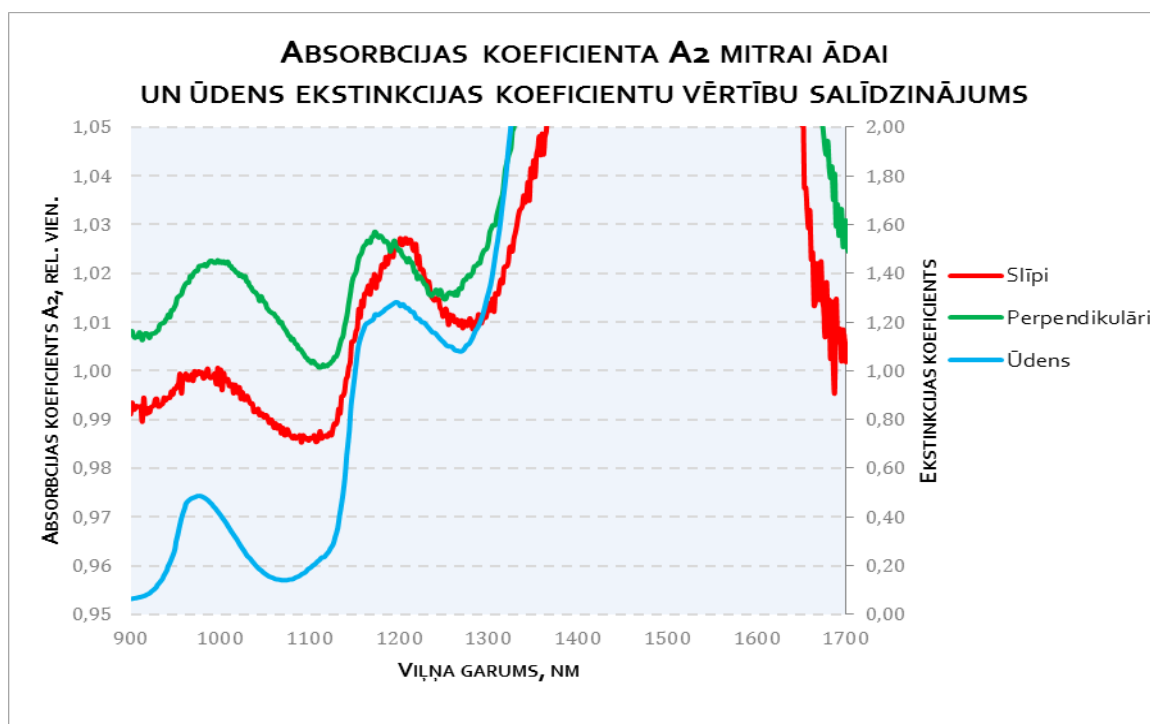
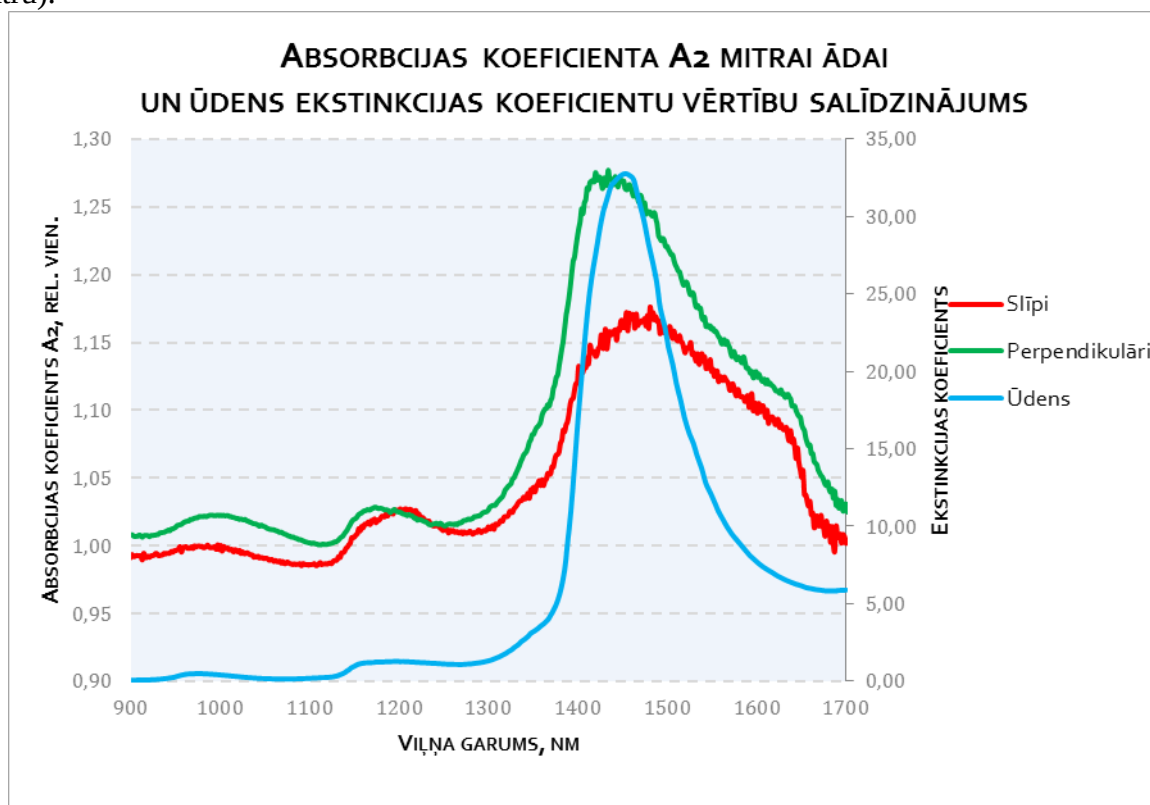
Absorbcijas parametrs A: $A = I_0/I$, kur I_0 – balta papīra reference, uzlikta uz ādas.



Absorbcijas parametrs A2: $A2 = I_0/I$, kur I_0 – sausas ādas atstarotās gaismas spektrs.



Salīdzinājums absorbcijas koeficienta $A_2 = I_0/I$, kur I_0 – sausas ādas atstarotās gaismas spektrs, vērtībām gadījumā, kad šķiedra tika novietota slīpi attiecībā pret ādas virsmu un perpendikulāri attiecībā pret ādas virsmu, kā arī ar ūdens ekstinkcijas koeficientu vērtībām (ūdens absorbcijas spektru).

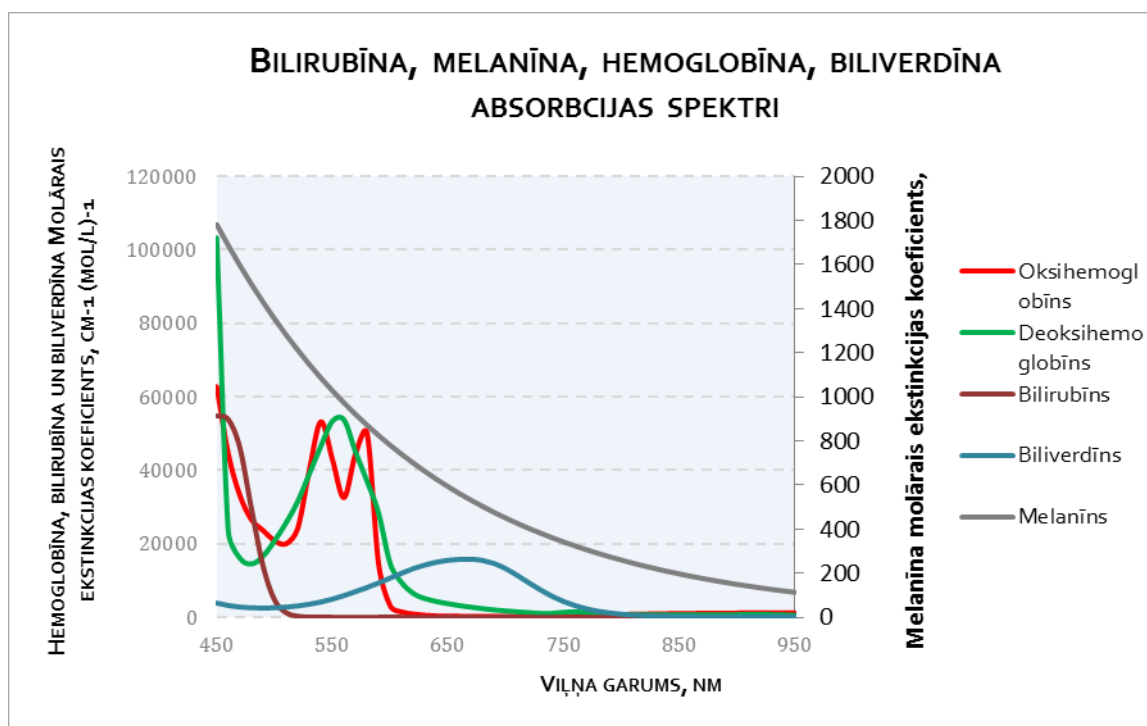


Šī brīža eksperimentālie rezultāti parāda to, ka ir iespējams spektrāli atšķirt sausu ādu no mitras ādas, tomēr trokšņa līmenis pagaidām ir pārāk liels, lai spētu novērtēt ādas mitruma izmaiņu atkarību no dažāda veida krēmu iedarbības. Turpmākos mērījumos tiks apskatīta polarizatoru ietekme uz mērījumu kvalitāti, dažādu gaismas avotu pielietojumi, kā arī cita veida uzlabojumi.

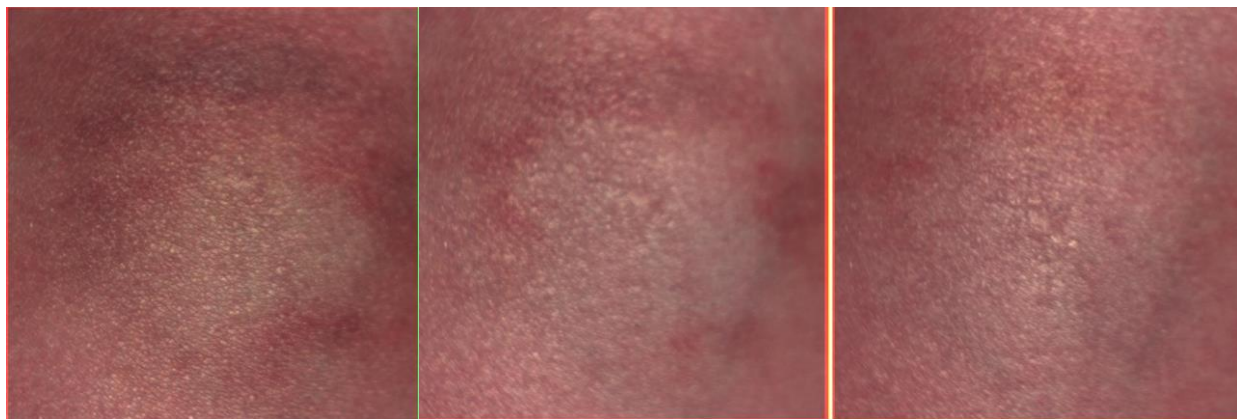
8. Bilirubīna kartēšanas algoritma pilnveide

Tika strādāts pie hromoforas bilirubīna kartēšanas algoritma pilnveides. Bilirubīns ir hromofora, kas atrodas asinīs. Ķīmiski tā ir hemoglobīna sabrukšanas produkts. Normāli tā ādā esošajos asinsvados ir pavisam nelielā koncentrācijā, tomēr dažu patoloģiju gadījumos bilirubīna koncentrācija mēdz būt palielināta (piemēram, jaundzimušo dzelte, aknu darbības problēmas, ādas sasitumos, u.c.). Līdz ar to bilirubīna kartēšana ādā ar neinvazīvām metodēm ir būtiska.

Bilirubīna koncentrācija ādā izteikti mainās ādas sasitumos (zilumos). Zilums rodas, kad āda tiek satraumēta, kā rezultātā saplīst mazie kapilāri ādas virskārtā (smagos sasitumos arī dziļākos ādas slāņos). Sākuma stadijā vērojams tikai ādas apsārtums, kas saistīts ar hemoglobīna koncentrācijas palielināšanos virsējā ādas slānī. Pēc tam ķīmisku procesu rezultātā rodas dažādi hemoglobīna sabrukšanas blakusprodukti, kā piemēram, biliverdīns (zaļgana nokrāsa) un bilirubīns (dzeltena nokrāsa). Ziluma krāsu izmaiņas var redzēt ar aci, jo šīm hromoforām ir izteikti absorbcijas spektri tieši redzamajā spektra diapazonā. Tomēr būtiski būtu atrast labu metodi hromoforas izmaiņu kvantitatīvam novērtējumam, ko varētu potenciāli izmantot, piemēram, ziluma vecuma noteikšanai tiesu medicīnas ekspertīzē.



Tika uzņemtas 2 zilumu sērijas: konkrēta ziluma attīstība laikā (vairākas dienas), izmantojot multispektrālās attēlošanas kameru *CRi Nuance*, halogēna lampas gaismas avotu, kā arī daži attēli tika uzņemti ar mobilā telefona RGB krāsu kameru. Tika izmantots spektra diapazons 450-950 nm ar soli 10 nm.



Piemērs: zilums 5., 8. un 11. dienā pēc tā iegūšanas (RGB attēli)

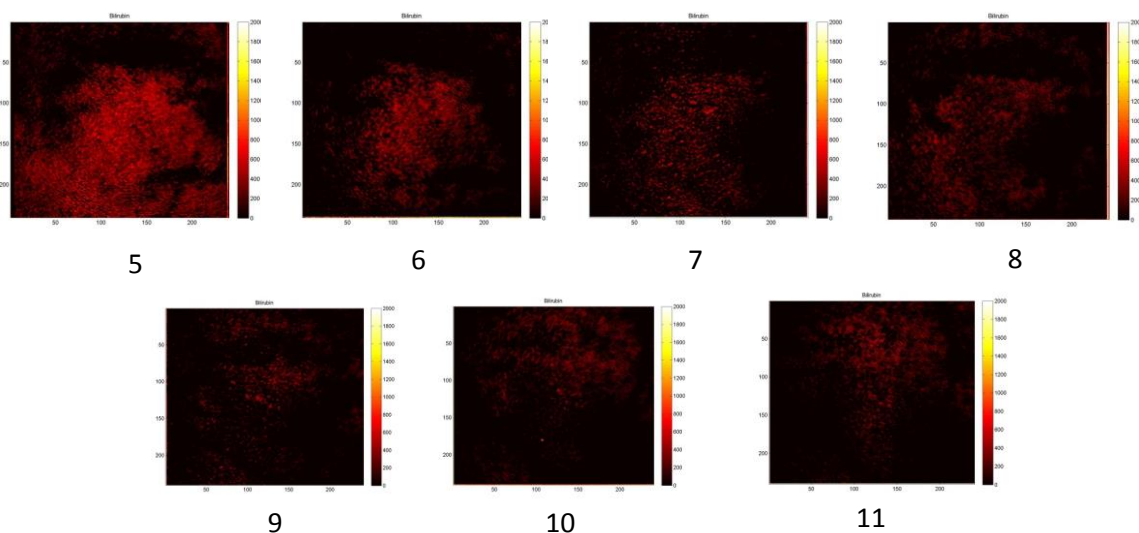
Attēlu sākotnējā apstrāde ietver sevī sekojošus soļus: attēla apgriešana, multispektrālo attēlu masīva reģistrēšana, tādējādi savietojot multispektrālos attēlus, lai iespējami mazinātu kustību artefaktus attēlu uzņemšanas laikā.

Multispektrālo attēlu datu masīvs tika apstrādāts, izmantojot mazāko kvadrātu metodes *Matlab* programmā iebūvēto funkciju *lsqnonneg* :

$$OD = \varepsilon \cdot C$$

kur OD – optiskā blīvuma vērtības, ε - molārā ekstinkcijas koeficienta vērtības un C – relatīvā hromoforas koncentrācija. ε vērtības tika ņemtas šādas: normālā āda, oksihemoglobīns, deoksihemoglobīns, bilirubīns, biliverdīns, melanīns. Tika izmēģināti arī citi varianti, kur kāda no iepriekš minētajām hromoforām netika iekļauta mazāko kvadrātu metodes pielietojumā.

Rezultātā tika iegūtas attiecīgo hromoforu koncentrāciju sadalījuma kartes. Piemērs bilirubīna koncentrāciju sadalījumam, zilumam attīstoties no 5. līdz 11. dienai, redzams zemāk esošajā attēlā. Kā redzams, bilirubīna koncentrācija zilumā pēc 5. dienas pakāpeniski samazinās (samazinās apgabals, kurā algoritms atrod kaut kāda līmeņa bilirubīna koncentrāciju).



Tika meklēts veids, kā vislabāk kvantitatīvi aprakstīt bilirubīna koncentrācijas un sadalījuma izmaiņas laikā, lai to būtu iespējams attēlot ar noteiktu skaitli – parametru. Tika izmēģināts parametrs, ko aprēķina šādi: pikseļu skaits bilirubīna sadalījuma kartē, kuru bilirubīna relatīvās koncentrācijas vērtība pārsniedz noteiktu sliekšņa vērtību (piemēram, vidējo aritmētisko vērtību, aprēķinātu no visiem pikseļiem). Tomēr šobrīd vēl šāds labs parametrs nav atrasts.

9. Secinājumi

Pārskata periodā veiktā darba rezultātā izdarīti šādi secinājumi, kas ietekmē nākošo periodu darba saturu:

- Melanomas-dzimumzīmes atšķiršanas metodes izpētes līmenis uzskatāms par pietiekamu, lai uzsāktu tās aparatūras realizāciju. Nepieciešamas diskusijas ar potenciāliem lietotājiem (mediķiem), lai noskaidrotu šāda aparāta praktiskas pielietošanas aspektus un tos ņemtu vērā gan aparatūras konstrukcijā, gan arī realizējamo funkciju specifikācijā. Šādu diskusiju jāiekļauj projekta realizācijai veltīta atklāta semināra dienas kārtībā.
- Nepieciešams izstrādāt projektējamās melanomas noteikšanas aparatūras struktūru un patentēt to.
- Projektējamās aparatūras struktūrā jāparedz attēlu apstrādes modulis, kas ir spējīgs lietotājam pieņemamā laika intervālā veikt nepieciešamo attēla priekšapstrādi un veidojumu klasifikāciju, balstoties uz 3 spektra joslu optiskā blīvuma attēlu izmantošanu.
- Projektējamajai aparatūrai jānodrošina kvalitatīvu attēlu iegūšana spektra joslās, kas pēc iespējas tuvas klasifikatora izstrādē lietotajām (viļņu garumi 540 nm, 640 nm, 740 nm). Pēc aparatūrā izmantoto elektronisko komponentu izvēles ar matemātiskās modelēšanas palīdzību jāpārbauda tāda klasifikatora kvalitāte, kurš izmantotu attēlus, kas iegūstami ar konkrēto komponentu palīdzību.
- Jāturpina darbs pie ādas mitruma novērtēšanas, izmantojot ūdens absorbcijas spektra izmaiņas tuvā infrasarkanā spektra apgabalā. Nepieciešams piedāvāt metodi, kuras praktiskā realizācija nodrošina ne tikai mitras ādas atšķiršanu no sausas, bet arī ļauj novērtēt ādas mitruma pakāpi.
- Jāturpina darbs pie hromoforu kartēšanas algoritma uzlabošanas bilirubīna koncentrācijas noteikšanai. Jāpēta iespējas piedāvāt parametru, kurš būtu praksē izmantojams bilirubīna vidējās koncentrācijas kvantitatīvai raksturošanai ādas apgabalā.

10. Literatūras saraksts

1. Rublee, Ethan, et al. ORB: an efficient alternative to SIFT or SURF. In: *Computer Vision (ICCV), 2011 IEEE International Conference on*. IEEE, 2011. p. 2564-2571.
2. I. Diebele, I. Kuzmina, A. Lihachev, J. Kapostinsh, A. Derjabo, L. Valeine, J. Spigulis. Clinical evaluation of melanomas and common nevi by spectral imaging. *Biomedical Optics Express*, March 2012, Vol. 3, No. 3
3. Quinzán, Ianisse, José M. Sotoca, Pedro Latorre-Carmona, Filiberto Pla, Pedro García-Sevilla, and Enrique Boldó. "Band selection in spectral imaging for non-invasive melanoma diagnosis." *Biomedical optics express* 4, no. 4 (2013): 514-519.
4. Projekts InBiT. Projekta aktivitātes Nr.2 "Pētījumi" progressa pārskats Nr.3.

Pielikumi

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

M. Tamošiūnas^a, D. Jakovels^b, A. Ľihačovs^b, A. Kilikevičius^c, J. Baltušnikas^c, R. Kadikis^d,
S. Šatkauskas^{a*}

^aBiophysical research group, Faculty of Natural Sciences, Vytautas Magnus University, Vileikos 8, Kaunas, LT-44404, Lithuania; ^bInstitute of Atomic Physics and Spectroscopy, University of Latvia, 19 Rainis Blvd., Riga, LV-1586, Latvia; ^cInstitute of Sports Sciences and Innovation, Lithuanian Sports University, Sporto 6, LT-44221 Kaunas, Lithuania; ^dInstitute of Electronics and Computer Science, 14 Dzerbenes St., LV-1006, Riga, Latvia.

ABSTRACT

Electroporation and ultrasound induced sonoporation has been showed to induce plasmid DNA transfection to the mice *tibialis cranialis* muscle. It offers new prospects for gene therapy and cancer treatment. However, numerous experimental data are still needed to deliver the plausible explanation of the mechanisms governing DNA electro- or sono-transfection, as well as to provide the updates on transfection protocols for transfection efficiency increase. In this study we aimed to apply non-invasive optical diagnostic methods for the real time evaluation of GFP transfection levels at the reduced costs for experimental apparatus and animal consumption. Our experimental set-up allowed monitoring of GFP levels in live mice *tibialis cranialis* muscle and provided the parameters for DNA transfection efficiency determination.

Keywords: fluorescence; spectroscopy; multispectral imaging; green fluorescent protein; DNA transfection; electroporation; sonoporation; muscle *tibialis cranialis*;

1. INTRODUCTION

Gene therapy refers to introducing the foreign DNA into genome for replacement of faulty or missing genetic material. Viral vectors represent the most efficient but at the same time the most insecure way of introducing foreign DNA into cells: the side effects of increased immune and inflammatory response, toxicity, tumor formation and even patient death have been reported ^{1,2}. As an alternative, the use of non-viral vectors for gene therapy becomes significant. Plasmid DNA has a number of advantages over viral vectors, including good safety record, production at a great extent, possibility of repeated administration, no limitation on DNA insert size.

Two methods, electroporation (EP) and sonoporation (SP) have been investigated for susceptibility of gene therapy ^{3,4}. Electric field induces transmembrane potential above the critical value, which leads to the structural changes of lipid bilayer, allowing temporal formation of several nanometer size hydrophilic pores ⁵. The key mechanism of sonoporation is the contrast agent microbubble (MB) cavitation induced by ultrasound (US) ⁶. However, so far the low efficiency of the gene transfection using EP or SP remains the main drawback for the application of those methods for gene therapy.

In this study, a considerable interest is on plasmid DNA transfection into skeletal muscles. A muscle tissue possesses specific cellular, anatomical and physiological properties that made it a highly ambitious target for gene therapy, especially for the production of proteins as systemic therapeutic agents ^{7,8,9,10}. Other possible targets of muscle gene therapy are vaccination and treatment of congenital muscular diseases ¹¹.

The objective of this study is 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 and sonoporation.

To reach these goals following tasks have been raised:

* s.satkauskas@gmf.vdu.lt

- i) to detect the fluorescence intensity from the surface of the skin;
- ii) to estimate a correlation of the detected fluorescence intensity to muscle surface fluorescence intensity and GFP concentration;
- 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.

Generally, our study aims at development of non-invasive diagnostics method for real time evaluation of green fluorescent protein (GFP) coding plasmid transfection efficiency.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental procedure

2.1.1. Animals. In all experiments we used 4-20-week-old C57BL/6 female or male line mice purchased from Biochemistry Institute (Vilnius University, Lithuania). All animals were kept in the same room at 12/12-h light/dark cycle, 20-22°C temperature and 55±10% humidity. Mice were housed in standard mouse cages, one to three mice per cage. Animals were fed standard chow diet and received tap water *ad libitum*. All experiments were approved by the Lithuanian Republic Alimentary and Veterinary Public Office (Nr.0236). Before DNA transfection animals were anesthetized by intraperitoneal injection of the anesthetics: ketamine (100 mg/kg; Richter Pharma AG, Wels, Austria) and xylazine (10 mg/kg; Eurovet Animal Health B.V., Bladel, Netherlands). The animals woke up within 1 h and appeared normally active.

2.1.2. Plasmid. EGFP (pEGFP-Nuc Vector) coding plasmid was used in all experiments. 10 µg of EGFP coding plasmid was diluted in 50 µl of 0.9% NaCl prior to injection (50 µl; 0.2 mg/ml EGFP). Mice undergoing sonoporation and electrosonoporation received 10 µg of EGFP mixed with Sonovue (Bracco, Switzerland) microbubbles at ~ 10⁴ MB/50 µl of 0.9% NaCl (50 µl; 0.2 mg/ml EGFP).

2.1.3. DNA injection. Hind limbs legs were removed by depilatory cream. EGFP plasmid was injected into the mice *tibialis cranialis* muscle of both mice legs using insulin syringe from the distal to proximal direction.

2.1.4. DNA electrotransfer. Prior to electroporation, shaved hind limb legs were smeared with conductive gel (Comed, Strasbourg, France) to ensure good contact between electrodes and skin. Two stainless steel electrodes were applied on both sides of *tibialis cranialis* muscle, above the skin and 4.5 mm apart. Electropulsator delivered either one square-wave HV (high voltage) pulse, with a length of 100 µs and a amplitude of 800 V/cm or 4 square-wave LV (low voltage) pulses, with a length of 100 ms and a amplitude of 80 V/cm at 1 Hz frequency.

2.1.5. DNA sonotransfer. For muscle sonoporation, 1 MHz US at intensity of 2 W/cm², at 20% or 100% duty cycle was delivered for 5 min through 6 mm transducer, using Sonitron 2000 (Artison Corp. OK, USA) sonoprotector. To ensure a good contact between the transducer and the treated muscle a conductive gel was used.

2.1.6. Experimental groups (comprising 3 mice or 6 transfected leg muscles per group):

Three different methods of GFP transfection were applied: GFP alone (1st gr.), electroporation (2nd, 3rd, 4th gr.) and sonoporation (5th gr.) assisted GFP delivery.

1 gr. Control mice (GFP);

2nd gr. GFP +EP (1 HV: 800 V/cm; 100 µs);

3rd gr. GFP+ EP (1HV)+EP(4LV: 80 V/cm; 100 ms);

4th gr. GFP+ EP (4LV);

5th gr. GFP + SP (1 MHz, 2W/cm²; 20% DC; 5 min).

2.1.7. Protein extraction. *Tibialis cranialis* muscles were dissected from both hind limb legs, weighted (Kern, ABS 80-4, Germany) and immediately frozen in 2-methylbutan, which was cooled in liquid nitrogen. Muscles were placed in tubes and for 10 mg of muscle 100 µL ice cold homogenization buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Triton X-100 1%, with 2% protease inhibitor cocktail) was added. Muscle homogenization was

executed in ice cold homogenization buffer by small scissors for 2 min at comfortable rate. Samples were shaken for 60 min in 4 °C. Thereafter samples were centrifuged at 13000 g in 4 °C for 10 minutes. Supernatant was taken for fluorescence point measurements.

2.2 Evaluation of GFP transfection efficiency

2.2.1. Fluorescence point measurements. Fluorescence spectra of biological tissues were measured with a fiber optics CCD spectrofluorimeter (AvaSpec ULS2048L, Avantes, The Netherlands) which was equipped with a Y-shaped fiber bundle (FC-UV400-2-SR, Avantes, The Netherlands). The central fiber of the fiber bundle was used to conduct the excitation light to the tissue, and the 6 circularly arranged fibers were used to collect tissue autofluorescence (Fig.1a). DPSS 473 nm laser (5-473-DPSS-0.1, CW, max. output 100 mW, Altechna, Lithuania) was used for skin and muscle fluorescence excitation, and a long pass filter ($T_{535}=80\%$) was inserted into the detection light path, to cut off the scattered laser excitation light. Six spectra were measured at the random sites of mice skin surface or muscle using 300 ms integration time.

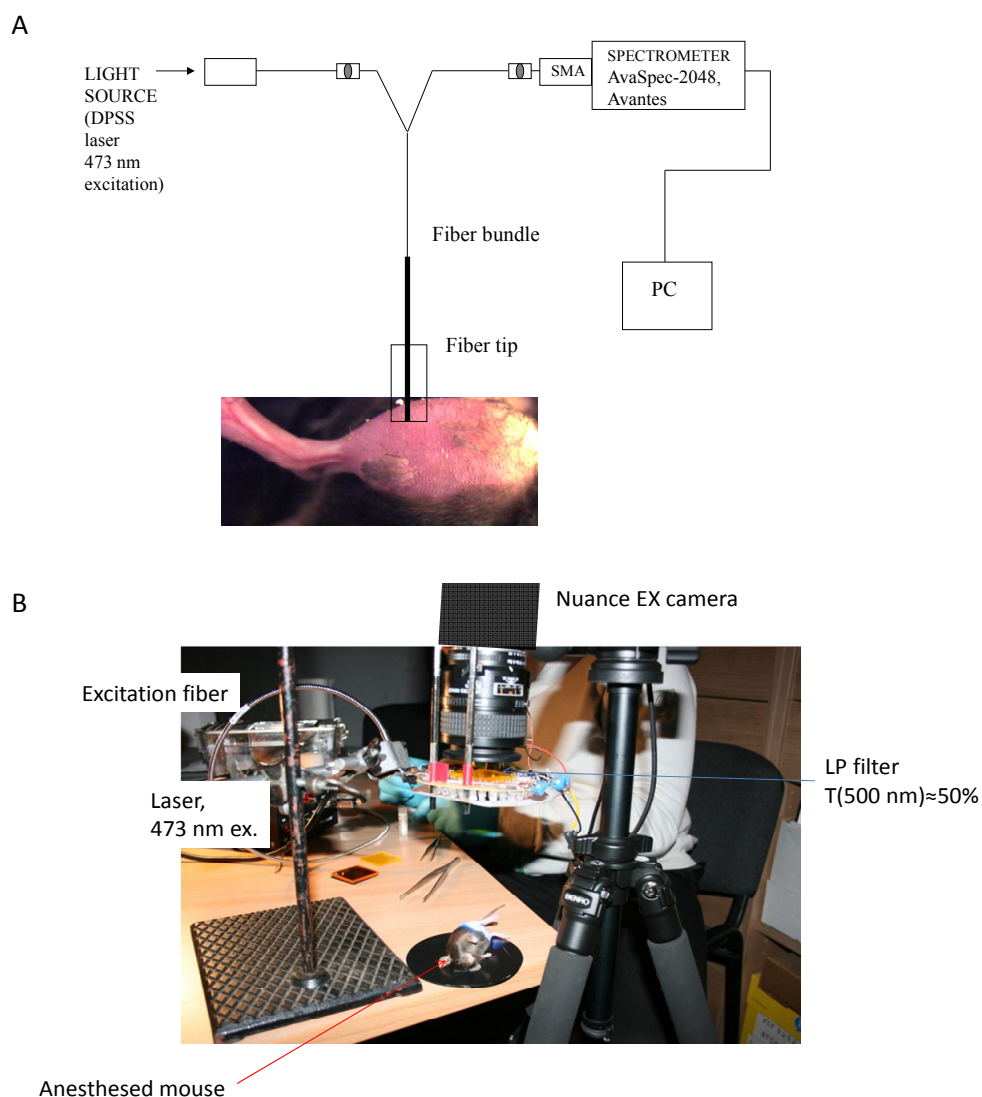


Figure 1. (a) Experimental set-up for fluorescence point measurements. (b) Experimental setup for fluorescence multispectral imaging.

2.2.2. Hyperspectral imaging. To visualize the distribution of GFP fluorescence in mice muscle and skin above the muscle, we used the imaging system depicted in Figure 1b. The system consisted of a hyperspectral imaging camera Nuance EX (model: N-MSI-EX, CRi, USA), a fiber-optic cable for delivering laser excitation (473 nm) to the skin surface and LP filter to block the reflected laser light. The images were acquired over the whole mouse leg in the wavelength range 450 to 950 nm with the scanning step of 10 nm. The subsequent processing of the images was performed using CRi Nuance software.

2.3 Analysis of multispectral images

Acquired *in vivo* multispectral images of mice were processed and analyzed using Matlab software.

Some of multispectral images of single leg of a mouse were not precisely aligned because of small movements of mouse. In such cases the image registration is needed (example shown in Fig 2 a). In registration process all images were aligned in respect to the image of lowest wavelength, 450nm. SURF feature detector¹² is used to find, describe and compare key points between images of adjacent wavelengths.

Corresponding points are matched to acquire transformation matrix that would allow registering image of higher wavelength to adjacent image of lower wavelength. Rarely manual registration of some images is required if not enough corresponding points are found between images. Result of Fig. 2a image registration is shown in Fig. 2b.

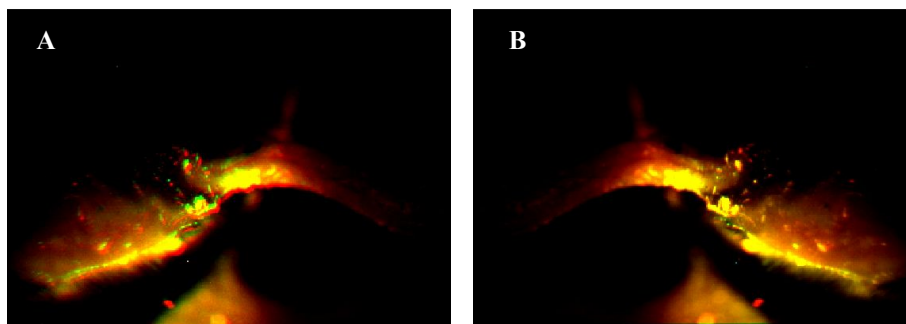


Figure 2. RGB image of mouse leg with *tibialis cranialis* muscle, a) depicts unalignment between components of different wavelengths; b) RGB image after registration

To acquire parameters of *in vivo* images, manual segmentation of muscle region was carried out. Image in Fig. 3a shows graphical user interface made in Matlab. Interface allows user to select points in the RGB image depicting border of muscle. Program calculates area of selected muscle region by counting pixels inside specified border. Using segmented image (Fig. 3b) and blob analysis functions of Matlab Image Processing Toolbox a minor axis length of muscle blob is found. This length approximately corresponds to diameter of muscle.

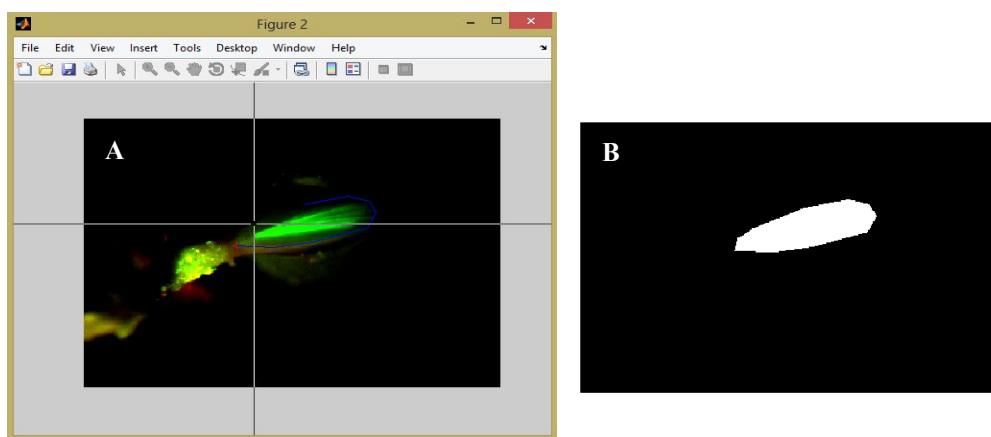


Figure 3. a) Manual selection of muscle region; b) Muscle blob for parameter acquisition.

Goal of next processing step is to find a fluorescent region in the muscle. Initial segmentation is accomplished by thresholding muscle region of an image of 510 nm wavelength. This wavelength corresponds to the green light; therefore green fluorescent regions are most likely to be more intensive in this band of spectrum than non-fluorescent regions. Automatic threshold for the region of muscle is found by using Otsu's method¹³. In this iterative method pixels are divided by threshold so that sum of spread of foreground and background pixels is at its minimum. Result of automatic segmentation is shown in Fig. 4a. Red border depicts fluorescent region.

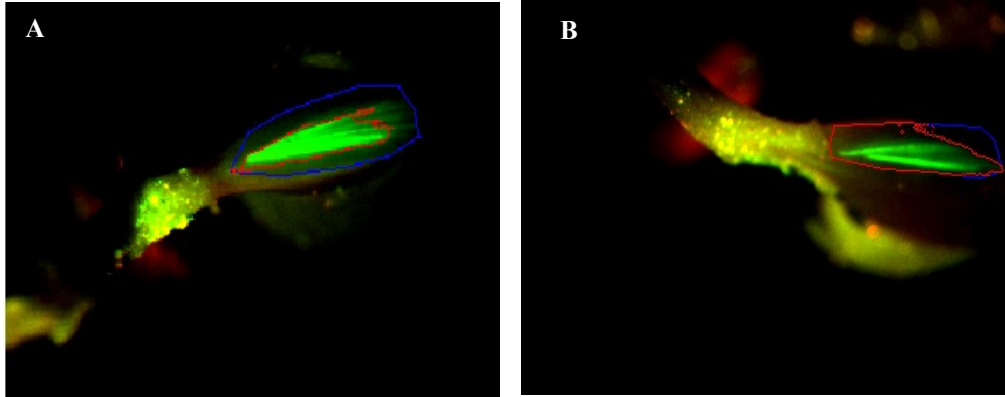


Figure 4. a) Automatic segmentation of fluorescent and non-fluorescent regions; b) Unsatisfactory result of automatic segmentation.

Automatic segmentation does not always returns satisfactory results as shown in Fig. 4b. If user is not satisfied with the result, he is asked to help segmentation manually. In this step user defines two points (P) in the image – one corresponds to fluorescent region (P_F), other to non-fluorescent region (P_{NF}). A 3x3 pixel regions around defined points are used to find mean spectrums (S), S_F , S_{NF} of both points. Similarly, spectrums are acquired for each current pixel of muscle region (S_C). Spectrum of current pixel is compared with spectrums of fluorescent point and non-fluorescent point acquiring distances $d(S_C, S_F)$ and $d(S_C, S_{NF})$:

$$d(S_C, S_F) = \sum_{i=1}^n |S_{C_i} - S_{F_i}| \quad (1)$$

$$d(S_C, S_{NF}) = \sum_{i=1}^n |S_{C_i} - S_{NF_i}|, \quad (2)$$

where n is number of spectral bands. Then distances are normalized:

$$R = \frac{d(S_C, S_F) - d(S_C, S_{NF})}{d(S_C, S_F) + d(S_C, S_{NF})} \quad (3)$$

Parameter R approaches value -1, if spectrum of currently analyzed pixel is similar to spectrum of fluorescent region and different from spectrum of non-fluorescent region. If point is more similar to non-fluorescent region, than R approaches value of +1.

Program combines parameter R and result from previous automatic segmentation for final segmentation of muscle:

$$T = W_O + W_R, \quad (4)$$

where W_O is weigh of pixel from Otsu's segmentation and W_R is weight of pixel from spectral analysis. If pixel was segmented as fluorescent in automatic segmentation, then W_O has the value of 1, if it was segmented as non-fluorescent pixel $W_O = 0$. W_R of pixel is dependent on value of R . If $R < 0$ and $R \geq -0.75$, than $W_R = 0.5$. If $R < -0.75$, than $W_R = 1.5$. Otherwise $W_R = 0$. The final decision of pixel segmentation is this: if $T \geq 1.5$, than pixel is segmented as fluorescent pixel. Therefore a pixel can be segmented as fluorescent either if its spectrum is a lot more similar to fluorescent region than non-fluorescent region, or if it is slightly more similar to fluorescent region and it also was segmented as fluorescent pixel in the automatic segmentation step.

3. RESULTS

Tibialis cranialis muscle has been revealed as a perfect model for the monitoring of GFP transfection level using fluorescence spectroscopy point measurements and hyperspectral imaging technique in a live animal. The skin, which covers the muscle from above, reduces the muscle GFP fluorescence intensity, however it does not accumulate GFP itself (Fig. 5).

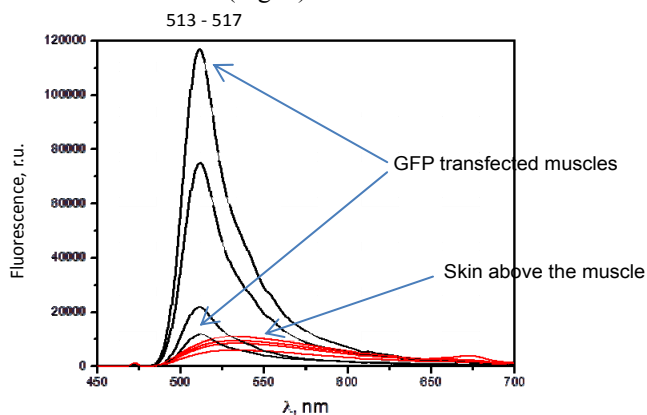


Figure 5. Comparison of GFP transfected muscle fluorescence spectra and the mice skin fluorescence located above.

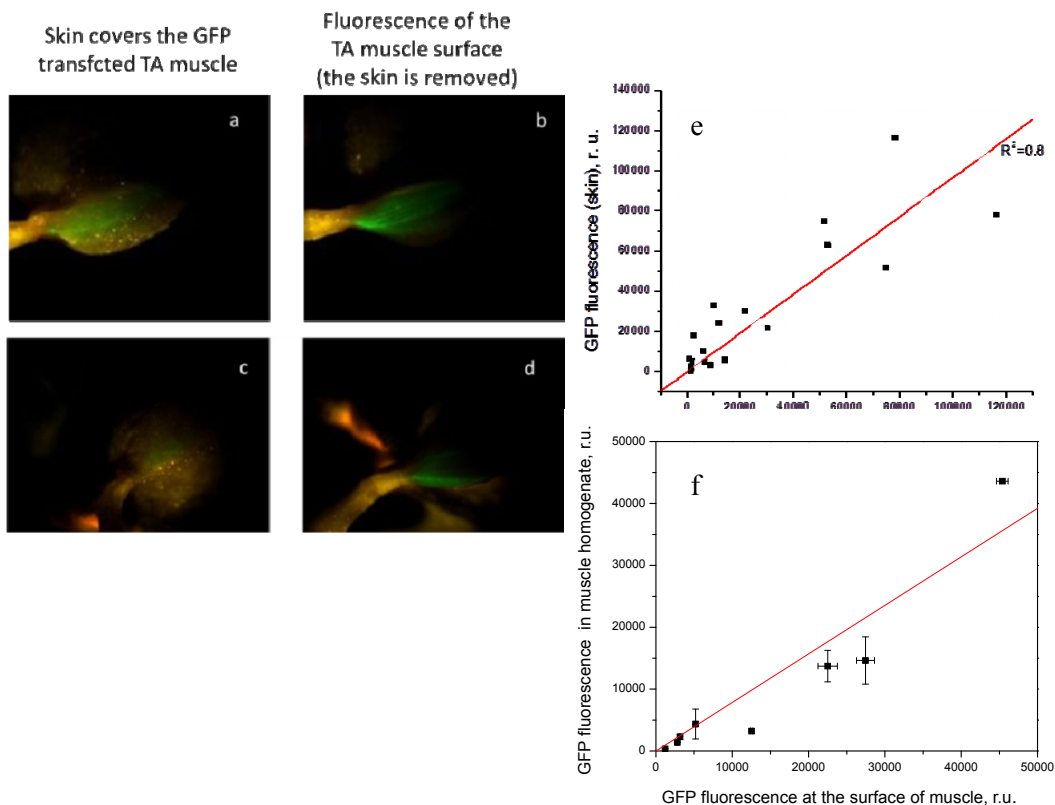


Figure 6. Comparison between GFP fluorescence distribution measured from the skin covering muscle(a, c) and muscle surface (b,d) supporting fluorescence point measurements data. Correlation between GFP fluorescence measured from the surface of skin (e) or in muscle homogenate (f) and GFP fluorescence at the surface of muscle.

Multispectral imaging *in vivo*

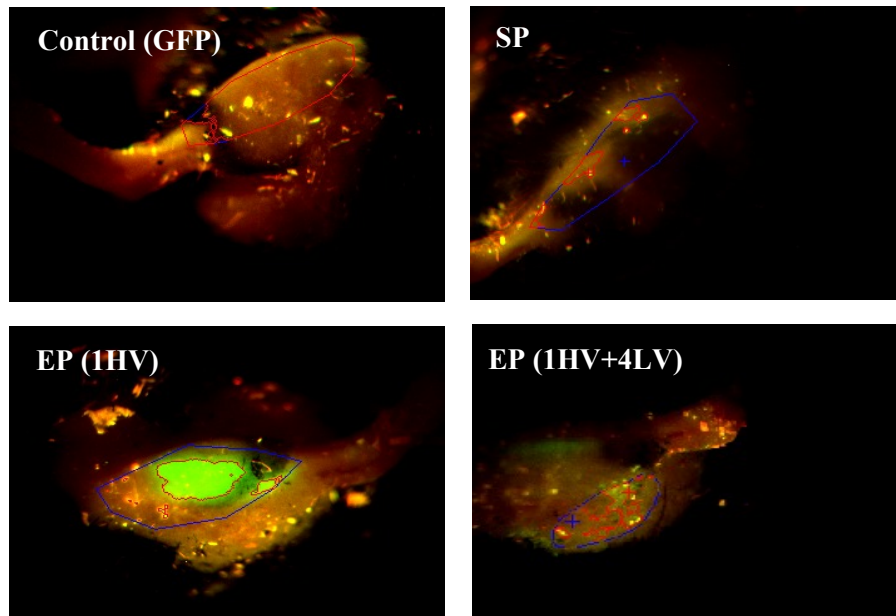


Figure 7 (*in vivo*). Non-invasive imaging of GFP fluorescence at the skin surface above the muscle, 1 year after GFP transfection protocols applied. Blue line denotes manually selected area of *tibialis cranialis* muscle and the red line denotes the calculated area of GFP fluorescence.

Multispectral imaging *ex vivo*

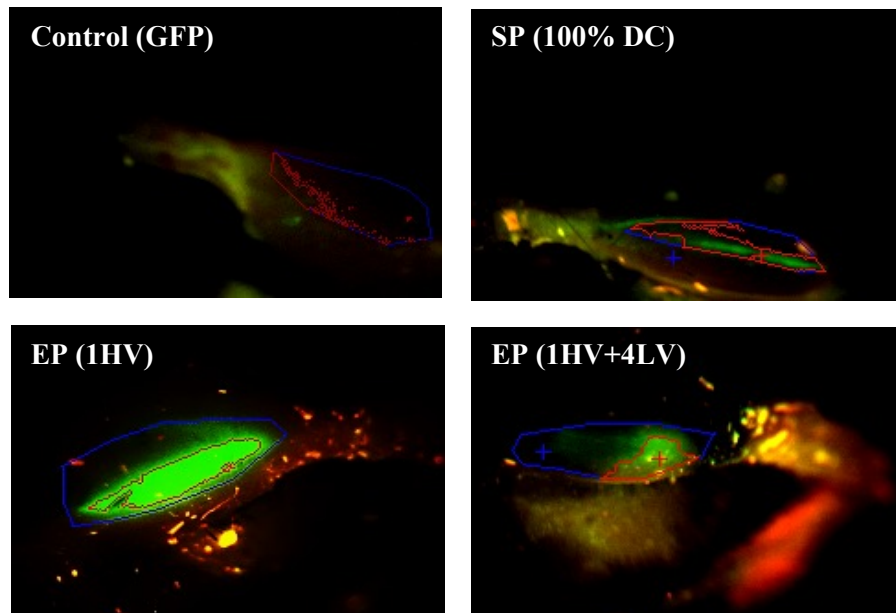


Figure 7 (*ex vivo*). Representative images of GFP fluorescence at the muscle surface for the same mice.

This allows presuming a successful application of non-invasive optical diagnostic methods for the real time evaluation of GFP transfection efficiency for *tibialis cranialis* muscle. At the first step we tested the correlation of

GFP fluorescence intensity between spectral data *in vivo* (the fiber is on the skin covering GFP transfected muscle) and *ex vivo*, when the fiber is at the same place above the muscle, but the skin is removed.

Together with the support of fluorescence imaging data (Fig.6 a-d) we revealed strong correlation between GFP fluorescence measured from the surface of skin and that at the surface of muscle ($R^2=0.8$), Fig. 6e. As the absolute control, the homogenates the GFP transfected muscles were made and fluorescence of GFP in muscle homogenate was compared to the average GFP fluorescence intensity measured at the same surface of the muscle. Data show correlation ($R^2=0.8$) of GFP fluorescence intensity measured at *tibialis cranialis* muscle surface and in homogenate (Fig. 6f).

Multispectral imaging data revealed that plasmid injection into muscle without any following treatment did not result in any fluorescence signal increase when measuring at the muscle surface or at the skin surface (Fig 7, Control). Low or no fluorescence was obtained following plasmid injection, when the muscle was subjected to sonoporation (Fig. 7, SP). On the contrary, the highest fluorescence signal of GFP was obtained in electroporation groups using HV pulses (Fig. 7, EP). However, addition of LV pulses had no beneficial effect to GFP fluorescence intensity or transfection area increase.

We applied the experiment protocol for electroporation and sonoporation, partially adapted from ^{3,7,14,15,16}, revealing that the GFP transfection efficiency of sonoporation-assisted DNA delivery was lower compared to HV electroporation assisted methods. As shown in Fig.7, this result could be already prognosticated from the non-invasive GFP fluorescence measurements *in vivo*.

Fig. 8a depicts a detailed example of the segmentation result after spectrum analysis for each pixel in muscle area (same input image as in Fig 4b). Two points are selected in Fig. 8a, and the spectrums of these points are displayed in Fig. 8b. Red line spectrum corresponds to fluorescent region, and blue to non-fluorescent region. When muscle is segmented, the parameters of fluorescent regions are acquired. Program calculates: 1) area of fluorescent region; 2) mean intensity and 3) sum intensity of pixel values of fluorescent region in the green spectral band image (510 nm). Program saves the acquired parameters which are presented in Table 1, respectively as AREA; MEAN; SUM.

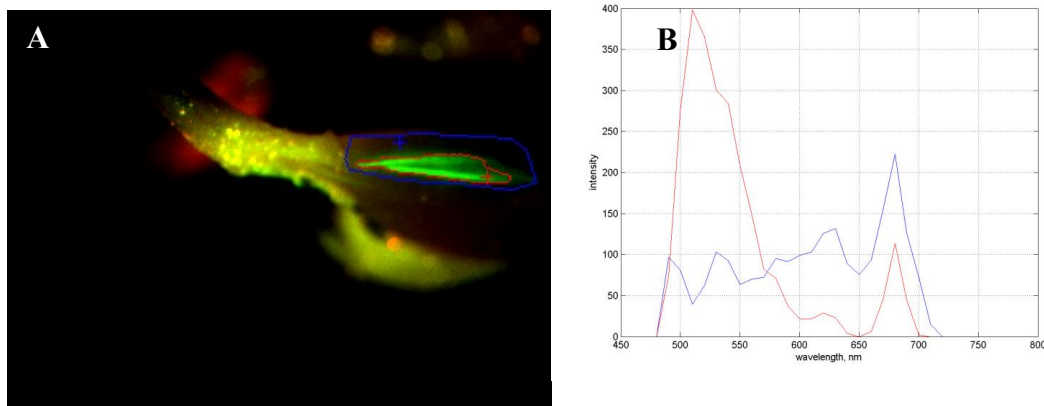


Figure 8. a) Segmentation using user input and spectrum analysis; b) Spectrums of fluorescent and non-fluorescent points that were defined by user.

Table 1. Results of multispectral image analysis. The distribution of data values is represented by standard deviation.

Parameter, r.u. Group	AREA		MEAN		SUM $\times (10^3)$	
	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>ex vivo</i>
GFP	—	~597	—	~35	—	~39
GFP+SP	485±326	1874±1656	322± 61	563± 98	166±135	974±748
GFP+EP	1544±668	1820± 685	651±326	1341±737	1160±892	2134±718

According to Table 1 data, the clear tendency of increasing efficiency of plasmid gene transfer in skeletal muscle by application of electroporation vs sonoporation can be revealed. The area, the mean value and the integral intensity of GFP fluorescence in muscle was higher in electroporation group. However, we observed a very high inter-individual variability of the level of GFP expression in both, electroporation and sonoporation groups. The origin of this lack of GFP transfection reproducibility is not fully understood.

4. DISCUSSION

By using hyperspectral imaging and fluorescence point measurements techniques, we monitored and compared GFP fluorescence intensities in live mice *tibialis cranialis* muscle, which is close to the mouse skin surface. Further analysis of obtained images revealed the key parameters allowing quantify/compare the efficiency of GFP transfection, area of GFP positive fibers for electroporated and sonoporated groups.

Such experimental model 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. By applying fluorescence spectroscopy point measurements, we have been able to monitor the GFP fluorescence kinetics in *tibialis cranialis* muscle during the whole life period of mice (2 years, data not shown).

Also we test the potential of reducing costs for imaging apparatus, replacing the Nuance EX multispectral imaging camera with less expensive industrial IDS UI-1241-LE-C camera ¹⁷ (IDS Imaging Development Systems GmbH, Germany). Up to date, the commercial live mouse imaging systems are more expensive and sophisticated (e.g. CSB Xenogen IVIS Imaging System 100; CRI Maestro system; Leica FCM 1000).

Our study showed that both electroporation and sonoporation methods are feasible for mice muscle transfection. However, evaluation of 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.

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 for non-invasive quantification of GFP transfection efficiency.

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 and Research Council of Lithuania project "Identification of the genetic factors of skeletal muscle traits and cardiovascular health", No. MIP-067/2012.

REFERENCES

- [1] Miura K., Okada Y., Aoi T., Okada A., Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Ohnuki M., "Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines", *Nat Biotechnol*, 27, 743-745 (2009).
- [2] Raper S. E., Chirmule N., Lee F. S., Wivel N. A., Bagg A., Gao G. P., Wilson J. M., Batshaw M. L., "Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer", *Mol Genet Metab.*, 80, 148-158 (2003).
- [3] Šatkauskas S., Bureau M. F., Puc M., Mahfoudi A., Scherman D., Miklavcic D., Mir L. M. "Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporomeabilization and DNA electrophoresis", *Mol Ther*, 5, 133-40 (2002).
- [4] Miller D. L., Pislaru S. V., Greenleaf J. E., "Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation", *Somat Cell Mol Genet*, 27, 115-134 (2002).

- [5] Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H. "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields", *EMBO J*, (1982).
- [6] Meijering B. D., Juffermans L. J., van Wammel A., Henning R. H., Zuhorn I. S., Emmer M., Versteilen A. M., Paulus W. J., van Gilst W. H., Kooiman K., de Jong N., Musters R. J., Deelman L. E., Kamp, O. „Ultrasound and Microbubble – Targeted Delivery of Macromolecules is regulated by Induction of Endocytosis and Pore Formation", *Circ. Res.*, 104, 679–87 (2009).
- [7] Mir L. M., Bureau M. F., Gehl J., Rangara R., Rouy D., Caillaud J. M., Delaere P., Branellec D., Schwartz B., Scherman D., "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses", *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 4262–7 (1999).
- [8] Martinenghi S., De C., Angelis G., Biressi S., Amadio S., Bifari F., Roncarolo M. G., Bordignon C., Falqui L., "Human insulin production and a melioration of diabetes in mice by electrotransfer-enhanced plasmid DNA gene transfer to the skeletal muscle", *Gene Ther*, 9, 1429–37 (2002).
- [9] Lu Q. L., Bou-Gharios G., Partridge T. A., "Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory", *Gene Ther*, 10, 131–42 (2003).
- [10] Wang X., Liang H. D. , Dong B., Lu Q. L. , Blomley M. J., "Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents", *Radiology*, 237, 224–229 (2005).
- [11] Gollins H., McMahon J., Wells K. E., Wells D. J., "High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle", *Gene Ther.*, 10:504–12 (2003).
- [12] Bay, Herbert, Tuytelaars Tinne, and Van Gool Luc. "Surf: Speeded up robust features", *Computer Vision–ECCV 2006, Springer Berlin Heidelberg*, 404–417 (2006).
- [13] Otsu, N. "A threshold selection method from gray-level histograms.", *Automatica* 11, 285–296, 23–27 (1975).
- [14] Casey G., Cashman J. P., Morrissey D., Whelan M. C. , Larkin J. O., Soden D. M., Tangney M., O'Sullivan G. C. "Sonoporation mediated immunogene therapy of solid tumors", *Ultrasound Med Biol. Mar*, 36(3),430–40 (2010).
- [15] Tsunoda S., Mazda O., Oda Y., Iida Y., Akabame S., Kishida T., Shin-Ya M., Asada H., Gojo S., Imanishi J., Matsubara H., Yoshikawa T., "Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart", *Biochem Biophys Res Commun.*, 336, 118–127 (2005).
- [16] Wang X. D., Liu J., Yang J. C. , Chen W. Q., Tang J. G., "Mice body weight gain is prevented after naked human leptin cDNA transfer into skeletal muscle by electroporation", *J Gene Med*, 5, 966–76 (2003).
- [17] Šatkauskas S., Tamošiūnas M., Lihachev A., Spigulis J., Lesins J., Lo C. W., Chen W., "Comparison of efficiencies of electroporation and sonoporation methods in mice muscle transfection", *Proceedings of 16th International Conference „Biomedical Engineering"*, Biomedical Engineering Institute, Kaunas University of Technology, p.37–42 (2012).

Mobile phone based laser speckle contrast imager for assessment of skin blood flow

Dainis Jakovels^{1*}, Inga Saknite¹, Gita Krievina^{2,3,4}, Janis Zaharans¹, Janis Spigulis¹

¹Biophotonics Laboratory, Institute of Atomic Physics and Spectroscopy, University of Latvia, Raina Blvd 19, Riga, LV-1586, Latvia

²Institute of Electronics and Computer Science, Dzerbenes Str 14, Riga, LV-1006, Latvia

³Department of Human Physiology and Biochemistry, Riga Stradiņš University, Dzirciema Str 16, Riga, LV-1007, Latvia

⁴Institute of Experimental and Clinical Medicine, University of Latvia, Ojara Vaciesa Str 4, Riga, LV-1004, Latvia

*E-mail: dainis.jakovels@lu.lv

ABSTRACT

Assessment of skin blood flow is of interest for evaluation of skin viability as well as for reflection of the overall condition of the circulatory system. Laser Doppler perfusion imaging (LDPI) and laser speckle contrast imaging (LASCI) are optical techniques used for assessment of skin perfusion. However, these systems are still too expensive and bulky to be widely available. Implementation of such techniques as connection kits for mobile phones have a potential for primary diagnostics.

In this work we demonstrate simple and low cost LASCI connection kit for mobile phone and its comparison to laser Doppler perfusion imager. Post-occlusive hyperemia and local thermal hyperemia tests are used to compare both techniques and to demonstrate the potential of LASCI device.

Keywords: Mobile phone, laser speckle contrast imaging, LASCI, speckle contrast, skin blood flow

1. INTRODUCTION

Assessment of skin blood flow is of interest for evaluation of skin viability as well as reflection of the overall condition of the circulatory system. Laser speckle contrast imaging (LASCI) offers a noncontact, full-field, and real-time mapping of capillary blood flow and can be considered as an alternative method to Laser Doppler perfusion imaging (LDPI) [1-4]. LDPI is clinically recognized and commercially available technique, but it works in scanning mode taking up to several minutes for acquisition of full perfusion map. LASCI system is simpler and cheaper compared to the LDPI technique, and could be used for full-field monitoring of skin perfusion [5-7]. LASCI can be used for monitoring of port wine stain treatment [8], assessment of burn injuries [9] and diabetic foot ulcers [10], quantification of the Allen test [11], label free *in vivo* imaging of blood and lymph vessels [12] as well as skin roughness measurements [13].

LASCI technique has been implemented in several commercial instruments e.g. *Laser Speckle Imager* from *Moor Instruments Ltd* [14] and *PeriCam PSI System* from *Perimed AB* [15]. However, these systems are still too expensive and bulky to be widely available.

Low-cost LASCI solutions have been tested using a webcam [16] and mobile phone camera [17, 18]. LASCI could be also applied in combination with RGB reflectometry for simultaneous imaging of blood flow and hemoglobin oxygenation [19].

Several techniques have found new implementations as connection kits for smartphones, e.g. the digital dermoscope *HandyScope* from *FotoFinder Systems* [20]. Smartphones could be used for assessment of skin blood pulsations [21], screening of skin tumors [22, 23] or development of a more complex health monitoring system [24].

In our previous studies [17, 18] we demonstrated simple implementation of LASCI technology based on 650 nm laser module and CMOS camera or smartphone. In this work we demonstrate simple and low cost LASCI connection kit for mobile phone and its comparison to laser Doppler perfusion imager. Well known tests (post-occlusive hyperemia and local thermal hyperemia tests) are used to compare both techniques and demonstrate the potential of LASCI device.

2. MATERIALS AND METHODS

The laser speckle contrast imaging (LASCI) device was implemented as connection kit for mobile phone (*iPhone 4S*), and consisted of widely available 650 nm laser diode module mounted on the phone case, see Figure 1a. The output power of the laser was 5 mW, and the beam was expanded by removing the lens to illuminate the surface of the skin. The laser was equipped with a stabilized autonomous 3V power supply. The phone case and laser holder were fabricated by a 3-D printer. The estimated cost of such LASCI connection kit for mobile phone was below 10 euros.

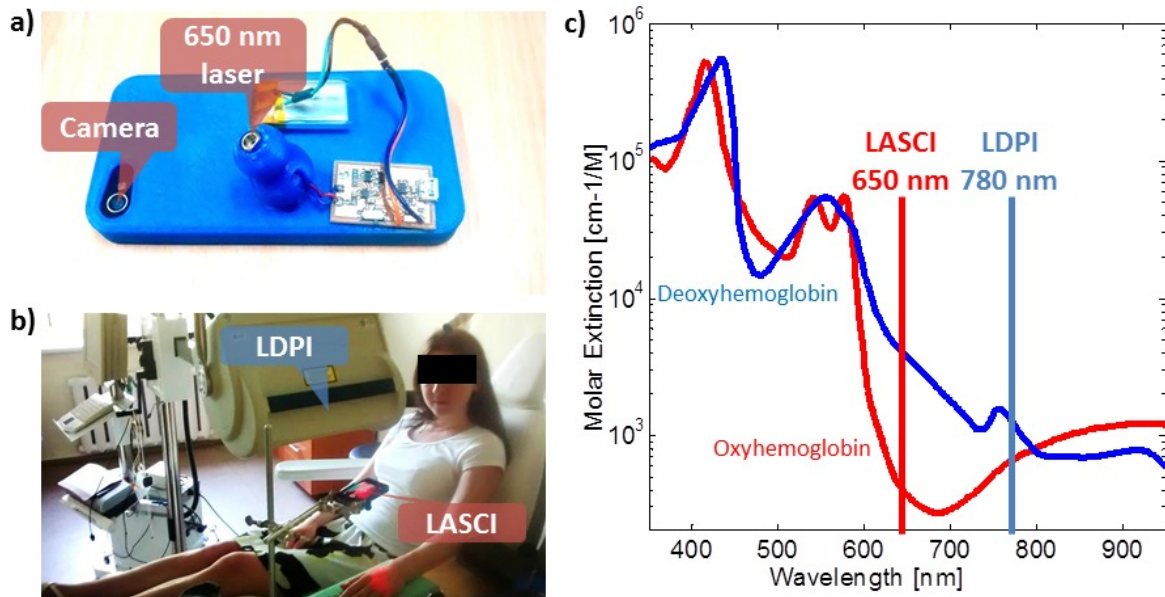


Figure 1. Mobile phone based LASCI (a), measurement set-up (b), and comparison of LASCI and LDPI laser wavelengths in frame of absorption of hemoglobin (c).

An *iPhone 4S* back camera (8 megapixel) and a default app were used for acquisition of videos (2MP – 1920x1080 px, 24...30 fps). The distance between the device and skin surface was held constant (~15 cm) during the measurements, see Figure 1b. Video files were further uploaded to PC for processing in *MatLab*, but it could be also performed in smartphone, thanks to the simplicity of LASCI algorithm.

The speckle contrast SC is defined as the ratio of the standard deviation Std to the mean intensity I_{mean} [1] and can be calculated from the region of interest within the image as

$$SC = \frac{std}{I_{mean}}. \quad (1)$$

Speckle contrast SC varies between 0 and 1, and is inversely proportional to the blood flow BF :

$$BF \approx \frac{1}{SC}. \quad (2)$$

The monitoring of blood flow changes in time was performed choosing the region of interest (100x100 pixels or more) and calculating the parameters at each video frame; mapping of blood flow was performed within the scanning window of 10x10 pixels.

Fast implementation of LASCI algorithm that allows simultaneous processing of all color image channels (R, G and B) and also nearly real time video processing was described in our previous study [18]. We recommend using G or B

channel instead of R channel to avoid intensity signal saturation. Recommended intensity signal range for 8-bit image is 50...200 digital units for further speckle contrast calculations.

The LDPI system (*moorLDI2* from *Moor Instruments*, UK) was used as a reference. It is the closest alternative to LASCI technique, and was available for comparison measurements at Institute of Experimental and Clinical Medicine, University of Latvia. The LDPI system was set to single point measurement mode with 40 Hz acquisition rate. Experimental measurement set-up for simultaneous LASCI and LDPI measurements is shown in Figure 1b. We could not take simultaneous measurements exactly at the same point due to high sensitivity of mobile phone camera to LDPI lasers, especially the 633 nm pointer (beam marker). The measurements were taken from the dorsal side of the palm, and the region of interest for LASCI was chosen as close as possible to the LDPI measurement point. The LDPI system's 780 nm laser radiation penetrates deeper into the skin, in comparison to the LASCI device with a 650 nm laser that samples information more superficially (up to 300 μm [14]) and has ~ 10 times lower molar extinction coefficient for oxyhemoglobin than for deoxyhemoglobin [25], see Figure 1c. Laser Doppler technique samples deeper in the skin – up to 1 mm [14].

The measurements were performed in dark room to avoid influence of ambient light. Well known and standardized tests (post-occlusive hyperemia and local thermal hyperemia) were used to test LASCI device and to compare both techniques. Vacuum pillow was used for fixation of the hand.

An arterial occlusion of forearm allows observation of post-occlusive reactive hyperemia (PORH) [26]. A cuff (180–200 mmHg) was applied to the upper arm, but measurements were taken from the dorsal side of the palm: ~ 60 s for baseline recording, 1 min. during occlusion, and 1 min. for post-occlusion period. Parameters were calculated as the mean values over the region of interest (RoI). It was expected to see a decrease in blood flow/perfusion parameters during occlusion (Biological zero) and a slight overshoot (Peak post-occlusive hyperemia) after cuff release.

The local thermal hyperemia test was performed to cause local vasodilatation of blood vessels. Laser Doppler probe with heating capability (*SHO2* from *Moor Instruments*, UK) was fixed to the dorsal side of the palm with a double-sided tape. The local heating temperature was 44 $^{\circ}\text{C}$ over the measurement time (7 min.). Two main phases of thermal hyperemic response were expected: the initial peak and the plateau.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Speckle color image of the dorsal side of the palm is shown in Figure 2a. B-channel intensity values in the range 50...200 units were used for further calculations of speckle contrast in order to avoid signal saturation. An example of corresponding inverse speckle contrast I/SC map (representing blood flow) overlaid on the color image is shown in Figure 2b.

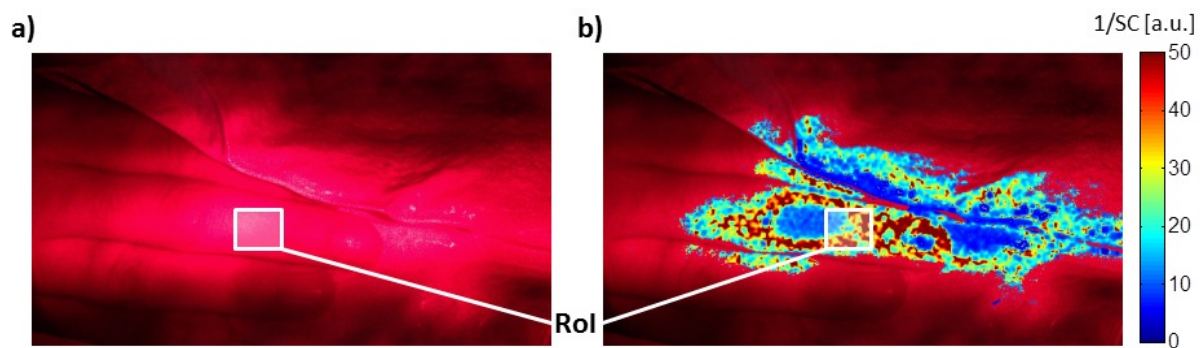


Figure 2. Speckle color image of the dorsal side of the palm (a) and the corresponding inverse speckle contrast I/SC map (b). Region of interest (RoI) is the monitoring site for arterial occlusion.

Post-occlusive hyperemia test was performed on the dorsal side of the palm (29 years old healthy male volunteer, skin type II), I/SC parameter values were calculated from the region of interest (100x100 pixels), see Figure 2. The results of

LDPI and LASCi comparative measurements are shown in Figure 3. Reduced perfusion/blood flow parameter values were observed during arterial occlusion as well as the PORH peak (overshoot) after cuff release. I/SC parameter values did not drop to zero during arterial occlusion due to the offset in speckle contrast. LASCi was more sensitive to different movements resulting in false parameter maxima – I/SC curve artifacts near 90 and 110 s in Figure 3. The mean intensity values of LASCi changed inversely to deoxyhemoglobin concentration due to ~10 times higher absorption coefficient for deoxyhemoglobin at 650 nm (see Figure 1c) in comparison to oxyhemoglobin. The standard deviation increased during provocation and decreased after cuff release as expected (due to decreased and restored blood flow). Both techniques LDPI and LASCi could be used for further extraction of the PORH parameters – resting and maximum flux, time to maximum flux and recovery [26].

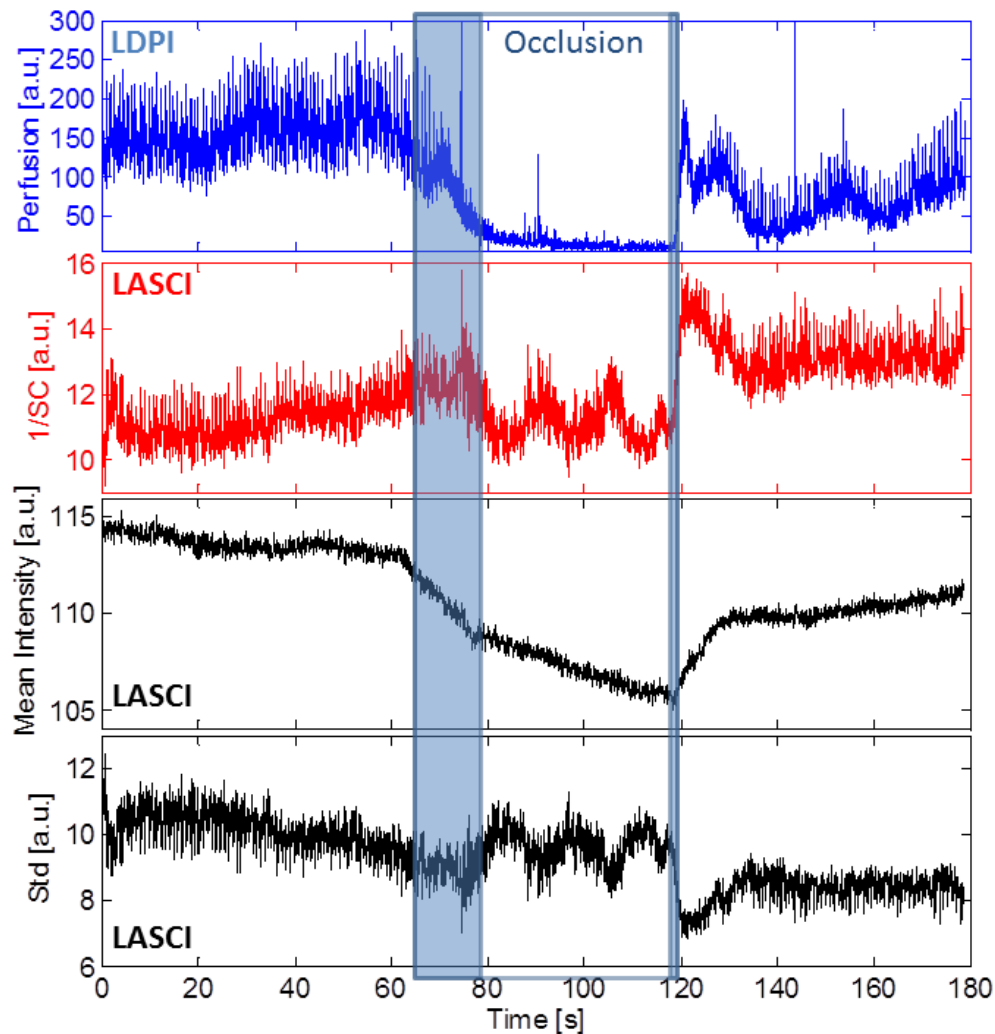


Figure 3. Results of the post-occlusive hyperemia test: perfusion measured with LDPI (blue), I/SC calculated from LASCi data (red) and corresponding LASCi signal sub-products (black).

The alternating signal component (AC) can be extracted from perfusion (LDPI) and I/SC (LASCi) signals by subtracting the direct signal component (DC). DC signal was calculated as smoothed signal over 1 s time frame; the resulting AC signal can be seen in Figure 4. LDPI perfusion signal was scaled to LASCi I/SC amplitude and corresponded well. The heart rate pulsations (~1Hz) were clearly visible in zoomed signal windows before arterial occlusion and during PORH reaction. Much higher noise was observed in LASCi signal during arterial occlusion where AC signal fluctuations were not expected.

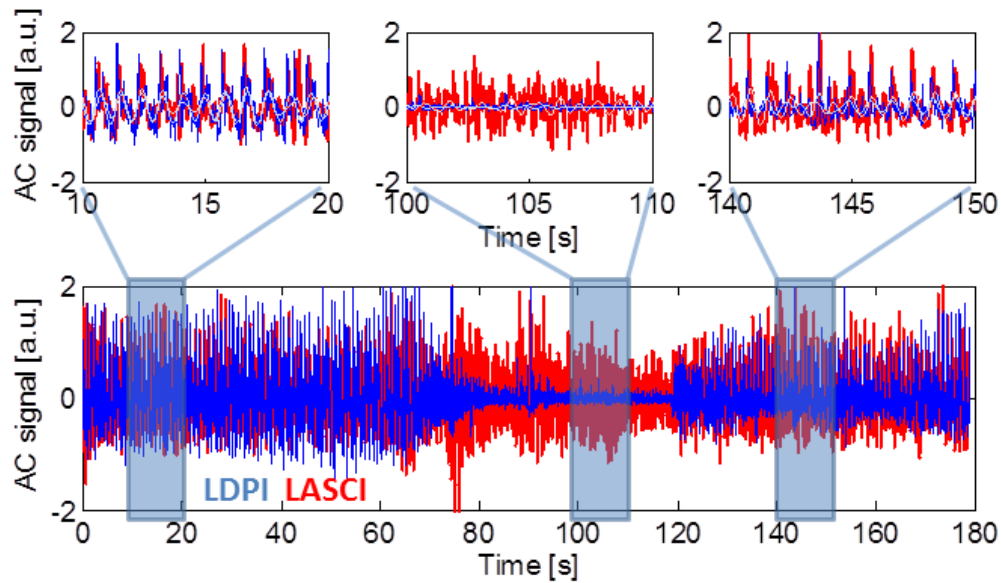


Figure 4. Alternating signal component (AC) for LDPI and LASCI.

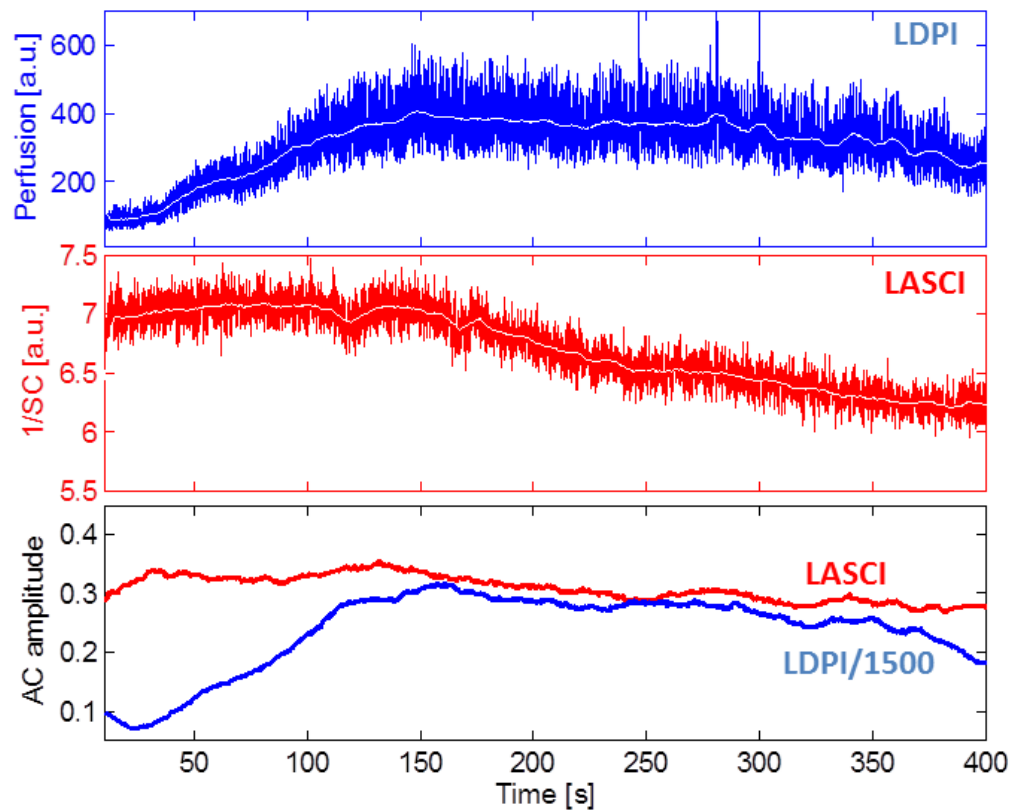


Figure 5. The local thermal hyperemia test: perfusion measured with LDPI (blue), $1/SC$ calculated from LASCI data (red) and the corresponding AC signal amplitudes.

The local thermal hyperemia test (25 years old healthy female volunteer, skin type II) results are shown in Figure 5. The expected LDPI perfusion increase up to 150% was observed after 3 min. of provocation of the dorsal side of the hand, as well as the following normalization (decrease) of perfusion. A different reaction was observed in LASCI *I/SC* results – an already increased blood flow and a following normalization. The difference in observations could be explained by different sampling depth of techniques: LASCI could be characterized as superficial, but LDPI samples from deeper layers of skin. Immediate reaction of superficial blood flow could be caused by contact probe. Similar difference can be observed in AC signal amplitude, demonstrating that an increased direct perfusion/blood flow also results in an increased alteration component – blood pulse amplitude. The result shows that LDPI and LASCI measurements can be compared with caution due to different sampling depth as well as the signal origin.

It should also be noted that single-point perfusion/blood flow measurements show large variability in recordings due to the small sampling volume [14] and the assumed large spatial heterogeneity in capillary density in forearm skin [27]. The reproducibility of the data might be improved by evaluating and averaging parameter responses over larger areas [28].

4. CONCLUSIONS

Simple laser module (650 nm) speckle contrast imaging (LASCI) device was implemented as a connection kit for mobile phone (*iPhone 4S*) with the cost below 10 euros. The results showed that it can be used for primary fast monitoring of speckle contrast that can be further related to the skin blood flow. The device could also be used for educational purposes, e.g. laboratory works for students on laser speckles/interference.

Comparison measurements of mobile phone based LASCI and commercially available LDPI showed that LASCI device could provide satisfactory results in case of post-occlusive hyperemia and can be used for further extraction of the PORH parameters. The heat test demonstrated difference between both techniques - LASCI could be characterized as superficial while LDPI data relate to deeper sampling depths. Additional test measurements should be performed to average the perfusion/blood flow values over larger areas to avoid spatial heterogeneity in capillary density.

LASCI device could also be used for observation and analysis of alternating signal component of blood flow that is related to heart rate. Monitoring of pulse amplitude could be of interest for control of local anesthesia [29].

LASCI is sensitive to movements, surface curvature and also settings of the camera: auto adjustment of the camera can cause artifacts resulting in floating signal or jumps in signal values. Uniform laser illumination would allow implementation of parameter mapping. Next steps would be development of mobile phone app to test full control of the LASCI device and also processing of the data.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the European Social Fund within project “Innovative biomedical image acquisition processing technologies (InBiT)” (No.2013/0009/1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/014). The authors are grateful to the laboratory measurement support provided by Institute of Experimental and Clinical Medicine, University of Latvia.

REFERENCES

- [1] J.D. Briers, „Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging,” *Physiol. Meas.* 22, R35-R66 (2001)
- [2] D.A. Boas, „Laser speckle contrast imaging in biomedical optics,” *J. Biomed. Opt.* 15(1), 011109 (2010)
- [3] M. Draijer, E. Hondebrink, T. Leeuwen, W. Steenbergen, “Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion,” *Lasers Med Sci* 24, 639–651 (2009)
- [4] D. Briers, P.M. McNamara, M.L. O’Connell, and M.J. Leahy, “Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA) for Measuring Blood Flow,” in *Microcirculation Imaging*, Wiley-Blackwell, Weinheim, 147-164 (2012)
- [5] J.D. Briers, S. Webster, „Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow,” *J. Biomed. Opt.* 1, 174-179 (1996)

- [6] K.R. Forrester, J. Tulip, C. Leonard, C. Stewart, R.C. Bray, „A laser speckle imaging technique for measuring tissue perfusion,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 51, 2074-2084 (2004)
- [7] J. Senarathna, A. Rege, Nan Li, N.V. Thakor, “Laser Speckle Contrast Imaging: Theory, Instrumentation and Applications,” *IEEE Reviews in Biomedical Engineering* 6, 99-110 (2013)
- [8] Y.C. Huang, T.L. Ringold, J.S. Nelson, B. Choi, „Noninvasive blood flow imaging for real-time feedback during laser therapy of port wine stain birthmarks,” *Lasers Surg. Med.* 40, 167-173 (2008)
- [9] J. Qin, R. Reif, Z. Zhi, S. Dziennis, R. Wang, „Hemodynamic and morphological vasculature response to a burn monitored using a combined dual-wavelength laser speckle and optical microangiography imaging system,” *Biomed. Opt. Express* 3(3), 455-466 (2012)
- [10] A. K. Jayanthi, N. Sujatha, M. Ramasubba Reddy, V. B. Narayanamoorthy, “Non invasive blood flow assessment in diabetic foot ulcer using laser speckle contrast imaging technique,” *Proc. of SPIE* 8952, 89521D (2014)
- [11] S.C. Sandker, E. Hondebrink, J.G. Grandjean, W. Steenbergen, “Laser speckle contrast analysis for quantifying the Allen test: A feasibility study,” *Lasers Surg. Med.* 46, 186–192 (2014)
- [12] V. Kalchenko, Y. Kuznetsov, I. Meglinski, A. Harmelina, “Label free in vivo laser speckle imaging of blood and lymph vessels,” *J. Biomed. Opt.* 17(5), 050502 (2012)
- [13] T.K. Lee, L. Tchvialeva, H. Lui, H. Zeng, D.I. McLean, “In-Vivo Skin Roughness Measurement by Laser Speckle,” in *Fringe*, Springer Berlin Heidelberg, 933-936 (2013)
- [14] J. O’Doherty, P. McNamara, N.T. Clancy, J.G. Enfield, M.J. Leahy, “Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration,” *J. Biomed. Opt.* 14(3), 034025 (2009)
- [15] A. Humeau-Heurtiera, G. Maheb, S. Durand, P. Abrahamb, “Skin perfusion evaluation between laser speckle contrast imaging and laser Doppler flowmetry,” *Opt. Commun.* 291, 482-487 (2013)
- [16] L.M. Richards, S.M. Shams Kazmi, J.L. Davis, K.E. Olin, A.K. Dunn, “Low-cost laser speckle contrast imaging of blood flow using a webcam,” *Biomedical Optics Express* 4(10), 2269-2283 (2013)
- [17] D. Jakovels, U. Rubins, J. Spigulis, “LASCA and PPG imaging for non-contact assessment of skin blood supply,” *Proc. SPIE* 8668, 866849 (2013)
- [18] D. Jakovels, I. Saknite, J. Spigulis, “Implementation of laser speckle contrast analysis as connection kit for mobile phone for assessment of skin blood flow,” *Proc. SPIE* 9129, 91293I (2014).
- [19] A. Steimers, S. Pinkernell, U. Lindauer, M. Kohl-Bareis, “Simultaneous imaging of cortical haemoglobin concentration and blood flow with RGB reflectometry and LASCA during cortical activation in rats,” *Proc. SPIE* 8804, 880403 (2013)
- [20] W.F. Zha, W.M. Song, J.J. Ai, A.E. Xu, “Mobile connected dermatoscope and confocal laser scanning microscope: a useful combination applied in facial simple sensitive skin,” *Int. J. Cosmet. Sci.* 34(4), 318-21 (2012)
- [21] E. Jonathan, M.J. Leahy, “Cellular phone-based photoplethysmographic imaging,” *J. Biophotonics* 4(5), 293-296 (2011)
- [22] S. Kroemer, J. Fruhauf, T.M. Campbell, C. Massone, G. Schwantzer, H.P. Soyer, R. Hofmann-Wellenhof, "Mobile teledermatology for skin tumour screening: diagnostic accuracy of clinical and dermoscopic image tele-evaluation using cellular phones," *Br J Dermatol.* 164(5):973-9 (2011)
- [23] L. Rosado, R. Castro, L. Ferreira, M. Ferreira, “Extraction of ABCD rule features from skin lesions images with smartphone,” *Stud Health Technol Inform.* 177, 242-7 (2012)
- [24] Y.G. Lee, W.S. Jeong, G. Yoon, “Smartphone-based mobile health monitoring,” *Telemed J E Health.* 18(8), 585-90 (2012)
- [25] S. Pahl, “Tabulated Molar Extinction Coefficient for Hemoglobin in Water,” <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/summary.html>, Last access: August, 2014
- [26] F. Morales, R.T. Graaff, A.J. Smit, S. Bertuglia, A.L. Petoukhova, W. Steenbergend, P. Legere, G. Rakhorsta, “How to assess post-occlusive reactive hyperaemia by means of laser Doppler perfusion monitoring: Application of a standardised protocol to patients with peripheral arterial obstructive disease,” *Microvascular Research* 69, 17– 23 (2005)
- [27] K. Wardell, I.M. Braverman, D.G. Silverman, G.E. Nilsson, “Spatial heterogeneity in normal skin perfusion recorded with laser Doppler imaging and flowmetry,” *Microvascular research* 48(1), 26-38 (1994)
- [28] G.A. Tew, M. Klonizakis, H. Crank, J.D. Briers, G.J. Hodges, “Comparison of laser speckle contrast imaging with laser Doppler for assessing microvascular function,” *Microvascular Research* 82(3), 326-332 (2011)
- [29] U. Rubins, A. Miscuks, “The analysis of blood flow changes under local anesthetic input using non-contact technique,” *IEEE conf. proc.* 2, 610-604 (2010)