



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.3. par periodu no 01.03.2014.g līdz 30.06.2014.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, doktorants.

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 priekšapstrāde	5
3.1.	Attēlu reģistrācija ar attēlu bīdīšanu un salīdzināšanu.....	5
3.2.	Interaktīva attēlu reģistrācija.....	7
3.3.	Attēlu segmentēšana	8
4.	Ādas veidojumu klasifikācija, izmantojot informāciju no neliela skaita spektra joslām	10
4.1.	Klasifikatora stabilitāte	12
4.2.	Spektrālo joslu tripleta modifikācija	14
5.	Elektroforēzes un sonoforēzes rezultātu attēlu iegūšana un analīze.....	15
6.	Publikācijas SPIE Proceedings	16
7.	Daiņa Jakovela promocijas darbs	18
8.	Multimodālas biomedicīnisku attēlu iegūšanas maketierīces laboratorijas pārbaudes.....	19
9.	Secinājumi	24
1.pielikums.	Application of fluorescence spectroscopy and multispectral imaging for non-invasive estimation of GFP transfection efficiency induced by electro- and sonoporation	25
2.pielikums.	Publikāciju teksti SPIE Proceedings	39

1. Kopsavilkums

Pārskata periodā projekta InBiT aktivitātes "Pētījumi" ietvaros veikti šādi darbi:

1. Izstrādāta metode melanomu atšķiršanai no dzimumzīmēm, balstoties uz ādas veidojumu attēliem 3 spektra joslās. Metode realizēta MATLAB vidē un pārbaudīta attiecībā pret pieejamo ādas veidojumu attēlu kopu (32 melanomas, 59 plakanas dzimumzīmes, 35 piepaceltas dzimumzīmes), iegūstot 1 sensitivitātes un 2 specifitātes kļūdas (aktivitāte 2.2).
2. Veikti eksperimenti ar pelēm šūnu apvalka elektroforēzes un sonoforēzes efektivitātes izpētei zāļu ievadīšanai. Secināts, ka labākos rezultātus var iegūt, izmantojot elektroforēzi ar īsiem (0,1 ms) augsta sprieguma (1200V/cm) impulsiem. Iegūti *in vivo* un *in vitro* attēlu pāri, starp kuriem tiks meklēti korelācijas raksturlielumi ar mērķi nodrošināt elektroforēzes efektivitātes novērtēšanu *in vivo* (aktivitāte 2.1).
3. Turpināta vēdera dobuma 3D datortomogrāfijas attēlu apstrādes programmas izstrāde. Tā kā nav izdevies definēt meklējamo nieru tauku objektu robežu pazīmes, tiek izstrādāts objektu tilpuma noteikšanas algoritms, ko var apmācīt, izmantojot manuāli atzīmētas objektu robežas (aktivitāte 2.2).
4. Izstrādāti un MATLAB vidē realizēti algoritmi ādas veidojumu multispektrālo attēlu automātiskai reģistrācijai un ādas veidojumu segmentācijai (aktivitāte 2.2).
5. Dainis Jakovels sekmīgi aizstāvējis promocijas darbu par tēmu "Ādas parametru izpēte un kartēšana ar optiskām metodēm" un ieguvis fizikas zinātņu doktora grādu (aktivitāte 2.1).
6. ASI turpināti attēlu iegūšanas aparātūras maketierīces laboratorijas pētījumi. Kopumā jau iegūti ādas veidojumu attēli no 75 pētījuma dalībniekiem (aktivitāte 2.1).
7. Dainis Jakovels un Inga Saknīte nolasījuši 2 referātus konferencē "Developments in Optics and Communications 2014", kas notika 9.-12.aprīlī Rīgā (aktivitāte 2.4).
8. Dainis Jakovels un Inga Saknīte piedalījušies SPIE Photonics Europe 2014 ar 2 stenda referātiem (aktivitāte 2.4).
9. Sagatavoti 2 raksti publicēšanai "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)
10. Inga Saknīte ar stenda referātu Inga Saknīte, Arita Silapetere, Janis Spigulis - "Phantoms used for mapping of skin chromophores by multi-spectral imaging" piedalījies konferencē "Biomedical Optics 2014", kas notika no 26. - 30. aprīlim Maiami, Floridā, ASV (aktivitāte 2.4).
11. Konferencē "Electronics 2014" iesniegtas un pieņemtas tēzes par multispektrālo attēlu fragmentu klasifikācijas metodi. Juris Siņica-Siņavskis ar referātu piedalījās šajā konferencē, kas notika 16.-18.jūnijā Palangā (aktivitāte 2.4).
12. Raksts par multispektrālo attēlu fragmentu klasifikācijas metodi publicēts žurnālā "Electronics and Electrical Engineering" (aktivitāte 2.4).
 - a. Aivars Lorencs, Ints Mednieks and Juris Sinica-Sinavskis, "Simplified Classification of Multispectral Image Fragments".
13. Projekta pētnieciskā darbība apspriesta 4 zinātnisko dalībnieku semināros (aktivitāte 2).

Atskaites materiālus gatavoja visi projekta zinātniskie dalībnieki, tos apkopoja un rediģēja

projekta zinātniskais vadītājs

A.Lorencs

2. Ievads

Šis pārskats veltīts projekta trešā posma laikā veiktajiem pētījumiem. Šajā laikā tika turpināti uzsāktie pētījumi, par iegūtajiem rezultātiem ziņots zinātniskās konferencēs un gatavotas zinātniskās publikācijas. Īpaša vērība tika veltīta ādas veidojumu klasifikācijas uzdevuma risināšanai, izstrādājot algoritmu, kuru varētu realizēt relatīvi vienkāršā un lētā aparatūrā.

Attīstot idejas, uz kurām balstās iepriekšējā periodā piedāvātā multispektrālo attēlu fragmentu klasifikācijas metode, tika izstrādāta jauna metode ādas veidojumu klasifikācijai no neliela skaita spektra joslu datiem. Metode realizēta MATLAB vidē un pārbaudīta, izmantojot pieejamo ādas veidojumu attēlu kopu, par kuriem ir zināma ārsta diagnoze. Pārbaudes rezultātā secināts, ka šī metode ļauj nodrošināt augstu klasifikācijas precizitāti un to var rekomendēt realizācijai specializētā iekārtā. Šīs metodes pielietošana iespējama bez sarežģītas un dārgas multispektrālo attēlu iegūšanas aparatūras izmantošanas. Lai to realizētu, jāizmanto vadāms gaismas avots, kas sastāv no diodēm, kuras izstaro gaismu izvēlētajās spektra joslās. No ādas atstaroto gaismu var uztvert ar krāsu attēlu sensoru. Iegūtos ādas veidojumu attēlus varēs nosūtīt uz datoru vai mobilo telefonu, kuros tiks darbināta pielāgota attēlu apstrādes programma. Programmas izpildes rezultātā lietotājs tiktu informēts par to, vai ir aizdomas, ka analizētais ādas veidojums varētu būt ļaundabīgs un jāgriežas pie ārsta-dermatologa. Uzsākta šādas aparatūras specifiskācijas izstrāde.

ASI tika turpināti izstrādātā aparatūras maketa laboratorijas izmēģinājumi multimodālu attēlu iegūšanai. Iegūtie attēli tiek uzkrāti projekta iekšējā vietnē EDI un izmantoti attēlu reģistrācijas un ādas veidojumu segmentācijas metožu un algoritmu pārbaudei.

Perioda laikā tika iesniegtas un pieņemtas tēzes daļībai starptautiskās konferencēs "Developments in Optics and Communications 2014", "SPIE Photonics Europe 2014", "Biomedical Optics 2014" un "Electronics 2014". Projekta dalībnieki piedalījās attiecīgo konferenču darbā ar referātiem, tādējādi aprobējot projekta ietvaros attīstītās idejas. Par šo referātu tēmām perioda laikā tika sagatavoti arī 3 zinātniski raksti izdevumiem "SPIE Proceedings" un "Electronics and Electrical Engineering", kuri pieņemti publicēšanai.

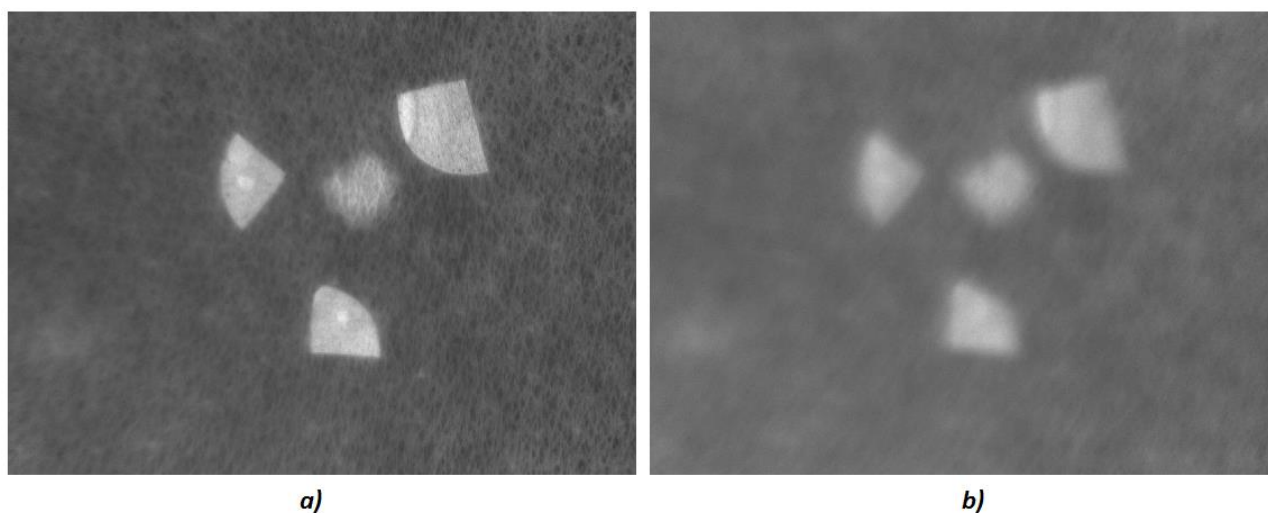
Perioda laikā sekmīgi aizstāvēts pirmais no ieplānotajiem promocijas darbiem un tā autors Dainis Jakovels kļuvis par fizikas zinātņu doktoru. Aizstāvēšanai tiek gatavoti Ingas Saknītes un Gītas Krieviņas promocijas darbi.

Pārskata periodā turpināti darbi, kas saistīti ar elektroforēzes un sonoforēzes efektivitātes izpēti zāļu ievadīšanai šūnās. Veikti eksperimenti ar pelēm un iegūti *in vivo* un *in vitro* fluorescences attēlu pāri, kas raksturo šo procedūru rezultātus. Ieplānoti tālāki pētījumi, kuros tiks novērtēti korelācijas raksturlielumi starp šiem attēlu pāriem. Pētījumu mērķis ir nodrošināt nepieciešamās informācijas iegūšanu par procedūru efektivitāti tikai no *in vivo* attēliem, tādējādi ļaujot izmantot izmēģinājumu peles atkārtoti.

Perioda laikā turpināta attēlu reģistrācijas un segmentācijas algoritmu izstrāde, 3D objektu izdalīšanas uzdevuma risināšana datortomogrāfijas attēlos, kā arī veikti citi darbi, kuru rezultāti atainoti pārskatā.

3. Ādas veidojumu multispektrālo attēlu priekšapstrāde

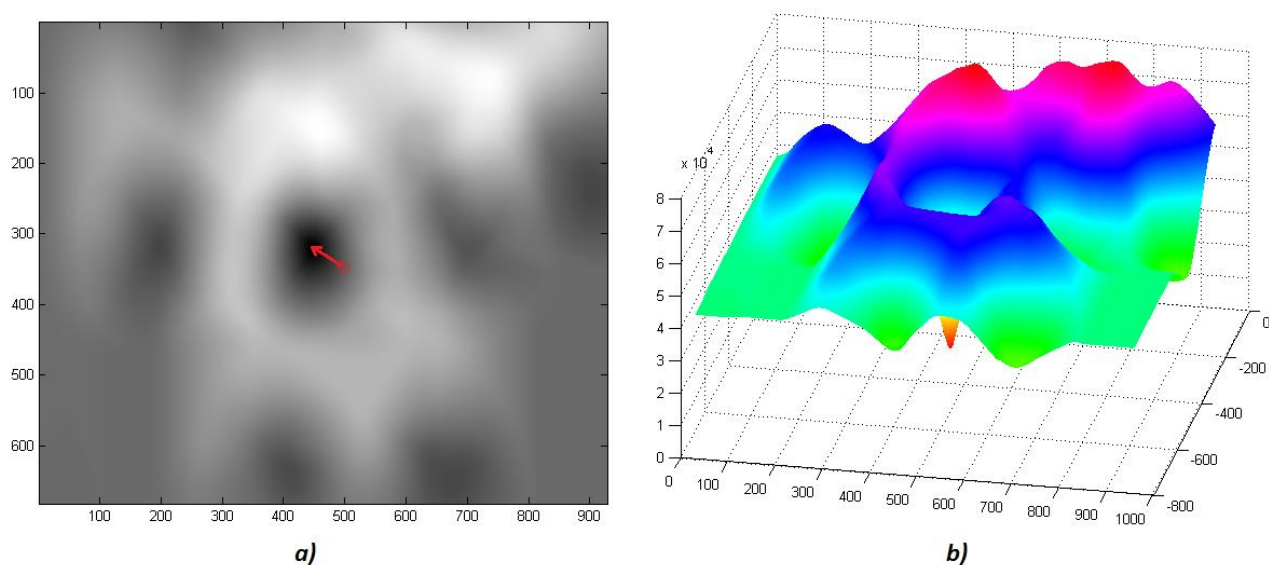
Iepriekšējā pārskata periodā Matlab vidē tika izstrādāta programma, kas īsteno metodi multispektrālo optiskā blīvuma attēlu reģistrācijai. Testējot metodi ar jauniegūtajiem datiem, tika secināts, ka ir gadījumi, kad algoritms nenostādā pietiekami labi. Visbiežāk attēls netiek pareizi reģistrēts, ja tas ir izplūdis pacienta vai kameras kustību dēļ. Piemērs parādīts attēlā 3.1.b. Izplūdušos attēlos bieži netiek atrasti atbilstošie raksturīgie punkti. Iespējams risinājums šai problēmai ir atkārtota attēlu uzņemšana. Tomēr, tā kā attēlu uzņemšana ar multispektrālās kameras Nuance EX palīdzību ir laikietilpīgs process, tas nav vēlams risinājums. Tādēļ, šajā pārskata periodā tika meklēti paņēmieni, kas ļautu uzlabot attēlu reģistrāciju.



Att. 3.1. Divu dažādu frekvenču attēli, kurus jāreģistrē vienu pret otru. Attēls b ir izplūdis pacienta vai kameras izkustēšanās dēļ.

3.1. Attēlu reģistrācija ar attēlu bīdīšanu un salīdzināšanu

Viens no alternatīviem reģistrācijas variantiem raksturīgo punktu atrašanai ir viena attēla bīdīšana attiecībā pret otru, meklējot attēlu pikseļu optisko blīvumu starpību absolūto vērtību summas minimumu. Bīdot attēlu 3.1.a gan horizontālā gan vertikālā virzienā pa pikselim pret attēlu 3.1.b un aprēķinot pārklājušos pikseļu optisko blīvumu starpību absolūto vērtību summu, pie katras attēlu nobīdes tiek iegūts lielums, kas raksturo attēlu līdzību pie konkrētās nobīdes. Attēlā 3.2.a parādītas iegūtās summas attēla formā, kur gaišākie apgabali atbilst lielākajām pikseļu optisko blīvumu starpību absolūto vērtību summām, tumšākie – mazākajām. Attēlā 3.2.b šī pati funkcija parādīta 3D telpā, kur skaidrāk parādās, ka konkrētajā gadījumā eksistē globāls minimums, pie kura nobīdītie attēli ir vislīdzīgākie viens otram pēc pikseļu vērtībām. Ar bultu attēlā 3.2.a, kā piemērs, parādīta reģistrējamā attēla sākotnējā atrašanās vieta, uz kuru jāveic translācijas transformācija, lai attēlu reģistrētu attiecībā pret jau reģistrētu blakus joslas attēlu. Atšķirībā no iepriekšējā pārskata periodā apskatītā reģistrācijas paņēmiena ar raksturīgajiem punktiem, šeit apskatītais ļauj veikt tikai attēla pārvietošanas transformāciju, izpaliekot rotācijas un izmēra mainīšanas transformācijām. Tādēļ šis algoritms tiek pielietots tikai atsevišķajiem gadījumiem, ja kāds no reģistrētajiem attēliem ir izplūdis. Pārējie attēli joprojām tiek reģistrēti ar raksturīgo punktu salīdzināšanas metodi.



Att. 3.2. Divu reģistrējamo attēlu salīdzināšana bīdot vienu pret otru un iegūstot pārklājošos pikseļu optisko blīvumu starpību absolūto vērtību summas.

Pēc aprakstītās metodes īstenošanas Matlab vidē tika secināts, ka metodes trūkums ir lielas skaitļošanas jaudas nepieciešamība, jo pārbīdot attēlus ik pa pikselim, katrā solī ir jāveic daudz darbību, salīdzinot lielāko daļu abu attēlu pikseļu. Tādēļ metode tika modificēta ātrākai darbībai.

Uzlabotajā metodē pirmā attēlu salīdzināšana, tāpat kā iepriekš, notiek nemainot reģistrējamā attēla koordinātes attiecībā pret otru. Ja sākotnējās reģistrējamā attēla centra koordinātes ir (i, j) , tad tiek iegūtas pikseļu optisko blīvumu starpības gan pie šāda attēla novietojuma, gan arī pārbīdot reģistrējamo attēla centru uz astoņām apkārt esošām koordinātēm $(i-1, j-1)$, $(i, j-1)$, $(i+1, j-1)$, $(i-1, j)$, $(i+1, j)$, $(i-1, j+1)$, $(i, j+1)$, $(i+1, j+1)$. Attēlā 3.3. parādīts piemērs, kurā apkārt koordinātēm (i, j) ir atrastas un pierakstītas iegūtās pikseļu optisko blīvumu starpību absolūto vērtību summas pie attiecīgajām reģistrējamā attēla pārbīdēm. No atrastajām summām tiek noteikta mazākā, kas piemērā ir 50 un iegūta centra koordinātēm $(i-1, j+1)$. Turpmākā attēla pārbīdīšana notiek, par centru izmantojot jaunās koordinātes $(i-1, j+1)$, un tā apkārtnē meklējot vēl mazāku summas vērtību. Šādi pa soļiem tiek turpināta attēla pārbīdīšana, līdz centra apkārtnē netiek atrasta neviena mazāka pikseļu optisko blīvumu starpību absolūto vērtību summa. Šāds algoritms būtiski samazina apskatīto pārbīdīšanu skaitu un uzlabo ātrdarbību. Pastāv gan iespēja, ka atrastā gala koordināte būs nevis globāls, bet lokāls minimums, kas var novest pie kļūdainas reģistrējamā attēla transformācijas. Tomēr visbiežāk pēc viļņu garumiem tuvu spektra joslu attēli nav nobīdīti tālu viens no otra, tādēļ, sākot salīdzināšanu ar nepārbīdītiem attēliem, ir liela varbūtība, ka tuvākais lokālais minimums ir arī meklētais globālais minimums. Šāda gadījuma piemērs parādīts attēlā 3.2., kur globālais minimums ir tuvu summu attēla centram, un, reģistrējamais attēls pēc transformācijas tiek pārbīdīts nelielā attālumā pa kreisi un uz augšu.

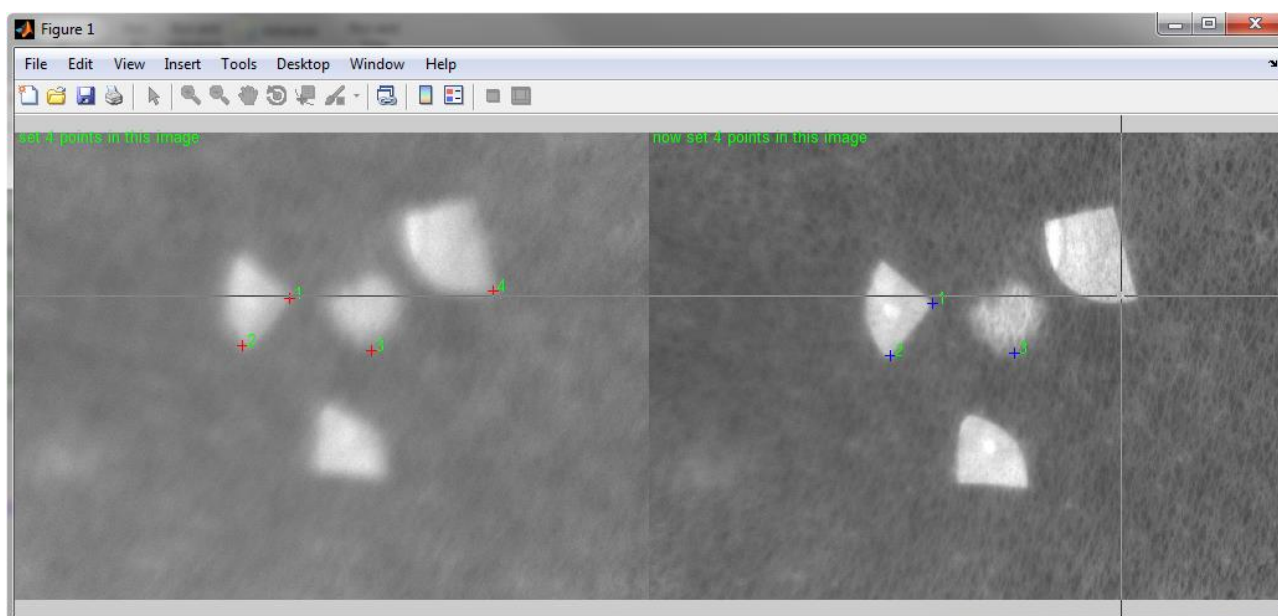
$(i-2, j-2)$				
	110	100	50	→
	170	(i, j)	56	
	300	200	70	
$(i+2, j-2)$				

Att. 3.3. Uzlabotā algoritma iterācijas ilustrācija: reģistrējamā attēla pārbīdīšanas virziena noteikšana.

3.2. Interaktīva attēlu reģistrācija

Matlab vidē izstrādātajā reģistrēšanas programmā attēli tiek reģistrēti pēc raksturīgajiem punktiem. Ja kādā no salīdzināmajiem attēliem netiek atrasti raksturīgie punkti, vai arī, ja iegūtā transformācijas matrica uzrāda pārāk lielas un maz ticamas nepieciešamās izmaiņas reģistrējamajā attēlā, tad reģistrācijai tiek pielietota augstāk aprakstītā attēlu bīdīšanas un salīdzināšanas metode. Ja attēlu tomēr neizdodas reģistrēt arī ar šo metodi, tad tiek lūgta lietotāja palīdzība attēlu reģistrācijai.

Matlab vidē tika izveidota programma, kas izveda uz ekrāna jau reģistrētu un reģistrējamo attēlus (att. 3.4.). Lietotājs atzīmē četrus punktus pirmajā attēlā, tad tos pašus punktus otrajā attēlā, kas tiek reģistrēts. Atliekot punktus, uz grafiskā izveda parādās gan atzīmētie punkti, gan to atzīmēšanas kārtība, lai lietotājs to varētu atkārtot abos attēlos vienādi. Tiek atzīmēti 4 punkti, jo tas ir minimālais nepieciešamais atbilstošo punktu skaits projekcijas transformācijai. No atzīmētajiem punktiem programmā tiek sagatavota transformācijas matrica, kas tiek pielietota attēla reģistrācijai.

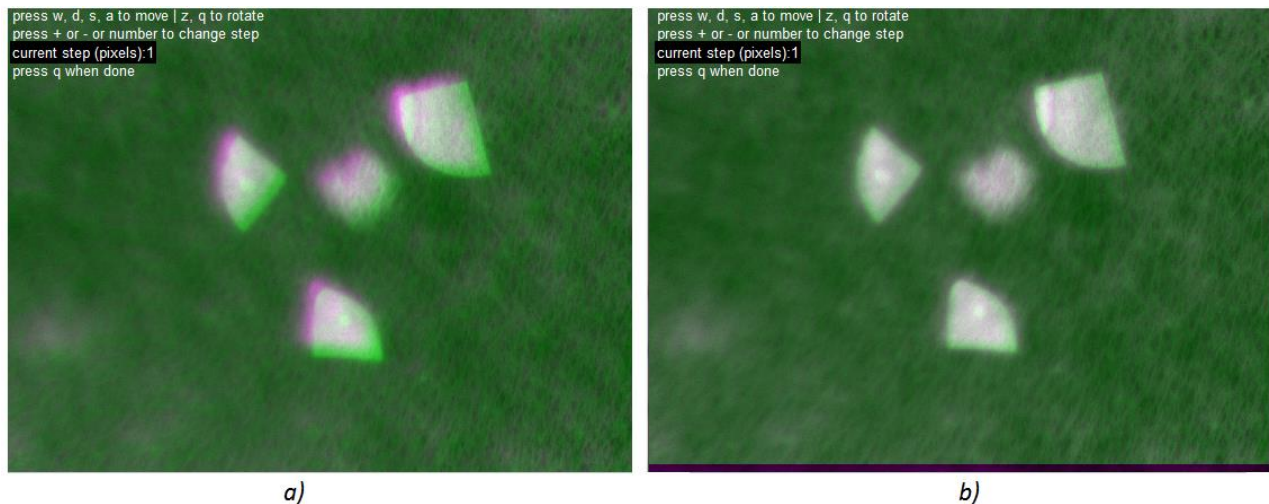


Att. 3.4. Attēlu reģistrācija ar lietotāja atzīmētiem punktiem.

Aprakstītā metode ļauj veikt pilnu projekcijas transformāciju attēlam, koriģējot gan reģistrējamā attēla centra koordinātes, gan rotāciju, gan izmēru. Tomēr, praktiski testējot piedāvāto metodi, secināts, ka punktu ievadīšana nav ērta, jo lietotājam nav viegli izlemt, kur precīzi atzīmēt abos attēlos atbilstošos punktus. Tādēļ tika izstrādāta cita metode, kas ļauj realizēt attēlu interaktīvu reģistrāciju sarežģītos gadījumos.

Alternatīvajā metodē reģistrējamie attēli tiek attēloti kopīgi, uzklājot tos vienu virsū otram un augšējo attēlu padarot daļēji caurspīdīgu. Piemērs parādīts attēlā 3.5.a, kur puscaurspīdīgs attēls 1 ir iekrāsots zaļā, bet attēls 2 violetā krāsā. 3.5.a ir novērojams, ka violette apgabali nesakrīt precīzi ar zaļajiem, tas norāda, ka attēli nav pareizi reģistrēti viens attiecībā pret otru. Lietotājam tiek dota iespēja bīdīt vienu attēlu attiecībā pret otru, līdz objekti attēlos precīzi pārklājas. Lietotājs var izvēlēties bīdīšanas soli pikseļos, tad ar taustiņiem 'w', 'd', 's' un 'a' tiek izvēlēts bīdīšanas virziens. Pie katras virziena pogas nospiešanas, tiek modificēts transformācijas matricas T elements (3,1) vai (3,2), kas atbild par translācijas operāciju. Bīdāmajam attēlam tiek pielietota iegūtā transformācija, un saskarnes logā lietotājam tiek parādīts rezultāts, kas ir par uzdoto pikseļu skaitu

un uzdoto virzienu nobīdīts attēls. Ja rezultāts nav apmierinošs, bīdīšanu turpina, līdz iegūst attēlu, kas līdzīgs 3.5.b parādītajam. Līdzīgā veidā programma ļauj arī rotēt vienu attēlu pret otru. Šajā gadījumā lietotājs maina rotācijas leņķa lielumu, tad ar pogām 'z' un 'c' veic rotāciju pret, vai pulksteņrādītāja virzienā. Šīs komandas maina par rotāciju atbildīgos matricas T elementus (1,2) un (2,1). Izmantojot šo metodi, reģistrējamā attēla izmēra maiņa nav iespējama.

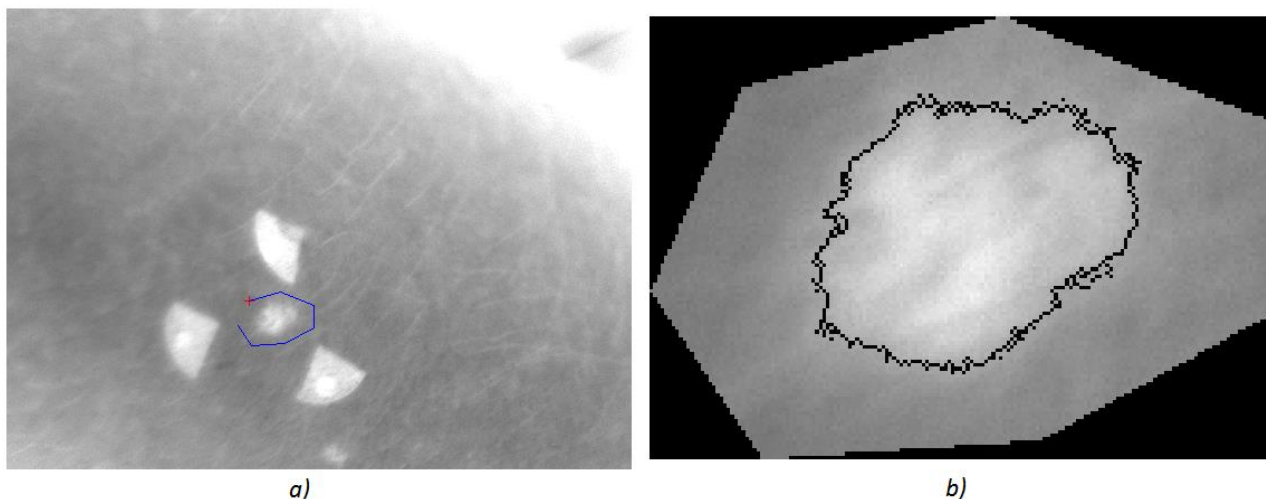


Att. 3.5. Attēlu reģistrācija ar manuālu bīdīšanu un rotēšanu.

3.3. Attēlu segmentēšana

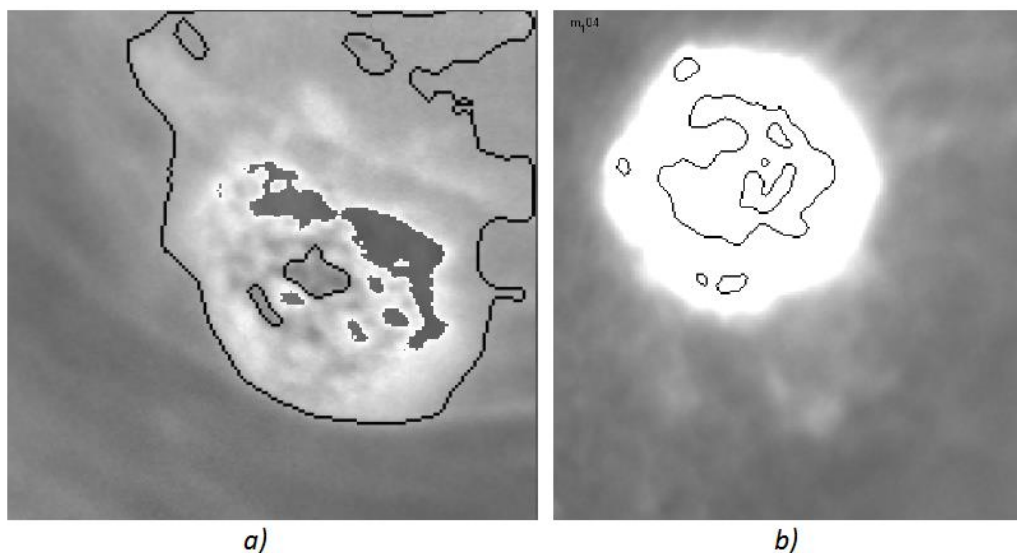
Pārskata periodā tika risināts arī attēlu segmentēšanas uzdevums, kurā jānošķir pētāmajam ādas veidojumam piederošus pikselus no apkārt esošajiem ādas pikseliem.

Pie mazākajiem viļņu garumiem pētāmie veidojumi optiskā blīvuma attēlā visbiežāk ir gaišāki par ādu, tādēļ segmentēšanai var lietot pikseļu optisko blīvumu atšķirības. Šajā gadījumā gan jāņem vērā, ka arī izmantotie marķieri ir gaiši, kā arī problēmas var radīt nevienmērīgs attēla apgaismojums, kā piemēram, attēla 3.6.a labais augšējais stūris. Šo iemeslu dēļ lietotājam tiek lūgts manuāli samazināt segmentēšanas apgabalu, aptuveni apvelkot interesējošo veidojumu, kā parādīts attēlā 3.6.a. Atzīmētais apgabals tiek izgriezts no 520 nm ieejas attēla, un, tajā tiek atrasts Otsu sliekšnis, kuru pielietojot, attēla pikseļi tiek segmentēti divās klasēs atkarībā no to intensitātes. Attēlā 3.6b parādīta segmentācijas rezultātā iegūtā robeža, kas atdala veidojumam piederošos pikselus no ādas pikseliem.



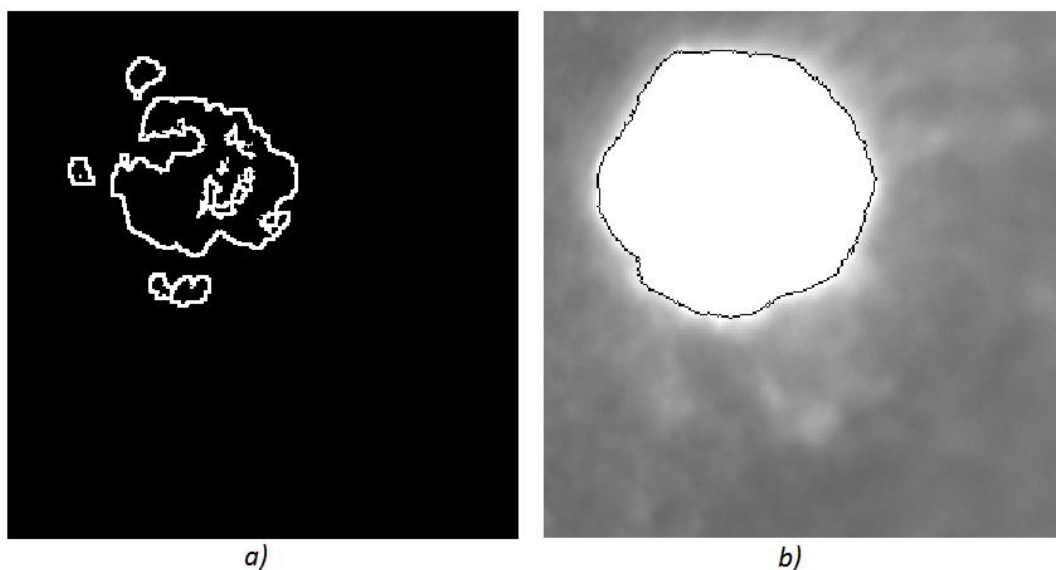
Att. 3.6. Attēla segmentēšana, samazinot pētāmo attēla apgabalu.

Veicot testus, secināts, ka piedāvātā segmentēšanas metode ne visos gadījumos dod vēlamo rezultātu. Iegūtajam segmentēšanas rezultātam var būt divu veidu kļūdas: vai nu ādas apgabala pikseļi tiek segmentēti kā veidojuma pikseļi (att. 3.7.a); vai arī tikai daļa no veidojuma pikseļiem tiek segmentēti kā veidojumam piederīgi (att. 3.7.b).



Att. 3.7. Segmentēšanas kļūdas.

Otrā problēma tiek atklāta un risināta sekojoši. Ap segmentēto robežu (att. 3.7.b), izmantojot morfoloģiskās paplašināšanas operācijas, tiek izdalīts apgabals ap robežu (baltais apgabals attēlā 3.8.a). Pikseļu optisko blīvumu vidējā vērtība uz šīs robežas tiek salīdzināta ar vidējo vērtību apgabalā, kas tika segmentēts kā veidojums. Ja šīs vērtības ir tuvas, tas liecina, ka apgabals ap pieņemto veidojumu ir līdzīgs pašam veidojumam, un, tiek pieņemts lēmums, ka segmentācija nav tikusi veikta pareizi. Šajā gadījumā segmentācija ar automātisko sliekšņa atrašanu tiek veikta no jauna. Šoreiz tiek izmantots cita viļņu garuma attēls, kurā veidojums nav tik ļoti atšķirīgs no fona pēc intensitātes, kā tas ir 520 nm attēlā. 3.8.b parādīta veiksmīga 3.7.b attēla segmentēšana pie 460 nm.



Att. 3.8. Segmentēšanas uzlabošana un rezultāts pie 460 nm.

4. Ādas veidojumu klasifikācija, izmantojot informāciju no neliela skaita spektra joslām

Pētījuma mērķis bija izveidot nēvusu (dzimumzīmju) un melanomu klasifikācijas algoritmu, kas izmantotu multispektrālos attēlus un atšķirtu melanomas no dzimumzīmēm. Mūsu rīcībā bija 32 melanomu un 94 nēvusu (59 plakani, 35 piepacelti) multispektrālie optiskā blīvuma (absorbcijas) attēli 51 spektrālā joslā. Attēlos redzamo ādas veidojumu iedalījums melanomās un nēvosos balstījās uz speciālista – dermatologa atzinumiem. Starojuma diapazons – 450 līdz 950 nm. Katras joslas platums – 10 nm.

Izvirzītā mērķa sasniegšanai uzmanība bija centrēta uz klasifikatora izveidi, kurš:

- klasifikācijas kārtulu balstītu uz informāciju no neliela spektrālo joslu skaita;
- būtu relatīvi stabils pret nelielām joslu platumu svārstībām;
- balstītos uz relatīvi vienkāršu raksturlielumu skaitļojumu;
- raksturotos ar augstu sensitivitātes un specifitātes rādītāju.

Klasifikatora bāzes joslu izvēle primāri tika balstīta uz apskatāmā pigmentētā ādas veidojuma attēla pikseļu optisko blīvumu vidējo vērtību sadalījumu pa spektrālajām joslām, kā arī uz apskatāmā pigmentētā ādas veidojuma attēla pikseļu optisko blīvumu sadalījuma standartnoviržu vērtībām spektrālajās joslās.

Šo līkņu analīze uzskatāmi parādīja, ka šo raksturlielumu diapazoni pārklājas, un melanomām šo raksturlielumu vērtības visumā ir lielākas par nēvusu attiecīgajām raksturlielumu vērtībām. Tāpēc klasifikatora konstruēšanā uzmanība tika pievērsta tām spektra joslām, kurās melanomu attiecīgo raksturlielumu minimālās vērtības bija tuvāk nēvusu attiecīgo raksturlielumu maksimālajām vērtībām. No visām spektra joslām tika izvēlēts spektra joslu trijnieks, proti, 10., 20. un 40. josla, kas raksturojas ar viļņu garumiem $\lambda_{10} = 540$ nm, $\lambda_{20} = 640$ nm un $\lambda_{40} = 840$ nm.

Klasifikators tika veidots kā sliekšņa tipa klasifikators. Pieņemot, ka mūsu rīcībā ir m melanomu attēli, sanumurēti secībā no 1 līdz m , un n nēvusu attēli – no 1 līdz n , apzīmēsim 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 $s_j(p)$ apzīmēsim 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

$$a_{j1} = \min_{p=1,m} \mu_j(p), \quad a_{j2} = \max_{q=1,n} \nu_j(q), \quad b_{j1} = \min_{p=1,m} s_j(p), \quad b_{j2} = \max_{q=1,n} \sigma_j(q). \quad (4.1)$$

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 tika izvēlēts reāls skaitlis Δ_j , $a_{j1} < \Delta_j < a_{j2}$, kas deva mazāko vērtību kopu U_{j1} un U_{j2} apjomu summai, t.i., $|U_{j1}| + |U_{j2}|$, kur $U_{j1} = \{\mu_j(p) \mid \mu_j(p) < \Delta_j\}$, $U_{j2} = \{\nu_j(q) \mid \nu_j(q) \geq \Delta_j\}$.

Analogi definēsim sliekšņus Δ'_j spektrālo joslu standartnovirzēm. Reālo skaitli Δ'_j uzskatīsim par sliekšni j -tās joslas standartnovirzēm, ja $b_{j1} < \Delta'_j < b_{j2}$ un $|V_{j1}| + |V_{j2}|$ vērtība ir minimāla salīdzinājumā ar citām iespējamām Δ'_j vērtībām, kur $V_{j1} = \{s_j(p) \mid s_j(p) < \Delta'_j\}$, $V_{j2} = \{\sigma_j(q) \mid \sigma_j(q) \geq \Delta'_j\}$.

Saskaņā ar aprakstīto sliekšņu izvēles procedūru ieguvām šādas sliekšņu vērtības mūsu spektra joslu trijniekam: $\Delta_{10} = 10000$, $\Delta_{20} = 6500$, $\Delta_{40} = 3500$, $\Delta'_{10} = 1200$, $\Delta'_{20} = 1200$, $\Delta'_{40} = 450$.

Acīmredzot, katru apskatāmo ādas veidojuma multispektrālo attēlu mūsu klasifikatora vajadzībām reprezentē skaitļu vektors $(\alpha_{10}, \alpha_{20}, \alpha_{40}, \beta_{10}, \beta_{20}, \beta_{40})$, kur α_j, j piederīgs pie $\{10, 20, 40\}$, ir melanomas vai nēvusa pikseļu optiskā blīvuma vidējā vērtība j -tajā joslā, bet β_j, j piederīgs pie $\{10, 20, 40\}$, ir standartnovirzes vērtība j -tajā joslā. Tātad par katru analizējamo attēlu varam formulēt sešus izteikumus: $\alpha_{10} \geq \Delta_{10}, \alpha_{20} \geq \Delta_{20}, \alpha_{40} \geq \Delta_{40}, \beta_{10} \geq \Delta'_{10}, \beta_{20} \geq \Delta'_{20}, \beta_{40} \geq \Delta'_{40}$. Ja konkrētais izteikums ir patiess, tam pierakstām vērtību 1, ja tas ir aplams, pierakstām vērtību 0. Ar $I(\alpha_j)$, resp., $I(\beta_j)$ apzīmēsim attiecīgā izteikuma patiesuma vērtību. Tad varam formulēt klasifikācijas kārtulu: apskatāmā ādas veidojuma attēls klasificējams kā melanoma tad un tikai tad, ja

$$\sum_{j \in \{10, 20, 40\}} \left(\frac{3}{21} I(\alpha_j) + \frac{4}{21} I(\beta_j) \right) > 0.5; \quad (4.2)$$

pretējā gadījumā attēls klasificējams kā nēvuss.

Lai klasifikatoru pielietotu multispektrāliem attēliem, jāveic melanomu un nēvusu attēlu segmentācijas procedūra, kuras rezultātā tiek atrasti attiecīgajiem ādas veidojumiem piederīgie pikseļi. Tā paveicama manuāli vai ar specifiskas programmatūras palīdzību. Klasifikatora aprobācija tika veikta gan ar manuālas segmentācijas rezultātiem, gan ar 3.nodaļā aprakstītās segmentācijas programmas palīdzību. Eksperimenta rezultāti atspoguļoti 1.tabulā, kur pareizi klasifikācijas rezultāti atzīmēti ar "0", bet kļūdas atzīmētas ar "1" attiecīgajās ailēs. Piepacceltas dzimumzīmes atzīmētas ar NI, plakanas dzimumzīmes- ar NP, melanomas – ar M.

1.tabula. Klasifikācijas rezultāti, izmantojot veidojumu pikseļu vidējās vērtības un standartnovirzes 10., 20. un 40. spektra joslās.

	Kļūdu skaits	Manuālā segm.					Automātiskā segm.			
		1		1		4		1	3	4
		Melanomu att.	M klasif.	NI att.	NI klasif.	NP att.	NP klasif.	M klasif.	NI klasif.	NP klasif.
1	m_1	1		ni_21	1	np_3	0	1	0	0
2	m_6	0		ni_24	0	np_4	0	0	0	0
3	m_12	0		ni_27	0	np_5	0	0	0	0
4	m_16	0		ni_34	0	np_7	0	0	0	1
5	m_20	0		ni_35	0	np_12	0	0	0	0
6	m_24	0		ni_36	0	np_14	0	0	0	0
7	m_39	0		ni_37	0	np_15	0	0	0	0
8	m_40/1	0		ni_38	0	np_16	0	0	0	0
9	m_40/2	0		ni_44	0	np_17	0		0	0
10	m_45	0		ni_50	0	np_18	0	0	1	0
11	m_46	0		ni_51	0	np_19	0	0	1	0
12	m_52	0		ni_53	0	np_20	0	0	0	0
13	m_54	0		ni_56	0	np_21	0	0	1	0
14	m_58	0		ni_57	0	np_24	0	0	0	0
15	m_60	0		ni_67	0	np_28	1	0	0	1
16	m_63	0		ni_70	0	np_30	0	0	0	1
17	m_65	0		ni_74	0	np_33	0	0	0	0
18	m_80	0		ni_75	0	np_34	0	0	0	0
19	m_81	0		ni_80	0	np_39	0	0	0	0
20	m_85	0		ni_84	0	np_42	0	0	0	0
21	m_96	0		ni_86	0	np_43	0	0	0	0
22	m_97	0		ni_88	0	np_44	0	0	0	0
23	m_98	0		ni_106	0	np_45	0	0	0	0
24	m_99	0		ni_111	0	np_48	0	0	0	0
25	m_100	0		ni_112	0	np_49	0	1	0	0
26	m_104	0		ni_113	0	np_54	0	0	0	0

27	m_107	0	ni_116	0	np_55	0		0	0	0
28	m_111	0	ni_119	0	np_60	0		0	0	0
29	m_112	0	ni_122	0	np_62	0		0	0	1
30	m_113	0	ni_123	0	np_66	0		0	0	0
31	m_114	0	ni_125	0	np_67	0		0	0	0
32	m_115	0	ni_141	0	np_69	0		0	0	0
33			ni_142	0	np_71	0			0	0
34			ni_144	0	np_73	0			0	0
35			ni_361	0	np_74	0			0	0
36					np_80	0				0
37					np_82	0				0
38					np_83	0				0
39					np_86	0				0
40					np_87	0				0
41					np_90	0				0
42					np_105	0				0
43					np_108	0				0
44					np_109	0				0
45					np_110	0				0
46					np_114	1				0
47					np_115	0				0
48					np_116	0				0
49					np_117	0				0
50					np_119	0				0
51					np_120	0				0
52					np_126	0				0
53					np_127	0				0
54					np_129	0				0
55					np_130	1				0
56					np_134	1				0
57					np_139	0				0
58					np_140	0				0
59					np_142	0				0

Jāatzīmē, ka segmentācijas programmas pašreizējo variantu vēl nepieciešams uzlabot, jo 10 nēvusi tika segmentēti neatbilstoši to īstajām robežām. Saprotams, ka klasifikatora pielietojums šādam segmentācijas variantam izrādījās kļūdainš, taču kā rāda tabula Nr.1, klasifikatora pieļauto kļūdu skaits kopumā izrādījās ne sevišķi liels. Vēl nepieciešams atzīmēt, ka melanoma, kura pie manuālās segmentācijas tika klasificēta kā nēvuss, vizuāli tikai ar grūtībām būtu klasificējama kā melanoma, lietojot ABCD kārtulu. Mūsu rīcībā nav informācijas, ka šis ļaunveidojums turpmākajā izmeklēšanā būtu akceptēts kā melanoma. Nav izslēgts, ka sākotnējais dermatologa vērtējums bijis kļūdainš.

4.1. Klasifikatora stabilitāte

Analizējot iespējas radīt vienkāršotu aparatūru, kura izmantotu šādu klasifikatoru, rodas jautājums: vai klasifikatora precizitātes rādītāji būtiski nemainīsies, ja izvēlētās spektra joslas (10, 20, 40) tiks paplašinātas, piem., j -tā josla ar platumu 10 nm pārvērtīsies par j -to joslu ar platumu 30 nm? Lai kaut vai daļēji atbildētu uz šo jautājumu, klasifikatora sākotnējā kārtula tika izmainīta. Apskatāmās melanomas (teiksim, p -tās) j -tās spektra joslas raksturlielumu $\mu_j(p)$ un $s_j(p)$ vietā stājās

$$\mu'_j(p) = 0,25\mu_{j-1}(p) + 0,5\mu_j(p) + 0,25\mu_{j+1}(p), \quad (4.3)$$

$$s'_j(p) = \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{1}{4}(s_{j-1}(p))^2 + (s_j(p))^2 + \frac{1}{4}(s_{j+1}(p))^2 \right) + \text{cov}_m(j-1, j) + \frac{1}{2} \text{cov}_m(j-1, j+1) + \text{cov}_m(j, j+1)}, \quad (4.4)$$

kur $cov_m(j-1, j)$ apzīmē kovariāciju starp melanomu pikseļu optiskajiem blīvumiem $(j-1)$ -ajā un j -tajā joslā; analoģiska nozīme ir simboliem $cov_m(j-1, j+1)$ un $cov_m(j, j+1)$.

Ja apskatāmo ādas reģionu reprezentē q -tā nēvusa attēls, tad klasifikatorā tiek izmantoti sekojoši raksturlielumi:

$$v'_j(q) = 0,25v_{j-1}(q) + 0,5v_j(q) + 0,25v_{j+1}(q), \quad (4.5)$$

$$\sigma'_j(q) = \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{1}{4}(\sigma_{j-1}(q))^2 + (\sigma_j(q))^2 + \frac{1}{4}(\sigma_{j+1}(q))^2 \right) + \text{cov}_n(j-1, j) + \frac{1}{2} \text{cov}_n(j-1, j+1) + \text{cov}_n(j, j+1)}, \quad (4.6)$$

kur $cov_n(j-1, j)$ apzīmē kovariāciju starp nēvusu pikseļu optiskajiem blīvumiem $(j-1)$ -ajā un j -tajā joslā; analoģiska nozīme ir simboliem $cov_n(j-1, j+1)$ un $cov_n(j, j+1)$.

Eksperimentā tika saglabātas sākotnējās sliekšņu vērtības Δ_j un Δ'_j ; segmentācija – manuālā. Šāda klasifikatora lietošanas eksperimentālie rezultāti atspoguļoti 2.tabulā.

2.tabula. Klasifikācijas rezultāti, izmantojot veidojumu pikseļu vidējās vērtības un standartnovirzes 9.-11., 19.-21. un 39.-41. spektra joslās.

	Kļūdu skaits	Manuālā segmentācija				
		1		1		1
	Melanomu att.	M klasif.	NI att.	NI klasif.	NP att.	NP klasif.
1	m_1	1	ni_21	1	np_3	0
2	m_6	0	ni_24	0	np_4	0
3	m_12	0	ni_27	0	np_5	0
4	m_16	0	ni_34	0	np_7	0
5	m_20	0	ni_35	0	np_12	0
6	m_24	0	ni_36	0	np_14	0
7	m_39	0	ni_37	0	np_15	0
8	m_40/1	0	ni_38	0	np_16	0
9	m_40/2	0	ni_44	0	np_17	0
10	m_45	0	ni_50	0	np_18	0
11	m_46	0	ni_51	0	np_19	0
12	m_52	0	ni_53	0	np_20	0
13	m_54	0	ni_56	0	np_21	0
14	m_58	0	ni_57	0	np_24	0
15	m_60	0	ni_67	0	np_28	1
16	m_63	0	ni_70	0	np_30	0
17	m_65	0	ni_74	0	np_33	0
18	m_80	0	ni_75	0	np_34	0
19	m_81	0	ni_80	0	np_39	0
20	m_85	0	ni_84	0	np_42	0
21	m_96	0	ni_86	0	np_43	0
22	m_97	0	ni_88	0	np_44	0
23	m_98	0	ni_106	0	np_45	0
24	m_99	0	ni_111	0	np_48	0
25	m_100	0	ni_112	0	np_49	0
26	m_104	0	ni_113	0	np_54	0
27	m_107	0	ni_116	0	np_55	0
28	m_111	0	ni_119	0	np_60	0
29	m_112	0	ni_122	0	np_62	0
30	m_113	0	ni_123	0	np_66	0
31	m_114	0	ni_125	0	np_67	0
32	m_115	0	ni_141	0	np_69	0
33			ni_142	0	np_71	0

34			ni_144	0	np_73	0
35			ni_361	0	np_74	0
36					np_80	0
37					np_82	0
38					np_83	0
39					np_86	0
40					np_87	0
41					np_90	0
42					np_105	0
43					np_108	0
44					np_109	0
45					np_110	0
46					np_114	0
47					np_115	0
48					np_116	0
49					np_117	0
50					np_119	0
51					np_120	0
52					np_126	0
53					np_127	0
54					np_129	0
55					np_130	0
56					np_134	0
57					np_139	0
58					np_140	0
59					np_142	0

Secinājums: prezentētais klasifikators uzrāda vērā ņemamu stabilitāti, jo nav konstatēta klasifikācijas rezultātu pasliktināšanās.

4.2. Spektrālo joslu tripleta modifikācija

Tā kā sākotnēji izvēlēta joslu tripleta 40. josla pēc viļņu garuma iesniedzas tuvajā infrasarkanajā zonā, tad aparātūras realizācijā šī komponente var radīt zināmas problēmas. Sakarā ar to tika meklēts joslu triplets, kurā 40. joslas vietā būtu josla ar mazāku viļņu garumu, bet atbilstošais sliekšņa tipa klasifikators raksturotos ar augstu precizitāti, t.i., ar niecīgu kļūdu procentu. No 40. joslas potenciālajiem aizstājējiem piemērotākā izrādījās 30. josla. Šajā gadījumā tika mainītas sliekšņu vērtības. Eksperimentā, kas tika veikts ar šo klasifikatoru, iegūtie rezultāti uzrādīti 3.tabulā.

3.tabula. Klasifikācijas rezultāti, izmantojot veidojumu pikseļu vidējās vērtības un standartnovirzes 9.-11., 19.-21. un 29.-31. spektra joslās.

		Manuālā segmentācija				
	Kļūdu skaits	1		3		1
	Melanomu att.	M klasif.	NI att.	NI klasif.	NP att.	NP klasif.
1	m_1	1	ni_21	1	np_3	0
2	m_6	0	ni_24	0	np_4	0
3	m_12	0	ni_27	0	np_5	0
4	m_16	0	ni_34	0	np_7	0
5	m_20	0	ni_35	0	np_12	0
6	m_24	0	ni_36	0	np_14	0
7	m_39	0	ni_37	0	np_15	0
8	m_40/1	0	ni_38	0	np_16	0
9	m_40/2	0	ni_44	0	np_17	0

10	m_45	0	ni_50	0	np_18	0
11	m_46	0	ni_51	0	np_19	0
12	m_52	0	ni_53	0	np_20	0
13	m_54	0	ni_56	0	np_21	0
14	m_58	0	ni_57	0	np_24	0
15	m_60	0	ni_67	0	np_28	1
16	m_63	0	ni_70	0	np_30	0
17	m_65	0	ni_74	0	np_33	0
18	m_80	0	ni_75	0	np_34	0
19	m_81	0	ni_80	0	np_39	0
20	m_85	0	ni_84	0	np_42	0
21	m_96	0	ni_86	0	np_43	0
22	m_97	0	ni_88	0	np_44	0
23	m_98	0	ni_106	0	np_45	0
24	m_99	0	ni_111	0	np_48	0
25	m_100	0	ni_112	0	np_49	0
26	m_104	0	ni_113	0	np_54	0
27	m_107	0	ni_116	1	np_55	0
28	m_111	0	ni_119	0	np_60	0
29	m_112	0	ni_122	0	np_62	0
30	m_113	0	ni_123	0	np_66	0
31	m_114	0	ni_125	0	np_67	0
32	m_115	0	ni_141	0	np_69	0
33			ni_142	1	np_71	0
34			ni_144	0	np_73	0
35			ni_361	0	np_74	0
36					np_80	0
37					np_82	0
38					np_83	0
39					np_86	0
40					np_87	0
41					np_90	0
42					np_105	0
43					np_108	0
44					np_109	0
45					np_110	0
46					np_114	0
47					np_115	0
48					np_116	0
49					np_117	0
50					np_119	0
51					np_120	0
52					np_126	0
53					np_127	0
54					np_129	0
55					np_130	0
56					np_134	0
57					np_139	0
58					np_140	0
59					np_142	0

5. Elektroforēzes un sonoforēzes rezultātu attēlu iegūšana un analīze

Elektroforēze un sonoforēze ir metodes zāļu un gēnu kontrolētai ievadišanai šūnās, abas minētās metodes pašlaik tiek klīniski testētas. Šī projekta ietvaros tika pētīta minēto terapijas metožu efektivitātes novērtēšanas iespēja, izmantojot fluorescences spektroskopiju un spektrālo attēlošanu.

Par pētāmiem objektiem tika izvēlēti dzīvnieku modeļi, precīzāk peļu *tibialis cranialis* muskuļi, kuriem tika injicēts zaļais fluorescējošais proteīns (green fluorescence protein - GFP), tā ievadīšana šūnās tika stimulēta ar elektro- un sonoforēzes palīdzību. Pētījumā tika apskatīta dažādu elektrisko impulsu (augsta un zema sprieguma) pievadīšana, kā arī kombinācija ar sonoforēzi – kopumā septiņas dažādas stimulācijas metodes, kā arī kontroles grupas mērījumi. Rezultāta novērtēšanai tika izmantota fluorescences spektroskopijas, fluorescences spektrālās attēlošanas (*in vivo*) un fluorescences mikroskopijas metodes (*in vitro* muskuļa šķērsgriezumam). Iegūtie rezultāti tika salīdzināti ar zaļā fluorescējošās proteīna izdalīšanas mērījumiem laboratorijas apstākļos.

Iegūtajos rezultātos novērota laba korelācija starp fluorescences intensitātes maksimuma pie 517 nm mērījumiem *in vivo* ar un bez ādas klātbūtnes, kā arī *in vitro* mērījumiem. GFP koncentrācijas novērtēšanai piedāvāts izmantot attiecības indeksu starp fluorescences intensitātes mērījumiem pie 517 nm (GFP fluorescences maksimums pie 473 nm ierosmes) un 590 nm (minimāla GFP fluorescences ietekme), tādējādi labāk izceļot proteīnu saturošos apgabalus. Piedāvātā metode ir vienkārša un lēta pieeja elektroforēzes un sonoforēzes efektivitātes novērtēšanai. Pētījumā tika konstatēts, ka labākā proteīna uzņemšana šūnās novērojama, izmantojot elektroforēzi ar augsta sprieguma impulsiem.

Turpmākajā pētījuma gaitā tiks strādāts pie iegūto rezultātu tālākas apstrādes, izveidojot metodiku kvantitatīvai minēto terapijas metožu efektivitātes novērtēšanai. Sīkāks esošo rezultātu apraksts, kā arī terapijas metožu teorētiskais izklāsts atrodams 1. pielikumā (angļu valodā). Uz minēto rezultātu pamata ir sagatavots un pieteikts referāts “Application of fluorescence spectroscopy and multispectral imaging for non-invasive estimation of GFP transfection efficiency” konferencei “Advanced Optical Materials and Devices”, kas notiks 25.-27. augustā Rīgā.

6. Publikācijas SPIE Proceedings

SPIE Photonics Europe 2014 konferencē tika prezentēti divi referāti, uz kuru pamata tika sagatavotas arī divas publikācijas konferences rakstu krājumam Proceedings of SPIE:

- **Dainis Jakovels, Inga Saknīte and Janis Spigulis, "Implementation of laser speckle contrast analysis as connection kit for mobile phone for assessment of skin blood flow", Proc. SPIE 9129, 91293I (2014)**

Lāzera speķu kontrasta analīze (Laser speckle contrast analysis – LASCA) nodrošina bezkontakta asins plūsmas kartēšanu ādas kapilāros reālā laikā, un var tikt uzskatīta par alternatīvu metodi lāzera Doplera perfūzijas attēlošanai (Laser Doppler perfusion imaging – LDPI). Tomēr komerciāli pieejamas LASCA un LDPI mērierīces ir dārgas, kā arī masīvas, kas ierobežo to pieejamību ikdienas lietošanai klīnikās. Jauna tendence diagnostikas tehnoloģiju pieejamības nodrošināšanai ir to īstenošana uz mobilo telefonu bāzes, tādējādi iegūstot lētas un miniatūras ierīces primārai diagnostikai.

Šajā darbā ir demonstrēta vienkārša pieeja LASCA tehnoloģijas īstenošanai savienojumā ar mobilo telefonu, kas varētu tikt izmantota primārai ādas asins plūsmas novērtēšanai. Bihromātisks divu stabilizētu lāzeru (650 un 532 nm) apgaismojums tika lietots, lai testētu hemoglobīna koncentrācijas un skābekļa līmeņa novērtēšanas iespējas papildus asins plūsmas novērtēšanai. Minētā pieeja tika testēta ar arteriālās oklūzijas un siltuma testiem, demonstrējot parametru izmaiņu dinamiku.

Tika novērots, ka asins plūsmas novērtēšanai piemērotāks ir sarkanās gaismas (650 nm) lāzers. Lietojot abus lāzerus vienlaicīgi, sarkanā (650 nm) lāzera starojums tiek uztverts R kanālā, bet zaļā (532 nm) lāzera – G kanālā. Lai arī RGB kanāliem ir raksturīga jutības

spektrālā pārklāšanās, tomēr arī abu lāzeru lietošanas gadījumā varēja iegūt laba kontrasta signālu R kanālā asins plūsmas novērtēšanai.

Lāzera intensitātes signāla vērtības R un G kanālos var tikt pārrēķinātas optiskā blīvuma (ΔOD) vērtībās, par referenci ņemot signālu no normālas/neierosinātas ādas. Šādā gadījumā $\Delta OD(R)$ labi korelē ar deoksihemoglobīna koncentrācijas izmaiņām, jo 650 nm deoksihemoglobīna absorbcija ir 10 reizes spēcīgāka, nekā oksihemoglobīna. $\Delta OD(G)$ un $\Delta OD(R)$ lielumu starpība reprezentē oksihemoglobīna koncentrācijas izmaiņas, tādējādi sniedzot novērtējumu skābekļa līmeņa izmaiņām asinīs.

Tomēr jāatzīst, ka LASCA pieeja ir jutīga pret kustībām, pētāmās virsmas izliekumiem, kā arī kameras iestatījumiem. Kameras auto-iestatījumiem jābūt izslēgtiem, kā arī ekspozīcijas laikam jābūt iestatītam tuvu rekomendējamai 5 ms vērtībai. Vienmērīgs lāzera apgaismojums un pilnīga kontrole pār mobilā telefona kameru joprojām ir izaicinājums, lai iegūtu uzticamu ierīci ādas asins plūsmas kartēšanai. Mērierīces validācijai būtu nepieciešami salīdzinošie mērījumi ar komerciāli pieejamām LDPI vai LASCA ierīcēm.

Raksta pilnā kopija angļu valodā pievienota šī pārskata beigās.

- **Inga Saknīte, Dainis Jakovels and Janis Spigulis, "Diffuse reflectance and fluorescence multispectral imaging system for assessment of skin", Proc. SPIE 9129, 91293H (2014)**

Difūzi atstarotās gaismas multispektrālā attēlošana tiek izmantota *in vivo* ādas hromoforu (hemoglobīna un melanīna) kartēšanai. Fluorescences spektrālā attēlošana daudz retāk tiek izmantota ādas novērtēšanā, datu ievākšanas un apstrādes/interpretācijas process ir sarežģītāks, tomēr to bieži vien min kā papildinošu spektrālās attēlošanas tehniku difūzi atstarotās gaismas mērījumiem, sniedzot papildus informāciju par fluoroforu klātbūtni un sadalījumu. Abas minētās tehnoloģijas iespējams apvienot vienā multimodālā pieejā.

LU ASI Biofotonikas laboratorijā esošā multispektrālā attēlošanas kamera Nuance, kuras darbības pamatā ir šķidro kristālu vadāmie filtri, tika pielāgota ādas *in vivo* difūzi atstarotās gaismas un autofluorescences spektrāliem mērījumiem. Vienmērīga apgaismojuma nodrošināšanai tika izveidots un izmantots LED gredzenveida gaismas avots. Četrus LED kombinācija (baltās gaismas, 770 nm, 830 nm, 890 nm) tika izmantota, lai nodrošinātu gaismas avota spektrālo pārklājumu 450-950 nm diapazonā difūzās atstarošanās mērījumiem. 405 nm LED tika izmantotas ādas autofluorescences ierosmei, papildus filtri nebija nepieciešami, jo spektrālās kameras jutība sākas no 450 nm. Multispektrālā kamera ievāca spektrālos attēlus 450-950 nm spektra diapazonā ar 10 nm soli un 15 nm joslas platumu. Vidējais redzes lauks mērījumos bija ~50x35 mm, nodrošinot telpisko izšķirtspēju 0,05 mm vienam attēla pikselim. Kameras dinamiskās izšķirtspējas maksimāli efektīvai izmantošanai spektrālie attēli tika ievākti ar dažādiem ekspozīcijas laikiem, kas variēja starp 7...500 ms.

Minētā multimodālā pieeja tika testēta dažādiem ādas veidojumiem, piem., labdabīgs nēvuss, hemangioma, bazalioma, halo nēvuss. Veidojumu spektrālie attēli masīvi tika ievākti un tālāk analizēti/interpretēti, lai novērtētu to diagnostikas potenciālu. Galvenās atšķirības dažādu veidojumu spektros tika interpretētas ar dažādu galveno ādas hromoforu (melanīna un hemoglobīna) koncentrāciju.

Raksta pilnā kopija angļu valodā pievienota šī pārskata beigās.

7. Daiņa Jakovela promocijas darbs

Dainis Jakovels promocijas darbu aizstāvēja un ieguva doktora zinātņu grādu fizikas nozarē, medicīniskās fizikas apakšnozarē 2014. gada 23. aprīlī. Promocijas darba tēma ir tieši saistīta ar šī projekta tēmu un Daiņa Jakovela uzdevumiem tajā, ko var uzskatīt par promocijas darba turpinājumu.

Promocijas darbā ir attīstītas un eksperimentāli/klīniski aprobētas vairākas jaunas pieejas *in vivo* ādas parametru neinvazīvai kartēšanai. Piedāvāta multispektrālās attēlošanas metode ādas hromoforu koncentrāciju sadalījuma kartēšanai, kas realizēta gan ar komerciālu multispektrālās attēlošanas ierīci *Nuance*, gan izmantojot paštaisītu kompakto mērierīci ar RGB attēlu sensoru un vairāku krāsu gaismas diožu apgaismojumu. Veikta multispektrālās attēlošanas metodes klīniskā aprobācija, demonstrējot ādas hromoforu (hemoglobīna, melanīna) koncentrāciju korelāciju izmantošanu ādas veidojumu klasifikācijā. Piedāvāta alternatīva pieeja ādas melanomas izšķiršanā, kuras pamatā ir galveno komponentu analīze. Pilnveidota RGB attēlošanas metodika ādas eritēmas indeksa kartēšanai un veikta tās klīniskā aprobācija ādas asinsvadu veidojumu fototerapijas efektivitātes novērtēšanā, piedāvājot jaunu parametru (eritēmas indeksa kontrastu) ādas viendabīguma novērtēšanai. Īstenota lāzerspeklu RGB attēlošanas metode ādas asins plūsmas novērtēšanai. Pilnveidota RGB metodika ādas autofluorescences fotoizbalēšanas attēlošanai. Iepriekšminētās metodes iespējams apvienot multimodālā pieejā pilnvērtīgākam ādas stāvokļa novērtējumam.

Multispektrālās attēlošanas metodikas klīniskās aprobācijas nolūkos veikti 221 ādas veidojumu mērījumi, no kuriem 31 bija melanoma, 158 citi pigmentēti veidojumi, 32 asinsvadu veidojumi. RGB attēlošanas metodikas klīniskās aprobācijas nolūkos veikti 45 vaskulāru ādas veidojumu fototerapijas monitoringa mērījumi.

Galvenie darba rezultāti prezentēti 16 referātos starptautiskās konferencēs un publicēti 17 rakstos (no tiem 6 starptautiski citētos žurnālos un 15 atrodami *Scopus* datubāzē), kā arī saņemts 1 Latvijas patents ar starptautisku (WO) prioritāti.

Promocijas darbs ir pieejams Latvijas Nacionālajā bibliotēkā un tās filiālēs, kā arī Latvijas Universitātes bibliotēkā.

8. Multimodālas biomedicīnisku attēlu iegūšanas maketierīces laboratorijas pārbaudes

Laika periodā no 2014. gada 1. marta līdz 30. jūnijam tika izsludinātas vairākas akcijas, kuru laikā brīvprātīgie tika aicināti piedalīties projekta ietvaros izstrādātās maketierīces pētījumos, kas apvienoti ar vizīti pie dermatologa, lai izmeklētu ādas veidojumus. Īpaša uzmanība tika pievērsta atipiskām dzimumzīmēm, aicinot pētījumā piedalīties dalībniekus, kuri atbilst šādām prasībām:

1. Vecums no 30 gadiem;
2. Nav grūtniecības vai barošanas ar krūti;
3. Uz ķermeņa sastopamas dzimumzīmes. Īpaši gaidīsim Jūs gadījumos, ja:



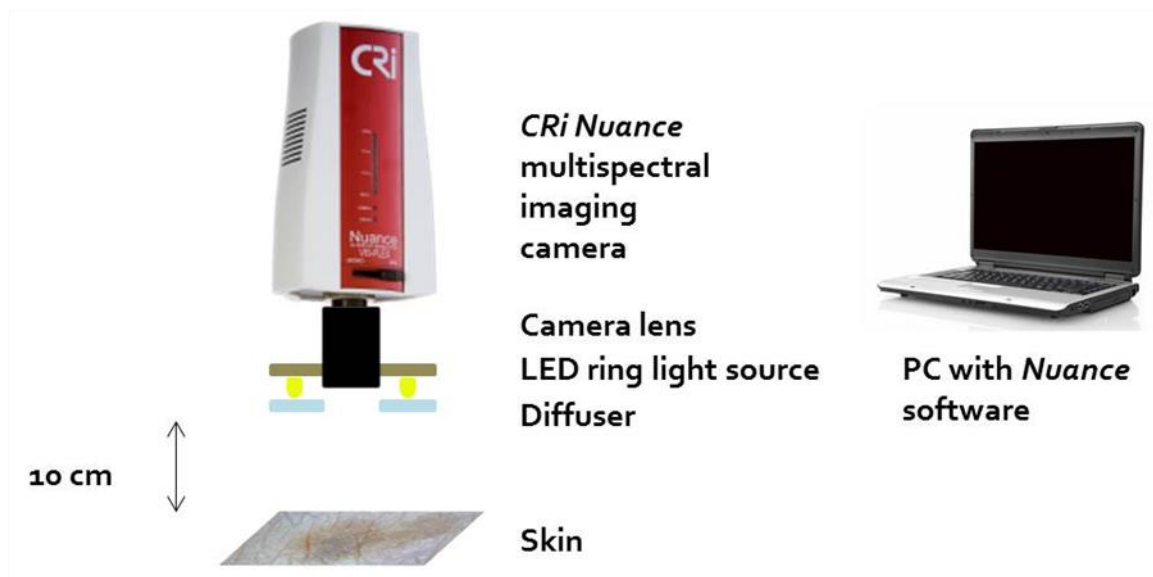
8.1. attēls – Atipisku dzimumzīmju raksturojums

Šajā periodā pētījumā piedalījās kopā 27 brīvprātīgie. Tika uzņemti 34 veidojumu difūzās atstarošanās režīmā, kā arī fluorescences un lāzera speklu attēli. Tādējādi kopumā pētījuma ietvaros ir piedalījušies jau 75 brīvprātīgie.

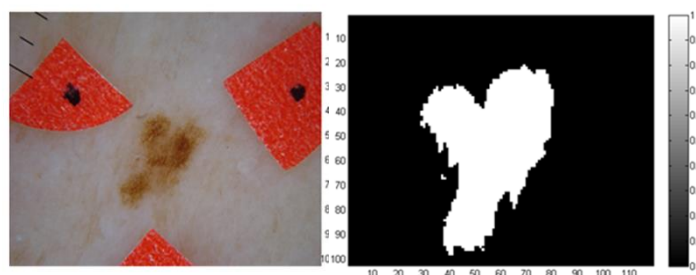
Pirmo 48 brīvprātīgo dalībnieku uzņemtie veidojumu difūzās atstarošanās un fluorescences attēlu masīvi tika apstrādāti, un pirmie rezultāti publicēti konferencēs „Developments in Optics and Communications”, kā arī „Photonics Europe”. Ar multispektrālās attēlošanas iekārtas *Nuance* uzņemto attēlu apstrāde notika sekojošos soļos:

1. Iegūtā difūzās atstarošanās/fluorescences attēlu masīva analīze, izgriežot (*Crop*) attēla daļu, kurā atrodas interesējošais veidojums un neliels normālas, ap to esošas ādas apgabals;
2. Samazinātā attēlu masīva attēlu reģistrācija (*Image Registration*), lai konkrētā veidojuma visus attēlus (kopā 51 attēlu) pie dažādiem viļņa garumiem (450nm – 950nm ar soli 10nm) novietotu „vienu virs otra”, tādējādi iespējami mazinātu kustību artefaktus, kas parasti rodas attēlu masīva uzņemšanas laikā cilvēka kustību (pārsvarā elpošanas) dēļ;
3. Ādas veidojuma un normālas ādas segmentēšana, nosakot konkrētā veidojuma attēlu masīva (gan difūzās atstarošanas, gan fluorescences) gan veidojuma, gan normālas ādas pikseļu apgabalu;

4. Gan veidojuma, gan normālas ādas vidējā spektra aprēķins (gan difūzās atstarošanas, gan fluorescences attēlu masīviem).



8.2. attēls – Eksperimentālais stends



8.3. attēls – Piemērs konkrēta ādas veidojuma attēla samazinājumam, izgriežot (*Crop*) tikai veidojuma apgabalu, kā arī segmentēšanai, atšķirt veidojumu (baltā krāsā) no normālas ādas (melnā krāsā)

4.tabulā apkopoti pirmo 48 brīvprātīgo dalībnieku uzņemto veidojumu analīze (lokācijas vieta un diagnoze), īpaši izceļot interesantākus veidojumus, kuri neklasificējas kā vienkārša (tipiska) vai atipiska dzimumzīme. Skaidrojumu atšifrējums:

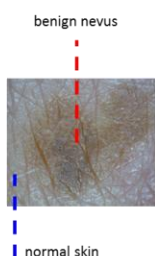
- Diagnozes apzīmējumi: 1 - tipiska dzimumzīme; 2 - atipiska dzimumzīme;
- Lokalizācijas vietas apzīmējumi: 1 - galva; 2 - augšstilbs; 3 - apakšstilbs; 4 – augšdelms; 5 - apakšdelms; 6 - vēders/krūšu daļa; 7 mugura.

4.tabula.

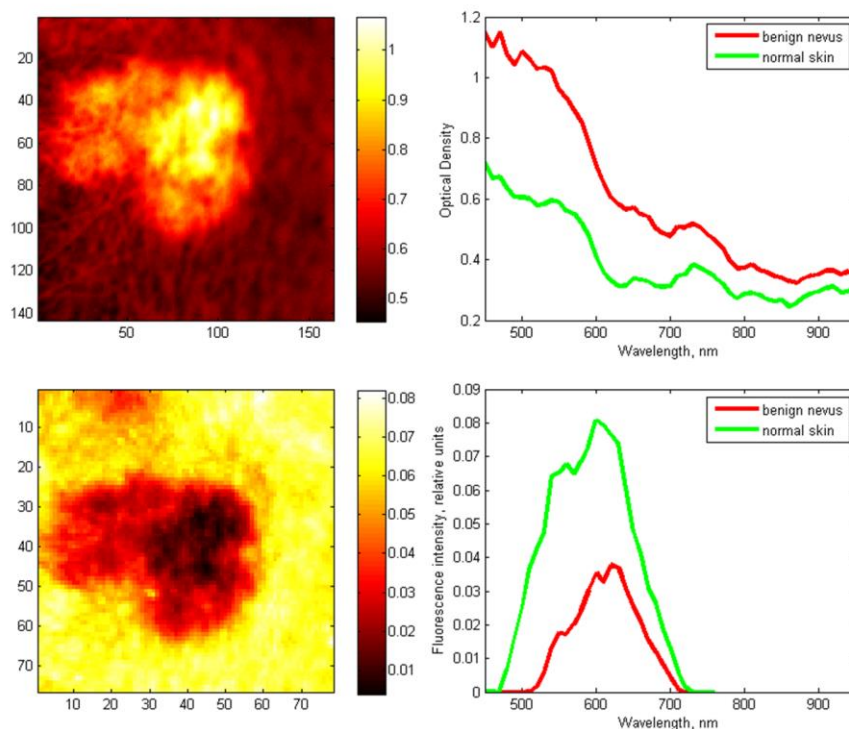
Nr.k.p.	Pacienta Nr.	Veidojuma Nr.	Diagnoze	Lokalizācija
1	1	1	1	5
2	1	2	1	5
3	2	1	1	3
4	3	1	2	7

5	3	2	2	7
6	4	1	Bazalioma	1
7	5	1	1	6
8	6	1	1	3
9	6	2	1	3
10	7	1	2	7
11	7	2	2	6
12	8	1	1	1
13	9	1	1	6
14	10	1	1	7
15	11	1	1	7
16	12	1	1	7
17	12	1	2	7
18	13	2	2	7
19	14	1	2	1
20	15	1	2	6
21	15	2	2	7
22	16	1	1	7
23	17	1	1	2
24	18	1	1	6
25	19	1	1	6
26	20	1	1	7
27	21	1	1	5
28	22	1	1	2
29	23	1	Veidojums uz krūts	6
30	24	1	1	2
31	25	1	1	2
32	26	1	1	2
33	27	1	1	1
34	28	1	1	1
35	29	1	2	2
36	30	1	1	7
37	31	1	1	6
38	32	1	1 + Hemangioma	6
39	33	1	1	3
40	34	1	2 (Halo nēvuss)	7
41	35	1	1	7
42	36	1	2	7
43	37	1	1	5
44	38	1	1	6
45	39	1	2 (nēvus pillus - punktveida)	5
46	40	1	1	7
47	41	1	2+2	7
48	41	2	2	6
49	42	1	1	6
50	43	1	1	7
51	44	1	Jaukta tipa nēvuss	7
52	45	1	1	4
53	46	1	1	4
54	47	1	1	1
55	48	1	1	6

Diffuse reflectance
imaging mode:

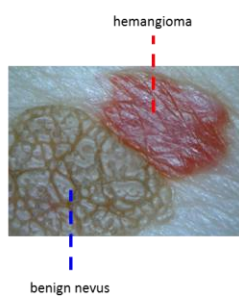


Fluorescence
imaging mode:

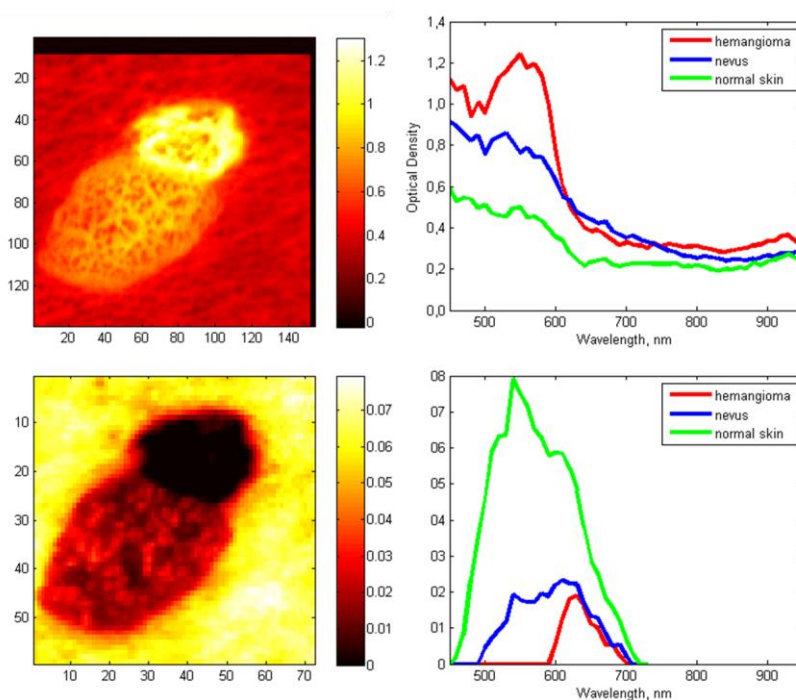


8.4. attēls – Tipiskas dzimumzīmes spektrālā analīze gan difūzās atstarošanās, gan fluorescences režīmā

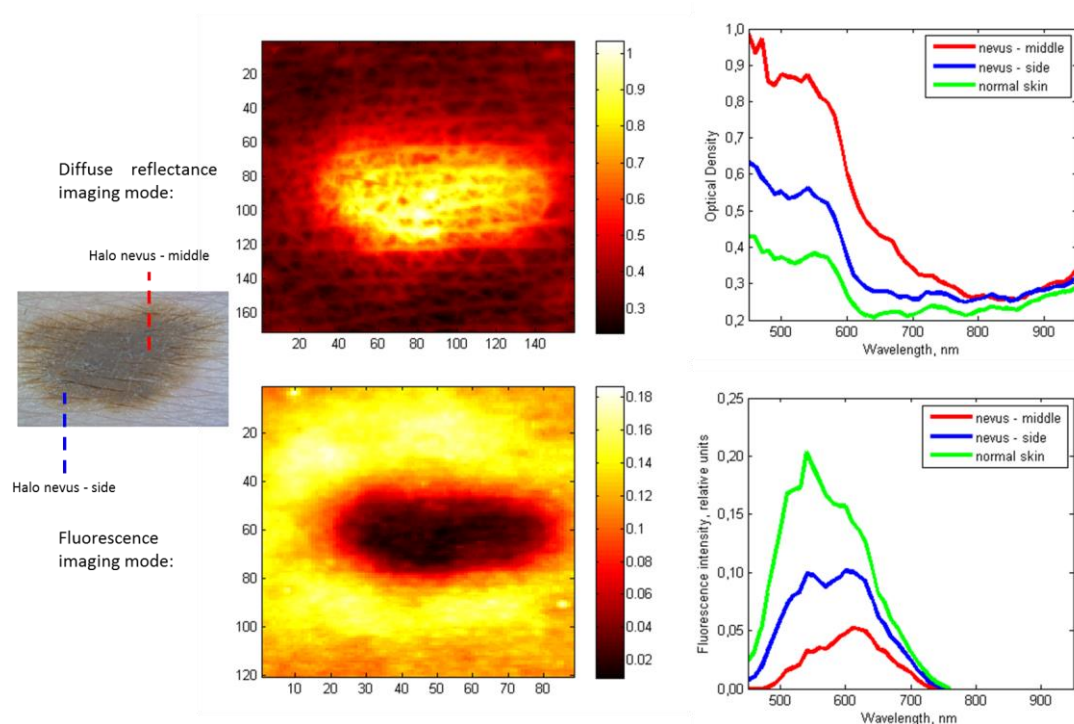
Diffuse reflectance
imaging mode:



Fluorescence
imaging mode:



8.5. attēls – Tipiskas dzimumzīmes (*benign nevus*) un hemangiomas spektrālā analīze gan difūzās atstarošanās, gan fluorescences režīmā



8.6. attēls – Atipiskas dzimumzīmes (*Halo nevus*) spektrālā analīze gan difūzās atstarošanās, gan fluorescences režīmā.

9. Secinājumi

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

- Izstrādātā ādas veidojumu klasifikācijas metode, kas balstās uz informāciju par gaismas absorbciju neliela skaita (2 vai 3) spektrālajās joslās, uzskatāma par pietiekami perspektīvu, lai to rekomendētu realizācijai aparatūrā. Turpmākajos projekta periodos jāizstrādā šādas aparatūras tehniskā specifikācija, jāveic šādas aparatūras maketa konstruēšana un izveide. Lai to paveiktu, jāpastiprina pētnieku grupas sastāvs ar dalībnieku, kam ir elektroniskās aparatūras izstrādes pieredze.
- Turpmākajos pētījumos ādas veidojumu attēlu apstrādes jomā jāfokusējas uz izstrādāto metožu praktiskās pielietošanas aspektiem.
- Jāturpina ādas veidojumu attēlu priekšapstrādes (reģistrācijas un segmentācijas) algoritmu uzlabošana, lai tos varētu pamatā pielietot automātiskā režīmā, ar iespējām manuāli koriģēt rezultātus. Šo algoritmu realizācija jāorientē uz izmantošanu jaunradāmajā aparatūrā.
- Jāturpina pētījumi zāļu un gēnu kontrolētai ievadīšanai šūnās, izmantojot elektroforēzi un sonoforēzi. Jāmēģina izstrādāt metodiku kvantitatīvai elektroforēzes efektivitātes novērtēšanai, balstoties uz attēlu apstrādi, kuri iegūti ar fluorescences spektroskopijas palīdzību.
- Jāaktivizē grupas darbs iegūto teorētisko un eksperimentālo rezultātu publicēšanā, lai sasniegtu projekta mērķus šajā ziņā.
- Sakarā ar birokrātiskiem šķēršļiem jāatmet ideja par izstrādātās aparatūras pārbaudēm klīnikas apstākļos, jo to pārvarēšanai tiek neefektīvi izšķiests laiks. Jāturpina šie pētījumi ASI iekārtotās telpās, jāmēģina tajos iesaistīt vairāk dalībnieku ar atipiskiem ādas veidojumiem, kuri rada aizdomas par melanomas attīstību.

1.pielikums. Application of fluorescence spectroscopy and multispectral imaging for non-invasive estimation of GFP transfection efficiency induced by electro- and sonoporation

1. Cell membrane permeabilization to exogenous molecules

Gene therapy refers to introducing the foreign DNA into genome for replacement of faulty or missing genetic material. Gene therapy related research and developments grow numerously, however unfortunately, none of those human gene therapy products have been approved for sale by neither by U.S. Food and Drug Administration (FDA) nor other where. 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. 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 for gene therapy, leading to the first clinical trials of interleukin gene therapy. Both methods produce permeabilization of cellular plasma membrane, however the mechanisms governing permeabilization are different. 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. And the key mechanism of sonoporation is the contrast agent microbubble (MB) cavitation induced by ultrasound (US). 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 part of report we will overview the basics of both electroporation and sonoporation and discuss the results of our experimentation on electroporation and sonoporation assisted delivery of plasmid DNA into mice *tibialis cranialis* muscle, generally aiming at development of non-invasive diagnostics methods for real time evaluation of green fluorescent protein (GFP) coding plasmid transfection efficiency.

The objective:

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

To reach these goals following tasks have been raised:

1. To evaluate the percentage of GFP positive *tibialis cranialis* muscle fibers in dependence of HV and LV electric pulse and SP parameters.
2. To evaluate GFP fluorescence intensity and distribution in *tibialis cranialis* muscle fibers and correlate it with the results of optical non-invasive fluorescence spectroscopy and multispectral imaging measurements of GFP fluorescence.

Scientific novelty

The combination of HV and long duration LV electric pulses is the novel protocol, used in latest commercially available electroporation devices – cliniporators. The effect of HV and LV combinations for DNA electrotransfection efficiency into the cells, both *in vitro* and *in vivo*, is discussed in continuous research.

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. The delivery

of various types electric pulses (HV or LV) in combination with SP have been applied for the first time *in vivo*. Taking into account that both electroporation and sonoporation induce pores in the plasma membrane it is naturally to assume that used in combination these methods can result in an increased efficiency of plasmid DNA delivery. This effect has been only investigated *in vitro* [Escofre et al. 2010] demonstrating synergism of GFP transfection by electrosonoporation.

1.1. Electroporation

Exposure of the cells *in vitro* or in tissues to short and intense electric fields results in a transient and reversible alteration of cell membrane permeability. This phenomenon, termed cell electroporation, is associated with the modification of cell transmembrane voltage, $\Delta\Phi_m$, by the externally applied electric field, E [Weaver JC et al 1996].

$$\Delta\Phi_m = 1.5 E R \cos\theta \quad (1)$$

R is the radius of cell and θ is the angle between the particular site of membrane and the direction of E (Figure 1).

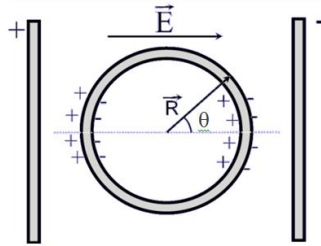


Figure 1. Cell in an electric field. The induced threshold transmembrane potential for successful cell electroporation is in the range of 0.2 – 1 V [Teissie et al. 1993], and in accordance to eq. (1) it is maximal at the poles of the cell.

Cell membrane conductivity is lower by several orders of magnitude in comparison to conductivity of intracellular and extracellular media. Therefore applying external E , the most of the electric field within the cell is concentrated on the membrane [Kotnik et al. 2000]. Thus the electric potential variation occurs only in the membrane, leading to the cell electroporation when $\Delta\Phi_m$ exceeds the threshold value. Despite the attempts to visualize the changes in the membrane structure caused by electric pulse application [Chang et al. 1990], which are believed to be hydrophilic and cylinder resembling transient defects of cell membrane (pores) [Chernomordik et al. 1987], the only up to date evidence of membrane poration phenomena are provided by indirect observations, e.g. from the molecular transport through the cell membrane. Indeed, it has been shown that small and large molecules such as various dyes, drugs, proteins, RNA, and DNA can be successfully transferred to various cells [Prausnitz MR et al 1995; Gehl 2003; Prud'homme et al. 2006; Pucihar et al 2008]. The efficiency of delivery strongly depends on the parameters of electrical pulses, such as pulse shape, pulse strength, pulse duration, pulse number and frequency.

The initial phase of pore formation in the cellular plasma membrane is succeeded with the pore size expansion phase, lasting throughout the duration of applied E [Hibino et al. 1993], and pore resealing phase, lasting in the range of minutes [Neumann et al. 1998]. Depending on applied pulses parameters, electroporation can be either irreversible, leading to the increase in pore size and/or rupture of cell membrane or reversible, leading to the cell membrane resealing. Irreversible electroporation had been used primarily for ablation of microorganisms and cells *in vitro* [Davalos et al. 2005] and is often considered only as a warning of upper limit of electrical parameters, used to achieve reversible tissue electroporation. Irreversible electroporation had been also successfully used for the minimally invasive treatment of aggressive cutaneous tumors [Al Shakere et al. 2007]. The most advanced medical application of reversible electroporation is antitumor electrochemotherapy (ECT) that currently is transferred into clinics [Mir et al 2006]. Electroporation of tumours allow the permeation of poorly permeable chemotherapeutic drugs, such as bleomycin or cisplatin into the tumour cells, leading to the drug cytotoxicity increase by orders

of magnitude [Mir et al. 1998]. Electric pulse parameters of 8 square waves with amplitude of 1000-1300 V/cm, duration of 100 μ s, and pulse frequency of kHz range are usually applied *in vivo* [Mir et al 2006]. An advantage of ECT is that it requires much lower doses of the cytotoxic drug for tumour treatment than those used systemically.

The most recently developed application of electric field induced membrane permeabilization is plasmid DNA (pDNA) electrotransfer into the cells and tissues. It has been proved as a simple, cheap, non-toxic and safe gene delivery method with only minor side effects, in comparison to viral and chemical gene transfection vectors. Enrolled into phase I clinical trial stage, electroporation assisted IL-12 gene transfection brings the promising perspectives for gene therapy of human metastatic melanoma lesions [Daud et al 2008]. Studies in animal models reviewed by [Mir et al. 2004; Šatkauskas et al. 2012] demonstrated the feasibility of pDNA electrotransfer into almost all biological tissues, including muscles, skin, liver spleen, lungs, testis, heart arteries, nervous tissues and tumours. In this project, considerable interest is given to pDNA electrotransfer 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 [Mir et al. 1999; Martinenghi S et al. 2002, Lu et al. 2003; Wang et al. 2003]. Other possible targets of muscle gene therapy are vaccination and treatment of congenital muscular diseases [Gollins et al. 2003].

The entry of small molecules, such as bleomycin or cisplatin had been characterized as the simple diffusion through electroporated membranes, however the mechanisms and realization of large sized pDNA electrotransfer is different and more complicated. In comparison to the convenient application of HV pulses alone, combination of short-duration, high voltage and long-duration, low voltage (LV) pulses is the advanced setup of electropulsation to increase gene transfection efficiency [Šatkauskas et al. 2002; Čepurnienė et al. 2010]. Indeed, pDNA electrotransfection across the membrane can be represented as a process of several steps, consisting of cell electroporation, pDNA electrophoresis towards electroporated membrane, pDNA-membrane interaction/ adsorption on electroporated membrane, formation of pDNA aggregates in the membrane and pDNA translocation into the cytoplasm during the post-pulse phase [Sucharev et al. 1992; Golzio et al. 2002; Šatkauskas et al. 2005; Escofre et al. 2011]. However, the mechanism and the optimal conditions for the effective gene electrotransfection are still not revealed in detail.

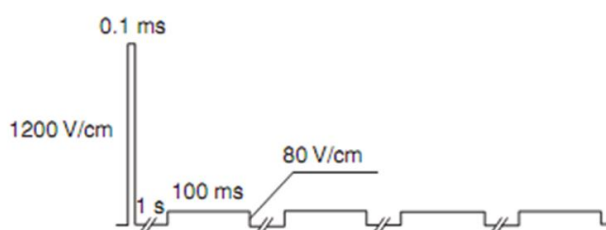


Figure 2. High voltage (1200V/cm) and long-duration low voltage (80V/cm) pulse setup for efficient pDNA electrotransfection.

1.2. Sonoporation

Cell sonoporation occurs as a response of cell exposure to ultrasound. Sonoporation process is associated with MB cavitation phenomenon [Hallow et al., 2006]. Cavitation is a step-by-step process, which includes the formation of a gas bubble, its growth in size, bubble oscillation and collapse. MB formation and oscillation around a constant diameter is called stable cavitation. The oscillating microbubble grows in diameter and finally undergoes the inertial cavitation which is characterized as a microbubble collapse producing shock waves, liquid microjets, reactive oxygen species, free radicals and local thermal effects which contribute to the cell membrane permeabilization [Lentacker et al. 2014].

There are two hypothesis of the molecular transfer mechanism at the membrane level: pore formation hypothesis (or even direct piercing of lipid bilayer) [Mehier-Humbert et al. 2005; Zhao YZ et al 2008] and endocytosis hypothesis [Meijering et al. 2009].

Variety of signal molecules has observed entering cell cytoplasm through the pores, either visible or “assumed to be”. Park J et al. (2012) discovered simultaneously occurring propidium iodide influx, intracellular calcium transients and dye fura-2 outflux, indicating concentration gradient driven and bidirectional transport characteristic of pores created by the sonoporation. Schlicher et al. (2006) delivered dextrans of different size and photographed cells with wounds at about 1 μm size.

As the ultrasound induces physical disruption of the cell membrane at a large scale, this will lead to the elevated intracellular Ca^{2+} levels due to a concentration driven passive diffusion. Ca^{2+} influx has also been shown to play a key-role in membrane repair processes, as it triggers exocytosis, directing the intracellular vesicles such as lysosomes to the site of membrane injury for the membrane repair processes [Miyake et al. 1995; Reddy et al. 2001].

However, smaller membrane pores can be physically removed via endocytosis [Draeger et al. 2011]. It has been demonstrated that mechanical forces induce cell plasma membrane deformation and cytoskeletal rearrangements, and these changes can stimulate the endocytotic uptake of fluid-phase markers in endothelial cells [Davies et al. 1984]. The influx of Ca^{2+} is also related with ultrasound enhanced endocytotic activity leading to the pore removal from the cellular plasma membrane [Hassan et al. 2010].

It has been clarified that the uptake mechanisms of exogenous molecules are dependent on molecule size. According [Meijering et al. 2009] the smaller dextran molecules (4.4 and 70 kDa) were homogenously distributed throughout the cytosol after the cell sonication, thus supporting the pore formation mechanism. Whereas the larger dextran molecules (155 and 500 kDa) were mainly localized in vesicle-like structures, indicating that endocytosis was involved in the uptake of the larger dextrans. Considering the transfection of plasmid DNA, Paula et al. (2011) attributed it to the clathrin-dependent mechanism of endocytosis. Endocytosis hypothesis states molecular entry within membrane vesicles, which after degradation liberate the cargo in the cytoplasm. However, there are also evidence of direct deposition of the gene complexes into the cytoplasm, revealed by the use of endocytotic inhibitors and confocal microscopy images [Lentacker et al. 2007; Lentacker et al. 2009; Geers et al 2011].

In comparison to widely accepted transfection methods, sonoporation has a considerable number of advantages – it is safe, noninvasive and local molecular delivery technique, allowing ultrasound triggered and spatiotemporally controlled therapeutic agent release.

1.3. Combination of electroporation and sonoporation (electrosonoporation)

Two methods, electroporation and sonoporation are similar in a way that both induce pores in the cellular plasma membrane, however the mechanisms of pore creation are different. Probably the most attractive idea of combining EP and SP modalities is to increase the effectiveness of drug and gene delivery into tumors performing either non-invasive or minimum-invasive procedure of treatment. The studies incorporating electroporation and sonoporation are still fragment, however the most important tendency of the combination is already revealed: the combination of electroporation and sonoporation induces synergistic increase of drug and gene delivery. Our recent study revealed the ability of electrosonoporation to enhance the cell membrane reversible permeability for the antitumour agent bleomycin [Tamošiūnas et al., *in press* 2014]. The percentage of reversibly permeabilized CHO cells induced by electrosonoporation was 2-5-fold higher in comparison to EP using LV or HV pulses, and 2-4 fold higher in comparison to SP at 500 kPa PNP, 100% DC, 1MHz. CHO cells that were treated using combination of electroporation and sonoporation - electrosonoporation (ESP) gained a four-fold increase in transfection level (amount of GFP produced) and a six-fold increase in the percentage of transfected cells in comparison to those cells that were treated either with EP or SP alone. [Escofre et al. 2010]. As indicated in Figure 3, the proposed model of synergism is based on experimental findings that electroporation induced the formation of plasmid DNA aggregates at the level of plasma membrane, and then they were

propelled directly into cell cytoplasm as a result of US exposure [Escofre et al. 2010]. Yamashita et al. (2002) investigated the effectiveness of electrosonoporation for mouse interleukin-12 gene transfer into the skeletal muscle of mice *in vivo*. Mice that had undergone ESP showed eight-fold and 1.6-fold higher gene expression level compared with those mice that underwent electroporation alone and sonoporation alone. The authors related the enhanced gene expression level induced by ESP with the reduction of tissue damage [Yamashita et al., 2004]. Therefore whether combination of electroporation and sonoporation can result in additive or synergic effect and can be beneficial for enhanced drug delivery remain elusive.

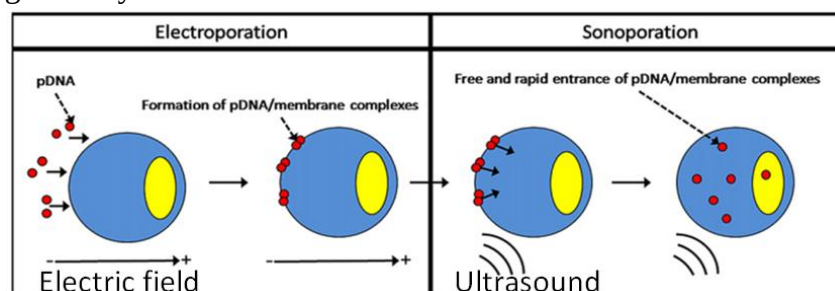


Figure 3. Mechanism of gene transfer by electro-sonoporation proposed by Escofre et al. (2010).

2. Methods

Animals

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). In all experiments we used 4-20-week-old C57BL/6 female or male line mice. 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).

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).

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.

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 TA 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 an amplitude of 800 V/cm or 4 square-wave LV (low voltage) pulses, with a length of 100 ms and an amplitude of 80 V/cm at 1 Hz frequency.

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) sonoprotator. To ensure a good contact between the transducer and the treated muscle a conductive gel was used.

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

Four different methods of GFP transfection were applied: GFP alone (1st gr.), electroporation (2nd 3rd; 8th gr.), sonoporation (4th gr.) and electrosonoporation (5th 6th; 7th gr.) assisted GFP delivery.

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

Protein extraction

TA 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 μ L 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.

Preparation of muscle histological sections

Animals were killed by cervical dislocation. Immediately after the muscle fluorescence imaging (lasting up to 5 min after sacrificing the mice), the whole *tibialis cranialis* muscle was removed and shock-frozen in liquefied 2-methylbutan (-190 °C). After freezing, the muscle was placed into the plastic container and stored approx. for 12 hr. on dry ice. Muscle cryosections were prepared from unfixed muscle samples using Leica CM1850 cryostat (Nußloch, Germany). The muscle was cut in 20 μ m thickness, exactly at the middle part of muscle and perpendicularly to the fiber lining, at -24 °C. EGFP coding plasmid is highly soluble, therefore the formalin fixation of the muscle cryosections was required. The formalin vapor fixation method was used as described by Jockush et al (2003). Muscle cryosections were put on adhesive microscope slides (Menzel–Gläser; Braunschweig, Germany), dried for about 5 min, then put in a tightly closed plastic dish with filter paper soaked with 37% formaldehyde solution (Sigma, Germany) and exposed to the formaldehyde vapor for 2 hr.

Evaluation of GFP transfection efficiency

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 4. The system consisted of a hyperspectral imaging camera (Nuance EX), LP filter to block thereflected laser light (2), and fiberoptic cable for delivering laser radiation to the skin surface. Spectral image cube of 31 grayscale images was acquired in 500-800 nm spectral range with step 10 nm and band width 10 nm. RGB composite image was constructed from separate spectral bands with parameters – center wavelengths 450 (B), 550 (G), 650 (R) nm and band width 100 nm.

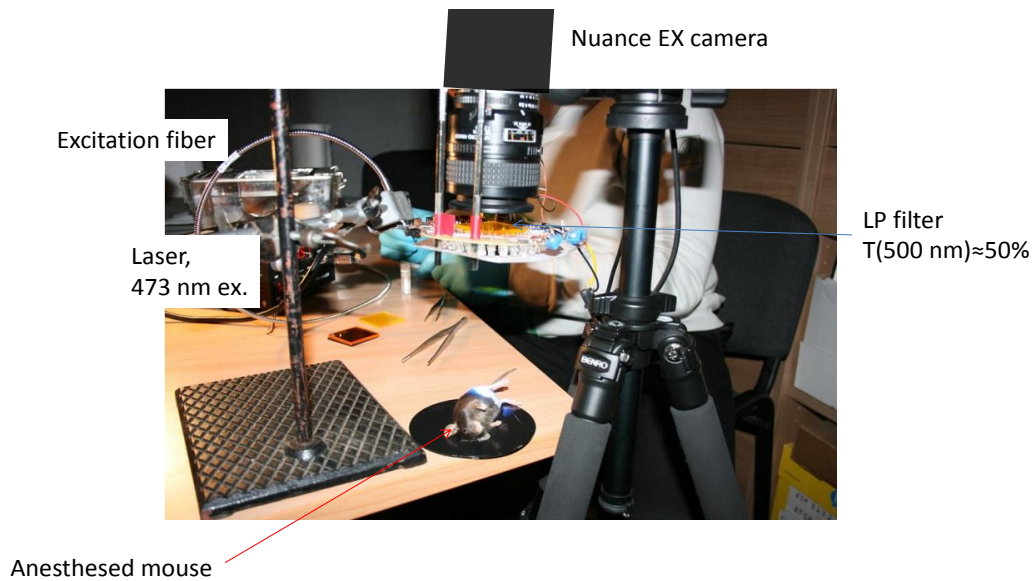


Fig.4. Experimental setup of hyperspectral fluorescence imaging.

Fluorescence point measurements

The spectral registration setup comprised 473 nm, 50 mW DPSS laser (Altechna, Lithuania) with focusing output SMA-connector, Y-shaped optical fiber bundle FC-UV400-2-SR (Avantes, The Netherlands) for light delivering to the skin surface and fluorescence registration, long pass filter ($T_{500\text{ nm}}=50\%$) to block the reflected laser light and fiber optics spectrofluorimeter Avaspec ULS 2048L (Avantes) connected to PC (Figure 5). During the fluorescence measurements, the tip of fiber bundle, comprising 1 emitting and 6 detecting fibers, was in contact with the skin surface or muscle.

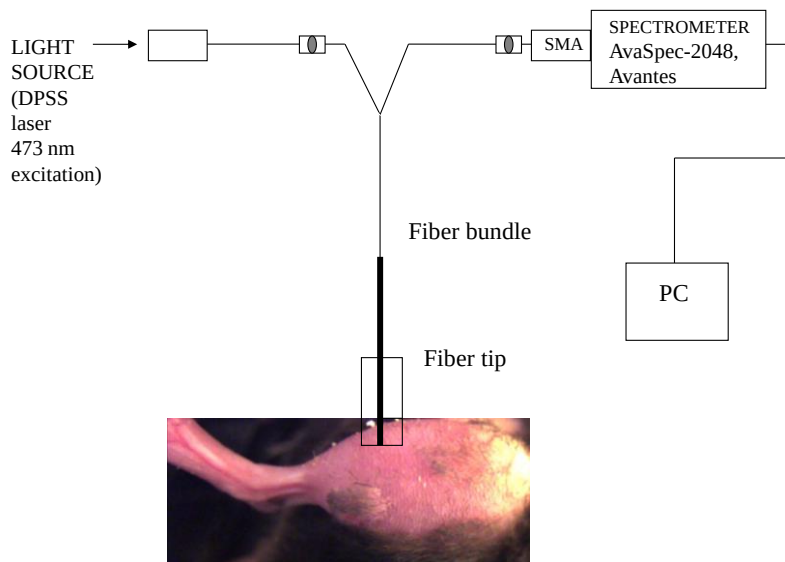


Fig. 5. Experimental setup for fluorescence point measurements.

Fluorescence microscopy

Muscle histological sections were analysed using Leica DM 3000 fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with Leica 10x/0.30 HC PL Fluoritar 506505 Objective and Leica DFC 490 CCD camera. Excitation light was modified by UV filter (BP340–380 nm; 400dichroic and 425– LP) and N2 intensity filter (50%); I3 filter cube (BP450–490 nm; 510dichroic and 515– LP) was used to reveal GFP fluorescence. Images were captured at 2s integration time.

3. Results

Tibialis cranialis muscle has been tested as a model system for monitoring of GFP transfection levels using fluorescence spectroscopy point measurements and hyperspectral imaging technique in a live animal. Skin reduces the fluorescence intensity of muscle GFP, however it does not accumulate GFP itself (Fig. 6). Therefore this allowed us to obtain the correlation data of GFP fluorescence intensity between *in vivo* (the fiber is on the skin covering GFP transfected muscle) and *ex vivo*, when the fiber is at the same place of muscle, but the skin is removed, Fig. 7e.

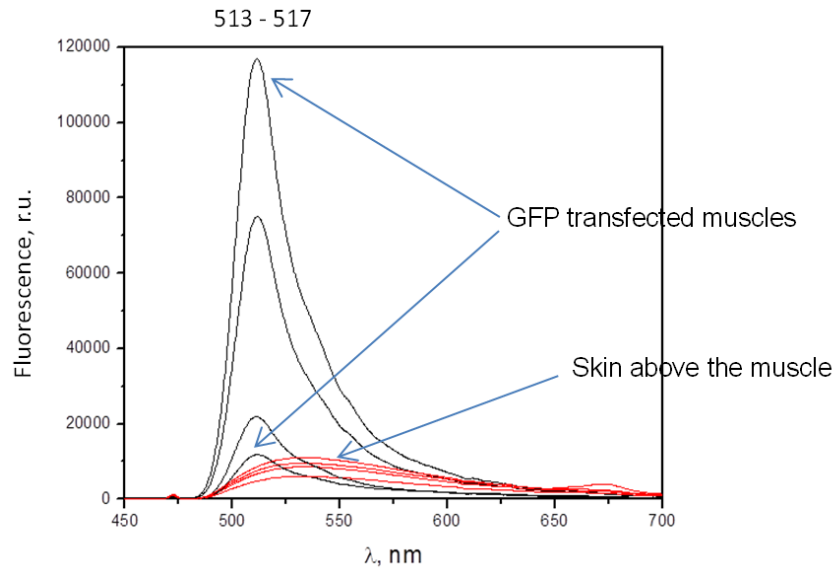


Figure 6. Mice leg muscle as a model system for non-invasive estimation of GFP transfection efficiency.

Afterwards we made the homogenates of those GFP transfected muscles and compared the GFP fluorescence of muscle homogenates (y axis) and that measured from the surface of muscle at the moment of skin removal (x axis), Figure 8. We obtained data correlation.

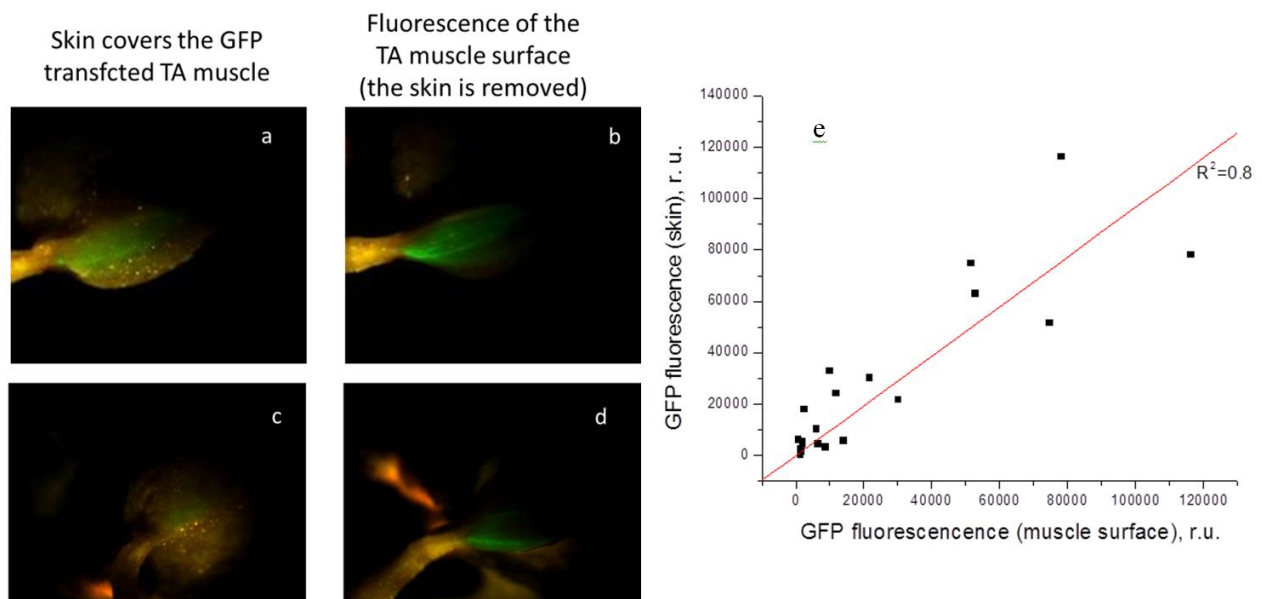


Figure 7. Comparison between GFP fluorescence distribution measured from the skin covering muscle(a, c) and muscle surface (b,d) supporting fluorescence point measurements data. Correlation between GFP fluorescence measured from the surface of skin and that at the surface of muscle (e).

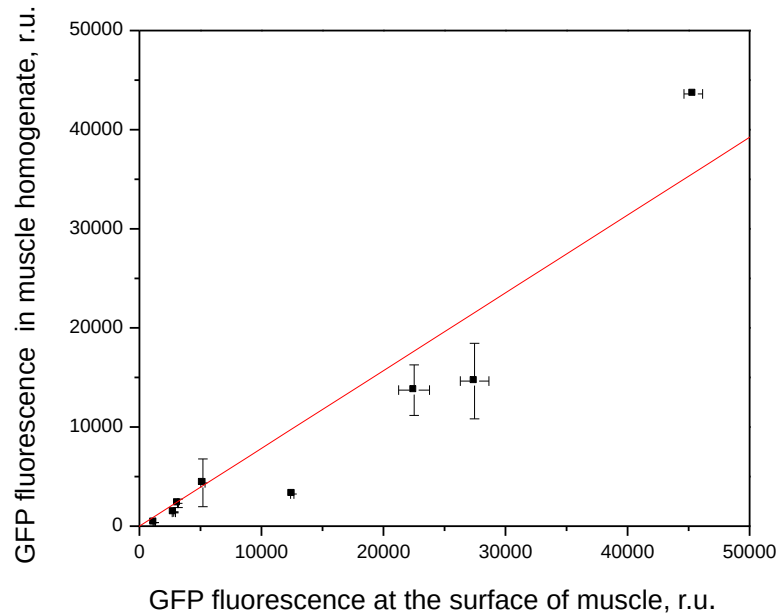


Figure 8. Correlation of GFP fluorescence intensity measured at *tibialis cranialis* muscle surface and in homogenate of the same muscle.

By applying fluorescence spectroscopy point measurements, we monitored GFP fluorescence kinetics in muscle (Figure 9 A). Since intensity of autofluorescence spectra significantly varied in the control group we performed spectra normalization at the wavelength of 590 nm (Figure 9 B). Spectral normalization allowed to compare GFP fluorescence, expressed as the 517 nm/590 nm ratio, thus allowing to remove the variations of autofluorescence intensity background. Our data show that plasmid injection into muscle without any following treatment did not result in any fluorescence signal (Figure 9). Low or no fluorescence was obtained when muscle, following plasmid injection, when the muscle was subjected to sonoporation at 20% or 100% duty cycle. Contrary to that a clear fluorescence signal of GFP was obtained in EP (HV) groups for the short and long time GFP expression.

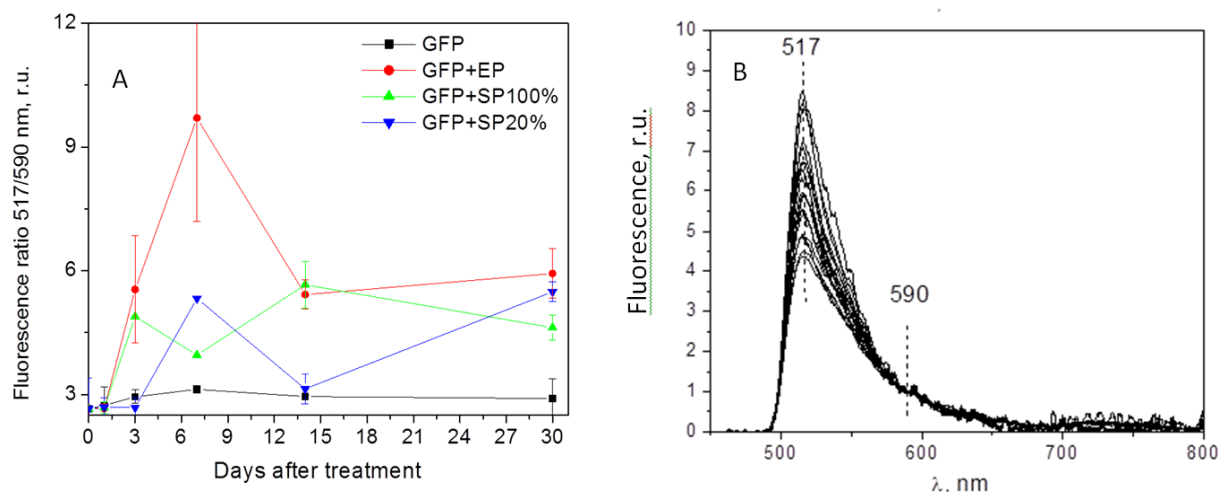


Figure 9. Non invasive estimation of GFP accumulation kinetics in *tibialis cranialis* muscle (A). Fluorescence ratio 517/590 nm calculation for spectral artifacts removal (B).

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. Also it allowed reducing costs for experimental apparatus and/or animal consumption. Up to date the live mouse imaging equipment is expensive and sophisticated (e.g. CSB Xenogen IVIS Imaging System 100; CRI Maestro system; Leica FCM 1000).

Further in this study we compared the characteristics of GFP plasmid transfection achieved *in vivo* by local application of electroporation and/or sonoporation. First we tested various electric field parameters facilitating the transfection of GFP. 1HV pulse has been proved to be optimal to achieve excellent levels of muscle permeabilization. However, again from the hyperspectral imaging data we observed a very high interindividual variability of the level of GFP expression (Figure 7 a-d). The origin of this lack of GFP transfection reproducibility is not fully understood. Compared to electroporation, the efficiency of plasmid gene transfer in skeletal muscle was significantly reduced by the application of sonoporation to the muscle following the injection of plasmid DNA (Figure 10). However, GFP fluorescence in sonoporation groups was still higher in comparison to the control group.

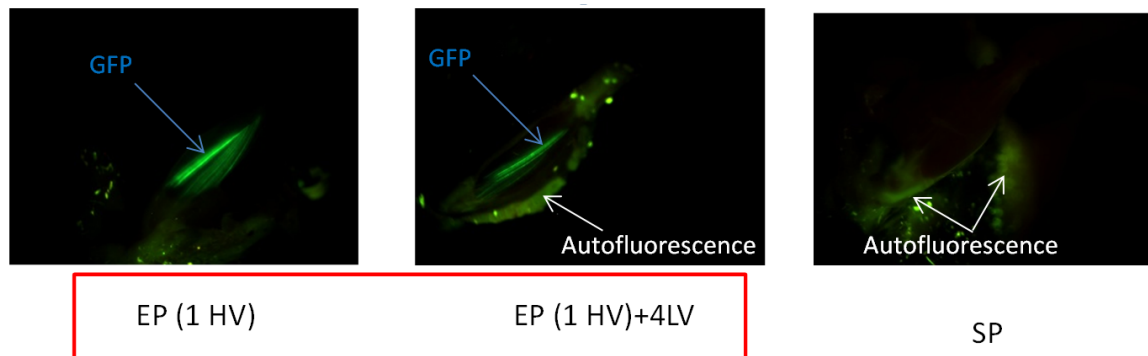


Figure 10. Comparison between GFP transfection efficiency using EP(HV), EP(HV+LV) and SP.

From the further image analysis, we expect to reveal information for:

- the number of transfected fibers;
(For any gene therapy outcome, the number of transfected fibres within a muscle is of the most importance).
- variation in muscle fluorescence intensity to compare the GFP expression levels (or GFP concentration) in particular muscle;
(To test the relation between GFP fluorescence levels and actual GFP concentration we made the homogenates of non GFP transfected muscles and added the exogenous GFP which concentration we known (Figure 11). Then we measured the GFP fluorescence in the muscle homogenate. We obtained the calibration curve allowing to relate GFP fluorescence in e.g. muscle homogenate to actual GFP concentration).
- area of GFP fluorescence in *tibialis cranialis* muscle for each experimental setup (EP, SP, EP+SP);
- mean fluorescence intensity of GFP, maximal values;
- density of GFP positive fibers;

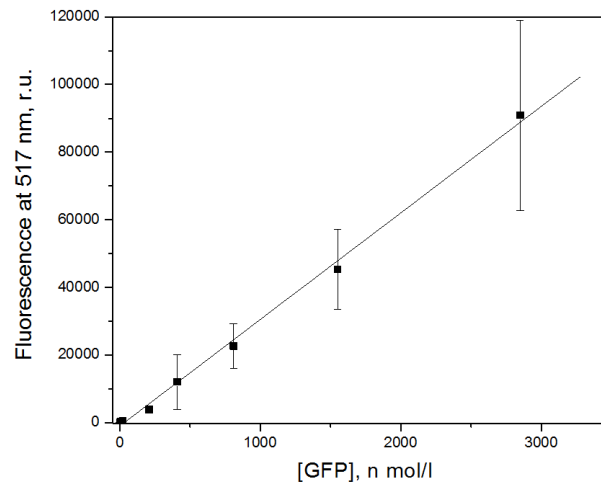


Figure 11. GFP calibration curve.

As the absolute control, the percentage and distribution of GFP positive muscle fibers as well as GFP fluorescence intensity was evaluated in muscle histological sections using the method of fluorescence microscopy (Figure 12). Data revealed that the efficiency of sonoporation-assisted DNA transfection is still low compared to HV electroporation assisted methods, however this could be already prognosticated from the results of non-invasive GFP fluorescence measurements *in vivo*.

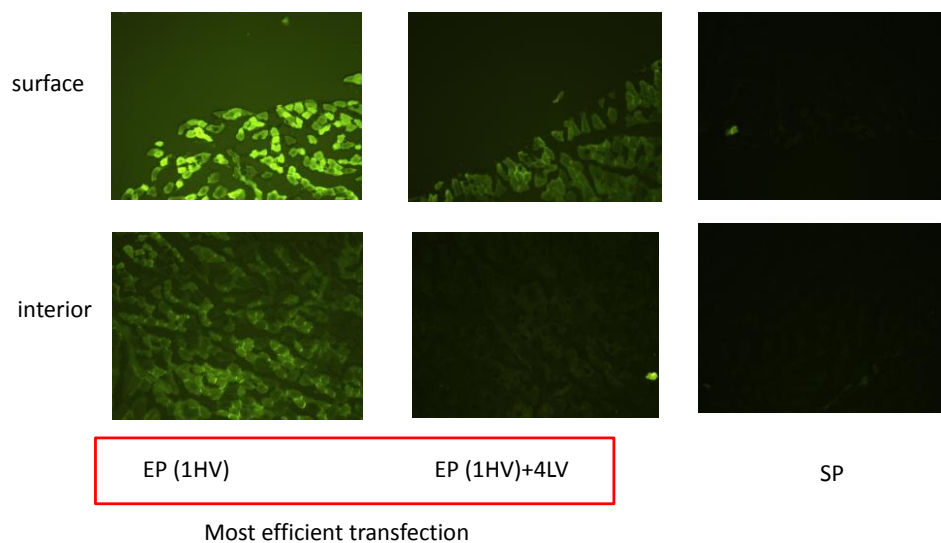


Figure 12. Comparisson between GFP transfection efficiency using EP(HV), EP(LV) and SP in *tibialis cranialis* muscle histological sections.

Fluorescence microscopy data gives insights on spatial distribution of GFP fluorescence.

Further analysis of transverse muscle sections should reveal:

- the exact number (area; percentage) of GFP positive *tibialis cranialis* muscle fibers in dependence of HV and LV electric pulse and SP parameters.
- average GFP fluorescence intensity and distribution in *tibialis cranialis* muscle fibers

That should be compared with 2D imaging data obtained *in vivo* (skins surface) and *ex vivo* (muscle surface) challenging to give the insights of the area within the muscle transfected with GFP.

Conclusions

Our study shows the potential of GFP transfection monitoring at the reduced costs for experimental apparatus and animals consumption. 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.

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 resulted in more intense GFP signal. In addition, long term GFP expression was most efficient in electroporation groups using HV electric pulses.

Further analysis of obtained images is possible and it is necessary to produce the key parameters allowing quantify/compare the efficiency of GFP transfection, area of GFP positive fibers for electroporated, sonoporated and electrosonoporated groups.

References

- Al-Sakere B, Andre F, Bernat C, Connault E, Opolon P, Davalos RV, Rubinsky B, Mir LM. Tumor Ablation with Irreversible Electroporation. PLoS ONE 2007;11:1–8.
- Andre F, Mir LM. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. Gene Ther 2004;11:33–42.
- Chang DC, Reese TS. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. Biophys J 1990;58:1–12.
- Chernomordik LV, Sukharev SI, Popov SV, Pastushenko VF, Sokirko AV, Abidor IG, Chizmadzhev YA. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies. Biochim Biophys Acta 1987;902:360–73.
- Čepurnienė K, Ruzgys P, Treinys R, Šatkauskienė I, Šatkauskas S. Influence of plasmid concentration on DNA electrotransfer in vitro using high-voltage and low-voltage pulses. J Membr Biol 2010;236:81–5.
- Daud AI, Deconti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondak VK, Munster PN, Sullivan DM, Ugen KE, Messina JL, Heller R. Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol 2008;26:5896–903.
- Davalos RV, Mir LM, Rubinsky B Tissue ablation with irreversible electroporation. Ann Biomed Eng 2005;33:223–31.
- Davies PF, Dewey CF Jr, Bussolari SR, Gordon EJ, Gimbrone MA Jr. Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function. In vitro studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic cells. J Clin Invest. 1984; 73(4):1121–9.
- Draeger A, Monastyrskaya K, Babychuk EB. Plasma membrane repair and cellular damage control: the annexin survival kit. Biochem Pharmacol. 2011; 81(6):703–12.
- Escoffre JM, Kaddur K, Rols MP, Bouakaz A. In vitro gene transfer by electrosonoporation. Ultrasound Med Biol 2010;36:1746–55.
- Escoffre JM, Portet T, Favard C, Teissie J, Dean DS, Rols MP. Electromediated formation of DNA complexes with cell membranes and its consequences for gene delivery. Biochim Biophys Acta 2011;1808:1538–43.
- Geers B, Lentacker I, Alonso A, Sanders NN, Demeester J, Meairs S, De Smedt SC. Elucidating the mechanisms behind sonoporation with adeno-associated virus-loaded microbubbles. Mol Pharm. 2011;8(6): 2244–51.
- Gehl J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. Acta Physiol Scand 2003;177:437–47.
- Gollins H, McMahon J, Wells KE, Wells DJ. High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle. Gene Ther 2003;10:504–12.
- Golzio M, Teissie J, Rols MP. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:1292–7.
- Hallow DM, Mahajan AD, McCutchen TE, Prausnitz MR. Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects. Ultrasound Med Biol 2006; 32:1111–22.
- Hassan MA, Campbell P, Kondo T. The role of Ca^{2+} in ultrasound-elicited bioeffects: progress, perspectives and prospects. Drug Discov Today. 2010; 15:892–906.

- Heller R, Jaroszeski M, Atkin A, Moradpour D, Gilbert R, Wands J, Nicolau C. In vivo electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Letters* 1996;389:225–8.
- Hibino M, Itoh H, Kinoshita K Jr. Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys J* 1993;64:1789–800.
- Jockusch H, Voigt S, Eberhard D. Localization of GFP in frozen sections from unfixed mouse tissues: immobilization of a highly soluble marker protein by formaldehyde vapor. *J Histochem Cytochem.* 200;51(3):401-4.
- Mehier-Humbert S., Bettiger T., Yan F., Guy RH. Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: Implication for drug delivery. *J Control Release* 2005;104: 213–22.
- Kotnik T, Miklavcic D. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophys J* 2000;79:670–79.
- Lentacker I, DeCock , Deckers R, De Smedt SC, Moonen CT. Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;72: 49-64.
- Lentacker I, Wang N, Vandenbroucke RE, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN. Ultrasound exposure of lipoplex loaded microbubbles facilitates direct cytoplasmic entry of the lipoplexes. *Mol Pharm.* 2009; 6(2):457–67.
- Lentacker I, De Smedt SC, Demeester J, Van Marck V, Bracke M, Sanders N N. Lipoplex-Loaded Microbubbles for Gene Delivery: A Trojan Horse Controlled by Ultrasound. *Advanced Functional Materials.* 2007; 17(12):1910–16.
- Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Ther* 2003;10:131–42.
- Martinenghi S, De C, Angelis G, Biressi S, Amadio S, Bifari F, Roncarolo MG, 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* 2002;9:1429–37.
- Meijering BD, Juffermans LJ, van Wammel A, Henning RH, Zuhorn IS, Emmer M, Versteilen AM, Paulus WJ, van Gilst WH, Kooiman K, de Jong N, Musters RJ, Deelman LE, Kamp O. Ultrasound and Microbubble – Targeted Delivery of Macromolecules is regulated by Induction of Endocytosis and Pore Formation. *Circ. Res.* 2009;104: 679–87.
- Miyake K, McNeil PL. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *J Cell Biol.* 1995;131:1737–45.
- Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG, Garbay JR, Billard V, Geertsens PF, Rudolf Z, O’Sullivan GC, Marty M. Standard operating procedures of the electrochemotherapy. Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. *EJC* 2006;Suppl4:14–25.
- Mir LM, Glass LF, Sersa G, Tessie J, Domenge C, Miklavcic D, Jaroszeski MJ, Orlowski S, Reintgen DS, Rudolf Z, Belehradek M, Gilbert R, Rols MP, Belehradek J, Bachaud JM, DeConti R, Stabuc B, Cemazar M, Coninx P, Heller R. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998;77:2336–42.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4262–7.
- Neumann E, Toensing K, Kakorin S, Budde P, Frey J. Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells. *Biophys J* 1998;74:98–108.
- Park J, Fan Z, Deng CX. Effects of shear stress cultivation on cell membrane disruption and intracellular calcium concentration in sonoporation of endothelial cells. *J Biomech.* 2011; 44(1):164-9.
- Paula DM, Valero-Lapchik VB, Paredes-Gamero EJ, Han SW. Therapeutic ultrasound promotes plasmid DNA uptake by clathrin-mediated endocytosis. *J Gene Med.* 2011;13(7-8):392–401.

- Prausnitz MR, Corbett JD, Gimm JA, Golan DE, Langer R, Weaver JC. Millisecond measurement of transport during and after an electroporation pulse. *Biophys J* 1995;68:1864–70.
- Prud'homme GJ, Glinka Y, Khan AS, Draghia-Akli R. Electroporation enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Current Gene Transfer*. 2006;6:243–73.
- Pucihar G, Kotnik T, Miklavcic D, Teissie J. Kinetics of transmembrane transport of small molecules into electroporated cells. *Biophys J* 2008;95:2837–48.
- Reddy A, Caler EV, Andrews NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*. 2001;106(2):157–69.
- Schlicher RK, Radhakrishna H, Tolentino TP, Apkarian RP, Zarnitsyn V, Prausnitz MR. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol*. 2006 32(6):915–24.
- Šatkauskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, Miklavcic D, Mir LM. Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis. *Mol Ther* 2002;5:133–40.
- Šatkauskas S, Andre F, Bureau MF, Scherman D, Miklavcic D, Mir LM. Electrophoretic component of electric pulses determines the efficacy of in vivo DNA electrotransfer. *Hum Gene Ther* 2005;16:1194–201.
- Šatkauskas S, Ruzgys P, Venslauskas MS. Towards the mechanisms for efficient gene transfer into cells and tissues by means of cell electroporation. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12:275–86.
- Sukharev S, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YuA. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J* 1992;63:1320–7.
- Teissie J, Rols MP. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophys J* 1993;65:409–13.
- Wang XD, Liu J, Yang JC, Chen WQ, Tang JG. Mice body weight gain is prevented after naked human leptin cDNA transfer into skeletal muscle by electroporation. *J Gene Med* 2003;5:966–76.
- Weaver JC, Chizmadzhev YuA. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochem Bioener*, 1996;41:135–60.
- Zhao YZ, Luo YK, Lu CT, Xu JF, Tang J, Zhang M, Zhang Y, Liang HD. Phospholipids-based microbubbles sonoporation pore size and reseal of cell membrane cultured in vitro, *J. Drug Target*. 2008;16:18–25.

2.pielikums. Publikāciju teksti SPIE Proceedings

Implementation of laser speckle contrast analysis as connection kit for mobile phone for assessment of skin blood flow

Dainis Jakovels*, Inga Saknite, Janis Spigulis

Biophotonics Laboratory, Institute of Atomic Physics and Spectroscopy, University of Latvia,
Raina Blvd. 19, LV 1050, Riga, Latvia

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

ABSTRACT

Laser speckle contrast analysis (LASCA) offers a non-contact, full-field, and real-time mapping of capillary blood flow and can be considered as an alternative method to Laser Doppler perfusion imaging. LASCA technique has been implemented in several commercial instruments. However, these systems are still too expensive and bulky to be widely available. Several optical techniques have found new implementations as connection kits for mobile phones thus offering low cost screening devices.

In this work we demonstrate simple implementation of LASCA imaging technique as connection kit for mobile phone for primary low-cost assessment of skin blood flow. Stabilized 650 nm and 532 nm laser diode modules were used for LASCA illumination. Dual wavelength illumination could provide additional information about skin hemoglobin and oxygenation level.

The proposed approach was tested for arterial occlusion and heat test. Besides, blood flow maps of injured and provoked skin were demonstrated.

Keywords: Laser speckle contrast analysis, LASCA, blood flow, skin, mobile phone

INTRODUCTION

Laser speckle contrast analysis (LASCA) 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]. LASCA system is simpler and cheaper compared with LDPI technique, and could be used for full-field monitoring of skin perfusion [5-7]. LASCA can be used for monitoring of port wine stain treatment [8], assessment of burn injuries [9] and quantification the Allen test [10].

LASCA technique has been implemented in several commercial instruments e.g. *Laser Speckle Imager* from *Moor Instruments Ltd* [11] and *PeriCam PSI System* from *Perimed AB* [12]. However, these systems are still too expensive and bulky to be widely available.

Low-cost LASCA solutions have been tested using a webcam [13] and mobile phone camera [14]. LASCA could be also used in combination with RGB reflectometry for simultaneous imaging of blood flow and hemoglobin oxygenation [15].

Several techniques have found new implementations as connection kits for smartphones e.g. digital dermoscope *HandyScope* from *FotoFinder Systems* [16]. Smartphones could be used for assessment of skin blood pulsations [17], screening of skin tumors [18, 19] or development of more complex health monitoring system [20].

In our previous study [14] we demonstrated simple implementation of LASCA technology based on 650 m laser module and CMOS camera or smartphone. In this work we demonstrate simple implementation of LASCA imaging technique as connection kit for mobile phone for primary low-cost assessment of skin blood flow. Besides, dual (650 and 532 nm) laser illumination is used to provide additional information about oxy- and deoxyhemoglobin content. The proposed approach was tested for arterial occlusion and heat test. Blood flow maps of injured and provoked skin were demonstrated.

MATERIALS AND METHODS

The LASCA device consists of mobile phone (*iPhone 4S*) and two laser modules (650 nm and 532 nm with output power 10-15 mW). The laser beam was expanded through the lens to illuminate the surface of the skin. The intensities

of bi-chromatic (650 and 532 nm) laser illumination were adapted using neutral density filters. 8 megapixel back camera and default app of *iPhone 4S* was used for acquisition of images (8 MP – 3264x2448 px) and videos (2MP – 1920x1080 px, 24 fps). The device was positioned 15 cm from the surface of the skin. 3x3 cm (500x500 px) region of interest (RoI) was used for further processing. Videos and images were uploaded to PC for processing in *MatLab*, but it could be performed in smartphone due to simplicity of LASCA algorithm.

The speckle contrast SC could be defined as the ratio of the standard deviation Std to the mean intensity I_{mean} [1] and vary between 0 and 1:

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

The blood flow BF is inversely proportional to the speckle contrast SC and can be expressed:

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

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

Processing of 500x500 px monochrome image in *MatLab* using *for loop* takes up to 30 s by scanning every pixel. It is possible to reduce the processing time to 100 times (up to 300 ms for 500x500 px image) by scanning every 10th pixel as the spatial resolution is still reduced in proportion to the number of pixels of the scan window. Processing time can be reduced another 10 times (up to 25 ms for 500x500 px image) by avoiding *for loops*. Therefore LASCA algorithm based on built-in *MatLab* image processing functions was constructed (see Figure 1). Pre-processing consists of reading of data and extraction of channels (Step 1). Calculation of mean intensity I_{mean} map (Step 2) and standard deviation Std (Step 3) map is performed using *imresize*, *sqrt* functions and arithmetic operations. The blood flow BF map is calculated by matrix (I_{mean} and Std) division. Such LASCA algorithm allows processing of all image R, G, B channels simultaneously, and also near real time video processing.

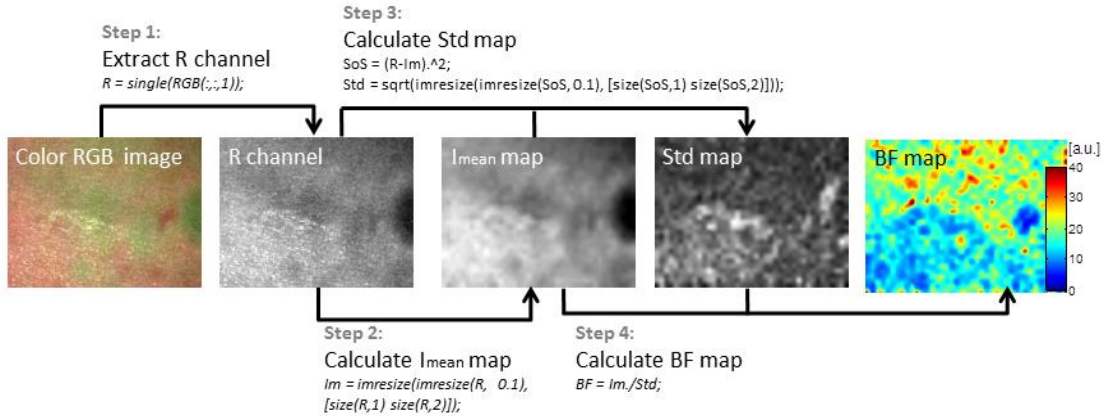


Figure 1. LASCA algorithm for mapping of blood flow in *MatLab*.

Dual wavelength illumination could provide additional information about skin hemoglobin and oxygenation level. Absorption of deoxyhemoglobin at 650 nm (red light) is ten times higher compared to oxyhemoglobin [21] therefore intensity signal in R channel is much more sensitive to deoxyhemoglobin changes than oxyhemoglobin. A different effect can be observed at 532 nm (green light) where oxyhemoglobin absorption is 8% stronger than deoxyhemoglobin. The red light has ~10 lower absorption of hemoglobin compared with green light, but it penetrates more deeply into the skin covering the deeper blood vessels. The green light penetrates more superficially, but provides better contrast between the blood and other tissues. Spectral LASCA is implemented by illuminating skin with red (650 nm) and green (532 nm) laser and acquiring both spectral LASCA images simultaneously in different spectral channels (R and G). Therefore the intensity signal values can be used for assessment of oxy- and deoxyhemoglobin calculating optical density difference ΔOD values from Beer-Lambert law:

$$\Delta OD = \log\left(\frac{I_{ref}}{I}\right), \quad (3)$$

where I is intensity of reflected light at pixel or region of interest, I_{ref} is reference value – mean intensity of reflected light at normal or unprovoked area of the skin. It was assumed that ΔOD signal at R channel should correspond well with deoxyhemoglobin concentration changes, ΔOD difference between G and R channels should represent oxyhemoglobin changes.

An arterial occlusion of forearm and also finger was used to test LASCA device. A cuff (180–200 mmHg) was applied to the upper arm, but measurements were taken from the dorsal side of the hand: 20 s for reference signal from unprovoked skin, 1 min. during occlusion, and 1 min. for post-occlusive reaction observation. Parameters were calculated as mean values over the region of interest (RoI). It was expected to see decrease in blood flow and oxyhemoglobin concentration during occlusion and slight overshoot after cuff release. The opposite reaction was expected in the case of deoxyhemoglobin. The occlusion of the finger was performed by rubber band to observe the contrast in two skin areas.

The heat test was performed to cause local vasodilatation of blood vessels. The dorsal side of the hand was in contact with warm (40–50 °C) metal object for 5 s. The reaction was observed for 30 s, and blood flow and oxygenation level increase were expected.

Mapping of blood flow was demonstrated on the region of skin with scar. Decreased blood flow parameter values within the scar were expected.

RESULTS AND DISCUSSION

The region of interest for test measurement of arterial occlusion and also mapping of blood flow is shown in Figure 2. The scar is clearly visible on the dorsal side of the hand using white light illumination. Uniform laser illumination over all field of view still remains a challenge therefore smaller region of interest (~3x3 cm, 500x500 px) was used for further processing.

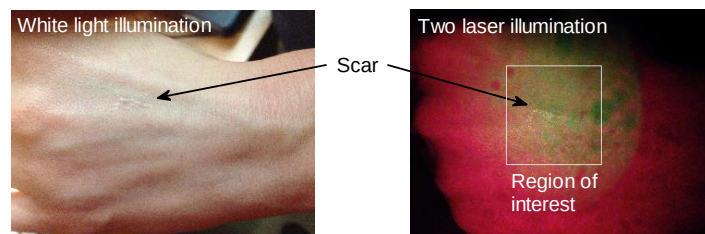


Figure 2. The region of interest with a scar: white light illumination (left) and dual laser illumination (right).

Arterial occlusion test was performed at three illumination modes: only 650 nm laser, only 532 nm laser and both (650 nm and 532 nm) lasers are switched on. The video was captured at 24 fps, and the parameters were calculated as the mean values within the region of interest in each frame. The result of arterial occlusion test measurement using only 650 nm laser is shown in Figure 3. The parameter values were calculated from the data of R channel as it is the most sensitive to 650 nm laser. The profiles of parameters' curves correspond well with expectations. The mean intensity values change inversely to deoxyhemoglobin concentration. The standard deviation increases during provocation and decreases after cuff release due to decreased and restored blood flow. The blood flow parameter values drops for ~12% during occlusion comparing to unprovoked skin and increases for ~14% after cuff release resulting in slight overshoot. Blood flow doesn't drop to zero as speckle contrast values vary between 0 and 1. The contrast in blood flow changes is sufficient for further temporal analysis of the circulatory response to arterial occlusion.

The result of 532 nm laser illumination calculated from the data of G channel is shown in Figure 4. It was observed that the camera tends to use auto settings to adjust the intensity that appears as the signal jumps of mean intensity curve. The profile of mean intensity curve differs from the one obtained at 650 nm due to different sensitivity to oxy- and deoxyhemoglobin, also penetration depth. However the standard deviation curve is similar to the one obtained at 650 nm as they both are based on the same laser speckle principles of formation. The blood flow curve is affected by auto settings caused artefacts, and doesn't show a good signal contrast as it was achieved for 650 nm laser illumination.

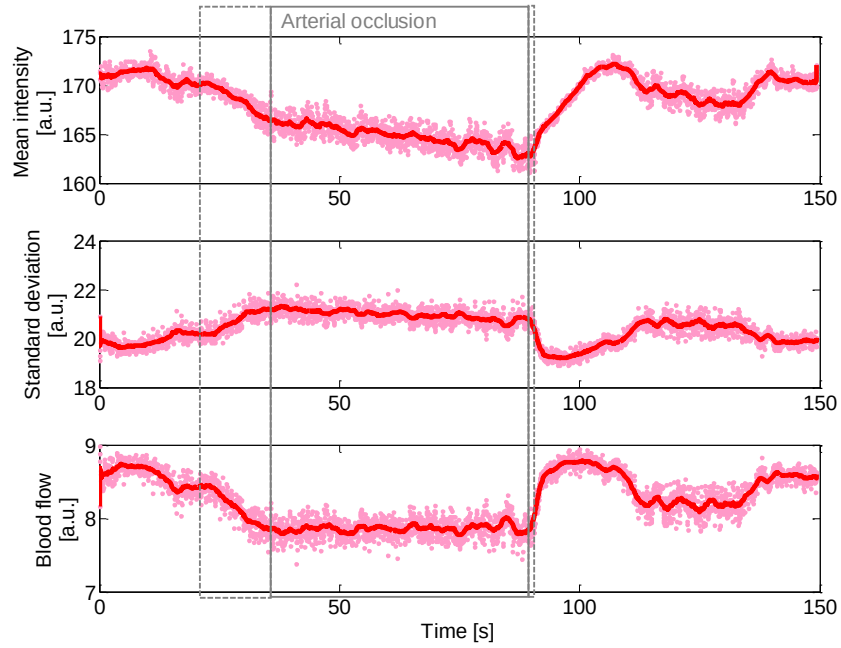


Figure 3. 650 nm laser illumination: monitoring of mean intensity, standard deviation and blood flow changes during arterial occlusion.

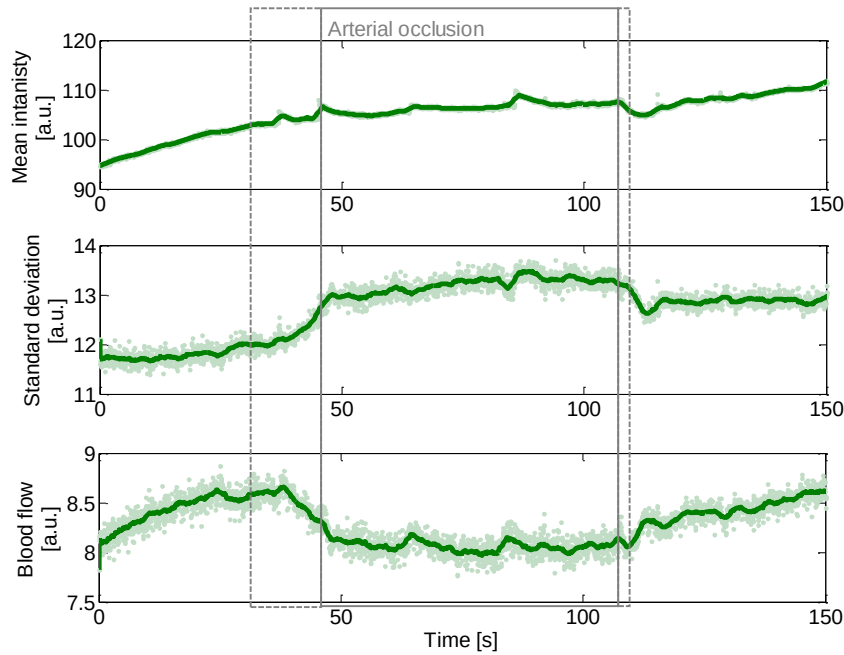


Figure 4. 532 nm laser illumination: monitoring of mean intensity, standard deviation and blood flow changes during arterial occlusion.

Dual laser illumination arterial occlusion measurement was performed detecting simultaneously 650 nm in R channel and 532 nm in G channel, the result is shown in Figure 5. The blood flow was calculated from the data of R channel and corresponds well with expectations and observations when only 650 nm laser was used – influence of 532 nm laser is negligible. ΔOD signal profiles corresponded well with expected hemoglobin changes. $\Delta OD(R)$ represents deoxyhemoglobin changes, but $\Delta OD(G) - \Delta OD(R)$ corresponds to oxyhemoglobin profile changes. Fluctuations in signal after cuff release (between 90 and 120 s) are caused by auto adaption settings of phone camera, but still clear overshoot in blood flow and oxyhemoglobin ($\Delta OD(G) - \Delta OD(R)$) can be observed and further used for analysis of blood flow recovery after occlusion.

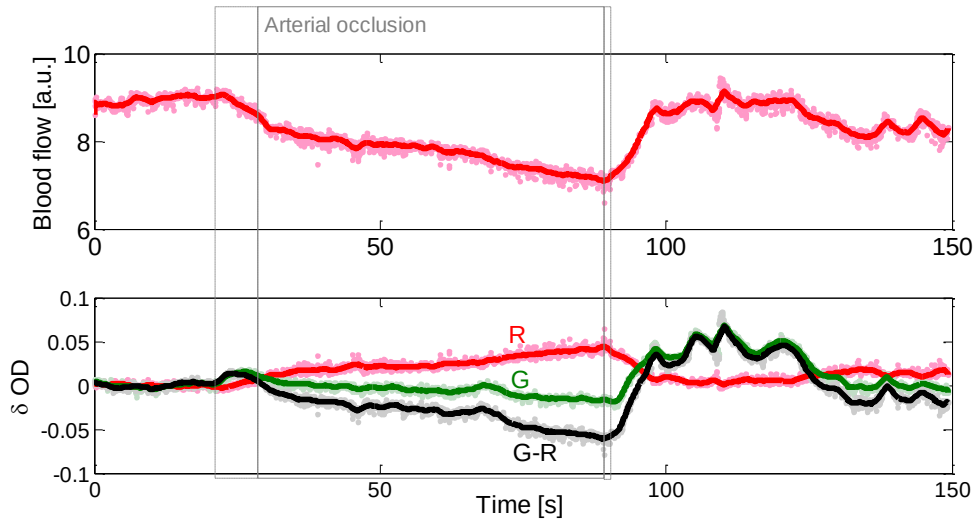


Figure 5. Dual (650 and 532 nm) laser illumination: monitoring of blood flow and ΔOD changes during arterial occlusion.

Heat test results are shown in Figure 6. Expected blood flow parameter increase up to 10% was observed after short (5 s) heat provocation of the dorsal side of the hand. ΔOD profiles show that irritation of the skin can be characterized as oxyhemoglobin ($\Delta OD(G) - \Delta OD(R)$) concentration increase, no increase in deoxyhemoglobin ($\Delta OD(R)$) was observed.

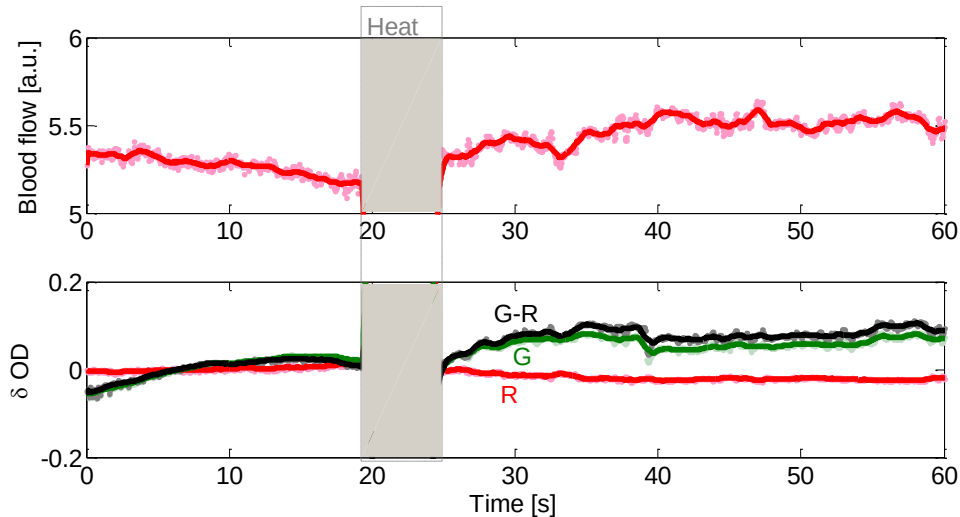


Figure 6. Heat test: monitoring of blood flow and ΔOD changes using dual (650 and 532 nm) laser illumination.

The scar intensity image and calculated parameter maps are presented in Figure 7. Intensity image shows that uniform laser illumination remains a challenge. Scar is not (or poorly) visible in the mean intensity image of R channel, but has good contrast in G channel. The scar is highlighted well in standard deviation maps – laser speckles are more pronounced due to absence of the blood vessels. Pseudo color RGB map of standard deviation is constructed to show that standard deviation values in different spectral channels are similar – similar values appear in gray colors. Blood flow maps indicate the scar as poorly perfused region – lower blood flow values. Pseudo color RGB map of blood flow shows that each color channel (R and G) present different blood flow parameter values due to non-uniform laser illumination, but the scar still appears as dark region with lower parameter values. Uniformity of laser illumination should be improved for more accurate and credible representation of blood flow.

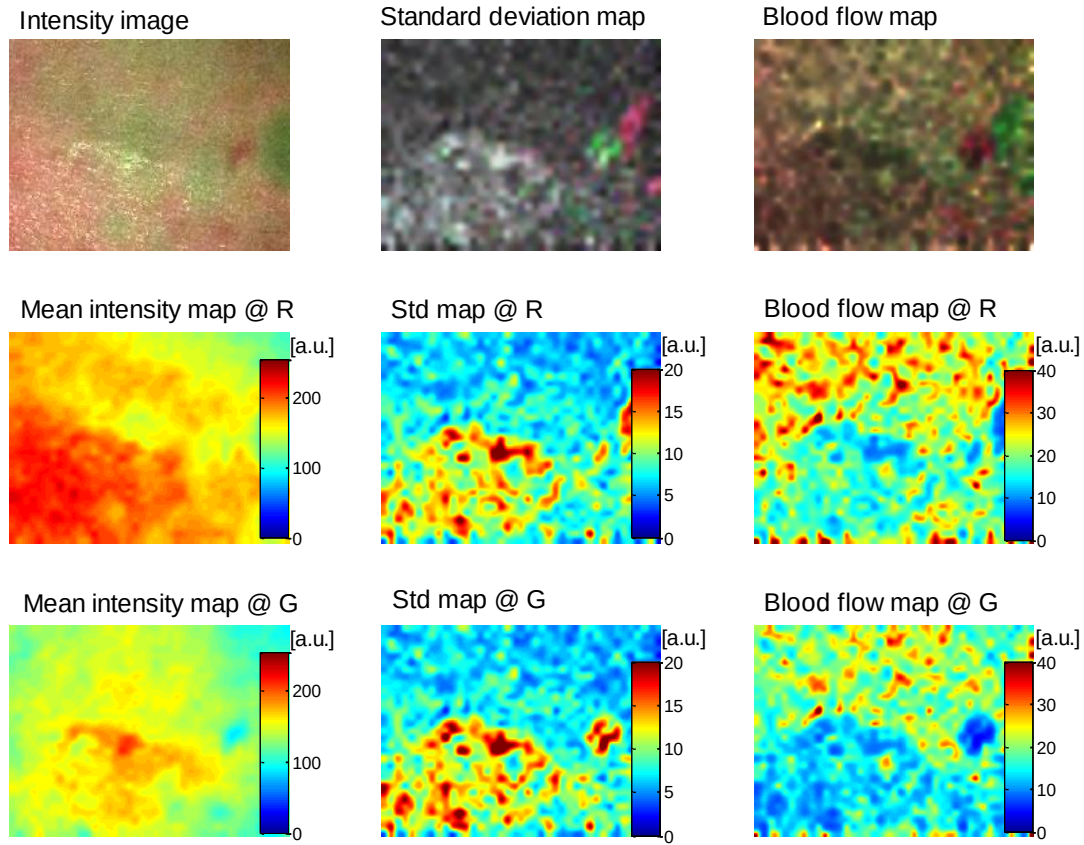


Figure 7. Mapping of the scar: intensity, standard deviation and blood flow maps represented as RGB images and values at separate R and G channels.

Imaging of finger occlusion demonstrates good contrast between occluded (RoI_1) and non-occluded (RoI_2) areas of the skin (see Figure 8). Two regions of interest (RoI) were chosen to monitor two points in time simultaneously. Blood flow values decreases during occlusion in RoI_1 while normal blood flow values remains in non-occluded region RoI_2 . Significant parameter overshoot up to 40% was observed in RoI_1 after cuff release and also slight parameter increase in RoI_2 . ΔOD changes show decrease in oxyhemoglobin ($\Delta OD(G) - \Delta OD(R)$) and increase in deoxyhemoglobin ($\Delta OD(R)$) concentration during occlusion in RoI_1 , also significant overshoot in oxyhemoglobin after cuff release. It was observed that oxyhemoglobin overshoot is shifted in time for 5...10 s comparing to blood flow overshoot. ΔOD remains around zero values in RoI_2 indicating normal hemoglobin concentration. Blood flow maps of three significant points (before, during and after occlusion) are presented in Figure 8, spatial decrease in parameter values and also overshoot can be observed.

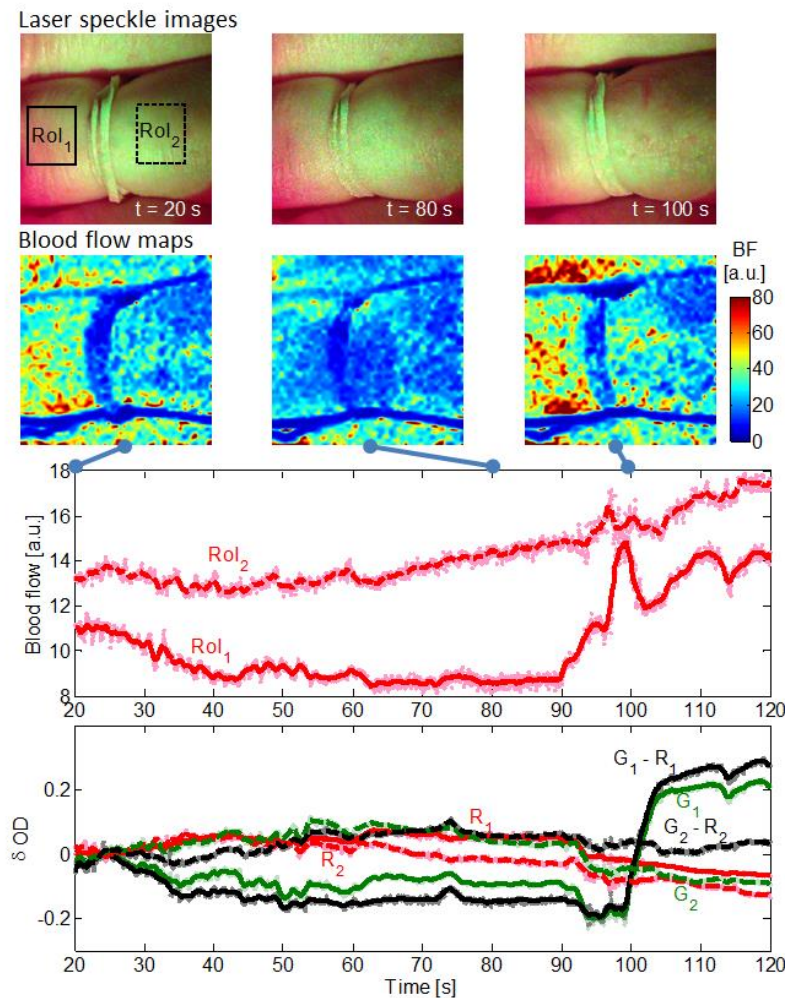


Figure 8. Finger occlusion: monitoring of blood flow and ΔOD changes in two regions of interest (RoI₁ and RoI₂), and blood flow maps of three significant points (before, during and after occlusion).

CONCLUSIONS

Simple dual (650 and 532 nm) wavelength LASCA device based on mobile phone camera was built and tested by arterial occlusion and heat test. The results showed that it can be used for primary fast monitoring and mapping of skin blood flow and implemented as connection kit for smartphone.

Blood flow values can be calculated from intensity signal in red (R) channel where 650 nm laser is detected. Green (G) channel can be used to provide more information about hemoglobin content. ΔOD signal in R channel corresponds well with deoxyhemoglobin concentration changes, but ΔOD difference between G and R channels represents oxyhemoglobin changes.

LASCA technique is sensitive to movements, surface curvature and also settings of the camera. Auto adjustment of the camera causes artefacts resulting in floating signal or jumps in signal values. Auto correction settings should be switched off and exposure time should be set close to recommended value 5 ms. Uniform laser illumination and full control over camera setting still remains a challenge to provide more accurate and credible representation of blood flow. Developed LASCA device should be tested and calibrated using commercially available LDPI or LASCA device.

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).

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] 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)
- [11] 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)
- [12] A. Humeau-Heurtiera, G. Maheb, S. Durand, P. Abraham, „Skin perfusion evaluation between laser speckle contrast imaging and laser Doppler flowmetry,” *Opt. Commun.* 291, 482-487 (2013)
- [13] 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)
- [14] D. Jakovels, U. Rubins, J. Spigulis, „LASCA and PPG imaging for non-contact assessment of skin blood supply,” *Proc. SPIE* 8668, 866849 (2013)
- [15] 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)
- [16] 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)
- [17] E. Jonathan, M.J. Leahy, „Cellular phone-based photoplethysmographic imaging,” *J. Biophotonics* 4(5), 293-296 (2011)
- [18] S. Kroemer, J. Fruhau, 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)
- [19] 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)
- [20] Y.G. Lee, W.S. Jeong, G. Yoon, „Smartphone-based mobile health monitoring,” *Telemed J E Health.* 18(8), 585-90 (2012)
- [21] S. Prahl, „Tabulated Molar Extinction Coefficient for Hemoglobin in Water,” <http://omlc.ogi.edu/spectra/hemoglobin/summary.html>, Last access: March, 2014.

Diffuse reflectance and fluorescence multispectral imaging system for assessment of skin

Inga Saknite*, Dainis Jakovels, Janis Spigulis

Biophotonics Laboratory, University of Latvia, Raina Blvd 19, Riga, LV-1586, Latvia

ABSTRACT

The diffuse reflectance multispectral imaging technique has been used for distant mapping of *in vivo* skin chromophores (hemoglobin and melanin). The fluorescence multispectral imaging is not so common for skin applications due to complicity of data acquisition and processing, but could provide additional information about skin fluorophores. Both techniques are compatible, and could be combined into a multimodal solution.

The multispectral imaging system *Nuance* based on liquid crystal tunable filters was adapted for diffuse reflectance and fluorescence spectral imaging of *in vivo* skin. Uniform illumination was achieved by LED ring light. Combination of four LEDs (warm white, 770 nm, 830 nm and 890 nm) was used to support diffuse reflectance mode in spectral range 450-950 nm. 405 nm LEDs were used for excitation of skin autofluorescence. Multispectral imaging system was adapted for spectral working range of 450-950 nm with scanning step of 10 nm and spectral resolution of 15 nm. An average field of view was 50x35 mm in size with spatial resolution 0,05 mm (the pixel size). Due to spectrally different illumination intensity and system sensitivity, various exposure times (from 7...500 ms) were used for each image acquisition.

The proposed approach was tested for different skin lesions: benign nevus, hemangioma, basalioma and halo nevus. Spectral image cubes of different skin lesions were acquired and analyzed to test its diagnostic potential.

Keywords: Multispectral imaging, diffuse reflectance, autofluorescence, skin.

INTRODUCTION

Multispectral imaging is a non-contact method that can be used for noninvasive mapping of skin chromophores, e.g. hemoglobin and melanin [1,2]. Fluorescence imaging gives information about skin fluorophores [3,4]. The characteristic absorption and emission spectra of skin fluorophores are shown in Figure 1. Diffuse reflectance and fluorescence multispectral imaging can be combined in a multimodal solution for analysis of skin lesions.

Multispectral imaging system based on liquid crystal tunable filters in combination with a light source of different LEDs in the visible and near-infrared spectral range can be adapted for acquisition of multispectral image cubes. These multispectral images can be later analyzed to acquire chromophore concentration maps and skin autofluorescence spectra.

Goal of this study was to test the developed system that combines diffuse reflectance and fluorescence multispectral imaging techniques by acquiring multispectral image cubes of different pigmented skin lesions. The drawback of this multimodal solution is time-consuming data acquisition and processing, as well as motion artefacts.

*inga.saknite@lu.lv; phone 00 371 29162679

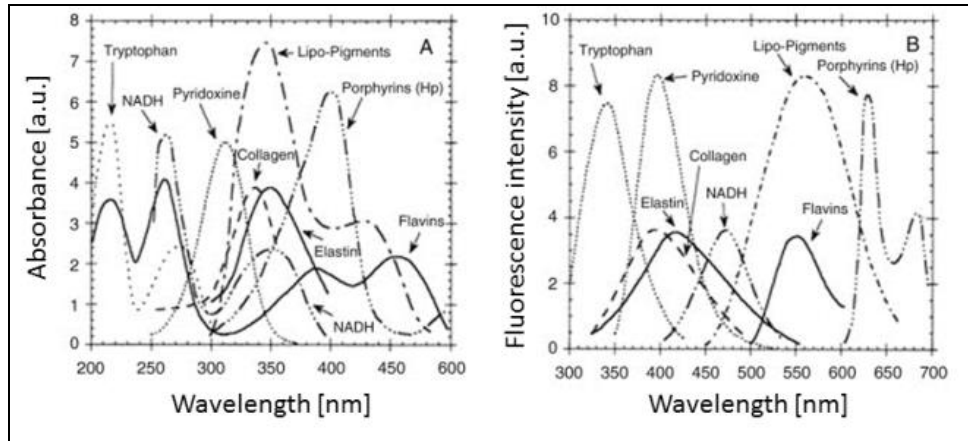


Figure 1. The characteristic absorption (to the left) and emission (to the right) spectra of skin fluorophores [3].

EXPERIMENTAL

Experimental setup

Multispectral imaging setup consisting of multispectral imaging system *CRI's Nuance*, light source of LED ring light, diffuser in front of the light source, as well as a computer with *Nuance* software was used for image acquisition in the spectral range of 450-950 nm.

Light source was developed as a ring light consisting of LEDs to cover the spectral range of 450-950 nm for diffuse reflectance mode: warm white, 770 nm, 830 nm and 890 nm. Spectra of used LEDs are show in Figure 2. Diffuser in front of the light source was used to achieve a uniform illumination of the skin area of interest.

Light source consisted of an inner circle of ultraviolet (405 nm) illumination LEDs for skin autofluorescence imaging. No diffuser was used in front of ultraviolet LEDs.

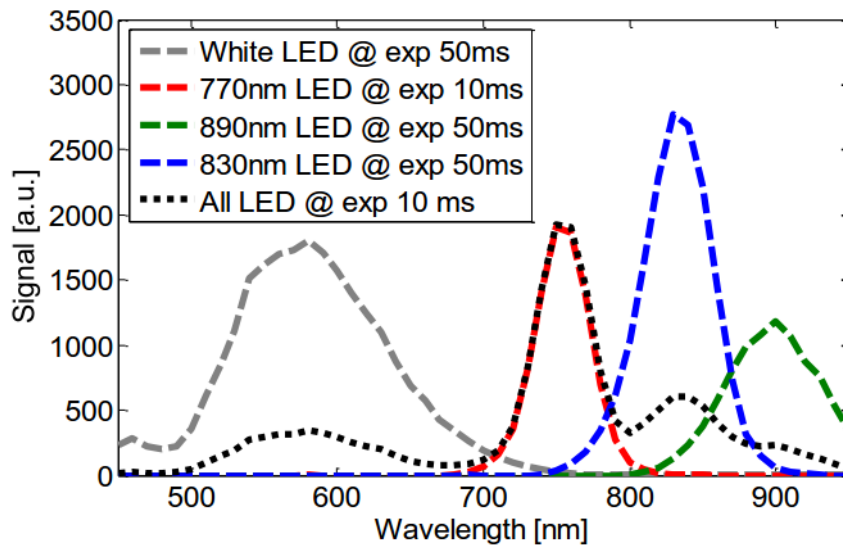


Figure 2. Spectra of illumination LEDs for diffuse reflectance mode at different exposure times.

Data acquisition and processing

For diffuse reflectance imaging mode, various exposure times (from 7...500 ms) were used for each wavelength in the spectral range of 450-950 nm due to spectrally different illumination intensity and system sensitivity. Images were acquired with a spectral step of 10 nm at wavelengths in the spectral range of 450-950 nm. Maximum pixel resolution was used.

For fluorescence mode, a constant exposure time of 200 ms was used to acquire images in the spectral range of 450-950 nm with a spectral step of 10 nm. Reduced pixel resolution was used by combining 4 pixels in 1 pixel.

As image acquisition process takes approximately 30-40 seconds for diffuse reflectance mode and 20-30 seconds for fluorescence mode, motion artefacts are unavoidable. Thus, image registration was performed for each image cube. Simple stickers were applied to the skin area around the lesion in order to improve the image registration performance. Image segmentation was used to distinguish the lesion from normal skin (Figure 3).

For diffuse reflectance imaging mode, optical density (OD) images were obtained:

$$OD = -\log \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

where I_0 are reference intensity values acquired by using a white reference reflector before the measurement of skin area of interest, and I are intensity values acquired of skin area of interest.

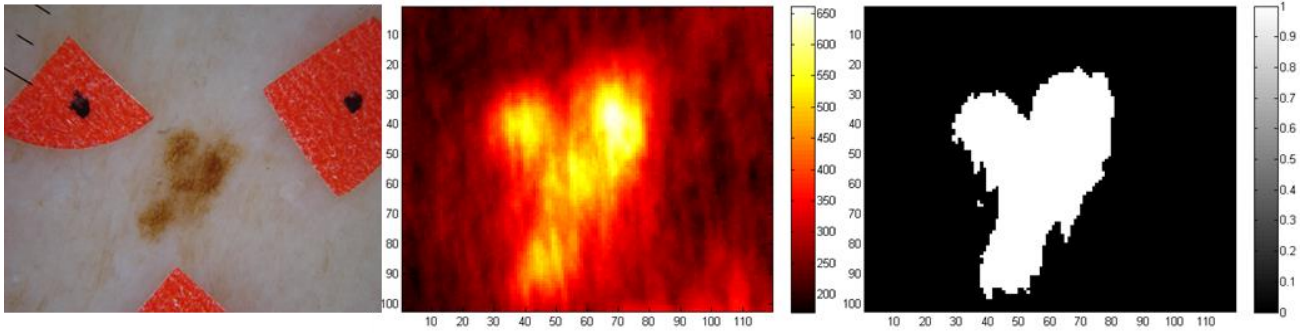


Figure 3. Example of diffuse reflectance data of a lesion: RGB image (to the left), optical density color map at 580 nm (in the middle), segmented lesion (to the right).

Average spectrum of segmented area of the lesion and segmented area of normal skin around the lesion was calculated by analyzing each image pixel of skin area of the lesion and skin area of normal skin for both modalities: diffuse reflectance and fluorescence imaging.

RESULTS

Pilot study was performed on 30 volunteers by acquiring diffuse reflectance and fluorescence images of 40 skin lesions: 23 benign nevi, 14 atypical nevi, and 3 other interesting lesions: hemangioma, basalioma and halo nevus. Dermatologist examined all volunteers to classify the lesions. In this study, 3 interesting lesions were further analyzed and compared to benign nevi (Figures 4-7). For diffuse reflectance imaging mode, a map of Optical density values at 580 nm is shown, as well as comparison of the average diffuse reflectance spectra of skin areas of interest (area of the lesion and area of normal skin around the lesion). For fluorescence imaging mode, a map of fluorescence intensity values at 580 nm is shown, as well as comparison of the average skin autofluorescence spectra of skin areas of interest. Also, an RGB image of the lesion and surrounding tissue is shown for each example.

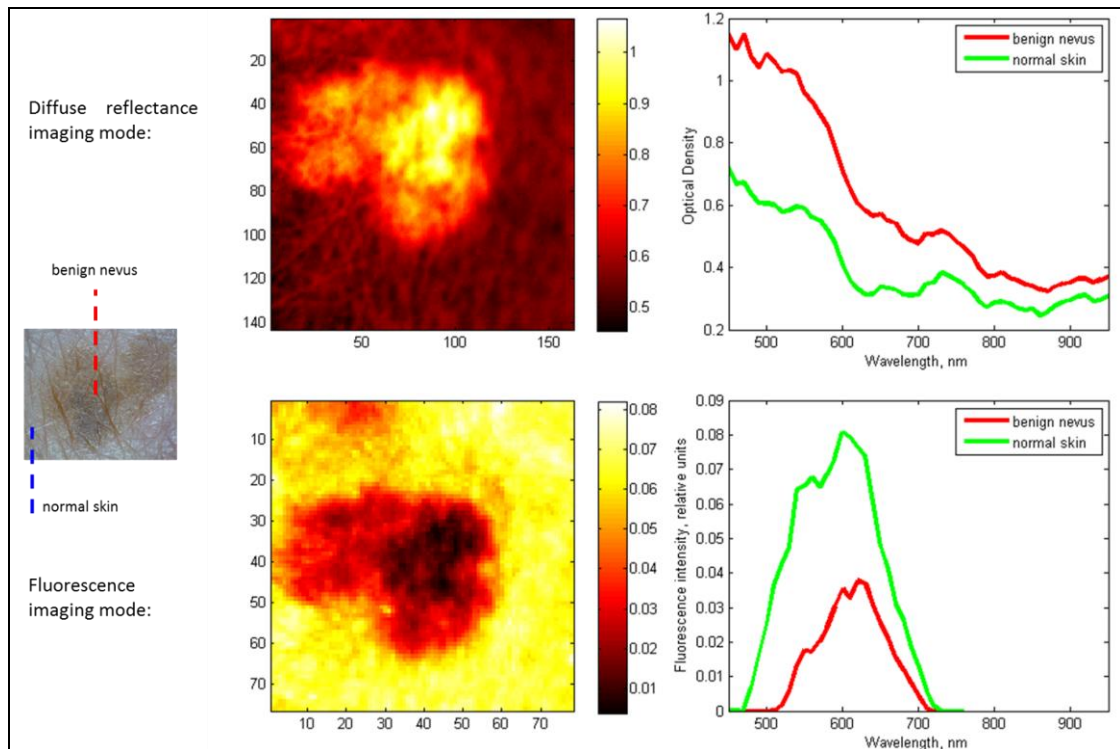


Figure 4. Diffuse reflectance and fluorescence imaging data analysis of **benign nevus**.

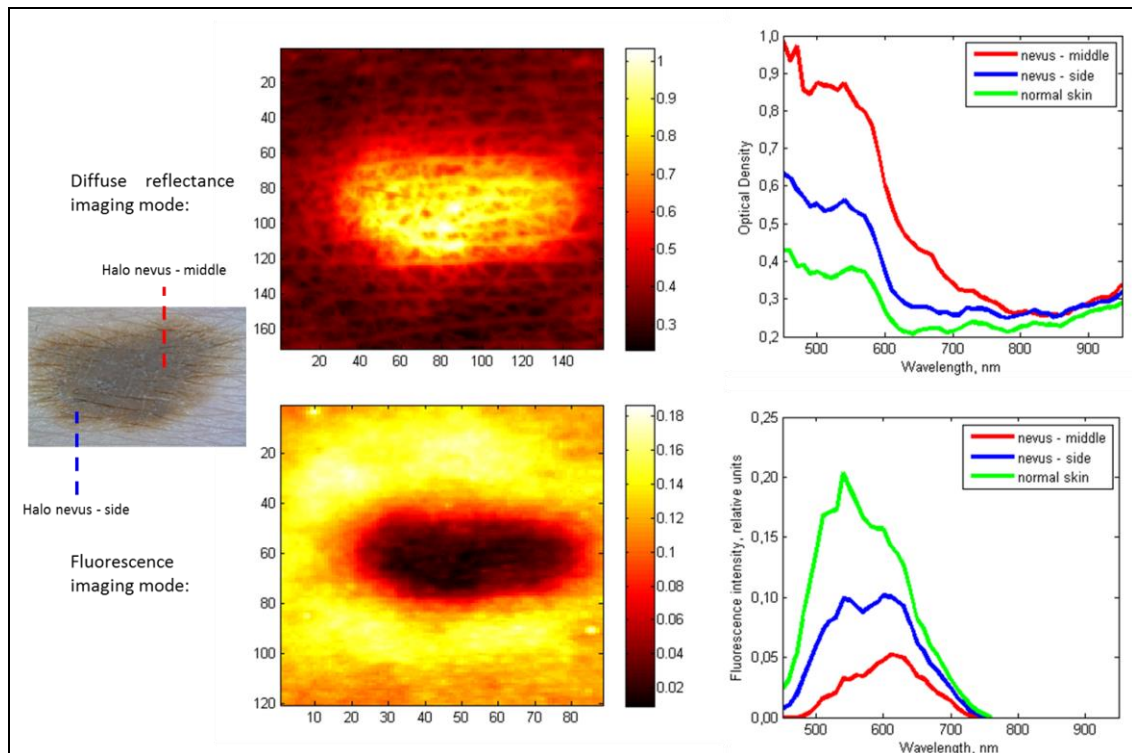


Figure 5. Diffuse reflectance and fluorescence imaging data analysis of **halo nevus**.

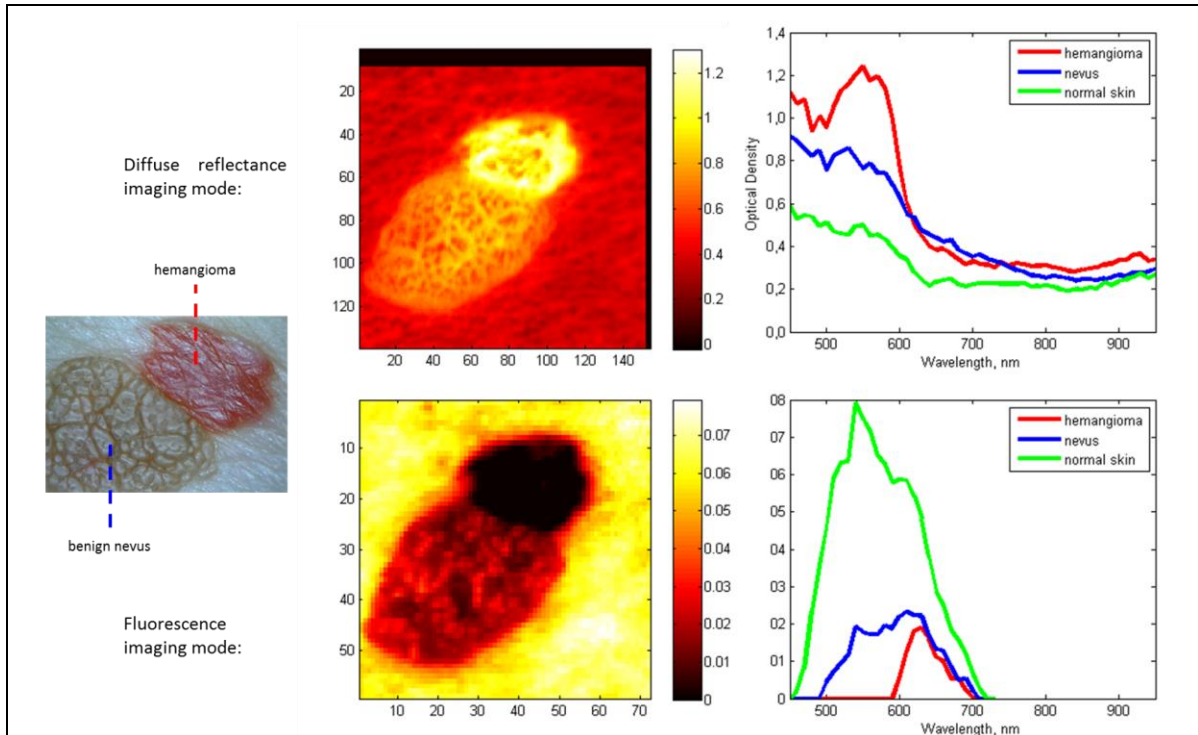


Figure 6. Diffuse reflectance and fluorescence imaging data analysis of **hemangioma** and **benign nevus**.

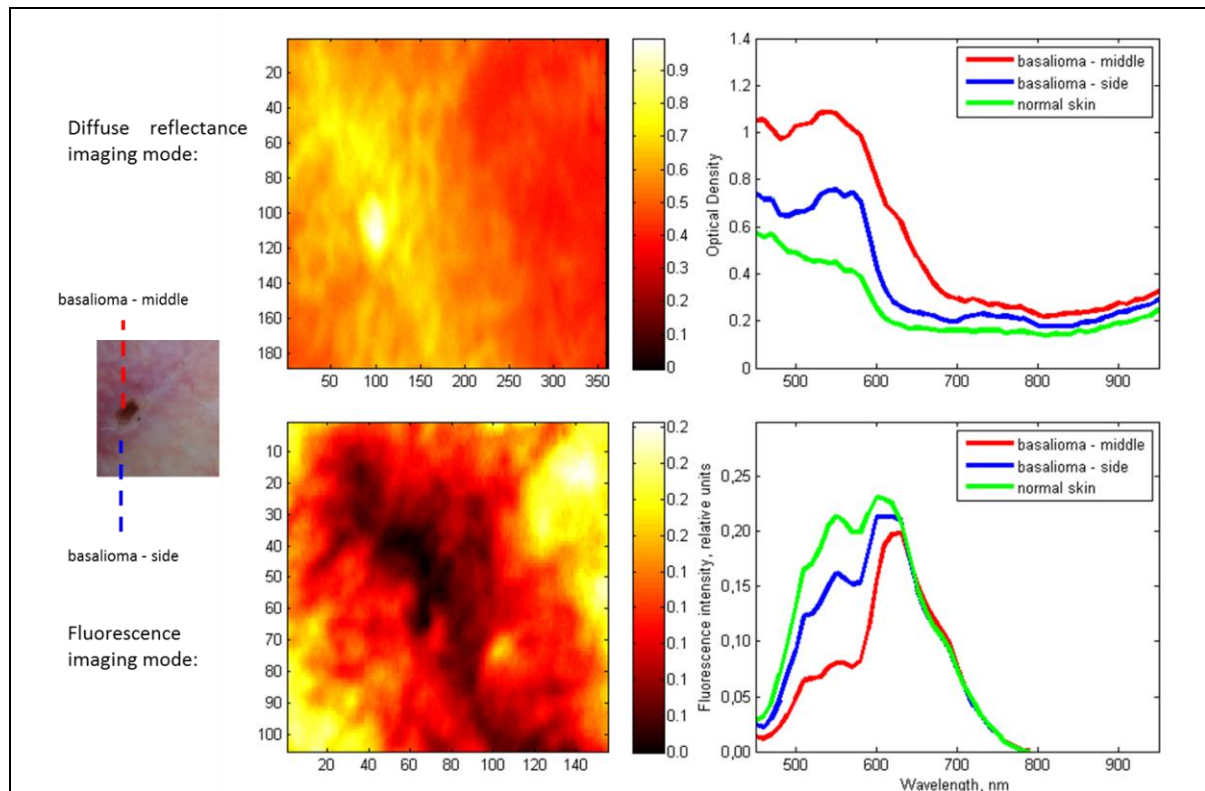


Figure 7. Diffuse reflectance and fluorescence imaging data analysis of **basalioma**.

DISCUSSION

Diffuse reflectance spectra of different skin lesions give information about the main chromophores that absorb light in the spectral range of 450-950 nm: hemoglobin and melanin. For benign nevi and halo nevus (Figures 4-6), reflectance spectra has the characteristics of melanin absorption spectrum – the average reflectance spectrum is steeper in the area of a pigmented lesion than in the area of normal skin, as there is an increased concentration of melanin in pigmented skin lesions like nevi. When looking at diffuse reflectance spectra of hemangioma and benign nevus (Figure 6), it is easy to see that the average spectrum of hemangioma shows the characteristic absorption maxima of hemoglobin at around 540 nm and 580 nm, comparing to the average reflectance spectrum of benign nevus and normal skin. Also, diffuse reflectance spectra of different parts of basilioma (Figure 7) show interesting results – both, the middle and side part of basilioma show an increased hemoglobin absorption, comparing to normal skin.

Characteristic absorption and emission data of skin fluorophores (Figure 1) suggest that when illuminating skin with 405 nm LEDs as was done in this study, main absorbing fluorophores would be Lipo-Pigments, Porphyrins and Flavins. Emission spectra of these fluorophores show that Lipo-Pigments emit light in the spectral range of 450-700 nm (with a maximum at 570 nm), Porphyrins emit light in the spectral range of 600-700 nm (with maxima at 630 nm and 670 nm), and Flavins emit light in the spectral range of 500-600 nm (with a maximum at 550 nm).

Results of this study show different skin autofluorescence spectra of different skin lesions that were analyzed. The average fluorescence spectra of the area of normal skin show similar patterns in all four analyzed cases: light is emitted in the spectral range of 450-700 nm that could be the autofluorescence of skin fluorophores Lipo-Pigments and Flavins. There is a decrease of detected fluorescence intensity in the regions of pigmented lesions, as expected. However, when looking at skin lesions with an increased hemoglobin concentration (hemangioma and basalioma, Figure 6-7), there is a significant decrease of fluorescence intensity in the spectral range of 500-600 nm, comparing the areas of pigmented lesion and normal skin. This is probably due to the increased hemoglobin absorption in this spectral range.

CONCLUSIONS

In this study, diffuse reflectance imaging and fluorescence imaging were combined in a multimodal solution and 4 different skin lesions were analyzed: benign nevus, halo nevus, hemangioma and basalioma. Diffuse reflectance and skin autofluorescence spectra of pigmented lesions and normal skin around the lesions were acquired and compared.

Results show differences in diffuse reflectance and fluorescence spectra due to different hemoglobin and melanin concentrations.

ACKNOWLEDGMENTS

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).

REFERENCES

- [1] Välisuo, P., Kaartinen, I., Tuchin, V., Alander, J., “New closed-form approximation for skin chromophore mapping,” *J. Biomed. Opt.* 16(4), 046012 (2011).
- [2] Jacques, S. L., Samatham, R., Choudhury, N., “Rapid spectral analysis for spectral imaging,” *Biomed. Opt. Express* 1(1), 157-164 (2010).
- [3] Monici, M., “Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications,” *Biotechnol. Annu. Rev.* 11, 227-256 (2005).
- [4] Alfano, R., Tata, D., Cordero, J., et al, “Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue,” *IEEE J. Quant. Electron.* 20(12), 1507-1511 (1984).