



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

28/12/2020

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 2^ο χρόνο εκπόνησης της διδακτορικής έγιναν οι ακόλουθες εργασίες:

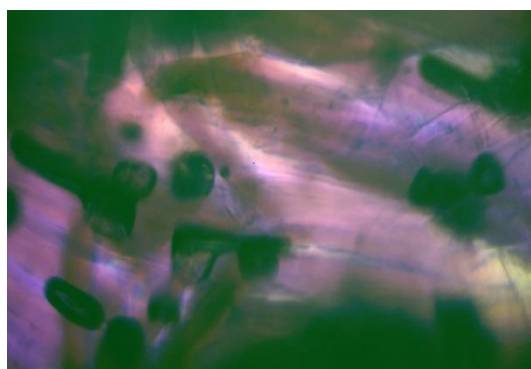
1. Ανάπτυξη λογισμικού συστήματος ελεγχόμενης περιστροφής δείγματος ιστού
2. Χρώσεις ιστών

Ανάπτυξη λογισμικού συστήματος ελεγχόμενης περιστροφής δείγματος ιστού

Κατά τη διάρκεια του 2^{ου} έτους της διατριβής αναπτύχθηκε το λογισμικό του συστήματος ελεγχόμενης περιστροφής δείγματος ιστού. Το λογισμικό περιλαμβάνει το λογισμικό για τη λειτουργία του μικροελεγκτή Arduino (Margolis et al. (2020)) και το λογισμικό σε υπολογιστή για τη συλλογή εικόνων (Howse & Minichino (2020)) και την δημιουργία εικόνων διατομής του ιστού με χρήση δεδομένων προβολής (Kak, & Slaney (1988)).

Το λογισμικό για τον μικροελεγκτή Arduino αναπτύχθηκε στη γλώσσα προγραμματισμού C++ και είναι υπεύθυνο για τον ηλεκτρικό έλεγχο των βηματικών κινητήρων που απαρτίζουν το σύστημα.

Το λογισμικό του υπολογιστή αναπτύχθηκε στη γλώσσα προγραμματισμού Python. Το εν λόγω λογισμικό στέλνει στο λογισμικό του μικροελεγκτή την εντολή για την περιστροφή του βηματικού κινητήρα κατά συγκεκριμένη γωνία. Αφού γίνει η περιστροφή του δείγματος, λαμβάνεται εικόνα από κάμερα η οποία είναι προσαρμοσμένη στο προσοφθάλμιο ενός συμβατικού μικροσκοπίου (Εικόνα 1). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να ολοκληρωθεί μία πλήρης περιστροφή του δείγματος. Η περιστροφή γίνεται ανά 1,5° περίπου και συνολικά προκύπτουν 256 εικόνες.



Εικόνα 1. Παράδειγμα εικόνας μικροσκοπίου ληφθείσα από το προτεινόμενο σύστημα.

Οι εικόνες που συλλέγονται επεξεργάζονται στο Matlab με τον αλγόριθμο της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής για την δημιουργία εικόνων διατομής του ιστού με χρήση δεδομένων προβολής (Kak, & Slaney (1988)).

Χρώσεις ιστού

Κατά τη διάρκεια του 2^{ου} έτους της διατριβής, έγιναν οι διαδικασίες προετοιμασίας και χρώσεις ιστών σε συνεργασία με το παθολογοανατομικό τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου

Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων». Το βασικό πρόβλημα που προέκυψε, ήταν η δυσκολία διείσδυσης της βαφής του ιστού σε μεγάλο βάθος. Για τον σκοπό αυτόν, δοκιμάστηκαν διάφορα πρωτόκολλα βαφής έτσι ώστε, να είναι εφικτή η διείσδυση σε βάθος βαφής μεγαλύτερου των 3 μm. Τροποποιήσαμε το πρωτόκολλο βαφής πολλές φορές έτσι ώστε, να μπορέσουμε να διεισδύσουμε σε βάθος βαφής μεγαλύτερου των 3 μm.

Η διαδικασία προετοιμασίας του ιστού περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

- Παραλαβή – Πρωτοκόλληση Παρασκευασμάτων
- Μακροσκοπική περιγραφή Παρασκευασμάτων
- Μονιμοποίηση του ιστού
- Σκηνωμα / Έγκλιση – Δημιουργία κύβων παραφίνης
- Τριμάρισμα (απομάκρυνση περίσσειας παραφίνης)
- Μικροτόμηση
- Ιστοχημική χρώση πλακιδίων
- Μικροσκόπηση

Το βασικό πρωτόκολλο χρώσης περιελάμβανε την τοποθέτηση ιστού σε:

- Οινόπνευμα 100% 2 min
- Οινόπνευμα 90% 2 min
- Οινόπνευμα 80% 2 min
- Οινόπνευμα 70% 2 min
- Ξέπλυμα dh2O
- Αιματοξυλίνη 5 min
- Ξέπλυμα dh2O
- Ηωσίνη 2min
- Οινόπνευμα 70% 30sec
- Οινόπνευμα 80% 60sec
- Οινόπνευμα 90% 90sec
- Οινόπνευμα 100% 2min

Έγιναν παραλλαγές στο βασικό πρωτόκολλο όσον αφορά στον χρόνο της εμβάπτισης του ιστού στην Αιματοξυλίνη-Ηωσίνη. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν χρόνοι εμβάπτισης 5, 7, 9, 11 και 13 λεπτά.

Τα αποτελέσματα που προκύψανε δεν ήταν ενθαρρυντικά όσο αφορά το πάχος του ιστού που θέλουμε να βάψουμε. Συγκεκριμένα, τροποποιήσαμε πολλές φορές το βασικό πρωτόκολλο βαφής (Ηωσίνη- Αιματοξυλίνη). Σε κάθε περίπτωση δεν μπορέσαμε να εισχωρήσουμε βαθιά στον ιστό (πάχος ιστού 400 μm). Ενδεχομένως με άλλη χρωστική ουσία που χρησιμοποιούν οι παθολογοανατόμοι να μπορεί να εισχωρήσει η βαφή πιο βαθιά στον ιστό.

Στα παθολογοανατομικά ιατρεία χρησιμοποιούνται διάφορες χρώσεις που είναι πιο τοξικές και ενδεχομένως να μπορούν να διεισδύσουν πιο βαθιά στον ιστό και να αναδείξουν διάφορα παθολογικά ευρήματα. Το κόστος των χρωστικών ουσιών αυτών (kit) είναι πολύ μεγαλύτερο από το ποσό των 1.500 ευρώ.

Το ηλεκτρομηχανολογικό σύστημα λειτουργεί σωστά και μπορεί να δώσει ανακατασκευασμένες εικόνες αρκεί το υλικό που θα τοποθετηθεί στον υάλινο σωλήνα να είναι ημιδιαπερατό από το φως του μικροσκοπίου.

Αναφορές

Howse, J., & Minichino J. (2020). Learning OpenCV 4 Computer Vision with Python 3. 3rd Edition, Packt Publishing.

Kak, A. C., & Slaney M. (1988). Principles of Computerized Tomographic Imaging, New York, NY, IEEE Press.

Margolis, M., Jepson, B., & Weldin, N.R. (2020). Arduino Cookbook: Recipes to Begin, Expand and Enhance Your Projects. 3rd Eds, O'Reilly Publications.