



Τίτλος εργασίας :

“Φασματοσκοπία Υπερύθρου και εφαρμογές της στην
οφθαλμολογία”

Τσιάπα Ειρήνη

Επιβλέπων Καθηγητής: Παπάζογλου Δημήτριος

Μάρτιος 2008



Τίτλος εργασίας :

**“Φασματοσκοπία Υπερύθρου και εφαρμογές της στην
οφθαλμολογία”**

Τσιάπα Ειρήνη

Επιβλέπων Καθηγητής: Παπάζογλου Δημήτριος

Η παρούσα εργασία υπεβλήθη ως μέρος των υποχρεώσεων για την απονομή του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Οπτική και Όραση» και παρουσιάστηκε στην Τριμελή Επιτροπή αποτελούμενη από τους:

1. ΔΗΜΗΤΡΙΟ ΠΑΠΑΖΟΓΛΟΥ
2. ΧΑΡΙΛΑΟ ΓΚΙΝΗ
3. ΝΙΚΟΛΑΟ ΚΑΤΣΑΡΑΚΗ

Μάρτιος 2008



Τα πειράματα στα πλαίσια της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκαν στο ΒΕΜΜΟ και στο Εργαστήριο Photonic, Phononic and Meta-materials" του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ (ΙΗΔΛ) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ).

Ευχαριστίες

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους αυτούς που στάθηκαν δίπλα μου και με βοήθησαν να ανταπεξέλθω στη προσπάθεια ολοκλήρωσης της εργασίας αυτής. Έτσι θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου, τους συνεργάτες και τους φίλους μου που με βοήθησαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτρη Παπάζογλου, που με την καθοδήγησή του και την ουσιαστική υποστήριξή του με βοήθησε να ολοκληρώσω την διπλωματική μου εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της ομάδας “Photonic, Phononic and Meta-materials” του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ (IHΔΛ) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) για την ευκαιρία που μου έχουν δώσει τόσο καιρό να συνεργάζομαι μαζί τους και την δυνατότητα που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω την εργασία μου στο εργαστήριο “Photonic, Phononic and Meta-materials”.

Νοιώθω όμως την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Νίκο Κατσαράκη για την εξαιρετική συνεργασία που έχουμε όλο αυτό το διάστημα και για την καθοδήγηση και στήριξη του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω, τον Γιώργο Κεσανάκη που ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει σε οποιοδήποτε πρόβλημα και αν αντιμετώπιζα.

Από το εργαστήριο του ΒΕΜΜΟ, θα ήθελα να ευχαριστήσω των κ. Χ. Γκίνη για την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της εργασίας μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ηρώ Πεντάρη για τις πολύτιμες πληροφορίες και τα δεδομένα που μου έδωσε σε ότι αφορά την ενυδάτωση του κερατοειδή.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους Δημήτρα Καλτσά, Ιωάννα Σακελλάρη, Ευτυχία Γκαβά, Κώστα Τερζάκη, Ιωάννη Ορφανό για την πολύτιμη ψυχολογική στήριξη που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υλική και ηθική στήριξη που μου παρείχε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια. Η αγάπη και η ευγνωμοσύνη μου θα είναι παντοτινή.

Abstract

A basic factor with major influence on the outcome of the refractive surgery using laser is the precise knowledge of the corneal hydration degree during the procedure. To our knowledge, no successful and safe way to estimate «in vivo» the corneal hydration during the procedure has been found until now.

The basic concept of this thesis, was the correlation of spectroscopic characteristics of corneal related with the hydration. Besides the qualitative correlation we also worked in the quantitative determination of hydration via experimental measurements in two narrow spectroscopic regions in the near IR. Using spectroscopic information obtained from 10 pork cornea samples and their correlation to absolute hydration measurements (accurate dry and wet tissue weight measurement) we achieved the absolute spectroscopic determination of the hydration with a ~ 2.5% accuracy.

The thesis is organised as follows:

Initially certain basic elements of structure and hydration of corneal are presented which will be studied spectroscopically. Then the basic principles of spectroscopy and the elucidation of the operation of Fourier Transform Spectrometry are described.

Afterwards, the process that was developed at the samples is illustrated. The qualitative and quantitative dependence of spectra of transmission by means of reflection and absorption of cornea concerning the hydration in the near Infra red region are analytically presented.

Περίληψη

Βασική παράμετρος για την επιτυχή έκβαση μιας διαθλαστικής επέμβασης με λέιζερ είναι η ακριβής γνώση του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδούς. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει μια τεχνική που μπορεί να μετρήσει «in vivo» την τιμή της ενυδάτωσης με ικανοποιητική ακρίβεια.

Βασικός στόχος της παρούσης εργασίας ήταν ο συσχετισμός φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών του κερατοειδή που σχετίζονται με την ενυδάτωση. Πέρα από τον ποιοτικό συσχετισμό προχωρήσαμε και στον ποσοτικό προσδιορισμό της ενυδάτωσης από μετρήσεις μέχρι και σε δύο φασματικές περιοχές μικρού εύρους στο εγγύς IR. Χρησιμοποιώντας τις φασματοσκοπικές πληροφορίες που προκύπτουν από την ανάλυσή μας η οποία έχει πραγματοποιηθεί σε 10 δείγματα κερατοειδών από χοίρειους οφθαλμούς και μέσω της συσχέτισης με τις μετρήσεις απόλυτης ενυδάτωσης (λόγος μάζα του κερατοειδή ως προς την απόλυτα αφυδατωμένη μάζα) επιτύχαμε τον απόλυτο φασματοσκοπικό προσδιορισμό της ενυδάτωσης με μια ακρίβεια ~ 2,5%.

Η εργασία είναι οργανωμένη ως εξής:

Αρχικά παρουσιάζονται κάποια βασικά στοιχεία της δομής και της ενυδάτωσης του κερατοειδή ο οποίος θα μελετηθεί φασματοσκοπικά. Έπειτα περιγράφονται οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας και εξηγείται η λειτουργία του φασματοφωτόμετρου με μετασχηματισμό Fourier.

Ακολουθεί η παρουσίαση της διαδικασίας που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Παρουσιάζεται αναλυτικά η ποιοτική και ποσοτική εξάρτηση των φασμάτων διαπερατότητας, ανάκλασης και απορρόφησης του κερατοειδή σε σχέση με την ενυδάτωση στην περιοχή του εγγύς Υπερύθρου.

Περιεχόμενα

| | |
|--------------------|-----------|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 4 |
| ABSTRACT | 5 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 6 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 10 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΗ

| | |
|--|----|
| 1.1 Ιστολογική δομή του κερατοειδή | 11 |
| 1.1.1 Η προκερατοειδική δακρυϊκή στιβάδα | 12 |
| 1.1.2 Το επιθήλιο | 12 |
| 1.1.3 Η βασική μεμβράνη | 13 |
| 1.1.4 Η μεμβράνη του Bowman | 13 |
| 1.1.5 Στρώμα ή ίδια ουσία | 14 |
| 1.1.6 Η δεσκεμέτιος μεμβράνη | 14 |
| 1.1.7 Το ενδοθήλιο | 15 |
| 1.2 Ενυδάτωση του κερατοειδούς χιτώνα | 15 |
| 1.2.1 Ανατομικοί παράγοντες | 15 |
| 1.2.2 Διαρκή σχετική αφυδάτωση του κερατοειδή | 17 |
| 1.3 Ενυδάτωση κερατοειδή κατά την διαδικασία διαθλαστικής | 18 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΟΠΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΙΣΤΩΝ

| | |
|------------------------------------|----|
| 2.1 Εισαγωγή | 19 |
| 2.2 Οπτικές Ιδιότητες Ιστών | 21 |
| 2.2.1 Απορρόφηση | 21 |
| 2.2.2 Σκέδαση | 22 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 2.3 | Προσδιορισμός Αλληλεπίδρασης Η/Μ ακτινοβολίας με την ύλη | 23 |
| 2.3.1 | Συντελεστής Απορρόφησης | 23 |
| 2.3.2 | Συντελεστής Σκέδασης | 24 |
| 2.3.3 | Βάθος Δείσδυσης | 25 |
| 2.3.4 | Ολικός Συντελεστής Εξασθένησης | 25 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ (InfraRed spectroscopy, IR)

| | | |
|--------------|--|----|
| 3.1 | Εισαγωγή | 26 |
| 3.2 | Βασικές αρχές της φασματοσκοπίας | 28 |
| 3.3 | Δονητική Φασματοσκοπία | 29 |
| 3.4 | Δονήσεις Τάσεις | 30 |
| 3.5 | Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform – InfraRed spectroscopy, FT-IR) | 31 |
| 3.5.1 | Η αρχή λειτουργίας του συμβολόμετρου Michelson | 32 |
| 3.5.2 | Δυνατότητες και Πλεονεκτήματα Φασματοφωτόμετρου FT-IR | 35 |
| 3.6 | Φασματοσκοπική μελέτη της ενυδάτωσης του κερατοειδή | 37 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

| | | |
|------------|---|----|
| 4.1 | Σκοπός μελέτης | 38 |
| 4.2 | Πειραματική Διάταξη | 38 |
| | ▪ Πηγές Φωτός | 40 |
| | ▪ Σφαίρα Ολοκλήρωσης | 40 |
| | ▪ Οπτικά Μεταφοράς | 41 |
| | ▪ Ανιχνευτές | 41 |
| | ▪ Μετασχηματισμός Fourier | 42 |
| 4.3 | Περιγραφή διαδικασίας λήψης των μετρήσεων | 43 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

| | |
|---|----|
| 5.1 Εισαγωγή | 46 |
| 5.2 Φάσματα Διέλευσης, Ανάκλασης και Απορρόφησης | 46 |
| 5.3 Ποιοτική Ανάλυση των Φασμάτων Διέλευσης | 54 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

| | |
|----------------------------|-----------|
| ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 65 |
|----------------------------|-----------|

| | |
|--------------------------------|-----------|
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ | 67 |
|--------------------------------|-----------|



Εισαγωγή

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε ο παράγοντας του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδούς, ο οποίος συμβάλλει στην επιτυχή έκβαση της διαθλαστικής χειρουργικής. Σημαντικές διαφοροποιήσεις του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδή από την μέση τιμή ενυδάτωσης, έχουν ως αποτέλεσμα την υποδιόρθωση ή υπερδιόρθωση του διαθλαστικού σφάλματος. Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποια ασφαλής και αποτελεσματική μέθοδος ελέγχου του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδή.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν τα φάσματα διέλευσης, ανάκλασης και απορρόφησης του κερατοειδή στην περιοχή του εγγύς Υπερύθρου. Επίσης, μελετήθηκε η μεταβολή του φάσματος διαπερατότητας του κερατοειδή σε σχέση με την ενυδάτωση.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την χρήση φασματοφωτόμετρου υπερύθρου της εταιρείας Bruker (IFS 66v/S) με την προσθήκη του εξαρτήματος A 562-G, το οποίο φέρει σφαίρα ολοκλήρωσης διαμέτρου 75mm. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα κερατοειδείς από οφθαλμούς χοιρινών.

Κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης εξήχθησαν σημαντικά αποτελέσματα που αφορούν την συσχέτιση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών με το βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδούς.

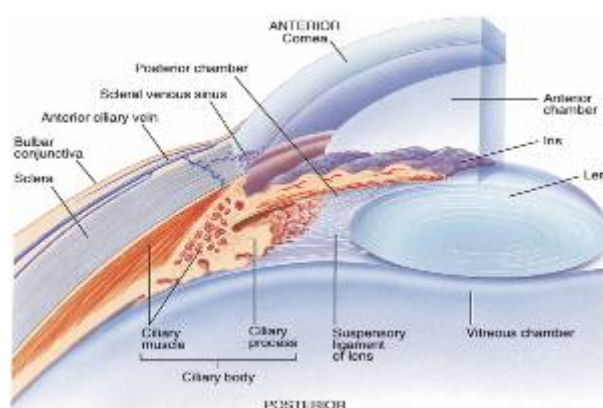
Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, πιστεύεται ότι είναι σκόπιμη, η περαιτέρω διερεύνηση των φασμάτων διαπερατότητας του κερατοειδούς στο εγγύς Υπέρυθρο, με απώτερο σκοπό την κατασκευή συστήματος εκτίμησης της ενυδάτωσης του κερατοειδή *in vivo*.

Κεφάλαιο 1^ο

Ανατομία Κερατοειδή

1.1 Ιστολογική δομή του κερατοειδή

Ο κερατοειδής χιτώνας καταλαμβάνει το πρόσθιο και διαφανές τμήμα του ινώδη χιτώνα του οφθαλμικού βολβού και αποτελεί το κυριότερο διαθλαστικό μέσο του οπτικού συστήματος του οφθαλμού. Η διαθλαστική του ισχύς ανέρχεται περίπου σε 45 διοπτρίες και η διαφάνειά του επιτρέπει την διόδο εντός του οφθαλμού των φωτεινών ακτίνων που προέρχονται από τα διάφορα αντικείμενα του περιβάλλοντος χώρου, για να ερεθίσουν τον αμφιβληστροειδή. Είναι κυρτός, διαυγής και διάφανος ιστός, με διάμετρο 12mm. Παρέχει το 65% της συνολικής οπτικής ισχύς του οφθαλμού η οποία κατανέμεται κυρίως στο κεντρικό κομμάτι του κερατοειδή το οποίο είναι περισσότερο καμπύλο. Το πάχος του κερατοειδή *in vivo* είναι κατά προσέγγιση 550μm ενώ στην περιφέρεια το πάχος αυτού αυξάνεται και φτάνει τα 650μm έως και 1000μm περίπου, καθιστώντας αυτόν ιδιαίτερα διαθλαστικό.



Σχήμα 1.1 Σχηματική αναπαράσταση της δομής του κερατοειδή.

Για να εκπληρώσει ο κερατοειδής τον φυσικό του ρόλο για τον οποίο έχει κατασκευαστεί πρέπει να παραμένει πάντα διαφανής. Ο κυριότερος παράγοντας που συμβάλλει στη διαφάνεια του κερατοειδή είναι η ομοιόμορφη και κανονική διάταξη των ελασμάτων του στρώματος, αλλά και των κολλαγόνων ινιδίων που τα αποτελούν, καθώς και η ύπαρξη μικρού αριθμού κυττάρων στο στρώμα. Στη φυσιολογική του κατάσταση είναι διαφανής και αποτελείται από πέντε στοιβάδες.

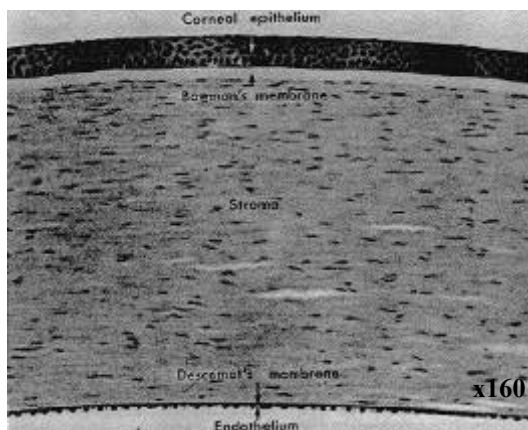
Ο κερατοειδής, λειτουργεί ως ένα κυρτό δίοπτρο. Ο φυσιολογικός κερατοειδής είναι πιο κρημνώδης στο κέντρο, ενώ επιπεδώνεται προχωρώντας στην περιφέρεια εξασφαλίζοντας ελαχιστοποίηση των σφαιρικών εκτροπών. Επίσης, μικρές μεταβολές στην καμπυλότητα του επιφέρουν σημαντικές αλλαγές στη διαθλαστική του ισχύ. Για το λόγο αυτό, τις τελευταίες δεκαετίες μεγάλο ενδιαφέρον έχει εστιαστεί στη διόρθωση των διαθλαστικών ανωμαλιών του οφθαλμού, με χειρουργική τροποποίηση της κυρτότητας της πρόσθιας επιφάνειας του κερατοειδή.

1.1.1 Η προκερατοειδική δακρυϊκή στιβάδα

Η προκερατοειδική δακρυϊκή στοιβάδα έχει πάχος από 0,02 έως 0,04 μm . Αποτελείται από τρεις υποστιβάδες, ένα πρόσθιο λεπτό λιπιδικό στρώμα και ένα ενδιάμεσο υδατικό. Επίσης, περιέχει ένα εσωτερικό βλεννώδες του οποίου τα συστατικά βρίσκονται σε χαλαρή σύνδεση με τα στοιχεία του γλυκοκάλυκα των επιθηλιακών κυττάρων (σακχαρικές ομάδες συνδεδεμένες με τμήματα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών) και των κυττάρων του επιπεφυκότα. Μερικές από τις βασικές λειτουργίες της δακρυϊκής στιβάδας είναι η ενυδάτωση των βλεφάρων και η δημιουργία ομαλής επιφάνειας στην εξωτερική πλευρά του κερατοειδή. Καθώς επίσης, η παροχή αντιβακτηριακής προστασίας της επιφάνειας και διατροφή του επιθηλίου του κερατοειδή.

1.1.2 Το επιθήλιο

Το επιθήλιο αποτελείται από 5-7 στρώσεις επιθηλιακών κυττάρων. Στην περιφέρεια έχει πάχος 80 μm και φτάνει τις 10 στοιβάδες, αντίστοιχα προς το σκληροκερατοειδές όριο, όπου μεταπίπτει στο επιθήλιο του επιπεφυκότα. Τα κύτταρα στη βάση του επιθηλίου έχουν κυλινδρικό σχήμα ενώ τα επιφανειακά είναι πεπλατυσμένα. Σε περίπτωση τραυματισμού του κερατοειδούς, σκοπός τους είναι η γρήγορη αναπαραγωγή τους, η οποία πραγματοποιείται κυρίως στην περιφέρεια του κερατοειδή και συγκεκριμένα στο σκληροκερατοειδικό όριο.



Σχήμα 1.2 Ιστολογική δομή του κερατοειδή από οπτικό μικροσκόπιο¹.

Σε περίπτωση ισχυρού τραυματισμού δημιουργούνται αδιαφανείς περιοχές στον κερατοειδή, αναγκάζοντάς αυτόν να χάσει την σαφήνιά του. Επιπλέον εμποδίζει τη μετάβαση κάποιου ξένου υλικού στο μάτι και στα άλλα στρώματα του κερατοειδή και παρέχει μια ομαλή επιφάνεια που απορροφά το οξυγόνο και άλλες αναγκαίες θρεπτικές ουσίες των κυττάρων.

1.1.3 Η βασική μεμβράνη

Η βασική μεμβράνη αποτελεί ξεχωριστή δομή του κερατοειδούς και είναι τοποθετημένη μεταξύ της βασικής στοιβάδας των επιθηλιακών κυττάρων και της μεμβράνης του Bowman. Εκκρίνεται από ειδικά κύτταρα της βασικής στιβάδας και σχηματίζει φραγμό που απομονώνει τις διαταραχές του κερατοειδούς από το υποκείμενο στρώμα. Αποτελείται από ίνες κολλαγόνου τύπου IV και εμφανίζει δυο ζώνες. Την πρόσθια ανοιχτόχρωμη ζώνη που αποτελείται από την λιπιδική στιβάδα με κοκκώδη εμφάνιση και την οπίσθια πυκνή ζώνη αποτελούμενη από ένα δίκτυο ινών.

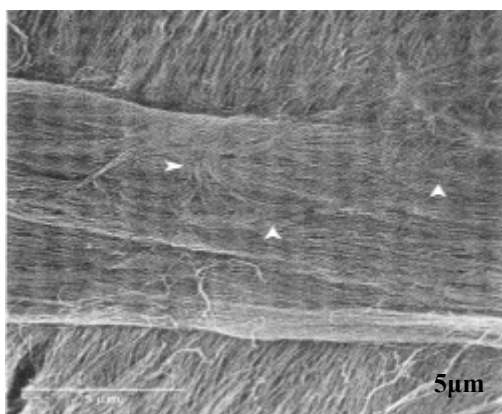
1.1.4 Η μεμβράνη του Bowman

Η μεμβράνη αυτή είναι μία ξεχωριστή στιβάδα του κερατοειδή, αλλά ουσιαστικά είναι συνέχεια του στρώματος στο οποίο μεταπίπτει χωρίς να είναι δυνατόν να την αποχωρίσουμε από αυτό. Είναι ακυτταρική, πάχους 8-12 μm και αποτελείται από κολλαγόνο και θεμελιώδης ουσία. Η πρόσθια επιφάνεια της μεμβράνης του Bowman είναι λεία και ομαλή, σε αντίθεση με την οπίσθια, η οποία είναι ασαφής και συγχέεται με

το δίκτυο των κολλαγόνων ινιδίων του πρόσθιου στρώματος. Η μεμβράνη του Bowman συμμετέχει ενεργά στη στερεότητα και στην αντοχή του κερατοειδή.

1.1.5 Στρώμα ή ίδια ουσία

Στη συνέχεια υπάρχει το στρώμα του κερατοειδή το οποίο αντιπροσωπεύει περίπου το 90% του συνολικού πάχους του κερατοειδή. Σχηματίζεται από ελάσματα κολλαγόνων ινιδίων, κύτταρα και θεμέλιο ουσία. Τα ελάσματα από κολλαγόνο επικάθονται το ένα επί του άλλου και διατάσσονται παράλληλα τόσο μεταξύ τους όσο και προς την επιφάνεια του κερατοειδή. Κάθε έλασμα αποτελείται από κολλαγόνα ινίδια, που περιβάλλονται από θεμέλια ουσία. Τα κολλαγόνα ινίδια είναι παράλληλα μεταξύ τους και αρμονικά διατεταγμένα. Η διάταξη αυτή αποτελεί την κύρια αιτία της διαφάνειας του κερατοειδούς. Η θεμέλιος ουσία, η οποία συμπληρώνει τον χώρο μεταξύ των ινιδίων του κολλαγόνου, αποτελείται από πρωτεογλυκάνες και γλυκοζαμινογλυκάνες.



Σχήμα 1.3 Ιστολογική δομή ινών κολλαγόνου του στρώματος από οπτικό μικροσκόπιο².

1.1.6 Η δεσκεμέτιος μεμβράνη

Η δεσκεμέτιος μεμβράνη αποτελεί τη βασική μεμβράνη του ενδοθηλίου και παράγεται εν μέρει ή πιθανώς εξ ολοκλήρου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατά τη γέννηση έχει πάχος 4μ, στον ενήλικα δε φθάνει τα 10μ. Είναι ομοιογενής μεμβράνη η οποία εύκολα μπορεί να αποχωριστεί από το στρώμα και το ενδοθήλιο. Αποτελείται από λεπτά κολλαγόνα ινίδια, με ομοιόμορφη κατανομή, διαφορετικά όμως από αυτά του στρώματος.

1.1.7 Το ενδοθήλιο

Τελευταία στοιβάδα του κερατοειδούς είναι το ενδοθήλιο που αποτελείται από μία μονοκυτταρική στρώση εξαγωνικών κυττάρων, πλούσια σε μιτοχόνδριο τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στην μεταφορά υγρού από τον κερατοειδή προς τον πρόσθιο θάλαμο και στην διατήρηση του κερατοειδή, ελαφρώς αφυδατωμένο, γεγονός που απαιτείται για την οπτική διαύγεια.

Επίσης, εξασφαλίζει την πυκνή διάταξη των ιών κολλαγόνου του στρώματος. Σε περίπτωση ανεπάρκειας του ενδοθηλίου να επιτελέσει αυτή τη λειτουργία η μέση απόσταση μεταξύ των ιών του κολλαγόνου αυξάνει (οίδημα), με αποτέλεσμα τη σκέδαση και την απώλεια της διαύγειας του κερατοειδή.

Η άμεση επαφή του ενδοθηλίου με το υδατοειδές υγρό καθώς και ύπαρξη στα κύτταρά του οργανιδίων χαρακτηριστικών για κύτταρα που παίρνουν μέρος σε ενεργητική μεταφορά και πρωτεϊνική σύνθεση για έκκριση, το καθιστούν εξαιρετικής λειτουργικής σπουδαιότητας ιστό για τον μεταβολισμό του κερατοειδούς καθώς και τη διατήρηση της διαφάνειας αυτού.

1.2 Ενυδάτωση του κερατοειδούς χιτώνα

Για να εκπληρώσει ο κερατοειδής το φυσιολογικό ρόλο για τον οποίο έχει κατασκευαστεί πρέπει να παραμένει πάντα διαφανής στην ορατή ακτινοβολία. Ο κερατοειδής, το υδατοειδές υγρό και ο φακός έχουν τις ίδιες οπτικές ιδιότητες. Η διαφάνεια του κερατοειδή οφείλεται στους παρακάτω παράγοντες:

1.2.1 Ανατομικοί παράγοντες

Λόγω της ομοιόμορφης και παράλληλης διάταξης των δομικών στοιχείων του κερατοειδούς αποφεύγονται φαινόμενα σκέδασης και καθιστούν τον κερατοειδή διαυγή στην ορατή ακτινοβολία. Διότι, εξασφαλίζεται η μέση απόσταση³ μεταξύ των δομικών στοιχείων του στρώματος η οποία είναι πολύ μικρότερη από το μήκος κύματος του ορατού φωτός που διαδίδεται σε αυτά.

Η ύπαρξη στερεών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς δεν επιτρέπει την είσοδο υγρού από την πρόσθια επιφάνεια του κερατοειδή. Ενώ η κανονική διάταξη και ακεραιότητα του ενδοθηλίου του κερατοειδή εμποδίζουν την υπερβολική διέλευση υδατοειδούς υγρού εντός του στρώματος.

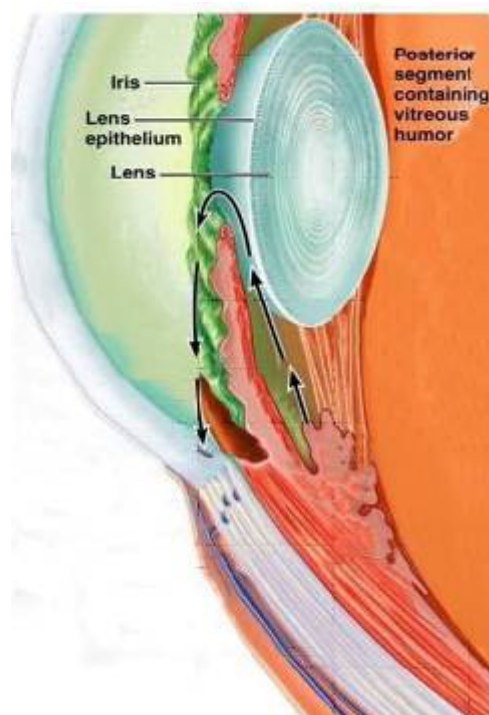
Οι υβριδικές ινώδεις δομές κολλαγόνου του κερατοειδή είναι μίγμα από μόρια κολλαγόνου τύπου I, III και V. Αυτοί οι τύποι κολλαγόνου διαφέρουν μεταξύ τους στο αμινοξύ και καθορίζουν το μέγεθος των δομών ινών κολλαγόνου καθώς και το κατά πόσο μπορούν οι δομές αυτές να αυξηθούν πλευρικά⁴. Επιπλέον ο κερατοειδής περιέχει σε μεγάλο ποσοστό κολλαγόνο τύπου IV, το οποίο διαμορφώνει διάφορες δομές, όπου ο ρόλος τους είναι καθοριστικός στην τροποποίηση της δομής και της λειτουργίας των ινών κολλαγόνου.

Στον κερατοειδή την αντοχή στην συμπίεση και την πλήρωση των χώρων ανάμεσα στα κύτταρα, εξυπηρετεί μια εντελώς διαφορετική ομάδα μακρομορίων του στρώματος, οι πρωτεογλυκάνες. Οι πρωτεογλυκάνες είναι υβριδικά μακρομόρια τα οποία αποτελούνται από έναν πρωτεϊνικό πυρήνα, όπου συνδέονται με τα μόρια μίας ειδικής κατηγορίας πολύπλοκων, αρνητικά φορτισμένων πολυσακχαριτών, γνωστών ως γλυκοζαμινογλυκάνες. Οι γλυκοζαμινογλυκάνες είναι πολύ υδρόφιλες και εκπτώσσονται πολύ, με συνέπεια να καταλαμβάνουν τεράστιο όγκο σε σχέση με την μάζα τους. Αυτό δημιουργεί μια πίεση διόγκωσης, η οποία αντισταθμίζεται από την τάση των ινών του κολλαγόνου που διαπλέκονται με τις πρωτεογλυκάνες.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων πρωτεογλυκάνης και του κολλαγόνου έχει ρόλο κλειδί στην δημιουργία ινών κολλαγόνου, στην οργάνωση αυτών και τελικά στην διαφάνεια του κερατοειδή. Η οποιαδήποτε τροποποίηση στα μόρια της πρωτεογλυκάνης συνδέεται με την απώλεια της κερατοειδούς διαφάνειας.

1.2.2 Διαρκή σχετική αφυδάτωση του κερατοειδή

Ο κύριος παράγοντας που συμβάλλει στην σχετική αφυδάτωση του στρώματος του κερατοειδή είναι η λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η κερατοειδής διαφάνεια αντιστοιχεί σε νερό περιεκτικότητας 75-78% κατά βάρος, το οποίο είναι ασθενώς δέσμιο στην εξωκυττάρια ουσία με δεσμούς υδρογόνου. Υγρό από τον πρόσθιο θάλαμο εισέρχεται στο στρώμα δια μέσου του ατελούς φραγμού του ενδοθηλίου του κερατοειδούς. Η δύναμη η οποία προκαλεί την μετακίνηση του υγρού ονομάζεται πίεση διαπότισης και είναι η συνισταμένη της ενδοφθάλμιας πίεσης και της οσμωτικής πίεσης του στρώματος του κερατοειδή



Σχήμα 1.4 Αναπαράσταση διαρκούς σχετικής αφυδάτωσης κερατοειδή.

Η λειτουργία της «αντλίας» του ενδοθηλίου που προκαλεί μετακίνηση υγρού από το στρώμα προς τον πρόσθιο θάλαμο, με τελική δυναμική κατάσταση ισορροπίας την σχετική αφυδάτωση του κερατοειδούς. Τα εν λόγω κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική υδάτωση και θρέψη του κερατοειδούς δρώντας αφενός σαν φραγμός, εμποδίζοντας την υπερβολική είσοδο του υδατοειδούς υγρού στο στρώμα και αφετέρου σαν αντλία ύδατος με τη βοήθεια ενεργού μηχανισμού μεταφοράς ιόντων.

Ο πιο πάνω μηχανισμός «αντλίας» του ενδοθηλίου απαιτεί ενέργεια. Την ενέργεια αυτή παρέχουν τα μιτοχόνδρια του κυτταροπλάσματος των ενδοθηλιακών κυττάρων υπό μορφή ATP που προέρχεται από τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Ο μηχανισμός αυτός συνίσταται στην ενεργητική μεταφορά ιόντων από το στρώμα προς το υδατοειδές υγρό με τη βοήθεια ένζυμων που βρίσκονται στις πλάγιες μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ιόντα αυτά είναι κυρίως το Na^+ που βρίσκεται σε μεγάλη πυκνότητα στο στρώμα και το HCO_3^- που παράγεται μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα με την δράση ενός άλλου ένζυμου της καρβονικής ανυδράσης. Η αυξημένη λοιπών

συγκέντρωση ιόντων Na^+ και HCO_3^- στο υδατοειδές υγρό λόγω της δράσης των ΑΤΡασών, προκαλεί παθητική μεταφορά ύδατος προς τον πρόσθιο θάλαμο.

1.3 Ενυδάτωση κερατοειδή κατά την διαδικασία διαθλαστικής χειρουργικής

Ένας από τους βασικούς παράγοντας που μπορεί να διαφοροποιήσει τον ρυθμό φωτοαποδόμησης του κερατοειδή, κατά την διάρκεια της διαθλαστικής επέμβασης είναι η ενυδάτωση του κερατοειδή⁵. Διότι, μπορεί να επιφέρει μη επιθυμητά αποτελέσματα κατά την διόρθωση των διαθλαστικών σφαλμάτων. Οι Lin et al. (1995) αναφέρουν ότι υγροί κερατοειδικοί ιστοί αποδομούνται λιγότερο από ότι οι στεγνοί⁴, με αποτέλεσμα ιστός πλούσιος σε νερό να απόδομείται σε πολύ μικρότερο βαθμό από έναν ιστό σχετικά αφυδατωμένο.

Έχει αναφερθεί (Dougherty et al. 1994, McDonald & Chitkara, 1998) ότι αλλαγές στην ενυδάτωση του κερατοειδή μπορεί να επιφέρουν ένα σφάλμα της τάξης του 10-15% κατά την διόρθωση του διαθλαστικού σφάλματος⁵. Πιο συγκεκριμένα αφυδατωμένος ιστός ο οποίος αποδομείται περισσότερο από το προβλεπόμενο, υπερδιορθώνεται, ενώ υπερενυδατωμένος ιστός λόγω της λιγότερης αποδόμησης από το επιθυμητό υποδιορθώνεται, με αποτέλεσμα και στις 2 περιπτώσεις ο ασθενής να μην έχει την καλύτερη δυνατή διόρθωση.

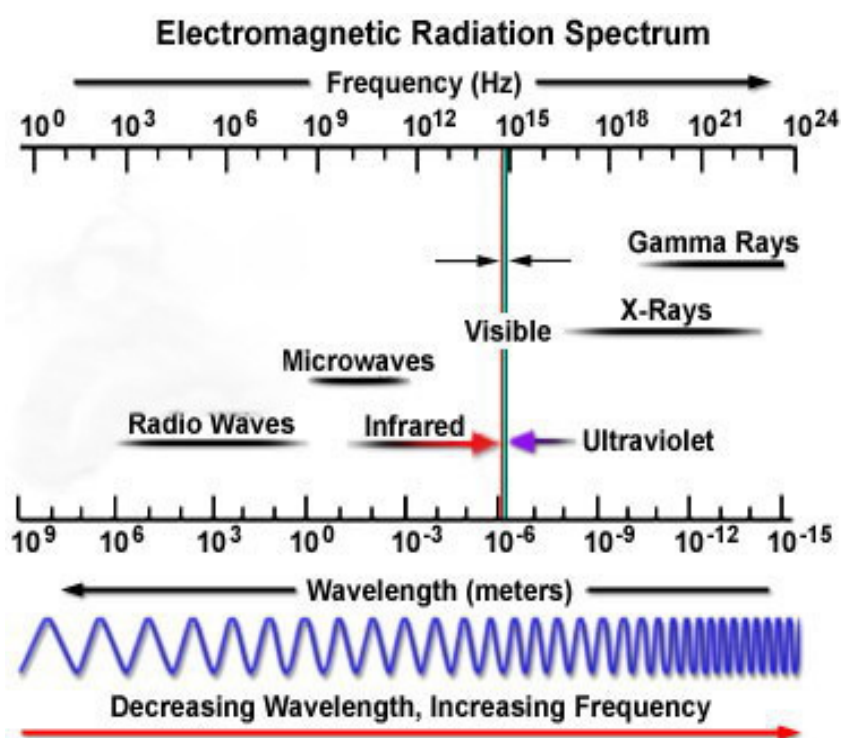
Κατά την διάρκεια της επέμβασης το πάχος του κερατοειδή μπορεί να αυξηθεί ακόμα και 50% λόγω διαφοροποιήσεων στο βαθμό ενυδάτωσης του. Αυτή η αύξηση του πάχους του κερατοειδούς κατά την διάρκεια της επέμβασης μπορεί να προκαλέσει προβλήματα, καθώς μετά το πέρας της επέμβασης και της αλλαγής της καμπυλότητας του κερατοειδούς, ο κερατοειδής επανέρχεται στο φυσιολογικό του πάχος λόγω της φυσιολογικής πλέον ενυδάτωσης αλλά το αποτέλεσμα από την αλλαγή της καμπυλότητας του, είναι αρκετά διαφορετικό από το προβλεπόμενο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάγκη για διαφορετική αντιμετώπιση και ακτινοβόληση του κερατοειδή από αυτή που είχε αρχικά σχεδιαστεί, για την σωστή διόρθωση του διαθλαστικού σφάλματος. Κρίνεται λοιπόν αναγκαία, η γνώση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς κατά την διάρκεια της επέμβασης διαθλαστικής χειρουργικής.

Κεφάλαιο 2^ο

Οπτικές Ιδιότητες Ιστών

2.1 Εισαγωγή

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ταξινομείται, ανάλογα με την συχνότητα ή το μήκος κύματος, στις ραδιοσυχνότητες, τα μικροκύματα, την υπέρυθρη ακτινοβολία, το ορατό, το υπεριώδες και τις ακτίνες X και γ.



Σχήμα 2.1 Το Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Σαν κυματικό φαινόμενο, η διάδοση του φωτός περιγράφεται από το μήκος κύματος (λ) και τη συχνότητα (f) της ακτινοβολίας. Τα μεγέθη αυτά συνδέονται με τη σχέση:

$$c = \lambda \cdot f$$

όπου $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{sec}^{-1}$ είναι η ταχύτητα του φωτός στο κενό.

Ακολουθώντας ένα γενικευμένο ορισμό, μπορούμε να πούμε ότι η “οπτική” ακτινοβολία είναι εκείνη η περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που βρίσκεται μεταξύ των ακτινών Χ και των μικροκυμάτων και υποδιαιρείται σε τρεις κύριες περιοχές. Η πρώτη εξ αυτών είναι η περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV, από 185 έως 400 nm), γειτονική προς τις ακτίνες Χ. Η δεύτερη περιοχή είναι η ορατή (από 400 έως 700 nm) όπου και ο ανθρώπινος οφθαλμός είναι ευαίσθητος, ενώ η τρίτη και τελευταία περιοχή της οπτικής ακτινοβολίας είναι η περιοχή των υπερώθρων (IR, από 700 έως 10.600 nm), γειτονική στα μικροκύματα.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης της φωτεινής ακτινοβολίας στους ιστούς αποτελεί το κεντρικό πρόβλημα των περισσότερων ιατρικών και βιοϊατρικών εφαρμογών των lasers. Οι πιθανές αλληλεπιδράσεις της ακτινοβολίας με τον ιστό μπορεί να είναι οι ακόλουθες.

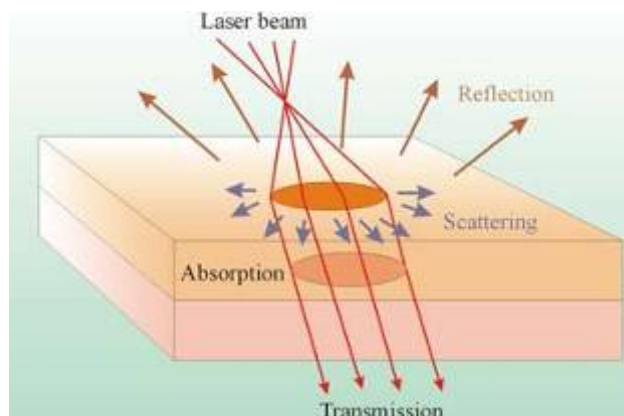
- **Ανάκλαση.** Η ακτινοβολία δύναται να υποστεί ανάκλαση από την επιφάνεια του ιστού. Συνήθως, όμως, το ποσοστό της δέσμης που ανακλάται κυμαίνεται στο 3 ~ 5% της ακτινοβολίας, γεγονός που οφείλεται, κυρίως, στην διαφορά των δεικτών διάθλασης του αέρα και του ιστού.
- **Απορρόφηση.** Ένα μέρος της ακτινοβολίας που διέρχεται από τον ιστό απορροφάται από αυτόν.
- **Σκέδαση.** Ένα μέρος της ακτινοβολίας που διέρχεται από τον ιστό σκεδάζεται χωρίς τελικά να απορροφηθεί. Η σκέδαση μπορεί να είναι απλή (μία σκέδαση ανα φωτόνιο) ή πολλαπλή (πολλές σκεδάσεις ανά φωτόνιο).
- **Διάδοση.** Ένα μέρος της ακτινοβολίας διέρχεται τελικά από τον ιστό

Το ποσοστό της ακτινοβολίας που ανακλάται, σκεδάζεται, απορροφάται ή διέρχεται από τον ιστό εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και από τις οπτικές ιδιότητες του ιστού. Η ακτινοβολία που απορροφάται από τον ιστό μπορεί να προκαλέσει τη θέρμανσή του, φωτοχημικές αντιδράσεις ή/και εκπομπή φθορισμού.

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης της οπτικής ακτινοβολίας σε βιολογικούς μαλακούς ιστούς είναι ιδιαίτερα σημαντική για μία σειρά ιατρικών εφαρμογών, που σχετίζονται τόσο με διαγνωστικές τεχνικές, όσο και με θεραπευτικές αγωγές. Για τη μελέτη αυτή είναι απαραίτητη η γνώση ή ο προσδιορισμός των οπτικών ιδιοτήτων των ιστών, που περιγράφουν τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης της φωτεινής ακτινοβολίας με τον ιστό.

2.2 Οπτικές Ιδιότητες Ιστών

Τόσο η σκέδαση, όσο και η απορρόφηση, είναι εξαιρετικά σημαντικές παράμετροι για την περιγραφή των οπτικών ιδιοτήτων ενός ιστού, ως κυρίαρχος μηχανισμός λαμβάνεται η σκέδαση [Cheong, 1990]. Ακόμη και για λεπτά, με πάχος κάτω από ένα χιλιοστό, τμήματα ιστού, τα διερχόμενα φωτόνια είναι πολύ πιθανό να υποστούν σκέδαση αρκετές φορές, μέχρι να φτάσουν στο σύνορο του ιστού.



Σχήμα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση αλληλεπίδραση ιστού- ακτινοβολίας⁷.

2.2.1 Απορρόφηση

Η απορρόφηση μετρείται από τον λόγο της απορροφούμενης προς την προσπίπτουσα ένταση ακτινοβολίας. Τελικό αποτέλεσμα αυτής της απορρόφησης είναι, κυρίως, η μερική μετατροπή της ενέργειας του φωτός σε θερμική κίνηση ή σε συγκεκριμένες δονήσεις των μορίων του μέσου απορρόφησης. Στους βιολογικούς ιστούς, η απορρόφηση συμβαίνει κυρίως λόγω της παρουσίας των μορίων νερού ή διαφόρων μακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι χρωστικές.

Σε εφαρμογές βιοϊατρικής οπτικής η απορρόφηση των φωτονίων αποτελεί μία πολύ σημαντική ιδιότητα των ιστών, για δύο κυρίως λόγους. Ο πρώτος εξ αυτών συνίσταται στο γεγονός ότι μέσω της απορρόφησης ένα laser, ή κάποια άλλη πηγή φωτός, δύναται να προκαλέσει μία δυναμική θεραπευτική (ή καταστροφική) επίδραση σε κάποιον ιστό. Χωρίς βέβαια την απορρόφηση δεν υφίσταται μεταφορά ενέργειας στον ιστό κι έτσι μένει ανεπηρέαστος από το φως. Από την άλλη, η απορρόφηση του φωτός διαθέτει και διαγνωστικό ρόλο, γεγονός που αξιοποιείται στην φασματοσκοπία των ιστών. Επίσης, με την απορρόφηση παρέχεται μία πληροφορία για την χημική

σύσταση ενός ιστού και λειτουργεί ως μηχανισμός οπτικής αντίθεσης (optical contrast) κατά τη διαδικασία απεικονιστικών μεθόδων.

2.2.2 Σκέδαση

Κατά την διάδοση της Η/Μ ακτινοβολίας μέσα από τα οπτικά στοιχεία του οφθαλμού, η Η/Μ ακτινοβολία αλληλεπιδρά με ανατομικά χαρακτηριστικά των δομών του. Η αλληλεπίδραση της με κύτταρα και κυτταρικές δομές, που έχουν διαστάσεις συγκρίσιμες ή ακόμα και μεγαλύτερες από το μήκος κύματος, προκαλεί την σκέδαση της. Οι δύο κύριες πηγές σκέδασης στο ανθρώπινο οφθαλμό, είναι ο κερατοειδής και ο κρυσταλλοειδής φακός. Ο κερατοειδής είναι ένας επίσης διάφανος ιστός, που καλύπτει το εμπρόσθιο τμήμα του ανθρώπινου οφθαλμού. Έχει ρόλο προστατευτικό, εμποδίζοντας την είσοδο σκόνης, μικροβίων και άλλων επιβλαβών στοιχείων στο εσωτερικό του ματιού, ενώ αποτελεί το πρώτο και ισχυρότερο οπτικό στοιχείο του ανθρώπινου οφθαλμού.

Σκέδαση είναι η απόκλιση της πορείας των φωτονίων από την ευθύγραμμη τροχιά, λόγω ανομοιογενειών του μέσου στο οποίο διαδίδονται. Κατά την διάρκειά της, βάσει της κβαντικής εικόνας, το φωτόνιο απορροφάται από τον σκεδαστή (π.χ. κάποιο μόριο) και στην συνέχεια επανεκπέμπεται σε διαφορετική κατεύθυνση, ενώ είναι πιθανό να συμβούν αλλαγές τόσο στην ενέργειά του, όσο και στην πόλωσή του σε σχέση με την κατάσταση που βρισκόταν πριν αυτό σκεδαστεί⁸. Η σκέδαση μπορεί να διαχωριστεί σε δυο είδη ανάλογα με το αν το φωτόνιο διατηρεί την ενέργειά του ή όχι. Έτσι έχουμε την ελαστική σκέδαση όπου δεν μεταβάλεται η ενέργεια και κατά συνέπεια το μήκος κύματος και η συχνότητα του φωτονίου και την ανελαστική που περιλαμβάνει μεταβολή της ενέργειας της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.

Σε καταστάσεις καταστροφής μεγάλου αριθμού ενδοθηλιακών κυττάρων, παρατηρείται αυξημένη σκέδαση στον κερατοειδή, αφού σε αυτήν την περίπτωση υποβαθμίζεται η λειτουργία του επιθηλίου προκαλώντας οίδημα στο στρώμα. Διότι μετά την πραγματοποίησή τους ενεργοποιείται ο επουλωτικός μηχανισμός του κερατοειδούς, αποτέλεσμα του οποίου είναι η αύξηση του αριθμού των κερατοκυττάρων με έντονη κυτταρική δραστηριότητα (παραγωγής κολλαγόνου) και αυξημένη ανακλαστικότητα τόσο των πυρήνων τους όσο και του κυτταρικού σώματος.

2.3 Προσδιορισμός Αλληλεπίδρασης Η/Μ ακτινοβολίας με την ύλη

Στις ποσότητες με διαστάσεις συμπεριλαμβάνεται ο συντελεστής απορρόφησης, ο συντελεστής σκέδασης, το βάθος διείσδυσης, ο ολικός συντελεστής εξασθένησης, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία και η πυκνότητα ροής ακτινοβολίας.

2.3.1 Συντελεστής Απορρόφησης

Η ιδιότητα του ιστού να απορροφά το φως χαρακτηρίζεται από τον συντελεστή απορρόφησης, μ_a . Ο συντελεστής αυτός για μονοφωτονική απορρόφηση ορίζεται από την εξίσωση:

$$dI = -\mu_a \cdot I dx \quad (2.2)$$

όπου dI είναι η διαφορική μεταβολή της έντασης I μιας σύμφωνης δέσμης φωτός που διασχίζει μία απειροελάχιστη διαδρομή dx μέσω ενός ομογενούς μέσου, με συντελεστή απορρόφησης μ_a . Από την εξίσωση (2.2) καθίσταται εμφανές ότι ο συντελεστής απορρόφησης εκφράζεται με διαστάσεις αντιστρόφου μήκους (cm^{-1}).

Επίσης, ο συντελεστής απορρόφησης περιγράφοντας ένα μέσο που περιέχει πολλά απορροφητικά σωματίδια μπορεί να εκφραστεί και με την ακόλουθη σχέση:

$$\mu_a = \rho_a \cdot \sigma_a \quad (2.3)$$

όπου το ρ_a (cm^{-3}) εκφράζει την πυκνότητα των σκεδαστών και το σ_a (cm^2) την ενεργό διατομή απορρόφησης. Με ολοκλήρωση της (2.2) σε ένα πάχος x και αντικατάσταση του συντελεστή απορρόφησης από την (2.3) προκύπτει ο νόμος των Beer-Lambert:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-\rho_a \sigma_a x} \quad (2.4)$$

όπου I_0 είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Η αντίστροφη ποσότητα του συντελεστή απορρόφησης, $1/\mu_a$, εκφράζει τη μέση ελεύθερη διαδρομή ενός φωτονίου, μέχρι να απορροφηθεί. Μία άλλη ποσότητα, που χρησιμοποιείται συχνά, είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, ϵ . Ο συντελεστής

αυτός ορίζεται χρησιμοποιώντας λογάριθμο με βάση το δέκα και συσχετίζεται με τον συντελεστή απορρόφησης μέσω της ακόλουθης εξίσωσης:

$$\varepsilon = \log_{10}(e) \cdot \frac{\mu_a}{C} \quad (2.5)$$

όπου C είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα. Από τη σχέση ορισμού του εύκολα μπορούν να προκύψουν οι μονάδες του μοριακού συντελεστή απορρόφησης ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).

2.3.2 Συντελεστής Σκέδασης

Ο συντελεστής σκέδασης, μ_s , ορίζεται ως η ιδιότητα του ιστού να σκεδάσει το φως. Η εξίσωση που περιγράφει τον συντελεστή σκέδασης είναι παρόμοια προς εκείνη του συντελεστή απορρόφησης:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-\mu_s \cdot x} \quad (2.6)$$

όπου I είναι το ποσό του φωτός που δεν έχει σκεδαστεί, αφού έχει διανύσει ένα διαφανές μέσο, πάχους x . Και αυτός ο συντελεστής μετράται σε μονάδες αντιστρόφου μήκους.

Επίσης, ο συντελεστής σκέδασης περιγράφοντας ένα μέσο που περιέχει πολλά σωματίδια σκέδασης, μπορεί να εκφραστεί και με την ακόλουθη σχέση:

$$\mu_s = \rho_s \cdot \sigma_s \quad (2.7)$$

όπου το ρ_s (cm^3) εκφράζει την πυκνότητα και το σ_s (cm^2) την ενεργό διατομή σκέδασης.

Η αντίστροφη ποσότητα του συντελεστή σκέδασης, $1/\mu_s$, εκφράζει τη μέση ελεύθερη διαδρομή ενός φωτονίου, μέχρι να λάβει χώρα σκέδαση. Τέλος, η ποσότητα $\mu_s \cdot x$ (αδιάστατη ποσότητα) εκφράζει το οπτικό βάθος ενός σκεδαστή.

2.3.3 Βάθος Διείσδυσης

Το βάθος διείσδυσης ορίζεται ως η μέση απόσταση που δύναται να ταξιδέψει το φως πριν απορροφηθεί ή/και σκεδαστεί. Υπολογίζεται ως το αντίστροφο του αθροίσματος των συντελεστών απορρόφησης και σκέδασης:

$$\delta = \frac{1}{\mu_a + \mu_s} \quad (2.8)$$

Το πάχος διείσδυσης εκφράζει το πάχος του ιστού στο οποίο το μέτρο της έντασης της φωτεινής ακτινοβολίας ελαττώνεται στο $1/e$ (37%) της αρχικής προσπίπτουσας τιμής. Ο ισχυρισμός αυτός αποδεικνύεται εύκολα από το νόμο του Lambert:

$$I(x) = I_0 \cdot \exp[-(\mu_a + \mu_s) \cdot x] \quad (2.9)$$

Θέτοντας $I(x) = (1/e) \cdot I_0$. Πράγματι, με την αντικατάσταση αυτή, η εξίσωση (2.9) καταλήγει στην (2.8), που αποτελεί και την εξίσωση ορισμού του βάθους διείσδυσης.

2.3.4 Ολικός Συντελεστής Εξασθένησης

Ο ολικός συντελεστής εξασθένησης ορίζεται ως το άθροισμα του συντελεστή απορρόφησης με τον συντελεστή σκέδασης

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (2.10)$$

Από την παραπάνω εξίσωση καθίσταται εμφανής η σχέση αντιστροφής μεταξύ του ολικού συντελεστή εξασθένησης και του βάθους διείσδυσης.

Ο ολικός συντελεστής εξασθένησης είναι εξαιρετικά χρήσιμος, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις βιολογικών μέσων τόσο η απορρόφηση, όσο και η σκέδαση, λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα. Τα μέσα αυτά αποτελούν τα επονομαζόμενα μη διαυγή δείγματα.

Κεφάλαιο 3^ο

Υπέρυθρη φασματοσκοπία (*InfraRed spectroscopy, IR*)

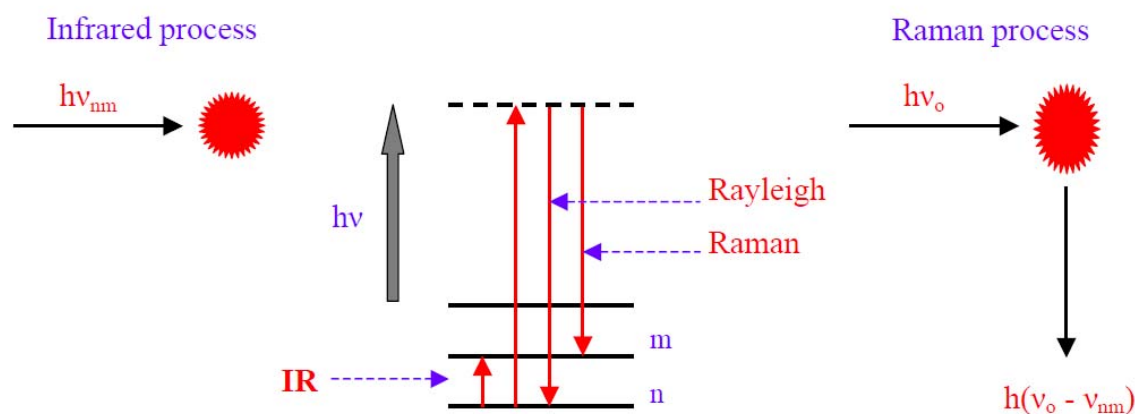
3.1 Εισαγωγή

Το κεφάλαιο αυτό αναφέρεται στην κατανόηση των βασικών αρχών και τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση των μετρήσεων. Πιο συγκεκριμένα αναφέρεται στις βασικές αρχές της υπέρυθρης φασματοσκοπίας ως η βασική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του φάσματος διαπερατότητας του κερατοειδή συναρτήσει της ενυδάτωσης.

Φασματοσκοπία είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (φως, ραδιοκύματα, ακτίνες x, κλπ.) με την ύλη. Τα άτομα, που αποτελούνται από ηλεκτρικά φορτισμένους πυρήνες και ηλεκτρόνια, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το ταλαντευόμενο ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο του φωτός και απορροφούν την ενέργεια που μεταφέρει.

Ένα άτομο/μόριο διεγείρεται μόνο από φωτόνια ενέργειας ίσης με την διαφορά ενέργειας μεταξύ του διεγερμένης και του ουδέτερης κατάστασης. Με ακτινοβολία (φως) υπέρυθρων συχνοτήτων ($10 - 12800 \text{ cm}^{-1}$), λόγω της χαμηλής ενέργειας του φωτονίου, μπορούν να διεγερθούν μόρια από ένα δονητικό ενεργειακό επίπεδο σε άλλο. Η ενέργεια μιας τέτοιας ακτινοβολίας ($1 - 800 \text{ meV}$) είναι αρκετή, ώστε να προκαλέσει δονήσεις στα μόρια που την απορροφούν. Ωστόσο, οι περιστροφικές ενέργειες των μορίων είναι ακόμα μικρότερες από τις δονητικές, με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη ακτινοβολία να είναι ικανή να προκαλέσει παράλληλα και περιστροφικές μεταπτώσεις. Στην περίπτωση αυτή, η φασματοσκοπία ονομάζεται *δονητική (vibrational spectroscopy)*.

Οι δονητικές φασματοσκοπικές τεχνικές αποτελούν τα πιο χρήσιμα εργαλεία για την κατανόηση της φύσης των χημικών δεσμών ενός συστήματος και την μελέτη χημικών αντιδράσεων. Τέτοιες τεχνικές είναι οι φασματοσκοπία FTIR και η φασματοσκοπία Raman οι οποίες είναι μη καταστροφικές ως προς το δείγμα και σχετίζονται κυρίως με μελέτες μεταβάσεων μεταξύ δονητικών και περιστροφικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης, ιόντων και μορίων.



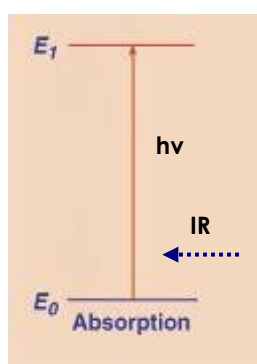
Σχήμα 3.1. Αναπαράσταση των δονητικών διαδικασιών IR και Raman.

Η φασματοσκοπία υπερέυθρου προκύπτει από απορρόφηση της ακτινοβολίας και μετάβαση σε ανώτερο ενεργειακό επίπεδο. Ενώ η Raman φασματοσκοπία⁹ διαφέρει από την υπέρυθη IR στο ότι η πληροφορία αποκτάται από σκέδαση φωτός. Κατά τη διαδικασία της Raman έχουμε διέγερση φωτονίων σε ένα virtual επίπεδο και μη ελαστική σκέδαση των φωτονίων κατά την αποδιέγερση (Σχήμα 3.1). Ένα ποσοστό των φωτονίων παραμένουν ενεργειακά αμετάβλητα κ επιστρέφουν στην κατώτερη ενεργειακά στάθμη (τότε έχουμε την λεγόμενη σκέδαση Rayleigh), ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό σκεδάζονται με μεταβολή της ενέργειάς τους (σκέδαση Raman).

Επίσης, διαφορετικοί κανόνες επιλογής καθορίζουν τις εντάσεις των παρατηρούμενων τρόπων δόνησης. Στην υπέρυθη φασματοσκοπία έχουμε απορρόφηση όταν αλλάζει η μόνιμη διπολική ροπή του τρόπου δόνησης του μορίου, ενώ η σκέδαση Raman σχετίζεται με κανονικούς τρόπους που παράγουν αλλαγή στην πολωσιμότητα ή επαγόμενη διπολική ροπή του μορίου. Για τον λόγο αυτό συμμετρικοί τρόποι έκτασης τείνουν να είναι τα πιο έντονα χαρακτηριστικά στα φάσματα Raman και ασύμμετροι στα φάσματα IR. Αυτή η διαφορά των δύο τεχνικών καθιστά την Raman φασματοσκοπία πιο ευνοϊκή για την μελέτη βιολογικών συστημάτων καθώς υπάρχει πολύ μικρότερη φασματική παρεμβολή από τους τρόπους δόνησης των μορίων του νερού, οι οποίοι είναι τα κυρίαρχα χαρακτηριστικά στα φάσματα υπερέυθρου. Όμως οι δυο αυτές τεχνικές είναι συμπληρωματικές, διότι προκύπτουν από διαφορετική διαδικασία, και οι μεταβάσεις που επιτρέπονται στη φασματοσκοπία Raman είναι απαγορευμένες στο IR.

3.2 Βασικές αρχές της φασματοσκοπίας¹⁰

Όταν ένα μόριο αλληλεπιδρά με ηλεκτρομαγνητικό πεδίο γίνεται μεταφορά ενέργειας από το πεδίο στο μόριο όταν ικανοποιείται η συνθήκη του Bohr, $\Delta E = h\nu$, όπου ΔE η διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο κβαντισμένων ενεργειακών καταστάσεων του μορίου, h η σταθερά του Planck και ν η συχνότητα της ακτινοβολίας. Στο σχήμα 3.2 δίδονται σχηματικά οι ενεργειακές στάθμες ενός διατομικού μορίου. Κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη υποδιαιρείται σε στάθμες ταλαντώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από τον κβαντικό αριθμό ταλαντώσεως u , ενώ κάθε στάθμη ταλαντώσεως υποδιαιρείται σε στάθμες περιστροφής των οποίων η ενέργεια χαρακτηρίζεται από τον κβαντικό αριθμό J .



Σχήμα 3.2. Διαδικασία μετάβασης σε ανώτερη ενεργειακή στάθμη.

Οι ενεργειακές στάθμες λόγω περιστροφής ευρίσκονται η μία πλησίον της άλλης και επομένως μεταπτώσεις μεταξύ γειτονικών σταθμών λαμβάνουν χώρα σε χαμηλές συχνότητες (ή μεγάλα μήκη κύματος). Τέτοιες μεταπτώσεις δίδουν τα φάσματα περιστροφής (*rotational spectra*) τα οποία μετρώνται στην περιοχή των μικροκυμάτων και άπω υπερέθρου, δηλαδή 1 cm^{-1} ($10000\ \mu\text{m}$) έως περίπου 10^2 cm^{-1} ($100\ \mu\text{m}$).

Υπενθυμίζεται ότι η συχνότητα, ν , μετατρέπεται σε κυματάριθμους, $\tilde{\nu}$, ή σε μήκος κύματος, λ , μέσω της σχέσης:

$$\lambda = c/\nu = 1/\tilde{\nu} \quad (3.3)$$

όπου c η ταχύτητα του φωτός. Η απόσταση μεταξύ δονητικών ενεργειακών σταθμών είναι μεγαλύτερη, με αποτέλεσμα οι σχετικές ενεργειακές μεταπτώσεις να λαμβάνουν χώρα σε μεγαλύτερες συχνότητες (μικρότερα μήκη κύματος) απ' ό,τι οι μεταπτώσεις λόγω περιστροφής. Τα δονητικά φάσματα (*vibrational spectra*) μετρώνται συνήθως στην περιοχή 10^2 cm^{-1} ($10^2\ \mu\text{m}$) έως 10^4 cm^{-1} ($1\ \mu\text{m}$) (περιοχή υπερέθρου). Τέλος, η μεγάλη ενεργειακή απόσταση μεταξύ των ηλεκτρονιακών ενεργειακών σταθμών έχει ως

αποτέλεσμα τα αντίστοιχα ηλεκτρονικά φάσματα (electronic spectra) να μετρώνται στην περιοχή 10^4 cm^{-1} ($1 \mu\text{m}$) έως 10^5 cm^{-1} ($0.1 \mu\text{m}$) (περιοχή ορατού και υπεριώδους).

3.3 Δονητική Φασματοσκοπία¹¹

Ένα μόριο απορροφά IR ακτινοβολία όταν η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας συμπίπτει με την ενέργεια μια μετάβασης του μορίου μεταξύ δύο δονητικών επιπέδων της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης. Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο καθίσταται δυνατή όταν υπάρχει αλλαγή στη διπολική ροπή που χαρακτηρίζει ένα συγκεκριμένο τρόπο δόνησης. Δηλαδή το μόριο πρέπει να περιέχει ένα δίπολο το οποίο να δονείται με συχνότητα ίση με τη συχνότητα του παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η μόνιμη διπολική ροπή δίνεται από τη σχέση:

$$\mu = e \cdot r \quad (3.4)$$

όπου μ η διπολική ροπή, e το φορτίο και r η απόσταση που χωρίζει τα θετικά από τα αρνητικά φορτία.

Σύμφωνα με την κλασική εικόνα, αν ένα ετεροπυρηνικό διατομικό μόριο δονείται σε μία συγκεκριμένη συχνότητα, η μοριακή διπολική ροπή επίσης ταλαντώνεται γύρω από την τιμή ισορροπίας της. Το ταλαντούμενο δίπολο απορροφά ενέργεια από το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μόνο αν το τελευταίο ταλαντώνεται με την ίδια συχνότητα του διπόλου.

Για δονητικές κινήσεις η διπολική ροπή μ μπορεί να γραφεί σαν ένα άθροισμα όρων:

$$\mu = \mu_0 + (\partial\mu / \partial q)q + \dots \quad (3.5)$$

όπου μ_0 η μόνιμη διπολική ροπή και q η δονητική μετατόπιση η οποία ορίζεται σαν:

$$q = r - r_e \quad (3.6)$$

όπου r η διαπυρηνική απόσταση και r_e η ίδια απόσταση κατά την ισορροπία.

Το ποσό της ακτινοβολίας IR που απορροφάται κατά τη διάρκεια μίας δόνησης, καθώς και η ένταση της στο λαμβανόμενο φάσμα εξαρτάται από την πιθανότητα της δονητικής μετάβασης, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την αλλαγή της διπολικής ροπής που συνοδεύει αυτή τη μετάβαση. Έχει αποδειχθεί ότι η ένταση της

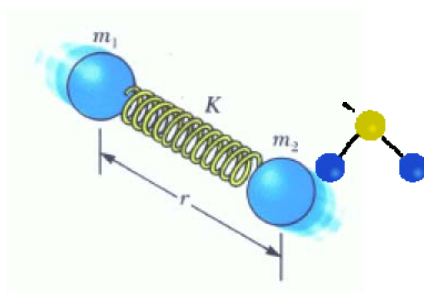
απορρόφησης στο IR είναι ανάλογη του τετραγώνου της μεταβολής της διπολικής ροπής P ως προς τη μετατόπιση q του πυρήνα, στη διάρκεια της δόνησης:

$$I_{IR} \sim (\partial P / \partial q)^2 \quad (3.7)$$

Αυτό σημαίνει ότι μία δόνηση είναι ενεργή στο IR όταν μεταβάλλει τη διπολική ροπή.

3.4 Δονήσεις Τάσεις

Η θεωρία των μοριακών διεγέρσεων περιγράφεται απλά με το μοντέλο του αρμονικού ταλαντωτή. Το σύστημα θεωρείται ότι αποτελείται από δυο σφαίρες μάζας m , συνδεδεμένες μέσω ενός αβαρούς ελατηρίου, του οποίου η τάση δίνεται από μια σταθερά k .



Σχήμα 3.3 Ταλάντωση διατομικού μορίου.

Σύμφωνα με το νόμο του Hooke, η συχνότητα δόνησης του ελατηρίου, δίνεται από την σχέση:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.8)$$

όπου k είναι η σταθερά δύναμη, και μ είναι η ανοιγμένη μάζα που δίνεται από την σχέση:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_A} + \frac{1}{m_B} \quad (3.9)$$

m_A, m_B είναι οι μάζες των σφαιρών.

Επιπλέον, η ενέργεια του συστήματος, σύμφωνα με την θεωρία του κλασσικού αρμονικού ταλαντωτή δίνεται από την σχέση $E = \frac{1}{2} kx^2$, όπου x είναι η μετατόπιση του

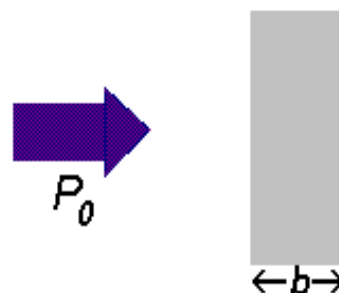
ελατηρίου. Επειδή το x μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή, κάθε τιμή ενέργειας κατά την κλασσική άποψη είναι επιτρεπτή, συμπεράσμα, όμως, που κβαντομηχανικά δεν ευσταθεί. Έτσι, σύμφωνα με την κβαντομηχανική, η ενέργεια του συστήματος δίνεται από την σχέση:

$$E = (n + \frac{1}{2})h\nu \quad (3.10)$$

Όπου ν είναι η συχνότητα δόνησης και n είναι ο κβαντικός αριθμός που παίρνει τιμές (0,1, 2, ...). Συνεπώς, η ενέργεια του κβαντομηχανικού ταλαντωτή μπορεί να είναι μόνο ακέραιο πολλαπλάσιο του $\frac{1}{2}h\nu$. Η ενέργεια με $n=0$, $E_0=1/2 h\nu$, ονομάζεται ενέργεια μηδενικού σημείου και υπάρχει ακόμα και στη θερμοκρασία του απόλυτου μηδέν, γιατί είναι ανεξάρτητη από τις θερμικές κινήσεις των μορίων.

3.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform – InfraRed spectroscopy, FT-IR) ¹²

Στη φασματοσκοπία υπερύθρου μελετάμε την απορρόφηση υπέρυθρου φωτός από το δείγμα συναρτήσει της συχνότητας. Το μόριο απορροφά ενέργεια $\Delta E = h\nu$ από την IR πηγή (που εκπέμπει ακτινοβολία έντασης I) σε κάθε δονητική μετάβαση.



Σχήμα 3.4 Προσπίπτουσα ακτινοβολία σε δείγμα πάχους b .

Η διαπερατότητα T ορίζεται:

$$T = \frac{I_t}{I_o} \quad (3.11)$$

Η διέλευση μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή μεταξύ του 0 και του 1 και συχνά εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό (οπότε οι τιμές που μπορεί να πάρει βρίσκονται μεταξύ του 0 και του 100%). Η απορρόφηση και η διέλευση σχετίζονται επομένως ως εξής:

$$P = P_0 \text{Exp}[-a b] \quad (3.12)$$

Όπου:

P: Ισχύς εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση δείγματος

P_0 : Ισχύς προσπίπτουσας ακτινοβολίας

a: σταθερά απορρόφησης

b: πάχος δείγματος

Ενώ η σχέση Απορρόφησης A(%) –Σκέδασης S(%) – Διαπερατότητας T(%) – Ανάκλασης R(%) είναι:

$$A(\%) + S(\%) + T(\%) + R(\%) = 100 (\%) \quad (3.12)$$

Η πλέον χρήσιμη σχέση στην φασματοφωτομετρία απορρόφησης προκύπτει από τον συνδυασμό του νόμου του Lambert (κάθε στρώμα, ίσης επιφάνειας, ενός απορροφητικού μέσου απορροφά ίσο ποσοστό της ακτινοβολίας που το διασχίζει) και του νόμου του Beer (η απορρόφηση ενός διαλύματος είναι ανάλογη προς την συγκέντρωση της απορροφητικής ουσίας).

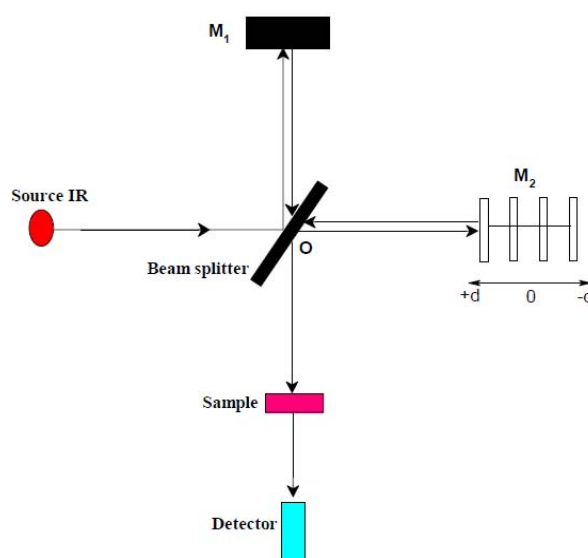
Το φάσμα απορρόφησης και ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης σε μήκος κύματος λ είναι παράμετροι που χαρακτηρίζουν μοναδικά συγκεκριμένα μόρια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ποσοτικοποίηση, όσο και για χαρακτηρισμό δειγμάτων.

3.5.1 Η αρχή λειτουργίας φασματοφωτόμετρου FTIR¹³

Τα δονητικά φάσματα λαμβάνονται με ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR. Αυτό έχει ως βάση λειτουργίας το συμβολόμετρο Michelson, το οποίο χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί ένα συμβολογράφημα. Μαθηματική επεξεργασία του συμβολογραφήματος (μετασχηματισμός Fourier) δίνει το φάσμα απορρόφησης IR.

Το συμβολόμετρο (interferometer) δύο δεσμών, αρχικά σχεδίασε ο Michelson το 1891. Πολλά άλλα συμβολόμετρα δύο δεσμών έχουν σχεδιαστεί μετά απ' αυτό, τα οποία μπορεί να είναι χρήσιμα για μερικές ιδιαίτερες εφαρμογές. Ωστόσο, η αρχή λειτουργίας των συμβολόμετρων δύο δεσμών είναι παρόμοια.

Το συμβολόμετρο Michelson είναι μια διάταξη οπτικών που χωρίζει μια δέσμη ακτινοβολίας σε δύο δέσμες και τις επανασυνθέτει, αφού πρώτα ακολουθήσουν ξεχωριστές διαδρομές που διαφέρουν στο μήκος. Οι μεταβολές της έντασης της επαλληλίας των δύο δεσμών ακτινοβολίας, ως συνάρτηση της διαφοράς των οπτικών διαδρομών καταγράφονται από έναν ανιχνευτή.



Σχήμα 3.5 Σχηματικό διάγραμμα του συμβολόμετρου Michelson.

Όλα τα φασματοφωτόμετρα μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιούν ένα συμβολόμετρο τύπου Michelson (Σχήμα 3.5). Η πολυχρωματική IR ακτινοβολία, που εκπέμπεται από την πηγή, φθάνει στο διαχωριστή δέσμης όπου είναι φτιαγμένος από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως KBr και το 50% της ακτινοβολίας ανακλάται και το υπόλοιπο 50% περνά από το διαχωριστή. Ο διαχωριστής είναι τοποθετημένος σε γωνία 45°, ως προς την προσπίπτουσα δέσμη, ώστε να είναι μέγιστες οι εντάσεις τόσο του μέρους της δέσμης που ανακλάται, όσο και εκείνου που διαπερνά.

Η ακτινοβολία που παράγεται από την IR πηγή προσπίπτει στον διαχωριστή δέσμης, ο οποίος διαιρεί την ακτινοβολία σε δύο ίσα μέρη αποστέλλοντας το ένα τμήμα στο κάτοπτρο M1 και το άλλο μισό στο M2. Η ανακλώμενη ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο σταθερό καθρέπτη, ο οποίος βρίσκεται σε απόσταση L από το διαχωριστή. Η δέσμη ανακλάται και επιστρέφει στο διαχωριστή. Το δεύτερο κλάσμα της IR ακτινοβολίας που διαπερνά τον διαχωριστή, αφού διανύσει απόσταση (L+d), ανακλάται από τον κινούμενο καθρέπτη και επανέρχεται στον διαχωριστή. Έτσι, η διαφορά των δύο οπτικών διαδρομών είναι $\delta=2d$. Οι δύο ανακλώμενες δέσμες, όταν επιστρέψουν στο διαχωριστή, συμβάλουν έχοντας διανύσει διαφορετικό οπτικό δρόμο. Με την διαδικασία αυτή, δημιουργούνται οι κροσσοί συμβολής μέσω των οποίων γίνεται η κατάλληλη επιλογή των μηκών κύματος.

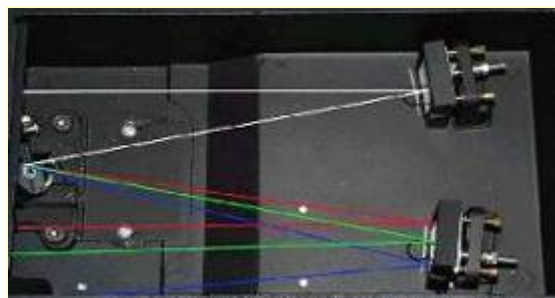
Στην περίπτωση μονοχρωματικής δέσμης φωτός μήκους κύματος λ (αν και στην περίπτωση της φασματοφωτομετρίας FT-IR δεν χρησιμοποιείται μονοχρωματική ακτινοβολία) που εκπέμπεται από την πηγή και συνενώνεται στην πλάκα B, υπόκειται σε ενισχυτική ή καταστροφική συμβολή ανάλογα με τις αποστάσεις της πλάκας B από τα κάτοπτρα M_1 και M_2 . Εάν οι αποστάσεις αυτές είναι ίσες ή διαφέρουν κατά ένα ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της μονοχρωματικής δέσμης, τότε δημιουργείται ενισχυτική συμβολή με αποτέλεσμα να τετραπλασιάζεται η ένταση. Εάν, όμως οι αποστάσεις της B από τα M_1 και M_2 δεν είναι ακέραια πολλαπλάσια του μήκους κύματος, τότε οι δέσμες φωτός ανακλώνται στα κάτοπτρα και επανέρχονται στην B, όπου και αλληλοεξουδετερώνονται.

Σε ένα φασματοφωτόμετρο FT-IR η πηγή εκπέμπει ένα συνεχές φάσμα. Κατά την έξοδο από το συμβολόμετρο έχουμε επαλληλία των διαφόρων φασματικών συνιστωσών των επιμέρους δεσμών. Το τελικό αποτέλεσμα προκύπτει από το άθροισμα των επιμέρους εντάσεων ακτινοβολίας που αντιστοιχούν σε κάθε φασματική περιοχή. Έτσι για μηδενική διαφορά οπτικού δρόμου όλες οι φασματικές συνιστώσες είναι σε φάση και η συνολική ένταση ακτινοβολίας είναι μέγιστη. Καθώς αυξάνεται η διαφορά οπτικού δρόμου ΔL η επαλληλία για κάθε φασματική συνιστώσα οδηγεί σε μέγιστο ή ελάχιστο ανάλογα με τον λόγο $\Delta L/\lambda$. Έτσι η συνολική ένταση μειώνεται ή αυξάνεται με όλο και μικρότερο πλάτος διαμόρφωσης. Μετά από μια μέγιστη διαφορά οπτικού δρόμου δεν υπάρχει πια κανένας συσχετισμός φάσης μεταξύ των διαφόρων φασματικών συνιστωσών και η συνολική ένταση είναι πια σταθερή και ανεξάρτητη από την διαφορά οπτικού δρόμου. Όπως αποδεικνύεται το πλάτος διαμόρφωσης των πολυχρωματικών κροσσών συμβολής είναι συνάρτηση ως συνάρτηση του της διαφοράς οπτικού δρόμου σχετίζεται με τον μετασχηματισμό Fourier της φασματικής κατανομής της πηγής.

3.5.2 Δυνατότητες και Πλεονεκτήματα Φασματοφωτόμετρου FT-IR

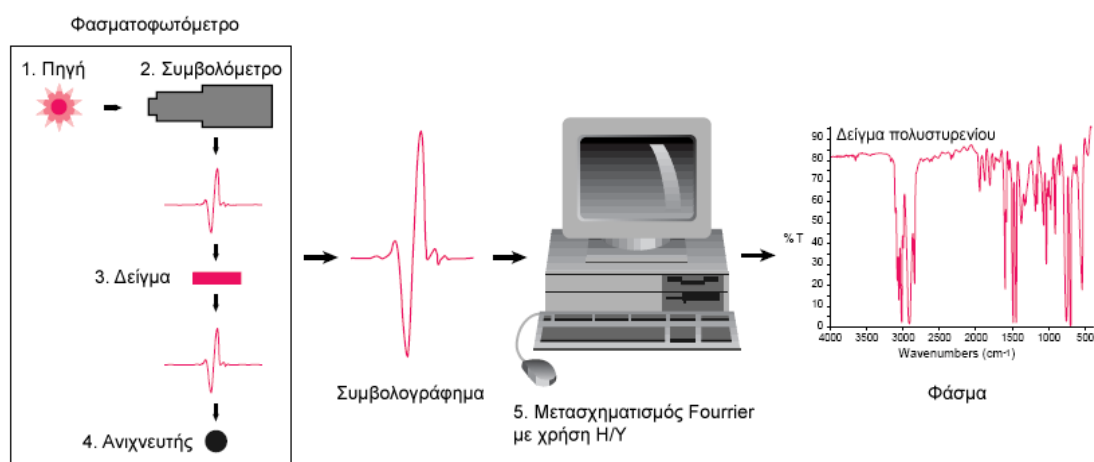
Η τεχνική αυτή του FT-IR έχει σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες τεχνικές φασματοσκοπίας. Χρησιμοποιεί το συμβολόμετρο Michelson για επιλογή μήκους κύματος και το μετασχηματισμό Fourier για τη δημιουργία του φάσματος. Κατά συνέπεια παίρνουμε φάσματα υψηλής ποιότητας.

Στην τεχνική FTIR με διαβαθμισμένο πλέγμα (grating) χρησιμοποιείται ένα πλέγμα οπτικά διαβαθμισμένο για την ανάλυση της IR και την επιλογή μίας μονοχρωματικής ακτινοβολίας, το οποίο αποτελείται από μια επιφάνεια που έχει επιστρωθεί με μια λεπτή γυαλιστερή μεταλλική στοιβάδα πάνω στην οποία έχουν χαραχθεί αυλάκια.



Σχήμα 3.6 Διάταξη FTIR με διαβαθμισμένο πλέγμα (grating).

Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR παρουσιάζουν σαφή πλεονεκτήματα. Καταρχήν, η χρήση υπολογιστή στη φασματοσκοπία FT-IR προσφέρει τη δυνατότητα ταχείας λήψης πολλαπλών φασμάτων, υπολογισμού του μέσου όρου τους, επεξεργασίας και αποθήκευσης των δεδομένων. Τούτο συνεπώς οδηγεί στην καταγραφή φασμάτων υψηλής ποιότητας. Είναι δυνατή επίσης η αφαίρεση φασμάτων και επομένως η ακριβής ανίχνευση πολύ μικρών μεταβολών που οφείλονται τόσο σε μεταβαλλόμενη σύσταση, όσο και στη φυσική κατάσταση του δείγματος.



Σχήμα 3.7 Διαδικασία λειτουργίας φασματοφωτόμετρου.

Η ύπαρξη «βιβλιοθήκης» φασμάτων υπερύθρου παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης του φάσματος ενός μείγματος συστατικών στα επί μέρους συστατικά του και επομένως τη δυνατότητα ποιοτικής/ποσοτικής ανάλυσης του μείγματος.

Η μεγάλη ευαισθησία που χαρακτηρίζει τη φασματοσκοπία FT-IR μετατρέπεται σε μειονέκτημα στην περίπτωση που η ατμόσφαιρα του φωτομέτρου δεν έχει πλήρως εκκενωθεί, ή αντικατασταθεί με άζωτο. Τότε, το φάσμα υπερύθρου παρουσιάζει έντονες απορροφήσεις που οφείλονται στο H_2O και το CO_2 του χώρου του φωτομέτρου. Το σοβαρότερο όμως μειονέκτημα της φασματοσκοπίας FT-IR είναι η απαιτούμενη ακριβής ρύθμιση των οπτικών του οργάνου, κυρίως του συμβολομέτρου Michelson. Σε αντίθεση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα, που δίνουν χαμηλής ποιότητας αλλά χρησιμοποιήσιμα φάσματα όταν δεν είναι καλώς ρυθμισμένα.

Σε σύγκριση με τα συμβατικά IR φασματοφωτόμετρα με διαβαθμισμένο πλέγμα, τα FTIR φασματοφωτόμετρα υπερέχουν σημαντικά, καθώς ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο (S/N) είναι πολύ μεγαλύτερος. Η υπεροχή των FTIR φασματοφωτόμετρων οφείλεται στα βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας τους, που έχουν ως αποτέλεσμα: 1) όλες οι συχνότητες που εκπέμπονται από την πηγή να φθάνουν ταυτόχρονα στον ανιχνευτή 2) ένα μεγάλο εμβαδόν της δέσμης να περνά μέσα από το δείγμα και 3) η θέση του κινούμενου καθρέπτη να προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια.

3.6 Φασματοσκοπική μελέτη της ενυδάτωσης του κερατοειδή

Για την ποσοτικοποίηση των παραγόντων που πιθανώς να επηρεάζουν την κερατοειδική ενυδάτωση κατά την διάρκεια της επέμβασης, οι Pallikaris et al.¹⁴ (1998) ερευνήσαν την χρήση της φασματοσκοπικής τεχνικής LIBS για την καταγραφή της κερατοειδικής ενυδάτωσης. Αναφέρουν ότι η ένταση των ατομικών γραμμών εκπομπής του υδρογόνου παρέμενε σταθερή, ενώ η ένταση της ατομικής εκπομπής του ασβεστίου διαφοροποιόταν συναρτήσει της ενυδάτωσης του κερατοειδή. Με την τεχνική LIBS γίνεται χρήση δέσμης laser ενέργειας δεκάδων mJ για την αποδόμηση μικρού δείγματος του κερατοειδικού ιστού, με αποτέλεσμα τον ιονισμό του αποδομημένου υλικού και την εκπομπή ορατής ακτινοβολίας.

Μία ακόμη φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή της ενυδάτωσης του κερατοειδή είναι η φασματοσκοπία Raman. Ο κερατοειδής μπορεί να υποστεί απευθείας ανάλυση Raman λόγω της σύνθεσης του. Το κολλαγόνο και οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στον κερατοειδή, έχουν χαρακτηριστικές δονητικές συχνότητες, γνωστές ως Raman bands.

Οι Jongsma et al.¹⁵ (1997) περιγράφουν τη χρήση ενός συνεστιακού συστήματος Raman, για την *in vitro* ανάλυση σε οφθαλμούς κουνελιών, όπου η διέγερση του δείγματος και η συλλογή του σκεδαζόμενου φωτός πραγματοποιούταν μέσω ενός συνεστιακού αντικειμενικού μικροσκοπίου.

Το συνεστιακό σύστημα Raman, επιτρέπει την διερεύνηση του βαθμού ενυδάτωσης κατά βάθος του κερατοειδή. Οι Bauer et al.¹⁶ (1998) μέτρησαν την ενυδάτωση του κερατοειδούς κουνελιών *in vivo* και *in vitro* καθώς και σε δείγματα που προσομοίωσαν το κερατοειδή και χρησιμοποιώντας το κλάσμα της έντασης της ζώνης O-H προς την ένταση της ζώνης C-H, βρήκαν ότι η ενυδάτωση ήταν σταθερή μέσα σε ένα δείγμα αλβουμίνης με ομοιόμορφη κατανομή νερού.

Κεφάλαιο 4^ο

Πειραματική Διαδικασία

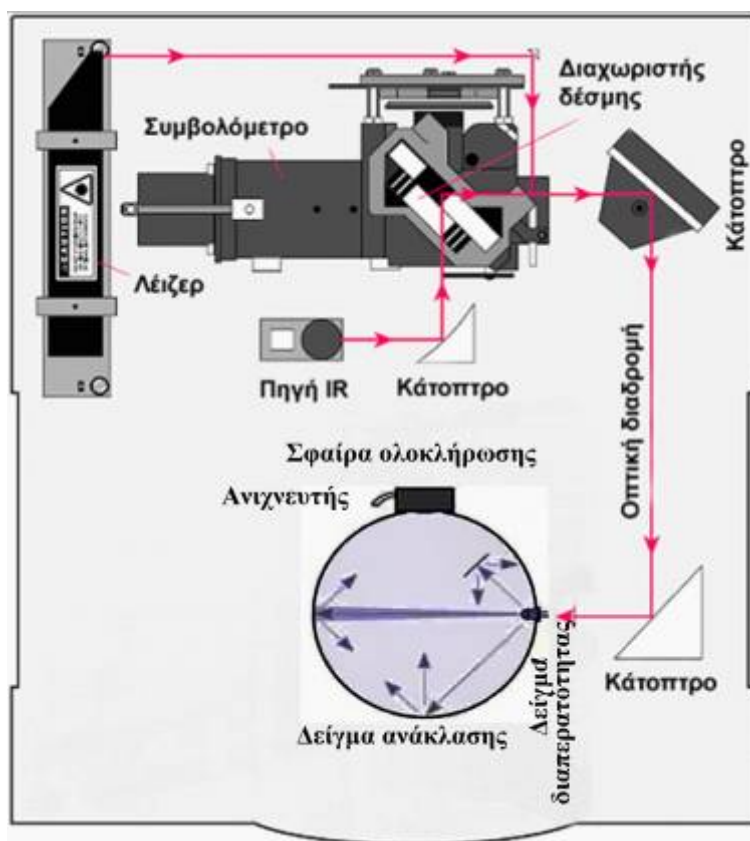
4.1 Σκοπός μελέτης

Βασική παράμετρος για την επιτυχή έκβαση μιας διαθλαστικής επέμβασης με λέιζερ είναι η ακριβής γνώση του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδούς. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει μια τεχνική που μπορεί να μετρήσει «in vivo» την τιμή της ενυδάτωσης με ικανοποιητική ακρίβεια.

Βασικός στόχος της παρούσης εργασίας ήταν ο συσχετισμός φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών του κερατοειδή που σχετίζονται με την ενυδάτωση. Πέρα από τον ποιοτικό συσχετισμό προχωρήσαμε και στον ποσοτικό προσδιορισμό της ενυδάτωσης από μετρήσεις μέχρι και σε δύο φασματικές περιοχές στο IR. Όπως προκύπτει από την ανάλυση μας που έχει πραγματοποιηθεί σε 10 δείγματα με την βοήθεια φασματοσκοπικών μετρήσεων μπορεί κανείς να μετρήσει την ενυδάτωση με τυπικό σφάλμα της τάξης του 2.5%.

4.2 Πειραματική Διάταξη

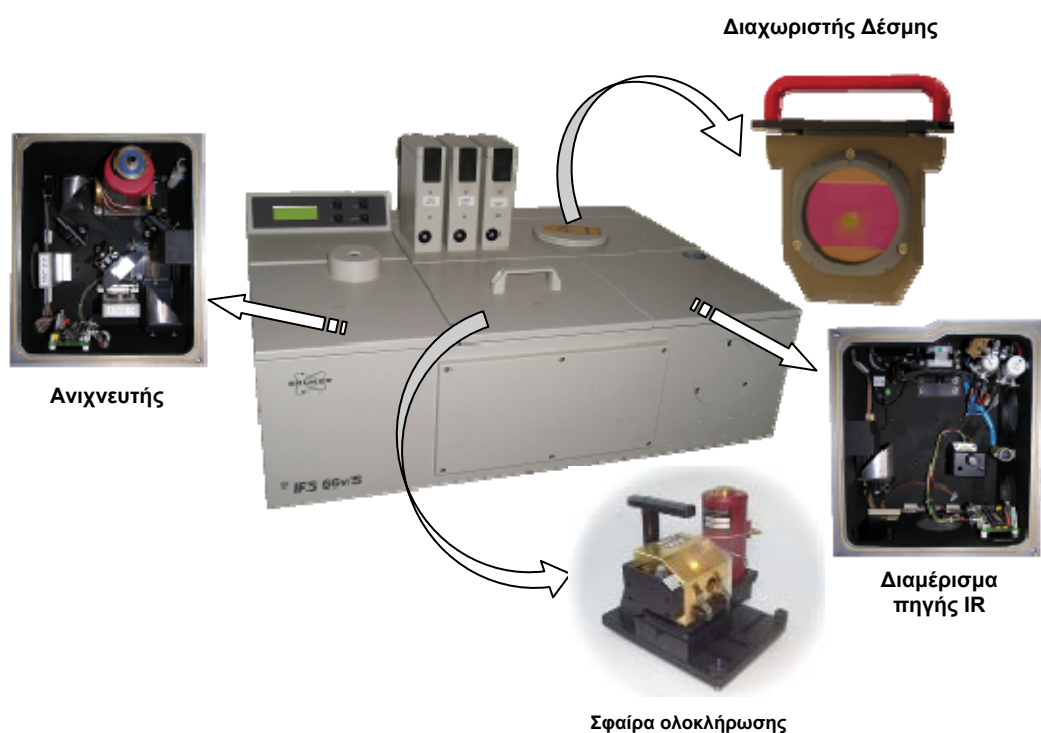
Σε αυτή την εργασία μελετήθηκε η ενυδάτωση του κερατοειδή με τη φασματοσκοπική μέθοδο FTIR. Η τεχνική της φασματοφωτομετρίας εφαρμόστηκε για τη μέτρηση της διάδοσης και της ανάκλασης του φωτός μέσα από κερατοειδών δειγμάτων οφθαλμού. Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνεται σχηματικά το φασματοφωτόμετρο FTIR που χρησιμοποιήθηκε.



Σχήμα 4.1: Σχηματικό διάγραμμα υπέρυθρου φασματοφωτομέτρου FT-IR.

Το όργανο αυτό χρησιμοποιείται για την μέτρηση της διαπερατότητας και σχετικής ανακλαστικότητας του δείγματος. Τα επιμέρους μέρη από τα οποία αποτελείται το φασματοφωτόμετρο είναι οι πηγές φωτός, το συμβολόμετρο, η σφαίρα ολοκλήρωσης, οι ανιχνευτές και τα οπτικά μεταφορές.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα φασματοφωτόμετρο υπέρυθρου της εταιρείας Bruker (IFS 66ν/S) με την προσθήκη του εξαρτήματος A 562-G, το οποίο φέρει σφαίρα ολοκλήρωσης διαμέτρου 75mm και που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.2.



Εικόνα 4.2. Φωτογραφία φασματοφωτομέτρου υπερύθρου Bruker (IFS 66v/S).

Πηγές Φωτός

Η πηγή φωτός παρέχει ακτινοβολία στα κατάλληλα μήκη κύματος. Το φασματοφωτόμετρο το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή, για την περιοχή του Υπερύθρου διαθέτει λάμπα Globar SiC (καρβίδιο του πυριτίου). Η λάμπα αυτή παράγει πολυχρωματική δέσμη σταθερής έντασης.

Σφαίρα Ολοκλήρωσης

Η σφαίρα ολοκλήρωσης A 562-G, είναι διαμέτρου 75 mm και είναι κατασκευασμένη εσωτερικά από λεπτή επίστρωση χρυσού η οποία προσδίδει μεγάλη ανακλαστικότητα στο IR. Η λειτουργία της σφαίρας ολοκλήρωσης είναι να συγκεντρώνει και να λαμβάνει υπ' όψη στη διαδικασία μέτρησης την ακτινοβολία που σκεδάζεται. Η σφαίρα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.1, έχει δύο πύλες, την πύλη διέλευσης από όπου η δέσμη εισέρχεται στην σφαίρα και την πύλη ανάκλασης όπου η δέσμη ανακλάται πάνω στο δείγμα. Ανάλογα με την ζητούμενη

μέτρηση, το δείγμα τοποθετείται εμπρός από την αντίστοιχη πύλη και συγκρατείται με την κατάλληλη βάση.

Στην περίπτωση μέτρησης της διέλευσης της δέσμης το δείγμα τοποθετείται στην είσοδο της σφαίρας. Οπότε η δέσμη αφού διέλθει από το δείγμα θα ανακλαστεί στα τοιχώματα της σφαίρας και έπειτα θα συγκεντρωθεί και θα καταλήξει στον ανιχνευτή. Ενώ κατά τη διαδικασία μέτρησης της ανάκλασης το δείγμα τοποθετείται στο εσωτερικό της σφαίρας. Η δέσμη αφού εισέλθει στη σφαίρα ανακλάται και σκεδάζεται από το δείγμα, συγκεντρώνεται και πάλι από τη σφαίρα ολοκλήρωσης και οδηγείται στον ανιχνευτή. Εάν πρόκειται για μετρήσεις διάδοσης, η πύλη ανάκλασης σφραγίζεται με ειδικά διαμορφωμένο κομμάτι χρυσού. Η σφαίρα ολοκλήρωσης αποσκοπεί στην συγκέντρωση της ακτινοβολίας, που εισέρχεται στο εσωτερικό της, στην ειδική θύρα του ανιχνευτή.

Οπτικά Μεταφορές

Τα οπτικά μεταφορές της διάταξης κατευθύνουν τη δέσμη δείγματος από το φασματοφωτόμετρο στη σφαίρας ολοκλήρωσης. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.1 τα κάτοπτρα οδηγούν τη δέσμη δείγματος μέσω της πύλης διάδοσης στη σφαίρα ολοκλήρωσης. Επίσης, χρησιμοποιείται ένα laser HeNe στα 633nm, για την ευθυγράμμιση του συμβολόμετρου και για την μέτρηση της μετατόπισης του κινητού κατόπτρου με μεγάλη ακρίβεια.

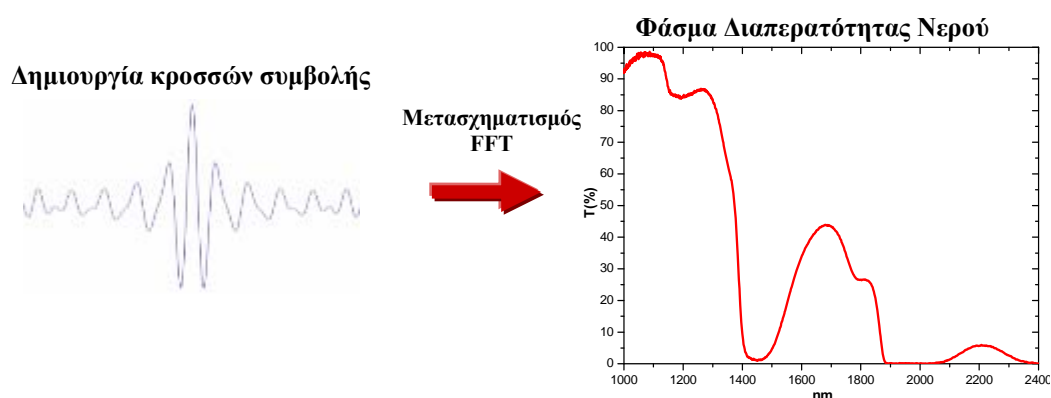
Ανιχνευτές

Ο ανιχνευτής είναι από τα πλέον σημαντικά εξαρτήματα ενός φασματοφωτομέτρου, καθώς αυτός είναι που μετρά το ποσό του φωτός που διαδίδεται ή ανακλάται από το δείγμα. Λειτουργεί πυρο-ηλεκτρικά, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση που προσπίπτει, τόσο πιο πολύ θερμαίνεται. Η διηλεκτρική σταθερά του ανιχνευτή μεταβάλλεται με τη θερμοκρασία, με αποτέλεσμα όσο πιο μεγάλη η θερμοκρασία τόσο πιο πολύ ρεύμα διέρχεται. Ενώ, έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία λαμβάνουμε το φάσμα.

Στη περίπτωση της μέτρησης με σφαίρα ολοκλήρωσης ο ανιχνευτής είναι τοποθετημένος πάνω στο σύστημα της σφαίρας. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, το διερχόμενο ή ανακλώμενο μέρος της δέσμης (ανάλογα με το είδος της μέτρησης), συλλέγεται από την σφαίρα ολοκλήρωσης και ανιχνεύεται από την δίοδο.

✚ Μετασχηματισμός Fourier

Με την χρήση πνευματικού μηχανισμού, έχουμε συνεχή κίνηση του κινητού κατόπτρου και σάρωση του φάσματος. Μετά από έναν αριθμό σαρώσεων (20-100 σαρώσεις) ο «θόρυβος» μειώνεται σημαντικά, ενώ οι εντάσεις των απορροφήσεων βελτιώνονται σε σημαντικό βαθμό.



Σχήμα 4.3 Διαδικασία μετασχηματισμού Fourier.

Συνήθως η καταγραφή των σημάτων που δέχεται ο ανιχνευτής γίνεται κάθε 1/1000 του δευτερολέπτου και κάθε πληροφορία συσσωρεύεται σε ένα από τα 1000 σημεία του προγραμματισμένου φάσματος. Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής επεξεργάζεται τις πληροφορίες, εκτελεί τους μετασχηματισμούς Fourier σε λίγα δευτερόλεπτα και παρουσιάζει ένα κανονικό φάσμα υπερύθρου. Η παραπάνω διαδικασία ολοκληρώνεται σε λίγα δευτερόλεπτα (10-20 sec) και μετά από έναν αριθμό σαρώσεων (20-100 σαρώσεις) του φάσματος ο «θόρυβος» μειώνεται σημαντικά.

4.3 Περιγραφή διαδικασίας λήψης των μετρήσεων

Για την πραγματοποίηση αυτής της έρευνας χρησιμοποιήθηκαν κερατοειδείς από χοίρειους οφθαλμούς, των οποίων χαρακτηριστικό είναι ότι δεν διαθέτουν μεμβράνη Bowman. Ο συνολικός χρόνος που παρήλθε από την αφαίρεση των οφθαλμών μέχρι την διεξαγωγή του πειράματος ήταν 24 ώρες. Ενώ οι συνθήκες προσομοίωναν στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό της κλινικές συνθήκες που επικρατούν κατά την επέμβαση διαθλαστικής χειρουργικής.



Σχήμα 4.4 Οφθαλμός χοίρου.

Το επιθήλιο συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της φυσιολογικής ενυδάτωσης του κερατοειδή και η αφαίρεση αυτού πριν από την διαδικασία επιφέρει ταυτόχρονη και σταδιακή αφυδάτωση του κερατοειδή¹⁷. Το επιθήλιο του κερατοειδή αφαιρέθηκε με χρήση πεπλατυσμένης σπάτουλας και η επιφάνεια καθαρίστηκε από τυχόν υπολείμματα με χρήση



Σχήμα 4.5 Διαδικασία αφαίρεσης κερατοειδή από οφθαλμό.

στεγνού χειρουργικού σπόγγου.

Οι κερατοειδείς, διαμέτρου 8mm, αφαιρέθηκαν από τους οφθαλμούς με την βοήθεια ειδικού χειρουργικού εργαλείου, ξεβγάλθηκαν με διάλυμα BSS και τοποθετήθηκε σε περιβάλλον θερμοκρασίας 23°C και σχετικής υγρασίας 44% για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, διάρκειας 2-120min.



Σχήμα 4.6 Κερατοειδής.

Τέλος οι κερατοειδείς αποξηράνθηκαν στους 62°C και σε κενό αέρος για 24 ώρες. Η ενυδάτωση του κάθε δείγματος υπολογίστηκε μέσω ζύγισης αυτού, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας με διακριτική ικανότητα 10⁻⁴gr, πριν και μετά την αποξήρανση. Από την μάζα του στερεού υπόλοιπου υπολογίστηκε η περιεκτικότητα κατά βάρος σε νερό (ενυδάτωση) για κάθε πειραματική τιμή του συνολικού βάρους σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση:



Σχήμα 4.7 Ζυγαριά ακριβείας

$$\text{Ενυδάτωση}(\%) = \frac{M_o - M_{Dry}}{M_o} \cdot 100$$

όπου M_0 είναι η μάζα του κερατοειδή σε δεδομένο χρόνο και M_{Dry} είναι η ξηρή μάζα του κερατοειδή.

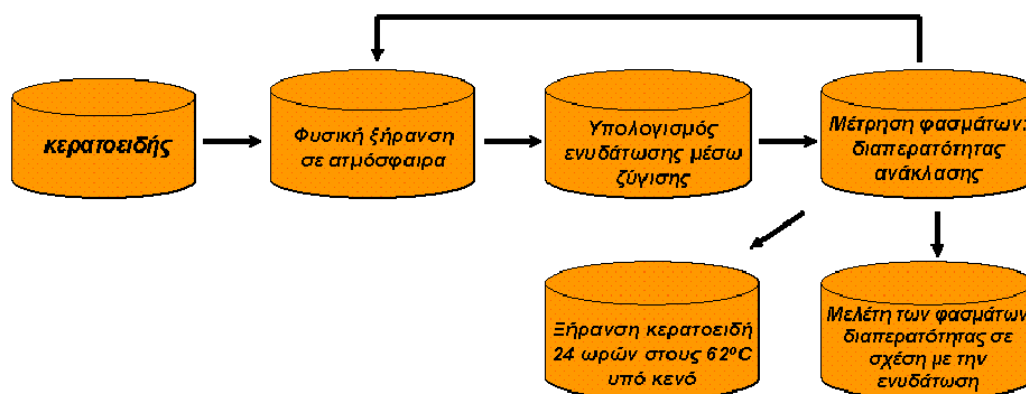
Για την στήριξη του δείγματος κατασκευάστηκε ειδικός μεταλλικός δειγματοφορέας με οπή διαμέτρου 6mm, ο οποίος συγκρατεί το δείγμα. Ο κερατοειδής τοποθετήθηκε μεταξύ δυο γυάλινων παραθύρων fused silica τα οποία δεν απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή Υπερύθρου όπου θα πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις μας.



Σχήμα4.8 Δειγματοφορέας.

Στο διάγραμμα περιγράφεται η διαδικασία εξαγωγής του πειράματος. Ο κερατοειδής αφού αφαιρεθεί από το υπόλοιπο οφθαλμό και υποστεί κατάλληλη προετοιμασία, όπως αναφέρεται παραπάνω, εκτίθεται στο περιβάλλον όπου επικρατούν συνθήκες οι οποίες προσομοιώνουν τις κλινικές συνθήκες που επικρατούν κατά την επέμβαση διαθλαστικής χειρουργικής. Μέσω ζύγισης υπολογίζεται η ενυδάτωση του κερατοειδή την προκειμένη στιγμή όπου μετρείται το φάσμα διαπερατότητας και ανάκλασής του. Η διαδικασία υπολογισμού της ενυδάτωσης και οι μετρήσεις διαπερατότητας και ανάκλασης επαναλαμβάνονται στο πέρας του χρόνου όπου έχουμε μεταβολή της ενυδάτωσης. Συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον κάθε κερατοειδή είναι η εξής:

- ❖ Υπολογίσαμε το βαθμό ενυδάτωσης μέσω ζύγισης για κάθε στάδιο ενυδάτωσης.
- ❖ Λάβαμε μετρήσεις διέλευσης και ανάκλασης, έπειτα αφήναμε το δείγμα για 5 λεπτά έτσι ώστε να αφυδατωθεί και επαναλαμβάναμε τη διαδικασία ζύγισης και μέτρησης.
- ❖ Τη διαδικασία αυτή, την επαναλάβαμε για τον κάθε οφθαλμό περίπου ανά 5 λεπτά για 1 ώρα.
- ❖ Μετά το τέλος της διεξαγωγής των μετρήσεων ο κερατοειδής αποξηραίνεται στους 62°C και σε κενό αέρος για 24 ώρες, για τον υπολογισμό της ενυδάτωσης με την χρήση της μάζας του στερεού υπόλοιπου του κερατοειδή.



Σχήμα 4.9 Διαδικασία διεξαγωγής πειράματος.

Έπειτα, από την διαδικασία των πειραματικών μετρήσεων διεξάγουμε πληροφορίες για την διαπερατότητα, την ανάκλαση και την απορρόφηση του κερατοειδή στην υπέρυθρη περιοχή. Ενώ, με τη κατάλληλη επεξεργασία των πειραματικών μετρήσεων μπορούμε να διεξάγουμε την πληροφορία της εξάρτησης της ενυδάτωσης του κερατοειδή μέσω φασματοσκοπικής διαδικασίας. Καθώς επίσης μπορούμε να συγκρίνουμε τα φάσματα διαπερατότητας, ανάκλασης και απορρόφησης του κερατοειδή σε σχέση με την ενυδάτωση τους.

Κεφάλαιο 5^ο

Πειραματικά Αποτελέσματα

5.1 Εισαγωγή

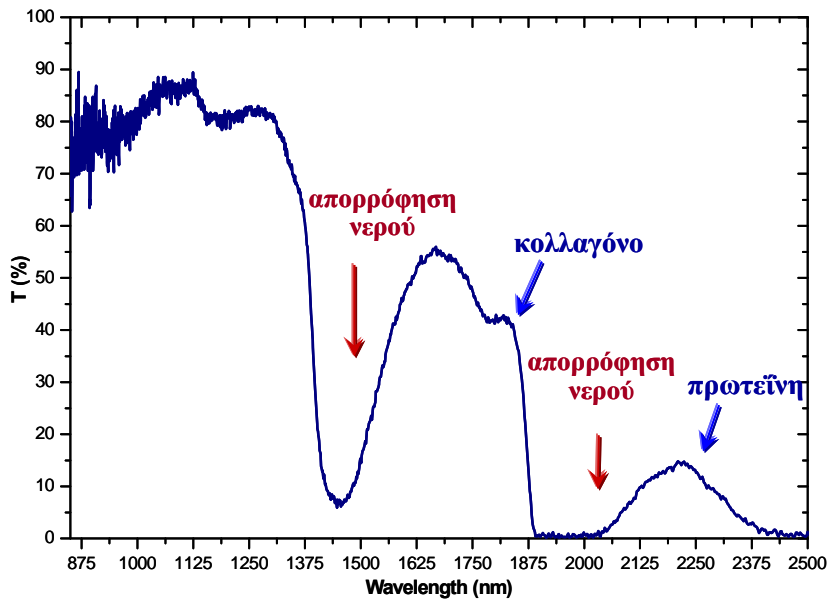
Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται τόσο τα πειραματικά αποτελέσματα της φασματοσκοπικής διαδικασίας, όσο και τα στατιστικά δεδομένα που προέκυψαν από την κατάλληλη επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων.

Μετρήθηκαν φάσματα διαπερατότητας, ανάκλασης και απορρόφησης του κερατοειδή στην υπέρυθη περιοχή σε ένα εύρος μηκών κύματος από 800 έως 2500 nm. Τα φάσματα μετρήθηκαν κατά τη διαδικασία φυσικής αφυδάτωσης του κερατοειδή σε διάφορα στάδια ενυδάτωσής του. Έπειτα μελετήθηκαν τα φάσματα διαπερατότητας έτσι ώστε να διεξάγουμε την πληροφορία της εξάρτησης της ενυδάτωσης του κερατοειδή από τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του.

Τα δείγματα, όπως αναφέρθηκε και στο τέταρτο κεφάλαιο, αποτελούσαν υγιείς κερατοειδείς από χοίρειους οφθαλμούς. Χαρακτηριστικό τους είναι η αφαίρεση του επιθηλίου πριν από την πειραματική διαδικασία έτσι ώστε να επέλθει ταυτόχρονη και σταδιακή αφυδάτωση του κερατοειδή.

5.2 Φάσματα Διέλευσης, Ανάκλασης και Απορρόφησης

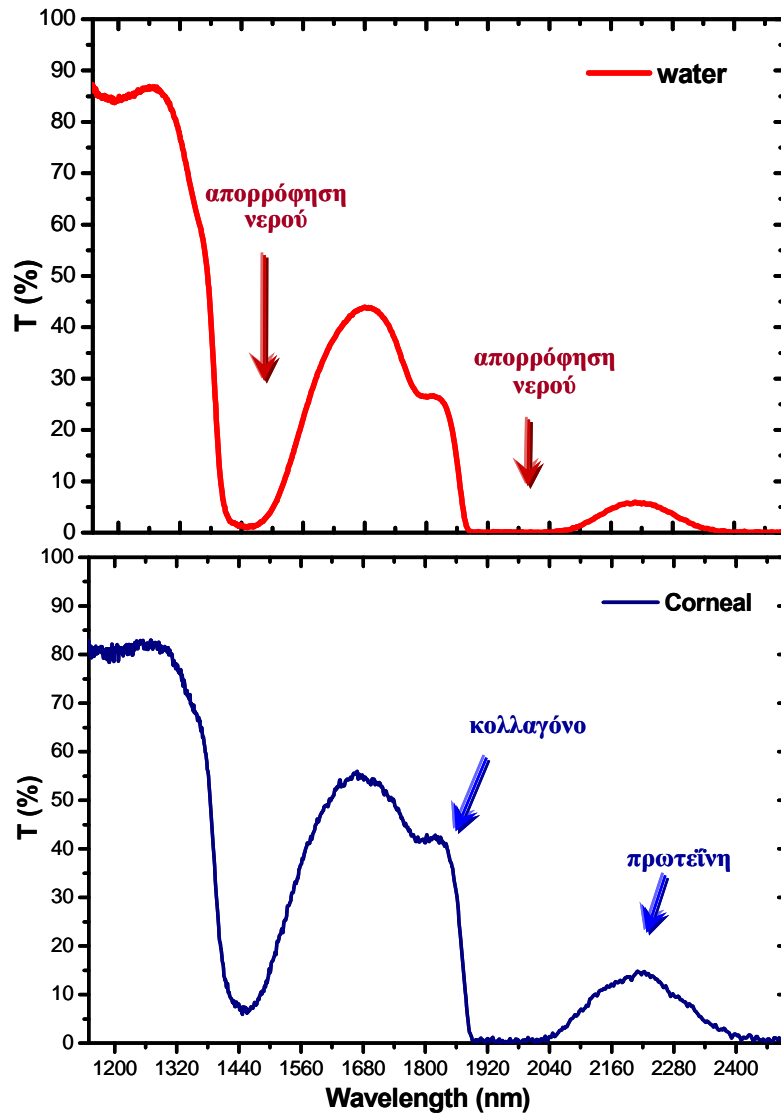
Θα παρουσιάσουμε φάσματα διέλευσης, ανάκλασης και απορρόφησης του κερατοειδή στην περιοχή του υπέρυθρου και θα εξετάσουμε την συμπεριφορά τους κατά τη διαδικασία της αφυδάτωσης. Αρχικά παρουσιάζουμε το φάσμα διέλευσης του κερατοειδή, με φυσιολογική ενυδάτωση $H = 84,67\%$, και εξετάζουμε τις κορυφές που παρουσιάζονται σε αυτό.



Σχήμα 5.1 Διάγραμμα διαπερατότητας κερατοειδή με ενυδάτωση $H=84,67\%$ στην περιοχή του υπερύθρου.

Στο Σχήμα 5.1 φαίνεται ένα τυπικό φάσμα διαπερατότητας κερατοειδή με φυσιολογική ενυδάτωση, όπως προέκυψε από την πειραματική διαδικασία. Παρατηρούμε τις περιοχές απορρόφησης νερού: 1450 nm και 1925 nm, καθώς και την η κορυφή η οποία είναι επηρεασμένη από κολλαγόνο: 1820 nm και την κορυφή η οποία είναι επηρεασμένη από πρωτεΐνη: 2230 nm όπως έχει αναφερθεί από τους James Douth et al,¹⁸ 2007.

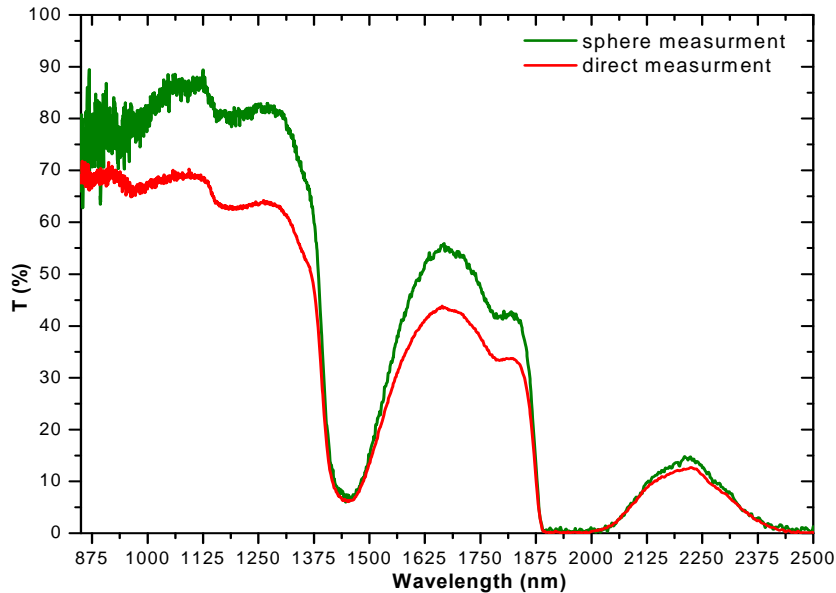
- ✚ Όπως προαναφέραμε στο πρώτο κεφάλαιο ο κερατοειδής αποτελείται τυπικά από 78% από νερό. Οπότε συγκρίνοντας τα φάσματα διαπερατότητας T (%) του κερατοειδή σε σύγκριση με του νερού θα δούμε τις διαφορές που παρουσιάζουν τα φάσματα διαπερατότητάς τους.



Σχήμα 5.2 Σύγκριση φασμάτων διαπερατότητας T (%) κερατοειδή με φυσιολογική ενυδάτωση H (84,67%) και νερού ισοδύναμου πάχους.

Παρατηρούμε ότι τα φάσματα διαπερατότητας του κερατοειδή και το φάσμα ισοδύναμου πάχους νερού, διαφέρουν στα 1250 nm λόγω σκέδασης. Ενώ η κορυφή στα 1820 nm είναι επηρεασμένη από το κολλαγόνο του κερατοειδή και η κορυφή 2230 nm είναι επηρεασμένη από πρωτεΐνη του κερατοειδή, όπως προκύπτει από την βιβλιογραφία.¹⁸

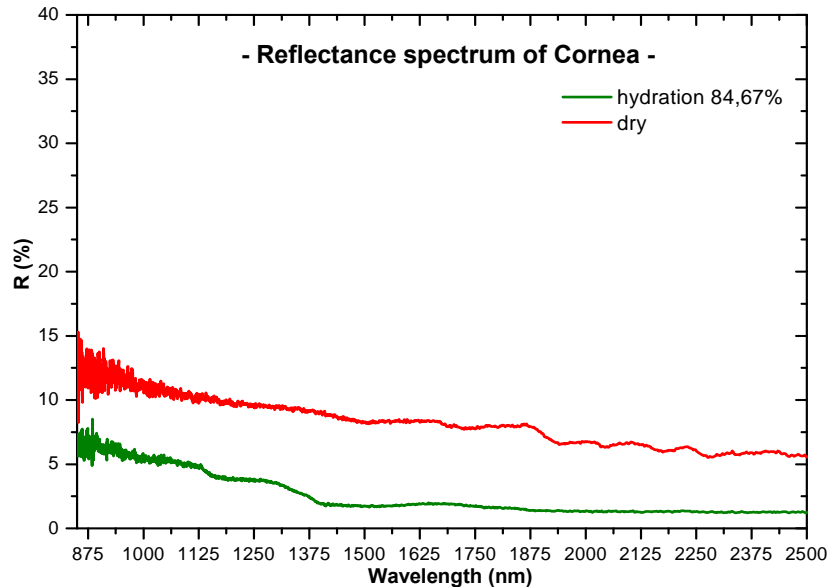
- ✚ Έπειτα συγκρίνουμε τα φάσματα διαπερατότητας του κερατοειδή με φυσιολογική ενυδάτωση H (84,67%) σε μέτρηση ελεύθερης διάδοσης και σε χρήση σφαίρας ολοκλήρωσης.



Σχήμα 5.3 Σύγκριση φασμάτων διαπερατότητας T (%) του κερατοειδή με ενυδάτωση H=84,67% σε μέτρηση με και χωρίς σφαίρα ολοκλήρωσης.

Παρατηρούμε ότι το φάσμα διαπερατότητας με την χρήση σφαίρας ολοκλήρωσης παρουσιάζει υψηλότερη ένταση στις κορυφές έως 1300nm (κοντά στο ορατό) και στην κορυφή 1700 nm. Το γεγονός αυτό προκύπτει διότι κατά τη μέτρηση με τη χρήση της σφαίρας ολοκλήρωσης η σκεδαζόμενη ακτινοβολία συνυπολογίζεται ως διερχόμενη ακτινοβολία. Επομένως έχουμε μεγαλύτερη ένταση διαπερατότητας με τη χρήση σφαίρας ολοκλήρωσης.

- ✚ Σύγκριση φασμάτων Ανάκλασης R (%) κερατοειδή κατά την διαδικασία φυσικής ξήρανσης στην ατμόσφαιρα. Στο παρακάτω διάγραμμα συγκρίνονται τα φάσματα ανάκλασης κερατοειδή με φυσιολογική ενυδάτωση H=84,67% και του πλήρως αφυδατωμένου κερατοειδή.



Σχήμα 5.4 Σύγκριση φασμάτων ανακλαστικότητας R (%) του κερατοειδή με ενυδάτωση H=84,67% και του πλήρως αφυδατωμένου δείγματος.

Κατά τη μέτρηση της ανακλώμενης ακτινοβολίας του κερατοειδή παρατηρείται ανακλαστικότητα (3 – 7) % στο δείγμα με φυσιολογική ενυδάτωση H (84,67 %), ενώ στο πλήρες αφυδατωμένο δείγμα παρατηρείται ανακλαστικότητα (5 – 12)%. Η αύξηση της ανακλαστικότητας του αφυδατωμένου κερατοειδή οφείλεται κυρίως στην αύξηση του δείκτη διάθλασης του κερατοειδή λόγω της αφυδάτωσης.

Η ανακλαστικότητα δίνεται από την σχέση: $R = \left(\frac{n-1}{n+1} \right)^2 \Rightarrow \sqrt{R} * n + \sqrt{R} = n - 1$

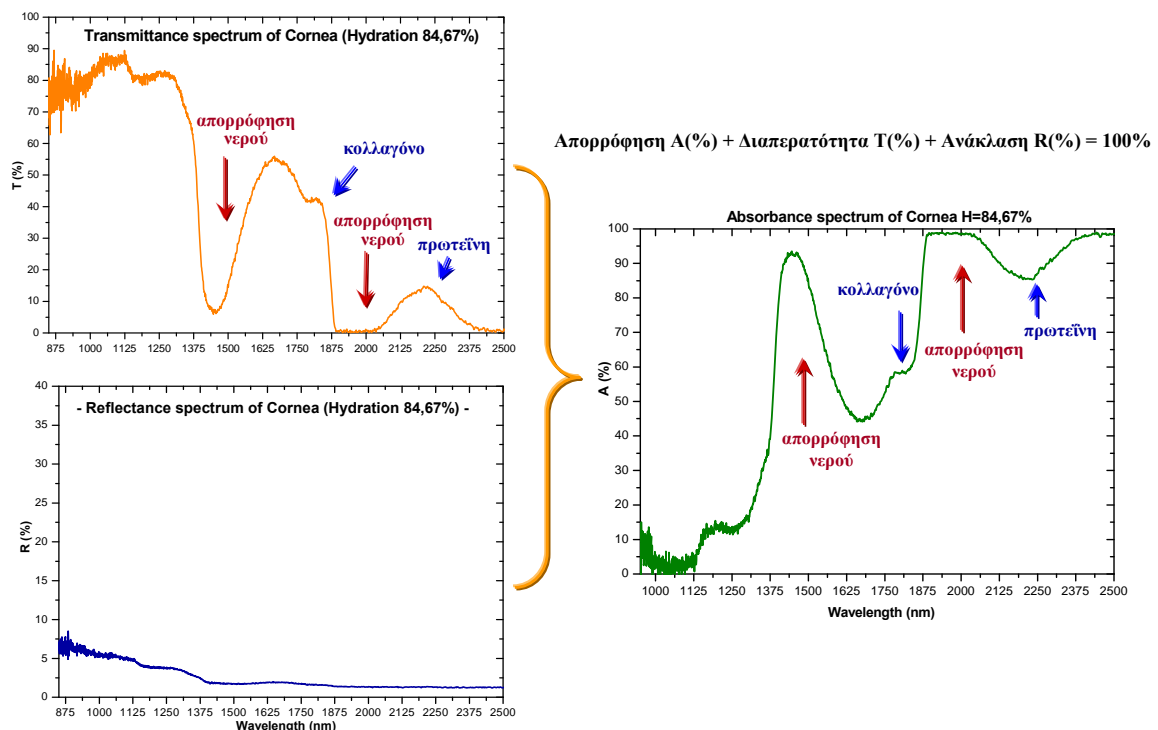
Οπότε ο δείκτης διάθλασης προκύπτει από την παραπάνω σχέση: $n = \frac{\sqrt{R} + 1}{1 - \sqrt{R}}$

Για ανακλαστικότητα 7% ο δείκτης διάθλασης υπολογίζεται: $n = \frac{\sqrt{0,07} + 1}{1 - \sqrt{0,07}} \Rightarrow n \approx 1,7$



Ο δείκτης διάθλασης του κερατοειδή με φυσιολογική ενυδάτωση Η (84,67 %) κυμαίνεται $n' \approx 1,376$.¹⁹ Όμως ο δείκτης διάθλασης πλήρως αφυδατωμένου κερατοειδή με ανακλαστικότητα 7% υπολογίζεται $n \approx 1,7$. Λόγω αυτής της σημαντικής αύξησης του δείκτη διάθλασης κατά την πλήρη αφυδάτωση παρατηρείται σημαντική αύξηση της ανακλαστικότητας του αφυδατωμένου κερατοειδή.

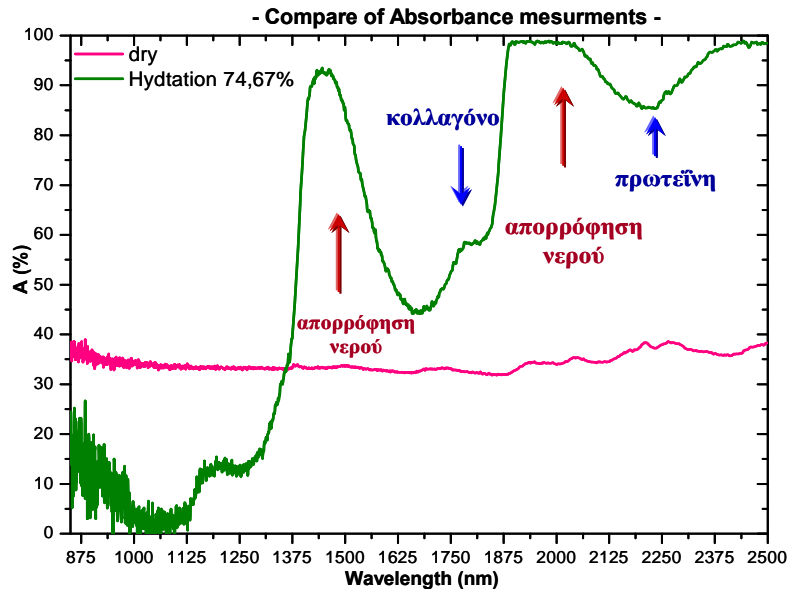
- Υπολογισμός φάσματος απορρόφησης κερατοειδή μέσω της χρήσης φασμάτων διέλευσης και ανάκλασης του κερατοειδή.



Σχήμα 5.5 Υπολογισμός φάσματος απορρόφησης κερατοειδή μέσω της χρήσης φασμάτων διέλευσης και ανάκλασης του κερατοειδή με φυσιολογική ενυδάτωση Η (84,67%).

Η ανακλαστικότητα του κερατοειδή με φυσιολογική ενυδάτωση Η (84,67%) κυμαίνεται 3 – 7 %, ποσοστό αρκετά μικρό. Επίσης η ανακλαστικότητα παρουσιάζει μια μονοτονική πτώση όπως αυξάνεται το μήκος κύματος, χωρίς έντονα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά. Κατά συνέπεια η ανακλαστικότητα δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τον ποιοτικά το φάσμα απορρόφησης, το οποίο θα είναι πρακτικά σχεδόν αντίστροφο από το φάσμα διαπερατότητας.

- ✚ Σύγκριση φασμάτων Απορρόφησης κερατοειδή κατά την διαδικασία φυσικής ξήρανσης στην ατμόσφαιρα. Στο παρακάτω διάγραμμα συγκρίνονται τα φάσματα ανάκλασης κερατοειδή με ενυδάτωση $H=74,67\%$ και του πλήρως αφυδατωμένου κερατοειδή.

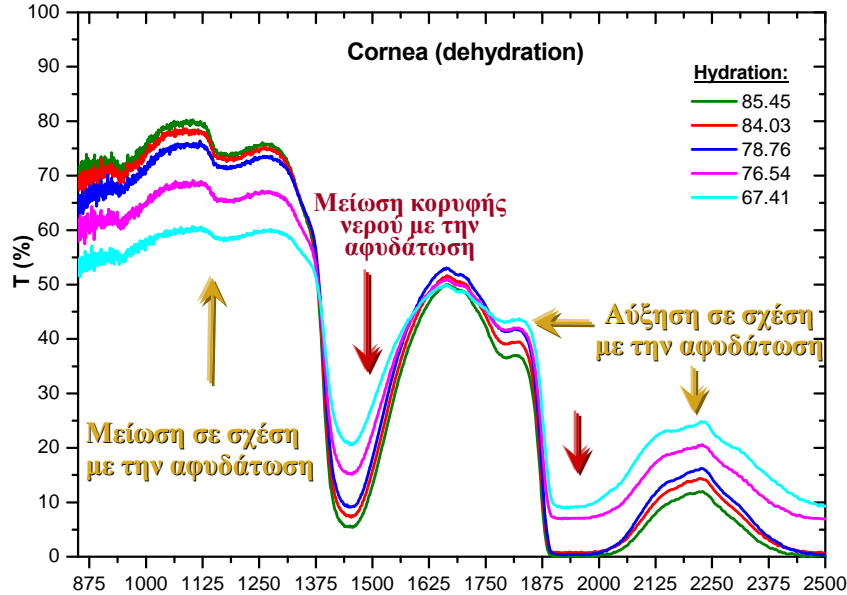


Σχήμα 5.6 Σύγκριση φασμάτων ανάκλασης A (%) του κερατοειδή με ενυδάτωση $H=74,67\%$ και του πλήρως αφυδατωμένου δείγματος.

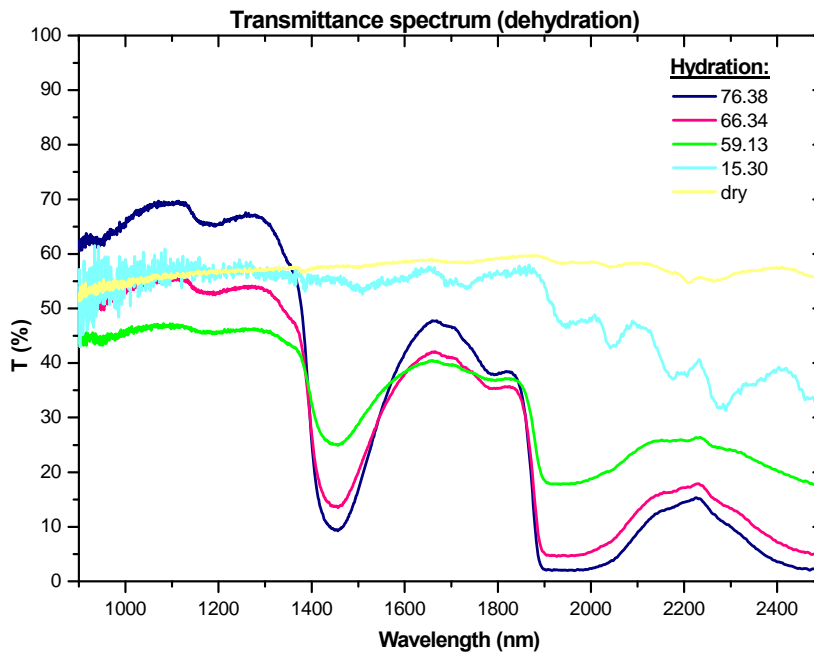
Στο φάσμα απορρόφησης του ενυδατωμένου H (74,67%) κερατοειδή που υπολογίστηκε, παρατηρούμε τις γνωστές από την βιβλιογραφία, ζώνες απορρόφησης νερού: 1450 nm και 1925 nm. Ενώ οι ζώνες που επηρεάζονται από το κολλαγόνο 1820 nm και από την πρωτεΐνη 2230 nm εμφανίζονται ως περιοχές μειωμένης απορρόφησης. Στο φάσμα απορρόφησης του πλήρως αφυδατωμένου δείγματος παρατηρούμε σχεδόν σταθερή απορρόφηση A (40%) σε όλο το φάσμα.



- ✚ Μελέτη συμπεριφοράς του φάσματος Διαπερατότητας του κερατοειδή μέσω σύγκριση των κορυφών του φάσματος κατά την διαδικασία φυσικής ξήρανσης στην ατμόσφαιρα.



Σχήμα 5.7 α) Σύγκριση φασμάτων διαπερατότητας T (%) του κερατοειδή με μεταβολή της ενυδάτωσης (85,45 – 67,41)%

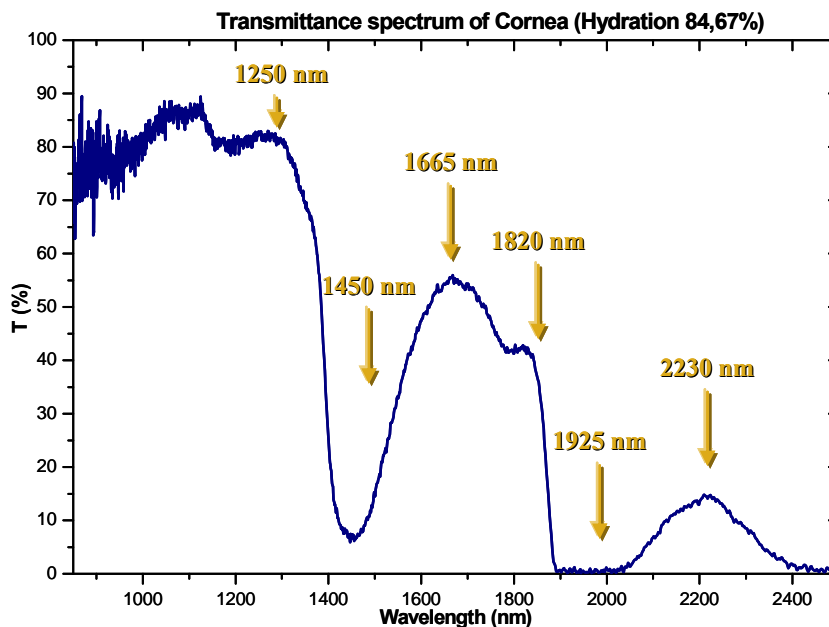


Σχήμα 5.7 β) Σύγκριση φασμάτων διαπερατότητας T (%) του κερατοειδή με μεταβολή της ενυδάτωσης 76,38 % έως την πλήρες αφυδάτωση του κερατοειδή.

Κατά τη φυσική ξήρανση του κερατοειδή στην ατμόσφαιρα, παρατηρείται μια διαφοροποίηση στην αναλογία των κορυφών που εμφανίζονται στα φάσματα διαπερατότητας. Η μείωση των ζωνών απορρόφησης του νερού: 1450 nm και 1925 nm, οφείλεται στο γεγονός της αφυδάτωσης του κερατοειδή και επομένως στην μείωση του ποσοστού του νερού εντός του κερατοειδή. Ενώ κατά την πλήρη αφυδάτωση η διαπερατότητα του κερατοειδή εμφανίζει σε όλο το φάσμα σταθερό ποσοστό απορρόφησης ~60%. Το φάσμα του πλήρως αφυδατωμένου κερατοειδή είναι ανεξάρτητο από το φάσμα του νερού και εξαρτάται μόνο από δηλαδή τις ίνες κολλαγόνου, τις πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα στοιχεία του κερατοειδή.

5.3 Ποιοτική Ανάλυση των Φασμάτων Διέλευσης

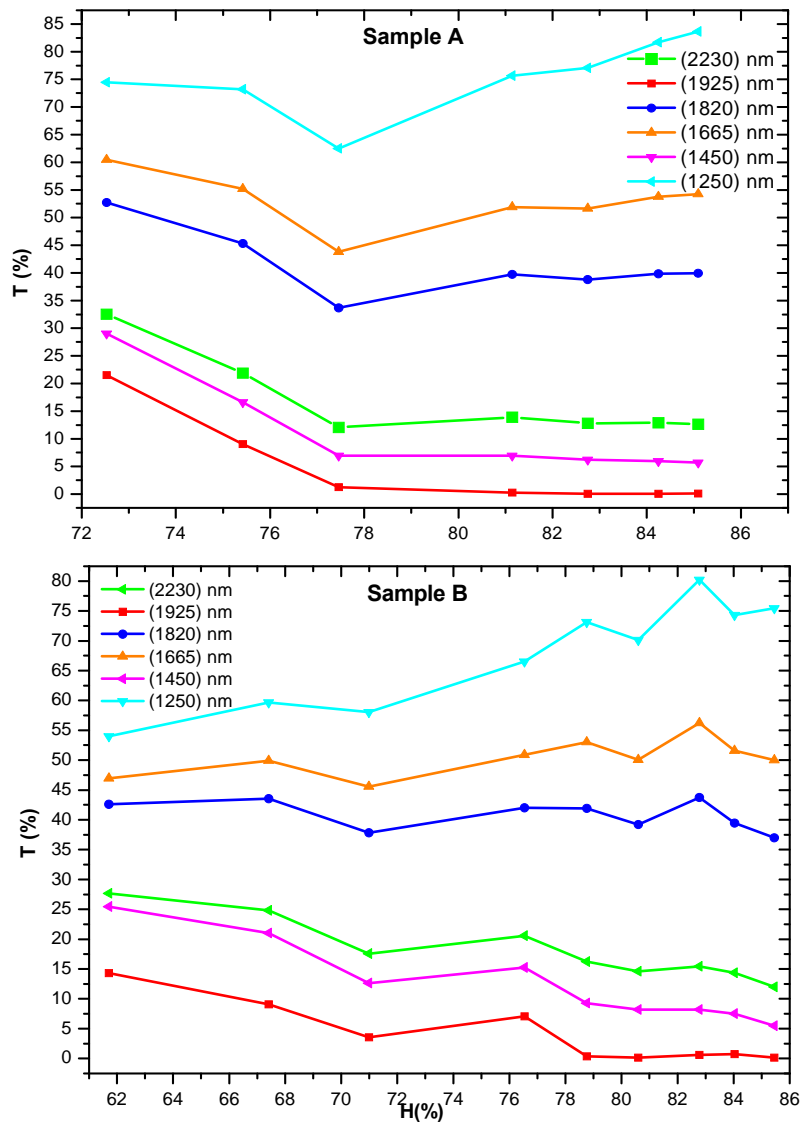
- ✚ Εξετάζοντας ποιοτικά την μεταβολή του φάσματος διαπερατότητας κατά τη φυσική ξήρανση του κερατοειδή στην ατμόσφαιρα παρατηρούμε μια διαφοροποίηση στην αναλογία των κορυφών που εμφανίζονται στα φάσματα διαπερατότητας, ανάλογα με τον βαθμό ενυδάτωσης των δειγμάτων.



Σχήμα 5.8 Περιοχές του φάσματος διαπερατότητας T (%) του κερατοειδή οι οποίες θα εξεταστούν κατά την μεταβολή της ενυδάτωσης του κερατοειδή.



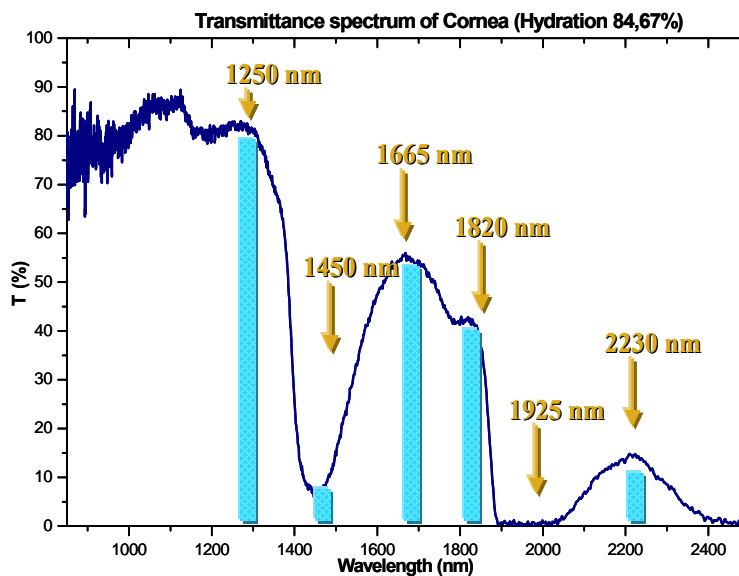
Θέλοντας να μελετήσουμε την συμπεριφορά των κορυφών του φάσματος, μετρήσαμε 10 κερατοειδείς από χοίρειους οφθαλμούς κατά την διαδικασία φυσικής αφυδάτωσης στην ατμόσφαιρα. Έπειτα, παραστήσαμε γραφικά την εξάρτηση των επιλεγμένων περιοχών του φάσματος διαπερατότητας από την ενυδάτωση $H(\%)$. Παρακάτω βλέπουμε το γράφημα της εξάρτησης των κορυφών για δυο από τα δείγματα που μελετήθηκαν.



Σχήμα 5.9 Εξάρτηση κορυφών του φάσματος διαπερατότητας από την ενυδάτωση $H(\%)$ για δυο από τα δείγματα που μελετήθηκαν.

Παρατηρούμε ότι η εξάρτηση των κορυφών του φάσματος διαπερατότητας από την ενυδάτωση $H(\%)$ παρουσιάζει μια «συστηματική» συμπεριφορά. Δηλαδή, όλες οι επιλεγμένες περιοχές του φάσματος έχουν παρόμοια συμπεριφορά κατά την αφυδάτωση.

- ✚ Για να ποσοτικοποιήσουμε την «συστηματική» αυτή εξάρτηση των επιλεγμένων φασματικών περιοχών από την ενυδάτωση υπολογίστηκε το εμβαδόν των περιοχών που περικλείουν οι περιοχές και εν συνεχεία υπολογίστηκαν διάφοροι δείκτες χρησιμοποιώντας τις τιμές αυτές.



Σχήμα 5.10 Φασματικές περιοχές για τις οποίες υπολογίστηκαν τα εμβαδά.

Τα εμβαδά των επιλεγμένων φασματικών περιοχών υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας ολοκληρώματα της μορφής:

$$\text{Π.χ. για την κορυφή } 1250\text{nm: } I_{1250} = \int_{1244}^{1255} I(l)dl$$

Με τον υπολογισμό των εμβαδών των περιοχών που περικλείουν οι κορυφές και την χρήση διαφόρων λόγων τους (Δείκτες), καταφέρνουμε να εξαλείψουμε τα σφάλματα που επιφέρει η πειραματική διαδικασία στις μετρήσεις.

Επιλέξαμε κορυφές με αρκετά υψηλή ένταση διαπερατότητας έτσι ώστε να είναι μετρήσιμη η μεταβολή της έντασης κατά την διαδικασία αφυδάτωσης. Μελετήσαμε την μεταβολή



κορυφών γνωστές από τη βιβλιογραφία, όπως η κορυφή στα 1820 nm η οποία είναι επηρεασμένη από το κολλαγόνο του κερατοειδή και η κορυφή 2230 nm η οποία είναι επηρεασμένη από πρωτεΐνη του κερατοειδή. Με τον τρόπο καταφέραμε να μελετήσουμε την ποιοτική συμπεριφορά των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών κατά τη διαδικασία της αφυδάτωσης.

- ✚ Μετά τον υπολογισμό των εμβαδών των περιοχών που περικλείουν οι κορυφές, εν συνεχεία υπολογίστηκαν οι διάφοροι λόγοι τους (Δείκτες):

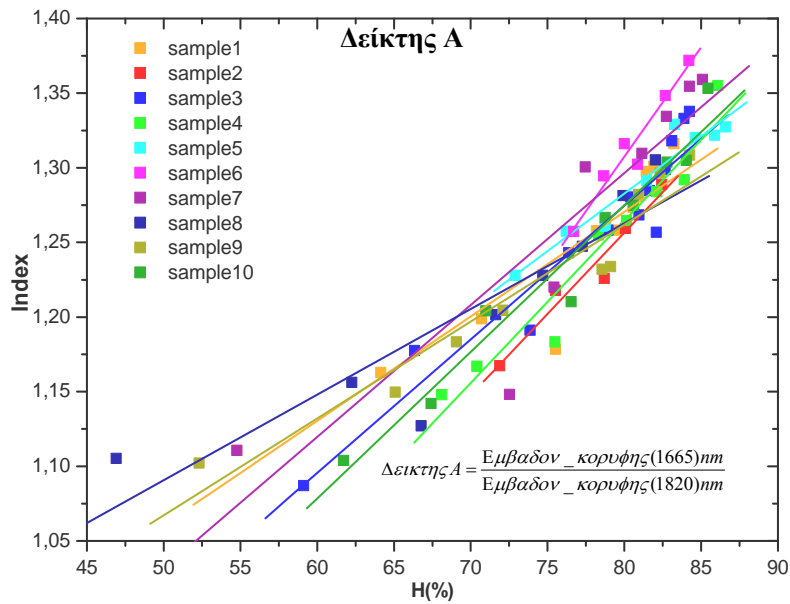
$$\Delta\epsilon\iota\kappa\tau\eta\varsigma A = \frac{\text{Εμβαδον_κορυφης}(1665)nm}{\text{Εμβαδον_κορυφης}(1820)nm}$$

$$\Delta\epsilon\iota\kappa\tau\eta\varsigma B = \frac{\text{Εμβαδον_κορυφης}(2230)nm}{\text{Εμβαδον_}(κορυφων)nm}$$

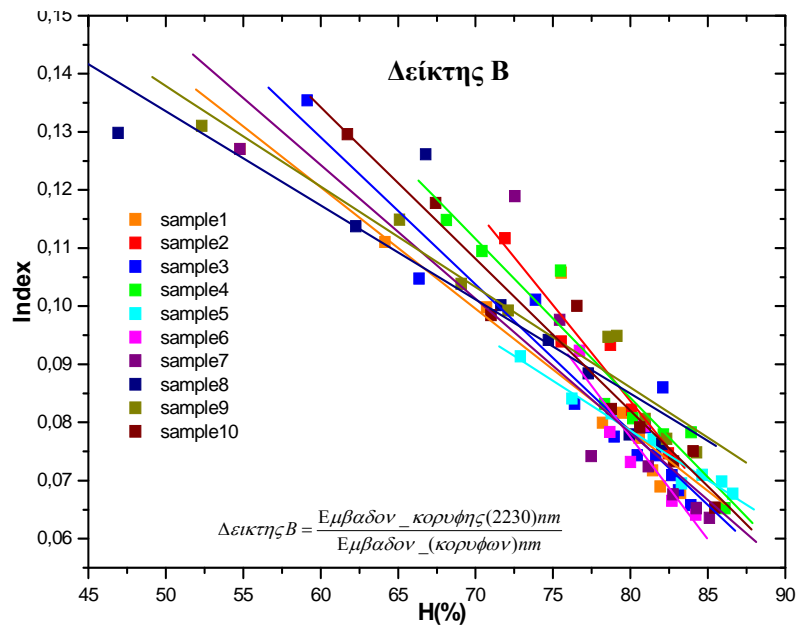
$$\Delta\epsilon\iota\kappa\tau\eta\varsigma C = \frac{\text{Εμβαδον}(κορυφης(1665)nm + κορυφης(1820)nm)}{\text{Εμβαδον}(κορυφης(1665)nm - κορυφης(1820)nm)}$$

- Ο Δείκτης A προκύπτει από το λόγο της σταθερής κορυφής στα 1665 nm και της κορυφής στα 1820 nm η οποία είναι επηρεασμένη από το κολλαγόνο του κερατοειδή.
- Ο Δείκτης B προκύπτει από το λόγο της κορυφής 2230 nm η οποία είναι επηρεασμένη από πρωτεΐνη του κερατοειδή ως προς το άθροισμα όλων των κορυφών (1250 nm, 1450 nm, 1665 nm, 1820 nm, 1925 nm, 2230 nm).
- Ο Δείκτης C προκύπτει από το λόγο του αθροίσματος ως προς την διαφορά, της σταθερής κορυφής στα 1665 nm και της κορυφής στα 1820 nm η οποία είναι επηρεασμένη από το κολλαγόνο του κερατοειδή.

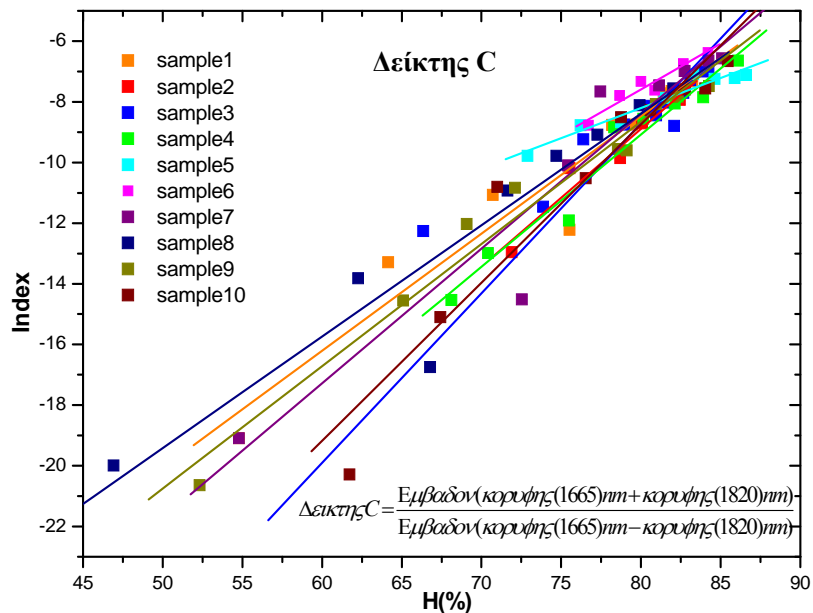
- ✚ Στην συνέχεια κατασκευάστηκαν οι γραφικές παραστάσεις των Δεικτών συναρτήσει του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδή για το κάθε δείγμα. Εφαρμόσαμε γραμμική προσαρμογή του κάθε Δείκτη για όλο το εύρος της ενυδάτωσης. Σε κάθε γράφημα παρατηρούμε την συμπεριφορά του κάθε Δείκτη για τους 10 κερατοειδείς που μελετήθηκαν:



Σχήμα 5.11 α) Γραφική παράσταση Δείκτη Α του φάσματος διαπερατότητας συναρτήσει της ενυδάτωσης του κάθε δείγματος.



Σχήμα 5.11 β) Γραφική παράσταση Δείκτη Β του φάσματος διαπερατότητας συναρτήσει της ενυδάτωσης του κάθε δείγματος.



Σχήμα 5.11 γ) Γραφική παράσταση Δείκτη C του φάσματος διαπερατότητας συναρτήσει της ενυδάτωσης του κάθε δείγματος.

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται συστηματική εξάρτηση του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδούς με τους φασματοσκοπικούς δείκτες. Αν θεωρήσουμε ότι, τουλάχιστον σε μία περιοχή ενυδάτωσης, η σχέση μεταξύ Δεικτών και ενυδάτωσης είναι γραμμική μπορούμε και εφαρμόζουμε γραμμική προσαρμογή στα δεδομένα μας. Εφαρμόζουμε γραμμική προσαρμογή του κάθε Δείκτη για όλο το εύρος της ενυδάτωσης και συγκεκριμένα για την περιοχή που περικλείει την φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς H (87% – 73%). Επίσης υπολογίσαμε το στατιστικό λάθος των δεικτών για όλο το εύρος της ενυδάτωσης και για την περιοχή που περικλείει την φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς H (87% – 73%).

Υπολογίζουμε λοιπόν, μέσω γραμμικής προσαρμογής του κάθε Δείκτη, την συνάρτηση που μας δίνει την ενυδάτωση του κερατοειδή και το στατιστικό λάθος των δεικτών για όλο το εύρος της ενυδάτωσης.

Συγκεκριμένα, για όλο το εύρος της ενυδάτωσης έχουμε:

➤ για τον Δείκτη A:

$$\text{Hydration} = 106,18786 * \text{Index} - 56,06667 \quad \text{και} \quad R_A = 0,91761$$

➤ για τον Δείκτη B:

$$\text{Hydration} = -397,46432 * \text{Index} + 111,64729 \quad \text{και} \quad R_B = -0,92507$$

➤ για τον Δείκτη C:

$$\text{Hydration} = 2,08339 * \text{Index} + 97,46828 \quad \text{και} \quad R_B = 0,93758$$

Παρατηρούμε ότι έχουμε μικρό στατιστικό λάθος για όλους τους Δείκτες οπότε έχουμε καλή γραμμική προσαρμογή των Δεικτών για όλο το εύρος της ενυδάτωσης.

✚ Έπειτα, υπολογίζουμε μέσω γραμμικής προσαρμογής του κάθε Δείκτη, την συνάρτηση που μας δίνει την ενυδάτωση του κερατοειδή και το στατιστικό λάθος των δεικτών για το εύρος της ενυδάτωσης που περικλείει την φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς Η (87% – 73%).

Για την περιοχή που περικλείει την φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς Η (87% – 73%) έχουμε:

➤ για τον Δείκτη A:

$$\text{Hydration}' = 67,39732 * \text{Index}' - 5,92945 \quad \text{και} \quad R_A' = 0,82737$$

➤ για τον Δείκτη B:

$$\text{Hydration}' = -346,66447 * \text{Index}' + 107,60604 \quad \text{και} \quad R_B' = -0,91793$$

➤ για τον Δείκτη C:

$$\text{Hydration}' = 2,7434 * \text{Index}' + 103,02681 \quad \text{και} \quad R_B' = 0,8721$$

Το στατιστικό λάθος της μεθόδου υπολογισμού του κάθε Δείκτη για όλο το εύρος της ενυδάτωσης και για την περιοχή που περικλείει την φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς Η (87% – 73%), υπολογίζεται από την σχέση:

$$StatisticError = \frac{H - (A \cdot Index + B)}{(A \cdot Index + B)}$$

Επομένως το στατιστικό λάθος για τον κάθε Δείκτη προκύπτει:

➤ για τον Δείκτη Α:

για όλο το εύρος της ενυδάτωσης: Sd= 4,8%

για Η (87% – 73%): Sd= 2,6%

➤ για τον Δείκτη Β:

για όλο το εύρος της ενυδάτωσης: Sd= 4,7%

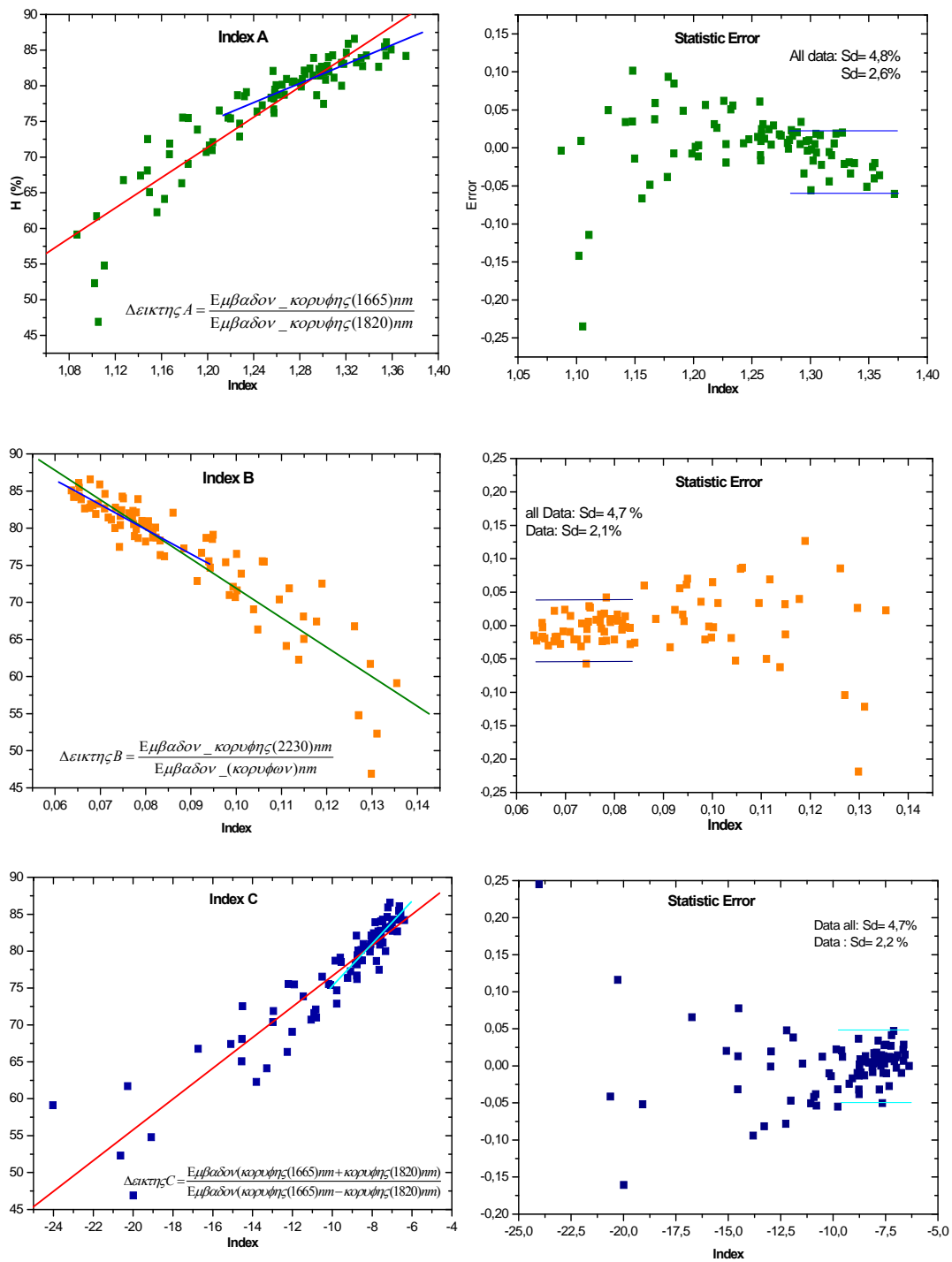
για Η (87% – 73%): Sd= 2,1%

➤ για τον Δείκτη C:

για όλο το εύρος της ενυδάτωσης: Sd= 4,7%

για Η (87% – 73%): Sd= 2,2%

Στα παρακάτω γραφήματα παρατηρούμε την ενυδάτωση Η(%) συναρτήσει των Δεικτών (αριστερό γράφημα) καθώς και το στατιστικό λάθος της μεθόδου συναρτήσει των Δεικτών (δεξί γράφημα).



Σχήμα 5.12 Γραφική παράσταση της ενυδάτωσης H(%) συναρτήσει των Δεικτών του φάσματος διαπερατότητας όλων των δειγμάτων καθώς και το στατιστικό λάθος.

Παρατηρούμε ότι η γραμμική προσαρμογή του κάθε Δείκτη για όλο το εύρος της ενυδάτωσης και συγκεκριμένα για την περιοχή που περικλείει την φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς Η (87% – 73%) έχουν μικρή απόκλιση.

Το στατιστικό λάθος που υπολογίσαμε για όλο το εύρος της ενυδάτωσης των Δεικτών κυμαίνεται στα 4,7%. Ενώ το στατιστικό λάθος συγκεκριμένα για την περιοχή που περικλείει την φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς Η (87% – 73%) κυμαίνεται για όλους τους Δείκτες (2,1% – 2,6 %). Το στατιστικό λάθος για την περιοχή ενδιαφέροντος δηλαδή την περιοχή φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς είναι ικανοποιητικό για τις κλινικές εφαρμογές.

Μετά τον υπολογισμό των διαφόρων Δεικτών και την στατιστική μελέτη αυτών, επιλέγουμε των Δείκτη Α ο οποίος έχει μικρό στατιστικό σφάλμα και είναι ο πιο εύχρηστος στον υπολογισμό του.

Με την εφαρμογή της γραμμικής προσαρμογής στο γράφημα της ενυδάτωσης Η(%) συναρτήσει των Δεικτών, προκύπτει:

$$\text{Hydration} = A * \text{Index} + B$$

- ❖ Εφαρμόζοντας γραμμική προσαρμογή για την περιοχή που περικλείει την φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς Η (87% – 73%):

$$\text{Hydration} = 67,39732 * \text{Index} - 5,92945$$

$$R=0,82737$$

- ❖ Εφαρμόζοντας γραμμική προσαρμογή για όλο το εύρος της ενυδάτωσης:

$$\text{Hydration} = 106,18786 * \text{Index} - 56,06667$$

$$R=0,91761$$

Παρατηρούμε λοιπόν, ότι ανάλογα με τον βαθμό του Index που προκύπτει από την μέτρηση μας, μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό της ενυδάτωσης του κερατοειδή ως εξής:

- $\text{Index} \geq 1,3 \Rightarrow \text{Hydration} = 67,39732 * \text{Index} - 5,92945$
τότε η ενυδάτωση H(%) είναι $H \geq 83\%$
- $\text{Index} < 1,3 \Rightarrow \text{Hydration} = 106,18786 * \text{Index} - 56,06667$
τότε η ενυδάτωση H(%) είναι $H < 83\%$

Παρατηρούμε, ότι μέσω του Δείκτη μπορούμε να υπολογίσουμε την ενυδάτωση H(%) του κερατοειδή. Για $\text{Index} \geq 1,3$ η ενυδάτωση H(%) που προκύπτει είναι $H \geq 83\%$, ενώ για $\text{Index} < 1,3$ η ενυδάτωση H(%) είναι $H < 83\%$. Καταφέραμε, λοιπόν, μέσω των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών της διαπερατότητας του κερατοειδή να προσδιορίσουμε την τιμή της ενυδάτωσης του κερατοειδούς με σφάλμα της τάξεως 2%.



Συμπεράσματα

Αρχικά καταγράφηκαν και μελετήθηκαν τα φάσματα διέλευσης, ανάκλασης και απορρόφησης του κερατοειδή στην περιοχή του εγγύς Υπερύθρου.

Συγκεκριμένα, στο τυπικό φάσμα διαπερατότητας, όπως προέκυψε από την πειραματική διαδικασία, παρατηρούμε: **α)** τις περιοχές απορρόφησης νερού: 1450 nm και 1925 nm, **β)** την κορυφή η οποία είναι επηρεασμένη από κολλαγόνο: 1820 nm καθώς και **γ)** την κορυφή η οποία είναι επηρεασμένη από πρωτεΐνη: 2230 nm όπως έχει αναφερθεί από τους James Douth et al, 2007.

Έπειτα, μελετήθηκε η συμπεριφοράς του φάσματος διέλευσης του κερατοειδή μέσω σύγκρισης των κορυφών του φάσματος κατά την διαδικασία φυσικής ξήρανσης στην ατμόσφαιρα. Εξετάζοντας ποιοτικά την μεταβολή του φάσματος παρατηρούμε μια διαφοροποίηση στην αναλογία των κορυφών που εμφανίζονται στα φάσματα διαπερατότητας, ανάλογα με τον βαθμό ενυδάτωσης των δειγμάτων.

Συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι η εξάρτηση των κορυφών του φάσματος διαπερατότητας από την ενυδάτωση H(%) παρουσιάζει μια «συστηματική» συμπεριφορά. Δηλαδή, όλες οι επιλεγμένες περιοχές του φάσματος έχουν παρόμοια συμπεριφορά κατά την αφυδάτωση. Για να ποσοτικοποιήσουμε την «συστηματική» αυτή εξάρτηση των επιλεγμένων φασματικών περιοχών από την ενυδάτωση υπολογίστηκε το εμβαδό των περιοχών που περικλείουν οι περιοχές και εν συνεχεία υπολογίστηκαν διάφοροι δείκτες χρησιμοποιώντας τις τιμές αυτές.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την γραμμική προσαρμογή στα δεδομένα μας προέκυψε συσχέτιση, Hydration = A*Index + B μέσα από την οποία μπορεί να προσδιοριστεί ο βαθμός ενυδάτωσης του κερατοειδούς.

Ανάλογα με την τιμή του δείκτη ο οποίος δίνεται από την σχέση:

$$\Delta\text{εικτης } A = \frac{\text{Εμβαδον_κορυφης}(1665)\text{nm}}{\text{Εμβαδον_κορυφης}(1820)\text{nm}}$$

μπορούμε να προσδιορίσουμε την τιμή της ενυδάτωσης του κερατοειδούς με σφάλμα της τάξεως 2%.

Επομένως, για την περιοχή που περικλείει την φυσιολογική ενυδάτωση του κερατοειδούς Η (87% – 73%):

- $\text{Index} \geq 1,3 \Rightarrow \text{Hydration} = 67,39732 * \text{Index} - 5,92945$
η ενυδάτωση Η(%) είναι $H \geq 83\%$

Ενώ για όλο το εύρος της ενυδάτωσης ισχύει:

- $\text{Index} < 1,3 \Rightarrow \text{Hydration} = 106,18786 * \text{Index} - 56,06667$
η ενυδάτωση Η(%) είναι $H < 83\%$

Εκτιμάται, λοιπόν, ότι μέσω του Δείκτη μπορούμε να υπολογίσουμε την ενυδάτωση Η(%) του κερατοειδή. Για $\text{Index} \geq 1,3$ η ενυδάτωση Η(%) που προκύπτει είναι $H \geq 83\%$, ενώ για $\text{Index} < 1,3$ η ενυδάτωση Η(%) είναι $H < 83\%$.

Αποτέλεσμα της μελέτης αυτής είναι η διεξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων που αφορούν την συσχέτιση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών με το βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδούς.

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, πιστεύεται ότι είναι σκόπιμη, η περαιτέρω διερεύνηση των φασμάτων διαπερατότητας του κερατοειδούς στο εγγύς Υπέρυθρο, με απώτερο σκοπό την κατασκευή συστήματος εκτίμησης της ενυδάτωσης του κερατοειδή in vivo.



Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. <http://www.optics.rochester.edu/workgroups/cml/opt307/spr05/anant/>
2. Διάλεξη ομιλίας Χαρίλαου Γκίνη στα πλαίσια διδασκαλίας του τμήματος «Οπτική και Όραση»
3. Daxer A, Misof K, Grabner B, Ettl A, Fratzl P., "Collagen fibrils in the human corneal stroma: Structure and aging." Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998 Mar; 39 (3) : 644-8
4. David F. Holmes, Christopher J. Gilpin, Clair Baldock, Ulrike Ziesedagger, Abraham J. Kosterdagger , Karl E. Kadler, "Corneal collagen fibril structure in three dimensions: Structural insights into fibril assembly, mechanical properties, and tissue organization." PNAS June 19, 2001, vol. 98, no. 13, 7307-7312
5. Dougherty PJ, Wellish KL, Maloney RK. "Excimer laser ablation rate and corneal hydration." Am J Ophthalmol 118 : 169-176, 1994.
6. Lin, J.T., "Critical review on refractive surgical lasers." Optical Engineering, 1995. 34(3)
7. www.ctl.com.pl/art/art4b.html
8. Cheong W., Prahl S.A., Welch A.J., "A Review of the optical properties of Biological Tissues", IEEE J. Quant. Elec., 26:2166-2185 (1990)
9. Raman spectroscopy experts – Kaiser Optical Systems Inc., Raman spectroscopy – An overview, [Διαθέσιμο στο διαδίκτυο: <http://www.kosi.com>]
10. Griffiths, P. R.; de Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*; Wiley & Sons: New York, 1986.
11. Ε. Ι. Καμπος, Γ. Δ. Χρυσικός «Στοιχεία Φασματοσκοπίας Υπερύθρου» Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, 1999.
12. Beckman Institute of the California Institute of Technology, The molecular materials research center, [Διαθέσιμο στο διαδίκτυο: <http://mmrc.caltech.edu>]
13. US EPA, Open Path Technologies: Measurement at a Distance (OP-FTIR), [Διαθέσιμο στο διαδίκτυο: <http://clu-in.org/programs/21m2/openpath/op-ftir/>]



14. Pallikaris, I.G., et al., Corneal hydration monitored by laser-induced breakdown spectroscopy. *J Refract Surg*, 1998. 14(6): p. 655-60.
15. Jongsma, F.H.M., et al., Confocal Raman Spectroscopy system for noncontact scanning of ocular tissues: An in vitro study. *Optical Engineering*, 1997. 36: p. 3193-3199.
16. Bauer, N.J., et al., Noninvasive assessment of the hydration gradient across the cornea using confocal Raman spectroscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998. 39(5): p. 831-5.
17. Monica M. Jablonski-Stiemke, PhD; Henry F. Edelhauser PhD. "Storage of human corneas in dextran and chondroitin sulfate-based corneal storage medium." *Arch Ophthalmol*. 1998;116:627-632
18. Douth, J., et al., "Propagation of infrared wavelengths through the corneal stroma, with reference to hydration changes" *Proc. of SPIE Vol. 6535, 65350V*, (2007)
19. Εισαγωγή στην Οφθαλμολογία και στη Νευροοφθαλμολογία. – Κ. Γ. Ψύλλας – University Studio Press