

Steady state diffuse reflectantie spectroscopy

R.L.P. van Veen¹, R.M.P. Doornbos²

¹ *Klinische Fysica / Photodynamische Therapy, Daniel Den Hoed Kliniek, Groene Hilledijk 301, 3008 AE, Rotterdam*

² *Laser Centrum, Academisch Medisch Centrum, Meibergdreef 9, 1105 AZ, Amsterdam*

vanaf heden werkzaam bij Philips Natlab

Inleiding

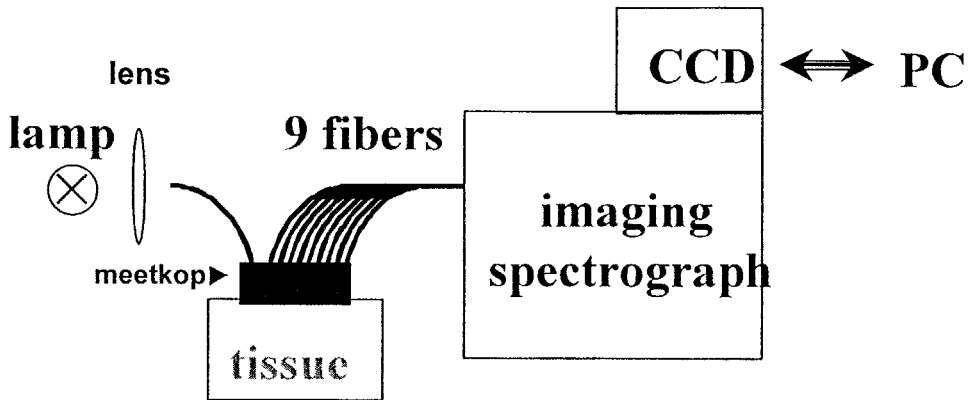
Voor het voorspellen van het gedrag van monochromatisch licht in menselijk weefsel is het noodzakelijk de optische eigenschappen te kennen. De twee belangrijkste eigenschappen zijn absorptie μ_a door kleurstoffen (chromoforen) zoals bloed en vet en de gereduceerde verstrooiing μ_s' (scattering). Met bijvoorbeeld de diffusie benadering van de Boltzmann transport vergelijking of met Monte Carlo numerieke simulaties kan als de absolute waarden van μ_s' en μ_a bekend zijn de distributie van het licht in weefsel berekend worden. Hiermee kan een waardevolle bijdrage geleverd worden wat betreft het voorspellen van weefsel schade bij bv Photodynamische Therapie (fotonica nr.1 1998) of andere medische laser applicaties. Omdat de absorptie coëfficiënt afhankelijk is van de aanwezigheid van rode bloedlichamen (oxy-hemoglobine en deoxy-hemoglobine) is het van belang dat μ_a en μ_s in-situ en op een non-invasieve gemeten worden. In dit artikel wordt steady state diffuse reflectie spectroscopie (D.R.S.) beschreven waarmee we optische weefsel eigenschappen bepaald hebben in het golflengtegebied tussen 600 en 1030 nm in weefsel. Uit het gemeten absorptiespectrum hebben we absolute chromofoor concentraties bepaald, en aan de hand van deze concentraties is de bloed zuurstof saturatie bepaald. Eerst zal in het kort de meetmethode en de theorie beschreven worden, en daarna worden de resultaten van

een meting op menselijk weefsel gepresenteerd

Diffuse Reflectie Spectroscopie

Wanneer in weefsel licht wordt gekoppeld is het onderhevig aan absorptie en verstrooiing. Door meervoudige verstrooiing zal een gedeelte van het ingekoppelde licht diffuus uit het weefsel oppervlak treden. Dit wordt re-emissie of diffuse reflectie genoemd. Deze diffuse reflectie neemt exponentieel af als functie van de afstand van de positie waar het licht is ingekoppeld. In figuur 1 is schematisch de opstelling om de diffuse reflectie te meten te zien.

Wit licht van een 100W quartz tungsten lamp met een vlakke spectrale emissie wordt via een optische fiber van 600 micron het weefsel ingekoppeld. 9 detectie fibers (600 micron diameter) met een gemiddelde onderlinge afstand van 1.7 mm worden gebruikt om de diffuse reflectie als functie van de detector bron afstand te detecteren en leiden het licht naar een spectrograaf. De 10 fibers zijn in een lijn ingegoten in een zwarte polyester meetkop. De Optical Multi channel Analyzer (OMA) spectrograaf heeft een golflengte bereik van 330 nm met een 3 nm resolutie. De 256*1024 pixels 16 bit CCD camera is lucht gekoeld en detecteert de negen spectra. Het beeld van de CCD camera is gerangschikt in 10 tracks (9 detectie 1 background). Voor de calibratie van de horizontale pixel (golflengte) as wordt het



Figuur 1
D.R.S. opstelling

spectrum van een HgAr gemeten. Voor de calibratie van de meetkop en de lamp worden de 9 intensiteiten gemeten in een integrerende bol die belicht wordt door de eerste input fiber. Deze methode corrigeert voor het lamp spectrum, fiber transmissie en reflectie verliezen, en is tevens een maat voor 100% diffuse reflectie.

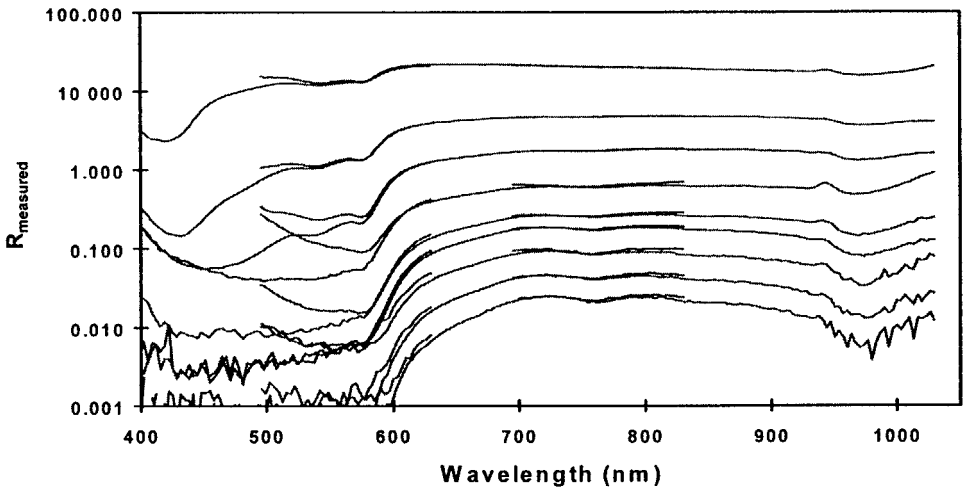
Berekening van de diffuse reflectie

De diffuse reflectie wordt in 3 intervallen van 330nm gemeten (300-630, 500-830, 700-1030nm). Omdat de absolute intensiteit niet bekend is wordt de meting genor-

maliseerd met de meting in de integrerende bol. De diffuse reflectie wordt als volgt berekend:

$$R_{\text{measured}}(\lambda_p, r_i) = \frac{I_{\text{Tissue}}(\lambda_p, r_i)}{I_{\text{Integratingsphere}}(\lambda_p, r_i)}$$

Waarin I_{Tissue} de gemeten intensiteit van de diffuse reflectie is als functie van de golflengte λ_p op een afstand r_i van de bron fiber. Op deze manier wordt het gehele golflengte gebied bestreken en krijgen we dus voor iedere detectie fiber een reflectie spectrum. Een voorbeeld van een diffuus



Figuur 2

Voorbeeld van reflectie spectrum gemeten op de onderarm. De onderste curve is afkomstig van de laatste fiber die de grootste afstand tot de bronfiber heeft.

reflectie spectrum voor de 9 brondetectie afstanden is te zien in figuur 2.

Om de optische weefsel eigenschappen te bepalen uit de diffuse reflectie metingen is een model nodig dat de re-emissie beschrijft als functie van de bron-detector afstand r , de absorptie coëfficiënt μ_a , de gereduceerde verstrooiing coëfficiënt μ_s' en de relatieve brekingsindex n_{rel} .

$$R_{theor} = f(\mu_a, \mu_s', n_{rel}, r) \quad (2)$$

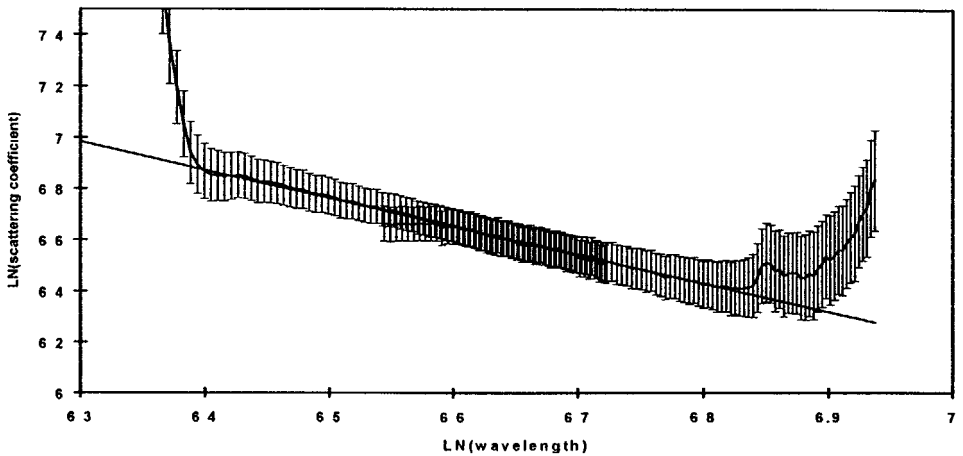
Wij maken gebruik van twee modellen die gebaseerd zijn op de diffusie benadering van de transport vergelijking (Farrell et al 1992, en Kienie et al 1997) welke speciaal zijn aangepast voor steady-state D.R.S. metingen door o.a. rekening te houden met Fresnel reflectie aan het weefsel/medium grensooppervlak. Voor de theoretische benadering moeten de volgende condities gelden:

- Het licht moet diffuus zijn dus, verstrooiing domineert over absorptie ($\mu_s' \gg \mu_a$).

- De bron -detectie afstand moet groter zijn dan $1/\mu_s'$. Bij afstanden kleiner dan deze is de reflectie uit het weefsel niet diffuus omdat er geen sprake is van meervoudige verstrooiing.
- Het weefsel moet homogeen en semi-oneindig zijn.

Deze modellen kunnen op de gemeten diffuse reflectie spectra worden gefit met behulp van een non-linear least square fitting algoritme. De 9 punt fits (van de 9 detectie fibers) worden vervolgens apart voor iedere golflengte gefit, waarbij alle parameters behalve n_{rel} vrij zijn. Het resultaat is een absorptiespectrum en een spectrum van de gereduceerde verstrooiing. In figuur 3 is het verstrooiingsspectrum in een dubbele log plot weergegeven. De curve is opgebouwd uit de onderling onafhankelijke fit-resultaten maar vertoont een duidelijk lineair verband (in een log-log grafiek) die benaderd kan worden met een Mie-achtige functie.

$$\mu_s' = a\lambda^{-b} \quad (3)$$



Figuur 3

De fit van de Mie-achtige functie (de rechte lijn) op de onafhankelijk van elkaar gefitte verstrooiing coëfficiënten

Waarin a en b constanten zijn, en b volgens Lorenz-Mie theorie een maat is voor de gemiddelde deeltjesgrootte van de verstrooiers.

Deze functie (3) wordt gefit op de fitresultaten, om een golflengte afhankelijke gereduceerde verstrooiing coëfficiënt te verkrijgen. Vervolgens wordt het diffuse reflectie spectrum opnieuw gefit met alleen μ_a vrij en met golflengte afhankelijke μ_s' (de rechte lijn in figuur 3). Dit heeft als gevolg een verbetering van de stabiliteit van de fit en opvallende afwijkingen in het absorptie spectrum worden hiermee weggevoerd (figuur 4) Bij golflengtes lager dan 600nm wordt μ_a dominant door sterke bloed absorptie, en is het door ons gebruikte model onbetrouwbaar.

De absorptie coëfficiënt is opgebouwd uit de sommatie van alle in het weefsel aanwezige absorberende componenten zoals oxy (Hb)-deoxy(HbO₂) hemoglobine, vet en water.

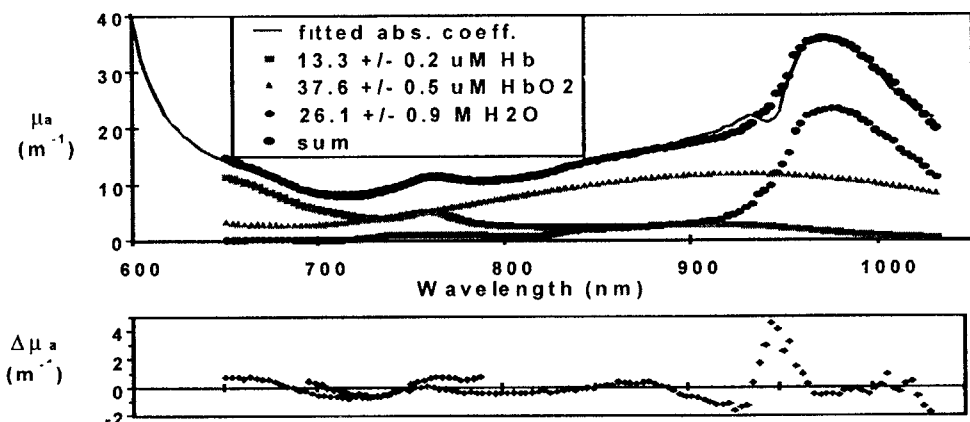
$$\mu_a = \sum_i C_i * \epsilon_i \quad (4)$$

Waarin c de concentratie is en ϵ de specifieke absorptie. Aangezien de absorptie spectra van Hb, HbO₂ en H₂O bekend zijn kunnen de concentraties m.b.v een de-compositie algoritme (Singular Value Decomposition en gerelateerde algoritmes) berekend worden.

Figuur 4 laat een voorbeeld zien van de specifieke absorptie spectra en de berekende concentraties. De berekende absorptie curve is bijna identiek aan de uit de meting van het reflectie spectrum afgeleide absorptie curve. Met de gevonden concentratie en het molaire gewicht kan vervolgens weer het water en bloed percentage in het weefsel bepaald worden (zie tabel 1).

Voortgang

Weefsel is vaak opgebouwd uit verschillende lagen met verschillende optische eigenschappen eg. Het menselijk brein bestaat uit een dunne laag (± 3 mm) grijze massa met daaronder witte massa. Volgens een recent twee lagen model (Kienle 1998) blijkt dat weefsel opgebouwd uit meerdere lagen een significantie invloed kan hebben op de diffuse reflectie. Het huidige model gaat uit van de aanname de het weefsel



Figuur 4

De gefitte absorptie curve plus de sommatie van de afzonderlijke absorptie spectra van Hb, HbO₂ en water $\Delta\mu_a$ is het verschil tussen gefitte en de gesommeerde absorptie curve

Tabel 1. Resultaten van de in-vivo gemeten weefsel eigenschappen

	[Hb] (μM)	[HbO ₂] (μM)	[H ₂ O] (M)	A	B	r_M (μm)	Satu- ration (%)	Water (%)	Blood (%)
Huid, arm	133 ± 0.2	376 ± 0.5	261 ± 0.9	550 ± 11	111 ± 0.08	0.20 ± 0.04	74	47	2.2
Huid, voetzool	453 ± 0.04	216 ± 0.1	395 ± 0.4	539 ± 2	160 ± 0.01	0.14 ± 0.01	86	71	1.1
Voorhoofd	4.3 ± 0.1	6.4 ± 0.3	18.5 ± 0.6	1141 ± 23	0.84 ± 0.07	0.29 ± 0.02	60	33	0.46

homogeen is. Op dit moment wordt de implementatie van een twee lagen model geëvalueerd (R. Doornbos). Onderzocht wordt of met D.R.S. de absorptiespectra (en de absolute concentraties) van bv fotosensitisers, chemotherapeutica of andere chromoforen bepaald kan worden. Recente D.R.S. metingen tonen aan dat er in het absorptiespectrum van het brein zich naast de waterpiek nog een additionele vetpiek (myeline) bevindt. Verder onderzoek naar de specifieke absorptie hiervan wordt verricht.

Conclusie

Uit de experimenten is gebleken dat middels diffuse reflectie spectroscopie en het aangepaste diffusie benaderingsmodel van Kienle en Farrell het mogelijk is om optische weefsel eigenschappen als absorptie en verstrooiing van homogeen weefsel te bepalen in het golflengte gebied tussen 600 en 1030 nm. Hieruit is het mogelijk de concentraties van de chromoforen te bepalen. Verder is aangetoond dat de golflengte afhankelijkheid van de gereduceerde verstrooiingscoëfficiënt eenvoudig te beschrij-

ven is met een eenvoudige eerste orde functie.

Het Laser Aided Investigation in Cardiology LAIC project is gesubsidieerd door de Europese gemeenschap

Literatuur

- Farrell T J, Patterson M S, and Wilson B C 1992
A diffusion theory model of spatially resolved, steady state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue properties in vivo *Med Phys* **19** 879-888
- Kienle A and Patterson M S 1997
Improved solutions of the steady-state

and the time-resolved diffusion equations for reflectance from a semi-infinite turbid medium *J Opt Soc Am A* **14** 246-245

- Kienle A, Patterson M S, Dognitz N, Bays R, Wagnieres G, and Bergh van de H 1998
Noninvasive determination of the optical properties of two-layered turbid media *Applied Optics* **37** 779-791
- R M P Doornbos, R Lang, M C Aalders, F W Cross and H J C M Sterenberg 1999
The determination of *in vivo* human tissue optical properties and absolute chromophore concentrations using spatially resolved steady-state diffuse reflectance spectroscopy *Phys Med. Biol* **44** (1999) 967-981.