



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: «Σχεδιασμός και κατασκευή μικροσκοπίου διερχόμενου φωτός με δυνατότητα τομογραφικής απεικόνισης»

Επιβλέπων Καθηγητής: Γκλώτσος Δημήτριος Αν. Καθ. Τμήμα Μηχανικών Βιοϊατρικής.

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Γκλώτσος Δημήτριος Αν. Καθ. Τμήμα Μηχανικών Βιοϊατρικής

Ασβεστάς Παντελεήμων Αν. Καθ. Τμήμα Μηχανικών Βιοϊατρικής

Κωστόπουλος Σπυρίδων Επικ. Καθ. Τμήμα Μηχανικών Βιοϊατρικής

Υποψήφιος Διδάκτωρ: Κουδουνάς Παντελεήμων

28/12/2019

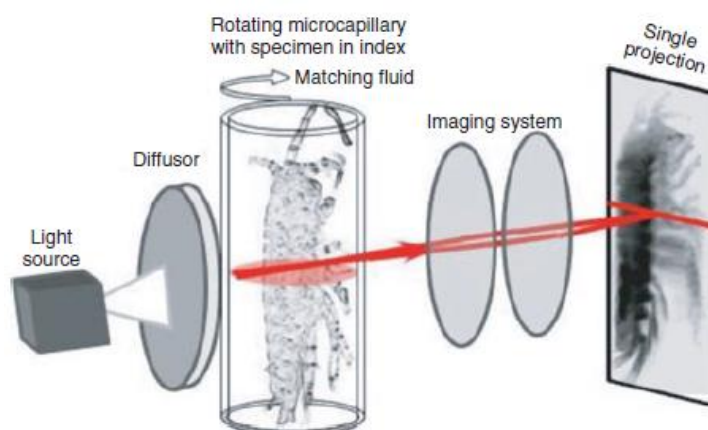
Ο σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι η δημιουργία ενός νέου πρωτοτύπου οπτικού μικροσκοπίου διερχομένου φωτός το οποίο θα μπορεί να παράγει 3-διάστατες εικόνες βελτιωμένης διακριτικής ικανότητας α/ περιστρέφοντας το δείγμα γύρω από το επίπεδο εστίασης, β/ λαμβάνοντας προβολές σε κάθε γωνία περιστροφής και γ/ δημιουργώντας την 3-διάστατη εικόνα μέσω αλγορίθμων τομογραφικής ανακατασκευής περιορισμένων προβολών.

Κατά τον 1^ο χρόνο εκπόνησης της διδακτορικής έγιναν οι ακόλουθες εργασίες:

1. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας.
2. Κατασκευή συστήματος ελεγχόμενης περιστροφής δείγματος ιστού.

Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας

Κατά τη διάρκεια του 1^{ου} έτους της διατριβής εξετάστηκε εκτενώς η διεθνής βιβλιογραφία όσον αφορά σε συστήματα οπτικών μικροσκοπίων για την τρισδιάστατη ανακατασκευή ιστού. Η βασική τεχνική που εφαρμόζεται είναι η μικροσκοπία οπτικών προβολών (Optical Projection Tomography – OPT) (Sharpe et al. 2002). Είναι αντίστοιχη της αξονικής τομογραφίας (CT) (Hsieh (2015)), όπου αντί για ακτίνες X χρησιμοποιείται ορατό φως. Η τεχνική αυτή προτάθηκε ως μία εναλλακτική προσέγγιση αντίστοιχων συμβατικών μεθόδων (συνεστιακή μικροσκοπία και οπτική τομογραφία συνοχής), καθώς αυτές έχουν περιορισμούς ως προς το μέγεθος του ιστού που μπορεί να απεικονιστεί. Στην τεχνική OPT, μία λάμπα που παρέχει μια διάχυτη πηγή ομοιόμορφου φωτισμού φωτίζει το δείγμα. Το φως που διέρχεται από το δείγμα ανιχνεύεται στην αντίθετη πλευρά από έναν αντικειμενικό φακό ευρέως πεδίου, και τελικά από μια κάμερα. Καθώς οι ακτίνες φωτός διαδίδονται μέσω του δείγματος σε περίπου ευθείες γραμμές σχηματίζοντας προβολές. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για διάφορες θέσεις του δείγματος. Το λογισμικό ανάλυσης σε έναν υπολογιστή μπορεί να ανακατασκευάσει μία εικόνα της διατομής του δείγματος χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο οπισθοπροβολής (Sharpe, 2004). Η Εικόνα 1 παρουσιάζει την αρχή της τεχνικής OPT.



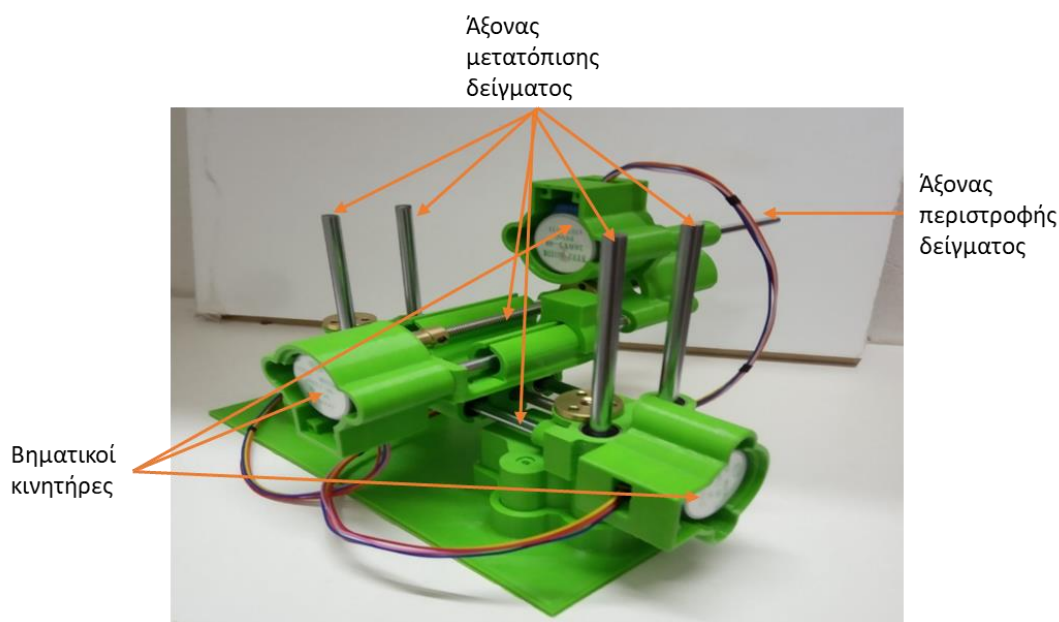
Εικόνα 1. Αρχή OPT (Πηγή: Gaff et al. (2013)).

Ενδεικτικές δημοσιεύσεις που προέκυψαν κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση δίνονται στο τέλος του κειμένου.

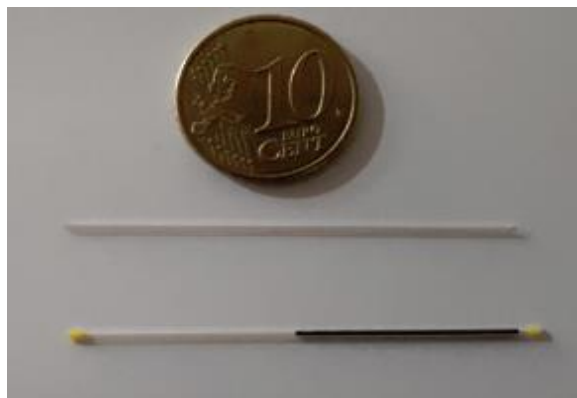
Κατασκευή ηλεκτρομηχανολογικού συστήματος περιστροφής δείγματος

Κατά το 1^ο έτος της διατριβής κατασκευάστηκε ηλεκτρομηχανολογικό σύστημα (Εικόνα 2) με δυνατότητα περιστροφής υάλινου σωλήνα τοποθέτησης δείγματος μπροστά από δέσμη

φωτός του μικροσκοπίου (Εικόνα 3). Επιπλέον το σύστημα έχει την δυνατότητα να κινεί τον υάλινο σωλήνα κατά τους άξονές x, y, z .



Εικόνα 2. Ηλεκτρομηχανολογικό σύστημα περιστροφής δείγματος.



Εικόνα 3. Σωλήνες τοποθέτησης δείγματος.

Η κατασκευή του συστήματος έγινε με την βοήθεια 3D εκτυπωτή (Creality 3D Ender 5). Είναι ο μικρότερος 3D εκτυπωτής της εταιρίας Creality διαθέτει μόνο extruder δηλαδή μπορεί να τυπώνει ένα υλικό κάθε φορά. Χρησιμοποιεί filament ως υλικό το οποίο είναι κατάλληλο για κατασκευή λειτουργικών εξαρτημάτων, μεγάλης σκληρότητας και αντοχής. Το υλικό filament- PLA δεν μπορεί να φτάσει την ακρίβεια κατασκευής ενός αντικειμένου με το υλικό ρητίνη. Στην κατασκευή του συστήματος, μας ενδιέφερε η σκληρότητα η αντοχή των εξαρτημάτων και για αυτό επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος εκτυπωτής. Ο σχεδιασμός της κατασκευής πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος (Simplify 3D). Είναι ένα εύκολο και προσιτό πρόγραμμα για την μοντελοποίηση 3D κατασκευών. Στη βιβλιοθήκη του προγράμματος υπάρχουν, διαθέσιμα σχήματα αλλά και δυνατότητα εισαγωγής 3D αρχείων.

Για να μπορέσουν πραγματοποιηθούν οι κινήσεις του υάλινου σωλήνα στους άξονες x, y, z χρησιμοποιήθηκαν πέντε βηματικοί κινητήρες. Δύο κινητήρες για την κίνηση στον άξονα z , ένας κινητήρας για τον άξονα x , ένας κινητήρας για τον άξονα y και ένας κινητήρας για τη περιστροφή των 360 μοιρών.

Χρησιμοποιηθήκαν 20 γραμμικά ρουλεμάν για την μείωση τριβών και την μικρομετρική ακρίβεια κύλισης των αξόνων.

Επίσης χρησιμοποιηθήκαν:

- Μεταλλικοί άξονες D 8mm x L200 10τεμ
- Αποστάτες 10 τεμ
- Βάσεις αξόνων 10τεμ
- Τραπεζοειδή κοχλίες 6 τεμ
- Σύνδεσμοι αξόνων 4 τεμ
- Τερματικοί διακόπτες 6 τεμ

Κατασκευάστηκαν σε τόρνο διάφοροι άξονες για την προσαρμογή των υάλινων σωλήνων.

Ο έλεγχος των βηματικών κινητήρων έγινε με χρήση πλακέτας Arduino (Margolis et al. (2020)). Το Arduino είναι μία πλακέτα μικροελεγκτή, η οποία περιλαμβάνει υποδοχές για την εύκολη διασύνδεση περιφερειακών εξαρτημάτων. Μπορεί να προγραμματιστεί εύκολα μέσω ολοκληρωμένου περιβάλλοντος ανάπτυξης κώδικα σε υπολογιστή με χρήση της γλώσσας προγραμματισμού C++. Κάθε βηματικός κινητήρας συνδέεται μέσω κατάλληλου ηλεκτρονικού κυκλώματος οδήγησης τύπου γέφυρας H (Malvino & Bates (2016)), στο Arduino, το οποίο παράγει το κατάλληλο σήμα ελέγχου για τη βηματική μετακίνηση του άξονα του κινητήρα.

Για τον έλεγχο της μετατόπισης του αντικειμένου, χρησιμοποιήθηκαν αισθητήρες ελέγχου για τον προσδιορισμό της ακριβούς θέσης, καθώς και τερματικοί διακόπτες για να δηλώνουν την αρχή και το τέλος της μετατόπισης.

Στην κατασκευή προέκυψαν διάφορα προβλήματα:

Α) Σχετικά με την ακρίβεια της καθετότητας του φακού του μικροσκοπίου σε όλο το εύρος της οριζόντιας μετατόπισης του υάλινου σωλήνα. Περιοριστήκαμε στις μετρήσεις μας για το διάστημα των 5 χιλιοστών στο οποίο υπήρχε πολύ μεγάλη ακρίβεια.

Β) Στην επαναληψιμότητα των θέσεων των βηματικών κινητήρων. Το πρόβλημα το λύσαμε συγχρονίζοντας τους κινητήρες μεταξύ τους σχετικά με την ακριβή θέση τους.

Γ) Το όλο σύστημα ήταν αρκετά μεγάλο και δεν μπορέσαμε να το εντάξουμε επάνω στην τράπεζα του μικροσκοπίου. Την κατασκευή την τοποθετήσαμε έξω από τη τράπεζα του μικροσκοπίου αλλά άρρηκτα συνδεδεμένη με μεταλλικούς άξονες.

Δ) Κατά την περιστροφή αλλά και την μετατόπιση του υάλινου σωλήνα υπήρχαν δονήσεις από τους βηματικούς κινητήρες με αποτέλεσμα να εμφανίζεται αστάθεια στις εικόνες. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε μέσω του προγραμματισμού. Συγκεκριμένα η κάμερα κατέγραφε μετά την ολοκλήρωση της μετατόπισης της θέσεως. Οι εικόνες που προέκυπταν από την ανακατασκευή δεν είχαν ικανή πληροφορία για ασφαλή συμπεράσματα στην παθολογοανατομία. Επίσης δεν είχαν καλή διακριτική ικανότητα.

Ε) Το βασικότερο πρόβλημα που δεν μπορέσαμε να το ξεπεράσουμε ήταν η δυσκολία της βαφής του ιστού. Δεν μπορέσαμε να διεισδύσουμε σε βάθος στον ιστό με την βαφή (Ηωσίνη-Αιματοξυλίνη). Το εσωτερικό πάχος του υάλινου σωλήνα είναι 400 μm .

Αναφορές

- Cheddad, A., Svensson, C., Sharpe, J., Georgsson, F., & Ahlgren, U. (2012). Image processing assisted algorithms for optical projection tomography. *IEEE transactions on medical imaging*, 31(1), 1–15. <https://doi.org/10.1109/TMI.2011.2161590>
- Fauver, M., Seibel, E., Rahn, J. R., Meyer, M., Patten, F., Neumann, T., & Nelson, A. (2005). Three-dimensional imaging of single isolated cell nuclei using optical projection tomography. *Optics express*, 13(11), 4210–4223. <https://doi.org/10.1364/opex.13.004210>
- Gaff, K., Parker, L.M., Lawlor, D. and Reynaud, E.G. (2013). Optical Projection Tomography. In *Imaging Marine Life*, E.G. Reynaud (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9783527675418.ch5>
- Hsieh, J. (2015). *Computed Tomography: Principles, Design, Artifacts, and Recent Advances*. 3rd Eds, Wiley, <https://doi.org/10.1117/3.2197756>
- Malvino, A., & Bates, D. (2016). *Electronic Principles*. 8th Eds, Mc Graw Hill Publications.
- Margolis, M., Jepson, B., & Weldin, N.R. (2020). *Arduino Cookbook: Recipes to Begin, Expand and Enhance Your Projects*. 3rd Eds, O'Reilly Publications.
- Pichat, J., Iglesias, J. E., Yousry, T., Ourselin, S., & Modat, M. (2018). A Survey of Methods for 3D Histology Reconstruction. *Medical image analysis*, 46, 73–105. <https://doi.org/10.1016/j.media.2018.02.004>
- Rieckher, M., Birk, U. J., Meyer, H., Ripoll, J., & Tavernarakis, N. (2011). Microscopic optical projection tomography in vivo. *PloS one*, 6(4), e18963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018963>
- Sharpe, J., Ahlgren, U., Perry, P., Hill, B., Ross, A., Hecksher-Sørensen, J., Baldock, R., & Davidson, D. (2002). Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5567), 541–545. <https://doi.org/10.1126/science.1068206>
- Sharpe J. (2004). Optical projection tomography. *Annual review of biomedical engineering*, 6, 209–228. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140210>
- Tang, X., van der Zwaan, D. M., Zammit, A., Rietveld, K., & Verbeek, F. J. (2017). Fast Post-Processing Pipeline for Optical Projection Tomography. *IEEE transactions on nanobioscience*, 16(5), 367–374. <https://doi.org/10.1109/TNB.2017.2706967>
- Trull, A. K., van der Horst, J., van Vliet, L. J., & Kalkman, J. (2018). Comparison of image reconstruction techniques for optical projection tomography. *Applied optics*, 57(8), 1874–1882. <https://doi.org/10.1364/AO.57.001874>
- Vallejo Ramirez, P. P., Zammit, J., Vanderpoorten, O., Riche, F., Blé, F. X., Zhou, X. H., Spiridon, B., Valentine, C., Spasov, S. E., Oluwasanya, P. W., Goodfellow, G., Fantham, M. J., Siddiqui, O., Alimagham, F., Robbins, M., Stretton, A., Simatos, D., Haderler, O., Rees, E. J., Ströhl, F., ... Kaminski, C. F. (2019). OptiJ: Open-source optical projection tomography of large organ samples. *Scientific reports*, 9(1), 15693. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52065-0>

- Walls, J. R., Sled, J. G., Sharpe, J., & Henkelman, R. M. (2005). Correction of artefacts in optical projection tomography. *Physics in medicine and biology*, 50(19), 4645–4665. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/50/19/015>
- Watson, T., Andrews, N., Davis, S., Bugeon, L., Dallman, M. D., & McGinty, J. (2017). OPTiM: Optical projection tomography integrated microscope using open-source hardware and software. *PloS one*, 12(7), e0180309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180309>
- Wong, M. D., Dazai, J., Walls, J. R., Gale, N. W., & Henkelman, R. M. (2013). Design and implementation of a custom built optical projection tomography system. *PloS one*, 8(9), e73491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073491>
- Zhang, H., Waldmann, L., Manuel, R., Boije, H., Haitina, T., & Allalou, A. (2020). zOPT: an open source optical projection tomography system and methods for rapid 3D zebrafish imaging. *Biomedical optics express*, 11(8), 4290–4305. <https://doi.org/10.1364/BOE.393519>