



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

**3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ
ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΤΟΥ
ΠΑΝΤΕΛΗΜΟΝΑ ΚΟΥΔΟΥΝΑ

Επιβλέπων: Καθ. Δημήτριος Γκλώτσος

Αθήνα 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA

FACULTY OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**3D IMAGING OF HISTOLOGICAL DATA IN TRANSMISSION
LIGHT MICROSCOPY**

Ph.D. Thesis

by

PANTELEIMON KOUDOUNAS

Supervisor: Prof. Dimitrios Glotsos

Athens 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

**3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ
ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΤΟΥ

ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΟΝΑ ΚΟΥΔΟΥΝΑ

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Καθ. Γκλώτσος Δημήτριος (Επιβλέπων)

Καθ. Ασβεστάς Παντελεήμων

Αναπλ. Καθ. Κωστόπουλος Σπυρίδων

Εγκρίθηκε από την επταμελή εξεταστική επιτροπή στις 14/11/2023

.....
Δ. Γκλώτσος
Καθηγητής ΠΑΔΑ

.....
Π. Ασβεστάς
Καθηγητής ΠΑΔΑ

.....
Σ. Κωστόπουλος
Αναπλ. Καθηγητής ΠΑΔΑ

.....
Δ. Κάβουρας
Ομότιμος Καθηγητής
ΠΑΔΑ

.....
Γ. Ματσόπουλος
Καθηγητής Ε.Μ.Π.

.....
Ε. Δαυίδ
Επ. Καθηγητής ΠΑΔΑ

.....
Ε. Αθανασιάδης
Επ. Καθηγητής ΠΑΔΑ

Αθήνα 2023

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο υπογράφων Παντελεήμων Κουδουνάς του Μιχαήλ, υποψήφιος διδάκτορας του Τμήματος Μηχανικών Βιοϊατρικής της Σχολής Μηχανικών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας και δικαιούχος των πνευματικών δικαιωμάτων επί της διατριβής και δεν προσβάλω τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων. Για τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής δεν χρησιμοποίησα ολόκληρο ή μέρος έργου άλλου δημιουργού ή τις ιδέες και αντιλήψεις άλλου δημιουργού χωρίς να γίνεται αναφορά στην πηγή προέλευσης (βιβλίο, άρθρο από εφημερίδα ή περιοδικό, ιστοσελίδα κ.λπ.). Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της διατριβής μου μέχρι και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη.

Ημερομηνία
15/10/2023

Ο Δηλών



Αφιερώνεται στη σύζυγο μου Ελένη

Περίληψη

Η οπτική μικροσκοπία, γνωστή και ως μικροσκοπία φωτός, είναι μία ευέλικτη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την απεικόνιση και τη μελέτη αντικειμένων σε επίπεδο μικροκλίμακας και νανοκλίμακας με τη χρήση ορατού φωτός και οπτικών φακών. Αποτελεί θεμελιώδες εργαλείο σε διάφορα επιστημονικά πεδία, όπως η βιολογία, η επιστήμη των υλικών, η χημεία και η ιατρική. Ειδικά η μικροσκοπία φωτεινού πεδίου, μία θεμελιώδης τεχνική στον τομέα της οπτικής μικροσκοπίας, είναι μια από τις απλούστερες και πιο κοινές μεθόδους για την παρατήρηση βιολογικών και άλλων διαφανών δειγμάτων. Όμως υπάρχει έλλειψη ολοκληρωμένων τεχνικών λήψης και ανάλυσης τρισδιάστατων ιστολογικών δεδομένων με τη χρήση συμβατικής οπτικής μικροσκοπίας διερχόμενου φωτός. Οι υπάρχουσες τεχνικές προσφέρουν κυρίως δισδιάστατα στιγμιότυπα τομών ιστών, παραβλέποντας την περίπλοκη τρισδιάστατη μικροαρχιτεκτονική που παίζει ζωτικό ρόλο στην κατανόηση της λειτουργίας των ιστών, της ανάπτυξης και της εξέλιξης των ασθενειών. Η τρισδιάστατη απεικόνιση είναι εφικτή με χρήση ειδικών μικροσκοπίων τα οποία συνήθως είναι αρκετά ακριβά. Συνεπώς, το ερώτημα που τίθεται είναι κατά πόσο είναι εφικτή η τρισδιάστατη απεικόνιση ενός ιστού με χρήση ενός συμβατικού οπτικού μικροσκοπίου διερχόμενου φωτός.

Στην παρούσα διατριβή, αρχικά περιγράφονται οι βασικές αρχές μικροσκοπίας και οι συνήθεις εργαστηριακές τεχνικές στην ιστοπαθολογία. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται δύο τεχνικές για την τρισδιάστατη αναπαράσταση ιστών από εικόνες μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου. Η πρώτη τεχνική αφορά στην αυτοματοποίηση μιας σειράς βημάτων για τη δημιουργία ψηφιακού τρισδιάστατου όγκου ενός ιστού από εικόνες συμβατικού μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου. Συγκεκριμένα, συλλέγονται ψηφιακές εικόνες περιοχής ενδιαφέροντος (ορισμένη από ειδικό) από διαδοχικές τομές ιστού. Στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται τεχνικές ευθυγράμμισης εικόνων και παρεμβολής βασισμένης στη βαθιά μάθηση για τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου όγκου της περιοχής ενδιαφέροντος. Ειδικός ιστοπαθολόγος αξιολόγησε την πληροφορία που παρέχεται από τον τρισδιάστατο όγκο και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο τρισδιάστατος όγκος ενδέχεται να αποκαλύπτει λεπτομέρειες που δεν είναι σαφώς ορατές ή ακόμη και μη ανιχνεύσιμες στις εικόνες ενός συμβατικού μικροσκοπίου. Σε αντίθεση με άλλες τεχνολογίες τρισδιάστατης απεικόνισης ιστών, η εν λόγω τεχνική έχει τα εξής πλεονεκτήματα: (α) δεν εξαρτάται από την απόσταση του δείγματος από τους αντικειμενικούς φακούς, παράγοντας τρισδιάστατους όγκους ιστών σε οποιαδήποτε επιθυμητή μεγέθυνση. (β) Δεν απαιτεί ειδικό όργανο, μπορεί να εφαρμοστεί με οποιοδήποτε συμβατικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου. (γ) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιαδήποτε δεδομένη εφαρμογή ρουτίνας, όχι μόνο για ορισμένες εξειδικευμένες κλινικές μελέτες.

Η δεύτερη τεχνική αφορά στην τομογραφική απεικόνιση μίας τομής ιστού με οπτικό τεμαχισμό (σε αντίθεση με την προηγούμενη τεχνική που αφορά σε φυσικό τεμαχισμό του υπό εξέταση ιστού). Αυτή η τεχνική βασίζεται στην ιδέα ότι κάθε τομή ιστού έχει πεπερασμένο πάχος και, επομένως, είναι δυνατή η δημιουργία εικόνων σε

διαφορετικά επίπεδα (οπτικός τεμαχισμός) εντός της τομής του ιστού, αποκαλύπτοντας λεπτομέρειες που πιθανώς δεν θα φαίνονταν διαφορετικά. Ο οπτικός τεμαχισμός κατέστη εφικτός με την ανάπτυξη μιας ειδικής διάταξης (με χρήση βηματικού κινητήρα και Arduino) και λογισμικού, που επιτρέπουν την περιστροφή του πλακιδίου με την υπό εξέταση τομή γύρω από τον οριζόντιο άξονα και τη λήψη εικόνας σε κάθε θέση. Η περιστροφή αυτή μετατρέπει το οπτικό μικροσκόπιο σε γεωμετρία αξονικής τομογραφίας περιορισμένου αριθμού προβολών. Με τον τρόπο αυτό, μπορεί να γίνει χρήση αλγορίθμων τομογραφικής ανακατασκευής από προβολές για τον οπτικό τεμαχισμό της τομής ιστού. Δοκιμάστηκαν δύο κλασικοί αλγόριθμοι ανακατασκευής (η φιλτραρισμένη οπισθοπροβολή και η αλγεβρική τεχνική ανακατασκευής). Οι εικόνες που προέκυψαν ήταν ικανοποιητικής ποιότητας, αλλά παρουσίαζαν ορισμένα τεχνικά σφάλματα. Συμπερασματικά, η χρήση κλασικών αλγορίθμων τομογραφικής ανακατασκευής με περιορισμένες αριθμό προβολών, επιτρέπει τη διερεύνηση του δείγματος σε οποιοδήποτε επιθυμητό οπτικό επίπεδο, αποκαλύπτοντας πληροφορίες που θα ήταν δύσκολο να εντοπιστούν όταν εστιάζουμε μόνο στις συμβατικές δισδιάστατες εικόνες μικροσκοπίου.

Λέξεις κλειδιά: οπτική μικροσκοπία, μικροσκοπία φωτεινού πεδίου, τομές ιστού, τρισδιάστατη ανακατασκευή, τομογραφική απεικόνιση, ευθυγράμμιση εικόνων, φιλτραρισμένη οπισθοπροβολή, αλγεβρική μέθοδος ανακατασκευής, βαθιά μάθηση.

Abstract

Optical microscopy, also known as light microscopy, is a versatile and widely used technique for imaging and studying objects at the microscale and nanoscale level using visible light and optical lenses. It is a fundamental tool in various scientific fields such as biology, materials science, chemistry and medicine. In particular, bright-field microscopy, a fundamental technique in the field of optical microscopy, is one of the simplest and most common methods for observing biological and other transparent samples.

However, there is deficiency of comprehensive 3D histological data acquisition and analysis techniques using conventional optical microscopy of transmitted light. Existing methodologies predominantly offer 2D snapshots of tissue sections, overlooking the intricate 3D microarchitecture that plays a vital role in understanding tissue function, development, and disease progression. Three-dimensional imaging is possible using specialized microscopes which are usually quite expensive. The question arises as to whether 3D imaging of a tissue is feasible using a conventional optical microscope of transmitted light.

In this thesis, we first describe the basic principles of microscopy and common laboratory techniques in histopathology. Then, two techniques for three-dimensional tissue reconstruction from bright-field microscopy images are presented. The first technique involves automating a series of steps to create a digital 3D volume of a tissue from conventional bright-field microscope images. Specifically, digital images of region of interest (defined by an expert) are collected from successive tissue sections. Image registration and deep learning-based interpolation techniques are then used to generate a 3D volume of the region of interest. An expert histopathologist evaluated the information provided by the 3D volume and the results showed that the 3D volume may reveal details that are not clearly visible or even undetectable in the images of a conventional microscope. Unlike other 3D tissue imaging technologies, this technique has the following advantages. (b) It does not require a special device; it can be applied with any conventional bright-field microscope. (c) It can be used for any given routine application, not only for certain specialized clinical studies.

The second technique involves the tomographic imaging of a tissue section with optical sectioning (as opposed to the previous technique which involves physical sectioning of the tissue under examination). This technique is based on the idea that each tissue section has a finite thickness and therefore it is possible to create images in different planes (optical slicing) within the tissue section, revealing details that would probably not be seen otherwise. Optical slicing was made possible by the development of a special device (using a stepper motor and Arduino) and software, which allow rotation of the slide containing the tissue section under consideration around the horizontal axis and image acquisition at each position. This rotation converts the optical microscope into a CT geometry with limited number of angles. In this way, tomographic reconstruction algorithms from projections can be used to visually slice the tissue section. Two classical reconstruction algorithms (the filtered

back-projection and the algebraic reconstruction technique) were tested. The resulting images were of satisfactory quality, but exhibited some artefacts. In conclusion, the use of classical tomographic reconstruction algorithms with a limited number of projections allows to explore the sample in any desired optical plane, revealing information that would be difficult to detect when focusing only on conventional two-dimensional microscope images.

Keywords: optical microscopy, bright field microscopy, tissue sections, 3D reconstruction, tomographic imaging, image registration, filtered back projection, algebraic reconstruction method, deep learning.

Ευχαριστίες

Οι ευχαριστίες που παρατίθενται στη σελίδα αυτή μπορούν να θεωρηθούν ως μια ελάχιστη αναγνώριση προς τα πρόσωπα που με στήριξαν επιστημονικά και ηθικά κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής. Δίχως τη στήριξη αυτή, είναι βέβαιο ότι η εκπλήρωση των στόχων της εργασίας αλλά και η ολοκλήρωσή της θα ήταν αδύνατη.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τον επιβλέποντα Καθηγητή, κ. Γκλώτσο Δημήτρη, για την επιστημονική καθοδήγηση και ηθική συμπαράσταση. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Ασβεστά Παντελή καθώς και τον Αναπλ. Καθηγητή, κ. Κωστόπουλο Σπύρο για τις πολύτιμες συμβουλές και την αμέτρητη στήριξη που απλόχερα μου προσέφεραν καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο καθηγητή, κ. Κάβουρα Διονύση για την συνεχή και απαράμιλλη συνεργασία που μου παρείχε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Επιστημονικό συμβουλίου του Γ.Ν.Α «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ» για την άδεια και έγκριση της ερευνητικής συνεργασίας με το Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Κόνιαρη Ευθύμη Ιατρό παθολογοανατόμο επιμελητή Α΄ του Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο» καθώς και στον κ. Μανώλη Γιάννη, παρασκευαστή για την αγαστή και απλόχερη συνεργασία που μου προσέφεραν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του Διοικητικού συμβουλίου, καθώς και στα μέλη του υπηρεσιακού συμβουλίου του Ψ.Ν.Α «ΔΡΟΜΟΚΑΪΤΕΙΟ» όπου και εργάζομαι, για την έγκριση της εκπαιδευτικής μου άδειας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για την πολύπλευρη στήριξη και συμπαράσταση που μου προσέφεραν και τη υπομονή που επέδειξαν στη διάρκεια της διατριβής μου.

Δημοσιεύσεις

P. Koudounas, E. Koniaris, I. Manolis, P. A. Asvestas, S. Kostopoulos, D. Cavouras and D. Glotsos “Three-dimensional tissue volume generation in conventional brightfield microscopy”, *Microscopy Research and Technique*, 2022, DOI: 10.1002/jemt.24141.

P. Koudounas, E. Koniaris, I. Manolis, P. Asvestas, S. Kostopoulos, D. Cavouras, and D. Glotsos “An experimental platform for tomographic reconstruction of tissue images in brightfield microscopy”, *Sensors* (under review, minor revision).

P. Koudounas, E. Koniaris, I. Manolis, P. Asvestas, S. Kostopoulos, D. Cavouras and D. Glotsos, “Deep learning assisted histological image generation”, *Focus on Microscopy Conference*, 2022

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	1
1.1	Ιστορική αναδρομή στη μικροσκοπία.....	1
1.2	Η φυσική του φωτός	5
1.2.1	Ιδιότητες φωτός.....	6
1.2.2	Διάθλαση φωτός.....	8
1.2.3	Συμβολή και περίθλαση φωτός.....	10
1.3	Κατηγοριοποίηση οπτικών μικροσκοπίων	12
1.4	Δομή μικροσκοπίου	13
1.4.1	Φωτισμός.....	14
1.4.2	Συμπυκνωτής	15
1.4.3	Τράπεζα.....	16
1.4.4	Φακοί	16
1.4.5	Καταγραφή εικόνας	18
1.5	Περιορισμοί στην οπτική μικροσκοπία	21
1.5.1	Χρωματική εκτροπή	21
1.5.2	Σφαιρική εκτροπή	21
1.5.3	Αστιγματισμός	22
1.5.4	Καμπυλότητα πεδίου.....	22
1.6	Μηχανισμοί αντίθεσης	23
1.7	Άλλα είδη μικροσκοπίας	25
1.7.1	Μικροσκοπία πόλωσης.....	25
1.7.2	Μικροσκοπία αντίθεσης φάσης	26
1.7.3	Μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου.....	27
1.7.4	Μικροσκοπία φθορισμού	28
1.7.5	Συνεστιακή μικροσκοπία	30
1.7.6	Πολυφωτονική μικροσκοπία	31
1.7.7	Μικροσκοπία υπερανάλυσης.....	32
2	Εργαστηριακές Τεχνικές στην Ιστοπαθολογία	34
2.1	Μονιμοποίηση ιστού	34
2.2	Αφυδάτωση.....	36
2.3	Καθαρισμός (Clearing)	37
2.4	Διήθηση/εμποτισμός	38

2.5	Ενσωμάτωση	39
2.6	Μικροτόμηση	41
2.6.1	Περιστροφική μικροτόμος.....	42
2.6.2	Παλινδρομική μικροτόμος.....	43
2.6.3	Μικροτόμος τύπου ελκήθρου	43
2.6.4	Συρόμενη μικροτόμος.....	44
2.6.5	Κρουστάτης μικροτόμος.....	44
2.6.6	Υπερμικροτόμος.....	45
2.6.7	Μικροτόμος λέιζερ.....	45
2.7	Χρώση ιστού.....	47
2.7.1	Επεξήγηση χρώσης ιστών	47
2.7.2	Χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης.....	49
2.7.3	Χρώση περιοδικού οξέος – Schiff	53
3	Τρισδιάστατη Ανακατασκευή Ιστού στη Συμβατική Μικροσκοπία Φωτεινού Πεδίου.....	54
3.1	Εισαγωγή.....	54
3.2	Δεδομένα	56
3.3	Μεθοδολογία.....	58
3.3.1	Διόρθωση χρωματικών διακυμάνσεων.....	58
3.3.2	Ευθυγράμμιση	60
3.3.3	Επαναδειγματοληψία υψηλής διακριτικής ικανότητας	64
3.4	Αποτελέσματα.....	68
3.5	Σχολιασμός Αποτελεσμάτων.....	71
4	Τομογραφική Απεικόνιση Τομής Ιστού στη Συμβατική Μικροσκοπία Φωτεινού Πεδίου.....	74
4.1	Εισαγωγή.....	74
4.2	Δεδομένα	76
4.3	Μεθοδολογία.....	76
4.3.1	Διάταξη συλλογής εικόνων.....	77
4.3.2	Ευθυγράμμιση εικόνων	83
4.3.3	Τομογραφική ανακατασκευή	84
4.4	Αποτελέσματα.....	96
4.5	Συζήτηση	110
5	Συμπεράσματα – Μελλοντικές Επεκτάσεις	115

Βιβλιογραφία	117
--------------------	-----

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1.1. Το μικροσκόπιο του Jansen (Πηγή).	2
Εικόνα 1.2. Το μικροσκόπιο του Γαλιλαίου (Πηγή)	2
Εικόνα 1.3. Το μικροσκόπιο του Hooke (Πηγή).	3
Εικόνα 1.4. Το μικροσκόπιο του van Leeuwenhoek (Πηγή)	4
Εικόνα 1.5. Κυματικές ιδιότητες του φωτός (Πηγή [10]).	6
Εικόνα 1.6. Αναπαράσταση πολωμένου κύματος φωτός (Πηγή [10]).	8
Εικόνα 1.7. Διάθλαση φωτός όταν προσπίπτει υπό γωνία σε υλικό (Πηγή [10]).	9
Εικόνα 1.8. Το φαινόμενο της διάθλασης φωτός σε φακό με κυρτή επιφάνεια (Πηγή [10]).	9
Εικόνα 1.9. (α) Αποσβεστική συμβολή. (β) Ενισχυτική συμβολή (Πηγή [10]).	10
Εικόνα 1.10. Δίσκος του Airy (Πηγή).....	11
Εικόνα 1.11. Δομή ενός μικροσκοπίου ανεστραμμένου τύπου (Πηγή).....	13
Εικόνα 1.12. Γεωμετρική οπτική λεπτού κυρτού φακού. Φαίνονται η εστιακή απόσταση (f), το εστιακό σημείο (F), τα κύρια επίπεδα, η απόσταση αντικειμένου-φακού (a), η απόσταση φακού-εικόνας (b) (Πηγή).	17
Εικόνα 1.13. Δομή ανθρώπινου οφθαλμού (Πηγή).	18
Εικόνα 1.14. Χρωματική εκτροπή. Όσο πιο μικρό είναι το μήκος κύματος του φωτός τόσο πιο κοντά γίνεται η εστίαση στον φακό (Πηγή).	21
Εικόνα 1.15. Σφαιρική εκτροπή. Οι ακτίνες φωτός που διέρχονται από την περιφέρεια του φακού εστιάζονται πιο κοντά σε αυτόν (Πηγή).....	22
Εικόνα 1.16. Αστιγματισμός (Πηγή).....	22
Εικόνα 1.17. Καμπυλότητα πεδίου (Πηγή).	23
Εικόνα 1.18. Τυπική διαμόρφωση μικροσκοπίου πόλωσης (Πηγή: [10]).	25
Εικόνα 1.19. (α) Τυπική διαμόρφωση μικροσκοπίου αντίθεσης φάσης, (β) Τυπική εικόνα μικροσκοπίου αντίθεσης φάσης (Πηγή: [10]).	27
Εικόνα 1.20. Τυπική διαμόρφωση μικροσκοπίου σκοτεινού πεδίου (Πηγή: [10]).	28
Εικόνα 1.21. (α) Τυπική διαμόρφωση μικροσκοπίου φθορισμού, (β) Τυπική εικόνα μικροσκοπίου φθορισμού (Πηγή: [10]).	29
Εικόνα 1.22. (α) Τυπική διαμόρφωση συνεστιακού μικροσκοπίου (Πηγή: [10]). (β) Συνεστιακή εικόνα κυττάρου αρουραίου μετάφασης (PtK2) χρωματισμένο με FITC-φαλλοιδίνη για F-ακτίνη (πράσινο) και ιωδιούχο προπίδιο για χρωμοσώματα (κόκκινο) (Πηγή: [15]).	31
Εικόνα 1.23. Μονή (α) και διπλή (β) διέγερση φωτονίων και η σχετική ένταση φθορισμού (Πηγή: [10]).	32
Εικόνα 1.24. Μικροσκοπία δομημένου φωτισμού: (α) Δείγμα. (β) Προβαλλόμενο πλέγμα. (γ) Οι πληροφορίες υψηλής συχνότητας εμφανίζονται ως κροσσοί Moiré (Πηγή: [10]).	33
Εικόνα 2.1. Καλούπια ενσωμάτωσης ιστού. (α) Καλούπι τύπου Leuckhard. (β) Ανοξειδωτο καλούπι. (γ) Πλαστικό καλούπι. (Πηγή: [18])	39
Εικόνα 2.2. Συσκευής ενσωμάτωσης ιστού (Πηγή: [18]).	40
Εικόνα 2.3. Παράδειγμα ιστού ενσωματωμένου σε μπλοκ παραφίνης.	40
Εικόνα 2.4. Διαδικασία κατάτμησης ιστού (Πηγή: [18]).	41
Εικόνα 2.5. Χρωματισμένες τομές ιστού τοποθετημένες σε πλακίδιο.	42

Εικόνα 2.6. (α) Περιστροφική μικροτόμος (Πηγή: [18]). (β) Αρχή λειτουργίας (Πηγή).	43
Εικόνα 2.7. Παλινδρομική μικροτόμος (Πηγή).	43
Εικόνα 2.8. Μικροτόμος τύπου έλκηθρου (Πηγή).....	44
Εικόνα 2.9. Συρόμενη μικροτόμος (Πηγή).	44
Εικόνα 2.10. Κρουοστάτης μικροτόμος (Πηγή).	45
Εικόνα 2.11. Υπερμικροτόμος (Πηγή).	45
Εικόνα 2.12. Προφίλ λεπίδας μικροτόμου. (α) Κοιλεπίπεδο. (β) Αμφίκιλο. (γ) Σφήνα. (δ) Ακμή εργαλείου. (Πηγή: [18])	46
Εικόνα 2.13. Τεχνικά σφάλματα σε ιστούς κατά τη μικροτόμηση. (α) Σκίσιμο του ιστού λόγω της ανομοιόμορφης κοπτικής άκρης του μαχαιριού. (β) Φυσαλίδες αέρα λόγω μη ελεγχόμενης θερμοκρασίας του υδατόλουτρου. (Πηγή [18])	46
Εικόνα 2.14. Ιστός χωρίς χρώση (Πηγή: [19]).	47
Εικόνα 2.15. Σχηματικό διάγραμμα δημιουργίας χρώματος από τη χρωστική ουσία. Το χρωμοφόρο απορροφά το φως και δίνει το χρώμα. Το αυξόχρωμα παρέχει ηλεκτρόνια στο χρωμοφόρο για την απορρόφηση περισσότερου φωτός (Πηγή: [18]).	48
Εικόνα 2.16. Ηπατικός ιστός χρωματισμένος με Η&Ε. Τα μπλε βέλη δείχνουν έναν πυρήνα χρωματισμένο από την αιματοξυλίνη, ενώ η διακεκομμένη γραμμή περικλείει πρωτεΐνες σε εξωκυτταρική περιοχή χρωματισμένη με ηωσίνη (Πηγή: [19]).	50
Εικόνα 2.17. Ιστός πάγκρεας χρωματισμένος με Η&Ε, δείχνοντας δομές acinus (μαύρο περίγραμμα), μεμονωμένο κύτταρο (κίτρινο περίγραμμα) και κυτταροπλασματική βασεοφιλία (κίτρινα βέλη) (Πηγή: [19]).	50
Εικόνα 2.18. Φλεγμονώδης ιστός χρωματισμένος με Η&Ε, που δείχνει κύτταρα με (μπλε βέλη) και χωρίς (πράσινα βέλη) κυτταροπλασματική βασεοφιλία. Επίσης φαίνεται ένα αιμοφόρο αγγείο (διακεκομμένες γραμμές) με ερυθρά αιμοσφαίρια (μαύρο βέλος) (Πηγή: [19]).	51
Εικόνα 2.19. Παραθυροειδής αδένας χρωματισμένος με Η&Ε, στον οποίο εμφανίζονται κύτταρα με έντονη κυτταροπλασματική ηωσινοφιλία (διακεκομμένη περιοχή) (Πηγή: [19]).	52
Εικόνα 2.20. Ηπατικός ιστός, με πυρήνες ενεργών (κίτρινα βέλη) και ανενεργών (μαύρα βέλη) κυττάρων (Πηγή: [19]).	52
Εικόνα 2.21. Χρώση νήστιδας με PAS. Υποδεικνύονται κύτταρα πλούσια σε υδατάνθρακες, που ονομάζονται κυλικοειδή κύτταρα (μαύρα βέλη) (Πηγή: [19])...	53
Εικόνα 3.1. Βήματα δημιουργίας εικόνων τομών ιστού.	57
Εικόνα 3.2. Παράδειγμα μείωσης των χρωματικών διακυμάνσεων μεταξύ εικόνων ιστού. Περίπτωση αδενοκαρκινώματος με μεγέθυνση × 50. (α) Εικόνα (από την περίπτωση 3) της οποίας το ιστόγραμμα είναι το ιστόγραμμα αναφοράς. (β) Εικόνα της οποίας το ιστόγραμμα θα αντιστοιχιστεί με το ιστόγραμμα αναφοράς. (γ) Εικόνα μετά από αντιστοίχιση ιστογράμματος. Στη δεξιά στήλη φαίνονται τα αντίστοιχα ιστογράμματα (κάθε εικόνα μετατράπηκε σε εικόνα κλίμακας του γκριζου για τον υπολογισμό του ιστογράμματος).	60

Εικόνα 3.3. Διαδικασία ευθυγράμμισης. Περίπτωση αδenoκαρκινώματος με μεγέθυνση $\times 50$. (α) Εικόνα αναφοράς. (β) Εικόνα προς ευθυγράμμιση. (γ) Σύντηξη των δύο εικόνων με χρήση άλφα ανάμειξης πριν από την ευθυγράμμιση. (δ) Σύντηξη των δύο εικόνων με χρήση άλφα ανάμειξης μετά την ευθυγράμμιση.	64
Εικόνα 3.4. Μπλοκ διάγραμμα της διαδικασίας για τη δημιουργία της εικόνας διαφοράς.	65
Εικόνα 3.5. Παράδειγμα δημιουργίας εικόνας διαφοράς. Περίπτωση αδenoκαρκινώματος (1080×1080) με μεγέθυνση $\times 50$. (α) Αρχική εικόνα RGB. (β) Εικόνα καναλιού φωτεινότητας (Y) (1080×1080). (γ) Υποδειγματοληψία εικόνας (Y') κατά 10 με χρήση κυβικής παρεμβολής (108×1080). (δ) Υπερδειγματοληψία εικόνας (Y'') κατά 10 χρησιμοποιώντας κυβική παρεμβολή (1080×1080). (ε) Εικόνα διαφοράς ($R = Y - Y''$) (1080×1080).	66
Εικόνα 3.6. Μέθοδος επαναδειγματοληψίας. Περίπτωση αδenoκαρκινώματος (1920×1080) με μεγέθυνση $\times 50$. (α) Περιοχή ενδιαφέροντος από δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz . (β) Επαναδειγματοληψία κατά 10 χρησιμοποιώντας κυβική παρεμβολή (743×236). (γ) Εικόνα διαφοράς (743×236). (δ) Επαναδειγματοληψία κατά 10 χρησιμοποιώντας συνελκτικό νευρωνικό δίκτυο (743×236).	67
Εικόνα 3.7. Περιοχή ενδιαφέροντος από περίπτωση ινοαδενώματος μαστού (505×357) με μεγέθυνση $\times 400$. (α) Τυπική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy (χρώση H&E) (άνω διατομή όγκου στο (γ)). (β) Ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (μπροστινή διατομή όγκου στο (γ)) (508×242). (γ) Δείγμα όγκου ανακατασκευασμένου ιστού.	68
Εικόνα 3.8. Περιοχή ενδιαφέροντος από λοβιακό καρκίνωμα in situ με μεγέθυνση $\times 200$. (α) Τυπική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy (χρώση H&E) (άνω διατομή όγκου στο (γ)). (β) Ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (μπροστινή διατομή τόμου στο (γ)). (γ) Δείγμα όγκου ανακατασκευασμένου ιστού.	69
Εικόνα 3.9. Περιοχή ενδιαφέροντος από περίπτωση αδenoκαρκινώματος με μεγέθυνση $\times 50$. (α) Συμβατική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy (αριστερά). (β) Ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz της περιοχής ενδιαφέροντος. Το ορθογώνιο στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy απεικονίζει δύο αγγειακά έμβολα, τα οποία φαίνονται να περιλαμβάνουν έναν μόνο αγγειακό αυλό στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (κύκλος).	69
Εικόνα 3.10. Περιοχή ενδιαφέροντος από λοβιακό καρκίνωμα in situ με μεγέθυνση $\times 200$. (α) Συμβατική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy . (β) Ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (δεξιά) της περιοχής ενδιαφέροντος. Ο κύκλος στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy απεικονίζει δύο λοβιακά νεοπλασματικά κύτταρα, που διεισδύουν στο μυϊκό τοίχωμα ενός αγγείου, ενώ ο κύκλος στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz αποκαλύπτει ένα τρίτο λοβιακό νεοπλασματικό κύτταρο στο μυϊκό τοίχωμα.	70
Εικόνα 3.11. Περιοχή ενδιαφέροντος από πορογενές καρκίνωμα in situ με μεγέθυνση $\times 100$. (α) Συμβατική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy , (β) ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (δεξιά) της περιοχής ενδιαφέροντος. Στην	

δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz , εντοπίστηκε ένα νεοπλασματικό έμβολο του πόρου, σε έναν αγγειακό χώρο (μέσα στον αυλό του αγγείου μπορούμε να δούμε μία νεοπλασματική συστάδα πορογενών κυττάρων). Αυτό το εύρημα δεν μπορούσε να αναπαραχθεί με σαφήνεια στις εικόνες του άξονα xy και για σύγκριση έχει επισημανθεί η (κατά προσέγγιση) περιοχή του ευρήματος με ένα κόκκινο τετράγωνο.	71
Εικόνα 4.1. Διάταξη για τη λήψη εικόνων τομής ιστού σε διάφορες γωνίες.	77
Εικόνα 4.2. Πλαίσιο στήριξης πλακιδίου με τομές ιστού.	77
Εικόνα 4.3. Διάταξη συγκράτησης πλαισίου.	78
Εικόνα 4.4. Βάση στήριξης με τα γραμμικά ρουλεμάν.	78
Εικόνα 4.5. Σύνδεση του βηματικού κινητήρα με τον άξονα περιστροφής μέσω κατάλληλου συνδέσμου.	79
Εικόνα 4.6. Ο βηματικός κινητήρας 28BYJ-48 (Πηγή).	79
Εικόνα 4.7. (α) Απλοποιημένο μπλοκ διάγραμμα του ULN2003. (β) Υλοποίηση κάθε βαθμίδας (Πηγή: [93]).	80
Εικόνα 4.8. Συνδεσμολογία βηματικού κινητήρα 28BYJ-48 με Arduino μέσω του κυκλώματος οδήγησης ULN2003A (Πηγή).	80
Εικόνα 4.9. Εικόνες μικροσκοπίου από την περιστροφή πλακιδίου ιστού. (α) Χωρίς περιστροφή. (β) Περιστροφή 5° . (γ) Περιστροφή 10°	83
Εικόνα 4.10. Παράδειγμα ευθυγράμμισης. (α) Εικόνα αναφοράς (το πλακίδιο στην οριζόντια θέση). (β) Εικόνα για περιστροφή 5° πριν την ευθυγράμμιση. (γ) Εικόνα μετά την ευθυγράμμιση. (δ) Σύντηξη της εικόνας αναφοράς με την ευθυγραμμισμένη εικόνα.	84
Εικόνα 4.11. Ορισμός ευθείας για τον υπολογισμό του μετασχηματισμού Radon.	84
Εικόνα 4.12. Δημιουργία παράλληλης προβολής για σταθερή γωνία θ	85
Εικόνα 4.13. Ο μετασχηματισμός Fourier της παράλληλης προβολής μία συνάρτησης δίνει τον μετασχηματισμό Fourier της συνάρτησης κατά μήκος μίας ακτινικής γραμμής στη γωνία της προβολής.	86
Εικόνα 4.14. Αναπαράσταση οπισθοπροβολής. Η φιλτραρισμένη προβολή στη θέση t έχει την ίδια συνεισφορά σε όλα τα σημεία στο επίπεδο $x - y$ κατά μήκος της γραμμής LM.	88
Εικόνα 4.15. Στις αλγεβρικές μεθόδους ανακατασκευής, ένα τετραγωνικό πλέγμα τοποθετείται στο πεδίο ορισμού της εικόνας. Οι τιμές της εικόνας θεωρούνται σταθερές σε κάθε κελί του πλέγματος.	90
Εικόνα 4.16. Γραφική απεικόνιση της μεθόδου του Kaczmarz επίλυσης αλγεβρικών εξισώσεων στις δύο διαστάσεις.	92
Εικόνα 4.17. Εικόνες (μετά την ευθυγράμμιση) τομής ιστού για γωνίες από -10° έως $+10^\circ$ με βήμα $0, 5^\circ$. Οι εικόνες είναι διατεταγμένες σε αύξουσα γωνία περιστροφής κατά γραμμές.	96
Εικόνα 4.18. Ορισμός συστήματος συντεταγμένων.	97
Εικόνα 4.19. Τομογραφική απεικόνιση στο αξονικό επίπεδο με χρήση της τεχνικής της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής.	98
Εικόνα 4.20. Τομογραφική απεικόνιση στο στεφανιαίο επίπεδο με χρήση της τεχνικής της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής.	98

Εικόνα 4.21. Τομογραφική απεικόνιση στο οβελιαίο επίπεδο με χρήση της τεχνικής της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής.	99
Εικόνα 4.22. Τρισδιάστατη ανακατασκευή τομής ιστού με χρήση της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής.....	99
Εικόνα 4.23. Παράδειγμα εικόνας στο αξονικό επίπεδο με χρήση της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.	100
Εικόνα 4.24. Παράδειγμα εικόνας στο στεφανιαίο επίπεδο με χρήση της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.....	101
Εικόνα 4.25. Παράδειγμα εικόνας στο οβελιαίο επίπεδο με χρήση της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.	102
Εικόνα 4.26. Τομογραφική απεικόνιση στο αξονικό επίπεδο με χρήση της ART.....	102
Εικόνα 4.27. Τομογραφική απεικόνιση στο στεφανιαίο επίπεδο με χρήση της ART.	103
Εικόνα 4.28. Τομογραφική απεικόνιση στο οβελιαίο επίπεδο με χρήση της ART. ...	104
Εικόνα 4.29. Τρισδιάστατη ανακατασκευή τομής ιστού με χρήση της ART.....	104
Εικόνα 4.30. Παράδειγμα εικόνας στο αξονικό επίπεδο με χρήση της ART. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.	105
Εικόνα 4.31. Παράδειγμα εικόνας στο στεφανιαίο επίπεδο με χρήση της ART. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.	106
Εικόνα 4.32. Παράδειγμα εικόνας στο οβελιαίο επίπεδο με χρήση της ART. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.	107
Εικόνα 4.33. Σύγκριση ανακατασκευής στο αξονικό επίπεδο της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής για βήμα γωνιών: (α) 0, 5° (β) 1° (γ) 2° (δ) 4°.	107
Εικόνα 4.34. Σύγκριση ανακατασκευής στο στεφανιαίο επίπεδο της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής για βήμα γωνιών: (α) 0, 5° (β) 1° (γ) 2° (δ) 4°.	108
Εικόνα 4.35. Σύγκριση ανακατασκευής στο οβελιαίο επίπεδο της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής για βήμα γωνιών: (α) 0, 5° (β) 1° (γ) 2° (δ) 4°.	108
Εικόνα 4.36. Σύγκριση ανακατασκευής στο αξονικό επίπεδο της ART για βήμα γωνιών: (α) 0, 5° (β) 1° (γ) 2° (δ) 4°.	108
Εικόνα 4.37. Σύγκριση ανακατασκευής στο στεφανιαίο επίπεδο της ART για βήμα γωνιών: (α) 0, 5° (β) 1° (γ) 2° (δ) 4°.	109
Εικόνα 4.38. Σύγκριση ανακατασκευής στο οβελιαίο επίπεδο της ART για βήμα γωνιών: (α) 0, 5° (β) 1° (γ) 2° (δ) 4°.	109
Εικόνα 4.39. Σύγκριση ανακατασκευής στο αξονικό επίπεδο της ART για (α) 10 επαναλήψεις, (β) 5 επαναλήψεις και (γ) 15 επαναλήψεις.	109
Εικόνα 4.40. Σύγκριση ανακατασκευής στο στεφανιαίο επίπεδο της ART για (α) 10 επαναλήψεις, (β) 5 επαναλήψεις και (γ) 15 επαναλήψεις.	110
Εικόνα 4.41. Σύγκριση ανακατασκευής στο οβελιαίο επίπεδο της ART για (α) 10 επαναλήψεις, (β) 5 επαναλήψεις και (γ) 15 επαναλήψεις.	110

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 2-1. Σύγκριση των διάφορων διαλυμάτων μονιμοποίησης ιστού.	35
Πίνακας 2-2. Σύγκριση των διαφόρων παραγόντων αφυδάτωσης.	37
Πίνακας 2-3. Σύγκριση ουσιών καθαρισμού ιστού.	38
Πίνακας 3-1. Παράμετροι συλλογής δεδομένων.	58

Ορολογία

Αγγλικός Όρος	Ελληνικός όρος
Aberration	Εκτροπή
Adenocarcinoma	Αδενοκαρκίνωμα
Algebraic Reconstruction Technique	Αλγεβρική Τεχνική Ανακατασκευής
Clearing	Καθαρισμός
Condenser	Συμπυκνωτής
Convolutional Neural Network	Συνελικτικό Νευρωνικό Δίκτυο
Dehydration	Αφυδάτωση
Ductal Carcinoma	Πορώδες Καρκίνωμα
Embedding	Ενσωμάτωση
Eosin	Ηωσίνη
Eyepiece Lens	Προσοφθάλμιος Φακός
Fibroadenoma	Ινοαδένωμα
Filtered Backprojection	Φιλτραρισμένη Οπισθοπροβολή
Fixation	Μονιμοποίηση
Haematoxylin	Αιματοξυλίνη
Histopathology	Ιστοπαθολογία
Infiltration	Διήθηση
Magnification	Μεγέθυνση
Microcontroller	Μικροελεγκτής
Microtome	Μικροτόμος
Objective Lens	Αντικειμενικός Φακός
Optical Microscopy	Οπτική Μικροσκοπία
Projection	Προβολή
Reconstruction	Ανακατασκευή
Registration	Ευθυγράμμιση
Resampling	Επαναδειγματοληψία
Slice	Τομή
Stage	Τράπεζα
Staining	Χρώση
Stepper Motor	Βηματικός Κινητήρας
Super-Resolution	Υπερυψηλή Διακριτική Ανάλυση
Three Dimensional Volume	Τρισδιάστατος Όγκος
Tissue	Ιστός
Tomographic Imaging	Τομογραφική Απεικόνιση

1 Εισαγωγή

1.1 Ιστορική αναδρομή στη μικροσκοπία

Η πρόοδος της επιστήμης βασίζεται ανέκαθεν στη δυνατότητα παρατήρησης γεγονότων: από την παρακολούθηση της κίνησης ουράνιων σωμάτων μέχρι την παρακολούθηση μικροσκοπικών οργανισμών. Αρχικά οι παρατηρήσεις των διαφόρων φαινομένων λάμβαναν χώρα χωρίς κάποιο όργανο αλλά αποκλειστικά με το ανθρώπινο μάτι. Από την εφεύρεση του μεγεθυντικού φακού πριν από περίπου 2.000 χρόνια, υπήρξε μια αργή βελτίωση στην ικανότητα απεικόνισης με ολοένα μεγαλύτερη λεπτομέρεια τόσο σε αστρονομική όσο και σε μικροσκοπική κλίμακα. Ίσως η πρώτη καταγεγραμμένη χρήση του φακού για παρατηρήσεις σε μικροσκοπική κλίμακα ήταν από τον Πλίνιο τον Πρεσβύτερο [1], όπου χρησιμοποιήθηκε ένας μεγεθυντικός φακός για την εξέταση της βλάβης ιστών και επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις, για την καυτηρίαση πληγών χρησιμοποιώντας το φως του ήλιου. Τα πρώτα χρόνια χρήσης του μεγεθυντικού φακού δεν ήταν πλήρως κατανοητή η φυσική της οπτικής με βάση την οποία γινόταν η δημιουργία της μεγεθυμένης εικόνας. Απλώς γινόταν κατασκευή φακών με βάση την ελεγχόμενη τήξη του γυαλιού και την εμπειρία του τεχνίτη να κατασκευάσει τον κατάλληλο φακό. Χρειάστηκε να περάσουν αρκετοί αιώνες μέχρι να εμφανιστούν (ή να καταγραφτούν) οι πρώτες πραγματικά πρακτικές εφαρμογές του μεγεθυντικού φακού από τον Salvino D' Armate στην Ιταλία, τον 12^ο αιώνα, ο οποίος θεωρείται ο εφευρέτης των γυαλιών όρασης για τη πρεσβυπία.

Τον 16^ο αιώνα, οι Ολλανδοί Zacharias και Hans Jansen (γιος και πατέρας) κατασκεύασαν το πρώτο οπτικό μικροσκόπιο, το οποίο ήταν ένα σύνθετο όργανο που έκανε χρήση πολλαπλών φακών (Εικόνα 1.1). Η κατασκευή των φακών έγινε μέσω πειραματισμού και προσεκτικά καταγεγραμμένων παρατηρήσεων. Παρόλο που οι σημειώσεις δεν διασώθηκαν, καθώς χάθηκαν κατά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο, έχει διαπιστωθεί ότι ανέπτυξαν ένα μικροσκόπιο που περιελάμβανε τρεις σωλήνες που είχαν τη δυνατότητα μετατόπισης για τη ρύθμιση της εστίασης και την αλλαγή της μεγέθυνσης. Ο προσοφθάλμιος φακός ήταν αμφίκυρτος και ο αντικειμενικός φακός ήταν επιπεδόκυρτος, ο οποίος απαιτούσε τις πιο προηγμένες μεθόδους στίλβωσης που ήταν διαθέσιμες στα τέλη του 16^{ου} αιώνα. Η μεγέθυνση μπορούσε να ρυθμιστεί μεταξύ τρεις και δέκα φορές.



Εικόνα 1.1. Το μικροσκόπιο του Jansen (Πηγή¹).

Την ίδια περίοδο, ο Γαλιλαίος πειραματιζόταν επίσης με σύνθετα οπτικά συστήματα για να αναπτύξει το πρώτο τηλεσκόπιο. Συγκεκριμένα, το 1609, παρουσίασε ένα σύνθετο μικροσκόπιο που χρησιμοποιούσε και κυρτό και κοίλο φακό. Περιέγραψε το «τροποποιημένο τηλεσκόπιό του για να βλέπει αντικείμενα πολύ κοντά» στο βιβλίο του *Il Saggiatore* (1623) και κατασκευάστηκαν αρκετές παραλλαγές αυτού του οργάνου (Εικόνα 1.2). Εκείνη την εποχή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ο όρος «μικροσκόπιο».



Εικόνα 1.2. Το μικροσκόπιο του Γαλιλαίου (Πηγή²)

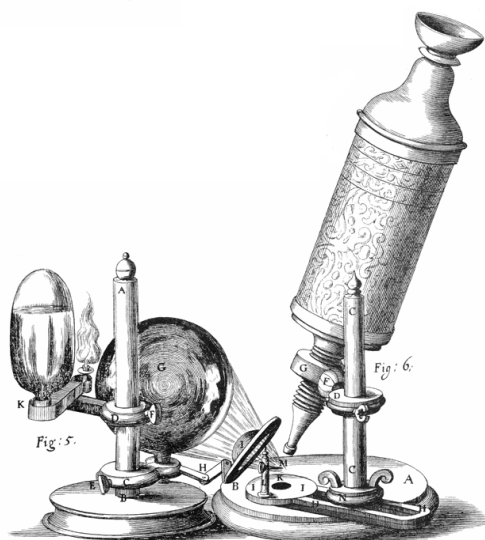
Στα επόμενα χρόνια, το μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση ενός ευρέος φάσματος δειγμάτων. Το 1665, ο Ρόμπερτ Χουκ, ως μέλος της Βασιλικής Εταιρείας του Λονδίνου για την επιμέλεια των πειραμάτων, χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο «κύτταρο» για να περιγράψει τη βασική μονάδα της ζωής. Το βιβλίο, με το όνομα *Micrographia*, που έγραψε ο Χουκ περιείχε εικόνες που προέκυψαν με ένα από τα καλύτερα μικροσκόπια της εποχής αυτής (Εικόνα 1.3). Αν

¹ Wikipedia, “Zacharias Janssen”, https://en.wikipedia.org/wiki/Zacharias_Janssen, 2003

² Wikipedia, “Galilean Compound Microscope, Museo Galileo, Florence”, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Galilean_Compound_Microscop,_Museo_Galileo,_Florence_Inv._3429,_224113.jpg, 2022

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

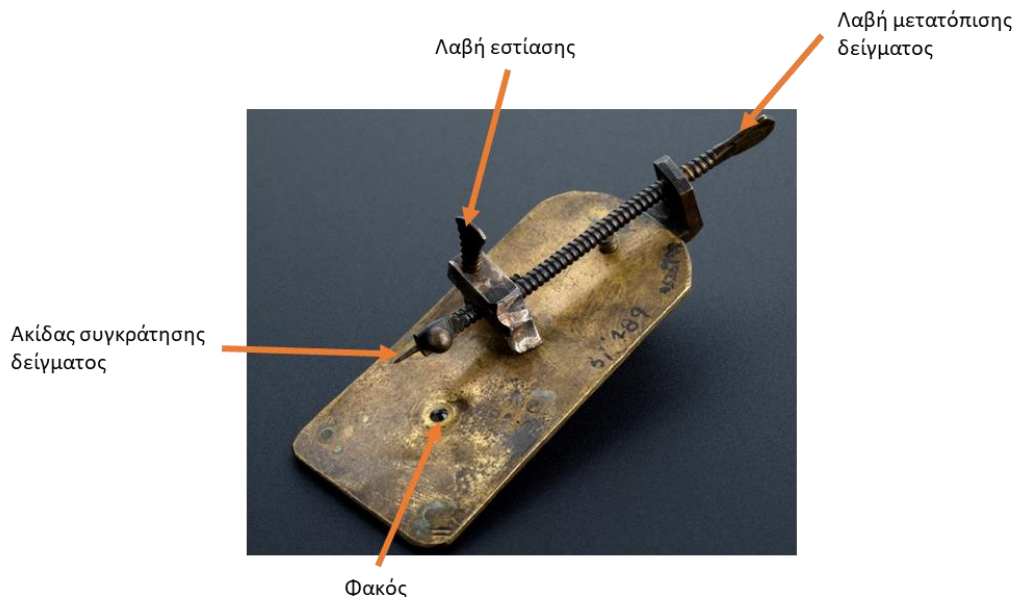
και είναι περισσότερο γνωστό για τις υψηλής ποιότητας χαλκογραφίες, το βιβλίο περιγράφει επίσης την κυματική θεωρία του φωτός, την οργανική φύση των απολιθωμάτων και αστρονομικές παρατηρήσεις. Κάποιες από τις θεωρίες που ανέπτυξε ο Χουκ έγιναν η αιτία να έχει αντιπαλότητα με τον Ισαάκ Νεύτωνα και έπρεπε να έρθει ο 20^{ος} αιώνας για να αναγνωριστεί η συνολική επιστημονική συνεισφορά του Ρόμπερτ Χουκ.



Εικόνα 1.3. Το μικροσκόπιο του Hooke (Πηγή³).

Βελτιώσεις στο μικροσκόπιο έγιναν μέσω της προόδου στην κατασκευή φακών με πρωτοπόρο τον Anton van Leeuwenhoek στην Ολλανδία. Το μικροσκόπιο του van Leeuwenhoek έκανε χρήση ενός ενιαίου σφαιρικού φακού. Το δείγμα προς παρατήρηση τοποθετούταν πάνω σε έναν πείρο, ο οποίος είχε τη δυνατότητα ακριβούς ρύθμισης ώστε να το δείγμα να εμφανίζεται στο επίκεντρο (Εικόνα 1.4). Λόγω της ικανότητάς του να παράγει φακούς υψηλής ποιότητας, παρήγαγε συστήματα με μεγέθυνση έως και 250 φορές περίπου. Ο van Leeuwenhoek έκανε παρατηρήσεις σε πολλαπλά ζωντανά δείγματα και του αποδίδεται η ανακάλυψη μονοκύτταρων οργανισμών. Οι επιστήμονες της εποχής και ειδικά η Βασιλική Εταιρεία του Λονδίνου, αντιμετώπισαν τα ευρήματά του με σκεπτικισμό. Εντούτοις, μετά από επίσκεψη μιας ομάδα επιστημόνων από το Λονδίνο στην Ολλανδία, διαπιστώθηκε η ορθότητα των παρατηρήσεων του van Leeuwenhoek. Αυτό είχε ως συνέπεια να γίνει μέλος της Βασιλικής Εταιρείας του Λονδίνου και να δημοσιευτούν 560 χειρόγραφα του με τις παρατηρήσεις του.

³ Wikipedia, "Robert Hooke", https://en.wikipedia.org/wiki/Robert_Hooke, 2023



Εικόνα 1.4. Το μικροσκόπιο του van Leeuwenhoek (Πηγή⁴)

Στα χρόνια που ακολούθησαν σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στην παραγωγή στοιχείων οπτικής υψηλής ποιότητας και παράλληλα έγινε κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο πρέπει να γίνεται ο συνδυασμός των φακών για βελτίωση της ποιότητας της παραγόμενης εικόνας. Συγκεκριμένα, το 1826 ο Joseph Lister ανέπτυξε αχρωματικούς διπλούς φακούς αντιμετωπίζοντας τη χρωματική εκτροπή, ένα από τα πιο σημαντικά τεχνικά που δημιουργούν οι φακοί. Ωστόσο, δεν είχε γίνει ακόμα πλήρως κατανοητό το θεωρητικό υπόβαθρο της οπτικής που διέπει τη λειτουργία των φακών. Τα περισσότερα από τα σχέδια προέκυψαν ως αποτέλεσμα πειραματισμών και δοκιμών και όχι εμπειριστατωμένης θεωρητικής ανάλυσης. Πρόοδοι στην κατανόηση της οπτικής έγιναν με μεγαλύτερη κατανόηση των μαθηματικών πίσω από τη διάδοση του φωτός και τη συμπεριφορά των κυμάτων. Ο Ernst Abbe, ο οποίος ήταν υπάλληλος του Carl Zeiss στην Ιένα, ανέπτυξε το θεωρητικό πλαίσιο για την λειτουργία και ειδικότερα τους περιορισμούς στην απόδοση των οργάνων οπτικής απεικόνισης [2]. Συγκεκριμένα, ο Abbe απέδειξε ότι υπάρχει όριο στη διακριτική ικανότητα ενός φακού, το οποίο εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός και το αριθμητικό διάφραγμα του φακού. Τα ευρήματά του Abbe δημοσιεύτηκαν στη Royal Microscopical Society [3]. Τα ευρήματα του Abbe βασίστηκαν σε μεγάλο βαθμό σε προσεκτικούς πειραματισμούς, ενώ την ίδια περίοδο ο Herman Helmholtz εργαζόταν σε μια θεωρητική προσέγγιση. Ο Joseph Lagrange, περισσότερα από 60 χρόνια νωρίτερα, είχε υπονοήσει τους περιορισμούς μέσω μαθηματικά βασισμένου συλλογισμού.

Το 1902 ο Richard Zsigmondy μελέτησε την κίνηση και τη θέση σωματιδίων (κολλοειδή αιωρήματα χρυσού) που είχαν μέγεθος μικρότερο από το όριο της διακριτικής ανάλυσης που πρότεινε ο Abbe. Συνεργαζόμενος με τον Henry Siedentopf

⁴ Wikipedia, "Leeuwenhoek simple microscope (copy), Leyden, 1901-1930", [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leeuwenhoek_simple_microscope_\(copy\),_Leyden,_1901-1930_Wellcome_L0057739.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leeuwenhoek_simple_microscope_(copy),_Leyden,_1901-1930_Wellcome_L0057739.jpg), 2022

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

(υπάλληλο της Zeiss) ανέπτυξε ένα μικροσκόπιο στο οποίο χρησιμοποίησε τη σκέδαση (και όχι την ανάκλαση ή την απορρόφηση) του φωτός για την παρατήρηση πολύ μικρών σωματιδίων [4]. Ήταν μία πολύ προχωρημένη τεχνική μικροσκοπίας για την εποχή της, λαμβάνοντας υπόψη ότι τότε δεν υπήρχαν ακόμη τα κατάλληλα μέσα συλλογής εικόνων (φωτογραφικές μηχανές ή κάμερες) και οι παρατηρήσεις έπρεπε να γίνονται με το μάτι. Ωστόσο, χάρη σε αυτές τις παρατηρήσεις του, ο Zsigmondy τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ χημείας το 1925. Η μέθοδος του εξελίχθηκε αργότερα και έγινε γνωστή ως μικροσκοπία επιλεκτικού επιπέδου φωτισμού [5].

Οι επόμενες εξελίξεις στην οπτική μικροσκοπία αφορούσαν περισσότερο σε μεθόδους βελτίωσης της αντίθεσης της παραγόμενης εικόνας και λιγότερο σε σημαντικές βελτιώσεις στον οπτικό σχεδιασμό στο μικροσκόπιο. Ως εκ τούτου, το επόμενο κομβικό σημείο στην ιστορία της μικροσκοπίας προήλθε από τον Fritz von Zernike το 1934, ο οποίος ανακάλυψε και ανέπτυξε τη μικροσκοπία αντίθεσης φάσης [6]. Για την ανακάλυψη αυτή, έγινε η απονομή του βραβείου Νόμπελ φυσικής στον von Zernike το 1953. Ο von Zernike αναγνώρισε τη σημαντική συμβολή του έργου του Abbe στην ανακάλυψη της μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης.

Η επόμενη μεγάλη εξέλιξη έλαβε χώρα το 1961, όταν ο Marvin Minsky κατοχύρωσε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το σχέδιο ενός ομοεστιακού μικροσκοπίου το οποίο είχε τη δυνατότητα να λαμβάνει οπτικές τομές ενός ιστού ο οποίος δεν είχε τεμαχιστεί σε τομές [7]. Το μικροσκόπιο αυτό περιελάμβανε μια λυχνία ηλεκτρικού τόξου για την παραγωγή φωτός και έναν παλμογράφο, συνδεδεμένο με την αργή μηχανική σάρωση ενός καθρέφτη, για την εμφάνιση των ανιχνευμένων σημάτων. Για τη συλλογή εικόνας, χρησιμοποιήθηκε μια κάμερα η οποία ήταν προσαρτημένη στον παλμογράφο. Δεν ήταν ένα πολύ πρακτικό σύστημα και μόνο στη δεκαετία του 1970 αναπτύχθηκαν συνεστιακά συστήματα στο εργαστήριο με βάση τη σάρωση δειγμάτων. Στη συνέχεια, τη δεκαετία του 1980, τα πρακτικά ομοεστιακά μικροσκόπια έγιναν για πρώτη φορά εμπορικά διαθέσιμα, βασισμένα σε σχέδιο σάρωσης δέσμης και αναπτύχθηκαν στο Cambridge από τους John White και Brad Amos [8].

Οι παράλληλες τεχνολογικές εξελίξεις στους υπολογιστές, στους αισθητήρες ψηφιακής απεικόνισης και στις πηγές παραγωγής φωτός οδήγησαν σε μια επανάσταση στην οπτική μικροσκοπία, όπως για παράδειγμα η μικροσκοπία δύο φωτονίων [9]. Στη συνέχεια αναφέρθηκαν πολυάριθμες παραλλαγές αυτής της μεθόδου οδηγώντας στην απονομή του βραβείου Νόμπελ χημείας το 2014 στους E. Betzig, S. W. Hell και W.E. Moerner για μεθόδους υπέρβασης του ορίου του Abbe.

1.2 Η φυσική του φωτός

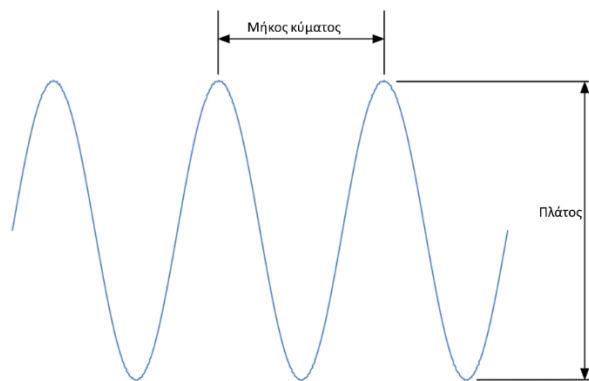
Στον πυρήνα όλων των μεθόδων οπτικής απεικόνισης είναι το φως και η εικόνα που φαίνεται μέσω μικροσκοπίου είναι το αποτέλεσμα του τρόπου με τον οποίο το φως αλληλεπιδρά με το δείγμα. Η παρούσα ενότητα περιγράφει τις φυσικές αρχές που στηρίζουν την οπτική μικροσκοπία. Αρχικά παρουσιάζονται οι βασικές έννοιες του φωτός και ακολουθεί εξήγηση του τρόπου με τον οποίο τα οπτικά εξαρτήματα

χειρίζονται το φως για να παρέχουν εικόνες μικροσκοπίας υψηλής ποιότητας. Περιγράφονται οι βασικοί περιορισμοί στην οπτική μικροσκοπία και παρουσιάζεται μία σειρά τυπικών μηχανισμών αντίθεσης, που απεικονίζουν πώς χρησιμοποιούνται οι διαφορετικές ιδιότητες του φωτός για να ενισχύσουν τα χαρακτηριστικά που ενδιαφέρουν μια εικόνα. Η ενότητα ολοκληρώνεται περιγράφοντας τα δύο άκρα ενός συστήματος οπτικής μικροσκοπίας: την πηγή φωτός και τον ανιχνευτή.

1.2.1 Ιδιότητες φωτός

Από τα μέσα του 16ου αιώνα υπήρξε μια διαμάχη για τη φύση του φωτός. Είναι κύμα (κλασική φυσική) ή σωματίδιο (κβαντική μηχανική); Πολλά από τα πιο διάσημα πειράματα φυσικής που πραγματοποιήθηκαν με το φως περιλαμβάνουν την επίδειξη του κυματοειδούς φύσης ή προσπάθεια προσδιορισμού της ταχύτητας του φωτός, τόσο σε κενό όσο και σε υλικό (αέριο, στερεό ή υγρό). Γνωρίζουμε τώρα ότι το φως μπορεί να θεωρηθεί ότι υπάρχει και στις δύο «μορφές» και αυτό παίζει θεμελιώδη ρόλο στην τρέχουσα κατανόησή μας και στην ερμηνεία της κβαντικής μηχανικής.

Λόγω της κυματικής του φύσης, το φως έχει α) μήκος κύματος, η οποία είναι η απόσταση από τη μία κορυφή του κύματος στην επόμενη, και β) τη συχνότητα η οποία είναι ο αριθμός των κυμάτων που περνούν ένα σημείο σε ένα δευτερόλεπτο. Αυτά απεικονίζονται στην Εικόνα 1.5.



Εικόνα 1.5. Κυματικές ιδιότητες του φωτός (Πηγή [10]).

Το φως ως κύμα υπακούει στην εξίσωση:

$$c = \nu \lambda \quad (1.1)$$

όπου ν είναι η συχνότητα του φωτός, λ το μήκος κύματος και c η ταχύτητα του φωτός στο κενό. Το 1983 η αριθμητική τιμή για την ταχύτητα του φωτός καθορίστηκε στα $299.792.458 \frac{m}{s}$. Σύμφωνα με τη θεωρία της ειδικής σχετικότητας του Αϊνστάιν c είναι η μέγιστη ταχύτητα με την οποία το φως, και επομένως η πληροφορία, μπορεί να ταξιδέψει.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

Λόγω της σωματιδιακής φύσης του φωτός, θεωρείται ότι το φως αποτελείται από στοιχειώδη σωματίδια που είναι γνωστά ως φωτόνια. Η ενέργεια που υπάρχει στο φως για ένα μεμονωμένο φωτόνιο δίνεται από την **εξίσωση του Planck** [11]:

$$E = h\nu \quad (1.2)$$

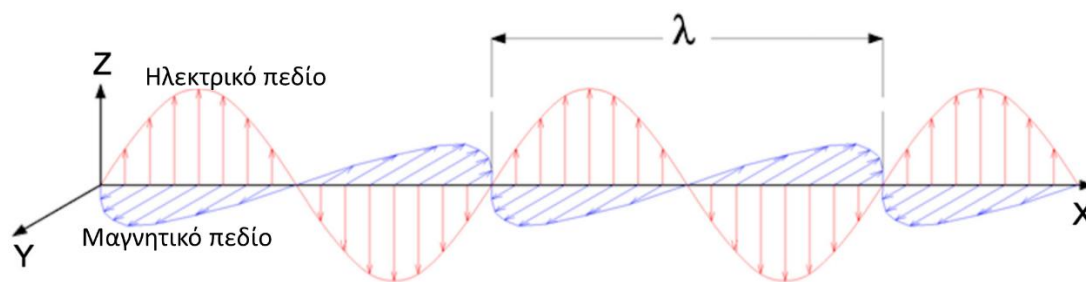
όπου E είναι η ενέργεια ενός μεμονωμένου φωτονίου, h είναι η σταθερά του Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ Js}$) και ν είναι η συχνότητα του φωτός. Σε μια πηγή που μεταδίδει φως ισχύος P και μήκους κύματος λ σε ένα δείγμα, ο αριθμός των φωτονίων ανά δευτερόλεπτο (N) που φθάνουν στο δείγμα δίνεται από την εξίσωση [11]:

$$P = N h \nu = \frac{N h c}{\lambda} \quad (1.3)$$

Για το παράδειγμα, αν η ισχύς είναι 1 mW και το μήκος κύματος 500 nm, τότε θα μεταδοθούν $2,5 \times 10^{15}$ φωτόνια ανά δευτερόλεπτο.

Το φως ταξιδεύει πιο αργά μέσα από οποιοδήποτε υλικό από ό,τι μέσω του κενού. Στη σωματική θεωρία του φωτός αυτή ήταν μια από τις προβλέψεις που ο Νεύτων έκανε λάθος, καθώς η θεωρία του (βασισμένη στο φως που είναι τα σωματίδια) προέβλεψε ότι το φως θα ήταν πιο γρήγορο στο γυαλί παρά στον αέρα. Ο λόγος της ταχύτητας του φωτός στο κενό προς την ταχύτητα του φωτός σε ένα υλικό ονομάζεται **δείκτης διάθλασης** (n) του υλικού. Για τα περισσότερα αέρια ο δείκτης διάθλασης είναι κοντά στο 1, ενώ στο γυαλί ο δείκτης διάθλασης είναι περίπου 1,5 που σημαίνει ότι το φως ταξιδεύει με ταχύτητα περίπου $2 \times 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}$. Μία σημαντική ιδιότητα του δείκτη διάθλασης ενός υλικού είναι ότι έχει εξάρτηση από το μήκος κύματος του φωτός. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να είναι ένα πλεονέκτημα, για παράδειγμα, σε πρίσματα τα οποία χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό διαφορετικών μηκών κύματος φωτός, αλλά και ένα μειονέκτημα που οδηγεί στην εστίαση διαφορετικών μηκών κύματος σε διαφορετικά σημεία από έναν φακό.

Μία άλλη ιδιότητα του φωτός είναι η **πόλωση**, η οποία σχετίζεται με την κατεύθυνση της ταλάντωσης του κύματος. Για παράδειγμα, όταν ένα κύμα οδεύει προς την κατεύθυνση x τα κύματα μπορεί να γίνεται ταλάντωση προς τις κατευθύνσεις y ή z , ή σε συνδυασμό των δύο. Στην περίπτωση του φωτός, που είναι ένας συνδυασμός ταλαντούμενων ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων, είναι η κατεύθυνση των ταλαντώσεων των ηλεκτρικών πεδίων που καθορίζει την κατεύθυνση της πόλωσης. Στην Εικόνα 1.6, το φως είναι κατακόρυφα πολωμένο.



Εικόνα 1.6. Αναπαράσταση πολωμένου κύματος φωτός (Πηγή [10]).

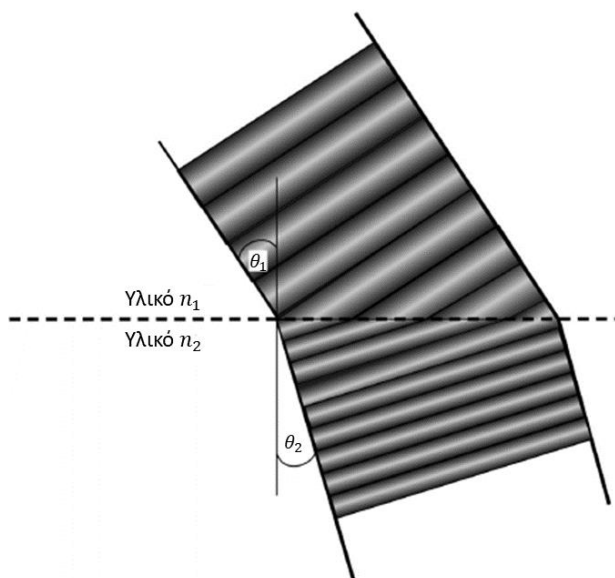
Μια δέσμη φωτός είναι γραμμικά πολωμένη εάν όλα τα κύματα ταλαντώνονται προς την ίδια κατεύθυνση, ενώ το μη πολωμένο ή τυχαία πολωμένο φως είναι ένας συνδυασμός κυμάτων που ταλαντώνονται προς όλες τις κατευθύνσεις. Το φως που δεν είναι πολωμένο μπορεί να διαχωριστεί σε δύο καταστάσεις πόλωσης (κάθετη και οριζόντια) χρησιμοποιώντας διάφορα εξαρτήματα, όπως οπτικά με ειδική επίστρωση, ορισμένους κρυστάλλους και μια συγκεκριμένη πόλωση που επιλέγεται χρησιμοποιώντας ειδικά πλαστικά (όπως αυτό που χρησιμοποιείται στα γυαλιά ηλίου).

Τα κύματα φωτός που διέρχονται ή ανακλώνται από υλικά μπορεί να αλλάξουν την πόλωσή τους, είτε περιστρέφοντας τη γωνία της πόλωσης, είτε αυξάνοντας, ή μειώνοντας το επίπεδο πόλωσης. Η σκέδαση του φωτός από τα σωματίδια μπορεί να επηρεάσει την πόλωση και το αποτέλεσμα εξαρτάται από το υλικό και το μέγεθος του σωματιδίου.

1.2.2 Διάθλαση φωτός

Όταν ένα κύμα φωτός πέσει κάθετα από τον αέρα σε ένα υλικό, τότε θα διαδοθεί στο υλικό, απλώς επιβραδύνοντας. Ωστόσο, εάν ένα κύμα φωτός πέσει υπό γωνία στο υλικό, τότε θα κατευθυνθεί προς την κατεύθυνση που είναι κάθετη στο υλικό, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.7. Γενικά, όταν ένα κύμα φωτός διέρχεται από ένα υλικό με δείκτη διάθλασης n_1 και προσπίπτει υπό γωνία θ_1 σε ένα άλλο υλικό με δείκτη διάθλασης n_2 τότε σχηματίζει γωνία θ_2 και ισχύει η ακόλουθη σχέση (νόμος του Snell) [11]:

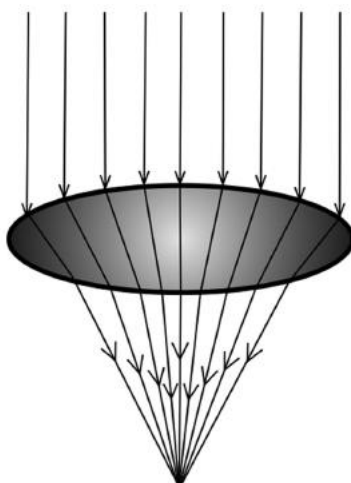
$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (1.4)$$



Εικόνα 1.7. Διάθλαση φωτός όταν προσπίπτει υπό γωνία σε υλικό (Πηγή [10]).

Η εξήγηση του φαινομένου αυτού έχει ως εξής: έστω ένα κύμα που κινείται από ένα υλικό με μικρό δείκτη διάθλασης (μεγάλη ταχύτητα διάδοσης) σε ένα υλικό με μεγάλο δείκτη διάθλασης (μικρή ταχύτητα διάδοσης) και προσπίπτει στη διεπαφή των δύο υλικών υπό γωνία. Τότε ένα τμήμα του κύματος θα φθάσει στο δεύτερο υλικό πιο γρήγορα και συνεπώς θα επιβραδυνθεί νωρίτερα από το υπόλοιπο κύμα. Με ένα τμήμα του κύματος να επιβραδύνει, ολόκληρο του κύμα θα στραφεί προς την κατεύθυνση αυτή. Στην αντίθετη περίπτωση (μετάδοση από ένα υλικό με μικρή ταχύτητα διάδοσης σε υλικό με μεγάλη ταχύτητα διάδοσης), ένα τμήμα του κύματος θα επιταχυνθεί και το κύμα θα απομακρυνθεί από την κατεύθυνση αυτή.

Με βάση το φαινόμενο αυτό, ένα φακός με κυρτές επιφάνειες που δέχεται μία δέσμη ακτίνων φωτός, θα προκαλέσει την διάθλαση των ακτίνων σε διαφορετικές γωνίες, αλλά όλες στη ίδια κατεύθυνση, προκαλώντας τη σύγκλιση (εστίαση) της δέσμης σε ένα σημείο (Εικόνα 1.8). Για έναν φακό με κοίλη επιφάνεια, η δέσμη των ακτίνων φωτός απομακρύνονται μεταξύ τους δημιουργώντας μίας αποκλίνουσα δέσμη.



Εικόνα 1.8. Το φαινόμενο της διάθλασης φωτός σε φακό με κυρτή επιφάνεια (Πηγή [10]).

Για έναν αμφίκυρτο φακό (όπως αυτός που φαίνεται στην Εικόνα 1.8) που εστιάζει μία δέσμη φωτός, η απόσταση του σημείου εστίασης από το κέντρο του φακού ονομάζεται **εστιακό μήκος** (f). Για έναν λεπτό φακό με δείκτη διάθλασης n με ακτίνες καμπυλότητας των δύο επιφανειών του R_1 και R_2 ισχύει η σχέση Lensmaker [11]:

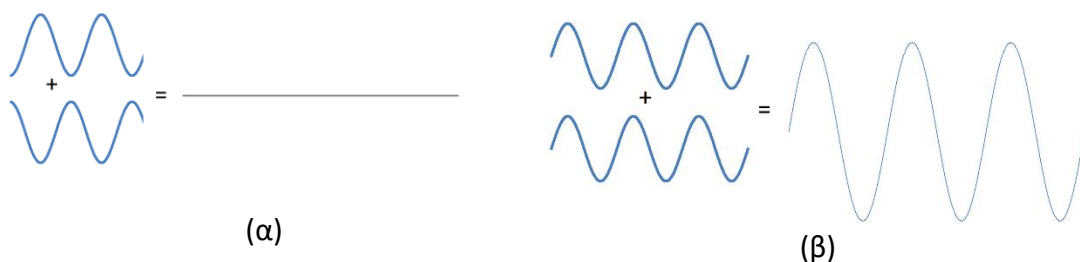
$$\frac{1}{f} = (n - 1) \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) \quad (1.5)$$

Για παράδειγμα, ένας τυπικός φακός με δείκτη διάθλασης 1,5 και ακτίνες καμπυλότητας 100 mm και 200 mm θα έχει εστιακό μήκος 400 mm.

Έχει δειχθεί ότι ένα κύμα φωτός που διέρχεται από μία διάφανη επιφάνεια θα υποστεί μία μικρή ανάκλαση, ακόμα και πέσει κάθετα στην επιφάνεια. Η ανάκλαση αυτή είναι γνωστή ως **ανάκλαση Fresnel** [12] και εξαρτάται από τους δύο διαφορετικούς δείκτες διάθλασης καθώς και από τη γωνία με την οποία το φως χτυπά την επιφάνεια. Για το γυαλί αυτό παρέχει μια ανάκλαση περίπου 4% για το φως σε κάθετη πρόσπτωση και αυτό αυξάνεται με τη γωνία και υψηλότερο δείκτη διάθλασης. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο όλες οι οπτικές επιφάνειες μέσα σε ένα μικροσκόπιο είναι επικαλυμμένες, μειώνοντας την ανάκλαση Fresnel, η οποία διαφορετικά θα έδινε εικόνες φαντασμάτων μέσα στο σύστημα.

1.2.3 Συμβολή και περίθλαση φωτός

Η συμβολή είναι το φαινόμενο που παρατηρείται όταν συναντηθούν δύο κύματα. Συγκεκριμένα, υπάρχει η αποσβεστική συμβολή και η ενισχυτική συμβολή. Στην αποσβεστική συμβολή η θετική κορυφή ενός κύματος συναντά την αρνητική κορυφή ενός άλλου κύματος με αποτέλεσμα το συνολικό κύμα να μηδενίζεται (ή καθόλου φως) (Εικόνα 1.9(α)). Στην ενισχυτική συμβολή, οι θετικές κορυφές των δύο κυμάτων συναντώνται δίνοντας ένα κύμα διπλάσιο πλάτους (έντονο φωτεινό σημείο) (Εικόνα 1.9(β)). Για να συμβεί η ενισχυτική συμβολή, τα κύματα φωτός πρέπει να έχουν το ίδιο μήκος κύματος και να είναι σε φάση.

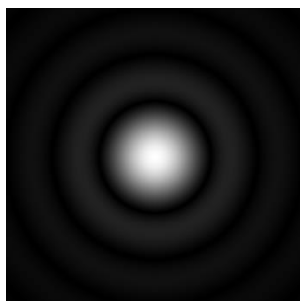


Εικόνα 1.9. (α) Αποσβεστική συμβολή. (β) Ενισχυτική συμβολή (Πηγή [10]).

Η συμβολή μεταξύ των κυμάτων είναι τότε το κύριο φυσικό αποτέλεσμα που οδηγεί στην περίθλαση. Κατά την περίθλαση, όταν το φως διέρχεται μέσα από μία σχισμή, η οποία έχει διαστάσεις συγκρίσιμες με το μήκος κύματος του φωτός, τότε δεν θα εμφανιστεί μία φωτεινή κηλίδα σε μία οθόνη τοποθετημένη πίσω από την σχισμή,

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

όπως θα περίμενε κάποιος. Αυτό που θα εμφανιστεί είναι φωτεινές και σκοτεινές περιοχές σε μία μεγάλη περιοχή γύρω από την θέση που θα έπρεπε να εμφανίζεται η φωτεινή κηλίδα. Στην περίπτωση σχισμής κυκλικού σχήματος που φωτίζεται ομοιόμορφα, προκύπτει ένα μοτίβο περίθλασης που προκύπτει, αποτελείται από μία φωτεινή κεντρική περιοχή, γνωστή ως δίσκος του Airy, που περιβάλλεται από σειρά ομόκεντρων δακτυλίων, δημιουργώντας το λεγόμενο μοτίβο του Airy [13] (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10. Δίσκος του Airy (Πηγή⁵).

Η διάμετρος του δίσκου του Airy (r) είναι ανάλογη του μήκους κύματος (λ) και αντιστρόφως ανάλογη της ακτίνας της σχισμής (a) [11]:

$$r = 1,22 \frac{R\lambda}{2a} \quad (1.6)$$

όπου R είναι η απόσταση από το κέντρο της σχισμής μέχρι την άκρη του δίσκου του Airy.

Ο δίσκος του Airy καθορίζει τη διακριτική ικανότητα ενός οπτικού συστήματος (π.χ. φακός). Συγκεκριμένα, έστω δύο σχισμές που φωτίζονται ομοιόμορφα. Κάθε μία από αυτές θα παράγει από ένα μοτίβο του Airy. Αν οι σχισμές πλησιάσουν, τα δύο μοτίβα του Airy θα αρχίσουν να επικαλύπτονται και σε κάποια θέση δεν θα μπορούμε πλέον να τα διαχωρίζουμε ως δύο διαφορετικά μοτίβα, ξεπερνώντας τη διακριτική ικανότητα του οπτικού συστήματος. Ο Rayleigh απέδειξε ότι τα δύο μοτίβα θα μπορούσαν να διαχωριστούν, εφόσον το κέντρο ενός δίσκου Airy πέσει στο πρώτο ελάχιστο του άλλου, οδηγώντας στο λεγόμενο όριο διακριτικής ικανότητας του Abbe [2]:

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.7)$$

όπου λ είναι το μήκος κύματος, n είναι ο δείκτης διάθλασης του μέσου στο οποίο διαδίδεται το φως, θ είναι η μισή γωνία του κώνου του φωτός που εισέρχεται στο οπτικό σύστημα και $NA = n \sin \theta$ είναι το **αριθμητικό άνοιγμα** (αδιάστατος αριθμός

⁵ Wikipedia, "Airy disk", https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Airydisk_sqrt.png, 2023.

που περιγράφει το εύρος των γωνιών στο οποίο ένα οπτικό σύστημα μπορεί να συλλέξει ή εκπέμψει φως).

1.3 Κατηγοριοποίηση οπτικών μικροσκοπίων

Τα τυπικά μικροσκόπια χωρίζονται αρχικά σε δύο κατηγορίες, ανεστραμμένα και όρθια. Σε ένα όρθιο μικροσκόπιο ο αντικειμενικός φακός είναι τοποθετημένος πάνω από το δείγμα κοιτάζοντας προς τα κάτω, ενώ για ένα ανεστραμμένο μικροσκόπιο ο αντικειμενικός φακός βρίσκεται κάτω από το δείγμα. Η επιλογή είτε ενός ανεστραμμένου είτε ενός κατακόρυφου συστήματος βασίζεται στα δείγματα που πρόκειται να απεικονιστούν. Στα εργαστήρια βιοεπιστημών, τα ανεστραμμένα μικροσκόπια είναι γενικά πιο συνηθισμένα, καθώς παρέχουν πρόσβαση στο δείγμα (το οποίο είναι τοποθετημένο σε ένα γυάλινο πλακίδιο) από πάνω επιτρέποντας την αλλαγή χημικών διαλυμάτων και την προσθήκη φθοροφόρων και τη δυνατότητα χειρισμού του δείγματος.

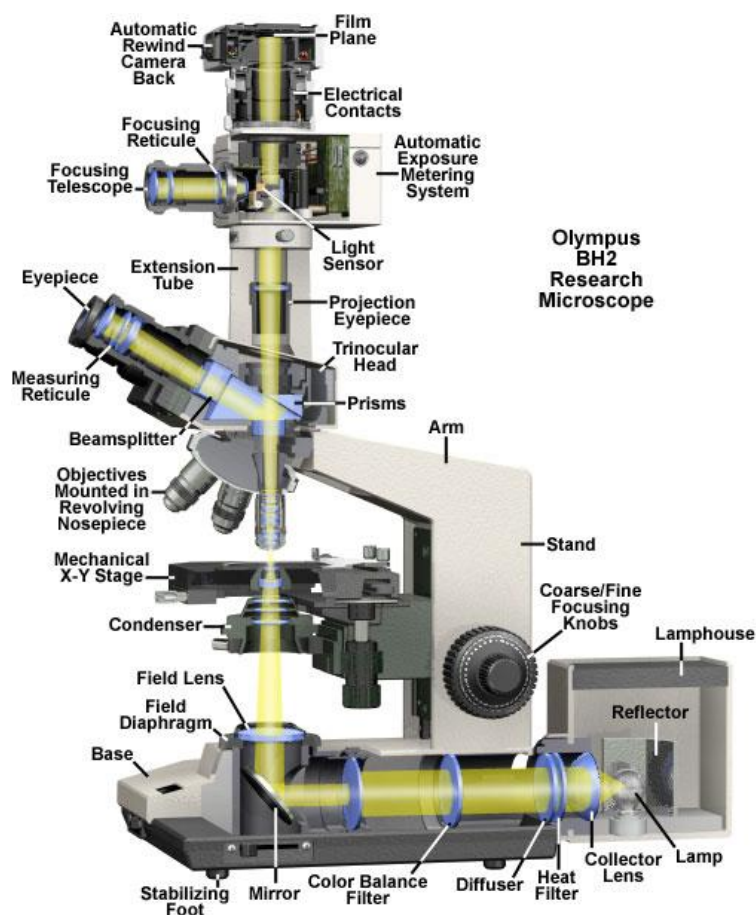
Τα όρθια μικροσκόπια είναι γενικά πιο κοινά σε εργαστήρια φυσικής ή μηχανικής. Εδώ το δείγμα δεν χρειάζεται να τοποθετηθεί σε γυάλινο πλακίδιο και η θέαση από ψηλά είναι ευκολότερη. Ωστόσο, οι τελευταίες τεχνολογικές εξελίξεις (φακοί εμβαπτισμένοι σε νερό με μεγάλο αριθμητικό άνοιγμα), τα όρθια μικροσκόπια αυξάνουν σε δημοτικότητα στις βιοεπιστήμες. Για παράδειγμα, για ένα οπτικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιείται για *in vivo* απεικόνιση, προτιμάται η όρθια διαμόρφωση, καθώς διευκολύνει την τοποθέτηση του δείγματος και η βαρύτητα έχει μικρότερη επίδραση στη συμπίεση των χαρακτηριστικών ενδιαφέροντος σε σχέση με ένα γυάλινο πλακίδιο.

Μια περαιτέρω κατηγοριοποίηση των διαμορφώσεων ενός μικροσκοπίου βασίζεται στον τύπο της απεικόνισης που πρέπει να πραγματοποιηθεί. Για παράδειγμα, στις φυσικές επιστήμες, ειδικότερα στη μεταλλουργία ή στην επιστήμη των υλικών, πολλά δείγματα δεν είναι διαφανή και έτσι το δείγμα απεικονίζεται με αντανάκλαση. Το φως διέρχεται μέσω του αντικειμενικού φακού (διαμόρφωση "epi"). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η διαμόρφωση *epi* χρησιμοποιείται πιο συχνά στη μικροσκοπία φθορισμού. Το σήμα που ανιχνεύεται στη συνέχεια περνά πίσω από τον αντικειμενικό φακό που πρόκειται να παρατηρηθεί και να καταγραφεί. Η πιο κοινή διαμόρφωση στις βιοεπιστήμες, και για δείγματα που έχουν κάποιο επίπεδο διαφάνειας, είναι η χρήση ενός συστήματος φωτισμού μετάδοσης, όπου το φως διέρχεται διαμέσου του δείγματος και του αντικειμενικού φακού για να καταλήξει στον ανιχνευτή.

Μία άλλη κατηγοριοποίηση των μικροσκοπίων είναι σε μονόφθαλμα και στερεοσκοπικά. Τα μονόφθαλμα μικροσκόπια έχουν ένα προσοφθάλμιο και τα στερεοσκοπικά μικροσκόπια έχουν δύο. Ένα στερεοσκοπικό μικροσκόπιο είναι σαφώς πιο περίπλοκο, αλλά παρέχει στον παρατηρητή ένα επίπεδο αντίληψης βάθους καθιστώντας ευκολότερο τον χειρισμό των δειγμάτων.

1.4 Δομή μικροσκοπίου

Η Εικόνα 1.11 δείχνει τα κύρια στοιχεία ενός μικροσκοπίου ανεστραμμένου τύπου. Όλα τα μικροσκόπια ακολουθούν πολύ παρόμοια διαμόρφωση και οι ίδιοι όροι χρησιμοποιούνται τόσο σε ανεστραμμένα όσο και σε όρθια μικροσκόπια, καθώς και σε συστήματα με μετάδοση ή αντανάκλαση φωτός. Το φως από την πηγή φωτός αρχικά συλλέγεται χρησιμοποιώντας έναν φακό και στη συνέχεια κατευθύνεται μέσω ενός ανοίγματος (διάφραγμα) και του φακού συμπύκνωσης στο δείγμα. Στην περίπτωση ενός συστήματος που χρησιμοποιεί επι-φωτισμό (μικροσκόπιο αντανάκλασης ή φθορισμού), το φως κατευθύνεται στο δείγμα μέσω ενός διαχωριστή δέσμης ή μερικώς ανακλαστικού καθρέφτη. Το φως, είτε έχει περάσει από το δείγμα είτε έχει ανακλαστεί, στη συνέχεια συλλέγεται από τον αντικειμενικό φακό και κατευθύνεται προς τα πάνω μέσω του οπτικού συστήματος. Στα περισσότερα σύγχρονα μικροσκόπια υπάρχει είτε ένας κινητός καθρέφτης, είτε ένα μερικώς ανακλαστικό σύστημα, το οποίο στέλνει το φως στους προσοφθάλμιους φακούς ή σε μια κάμερα. Η πιο κοινή διαμόρφωση είναι ένας κινητός καθρέφτης έτσι ώστε το 100% του φωτός να πηγαίνει είτε στα μάτια είτε στην κάμερα.



Εικόνα 1.11. Δομή ενός μικροσκοπίου ανεστραμμένου τύπου (Πηγή⁶).

⁶ Olympus, "Olympus BH2 Research Microscope Cutaway Diagram", <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/bh2cutaway/>

Στη συνέχεια, περιγράφονται τα βασικά εξαρτήματα ενός οπτικού μικροσκοπίου.

1.4.1 Φωτισμός

Ο ρόλος που παίζει ο φωτισμός στην τελική ποιότητα της εικόνας που παράγει το μικροσκόπιο είναι σημαντικός. Ο φωτισμός πρέπει να είναι ομοιόμορφος, να γεμίζει ολόκληρο το οπτικό πεδίο ενός αντικειμενικού φακού και να εισέρχεται με τέτοια γωνία ώστε να μην φθάνει φως στον αντικειμενικό φακό χωρίς να έχει περάσει πρώτα από το δείγμα. Αυτό θα μεγιστοποιήσει την αντίθεση μέσα στην εικόνα και, κατά γενικό κανόνα, όσο υψηλότερο είναι το αριθμητικό άνοιγμα του φακού συμπύκνωσης τόσο το καλύτερο. Υψηλή τιμή για το αριθμητικό άνοιγμα σημαίνει ότι το δείγμα θα φωτιστεί με έναν ευρύ κώνο φωτός, επιτρέποντας έτσι στον αντικειμενικό φακό να συλλέγει περιφερειακές ακτίνες προσθέτοντας λεπτομέρεια στην εικόνα. Το βέλτιστο σύστημα φωτισμού για ένα μικροσκόπιο αναπτύχθηκε το 1893 από τον August Köhler που εργαζόταν για την εταιρεία Zeiss [14]. Αυτό είναι πλέον το σύστημα φωτισμού που χρησιμοποιείται από τα σύγχρονα μικροσκόπια.

Στη συνέχεια, περιγράφονται κάποιες από τις πηγές φωτός που χρησιμοποιούνται σε μικροσκόπια.

1.4.1.1 Συμβατική λάμπα νήματος

Αυτή εξακολουθεί να είναι η πιο κοινή πηγή φωτισμού που χρησιμοποιείται σε όλα τα μικροσκόπια, καθώς παρέχει φωτισμό χαμηλού κόστους και ευκολίας ελέγχου. Ένα μεταλλικό νήμα περικλείεται σε μια ατμόσφαιρα χαμηλής πίεσης μέσα σε ένα γυάλινο περίβλημα και μια χαμηλή τάση εφαρμόζεται σε αυτό. Προσαρμόζοντας το ρεύμα που διαρρέει το νήμα, λάμπει πιο έντονα και επίσης αλλάζει το χρώμα του, το οποίο γίνεται πιο λευκό σε υψηλότερα ρεύματα. Στην περίπτωση ενός λαμπτήρα μεταλλικού αλογονιδίου η ένταση είναι πολύ μεγαλύτερη και μπορεί να παράγει υπεριώδες φως. Λόγω της υψηλής φωτεινότητάς τους, οι λαμπτήρες μεταλλικού αλογονιδίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μικροσκόπια φθορισμού.

1.4.1.2 Λαμπτήρας υδραργύρου

Οι λαμπτήρες υδραργύρου είναι η παραδοσιακή οδός για την παραγωγή ενός πολύ έντονου φωτός κατάλληλου για μικροσκόπια φθορισμού. Σε αυτές τις πηγές μια εκκένωση αερίου διεγείρεται μέσα σε ένα περίβλημα χαλαζία που περιέχει ατμούς υδραργύρου χαμηλής πίεσης. Αυτό παράγει ένα έντονο λευκό, και γενικά υπεριώδες, φως που έχει ως αποτέλεσμα την τοπική παραγωγή όζοντος. Είναι γενικά ακριβά και έχουν μόνο περιορισμένη διάρκεια ζωής (συνήθως περίπου 200 ώρες) όταν πρέπει να αντικατασταθούν για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος έκρηξης του λαμπτήρα και απελευθέρωσης ατμών υδραργύρου.

1.4.1.3 Δίοδος εκπομπής φωτός (LED)

Από το 1996 και την ανάπτυξη των μπλε και υπεριωδών LED υψηλής ισχύος, η χρήση των LED ως πηγή διέγερσης για την οπτική μικροσκόπια έχει αυξηθεί. Ειδικότερα, η έλευση των λευκών LED υψηλής ισχύος αλλάζει γρήγορα τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η συμβατική μικροσκόπια. Τα λευκά LED είναι πλέον αρκετά ισχυρά για τις περισσότερες συμβατικές μορφές μικροσκοπίας και όταν ενσωματώνονται με

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

συγκεκριμένα έγχρωμα LED μπορούν να χρησιμοποιηθούν για απεικόνιση φθορισμού. Τα κύρια πλεονεκτήματα των LED είναι το χαμηλό τους κόστος, η εξαιρετικά μεγάλη διάρκεια ζωής, η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και η χαμηλή θερμοκρασία λειτουργίας. Σε όλες τις περιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένων των λευκών LED, η αλλαγή της έντασής τους δεν επηρεάζει το χρώμα του φωτός και έτσι η φασματική φωτεινότητα διατηρείται με μεταβαλλόμενες εντάσεις. Προς το παρόν, είναι πιθανώς η πηγή φωτός της επιλογής για τις περισσότερες «τυποποιημένες» εφαρμογές μικροσκοπίας.

1.4.1.4 *Λαμπτήρας τόξου*

Πριν από την εμφάνιση των λέιζερ, οι λαμπτήρες τόξου ήταν οι φωτεινότερες διαθέσιμες πηγές φωτός. Στους λαμπτήρες τόξου, παράγεται ορατή εκκένωση σε ένα αέριο χτυπώντας ένα τόξο. Στη συνέχεια, το τόξο διατηρείται μέσω του παρεχόμενου ρεύματος. Γενικά η ένταση του τόξου δεν μπορεί να μεταβληθεί καθώς η αλλαγή της ισχύος μπορεί να προκαλέσει αστάθειες στην ένταση, επομένως η ένταση ελέγχεται από φίλτρα ή ανοίγματα. Το τόξο συνήθως υποκινείται και ελέγχεται από μια ηλεκτρική εκκένωση, αλλά οι λαμπτήρες στους οποίους το τόξο κινείται από μια δίοδο λέιζερ είναι πλέον διαθέσιμοι με πολύ υψηλή ισχύ. Οι λαμπτήρες τόξου προσφέρουν πολύ έντονο φωτισμό αλλά με υψηλό κόστος σε ηλεκτρική ενέργεια, παραγωγή θερμότητας και κόστος. Έχουν επίσης περιορισμένη διάρκεια ζωής.

1.4.1.5 *Λείζερ*

Τα λέιζερ έχουν προκαλέσει επανάσταση στην οπτική μικροσκοπία και αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο σχεδόν όλων των προηγμένων εξελίξεων τα τελευταία τριάντα χρόνια στην οπτική μικροσκοπία. Το κύριο πλεονέκτημά τους όσον αφορά στην οπτική μικροσκοπία είναι το στενό φασματικό εύρος τους σε συνδυασμό με την υψηλή ένταση. Η ικανότητα των λέιζερ να παράγουν πολύ σύντομους παλμούς φωτός τα καθιστά επίσης τη μόνη πηγή κατάλληλη για το ευρύ φάσμα των μεθόδων μη γραμμικής μικροσκοπίας, καθώς και για την απεικόνιση φθορισμού διάρκειας ζωής.

1.4.2 **Συμπυκνωτής**

Ο συμπυκνωτής (condenser) είναι ένα οπτικό στοιχείο το οποίο χρησιμοποιείται για να συγκεντρώνει και να εστιάζει το φως στο δείγμα. Με αυτόν τον τρόπο το δείγμα φωτίζεται επαρκώς και ομοιόμορφα οδηγώντας στον σχηματισμό μίας εικόνας καλής ποιότητας. Ένας συμπυκνωτής περιλαμβάνει ένα αυτόνομο σύστημα φακών το οποίο μπορεί να μετατοπιστεί κατά μήκος του οπτικού άξονα του μικροσκοπίου για ρύθμιση της εστίασης του φωτός στο δείγμα. Η συνήθης πρακτική είναι ο συμπυκνωτής να είναι ένα αρθρωτό εξάρτημα ώστε να μπορεί να αφαιρεθεί από το μικροσκόπιο και να χρησιμοποιηθεί κάποιος άλλος στη θέση του. Αυτό γίνεται είτε για να ταιριάζει με τη μεγέθυνση του αντικειμενικού φακού που χρησιμοποιείται είτε για να επιτρέψει τη χρήση μιας συγκεκριμένης μεθόδου ενίσχυσης της αντίθεσης.

1.4.3 Τράπεζα

Η τράπεζα (stage) χρησιμοποιείται για την τοποθέτηση του υπό εξέταση δείγματος και μπορεί να είναι σταθερή ή περιστρεφόμενη. Οι περιστρεφόμενες τράπεζες χρησιμοποιούνται συνήθως σε μικροσκόπια που χρησιμοποιούνται για την εξέταση πετρωμάτων ή άλλων υλικών. Στην κορυφή της τράπεζας υπάρχει ένα εξάρτημα συγκράτησης του πλακιδίου δείγματος με κάποια μορφή βραχίονα με ελατήριο. Ένα μικροσκόπιο συνήθως περιλαμβάνει πτυσσόμενα χειριστήρια στα δεξιά ή στα αριστερά της τράπεζας για τον εργονομικό έλεγχο της μετατόπισης της. Σε σύγχρονες μικροσκόπια, αυτές οι λειτουργίες μπορεί να είναι μηχανοκίνητες, ιδιαίτερα εάν το μικροσκόπιο έχει διαμορφωθεί για απεικόνιση ζωντανών κυττάρων.

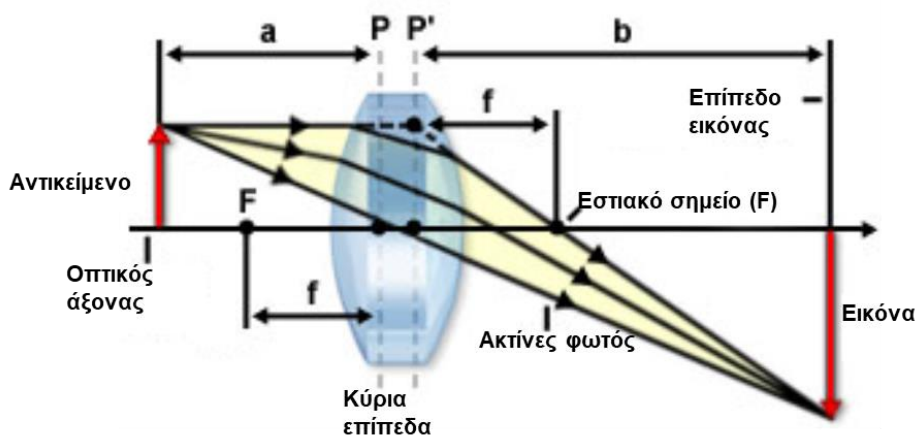
1.4.4 Φακοί

Ένα μικροσκόπιο περιλαμβάνει δύο βασικούς φακούς: τον αντικειμενικό φακό (objective) και τον προσοφθάλμιο (eyepiece). Ο αντικειμενικός φακός είναι αυτός που είναι πιο κοντά στο υπό εξέταση δείγμα, ενώ ο προσοφθάλμιος είναι αυτός που είναι πιο κοντά στον ανθρώπινο μάτι. Η συνολική μεγέθυνση ενός μικροσκοπίου προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό των μεγεθύνσεων αυτών των δύο φακών.

Ειδικά ο αντικειμενικός φακός είναι πιθανώς το πιο σημαντικό στοιχείο σε ένα μικροσκόπιο και μπορεί να αποτελεί έως και το 50% του συνολικού κόστους του οργάνου. Ο στόχος του αντικειμενικού φακού είναι να συλλέξει όσο το δυνατόν περισσότερο φως από το δείγμα και όσο μεγαλύτερη είναι η γωνία συλλογής του φακού τόσο μεγαλύτερη είναι η διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου. Με βάση την εξίσωση (1.7) που δίνει τη διακριτική ικανότητα ενός φακού, προκύπτει ότι για την ανίχνευση των μικρότερων λεπτομερειών ενός δείγματος απαιτείται φως μικρού μήκους κύματος, υψηλός δείκτης διάθλασης μεταξύ του δείγματος και του φακού και φακός με μεγάλο αριθμητικό άνοιγμα. Το μήκος κύματος του φωτός κανονικά καθορίζεται από τον ανιχνευτή που χρησιμοποιείται, αλλά ο δείκτης διάθλασης μπορεί να μεγιστοποιηθεί μέσω της χρήσης ελαίου εμβάπτισης και το αριθμητικό άνοιγμα μέσω της επιλογής φακού.

Η λειτουργία ενός φακού μικροσκοπίου βασίζεται στις αρχές της ανάκλασης και της διάθλασης. Ένας φακός χαρακτηρίζεται από δύο **κύρια** επίπεδα και δύο **εστιακά** επίπεδα που ορίζονται από τη σχέση μεταξύ του φακού και της εστιασμένης εικόνας και τη γεωμετρία του φακού (Εικόνα 1.12). Τα εστιακά επίπεδα βρίσκονται εκατέρωθεν του φακού και σε αυτά συγκεντρώνονται οι ακτίνες φωτός που διέρχονται από τον φακό. Τα κύρια επίπεδα είναι εικονικά επίπεδα εντός του φακού, όπου οι προεκτάσεις των ακτίνων φωτός που εισέρχονται στον φακό συναντούν τις προεκτάσεις των ακτίνων φωτός που εξέρχονται από αυτόν. Στην ουσία, στα κύρια επίπεδα θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα η διάθλαση του φωτός. Η απόσταση μεταξύ ενός κύριου επιπέδου και ενός εστιακού επιπέδου ονομάζεται εστιακό μήκος το φακού (η απόσταση f στην Εικόνα 1.12).

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ



Εικόνα 1.12. Γεωμετρική οπτική λεπτού κυρτού φακού. Φαίνονται η εστιακή απόσταση (f), το εστιακό σημείο (F), τα κύρια επίπεδα, η απόσταση αντικειμένου-φακού (a), η απόσταση φακού-εικόνας (b) (Πηγή⁷).

Η Εικόνα 1.12 παρουσιάζει ένα αντικείμενο (κόκκινο βέλος) αριστερά του φακού που βρίσκεται σε απόσταση a από το αριστερό κύριο επίπεδο του φακού. Οι ακτίνες φωτός που προέρχονται από το αντικείμενο διέρχονται μέσω του φακού και σχηματίζουν μια μεγεθυμένη πραγματική εικόνα (ανεστραμμένο κόκκινο βέλος) δεξιά του φακού σε απόσταση b από το δεξιό κύριο επίπεδο του φακού. Για έναν λεπτό αμφίκυρτο φακό, το εστιακό μήκος f συσχετίζεται με τις δύο προαναφερθείσες αποστάσεις ως ακολούθως:

$$\frac{1}{a} + \frac{1}{b} = \frac{1}{f} \quad (1.8)$$

Συνεπώς, εάν η απόσταση μεταξύ του φακού και του αντικειμένου και το εστιακό μήκος είναι γνωστά, τότε μπορεί να υπολογιστεί η απόσταση μεταξύ του φακού και του εστιακού επιπέδου. Επιπλέον, το ύψος της εικόνας που παράγεται από τον φακό διαιρούμενο με το ύψος του αντικειμένου καθορίζει την *μεγέθυνση* (M) του φακού:

$$M = \frac{b}{a} \quad (1.9)$$

Οι προηγούμενες εξισώσεις βασίζονται στην υπόθεση ότι ο φακός περιβάλλεται από αέρα, αλλά αυτό δεν συμβαίνει πάντα στην οπτική μικροσκοπία όπου οι φακοί μπορεί να είναι εμβαπτισμένοι σε λάδι, νερό ή γλυκερίνη. Ωστόσο, η πλειονότητα των κοινών μικροσκοπίων χαμηλής έως μέσης ισχύος χρησιμοποιούν συνήθως τον αέρα ως μέσο απεικόνισης.

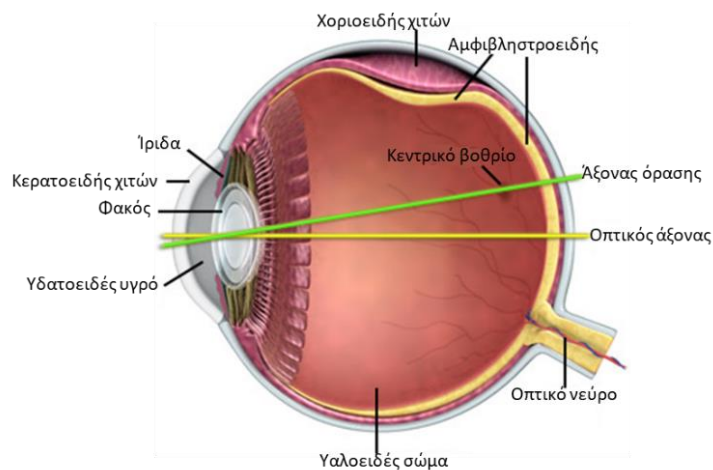
⁷ Olympus, "Introduction to Lenses and Geometrical Optics", <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/lensesintro/>

1.4.5 Καταγραφή εικόνας

1.4.5.1 Ανθρώπινο μάτι

Το ανθρώπινο μάτι είναι το πιο χρησιμοποιούμενο σύστημα ανίχνευσης στη μικροσκοπία. τα κύρια πλεονεκτήματα είναι η ευκολία χρήσης και η στερεοσκοπική παρατήρηση που παρέχει στον χρήστη μια καθαρή άποψη του δείγματος. Το κύριο μειονέκτημα της άμεσης οπτικής παρατήρησης είναι η αδυναμία ποσοτικοποίησης ή καταγραφής αυτού που φαίνεται. Το μάτι έχει επίσης εγγενώς ένα μεγάλο δυναμικό εύρος, που σημαίνει ότι μπορεί συχνά να ανιχνεύει χαρακτηριστικά σε ένα δείγμα που μπορεί να χάνονται από πιο τεχνικά εξελιγμένες μεθόδους.

Για να είναι ορατή μια εικόνα με το μάτι, η εικόνα πρέπει να παρουσιάζεται με χρώματα του ορατού φάσματος ή/και διαφορετικούς βαθμούς έντασης φωτός. Οι υποδοχείς που χρησιμοποιούν τα μάτια μας για την αίσθηση του χρώματος ονομάζονται κωνία. Τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για τη διάκριση των επιπέδων έντασης, όχι του χρώματος, ονομάζονται ραβδία. Καθένας από αυτούς τους τύπους κυττάρων βρίσκεται στον αμφιβληστροειδή, στο πίσω μέρος του εσωτερικού του ματιού. Το μπροστινό μέρος του ματιού, που περιλαμβάνει την ίριδα, τον κερατοειδή και τον φακό, δέχεται φως και το εστιάζει στον αμφιβληστροειδή (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13. Δομή ανθρώπινου οφθαλμού (Πηγή⁸).

1.4.5.2 Ψηφιακή κάμερα

Με την ανάπτυξη των προσωπικών υπολογιστών στις αρχές της δεκαετίας του 1980 και την αυξανόμενη απόδοση των συστοιχιών ανιχνευτών, η ψηφιακή κάμερα είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος καταγραφής εικόνων μικροσκοπίας. Η βασική αρχή λειτουργίας μίας ψηφιακής κάμερας είναι πως όταν ένα φωτόνιο απορροφάται σε ένα υλικό, ένα ηλεκτρόνιο θα απελευθερώνεται. Σε ένα σύστημα κάμερας αυτό το ηλεκτρόνιο στη συνέχεια κατευθύνεται προς ένα «πηγάδι» συλλογής (ένα «πηγάδι» ανά εικονοστοιχείο). Το μέγεθος του φορτίου που υπάρχει σε κάθε πηγάδι ψηφιοποιείται για να προσδιοριστεί η ένταση σε αυτό το pixel. Στη

⁸ Zeiss, "Education in Microscopy and Digital Imaging", <https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/introduction.html>

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

διαδικασία ψηφιοποίησης το μέγεθος της φόρτισης μετατρέπεται σε διάφορα επίπεδα, τα οποία καθορίζουν τον αριθμό των bits έντασης σε μια εικόνα. Έτσι, για μια εικόνα 8-bit η ένταση μετατρέπεται σε 256 επίπεδα (το μηδέν είναι μαύρο και το 255 είναι το μέγιστο) ή σε 1024 ή 4096 επίπεδα για εικόνες 10 και 12 bit αντίστοιχα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των bits έντασης τόσο μεγαλύτερη είναι η ανάλυση έντασης. Επίσης, για τις κάμερες δίνεται ο αριθμός των pixels που χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό εικόνας. Έτσι, για μια κάμερα που έχει 1000 επί 1000 pixels η εικόνα θα αποτελείται από σημεία εικόνας 1 Mb. Για να ληφθούν έγχρωμες εικόνες, κάθε ομάδα τεσσάρων εικονοστοιχείων καλύπτεται από ένα φίλτρο Bayer. Το φίλτρο Bayer αποτελείται από ένα μπλε φιλτραρισμένο pixel, ένα κόκκινο και δύο πράσινα για να αντιπροσωπεύει τη σχετική φασματική ευαισθησία του ανθρώπινου ματιού. Στη συνέχεια, ο υπολογιστής επεξεργάζεται αυτά τα μεμονωμένα pixel, με έναν πίνακα αναζήτησης χρωμάτων, για να παράγει μια έγχρωμη εικόνα.

Η ευαισθησία μίας κάμερας σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος καθορίζεται από την ακριβή σύσταση υλικού του ανιχνευτή. Οι περισσότερες ορατές κάμερες χρησιμοποιούν πυρίτιο ως το κύριο υλικό ανιχνευτή, αν και αυτό μπορεί να εμποτιστεί με άλλα στοιχεία για τον έλεγχο των ακριβών φασματικών χαρακτηριστικών. Οι ανιχνευτές με βάση το πυρίτιο λειτουργούν από την εγγύς υπεριώδες έως τα 1000 nm περίπου. Ο ρυθμός μετατροπής ενός φωτονίου σε ηλεκτρόνιο είναι γνωστός ως κβαντική απόδοση και αυτό θα ποικίλλει ανάλογα με το μήκος κύματος. Χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα υλικών για ανίχνευση μεγαλύτερου μήκους κύματος (κοντά στο υπέρυθρο). Οι πρώτοι ανιχνευτές που λειτουργούσαν σε αυτήν την περιοχή βασίζονταν στο σελήνιο ή το γερμάνιο, αλλά και οι δύο έχουν χαμηλή κβαντική απόδοση (η μετατροπή φωτονίων σε ηλεκτρόνια με το 1 να είναι τέλειο) και επίσης υψηλό επίπεδο θορύβου λόγω των θερμικά διεγερμένων ηλεκτρονίων που είναι διαθέσιμα σε θερμοκρασία δωματίου. Άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται τώρα περιλαμβάνουν θειούχο μόλυβδο, αντιμόνιο ίνδιο, αρσενίδιο του γαλλίου ινδίου και για μήκη κύματος μεγαλύτερα από 2 μm τελλουρίδιο του υδραργύρου.

Μια σειρά διαφορετικών ηλεκτρονικών διαμορφώσεων και μεθόδων παραγωγής χρησιμοποιούνται για την κατασκευή ψηφιακών φωτογραφικών. Οι αρχικές συσκευές ήταν γνωστές ως συσκευές σύζευξης φορτίου (CCD), αλλά καθώς οι μέθοδοι επεξεργασίας ημιαγωγών έχουν βελτιωθεί, η αγορά κυριαρχείται πλέον από συμπληρωματικές συσκευές μεταλλοξειδίου-ημιαγωγού (CMOS). Οι επιστημονικές κάμερες CMOS (sCMOS) χρησιμοποιούν τις ίδιες μεθόδους κατασκευής, αλλά τα σχετικά ηλεκτρονικά για την ανάγνωση και την ψηφιοποίηση του σήματος είναι πιο περίπλοκα και χαμηλότερα σε θόρυβο. Αυτό επιτρέπει ταχύτερη ανάγνωση, ομαδοποίηση pixel (γνωστή ως binning) ή ανάγνωση γραμμών ή περιοχών της κάμερας.

1.4.5.3 Φωτοπολλαπλασιαστής

Οι φωτοπολλαπλασιαστές είναι οι πιο ευαίσθητοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στη μικροσκοπία και είναι ικανοί να ανιχνεύουν μεμονωμένα φωτόνια. Γενικά, οι φωτοπολλαπλασιαστές παράγονται ως απλοί ανιχνευτές και δεν είναι διαθέσιμοι ως

συστοιχίες. Ένας φωτοπολλαπλασιαστής έχει ένα παράθυρο στο μπροστινό μέρος για να επιτρέπει τη διέλευση των φωτονίων στον ανιχνευτή. Στη συνέχεια, το φωτόνιο χτυπά τη φωτοκάθοδο και εκπέμπεται ένα ηλεκτρόνιο. Αυτό το ηλεκτρόνιο στη συνέχεια επιταχύνεται από ένα θετικό ηλεκτρικό πεδίο προς μια δεύτερη πλάκα όπου το ηλεκτρόνιο, τώρα με υψηλότερη ενέργεια, χτυπά την πλάκα εκπέμποντας πολλά ηλεκτρόνια. Αυτά στη συνέχεια έλκονται σε μια τρίτη πλάκα (όλα γνωστά ως δύνodos) όπου κάθε ηλεκτρόνιο πολλαπλασιάζεται ξανά, και αυτή η διαδικασία καταρράκτη λαμβάνει χώρα σε μια αλυσίδα δυνόδων πριν ανιχνευθεί από την άνοδο. Έτσι, από μια μόνο εκπομπή ηλεκτρονίων στη φωτοκάθοδο, ανιχνεύεται ένας μεγάλος αριθμός (συνήθως πάνω από ένα εκατομμύριο) ηλεκτρόνια στο τέλος. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα ρεύμα, της τάξης μA , το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε ίχνος σε μια οθόνη ή να ψηφιοποιηθεί για αποθήκευση σε υπολογιστή. Το ακριβές υλικό της φωτοκαθόδου καθορίζει τη φασματική ευαισθησία και αυτή μπορεί να επεκταθεί για να ανιχνεύσει φως κάτω από 200 nm (που συνήθως δεν χρησιμοποιείται στην οπτική μικροσκοπία) και μέχρι αρκετά μικρά.

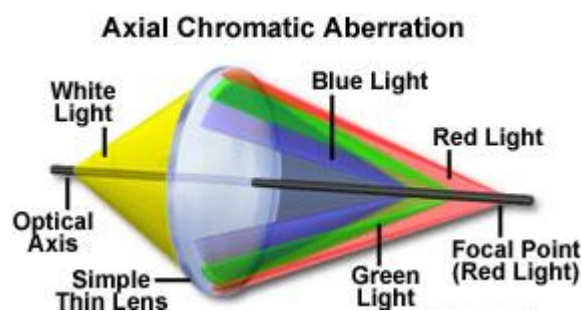
1.4.5.4 Φωτοδίοδος

Η λειτουργία μιας φωτοδίοδου είναι παρόμοια με αυτή μίας ψηφιακής κάμερας. Ένα φωτόνιο απορροφάται από ένα υλικό ημιαγωγού, απελευθερώνοντας ένα ηλεκτρόνιο, το οποίο στη συνέχεια είναι ελεύθερο να ρέει μέσα από το υλικό και συλλέγεται στην άνοδο της συσκευής. Η ευαισθησία με το μήκος κύματος ρυθμίζεται και πάλι από το υλικό. Καθώς κάθε φωτόνιο παράγει μόνο ένα ηλεκτρόνιο και δεν υπάρχει «πηγάδι» στο οποίο να συλλέγονται τα φωτόνια, μια βασική φωτοδίοδος δεν είναι πολύ ευαίσθητη. Το ρεύμα εξόδου από μια φωτοδίοδο είναι αρκετά μικρό και χρειάζεται ενίσχυση. Ωστόσο, μπορεί να λειτουργήσει με το φαινόμενο "χιονοστιβάδας" ή "Geiger". Συγκεκριμένα, εφαρμόζεται τάση στη φωτοδίοδο για να παραχθεί ένα πολύ υψηλό, εντοπισμένο, ηλεκτρικό πεδίο. Όταν εκπέμπεται ένα ηλεκτρόνιο, τότε αυτό μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση ενός καταρράκτη ηλεκτρονίων καθώς το πρώτο ηλεκτρόνιο επιταχύνεται προς την άνοδο. Αυτά τα ηλεκτρόνια υψηλής ταχύτητας θα προκαλέσουν την απελευθέρωση άλλων ηλεκτρονίων καθώς η ενέργεια της κίνησης παρέχει ενέργεια στα ηλεκτρόνια που είναι ακόμα δεσμευμένα μέσα στον ημιαγωγό. Έτσι, υπάρχει, στην πραγματικότητα, ένας φωτοπολλαπλασιαστής στερεάς κατάστασης, ο οποίος μπορεί να είναι μικρός και να λειτουργεί σε χαμηλή τάση. Τα τελευταία δέκα χρόνια τέτοιες συσκευές χιονοστιβάδας έχουν γίνει σημαντικά πιο χρήσιμες και ευαίσθητες μέσω της χρήσης σύγχρονων μεθόδων κατασκευής ημιαγωγών. Χρησιμοποιώντας τη διαδικασία παραγωγής CMOS (που χρησιμοποιείται για όλα σχεδόν τα ηλεκτρονικά ημιαγωγών) μπορούν να δημιουργηθούν μικροδομές γύρω από μια μικρή περιοχή στη φωτοδίοδο. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά υψηλά τοπικά ηλεκτρικά πεδία και μια εντοπισμένη χιονοστιβάδα ηλεκτρονίων κατά την απορρόφηση ενός φωτονίου. Αυτές οι συσκευές είναι γνωστές ως φωτοδίοδοι χιονοστιβάδας ενός φωτονίου. Λόγω της διαδικασίας παραγωγής, τέτοιες φωτοδίοδοι μπορούν εύκολα να συναρμολογηθούν σε συστοιχίες για να παράγουν στην πολύ ευαίσθητες κάμερες.

1.5 Περιορισμοί στην οπτική μικροσκοπία

1.5.1 Χρωματική εκτροπή

Όπως αναφέρθηκε, ο δείκτης διάθλασης ενός υλικού εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός. Αυτό σημαίνει ότι στην περίπτωση ενός απλού φακού τα διαφορετικά μήκη κύματος φωτός διαθλώνται (ή κάμπτονται) με διαφορετικό τρόπο, που σημαίνει ότι έρχονται σε εστίαση σε διαφορετική απόσταση από τον φακό (Εικόνα 1.14). Γενικά, ακτίνες φωτός με μικρό μήκος κύματος (π.χ. μπλε φως) διαθλώνται περισσότερο από ακτίνες φως με μεγαλύτερα μήκη κύματος που σημαίνει ότι έρχονται σε εστίαση πιο κοντά στον φακό.



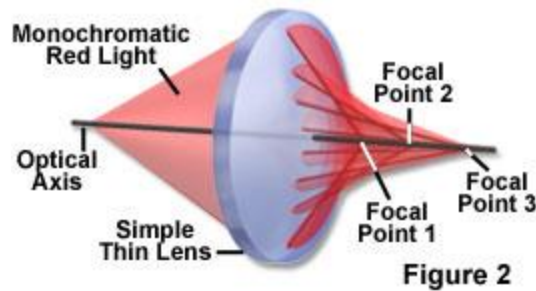
Εικόνα 1.14. Χρωματική εκτροπή. Όσο πιο μικρό είναι το μήκος κύματος του φωτός τόσο πιο κοντά γίνεται η εστίαση στον φακό (Πηγή⁹).

Εάν ένα αντικείμενο απεικονιστεί με χρήση λευκού φωτός, λόγω της διαφορετικής διάθλασης κάθε μήκους κύματος που υπάρχει στο λευκό φως, θα προκύψει μία εικόνα με χρωματικά "φωτοστέφανα" γύρω από το αντικείμενο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται χρωματική εκτροπή και προκειμένου, τα οπτικά συστήματα σχεδιάζονται με πολλαπλούς φακούς όπου χρησιμοποιούνται υλικά με διαφορετικό δείκτη διάθλασης για να εξισορροπηθούν τα αποτελέσματα αυτής της παραμόρφωσης μέσω ενός συνδυασμού γυαλιών και καμπυλοτήτων.

1.5.2 Σφαιρική εκτροπή

Το φυσικό σχήμα ενός φακού είναι σφαιρικό. Ωστόσο, αυτό το σχήμα οδηγεί σε ένα φαινόμενο γνωστό ως σφαιρική εκτροπή. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 1.15, για μια παράλληλη δέσμη φωτός που εισέρχεται σε έναν φακό, οι ακτίνες φωτός στην κεντρική περιοχή εστιάζουν πιο μακριά από τον φακό από εκείνες που εισέρχονται στην περιφέρεια του φακού.

⁹ Olympus, "Common Optical Defects in Lens Systems (Aberrations)", <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/opticalaberrations/>

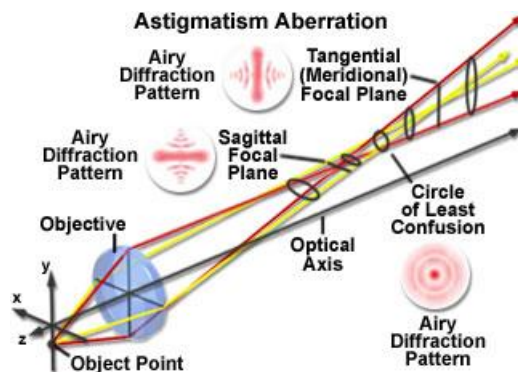


Εικόνα 1.15. Σφαιρική εκτροπή. Οι ακτίνες φως που διέρχονται από την περιφέρεια του φακού εστιάζονται πιο κοντά σε αυτόν (Πηγή¹⁰).

Κατά κανόνα, το αποτέλεσμα γίνεται σημαντικά μεγαλύτερο όταν το φως εισέρχεται στο φακό πέρα από τα δύο τρίτα περίπου της διαμέτρου του φακού. Μία λύση είναι να γίνει χρήση μεγαλύτερων φακών και στη συνέχεια να φωτίζεται μόνο ένα τμήμα τους, αν και είναι σαφές ότι αυτός δεν είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος κατασκευής ενός οπτικού συστήματος. Μια εναλλακτική λύση είναι η χρήση ασφαιρικών επιφανειών αν και είναι πολύ πιο δύσκολο να κατασκευαστούν.

1.5.3 Αστιγματισμός

Αυτό είναι ένα φαινόμενο στο οποίο το οπτικό σύστημα έχει διαφορετική οπτική ισχύ ή ικανότητα εστίασης σε δύο κάθετα επίπεδα. Αυτό φαίνεται στην Εικόνα 1.16 όπου ο φακός έχει ισχυρότερη εστιακή ισχύ στον άξονα x από ό,τι στον άξονα y και ως εκ τούτου το φως εστιάζει πιο κοντά στον φακό για οριζόντια χαρακτηριστικά σε σύγκριση με τα κατακόρυφα.



Εικόνα 1.16. Αστιγματισμός (Πηγή¹¹).

1.5.4 Καμπυλότητα πεδίου

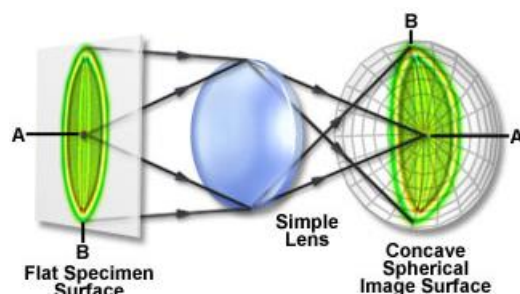
Αυτό το φαινόμενο σημαίνει ότι δεν υπάρχει σταθερή εστίαση σε όλο το εστιακό επίπεδο. Αυτό φαίνεται στην Εικόνα 1.17 όπου το φως που παράγει την εικόνα στο άκρο του οπτικού πεδίου έχει ελαφρώς διαφορετική εστίαση σε σύγκριση με το φως

¹⁰ Olympus, “Common Optical Defects in Lens Systems (Aberrations)”, <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/opticalaberrations/>

¹¹ Olympus, “Common Optical Defects in Lens Systems (Aberrations)”, <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/opticalaberrations/>

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

στο κέντρο. Αυτό σημαίνει ότι η εικόνα μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να εστιάζεται στο κέντρο, αλλά στη συνέχεια να είναι εκτός εστίασης στις άκρες.



Εικόνα 1.17. Καμπυλότητα πεδίου (Πηγή¹²).

1.6 Μηχανισμοί αντίθεσης

Πιθανώς η πιο κοινή φυσική διαδικασία που χρησιμοποιείται για την επίτευξη αντίθεσης σε ένα μικροσκόπιο είναι αυτή της απορρόφησης. Το φως απορροφάται από τη δέσμη φωτισμού και έτσι τα χαρακτηριστικά εμφανίζονται σκοτεινά σε ανοιχτόχρωμο φόντο. Η απορροφούμενη ενέργεια πρέπει να πάει κάπου και μπορεί να οδηγήσει σε θέρμανση στο δείγμα ή σε ορισμένες περιπτώσεις σε φθορισμό καθώς η ενέργεια εκπέμπεται εκ νέου σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Η απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο δείγμα θα εξαρτάται από τα μόρια που υπάρχουν και μπορεί να συμβεί σε ένα στενό εύρος μήκους κύματος ή ευρύτερα σε ολόκληρο το οπτικό φάσμα. Η απορρόφηση εντός του δείγματος μπορεί να είναι παρούσα λόγω φυσικών ενώσεων (για παράδειγμα μελανοκύτταρα στο δέρμα), αλλά μπορεί επίσης να εισαχθεί μέσω της προσθήκης χημικών ουσιών που επισημαίνουν κατά προτίμηση ορισμένες περιοχές του δείγματος. Πιθανώς ακόμα η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη εφαρμογή της μικροσκοπίας, στις βιοεπιστήμες, είναι στον τομέα της ιστοπαθολογίας όπου η χρώση Η και Ε (αιματοξυλίνη και ηωσίνη) εξακολουθεί να είναι η μέθοδος επιλογής. Στο λευκό φως αυτό οδηγεί σε περιοχές του δείγματος να εμφανίζονται μωβ, καθώς μέρος του λευκού φωτός απορροφάται κατά τη μετάδοση μέσω του δείγματος.

Ένας άλλος μηχανισμός δημιουργίας αντίθεσης σε μία εικόνα είναι μέσω σκέδασης του φωτός, δηλαδή της εκτροπής του φωτός από την ευθύγραμμη τροχιά κατά τη διέλευσή του σε ένα μέσο. Η σκέδαση συμβαίνει λόγω τοπικών διαφορών στον δείκτη διάθλασης του δείγματος. Το επίπεδο σκέδασης εξαρτάται (α) από την τοπική διαφορά στο δείκτη διάθλασης, (β) το μέγεθος των σωματιδίων που απαρτίζουν το μέσο και (γ) το μήκος κύματος του φωτός. Το φως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος διασκορπίζεται λιγότερο από ότι σε μικρότερα μήκη κύματος, γεγονός που είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους το εγγύς υπέρυθρο φως χρησιμοποιείται για απεικόνιση μέσω δειγμάτων βαθιών ιστών. Η πιο κοινή χρήση της σκέδασης στη μικροσκοπία ως μηχανισμός αντίθεσης είναι μέσω της σκέδασης του φωτός έξω από

¹² Olympus, "Common Optical Defects in Lens Systems (Aberrations)", <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/opticalaberrations/>

τη διαδρομή φωτισμού. Αυτό οδηγεί σε πιο σκούρες περιοχές μέσα στην εικόνα σε ανοιχτό φόντο. Μέσω της χρήσης διαφορετικών μηκών κύματος και της επακόλουθης επεξεργασίας εικόνας, μπορούν να ληφθούν πληροφορίες για το μέγεθος και τη φύση του σκεδαστή. Σε ορισμένα δείγματα, ιδιαίτερα σε εκείνα με αρκετά διαφανείς δομές που μοιάζουν με ίνες, μπορούν να φανούν έγχρωμα "φωτοστέφανα" γύρω από τέτοια χαρακτηριστικά όταν χρησιμοποιείται λευκό φως για τον φωτισμό. Αυτό οφείλεται στις διαφορετικές ιδιότητες σκέδασης με μήκος κύματος.

Οι μεταβολές του δείκτη διάθλασης εντός ενός υλικού είναι ένας άλλο μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία αντίθεσης. Όπως έχει αναφερθεί, η ταχύτητα με την οποία το φως ταξιδεύει στο υλικό καθορίζεται από τον δείκτη διάθλασης. Επομένως, εάν ένα επίπεδο κύμα φωτός διέρχεται από ένα υλικό στο οποίο διαφορετικά τμήματα του κύματος ταξιδεύουν μέσα από περιοχές διαφορετικού δείκτη διάθλασης, το κύμα δεν θα είναι πλέον ομοιόμορφο και τα τμήματα του κύματος θα καθυστερούν σε σχέση με άλλα. Αυτό είναι γνωστό ως η φάση του κύματος και δεν μπορεί να φανεί σε κανονικούς οπτικούς ανιχνευτές, αλλά μπορεί να δείξει περιοχές σε ένα δείγμα που έχουν διαφορετικούς δείκτες διάθλασης αλλά κατά τα άλλα είναι διαφανείς. Οι τοπικές διακυμάνσεις του δείκτη διάθλασης μπορεί να οφείλονται στις χημικές συγκεντρώσεις, το μεταβαλλόμενο βάθος ή τη διαφορά μεταξύ νερού και λιπιδίων. Όλες αυτές οι διαφορές μπορούν επομένως να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία αντίθεσης σε μια εικόνα.

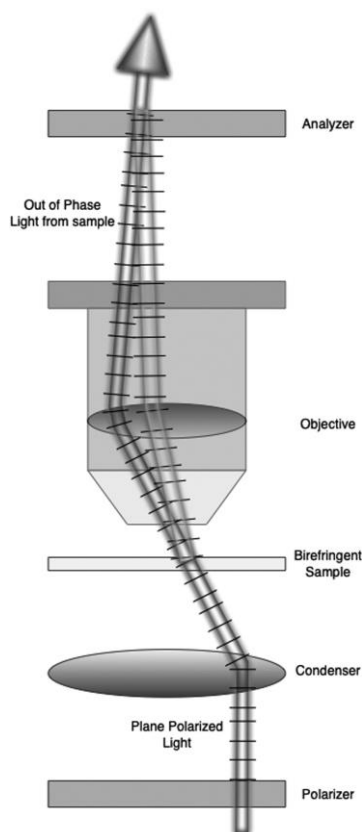
Ο φθορισμός είναι ίσως ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος μηχανισμός αντίθεσης μετά την επισήμανση με χρήση Η και Ε. Κατά το φαινόμενο αυτό, το φως σε ένα μήκος κύματος απορροφάται από μια ένωση που ακολουθείται από εκπομπή φωτός σε ελαφρώς μεγαλύτερο μήκος κύματος. Μέσω της χρήσης διχρωματικών φίλτρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον διαχωρισμό της διέγερσης από το φως εκπομπής καθίσταται δυνατή η παρατήρηση εικόνων των περιοχών φθορισμού. Μέσω της χρήσης πολλαπλών ενώσεων φθορισμού είναι δυνατό να δημιουργηθούν σύνθετες εικόνες όπου διαφορετικά χαρακτηριστικά μπορούν να διεγείρονται από διαφορετικά μήκη κύματος. Ένα πλεονέκτημα του φθορισμού είναι ότι μέσω χημικού χειρισμού το φθοροφόρο μπορεί να στοχευτεί σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ή περιοχές των δειγμάτων για να παρέχει τοπικές και συγκεκριμένες λεπτομέρειες. Πέρα από το εύρος των μηκών κύματος που μπορούν να δημιουργηθούν από μια σειρά φθοροφόρων που περιγράφηκαν παραπάνω, υπάρχει ένα άλλο χαρακτηριστικό που κάνει τις μεθόδους που βασίζονται σε φθορισμό πολύ ενδιαφέρουσες. Υπάρχει μια μικρή καθυστέρηση στο χρόνο από την απορρόφηση του φωτονίου μέχρι την επακόλουθη εκπομπή φωτός σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Αυτή η καθυστέρηση, συνήθως της τάξης των νανοδευτερόλεπτων για τα κοινά φθοροφόρα, εξαρτάται από το τοπικό περιβάλλον (pH, συγκέντρωση, ιξώδες, κ.λπ.) και έτσι παρέχει έναν πρόσθετο μηχανισμό αντίθεσης.

1.7 Άλλα είδη μικροσκοπίας

1.7.1 Μικροσκοπία πόλωσης

Η έννοια της πόλωσης περιγράφηκε προηγουμένως, όπου αναφέρθηκε ότι κύματα φωτός που είναι γραμμικά πολωμένα έχουν τα ηλεκτρικά τους πεδία να ταλαντώνονται προς την ίδια κατεύθυνση (Εικόνα 1.6). Όταν το φως διέρχεται από τα περισσότερα υλικά, η πόλωση του πεδίου φωτός δεν μεταβάλλεται. Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες και μέσω ορισμένων υλικών, υπάρχει αλλαγή της πόλωσης και χρησιμοποιείται το μικροσκόπιο πόλωσης για να παρέχει μοναδικές πληροφορίες για το δείγμα. Αλλαγή της πόλωσης του φωτός μπορεί να λόγω σκέδασης ή λόγω διπλής διάθλασης από συγκεκριμένα υλικά που έχουν δείκτη διάθλασης που εξαρτάται από την πόλωση και την κατεύθυνση διάδοσης του φωτός [10].

Για την υλοποίηση ενός μικροσκοπίου πόλωσης απαιτούνται μόνο μικρές προσθήκες σε ένα συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο. Η Εικόνα 1.18 απεικονίζει τη βασική δομή σε ένα μικροσκόπιο πόλωσης. Το φως από το σύστημα φωτισμού διέρχεται μέσω ενός στοιχείου πόλωσης, το οποίο επιτρέπει μόνο συγκεκριμένη πόλωση φωτός μέσω του συστήματος. Αυτό το εξάρτημα είναι συνήθως αχρωματικό για να διασφαλιστεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια πηγή λευκού φωτός στο μικροσκόπιο, αν και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ένα στενό φασματικό φίλτρο και σχετικός πολωτής. Ο πολωτής είναι συνήθως ευθυγραμμισμένος έτσι ώστε το εκπεμπόμενο κύμα φωτός να ταλαντώνεται στην κατεύθυνση ανατολής-δύσης κατά μήκος του δείγματος.



Εικόνα 1.18. Τυπική διαμόρφωση μικροσκοπίου πόλωσης (Πηγή: [10]).

Στη συνέχεια, το φως συνεχίζει μέσω του δείγματος και του αντικειμενικού φακού πριν συναντήσει ένα δεύτερο στοιχείο πόλωσης, μερικές φορές γνωστό ως αναλυτής. Αυτό μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να διασταυρώνεται με τον προηγούμενο πολωτή, έτσι ώστε μόνο το φως που έχει αλλοιώσει την πόλωσή του να περνάει για να φτάσει στον ανιχνευτή.

Το μικροσκόπιο πόλωσης χρησιμοποιείται ελάχιστα στις βιοεπιστήμες επειδή τα δείγματα ιστού κατά κανόνα δεν προκαλούν επαρκή διάθλαση επειδή περιέχουν μεγάλες ποσότητες νερού. Η μέθοδος χρησιμοποιείται εκτενώς στη γεωλογία και στις επιστήμες της γης και σε άλλους τομείς όπου υπάρχουν κρύσταλλοι στο δείγμα. Είναι δυνατό να παρατηρηθεί η ανάπτυξη ή η τήξη των κρυστάλλων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο πόλωσης και πράγματι είναι μια τυπική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του σημείου τήξης των κρυστάλλων.

1.7.2 Μικροσκοπία αντίθεσης φάσης

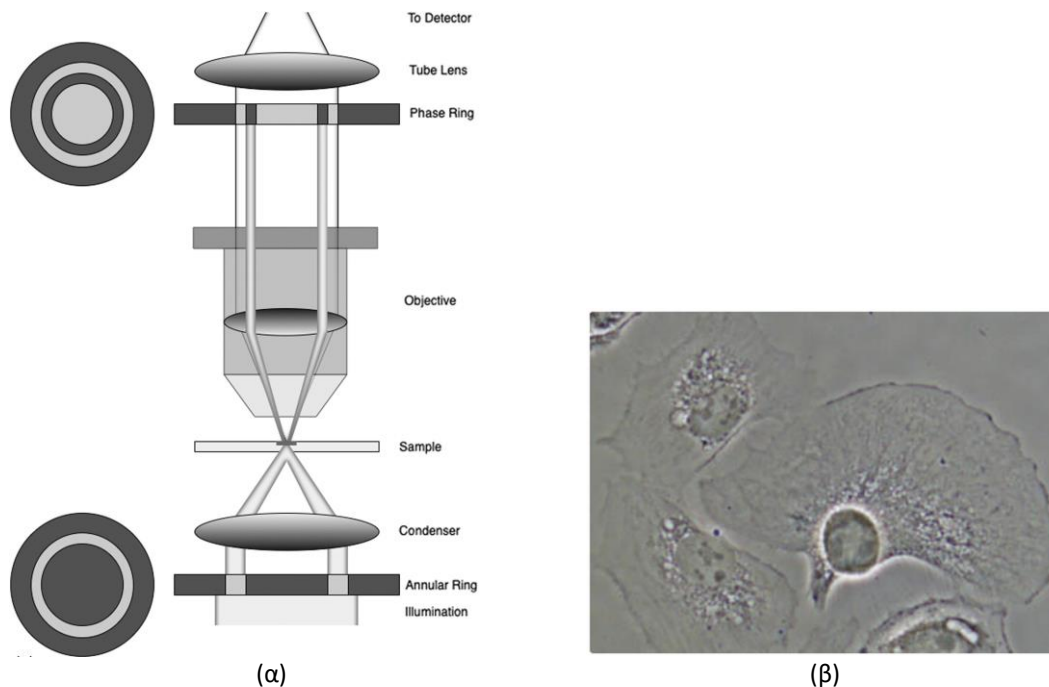
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μικροσκοπία αντίθεσης φάσης ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1930 από τον Frits Zernike. Αυτό που συνειδητοποίησε ο Zernike ήταν ότι εάν ένα επίπεδο κύμα φωτός μπορούσε να χωριστεί σε δύο κύματα, τα οποία ταξίδευαν μέσα από περιοχές με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης, αυτά τα δύο κύματα θα ήταν εκτός φάσης. Εάν αυτές τα κύματα μπορούσαν στη συνέχεια να επανασυνδυαστούν, τότε θα δημιουργούταν είτε ενισχυτική ή αποσβεστική συμβολή, ανάλογα με την ακριβή διαφορά οπτικής απόστασης¹³ την οποία διένυσαν. Έτσι, η αντίθεση στις εικόνες θα παράγεται από διαφορές στην οπτική διαδρομή και για λεπτά δείγματα ιστού θα σχετίζεται άμεσα με την τιμή δείκτη διάθλασης.

Ως εκ τούτου, το φως που φωτίζει ένα δείγμα διαχωρίζεται στο φως που διέρχεται γύρω από το δείγμα και σε αυτό που διέρχεται μέσω του δείγματος. Στο δείγμα, όπου υπάρχουν διαφορές στον τοπικό δείκτη διάθλασης, το φως διαθλάται. Το φως από τις δύο διαφορετικές διαδρομές στη συνέχεια ανασυνδυάζεται στον ανιχνευτή. Η Εικόνα 1.19(α) απεικονίζει τα κύρια χαρακτηριστικά της μεθόδου όπως εφαρμόζεται σε ένα τυπικό μικροσκόπιο. Το φως που περνά γύρω από το δείγμα είναι συνήθως εξασθενημένο έτσι ώστε να μην κυριαρχεί στην τελική εικόνα και διάφορα φάση $\lambda/4$ προστίθεται σε αυτό το φως για περαιτέρω βελτίωση της αντίθεσης της τελικής εικόνας. Για να επιτευχθεί αυτό σε ένα οπτικό μικροσκόπιο προστίθενται δύο επιπλέον στοιχεία στο βασικό οπτικό σύστημα που περιγράφηκε προηγουμένως. Το πρώτο είναι ένας οπτικός δακτύλιος τοποθετημένος έτσι ώστε να απεικονίζεται ξανά στο πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού, ενώ το δεύτερο, μια πλάκα φάσης, τοποθετείται στο πίσω άνοιγμα του αντικειμενικού φακού.

Η Εικόνα 1.19(β) παρουσιάζει μία τυπική εικόνα από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης.

¹³ Η οπτική απόσταση είναι η φυσική απόσταση που διανύει το φως πολλαπλασιαζόμενη με το δείκτη διάθλασης

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ



Εικόνα 1.19. (α) Τυπική διαμόρφωση μικροσκοπίου αντίθεσης φάσης, (β) Τυπική εικόνα μικροσκοπίου αντίθεσης φάσης (Πηγή: [10]).

Η μικροσκοπία αντίθεση φάσης είναι μια εξαιρετική μέθοδος για την παρατήρηση μη επισημασμένων, λεπτών και σχεδόν διαφανών δειγμάτων, όπως μεμονωμένα κύτταρα ή καλλιέργειες ιστού. Η μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα γρήγορης απεικόνισης και παρακολούθησης αλλαγών στο πάχος ή την κίνηση του κυττάρου καθώς και τα δύο αλλάζουν την οπτική διαδρομή και ως εκ τούτου αλλάζουν το παρατηρούμενο μοτίβο φωτός. Η μικροσκοπία αντίθεση φάσης είναι επίσης μη ευαίσθητη σε φαινόμενα πόλωσης και διπλής διάθλασης, κάτι που αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα κατά την εξέταση ζωντανών κυττάρων που αναπτύσσονται σε πλαστικά αγγεία καλλιέργειας ιστού.

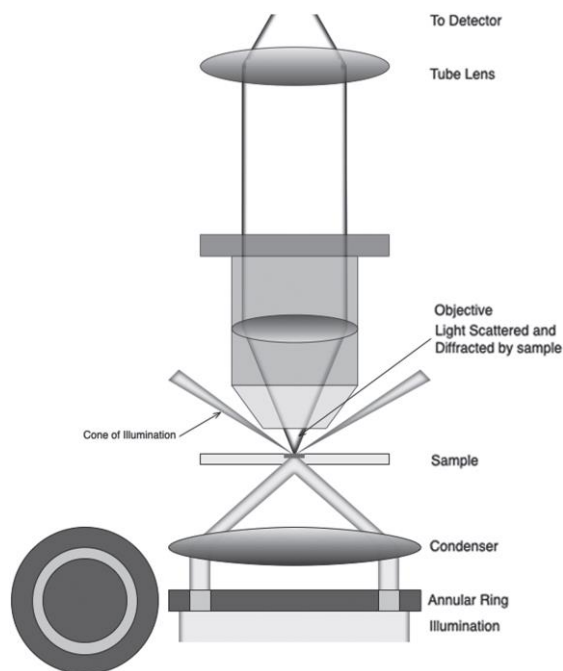
Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στη μικροσκοπία αντίθεσης φάσης [10]:

- Οι εικόνες φάσης συχνά περιβάλλονται από «φωτοστέφανα» φωτός, τα οποία είναι τεχνικά σφάλματα της διαδικασίας απεικόνισης και μπορούν να παραμορφώσουν τις λεπτομέρειες των ορίων.
- Η μικροσκοπία αντίθεσης φάσης δεν είναι κατάλληλη για παχύτερα δείγματα λόγω μετατοπίσεων φάσης που συμβαίνουν πάνω και κάτω από το εστιακό επίπεδο.
- Εάν χρησιμοποιηθεί λευκό φως, οι εικόνες, εμφανίζονται συχνά γκρι και στερούνται ελαφρώς αντίθεσης. Αυτό είναι πλέον λιγότερο πρόβλημα με τη χρήση καμερών CCD σε σύγκριση με την προηγούμενη χρήση φιλμ, καθώς οι εικόνες μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία μετά τη συλλογή τους.

1.7.3 Μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου

Στις συμβατικές μικροσκοπίας, ο στόχος είναι να φωτιστεί το δείγμα με φως και να μεγιστοποιηθεί η συλλογή του φωτός από τον αντικειμενικό φακό. Στη μικροσκοπία

σκοτεινού πεδίου το κεντρικό τμήμα του φωτισμού καλύπτεται και μόνο οι περιφερειακές ακτίνες εισέρχονται στο δείγμα. Οι ακτίνες αυτές γενικά δεν θα περάσουν από τον αντικειμενικό φακό, αλλά εάν το δείγμα έχει χαρακτηριστικά που προκαλούν σκέδαση, διάθλαση ή αντανάκλαση του φωτός τότε μερικά από τα φωτόνια θα κατευθυνθούν στον αντικειμενικό φακό και ως εκ τούτου θα φαίνονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα φωτεινά χαρακτηριστικά να εμφανίζονται σε σκούρο φόντο και αυτό μπορεί συχνά να εμφανίσει ενισχυμένες συγκεκριμένες δομές μέσα στο δείγμα. Η βασική διαμόρφωση φαίνεται στην Εικόνα 1.20.



Εικόνα 1.20. Τυπική διαμόρφωση μικροσκοπίου σκοτεινού πεδίου (Πηγή: [10]).

Το μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου χρησιμοποιείται μερικές φορές για την απεικόνιση κινούμενων βακτηρίων στο νερό, καθώς το μικρό τους μέγεθος μπορεί να τα κάνει να δημιουργήσουν «λάμπεις» φωτός. Η μέθοδος είναι επίσης χρήσιμη για άλλα δείγματα με αιχμηρά χαρακτηριστικά που κατά τα άλλα είναι διαφανή.

1.7.4 Μικροσκοπία φθορισμού

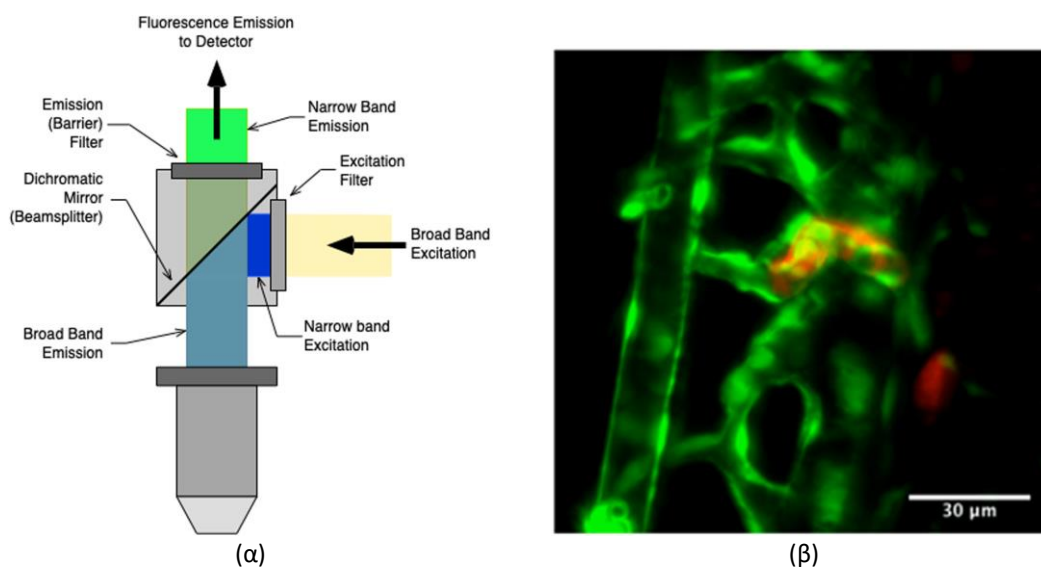
Η μικροσκοπία φθορισμού είναι ίσως η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική μικροσκοπίας στη βιοεπιστήμη και είναι δημοφιλής σε πολλούς άλλους τομείς. Η αρχή της μικροσκοπίας φθορισμού βασίζεται στην παροχή φωτός διέγερσης υψηλής έντασης στο δείγμα σε ένα μήκος κύματος και στη συνέχεια η ανίχνευση του προκύπτοντος φωτός μεγαλύτερου μήκους κύματος (φθορισμός) απορρίπτοντας ταυτόχρονα το φως διέγερσης.

Η Εικόνα 1.21(α) απεικονίζει τη βασική διαμόρφωση σε ένα οπτικό μικροσκόπιο (επι)φθορισμού. Το συνθετικό «επι» σημαίνει ότι το φως διέγερσης μεταδίδεται μέσω του αντικειμενικού φακού απεικόνισης και το προκύπτον εκπεμπόμενο φως συλλέγεται από τον ίδιο αντικειμενικό φακό. Παρόλο που υπάρχουν και άλλες

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

παραλλαγές της μικροσκοπίας φθορισμού, η συγκεκριμένη διαμόρφωση είναι μακράν η πιο κοινή που χρησιμοποιείται [10]. Ειδικότερα, το φως από μια κατάλληλη πηγή αρχικά συγκεντρώνεται και στη συνέχεια περνά μέσα από ένα φασματικό φίλτρο αποκοπής το οποίο επιτρέπει τη διέλευση φωτός με μικρά μήκη κύματος, διασφαλίζοντας ότι δεν υπάρχει φως που να φθάνει το δείγμα που μπορεί να είναι στο μήκος κύματος εκπομπής των φθοροφόρων που χρησιμοποιούνται. Ακόμη και για μια πηγή φωτισμού με στενή φασματική ζώνη, όπως ένα LED, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα τέτοιο φίλτρο αποκοπής καθώς τα LED έχουν μια «ουρά» εκπομπής που μπορεί να εκτείνεται αρκετές δεκάδες νανόμετρα σε μεγαλύτερο μήκος κύματος και να φθάνει στη ζώνη εκπομπής φθορισμού. Το φως μετά το φίλτρο κατευθύνεται προς το δείγμα χρησιμοποιώντας ένα διχρωματικό κάτοπτρο. Αυτό αντανακλά το φως διέγερσης μικρού μήκους κύματος μέσω του αντικειμενικού φακού και μέσα στο δείγμα. Το επιστρεφόμενο φως στη συνέχεια περνά πίσω από τον αντικειμενικό φακό και στη συνέχεια μεταδίδεται από το διχρωματικό φίλτρο. Το φως μπορεί στη συνέχεια να περάσει μέσα από ένα δεύτερο φίλτρο για να διασφαλιστεί ότι το φως διέγερσης δεν φτάνει στον ανιχνευτή, καθώς η ένταση διέγερσης είναι αρκετές τάξεις μεγέθους φωτεινότερη από το εκπεμπόμενο φως. Όπως συμβαίνει με ένα συμβατικό μικροσκόπιο ευρέως πεδίου, το φως της εικόνας στη συνέχεια εστιάζεται σε μια κάμερα με τον κανονικό τρόπο για να παραχθεί η φθορίζουσα εικόνα (Εικόνα 1.21(β)).

Το μικροσκόπιο φθορισμού χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς, από τη γεωλογία έως τις βιοεπιστήμες, αν και στον τελευταίο τομέα χρησιμοποιείται περισσότερο. Στις βιοεπιστήμες οι εφαρμογές είναι πολύ ευρείες, αλλά ο φθορισμός γενικά παρέχει τις επιλογές επισήμανσης ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού σε ένα δείγμα. Πιο πρόσφατα αυτό έγινε μέσω της χρήσης γενετικά κωδικοποιημένων μορίων.



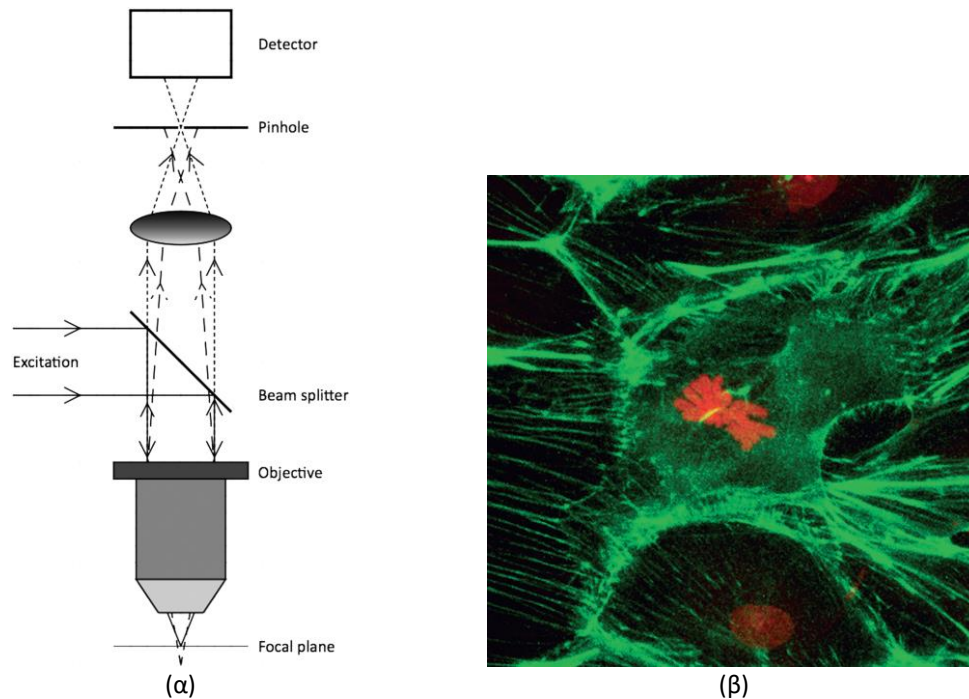
Εικόνα 1.21. (α) Τυπική διαμόρφωση μικροσκοπίου φθορισμού, (β) Τυπική εικόνα μικροσκοπίου φθορισμού (Πηγή: [10]).

1.7.5 Συνεστιακή μικροσκοπία

Ένα συνεστιακό μικροσκόπιο λειτουργεί εμποδίζοντας το φως που προέρχεται έξω από το εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού να φτάσει στον ανιχνευτή. Αυτό επιτρέπει την καταγραφή μίας «οπτικής τομής» του δείγματος. Η εστίαση μπορεί στη συνέχεια να ρυθμιστεί ώστε να λάβει μια σειρά οπτικών τομών σε όλο το δείγμα και αυτές οι τομές μπορούν στη συνέχεια να ανακατασκευαστούν σε μια τρισδιάστατη εικόνα. Τα σύγχρονα συνεστιακά μικροσκόπια εξακολουθούν να βασίζονται στενά στις αρχές που προτάθηκαν και επιδείχθηκαν για πρώτη φορά από τον Marvin Minsky. Η διορατικότητά του ήταν να εισαγάγει μια πολύ μικρή οπή σε ένα οπτικό σύστημα, το οποίο βρισκόταν στο ίδιο εστιακό επίπεδο με το δείγμα. Η οπή λέγεται ότι είναι συνεστιακή με το εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού. Αυτό απεικονίζεται στο διάγραμμα που φαίνεται στην Εικόνα 1.22. Σε αυτό το απλοποιημένο διάγραμμα, το φως εισέρχεται από την αριστερή πλευρά (συμπαγής γραμμή), ανακλάται από τον διαχωριστή δέσμης¹⁴ και στη συνέχεια εστιάζεται από τον αντικειμενικό φακό. Το φως φθορισμού (ή οπισθοσκεδαζόμενο φως σε ορισμένες διαμορφώσεις) από το εστιακό επίπεδο (εμφανίζεται ως διακεκομμένη γραμμή) στη συνέχεια περνά πίσω από τον αντικειμενικό φακό και μεταδίδεται από τον διαχωριστή δέσμης πριν εστιαστεί προς τα κάτω μέσω μιας οπής στον ανιχνευτή. Το φως έξω από το εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού (εμφανίζεται ως διακεκομμένη γραμμή) διέρχεται πίσω μέσω του αντικειμενικού φακού και μεταδίδεται επίσης από τον διαχωριστή δέσμης. Ωστόσο, καθώς αυτό το φως δεν προέρχεται από την εστίαση του αντικειμενικού φακού, από την οπή. Ως εκ τούτου, το μεγαλύτερο μέρος αυτού του φωτός εκτός εστίασης αποτυγχάνει να φτάσει στον ανιχνευτή. Έτσι, το σύστημα επιτρέπει μόνο στο φως από το εστιακό επίπεδο να φτάσει στον ανιχνευτή. Με τη σάρωση της δέσμης ή του δείγματος, μπορεί στη συνέχεια να δημιουργηθεί μια οπτική τομή σημείο προς σημείο (pixel προς pixel). Μετακινώντας το εστιακό σημείο μέσα στο δείγμα μπορούν να απεικονιστούν διαφορετικά βάθη.

¹⁴ Σε ένα τυπικό βιολογικό συνεστιακό σύστημα αυτός είναι ένας διχρωμικός διαχωριστής δέσμης που εκπέμπει ένα μήκος κύματος και ανακλά ένα άλλο

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

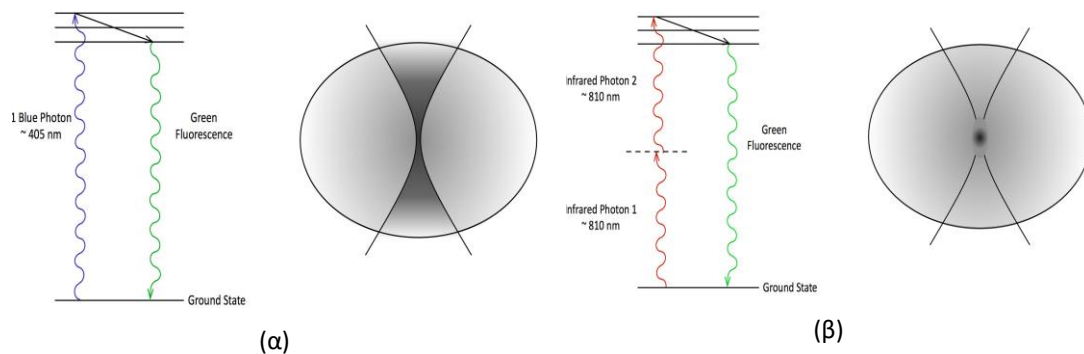


Εικόνα 1.22. (α) Τυπική διαμόρφωση συνεστιακού μικροσκοπίου (Πηγή: [10]). (β) Συνεστιακή εικόνα κυττάρου αρουραίου μετάφασης (PtK2) χρωματισμένο με FITC-φαλλοιδίνη για F-ακτίνη (πράσινο) και ιωδιούχο προτίδιο για χρωμοσώματα (κόκκινο) (Πηγή: [15]).

1.7.6 Πολυφωτονική μικροσκοπία

Στη μικροσκοπία πολλαπλών φωτονίων η βασική ιδέα είναι να δημιουργηθεί μια μικρή, πολύ έντονη εστίαση φωτός, στο διπλάσιο του κανονικού μήκους κύματος διέγερσης, εντός του δείγματος. Αυτή η πολύ εντοπισμένη ένταση οδηγεί σε σημαντική πιθανότητα ότι δύο ή περισσότερα φωτόνια θα απορροφηθούν ταυτόχρονα, οδηγώντας σε φθορισμό. Αυτή η διαδικασία απεικονίζεται στην Εικόνα 1.23. Στην Εικόνα 1.23(α) το φως σε μικρό μήκος κύματος (π.χ. 405 nm) δημιουργεί φθορισμό μέσω συμβατικής απορρόφησης στα φθοροφόρα που υπάρχουν. Αυτό παράγει το κλασικό προφίλ φθορισμού καθώς το φως εστιάζεται στο δείγμα. Ωστόσο, στην Εικόνα 1.23(β) δύο υπέρυθρα φωτόνια (π.χ. στα 810 nm) απορροφώνται ταυτόχρονα όπου η ένταση του φωτός είναι αρκετά υψηλή. Αυτό θα συμβεί μόνο στην εστία της δέσμης φωτός και έτσι εντοπίζεται η τοπική διέγερση μέσα στο δείγμα. Το προκύπτον σήμα φθορισμού μπορεί τότε να έχει προέλθει μόνο από το εστιακό σημείο της δέσμης διέγερσης και με σάρωση αυτού του σημείου κατά μήκος του δείγματος μπορεί να κατασκευαστεί μια οπτική τομή. Η τοπική διέγερση οδηγεί εγγενώς σε οπτική τομή και στη συνέχεια σάρωση σε διαφορετικά βάθη μέσα στο δείγμα μπορεί να καταγραφεί ένα τρισδιάστατο σύνολο δεδομένων. Το κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής πολυφωτονίων είναι ότι επιτρέπει την απεικόνιση σε σημαντικά μεγαλύτερα βάθη μέσα στα δείγματα [10]. Επιπλέον, ως αποτέλεσμα της εντοπισμένης διέγερσης, μπορεί να συλλεχθεί όλο το φως φθορισμού. Στο άλλο κύριο μικροσκόπιο οπτικής τομής, το συνεστιακό μικροσκόπιο, το φως φθορισμού πρέπει να περάσει πίσω από το όργανο και στη συνέχεια μέσω μίας οπής για τη

δημιουργία οπτικής τομής. Έτσι, οποιαδήποτε σκέδαση του φωτός φθορισμού καθώς αναδύεται από το δείγμα θα σημαίνει απώλεια σήματος καθώς το φως, αν και ίσως προέρχεται από το σωστό εστιακό βάθος, θα απορριφθεί από την οπή.



Εικόνα 1.23. Μονή (α) και διπλή (β) διέγερση φωτονίων και η σχετική ένταση φθορισμού (Πηγή: [10]).

1.7.7 Μικροσκοπία υπερανάλυσης

Η μικροσκοπία υπερανάλυσης παρακάμπτει το όριο περίθλασης του Abbe, ένα φυσικό εμπόδιο που περιορίζει την οπτική ανάλυση σε περίπου 250 nm, επιτρέποντας την οπτικοποίηση της υποκυτταρικής οργάνωσης με μεγάλη λεπτομέρεια. Οι τρέχουσες προσεγγίσεις μικροσκοπίας υπερανάλυσης μπορούν να επιτύχουν διακριτική ικανότητα περίπου 20 φορές μεγαλύτερη από αυτή της συμβατικής μικροσκοπίας φωτός. Στην πράξη, αυτό σημαίνει ότι δύο φθοροφόρα που χωρίζονται κατά 10 nm είναι ορατά ως ξεχωριστές οντότητες με ορισμένες μεθόδους μικροσκοπίας υπερανάλυσης, ενώ θα χρειαζόταν να απέχουν περίπου 200 nm μεταξύ τους για να εμφανίζονται ξεχωριστά στη συμβατική μικροσκοπία φωτός.

Υπάρχουν τρεις κύριες προσεγγίσεις της μικροσκοπίας υπερανάλυσης:

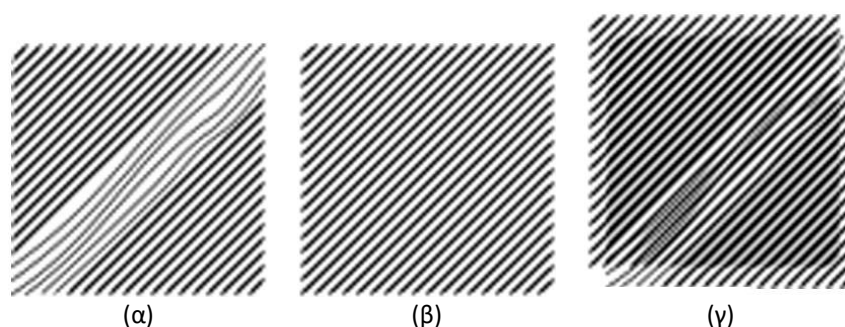
- μικροσκοπία εξάντλησης διεγερμένων εκπομπών (Stimulated Emission Depletion - STED)
- μικροσκοπία δομημένου φωτισμού (Structured Illumination Microscopy - SIM)
- στοχαστική οπτική μικροσκοπία ανακατασκευής (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy - STORM)

Η μικροσκοπία STED είναι μια τεχνική σάρωσης δέσμης που απαιτεί πολύ ακριβή χρονισμό εξαιρετικά σύντομων παλμών φωτός λέιζερ, ανιχνευτών υψηλής ταχύτητας και κατάλληλων δειγμάτων. Η μέθοδος περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1994 [16] και στη συνέχεια αναφέρθηκε ως πρακτικό σύστημα πέντε χρόνια αργότερα [17]. Η διαδικασία χρησιμοποιεί μια ακτίνα λέιζερ για να διεγείρει ένα φθοροφόρο και στη συνέχεια μια δεύτερη δέσμη, πολύ λίγο αργότερα, με προφίλ έντασης στη μορφή «ντόνατ». Αυτή η δεύτερη δέσμη αφαιρεί τον φθορισμό από τα μόρια εκτός από το κέντρο της δέσμης «ντόνατ» που είναι μαύρο. Στη συνέχεια, η δεύτερη δέσμη απενεργοποιείται και ο ανιχνευτής ενεργοποιείται για τη συλλογή του φθορισμού από τα υπόλοιπα φθορίζοντα μόρια. Καθώς το κέντρο της δέσμης «ντόνατ» δεν έχει

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

φως, δεν μπορεί να περιθλαθεί και ως εκ τούτου μπορεί να γίνει, τουλάχιστον κατ' αρχήν, αυθαίρετα μικρό.

Η μικροσκοπία τύπου SIM χρησιμοποιεί ένα ελεγχόμενο μοτίβο φωτός. Η βασική ιδέα πίσω από τη μέθοδο είναι ότι η λεπτομέρεια σε ένα δείγμα που πρόκειται να απεικονιστεί βρίσκεται στη λεπτή δομή. Αυτό αποτελείται από χαρακτηριστικά που βρίσκονται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους. Η Εικόνα 1.24(α) απεικονίζει ένα δείγμα με λεπτή γραμμική δομή. Εάν στη συνέχεια φωτιστεί με ένα μοτίβο λεπτού πλέγματος (Εικόνα 1.24(β)), η εικόνα που προκύπτει είναι αυτή που φαίνεται στην Εικόνα 1.24(γ). Αυτό αποτελείται από κροσσούς Moiré, τα οποία είναι το μοτίβο παρεμβολής μεταξύ της δομής του δείγματος και του επιβαλλόμενου πλέγματος. Η λεπτή δομή εμφανίζεται τώρα, στην πραγματικότητα, ως συχνότητα παλμού μεταξύ της επιβαλλόμενης συχνότητας και της φυσικής συχνότητας του δείγματος. Η κάμερα καταγράφει αυτό το μοτίβο χαμηλής συχνότητας που προκύπτει στο σύστημα. Το μοτίβο του φωτός στη συνέχεια μετακινείται με γνωστό τρόπο και λαμβάνεται μια περαιτέρω εικόνα και αυτή η μέθοδος επαναλαμβάνεται τουλάχιστον εννέα φορές για εικόνες 2D σούπερ ανάλυσης (τρεις περιστροφές του μοτίβου και τρεις μετατοπίσεις) ή δεκαπέντε φορές για την αντίστοιχη τρισδιάστατη εικόνα (τρεις περιστροφές και πέντε μετατοπίσεις). Τα προκύπτοντα σύνολα δεδομένων στη συνέχεια μετασχηματίζονται κατά Fourier των εικόνων, προσθέτοντας τη συχνότητα του πυρήνα πίσω πριν αθροιστούν όλες οι εικόνες και ληφθούν ο αντίστροφος μετασχηματισμός.



Εικόνα 1.24. Μικροσκοπία δομημένου φωτισμού: (α) Δείγμα. (β) Προβαλλόμενο πλέγμα. (γ) Οι πληροφορίες υψηλής συχνότητας εμφανίζονται ως κροσσοί Moiré (Πηγή: [10]).

Η βασική ιδέα της STORM είναι ότι διεγείρεται μόνο ένας μικρός αριθμός φθορίζοντων μορίων μέσα στο δείγμα, έτσι ώστε κάθε εκπομπός να μπορεί να θεωρηθεί ως ένα μόνο μόριο. Αυτά τα μεμονωμένα σημεία εκπομπής στη συνέχεια μεγεθύνονται σε μια ευαίσθητη κάμερα και καταγράφεται μια εικόνα. Στη συνέχεια τοποθετείται ένας δεύτερος φωτισμός στο δείγμα και καταγράφεται μια δεύτερη εικόνα, και αυτό επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Λόγω της μεγέθυνσης, κάθε εκπεμπόμενο σημείο της κάμερας κατανέμεται σε πολλαπλά εικονοστοιχεία και στη συνέχεια χρησιμοποιείται λογισμικό για να βρεθεί το κέντρο μάζας του σημείου και αυτό το σημείο στη συνέχεια λαμβάνεται ως το σημείο εκπομπής του μεμονωμένου μορίου [10].

2 Εργαστηριακές Τεχνικές στην Ιστοπαθολογία

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται οι βασικές εργαστηριακές τεχνικές που εφαρμόζονται στην ιστοπαθολογία για τη δημιουργία τομών ιστών οι οποίες μπορούν να εξεταστούν με μικροσκόπιο. Αρχικά, περιγράφονται οι βασικές έννοιες της μονιμοποίησης ιστού, αναφέρονται οι τύποι μονιμοποίησης και οι φυσικές μέθοδοι που εφαρμόζονται. Στη συνέχεια, περιγράφεται η διαδικασία της αφυδάτωσης του ιστού και οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτόν. Ακολούθως, παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο γίνεται ο καθαρισμός του ιστού, ο εμποτισμός του σε κερι παραφίνης και η δημιουργία ενός συμπαγούς μπλοκ το οποίο θα οδηγηθεί στη ειδική συσκευή (μικροτόμος) τεμαχισμού του σε τομές. Περιγράφονται τα διάφορα είδη μικροτόμων που χρησιμοποιούνται στον τεμαχισμό του μπλοκ ιστού. Τέλος, περιγράφεται η διαδικασία χρώσης ιστού ειδικά η χρώση με αιματοξυλίνη και ηωσίνη και η χρώση περιοδικού οξέος – Schiff, παραθέτοντας ενδεικτικά παραδείγματα χρώσης.

2.1 Μονιμοποίηση ιστού

Το πρώτο βήμα στον χειρισμό του δείγματος ιστού είναι η μονιμοποίηση του. Η μονιμοποίηση μετουσιώνει τις πρωτεΐνες καθιστώντας το κύτταρο και τα συστατικά του ανθεκτικά σε περαιτέρω αυτόλυση και κάνει τον ιστό πιο ανθεκτικό στις παρενέργειες των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα επόμενα βήματα της επεξεργασίας. Η φορμαλίνη (ή φορμόλη) είναι ίσως η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία για τη μονιμοποίηση δειγμάτων ιστού. Η φορμαλίνη στην βασική της μορφή είναι ένα υδατικό διάλυμα της φορμαλδεΐδης, τυπικά σε συγκέντρωση 37% - 40%. Στην περίπτωση αυτή ονομάζεται 100% φορμαλίνη. Για την μονιμοποίηση ιστών χρησιμοποιείται ένα διάλυμα 10% της 100% φορμαλίνης, δηλαδή ένα διάλυμα που αποτελείται από 1 μέρος της 100% φορμαλίνης με 9 μέρη νερού, κατά προτίμηση αποσταγμένο. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα διάλυμα φορμαλίνης μη ρυθμισμένο, του οποίου το pH κυμαίνεται μεταξύ 3 και 4. Εάν χρησιμοποιηθεί χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα, μπορεί να υπάρξει αντίδραση με την αιμοσφαιρίνη στους ιστούς και να παραχθούν ιζήματα αιματίνης με όξινη φορμαλδεΐδη σκούρου καφέ χρώματος, τα οποία περιπλέκουν την ιστολογική ερμηνεία. Για τον λόγο αυτόν, επιδιώκεται η ρύθμιση της 10% φορμαλίνης ώστε να έχει ουδέτερο pH, δηλαδή pH ίσο με 7. Αυτό επιτυγχάνεται με την ανάμειξη της με ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος, συνήθως φωσφορικού νατρίου. Μια τυπική σύνθεση του τελικού διαλύματος είναι:

- 100 mL 100% φορμαλίνη
- 900 mL νερό
- 4 g/L διόξινο φωσφορικό νάτριο

- 6,5 g/L όξινο φωσφορικό δινάτριο

Το διάλυμα αυτό ονομάζεται 10% ουδέτερη ρυθμισμένη φορμαλίνη (Neutral Buffered Formalin - NBF). Η φορμαλίνη έχει ρυθμό διείσδυσης 1 mm/h περίπου. Η ποσότητα φορμαλίνης που πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μονιμοποίηση ιστού πρέπει να είναι 20 φορές μεγαλύτερη από τον όγκο του ιστού [18].

Άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη μονιμοποίηση ιστών είναι: γλουταραλδεΐδη, τετροξείδιο του οσμίου, αιθυλική αλκοόλη, αντιδραστήριο του Bouin, υγρό του Zenker. Ο Πίνακας 2-1 παρουσιάζει τα βασικά μέσα που χρησιμοποιούνται για τη μονιμοποίηση ιστών, τη σύστασή τους, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά τους καθώς και το πεδίο εφαρμογής τους [18].

Πίνακας 2-1. Σύγκριση των διάφορων διαλυμάτων μονιμοποίησης ιστού.

Διάλυμα	Συστατικά	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Εφαρμογές
Ουδέτερη ρυθμισμένη 10% φορμαλίνη	<ul style="list-style-type: none"> • Φορμαλδεΐδη • Νερό • Διόξινο φωσφορικό νάτριο • Όξινο φωσφορικό δινάτριο 	<ul style="list-style-type: none"> • Υψηλή διείσδυση • Διατήρηση μορφολογίας κυττάρων • Χαμηλό κόστος • Σταθερότητα 	<ul style="list-style-type: none"> • Χρονοβόρα μονιμοποίηση • Αποτυχία διατήρησης όξινων βλεννοπολυσακχαριτών • Σκούρο καφέ κόκκοι στον αγγειακό ιστό 	<ul style="list-style-type: none"> • Αποτελεσματικό για εργαστηριακή χρώση ρουτίνας
Γλουταραλδεΐδη	<ul style="list-style-type: none"> • Γλουταραλδεΐδη • Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφόρου 	<ul style="list-style-type: none"> • Καλύτερη μονιμοποίηση υπερδομής • Λιγότερη συρρίκνωση των κυττάρων • Καλύτερη διατήρηση της πρωτεΐνης 	<ul style="list-style-type: none"> • Χαμηλή διείσδυση στον ιστό • Λιγότερο σταθερή • Ακατάλληλη για μονιμοποίηση λιπιδίων • Ακρινή 	<ul style="list-style-type: none"> • Το καλύτερο για ηλεκτρονική μικροσκοπία
Τετροξείδιο του οσμίου	<ul style="list-style-type: none"> • 2-4% Όσμιο • τετροξείδιο σε ρυθμιστικό διάλυμα 	<ul style="list-style-type: none"> • Καλό σταθεροποιητικό για τα λιπίδια • Ενδείκνυται για μονιμοποίηση σωμάτων Golgi και μιτοχονδρίων 	<ul style="list-style-type: none"> • Αδυναμία μονιμοποίησης πρωτεϊνών και υδατανθράκων • Δημιουργεί συσσώρευση DNA • Τοξικό και εξατμίζεται σε θερμοκρασία δωματίου • Ακριβό 	<ul style="list-style-type: none"> • Καλό για ηλεκτρονική μικροσκοπία
Αιθυλική αλκοόλη	<ul style="list-style-type: none"> • Καθαρό οινόπνευμα • Νερό 	<ul style="list-style-type: none"> • Γρήγορη διείσδυση 	<ul style="list-style-type: none"> • Εύφλεκτη 	<ul style="list-style-type: none"> • Καλό μέσο μονιμοποίησης για τον συνδετικό ιστό και το γλυκογόνο
Αντιδραστήριο του Bouin	<ul style="list-style-type: none"> • Πικρικό οξύ • Φορμαλδεΐδη • Παγόμορφο οξικό οξύ 	<ul style="list-style-type: none"> • Γρήγορος ρυθμός διείσδυσης 	<ul style="list-style-type: none"> • Δημιουργία κίτρινης χρωστικής στον ιστό 	<ul style="list-style-type: none"> • Καλό μέσο μονιμοποίησης για τον συνδετικό

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

		• Πολύ καλό για τρίχρωμη χρώση		ιστό και το γλυκογόνο
Υγρό του Zenker	<ul style="list-style-type: none"> • Χλωριούχος υδράργυρος • Οξικό οξύ σε μορφή πάγου • Διχρωμικό κάλιο • Απεσταγμένο νερό 	<ul style="list-style-type: none"> • Ταχεία δράση • Ομοιόμορφη διείδυση 	<ul style="list-style-type: none"> • Χρωστικές από διχρωμικό υδράργυρο 	<ul style="list-style-type: none"> • Όργανο με πολύ υψηλή αγγείωση όπως ο σπλήνας

Η μονιμοποίηση με χρήση χημικών διαλυμάτων είναι χρονοβόρα και καταστρέφει τη δομή της πρωτεΐνης [19]. Σε ορισμένες περιπτώσεις, εάν ο χρόνος ή η απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελούν προτεραιότητα, οι ιστοί μπορούν να μονιμοποιηθούν με ταχεία κατάψυξη, μια διαδικασία κατά την οποία ο ιστός βυθίζεται σε υγρό άζωτο αντί σε κάποιο χημικό διάλυμα μονιμοποίησης. Μία περίπτωση εφαρμογής της διαδικασίας αυτή λαμβάνει χώρα όταν οι χειρουργοί στείλουν ιστό στο παθολογικό εργαστήριο για ταχεία βιοψία. Η γρήγορη κατάψυξη επιτρέπει στον παθολογοανατόμο να επιστρέψει τα αποτελέσματα βιοψίας στον χειρουργό γρήγορα, ακόμη και όταν ο ασθενής βρίσκεται στο χειρουργικό τραπέζι. Στη συνέχεια, οι χειρουργικές επιλογές μπορούν να επιλεγούν με βάση τα αποτελέσματα της βιοψίας.

2.2 Αφυδάτωση

Η αφυδάτωση απομακρύνει υπολείμματα του μέσου μονιμοποίησης καθώς και το κυτταρικό νερό από τον ιστό. Το κυτταρικό νερό βρίσκεται στον ιστό είτε ως ελεύθερο ή δεσμευμένο. Καθώς, το δεσμευμένο μόριο του νερού είναι μέρος των μακρομορίων του κυττάρου, κατά την αφυδάτωση πρέπει να απομακρύνεται μόνο το ελεύθερο νερό, αφήνοντας το δεσμευμένο νερό ανέπαφο. Η απομάκρυνση του δεσμευμένου νερού θα δημιουργήσει προβλήματα, όπως για παράδειγμα συρρίκνωση του ιστού, ακανόνιστη χρώση, καθώς και ξηρούς, εύθραυστους ιστούς κατά τη μικροτόμηση τους [20].

Η αφυδάτωση επιτυγχάνεται με χρήση αλκοολών. Αν όμως οι ιστοί εκτεθούν σε αλκοόλες υψηλής συγκέντρωσης (95% ή 100%) για μεγάλο χρονικό διάστημα, θα αφαιρεθεί και το δεσμευμένο νερό. Για αυτό τον λόγο, γίνεται χρήση αλκοολών αυξανόμενης συγκέντρωσης ώστε να αφαιρεθεί το ελεύθερο νερό και να διατηρηθεί το δεσμευμένο νερό [20]. Η αιθανόλη (ή αιθυλική αλκοόλη) χρησιμοποιείται συνήθως για αφυδάτωση ιστών. Είναι ένα άχρωμο, διαυγές αλλά και εύφλεκτο υγρό. Σε τυπικές επεξεργασίες ιστών χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 70%, 90% και 100% (2 ώρες για κάθε συγκέντρωση αιθανόλης) [18]. Στην περίπτωση ευαίσθητων ιστών, η διαδικασία της αφυδάτωσης μπορεί να εκκινήσει από χαμηλότερη συγκέντρωση (30%) αιθυλικής αλκοόλης. Άλλα είδη αλκοολών που χρησιμοποιούνται είναι η μεθανόλη, η βουτυλική αλκοόλη και η ισοπροπυλική αλκοόλη [18].

Μη αλκοολούχοι παράγοντες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αφυδάτωση είναι η διοξάνη, η αιθυλενογλυκόλη και η ακετόνη. Ο επόμενος πίνακας συνοψίζει τα χαρακτηριστικά των διάφορων παραγόντων αφυδάτωσης [18].

Πίνακας 2-2. Σύγκριση των διαφόρων παραγόντων αφυδάτωσης.

Αφυδατωτικοί παράγοντες	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αιθυλική αλκοόλη	Ταχεία και αποτελεσματική αφυδάτωση	Χρειάζεται άδεια από την κυβέρνηση Εύφλεκτο Δημιουργεί σκληρό και εύθραυστο ιστό εάν εφαρμοστεί για μεγάλο χρονικό διάστημα
Μεθανόλη	Εξίσου αποτελεσματική με την αιθανόλη	Πτητική Υψηλό κόστος
Ισοπροπυλική αλκοόλη	Σχετικά γρήγορη δράση Μη τοξικό Ελάχιστη συρρίκνωση ιστού	Δεν είναι δυνατή η χρήση στην τεχνική σελοϊδίνης
Διοξάνη	Ταχεία δράση Δεν υπάρχει συρρίκνωση του ιστού	Παράγεται εξαιρετικά τοξικό αέριο
Αιθυλενογλυκόλη	Ταχύ Δεν απαιτείται διαβαθμισμένο διάλυμα Ο ιστός μπορεί να διατηρηθεί σε αυτό για πολύ χρόνος	Πολύ ακριβό Απαιτείται καθαριστικός πράκτορας
Ακετόνη	Ταχεία δράση Φθηνότερο από την αιθανόλη Καλό για την επεξεργασία λιπώδους ιστού	Εξατμίζεται γρήγορα Εύφλεκτο Η παρατεταμένη χρήση μπορεί να προκαλέσει συρρίκνωση και ευθραυστότητα του ιστού

2.3 Καθαρισμός (Clearing)

Μετά την απομάκρυνση των ελεύθερων μορίων νερού από τον ιστό, το επόμενο βήμα της επεξεργασίας είναι η χρήση ουσίας για την απομάκρυνση του μέσου αφυδάτωσης από τον ιστό, επειδή πολλά μέσα αφυδάτωσης δεν αναμειγνύονται ικανοποιητικά με το υλικό εμποτισμού που χρησιμοποιείται στο επόμενο βήμα της επεξεργασίας. Επιπρόσθετα, η διαδικασία του καθαρισμού αποσκοπεί στο να κάνει τον ιστό διαφανή για να διευκολυνθεί η μικροσκοπική εξέτασή του [18]. Ιδανικά μία ουσία που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό ιστού θα πρέπει να:

- έχει χαμηλό ιξώδες και υψηλό ποσοστό διείσδυσης
- έχει χαμηλό σημείο τήξης
- αναμειγνύεται τόσο με οινόπνευμα όσο και με λιωμένο κερί
- μην προκαλεί βλάβη στους ιστούς
- μην είναι τοξική

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

- μην είναι εύφλεκτη
- είναι φτηνή

Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο μέσο εργαστηριακό μέσο καθαρισμού ιστού είναι το ξυλόλιο, το οποίο είναι ένα διαυγές και εύφλεκτο υγρό. Το ξυλόλιο είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό και επομένως είναι ικανό να απομακρύνει το νερό από τον ιστό σχετικά γρήγορα (30-60 λεπτά). Όμως η παρατεταμένη έκθεση στο ξυλόλιο μπορεί να κάνει τον ιστό σκληρό. Εναλλακτικές ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθαρισμό ιστού είναι το τολουόλιο, το χλωροφόρμιο, οι εστέρες (νιτρικός αμυλεστέρας). Ο Πίνακας 2-3 παρέχει τις ιδιότητες των διάφορων ουσιών καθαρισμού ιστού όσον αφορά στο αν προκαλείται συρρίκνωση ή σκλήρυνση του ιστού, κατά πόσο είναι εύφλεκτες, στις παρενέργειες στον άνθρωπο και στο κόστος [18].

Πίνακας 2-3. Σύγκριση ουσιών καθαρισμού ιστού.

Ουσία	Συρρίκνωση ιστού	Σκλήρυνση ιστού	Εύφλεκτη	Παρενέργειες στον άνθρωπο	Κόστος
Ξυλόλιο	Ναι	Ναι	Ναι	Προκαλεί ερεθισμούς	Φθινό
Τολουόλιο	Ναι	Όχι	Ναι	Προκαλεί ερεθισμούς	Φθινό
Χλωροφόρμιο	Ελάχιστη	Όχι	Όχι	Επικίνδυνο τοξικό αέριο απελευθερώνεται κατά τη θέρμανση	Πολύ ακριβό
Εστέρες	Όχι	Όχι	Ναι	Ασφαλές	Υψηλό κόστος

2.4 Διήθηση/εμποτισμός

Σε αυτή τη φάση της επεξεργασίας του ιστού, γίνεται απομάκρυνση της ουσίας καθαρισμού και ο ιστός εμποτίζεται με κατάλληλη ουσία που θα διευκολύνει τη σκλήρυνση του ιστού και την επακόλουθη κατάτμησή του σε λεπτές τομές. Η ουσία που θα χρησιμοποιηθεί για τον εμποτισμό πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες [18]:

- Να είναι αναμίξιμη με την ουσία καθαρισμού
- Να είναι ρευστή σε υψηλές θερμοκρασίες (30 –60 °C) και στερεή σε θερμοκρασία δωματίου
- Να είναι ομοιογενής και σταθερή
- Να είναι μη τοξική και φθηνή
- Να είναι διαφανής
- Να είναι κατάλληλη για την κατάτμηση του ιστού

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ουσία είναι το κερί παραφίνης, το οποίο είναι ένας τύπος υδρογονάνθρακα και παράγεται ως υποπροϊόν κατά τη διύλιση του αργού

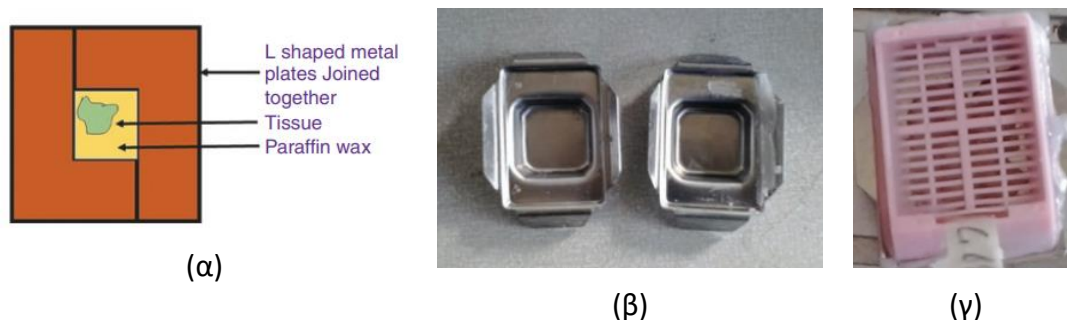
πετρελαίου. Είναι ένα μη τοξικό και φθινό μέσο εμποτισμού. Το σημείο τήξης του κυμαίνεται από 39 °C έως 70 °C. Το κερί παραφίνης με χαμηλό σημείο τήξης είναι μαλακό σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ το κερί παραφίνης υψηλότερου σημείου τήξης είναι πολύ πιο σκληρό σε συνοχή. Το κερί παραφίνης θερμαίνεται σε θερμοκρασία 2–3°C πάνω από το σημείο τήξης του. Αν θερμανθεί σε πιο υψηλή θερμοκρασία θα προκαλέσει σκλήρυνση του ιστού. Ο όγκος από το κερί παραφίνης που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τον όγκο του ιστού: πρέπει να έχει όγκο 20 έως 25 φορές μεγαλύτερο από τον όγκο του ιστού [21]. Ο τυπικός χρόνος εμποτισμού σε κερί παραφίνης είναι 3 έως 4 ώρες [18]. Μεγαλύτεροι χρόνοι εμποτισμού του ιστού στο κερί παραφίνης μπορεί να προκαλέσει συρρίκνωση και σκλήρυνσή του.

Άλλες ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εμποτισμό του ιστού είναι η ρητίνη, το άγαρ και η ζελατίνη [20].

2.5 Ενσωμάτωση

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της διήθησης/εμποτισμού, δημιουργείται ένα συμπαγές μπλοκ παραφίνης που περιέχει τον ιστό. Για να επιτευχθεί αυτό, χρησιμοποιείται ένα καλούπι ιστολογικής βάσης (συνήθως από ανοξείδωτο χάλυβα) κατάλληλου μεγέθους για να ταιριάζει στον ιστό, το οποίο επικαλύπτεται με γλυκερίνη για να αποτραπεί η προσκόλληση του κεριού που περιέχει τον ιστό στο καλούπι κατά τη στερεοποίηση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν 3 είδη καλουπιών [18]:

- **Καλούπια ενσωμάτωσης Leuckhard:** έχουν δύο βραχίονες σχήματος L με τον ένα βραχίονα να είναι μακρύτερος από τον άλλο (Εικόνα 2.1(α)). Οι δύο βραχίονες ρυθμίζονται για να δημιουργήσουν τον κατάλληλο χώρο για το μπλοκ. Λιωμένο κερί παραφίνης εγχέεται στον χώρο μεταξύ των δύο βραχιόνων και ο ιστός τοποθετείται εντός αυτού. Μετά την ψύξη του κεριού, δημιουργείται το συμπαγές μπλοκ ιστού.
- **Ανοξείδωτο καλούπι:** κατασκευάζεται από ανοξείδωτο χάλυβα (Εικόνα 2.1(β)). Η βάση του καλουπιού είναι επίπεδη και στιλπνή ώστε η υγρή παραφίνη να μπορεί να απομακρυνθεί εύκολα.
- **Πλαστικό καλούπι:** κατασκευάζεται από πλαστικό ανθεκτικό το οποίο είναι στα χημικά (Εικόνα 2.1(γ)).

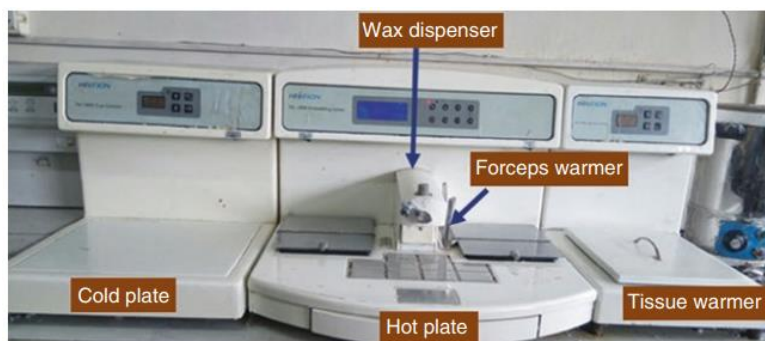


Εικόνα 2.1. Καλούπια ενσωμάτωσης ιστού. (α) Καλούπι τύπου Leuckhard. (β) Ανοξείδωτο καλούπι. (γ) Πλαστικό καλούπι. (Πηγή: [18])

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

Η διαδικασία της ενσωμάτωσης υλοποιείται με χρήση ειδικών συσκευών, οι οποίες αποτελούνται από [18]:

1. Σύστημα διανομής υγρής παραφίνης σε σταθερή θερμοκρασία
2. Μία θερμαντική επιφάνεια
3. Μία επιφάνεια ψύξης



Εικόνα 2.2. Συσκευής ενσωμάτωσης ιστού (Πηγή: [18]).

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Η παραφίνη είναι σε υγρή μορφή και σε σταθερή θερμοκρασία εντός του συστήματος διανομής.
- Ο ιστός τοποθετείται στον πυθμένα του καλούπιού.
- Υγρή παραφίνη εγχέεται στο καλούπι.
- Το καλούπι καλύπτεται με πλαστικό κάλυμμα.
- Τοποθετείται αναγνωριστικός στο πλαστικό κάλυμμα.
- Το καλούπι τοποθετείται στην επιφάνεια ψύξης.
- Το μπλοκ αφαιρείται από το καλούπι.

Η Εικόνα 2.3 παρουσιάζει το αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης ιστού σε μπλοκ παραφίνης. Το μπλοκ έχει ανακτηθεί από το αρχειακό υλικό του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών (Γ.Ν.Α.) «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ».



Εικόνα 2.3. Παράδειγμα ιστού ενσωματωμένου σε μπλοκ παραφίνης.

2.6 Μικροτόμηση

Η μικροτόμηση είναι η διαδικασία κοπής του ιστού σε λεπτές τομές για την προβολή του στο μικροσκόπιο. Επιτυγχάνεται με την χρήση ειδικής συσκευής, η οποία ονομάζεται μικροτόμος, και αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα [18] (Εικόνα 2.4):

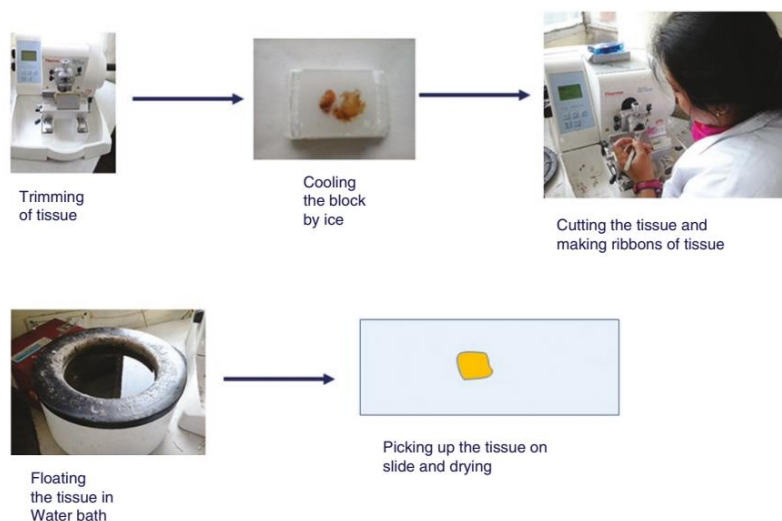
Τριμάρισμα του μπλοκ ιστού: η αποκοπή του ιστού γίνεται για να αναδυθεί το κομμάτι ιστού μέσα από το κερί παραφίνης στο οποίο έχει ενσωματωθεί. Το μπλοκ ιστού τοποθετείται στην τράπεζα της μικροτόμου και η παραφίνη που καλύπτει τον ιστό περικόπτεται μέχρι ο ιστός να εμφανιστεί.

Ψύξη του μπλοκ: το μπλοκ ψύχεται για 15-20 λεπτά. Η ψύξη συμβάλλει στη διατήρηση ίδιας συνοχής παραφίνης και ιστού και επομένως στην πιο εύκολη κοπή.

Μικροτόμηση: Το μπλοκ τοποθετείται στην τράπεζα της μικροτόμου. Το μπλοκ τεμαχίζεται σε τομές. Οι παραγόμενες τομές ιστού σχηματίζουν κορδέλα. Η άκρη της κορδέλας συγκρατείται με λαβίδα και το άκρο της κορδέλας αφαιρείται από την άκρη του μαχαιριού με βούρτσα.

Επίστρωση τομών: Η κορδέλα με τις τομές ιστού επιπλέει σε υδατόλουτρο το οποίο κάνει τον ιστό επίπεδο και αφαιρεί τυχόν ζάρες από αυτόν. Με τη βοήθεια λαβίδας, οι επιμέρους τομές διαχωρίζονται μεταξύ τους. Το υδατόλουτρο πρέπει να έχει σταθερή θερμοκρασία (45 °C), η οποία είναι μικρότερη από τη θερμοκρασία τήξης του κεριού παραφίνης. Σε περίπτωση διακύμανσης της θερμοκρασίας στο υδατόλουτρο, μπορεί να σχηματιστούν φυσαλίδες αέρα και να οδηγήσουν σε διάρρηξη του ιστού. Ένα πλακίδιο τοποθετείται κάθετα μέσα στο υδατόλουτρο μπροστά από τον ιστό και όταν αγγίξει τον ιστό, το πλακίδιο αποσύρεται κάθετα από το νερό.

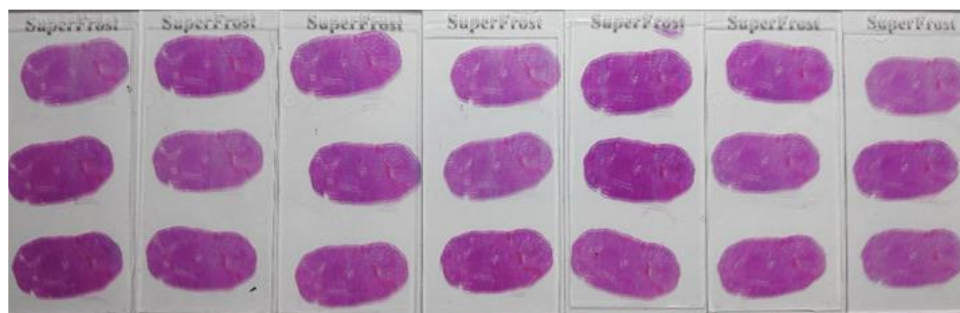
Αποπαραφίνωση: Το πλακίδιο τοποθετείται σε σχάρα και τοποθετούνται σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας (70 °C) για να αποπαραφινωθούν οι τομές του ιστού. Η θερμοκρασία πρέπει να ρυθμιστεί ώστε να είναι λίγο μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία τήξης της παραφίνης.



Εικόνα 2.4. Διαδικασία κατάτμησης ιστού (Πηγή: [18]).

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

Η Εικόνα 2.5 παρουσιάζει (χρωματισμένες) τομές ιστού όπως έχουν προκύψει από την μικροτόμηση. Οι τομές είναι τοποθετημένες σε ειδικό πλακίδιο. Οι τομές έχουν ανακτηθεί από το αρχαιακό υλικό του Γ.Ν.Α. «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ».



Εικόνα 2.5. Χρωματισμένες τομές ιστού το τοποθετημένες σε πλακίδιο.

Οι μικροτόμοι κατηγοριοποιούνται ως ακολούθως:

- Περιστροφική μικροτόμος
- Παλινδρομική μικροτόμος
- Μικροτόμος τύπου ελκήθρου
- Συρόμενη μικροτόμος
- Κρουοστάτης μικροτόμος
- Υπερμικροτόμος
- Μικροτόμος λείζερ

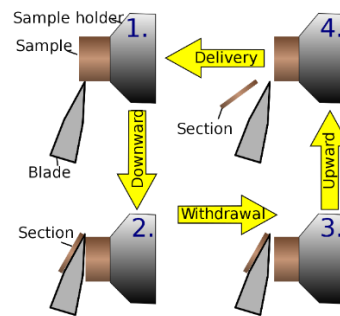
2.6.1 Περιστροφική μικροτόμος

Είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος τύπος μικροτόμου (Εικόνα 2.6(α)). Η λεπίδα τεμαχισμού παραμένει σε οριζόντια θέση και το μπλοκ που περιέχει τον ιστό κινείται πάνω-κάτω με τη χρήση περιστροφικής λαβής. Σε κάθε περιστροφή 360° της λαβής, το μπλοκ του ιστού κινείται προς τα κάτω, κόβεται μία πολύ λεπτή τομή και το μπλοκ ιστού ανεβαίνει προς τα πάνω (Εικόνα 2.6(β)). Η λειτουργία της μπορεί να ημιαυτόματη ή πλήρως αυτοματοποιημένη.

Η περιστροφική μικροτόμος παρέχει τομές 2-3 μm καλής ποιότητας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κοπή διαφόρων τύπων ιστών (σφιχτοί, εύθραυστοι, ιστοί από μικρή βιοψία κ.λπ.). Στα μειονεκτήματα αυτού του τύπου μικροτόμων είναι το κόστος, ότι δεν είναι κατάλληλες για την κατάτμηση μεγάλων μπλοκ ιστού και ότι η λεπίδα είναι προς τα πάνω και μπορεί να προκαλέσει τραυματισμούς στους χειριστές της συσκευής.



(α)



(β)

Εικόνα 2.6. (α) Περιστροφική μικροτόμος (Πηγή: [18]). (β) Αρχή λειτουργίας (Πηγή¹⁵).

2.6.2 Παλινδρομική μικροτόμος

Σε αυτόν τον τύπο μικροτόμου, το μαχαίρι είναι στατικό και το μπλοκ του ιστού κινείται με παλινδρομική κίνηση (Εικόνα 2.7). Είναι ένας από τους παλαιότερους σχεδιασμούς μικροτόμου. Ο μικροτόμος αυτού του τύπου μπορεί να κόψει λεπτές τομές σειριακά. Οι τομές που προκύπτουν είναι ελαφρώς κυρτές.



Εικόνα 2.7. Παλινδρομική μικροτόμος (Πηγή¹⁶).

2.6.3 Μικροτόμος τύπου ελκήθρου

Σε αυτού του τύπου την μικροτόμο το δείγμα τοποθετείται σε μια σταθερή βάση, η οποία στη συνέχεια κινείται προς τα πίσω και προς τα εμπρός κατά μήκος ενός μαχαιριού (Εικόνα 2.8). Οι σύγχρονοι μικροτόμοι αυτού του τύπου έχουν τη βάση τοποθετημένη σε ένα γραμμικό έδρανο, που επιτρέπει στην μικροτόμο να κόβει εύκολα πολλά χονδροειδή τμήματα. Το τυπικό πάχος κοπής που μπορεί να επιτευχθεί είναι μεταξύ 1 και 60 μm .

¹⁵ Wikipedia, "Microtome", <https://en.wikipedia.org/wiki/Microtome>, 2023.

¹⁶ Radical Scientific Equipments, "Rocking Microtome", <https://www.radicalindia.com/RMT-10.php>.



Εικόνα 2.8. Μικροτόμος τύπου έλκηθρου (Πηγή¹⁷).

2.6.4 Συρόμενη μικροτόμος

Σε αυτόν τον τύπο μικροτόμου, η λεπίδα τεμαχισμού είναι στάσιμη και το μπλοκ κινείται οριζόντια πάνω από αυτή (Εικόνα 2.9). Χρησιμοποιείται κυρίως για ιστούς ενσωματωμένους σε σελοειδή.



Εικόνα 2.9. Συρόμενη μικροτόμος (Πηγή¹⁸).

2.6.5 Κρυοστάτης μικροτόμος

Αυτός ο τύπος μικροτόμου χρησιμοποιείται για την κοπή κατεψυγμένου ιστού μέσα σε θάλαμο που περιέχει υγρό άζωτο. Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις ταχείας βιοψίας.

¹⁷ Wikipedia, "Microtome", <https://en.wikipedia.org/wiki/Microtome>, 2023.

¹⁸ Leica, "Sliding Microtome", <https://www.medicaexpo.com/medical-manufacturer/sliding-microtome-2637.html>.



Εικόνα 2.10. Κρυοστάτης μικρότομος (Πηγή¹⁹).

2.6.6 Υπερμικρότομος

Η υπερμικρότομος χρησιμοποιείται για την κοπή εξαιρετικά λεπτών τμημάτων για ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης (Εικόνα 2.11). Οι τομές έχουν πάχος μεταξύ 40 και 100 nm πάχους και κόβονται με χρήση γυάλινου μαχαιριού ή μαχαιριού διαμαντιού. Ο ιστός αρχικά κόβεται σε μεγέθους $1 \times 1 \text{ mm}^2$ και στη συνέχεια τμήμα κόβεται από αυτό το υπερμικρότομο με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Το τεμαχισμένο τμήμα αφήνεται να επιπλεύσει σε νερό και στη συνέχεια συλλέγεται σε ένα μεταλλικό πλέγμα.



Εικόνα 2.11. Υπερμικρότομος (Πηγή²⁰).

2.6.7 Μικροτόμος λέιζερ

Είναι ο πιο σύγχρονος τύπος μικροτόμου, χρησιμοποιείται δέσμη λέιζερ για την κοπή ιστού χωρίς επεξεργασία ή ενσωμάτωση. Χρησιμοποιείται δέσμη υπέρυθρου λέιζερ με πολύ μικρή διάρκεια παλμού ώστε να μην παράγεται σχεδόν καθόλου θερμότητα και ο τεμαχισμός του ιστού να γίνεται χωρίς καμία θερμική επίδραση.

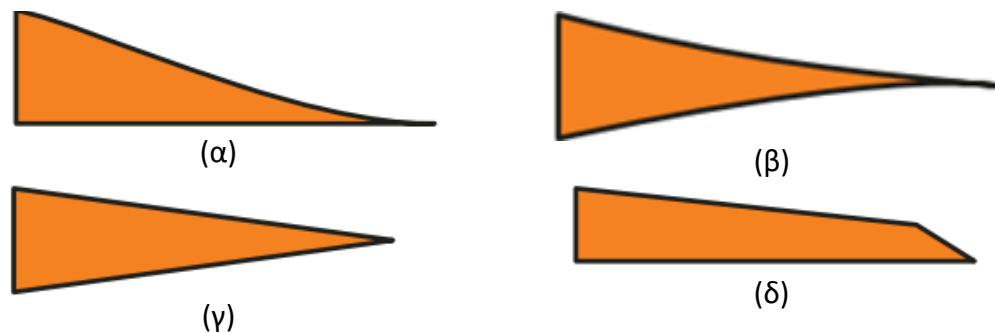
Η λεπίδα τεμαχισμού μίας μικροτόμου παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόμορφη και λεπτή κοπή τομής ιστού. Κατασκευάζεται από χάλυβα και υπάρχουν διάφορα προφίλ λεπίδας ανάλογα με τον τύπο της μικροτόμου. Συγκεκριμένα (Εικόνα 2.12):

¹⁹ Wikipedia, "Microtome", <https://en.wikipedia.org/wiki/Microtome>, 2023.

²⁰ Wikipedia, "Ultramicrotomy", https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cryo_Ultramicrotome.jpg, 2009.

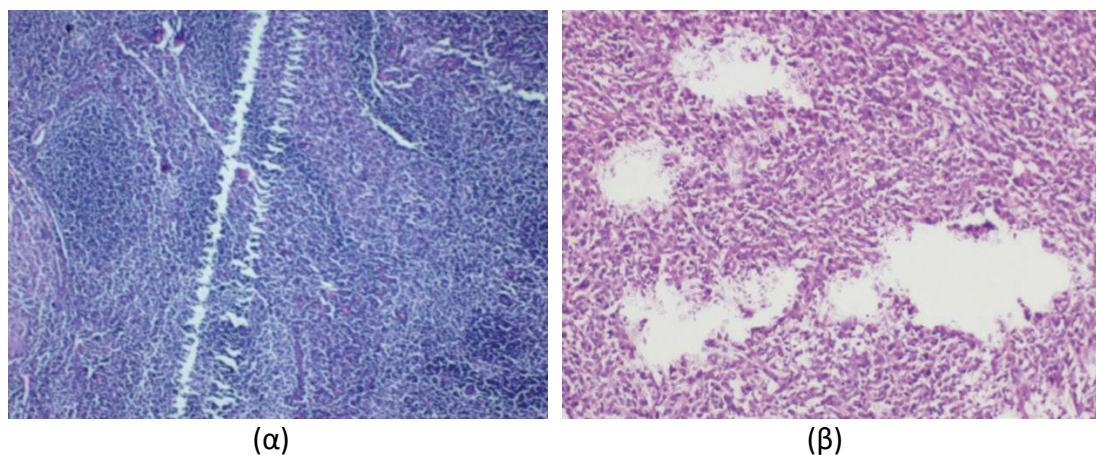
3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

- Κοιλεπίπεδη λεπίδα (Προφίλ Α): Η μία πλευρά της λεπίδας τεμαχισμού είναι απλή και η άλλη είναι κοίλη. Είναι πολύ κοφτερή και χρησιμοποιείται για τον τεμαχισμό μαλακών ιστών. Ωστόσο, χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά.
- Αμφίκοιλη λεπίδα (Προφίλ Β): Η λεπίδα είναι κοίλη και στις δύο πλευρές της. Χρησιμοποιείται στην παλινδρομική μικροτόμο. Δεν είναι εντελώς άκαμπτη με αποτέλεσμα να δονείται κατά την κοπή.
- Λεπίδα σε μορφή σφήνας (Προφίλ C): είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη λεπίδα τεμαχισμού και είναι συμβατή με τους διάφορους τύπους μικροτόμου.
- Λεπίδα σε μορφή ακμής εργαλείου (Προφίλ D): η λεπίδα μοιάζει με σμίλη επεξεργασίας ξύλου. Και οι δύο πλευρές της λεπίδας είναι απλές με απότομη άκρη. Χρησιμοποιείται κυρίως για την κοπή του σκληρού ιστού όπως το απασβεστωμένο οστό.



Εικόνα 2.12. Προφίλ λεπίδας μικροτόμου. (α) Κοιλεπίπεδο. (β) Αμφίκοιλο. (γ) Σφήνα. (δ) Ακμή εργαλείου. (Πηγή: [18])

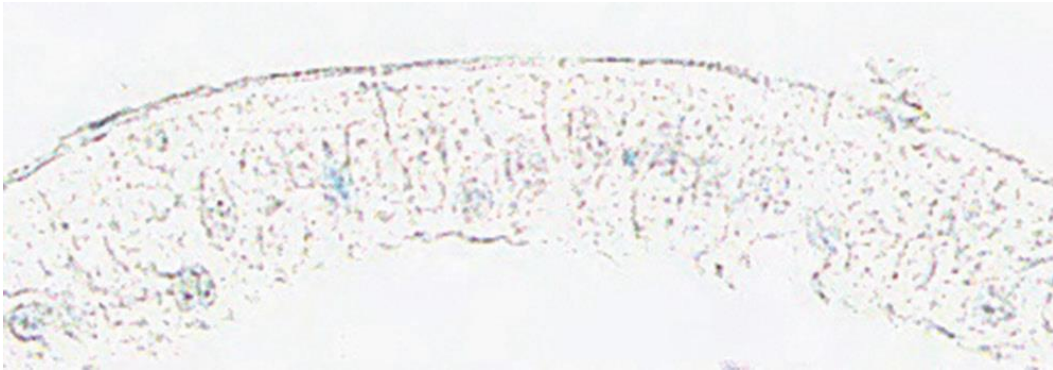
Κατά τη μικροτόμηση του ιστού μπορεί να προκύψουν διάφορα τεχνικά σφάλματα (διάρρηξη ιστού λόγω μη ομοιόμορφης ακμής του μαχαιριού ή φυσαλίδων αέρα από το υδατόλουτρο) στις τιμές, όπως φαίνεται στην επόμενη εικόνα.



Εικόνα 2.13. Τεχνικά σφάλματα σε ιστούς κατά τη μικροτόμηση. (α) Σκίσιμο του ιστού λόγω της ανομοιόμορφης κοπτικής άκρης του μαχαιριού. (β) Φυσαλίδες αέρα λόγω μη ελεγχόμενης θερμοκρασίας του υδατόλουτρου. (Πηγή [18])

2.7 Χρώση ιστού

Οι τομές που προκύπτουν μετά την μικροτόμηση του ιστού δεν έχουν χρώμα, επειδή η πρωτεΐνη που έχει διατηρηθεί στον ιστό μετά την μονιμοποίηση του έχει τον ίδιο δείκτη διάθλασης με αυτόν του πλακιδίου στο οποίο είναι τοποθετημένες.



Εικόνα 2.14. Ιστός χωρίς χρώση (Πηγή: [19]).

Για να κατανοηθεί η μορφολογία του ιστού, χρωματίζεται με ειδικές χρωστικές ουσίες οι οποίες έχουν ειδική συγγένεια με τις διαφορές πρωτεΐνες του ιστού. Κατά τη χρώση των τομών ιστού αρχικά γίνεται «αποπαραφινποίηση» (deparaffinization), δηλαδή απομάκρυνση του κεριού παραφίνης ώστε να επιτραπεί στις υδατοδιαλυτές χρωστικές ουσίες να εισχωρήσουν στον ιστό. Για τον σκοπό αυτόν, τα πλακίδια με τις τομές ιστού εκτίθενται σε καθαριστικό παράγοντα, σε διάφορα διαλύματα φθίνουσας συγκέντρωσης αλκοόλης και τελικά σε νερό.

2.7.1 Επεξήγηση χρώσης ιστών

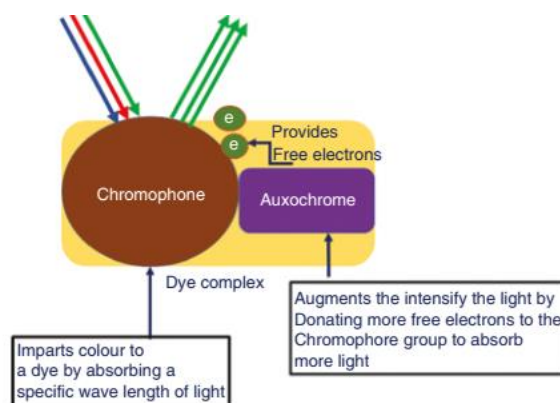
Η χρωστική ουσία μπορεί να είναι φυσική ή συνθετική. Οι μοναδικές φυσικές χρωστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι η αιματοξυλίνη και η καρμίνη. Η πλειονότητα των χρωστικών ουσιών είναι συνθετικές και συγκεκριμένα είναι παράγωγα πετρελαίου βασισμένες στο βενζόλιο. Το βενζόλιο είναι χημική ένωση με μοριακό τύπο C_6H_6 και τα άτομά του μορίου του σχηματίζουν εξαγωνικό δακτύλιο. Το βενζόλιο είναι άχρωμο. Ωστόσο, εάν μια συγκεκριμένη χημική ομάδα εισαχθεί στον δακτύλιο του βενζολίου (για παράδειγμα με αντικατάσταση δύο ατόμων υδρογόνου στον δακτύλιο βενζολίου από δύο άτομα οξυγόνου, σχηματίζοντας την ένωση κινόνη $C_6H_4O_2$), τότε θα παραχθεί χρώμα όταν φωτιστεί με λευκό φως, καθώς θα απορροφηθούν συγκεκριμένα μήκη κύματος.

Μία χρωστική ουσία απαρτίζεται από δύο μέρη: το χρωμοφόρο και το αυξόχρωμο μέρος (Εικόνα 2.15):

- **Χρωμοφόρο:** Είναι το τμήμα της χρωστικής ουσίας που απορροφά το φως και δίνει χρώμα στη βαφή. Διαθέτει πολλά ελεύθερα ηλεκτρόνια τα οποία έχουν τη δυνατότητα απορρόφησης των υπεριωδών ακτίνων φωτός.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

- **Αυξόχρωμα:** Είναι το τμήμα της χρωστικής ουσίας που ενισχύει την ένταση του φωτός και βοηθά να «κολλήσει» η χρώση στον ιστό. Παρέχει ελεύθερα ηλεκτρόνια στο χρωμοφόρο κομμάτι.



Εικόνα 2.15. Σχηματικό διάγραμμα δημιουργίας χρώματος από τη χρωστική ουσία. Το χρωμοφόρο απορροφά το φως και δίνει το χρώμα. Το αυξόχρωμα παρέχει ηλεκτρόνια στο χρωμοφόρο για την απορρόφηση περισσότερου φωτός (Πηγή: [18]).

Οι χρωστικές ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το ηλεκτρικό φορτίο που φέρουν ως [18]:

(α) **Ανιονικές (ή όξινες) χρωστικές ουσίες:** φέρουν αρνητικό φορτίο και είναι διαλυτές στο νερό. Συνδυάζονται με ιστούς με θετικό φορτίο (οξεόφιλοι ιστοί). Η ηωσίνη είναι μία από τις πιο γνωστές ανιονικές χρωστικές ουσίες.

(β) **Κατιονικές (ή βασικές) χρωστικές ουσίες:** φέρουν θετικό φορτίο και είναι κυρίως διαλυτές στην αιθανόλη. Συνδυάζονται με ιστούς με αρνητικό φορτίο (βασεόφιλοι ιστοί). Παραδείγματα τέτοιων χρωστικών ουσιών είναι το μεθυλικό πράσινο, το αιθυλικό πράσινο και το αλσιανό μπλε.

(γ) **Ουδέτερες χρωστικές ουσίες:** είναι σύνθεση όξινων και βασικών χρωστικών ουσιών. Όταν μία όξινη και μία βασική ουσία βρεθούν σε υδατικό διάλυμα, γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων από την όξινη στη βασική ουσία. Η χρωστική Romanowsky–Giemsa αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας.

Η σύνδεση μεταξύ χρωστικής ουσίας και ιστού επιτυγχάνεται με έναν από τους παρακάτω μηχανισμούς [22], [23]:

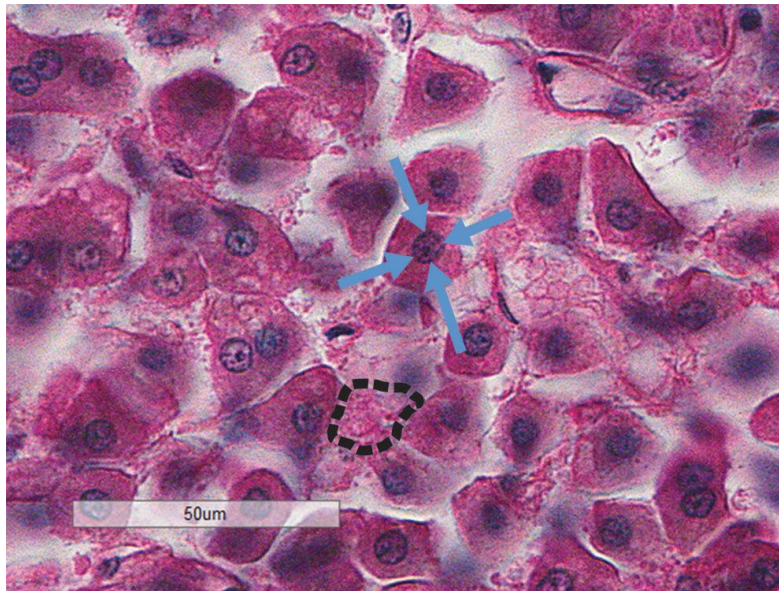
- **Ηλεκτροστατικός δεσμός:** ο ηλεκτροστατικός δεσμός εμφανίζεται μεταξύ δύο αντίθετα φορτισμένων σωματιδίων τα οποία έλκονται μεταξύ τους με δυνάμεις Coulomb. Για παράδειγμα, μία όξινη χρωστική ουσία που φέρει αρνητικό φορτίο συνδέεται με ιστό που φέρει θετικό φορτίο μέσω ηλεκτροστατικού δεσμού. Παρομοίως, η βασική χρωστική ουσία που έχει θετικά φορτισμένο χρωμογόνο συνδέεται με βασεόφιλο ιστό που περιέχει αρνητικό φορτίο (π.χ. φωσφορικό DNA ή θειικές βλεννογονικές ουσίες [24]).
- **Δυνάμεις van der Waals:** είναι πολύ ασθενείς ηλεκτροστατικές δυνάμεις που παρατηρούνται μεταξύ ουδέτερων ατόμων ή μορίων όταν βρεθούν πολύ κοντά.

- **Δεσμός υδρογόνου:** είναι μία μορφή ασθενούς ομοιοπολικού δεσμού που εμφανίζεται μεταξύ υδρογόνου και ενός ισχυρά αρνητικού φορτισμένου ατόμου, όπως οξυγόνο ή άζωτο.
- **Ομοιοπολικός δεσμός:** Σε περίπτωση ομοιοπολικού δεσμού, δύο ηλεκτρικά ουδέτερα άτομα μοιράζονται ηλεκτρόνια μεταξύ τους για να πληρώσουν τον απαιτούμενο αριθμό της εξωτερικής στιβάδας. Ο ομοιοπολικός δεσμός είναι ισχυρός δεσμός.

2.7.2 Χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης

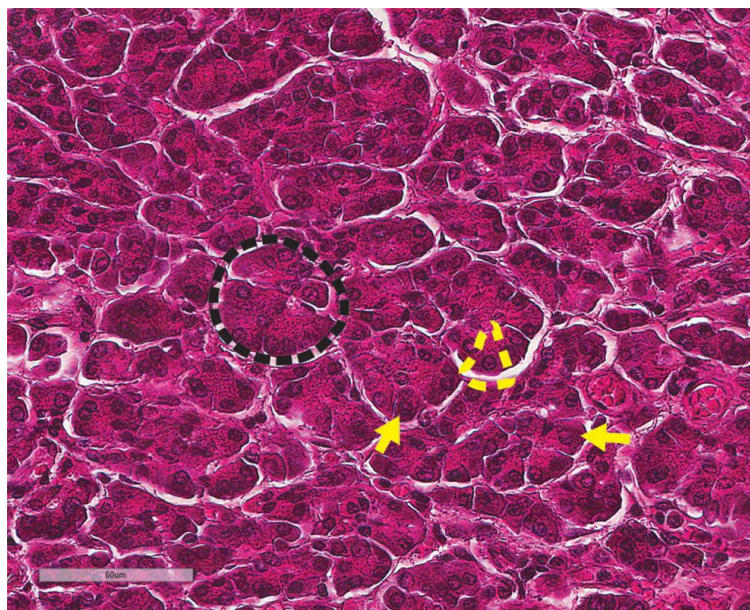
Η αιματοξυλίνη σε συνδυασμό με την ηωσίνη είναι ίσως ο πιο συνηθισμένος τρόπος βαφής ιστών [25]. Η αιματοξυλίνη είναι μια ουσία που χρωματίζει με μπλε χρώμα αρνητικά φορτισμένες (βασεόφιλες) κυτταρικές δομές (π.χ. DNA, RNA), ενώ η ηωσίνη είναι μία ουσία που χρωματίζει με κόκκινο (ή ροζ) χρώμα θετικά φορτισμένες (οξεόφιλες) κυτταρικές δομές (π.χ. πρωτεΐνες, μιτοχόνδρια). Η αιματοξυλίνη εξάγεται από το φλοιό του δέντρου *Haematoxylum campechianum* που εμφανίζεται κυρίως στην πολιτεία Campeche του Μεξικού, ενώ η ηωσίνη είναι σχηματίζεται με τη δράση βρωμίου και φλουορεσκεΐνης. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα χρώσης ιστών με χρήση αιματοξυλίνης και ηωσίνης και ποιες πληροφορίες μπορούν να εξαχθούν από τη χρώση τους.

Η Εικόνα 2.16 παρουσιάζει ένα παράδειγμα χρώσης κυττάρων ιστού ήπατος με χρήση H&E. Η χρώση με αιματοξυλίνη των αρνητικά φορτισμένων μορίων DNA δίνει στον πυρήνα μπλε χρώμα (μπλε βέλη στην Εικόνα 2.16), ενώ η κόκκινη/ροζ ηωσίνη χρωματίζει πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες στις εξωκυτταρικές περιοχές (εντός της μαύρης διακεκομμένης γραμμής στην Εικόνα 2.16) είναι επίσης χρωματισμένες με την ηωσίνη. Τα ριβοσώματα είναι κυτταρικές δομές στο κυτταρόπλασμα που συνθέτουν πρωτεΐνες. Επειδή τα ριβοσώματα περιέχουν RNA, το οποίο είναι αρνητικά φορτισμένο και, επομένως, βασεόφιλο, τα κύτταρα που συνθέτουν ενεργά μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης θα επιδείξουν κάποια χρώση αιματοξυλίνης σε τμήματα του κυτταροπλάσματος. Αυτό προσθέτει μπλε στο τυπικά ροζ (λόγω ηωσίνης) κυτταρόπλασμα, δημιουργώντας μια πιο σκούρα ή μοβ σκιά, ένα χαρακτηριστικό που αναφέρεται ως κυτταροπλασματική βασεοφιλία [19].



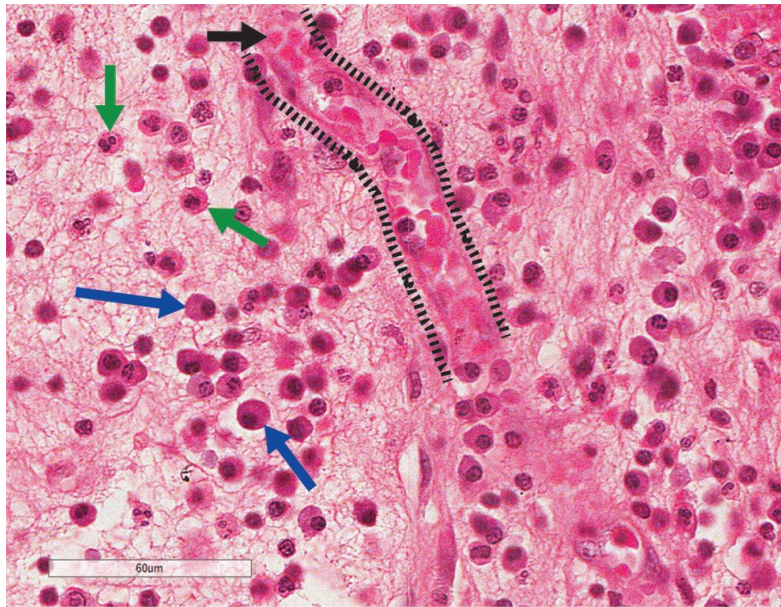
Εικόνα 2.16. Ηπατικός ιστός χρωματισμένος με Η&Ε. Τα μπλε βέλη δείχνουν έναν πυρήνα χρωματισμένο από την αιματοξυλίνη, ενώ η διακεκομμένη γραμμή περικλείει πρωτεΐνες σε εξωκυτταρική περιοχή χρωματισμένη με ηωσίνη (Πηγή: [19]).

Η Εικόνα 2.17 παρουσιάζει ιστό πάγκρεας χρωματισμένο με Η&Ε. Στο πάγκρεας και σε άλλα όργανα, συστάδες αρκετών κυττάρων οργανώνονται σε δομές που ονομάζονται acini (μαύρο περίγραμμα στην Εικόνα 2.17). Τα περισσότερα από τα κύτταρα σε μία τέτοια δομή έχουν σχήμα πυραμίδας (κίτρινο περίγραμμα). Σε αυτή την εικόνα, τα περισσότερα από τα κύτταρα παρουσιάζουν κυτταροπλασματική βασεοφιλία, ειδικά γύρω από τον πυρήνα. Δύο κύτταρα με έντονη κυτταροπλασματική βασεοφιλία υποδεικνύονται με τα κίτρινα βέλη.



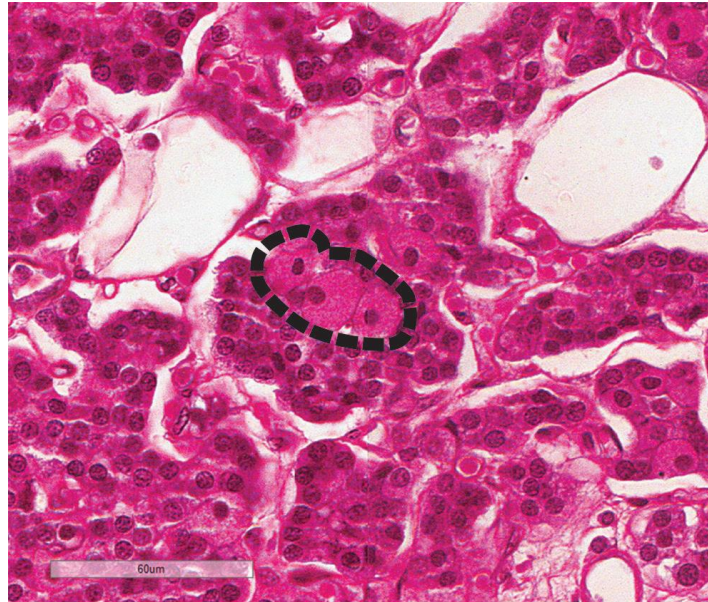
Εικόνα 2.17. Ιστός πάγκρεας χρωματισμένος με Η&Ε, δείχνοντας δομές acinus (μαύρο περίγραμμα), μεμονωμένο κύτταρο (κίτρινο περίγραμμα) και κυτταροπλασματική βασεοφιλία (κίτρινα βέλη) (Πηγή: [19]).

Η Εικόνα 2.18 δείχνει ένα άλλο παράδειγμα κυττάρων με κυτταροπλασματική βασεοφιλία (μπλε βέλη). Συγκρίνετε με κύτταρα με ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα (πράσινα βέλη). Επίσης η Εικόνα 2.18 παρουσιάζει ένα αιμοφόρο αγγείο (βρίσκεται ανάμεσα στις διακεκομμένες γραμμές). Στην κορυφή και στο κάτω μέρος, το αγγείο φαίνεται να εξαφανίζεται επειδή στρέφεται και φεύγει από το επίπεδο αυτής της τομής. Επιπρόσθετα, παρατηρούνται ερυθρά αιμοσφαίρια με έντονη χρώση ηωσίνης, τα οποία στερούνται πυρήνων (μαύρο βέλος).



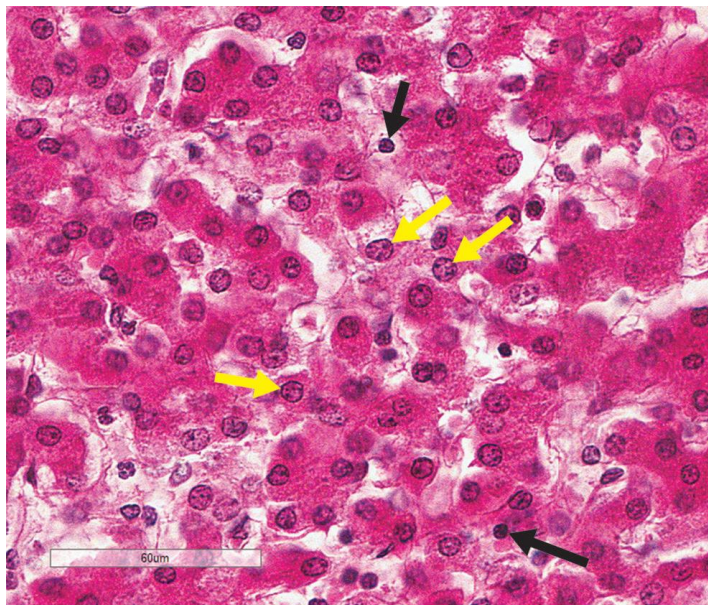
Εικόνα 2.18. Φλεγμονώδης ιστός χρωματισμένος με H&E, που δείχνει κύτταρα με (μπλε βέλη) και χωρίς (πράσινα βέλη) κυτταροπλασματική βασεοφιλία. Επίσης φαίνεται ένα αιμοφόρο αγγείο (διακεκομμένες γραμμές) με ερυθρά αιμοσφαίρια (μαύρο βέλος) (Πηγή: [19]).

Κύτταρα με άφθονες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες εμφανίζουν πιο έντονη χρώση ηωσίνης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.19, η οποία δείχνει κύτταρα με άφθονα μιτοχόνδρια (μαύρο περίγραμμα).



Εικόνα 2.19. Παραθυροειδής αδένας χρωματισμένος με Η&Ε, στον οποίο εμφανίζονται κύτταρα με έντονη κυτταροπλασματική ηωσινοφιλία (διακεκομμένη περιοχή) (Πηγή: [19]).

Ακριβώς όπως οι ιδιότητες χρώσης του κυτταροπλάσματος μπορούν να παρέχουν ενδείξεις για τη λειτουργία ενός κυττάρου, οι ιδιότητες χρώσης του πυρήνα μπορούν επίσης να υποδηλώνουν τη σχετική δραστηριότητα ενός κυττάρου. Το γενετικό υλικό στον πυρήνα, το DNA, μπορεί να είναι σε συμπυκνωμένη (ανενεργή) μορφή που ονομάζεται ετεροχρωματίνη ή σε αποσυμπυκνωμένη (ενεργή) μορφή που ονομάζεται ευχρωματίνη [19]. Το συμπυκνωμένο DNA σε ένα κύτταρο θα έχει ως αποτέλεσμα έναν μικρότερο, πιο πυκνά χρωματισμένο πυρήνα (μαύρα βέλη, Εικόνα 2.20), ενώ ένα ενεργό κύτταρο θα έχει έναν μεγαλύτερο, πιο χλωμό πυρήνα (κίτρινα βέλη).

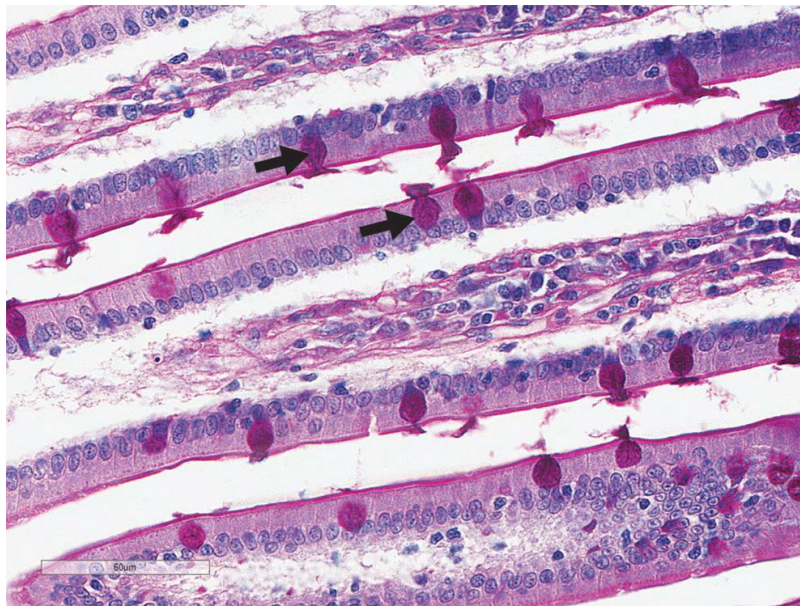


Εικόνα 2.20. Ηπατικός ιστός, με πυρήνες ενεργών (κίτρινα βέλη) και ανενεργών (μαύρα βέλη) κυττάρων (Πηγή: [19]).

2.7.3 Χρώση περιοδικού οξέος – Schiff

Η χρώση περιοδικού οξέος – Schiff (Periodic acid–Schiff - PAS) χρησιμοποιείται για την ανάδειξη των υδατανθράκων. Οι δομές που αντιδρούν με αυτή τη διαδικασία αναφέρονται ως PAS θετικές (PAS+) και εμφανίζονται με φωτεινό μωβ χρώμα. Ο ιστός τυπικά αντιχρωματίζεται με μια βασική βαφή για να τονίσει τον πυρήνα. Οι δομές PAS+ εντός του κυττάρου είναι η συσκευή Golgi, η πλασματική μεμβράνη.

Η Εικόνα 2.21 παρουσιάζει ένα ιστό βαμμένο με PAS. Η διπλοστοιβάδα λιπιδίων των πλασματικών μεμβρανών περιλαμβάνει ένα συστατικό υδατάνθρακα που ονομάζεται γλυκοκάλυκα. Ως εκ τούτου, τα όρια των κυττάρων είναι πιο ξεκάθαρα σε ιστούς που έχουν χρωματιστεί με PAS. Τα κύτταρα που χρωματίζονται έντονα θετικά με PAS (μαύρα βέλη) περιέχουν άφθονα εκκριτικά κυστίδια στο κυτταρόπλασμα, τα οποία είναι γεμάτα με γλυκοπρωτεΐνες.



Εικόνα 2.21. Χρώση νήστιδας²¹ με PAS. Υποδεικνύονται κύτταρα πλούσια σε υδατάνθρακες, που ονομάζονται κυλικοειδή κύτταρα (μαύρα βέλη) (Πηγή: [19]).

²¹ Η νήστιδα είναι το δεύτερο τμήμα του λεπτού εντέρου.

3 Τρισδιάστατη Ανακατασκευή Ιστού στη Συμβατική Μικροσκοπία Φωτεινού Πεδίου

Στον παρόν κεφάλαιο, αναπτύσσεται μεθοδολογία για τη δημιουργία ψηφιακής τρισδιάστατης οπτικής τομής σε συμβατικά μικροσκόπια φωτεινού πεδίου για εφαρμογές ιστοπαθολογίας. Θα δειχθεί ότι (α) ο τρισδιάστατος οπτικός τεμαχισμός ιστοπαθολογικών δειγμάτων είναι εφικτός με τη χρήση συμβατικών διατάξεων μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου, χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού, (β) οι παραγόμενοι τρισδιάστατοι όγκοι περιέχουν πληροφορίες που διαφορετικά είναι απρόσιτες για τον παρατηρητή ιατρό και (γ) η προτεινόμενη τεχνολογία έχει τη δυνατότητα προσαρμογής σε οποιοδήποτε τυπικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, επιτρέποντας, με αυτόν τον τρόπο, την ευρεία και χαμηλού κόστους διάδοση της ιδέας της τομογραφικής απεικόνισης στην ιστοπαθολογία.

3.1 Εισαγωγή

Η μικροσκοπική εξέταση περιλαμβάνει οπτική παρατήρηση κυτταρολογικού ή/και ιστολογικού υλικού, ιδανικά αφαιρούμενο από την πιο αντιπροσωπευτική περιοχή της παθολογίας. Τα εξαγόμενα βιολογικά δείγματα παρασκευάζονται χημικά, τοποθετούνται κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (ΦΠ) και αξιολογούνται οπτικά από τον παρατηρητή ιατρό. Η αρχιτεκτονική και η μορφομετρική εμφάνιση καθώς και η υφή των δειγμάτων συγκαταλέγονται μεταξύ των σημαντικότερων ευρημάτων που καθοδηγούν τη λήψη διαγνωστικών αποφάσεων. Ωστόσο, οι οπτικές εκτιμήσεις των ειδικών έχουν αποδειχθεί επιρρεπείς σε παρερμηνείες και λάθη [26], [27], [28]. Περίπου 1 εκατομμύριο άνθρωποι επηρεάζονται από διαγνωστικά σφάλματα ετησίως μόνο στις ΗΠΑ [29]. Οι επιπτώσεις στην πρόγνωση του ασθενούς μπορεί να είναι δυσμενείς (θάνατοι ή αναπηρίες), ενώ η οικονομική επιβάρυνση έχει υπολογιστεί σε μέγεθος δεκάδων δισεκατομμυρίων δολαρίων ετησίως [30]. Το ποσοστό των διαγνωστικών σφαλμάτων μπορεί να φτάσει το 30% σε καταστάσεις ρουτίνας [27], ειδικά για τους περισσότερους από 200 εντοπισμένους σπάνιους τύπους καρκίνου [31]. Αυτό σημαίνει ότι περίπου σε μία στις τρεις περιπτώσεις, ενδεχομένως, θα μπορούσε να είχε σχεδιαστεί ένα αποτελεσματικότερο θεραπευτικό πλάνο σε σχέση με αυτό που τελικά σχεδιάστηκε.

Παρά την παραπάνω πολυπλοκότητα της μικροσκοπικής εξέτασης, εξακολουθεί να παραμένει ο χρυσός κανόνας (gold standard) στην ιστοπαθολογία και τη διάγνωση του καρκίνου. Τα μικροσκόπια ΦΠ βρίσκονται παντού, από το μεγαλύτερο μητροπολιτικό νοσοκομείο μέχρι το τοπικό μικροβιολογικό εργαστήριο. Αποτελούν το πιο ουσιαστικό εργαλείο οπτικοποίησης στη διαγνωστική παθολογία. Ωστόσο, τα

μικροσκόπια ΦΠ έχουν τρεις γνωστούς περιορισμούς: (α) παράγουν μόνο δισδιάστατες εικόνες, (β) έχουν πεπερασμένο βάθος πεδίου και (γ) η διακριτική τους ικανότητα περιορίζεται από το φαινόμενο της περίθλασης. Αυτοί οι περιορισμοί έχουν αντιμετωπιστεί από τις σύγχρονες τεχνολογίες, όπως τα συνεστιακά, πολυφωτονικά και υπερυψηλής διακριτικής ικανότητας μικροσκόπια [32], [33]. Ωστόσο, η ενσωμάτωση τέτοιων τεχνολογιών στην καθημερινή κλινική πρακτική ως εναλλακτικές των μικροσκοπιών ΦΠ είναι, το πιθανότερο, αδύνατη λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας, των χρονοβόρων πρωτοκόλλων και του εξαιρετικά υψηλού κόστους (περίπου 200.000 € για ένα βασικό συνεστιακό μικροσκόπιο). Έτσι, η κλινική ρουτίνα εξακολουθεί να βασίζεται στα μικροσκόπια που παράγουν προβολικές εικόνες 2-διαστάσεων και παρουσιάζουν πεπερασμένη διακριτική ικανότητα λόγω του φαινομένου της περίθλασης [34].

Η τομογραφία οπτικής προβολής προσφέρει μια εναλλακτική λύση στην μικροσκοπία ΦΠ για τη δημιουργία τρισδιάστατων εικόνων δειγμάτων διαφανών στο φως σε μια πειραματική διάταξη που προσομοιάζει με το πρωτόκολλο σάρωσης της υπολογιστικής αξονικής τομογραφίας ακτίνων Χ. Οι εικόνες (προβολές) του δείγματος λαμβάνονται σε διαφορετικές γωνίες και ο τρισδιάστατος όγκος ανακατασκευάζεται χρησιμοποιώντας υπολογιστικούς αλγόριθμους, όπως η φιλτραρισμένη οπισθοπροβολή [35]. Αυτή η τεχνολογία έχει χρησιμοποιηθεί για πολλές εφαρμογές τα τελευταία 20 χρόνια, από τη μελέτη της ανατομίας των εμβρύων [35] έως την οπτικοποίηση της μορφολογίας των κυττάρων [36]. Μία άλλη εναλλακτική για την τρισδιάστατη ανακατασκευή όγκου ιστού έχει εφαρμοστεί σε απεικόνιση ολόκληρης της αντικειμενοφόρου πλάκας (whole slide imaging) χρησιμοποιώντας αλγόριθμους ευθυγράμμισης [37]. Ωστόσο, οι τεχνολογίες που έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία [36], [38], [39], [40], [41], [42], [43], [35], [44], [45] α/ απαιτούν την πλήρη περιστροφή του δείγματος γύρω από την πηγή φωτός, β/ απαιτούν τον σχεδιασμό ενός ειδικού οργάνου που είναι αφιερωμένο για το σκοπό αυτό και γ/ έχουν περιορισμένη εφαρμογή στην κλινική πράξη.

Για να καλυφθεί η ανάγκη να γίνουν οι τεχνολογίες μικροσκοπίας τρισδιάστατης ανακατασκευής πιο προσιτές στην κλινική πρακτική, οι ερευνητές προσπάθησαν να παράσχουν προσαρμοστικές τροποποιήσεις αυτών των τεχνολογιών για συμβατικά μικροσκόπια ΦΠ. Δύο από αυτές τις προσεγγίσεις που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, είναι το ολοκληρωμένο μικροσκόπιο τομογραφίας οπτικής προβολής (Optical Projection Tomography – OPT) [46], μια πλατφόρμα υλικού και λογισμικού ανοιχτής πρόσβασης που μπορεί να εφαρμόσει την εν λόγω τεχνολογία για μικροσκοπία ευρέως πεδίου και η μερικώς συνεκτική οπτική τομογραφία περίθλασης (Partially Coherent Optical Diffraction Tomography PC-ODT) [47], μια μέθοδος που αποσυνδυάζει και συνδυάζει δισδιάστατες εικόνες που δημιουργούνται με βάση τις μετρήσεις κατανομής του δείκτη διάθλασης στο δείγμα.

Εκτός από την εξέλιξη των τεχνολογιών μικροσκοπίας και επεξεργασίας εικόνας για την ανάλυση των καρκινικών κυττάρων, υπάρχει σημαντικός αριθμός προσεγγίσεων βιοχημικής ανάλυσης προς την ίδια κατεύθυνση. Οι τεχνολογίες ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων είναι μια πολλά υποσχόμενη αναδυόμενη

τεχνική ικανή να αναγνωρίσει κύτταρα όγκου που κυκλοφορούν στην κυκλοφορία του αίματος [48]. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας RNA μονοκυττάρου είναι μια άλλη σύγχρονη τεχνολογία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση του μικροπεριβάλλοντος των καρκινικών κυττάρων [49], [50]. Επιπλέον, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων υψηλής διάστασης έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση και την ανάλυση των καρκινικών κυττάρων με σύγχρονες τεχνολογίες κυτταρομετρίας [51], [52], [53].

3.2 Δεδομένα

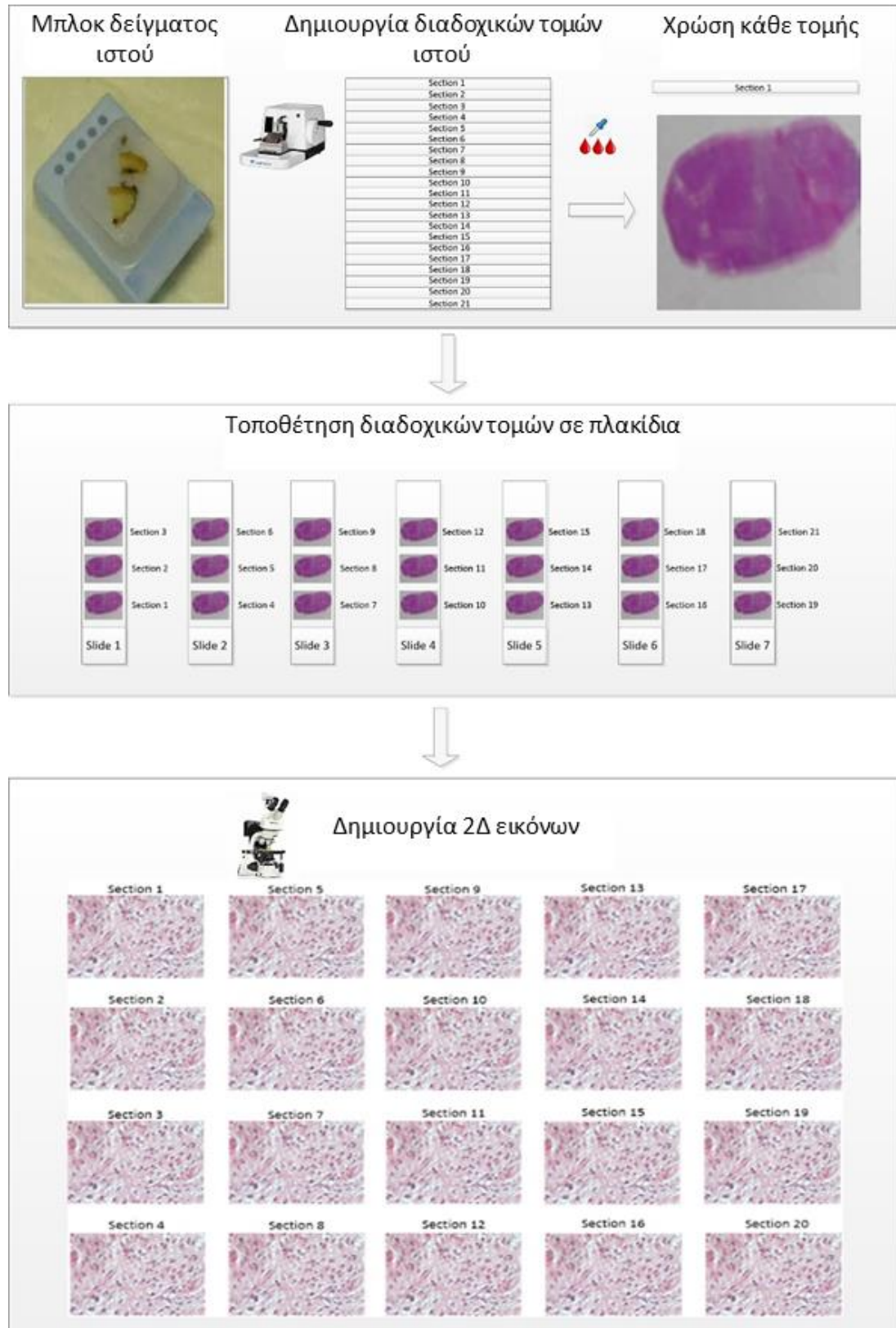
Τέσσερα (4) δείγματα ιστού από το αρχειακό υλικό του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο» χρησιμοποιήθηκαν. Το πρώτο δείγμα ήταν μια καλοήθης βλάβη του μαστού, ένα ινοαδένωμα, το δεύτερο ήταν μια κακοήθης βλάβη του μαστού, ένα μικροθηλώδες αδenoκαρκίνωμα μαστού, το τρίτο ήταν ένα λοβιακό καρκίνωμα *in situ* (LCIS) και το τέταρτο ήταν ένα καρκίνωμα του πόρου *in situ* (DCIS). Με αυτόν τον τρόπο, κατέστη δυνατή η αξιολόγηση της αξίας της προτεινόμενης μεθοδολογίας σε δύο διαφορετικές κατηγορίες παθολογιών, δηλαδή έναν καλοήθη όγκο (ινοαδένωμα) και τους κακοήθεις όγκους (αδenoκαρκίνωμα, LCIS και DCIS).

Η διαδικασία συλλογής δεδομένων και το ερευνητικό πρωτόκολλο γενικότερα εγκρίθηκαν από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Γ.Ν.Α. «Ιπποκράτειο» (Αριθμός Έγκρισης 65/8-11-2021) και την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας Έρευνας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. (Αριθμός έγκρισης 108080/30-11-2021).

Κάθε δείγμα ιστού τοποθετήθηκε σε μικροτόμο για τη δημιουργία διαδοχικών τομών πάχους 2 μm. Κάθε τομή ιστού χρωματίστηκε με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (H&E). Στη συνέχεια, οι τομές ιστού αριθμήθηκαν και τοποθετήθηκαν σε πλακίδια μικροσκοπίου. Ένας ιστοπαθολόγος επιθεώρησε οπτικά το υλικό για τον καθορισμό της περιοχής ενδιαφέροντος. Η περιοχή ενδιαφέροντος σημειώθηκε σε κάθε διαφάνεια μικροσκοπίου. Τέλος, λήφθηκε μία δισδιάστατη εικόνα για την περιοχή ενδιαφέροντος κάθε διαδοχικής τομής ιστού χρησιμοποιώντας ένα ψηφιακό σύστημα απεικόνισης μικροσκοπίας φωτός (LEICA DM 2500) με έγχρωμη κάμερα LEICA DFC 420 C. Η πηγή φωτισμού ήταν μια λάμπα βολφραμίου-αλογόνου 12 V, 10 W. Ψηφιοποιημένες εικόνες λήφθηκαν με ανάλυση 1728 × 1296 pixels (πραγματική διάσταση pixel: 2,78 μm × 2,78 μm) και βάθος χρώματος 24 bits. Ανάλογα με τις ειδικές απαιτήσεις κάθε περίπτωσης, χρησιμοποιήθηκαν αντικειμενικοί φακοί μεγέθυνσης × 50, × 100, × 200 και × 400.

Η Εικόνα 3.1 παρουσιάζει τα βήματα της δημιουργίας των εικόνων τομών κάθε ιστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΙΣΤΟΥ ΣΤΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΩΤΕΙΝΟΥ ΠΕΔΙΟΥ



Εικόνα 3.1. Βήματα δημιουργίας εικόνων τομών ιστού.

Ο Πίνακας 3-1 παρουσιάζει τον αριθμό των πλακιδίων, τον αριθμό των τομών ανά πλακίδιο, τον συνολικό αριθμό διαδοχικών τομών και τη μεγέθυνση για κάθε περίπτωση (Περίπτωση 1: Ινοαδένωμα, Περίπτωση 2: Αδενοκαρκίνωμα, Περίπτωση

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

3: LCIS, Περίπτωση 4: DCIS). Κάθε ξεχωριστή εικόνα αντιστοιχούσε σε διαφορετικό τμήμα ιστού, από την ίδια περιοχή ενδιαφέροντος, το οποίο σημειώθηκε από τον ιστοπαθολόγο σε κάθε διαφορετικό τμήμα ιστού ξεχωριστά.

Πίνακας 3-1. Παράμετροι συλλογής δεδομένων.

	Περιγραφή	Πλήθος πλακιδίων	Πλήθος τομών ανά πλακίδιο	Συνολικό πλήθος τομών (N)	Μεγέθυνση
Περίπτωση 1	Ινοαδένωμα	7	3	21	× 400
Περίπτωση 2	Αδενοκαρκίνωμα	15	2	30	× 50
Περίπτωση 3	LCIS	20	1	20	× 200
Περίπτωση 4	DCIS	10	2	20	× 100

3.3 Μεθοδολογία

Η προτεινόμενη μεθοδολογία για τη δημιουργία του τρισδιάστατου όγκου από τις μεμονωμένες δισδιάστατες εικόνες περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Διόρθωση χρωματικών διακυμάνσεων
- Ευθυγράμμιση
- Επαναδειγματοληψία υψηλής διακριτικής ικανότητας

3.3.1 Διόρθωση χρωματικών διακυμάνσεων

Μετά τη συλλογή των δεδομένων για κάθε περίπτωση, δημιουργήθηκε ένα σύνολο N δισδιάστατων εικόνων S_0, S_1, \dots, S_{N-1} που αντιστοιχούν σε διαδοχικές τομές ιστού ($N = 21$ για η πρώτη περίπτωση, $N = 30$ για τη δεύτερη περίπτωση και $N = 20$ για την τρίτη και τέταρτη περίπτωση). Οι εικόνες από κάθε περίπτωση υποβλήθηκαν σε προεπεξεργασία προκειμένου να μειωθούν οι διακυμάνσεις μεταξύ των χρωμάτων λόγω ανομοιόμορφης χρώσης, συνθηκών φωτισμού μικροσκοπίου, ανομοιόμορφης ευαισθησίας ψηφιακής κάμερας CCD και άλλων λόγων, όπως εξηγείται στην [54]. Η ανομοιόμορφη χρώση μπορεί να προκαλέσει χρωματικές διακυμάνσεις μεταξύ των τμημάτων του ιστού. Συγκεκριμένα, μπορεί να προκύψει ανομοιόμορφη χρώση σε τομές παραφίνης λόγω των ακόλουθων λόγων: (α) ατελής σταθεροποίηση του δείγματος. (β) Ατελής αφαίρεση του κεριού με αποτέλεσμα τα πλακίδια να περιέχουν περιοχές υπολειμματικού κεριού και να δημιουργούνται ανομοιόμορφα χρωματισμένες περιοχές και (γ) υπερβολική θερμότητα κατά τη στέγνωση των ιστών. Μια άλλη πηγή χρωματικής διακύμανσης είναι ο ανομοιόμορφος φωτισμός. Γενικά, αυτό το πρόβλημα δεν εξαρτάται από την κάμερα ή το μικροσκόπιο που χρησιμοποιείται. Παρατηρείται στην πλειονότητα των αισθητήρων απεικόνισης και οδηγεί στη δημιουργία εικόνων που έχουν σημαντικό φωτισμό κοντά στο οπτικό κέντρο και ανεπαρκή φωτισμό στα όρια. Αυτό το αποτέλεσμα είναι πιο εμφανές κατά τη δημιουργία εικόνων ολόκληρων πλακιδίων (whole-slide imaging). Για την αντιμετώπιση της πιθανής χρωματικής ανομοιομορφίας μεταξύ των μεμονωμένων εικόνων εφαρμόστηκε η τεχνική αντιστοίχισης ιστογράμματος [55], προκειμένου να

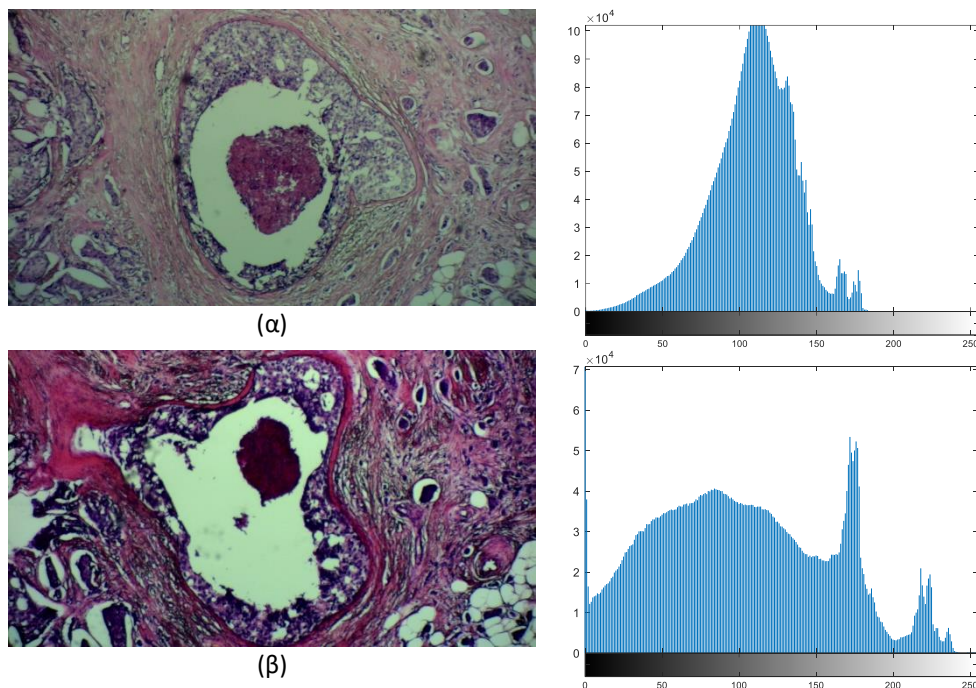
ταιριάζει το ιστόγραμμα κάθε εικόνας S_i ($i = 1, 2, \dots, N - 1$) στο ιστόγραμμα της πρώτης εικόνας S_0 . Καθώς πρόκειται για έγχρωμες εικόνες, η τεχνική εφαρμόστηκε σε κάθε κανάλι χρώματος (κόκκινο, πράσινο, μπλε) ανεξάρτητα (Εικόνα 1.2). Συγκεκριμένα, έστω $H_f(k)$ είναι το ιστόγραμμα μίας εικόνας εισόδου το οποίο θέλουμε να ταιριάξουμε με το ιστόγραμμα $H_r(k)$ μίας άλλης εικόνας αναφοράς ($k = 0, 1, 2, \dots, 255$). Διαιρώντας τις τιμές κάθε ιστογράμματος με το πλήθος των ρixelς της αντίστοιχης εικόνας προκύπτει η πιθανότητα εμφάνισης $p_f(k)$ και $p_r(k)$ της τιμής k σε κάθε εικόνα. Για κάθε εικόνα, υπολογίζεται η αθροιστική συνάρτηση κατανομής ως ακολούθως:

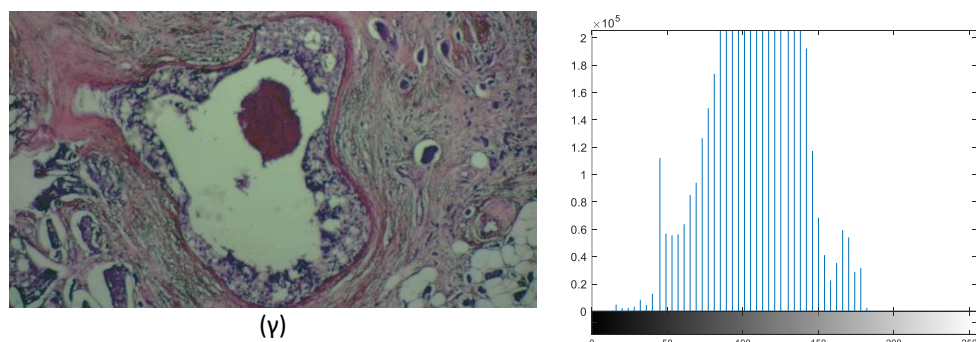
$$cdf_f(k) = 255 \sum_{j=0}^k p_f(k) \quad (3.1)$$

$$cdf_r(k) = 255 \sum_{j=0}^k p_r(k) \quad (3.2)$$

Για κάθε τιμή k ($k = 0, 1, 2, \dots, 255$) βρίσκεται η τιμή l έτσι ώστε η διαφορά $|cdf_f(k) - cdf_r(l)|$ να είναι ελάχιστη. Δημιουργείται μία νέα εικόνα στην οποία τα ρixelς που είχαν την τιμή k στην εικόνα εισόδου λαμβάνουν την τιμή l στη νέα εικόνα.

Η Εικόνα 3.2 παρουσιάζει παράδειγμα εφαρμογής της εν λόγω μεθόδου σε δύο εικόνες από την περίπτωση 3 (αδενοκαρκίνωμα).





Εικόνα 3.2. Παράδειγμα μείωσης των χρωματικών διακυμάνσεων μεταξύ εικόνων ιστού. Περίπτωση αδενοκαρκινώματος με μεγέθυνση $\times 50$. (α) Εικόνα (από την περίπτωση 3) της οποίας το ιστόγραμμα είναι το ιστόγραμμα αναφοράς. (β) Εικόνα της οποίας το ιστόγραμμα θα αντιστοιχιστεί με το ιστόγραμμα αναφοράς. (γ) Εικόνα μετά από αντιστοίχιση ιστογράμματος. Στη δεξιά στήλη φαίνονται τα αντίστοιχα ιστογράμματα (κάθε εικόνα μετατράπηκε σε εικόνα κλίμακας του γκριζου για τον υπολογισμό του ιστογράμματος).

3.3.2 Ευθυγράμμιση

Μετά τη διόρθωση των χρωματικών διακυμάνσεων, το επόμενο βήμα είναι να διορθωθούν τυχόν γεωμετρικές αποκλίσεις (μετατοπίσεις ή περιστροφές) μεταξύ των εικόνων ενός ιστού. Για τον σκοπό αυτόν, πραγματοποιήθηκαν ευθυγραμμίσεις μεταξύ των εικόνων που προέκυψαν από το προηγούμενο βήμα, αφού πρώτα έγινε η μετατροπή τους σε εικόνες κλίμακας του γκριζου. Η ευθυγράμμιση περιλαμβάνει δύο εικόνες: η μία εικόνα ονομάζεται εικόνα αναφοράς και η άλλη εικόνα ονομάζεται κινούμενη εικόνα. Στόχος είναι ο γεωμετρικός μετασχηματισμός της κινούμενης εικόνας ώστε να ευθυγραμμίζεται χωρικά με την εικόνα αναφοράς, δηλαδή οι αντίστοιχες δομές στις δύο εικόνες να είναι στις ίδιες θέσεις. Για την επίτευξη της ευθυγράμμισης, απαιτείται να ορισθεί:

- Ο τύπος του γεωμετρικού μετασχηματισμού
- Ένα κριτήριο ομοιότητας μεταξύ δύο εικόνων
- Μια μέθοδος βελτιστοποίησης

Κατά την ευθυγράμμιση, βελτιστοποιείται το μέτρο ομοιότητας μεταξύ της εικόνας αναφοράς και της μετασχηματισμένης κινούμενης εικόνας σε σχέση με τις παραμέτρους του μετασχηματισμού. Συγκεκριμένα, έστω $CM(I_f, I_m)$ είναι μία πραγματική συνάρτηση που δίνει ένα κριτήριο ομοιότητας μεταξύ δύο εικόνων I_f and I_m . Επιπλέον, έστω $T(I_m; a_1, a_2, \dots, a_n)$ υποδηλώνει μια συνάρτηση που παράγει μια εικόνα η οποία είναι η γεωμετρικά μετασχηματισμένη εκδοχή της εικόνας I_m με παραμέτρους μετασχηματισμού a_1, a_2, \dots, a_n , όπου n είναι το πλήθος των παραμέτρων του μετασχηματισμού. Κατά την ευθυγράμμιση, γίνεται εύρεση των τιμών των παραμέτρων μετασχηματισμού που βελτιστοποιούν τη συνάρτηση $CM(I_f, T(I_m; a_1, a_2, \dots, a_n))$.

όπου I_f είναι η εικόνα αναφοράς και I_m είναι η κινούμενη εικόνα.

3.3.2.1 Γεωμετρικός μετασχηματισμός

Ένας από τους πιο γνωστούς γεωμετρικούς μετασχηματισμούς είναι ο μετασχηματισμός τύπου affine [56]. Ένας μετασχηματισμός τύπου affine διατηρεί παραλληλία μεταξύ γραμμών και τις αναλογίες των αποστάσεων. Είναι ένας συνδυασμός μετατόπισης, περιστροφής, κλιμάκωσης (μεγέθυνσης/σμίκρυνσης) και διάτμησης²². Στις δύο διαστάσεις δίνεται από τις ακόλουθες σχέσεις:

$$\begin{aligned}x' &= a_1x + a_2y + a_3 \\y' &= a_4x + a_5y + a_6\end{aligned}\tag{3.3}$$

όπου (x, y) είναι οι συντεταγμένες ενός σημείου στις δύο διαστάσεις και (x', y') είναι οι συντεταγμένες του σημείου μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμού. Οι παράμετροι a_1, a_2, a_4, a_5 καθορίζουν την περιστροφή, την κλιμάκωση και τη διάτμηση, ενώ οι παράμετροι a_3, a_6 καθορίζουν την μετατόπιση.

3.3.2.2 Κριτήριο ομοιότητας

Ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα κριτήρια ομοιότητας μεταξύ δύο εικόνων κλίμακας του γκρίζου I_f and I_m διαστάσεων $P \times Q$ (P γραμμές και Q στήλες) είναι η αμοιβαία πληροφορία [57], η οποία ορίζεται από την ακόλουθη σχέση:

$$MI(I_f, I_m) = \sum_{k=0}^{255} \sum_{l=0}^{255} p_{fm}(k, l) \ln \left(\frac{p_{fm}(k, l)}{p_f(k)p_m(l)} \right)\tag{3.4}$$

όπου:

$$p_{fm}(k, l) = \frac{H_{fm}(k, l)}{P \times Q}\tag{3.5}$$

$$p_f(k) = \sum_{l=0}^{255} p_{fm}(k, l)\tag{3.6}$$

$$p_m(l) = \sum_{k=0}^{255} p_{fm}(k, l)\tag{3.7}$$

και $H_{fm}(k, l)$ συμβολίζει το από κοινού ιστόγραμμα των δύο εικόνων και παρέχει το πλήθος των pixels που έχουν την τιμή k στην εικόνα I_f και την τιμή l στην εικόνα I_m . Η αμοιβαία πληροφορία μπορεί να ερμηνευτεί ως η απόσταση μεταξύ της από κοινού κατανομής $p_{fm}(k, l)$ των δύο εικόνων και της από κοινού κατανομής $p_f(k)p_m(l)$ στην περίπτωση που οι δύο εικόνες είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Στην

²² Μετατόπιση σημείων προς μία συγκεκριμένη κατεύθυνση σε σχέση με μια γραμμή ή ένα επίπεδο αναφοράς.

περίπτωση που οι δύο εικόνες είναι διαφορετικές (ανεξάρτητες) μεταξύ τους, τότε $p_{fm}(k, l) = p_f(k)p_m(l)$ και η αμοιβαία πληροφορία είναι μηδέν. Όσο πιο σχετικές είναι οι εικόνες (δηλ. όσο πιο ευθυγραμμισμένες είναι οι εικόνες) τόσο πιο μεγάλη είναι η τιμή της αμοιβαίας πληροφορίας και όταν οι εικόνες είναι πλήρως ευθυγραμμισμένες λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της. Το βασικό πλεονέκτημα της αμοιβαίας πληροφορίας είναι ότι δεν προϋποθέτει κάποια σχέση μεταξύ των προς ευθυγράμμιση εικόνων (για παράδειγμα να είναι από το ίδιο απεικονιστικό σύστημα ή να υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ των τιμών τους), αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ευθυγράμμιση εικόνων από διαφορετικά απεικονιστικά συστήματα (π.χ. από αξονικό και μαγνητικό τομογράφο) ή εικόνων που έχουν γενικά μη γραμμική σχέση μεταξύ των τιμών τους.

3.3.2.3 Βελτιστοποίηση

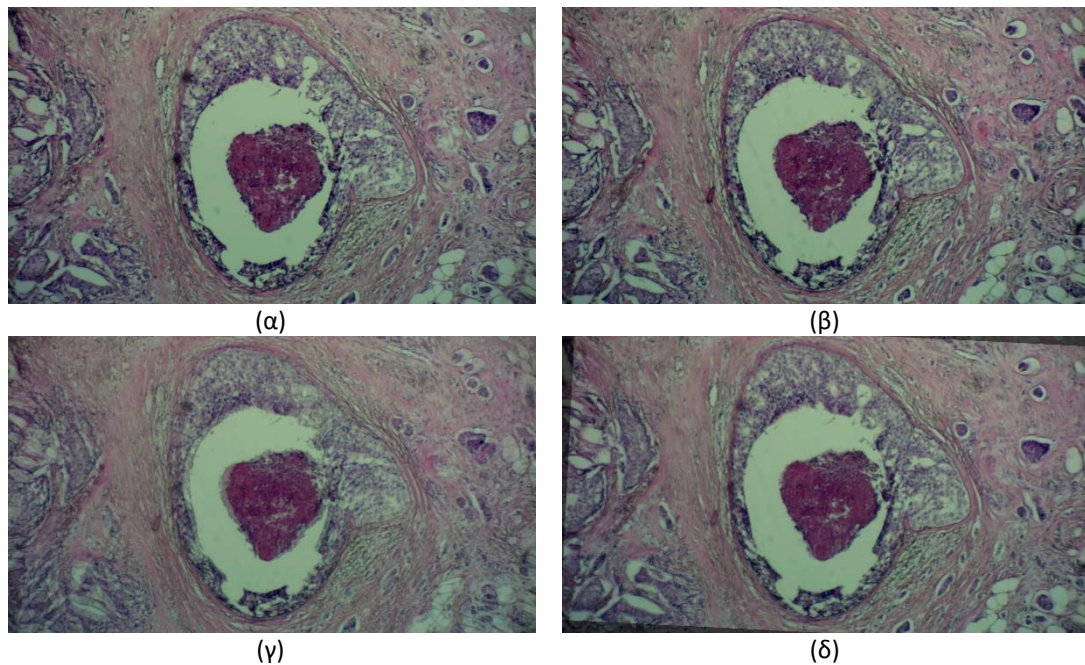
Όπως αναφέρθηκε, η ευθυγράμμιση απαιτεί τη χρήση κάποιας μεθόδου βελτιστοποίησης, δηλαδή μίας τεχνικής που βρίσκει το ολικό ακρότατο σημείο (σημείο ελαχίστου ή μεγίστου) μίας συνάρτησης (κριτήριο ομοιότητας) πολλών μεταβλητών (παράμετροι μετασχηματισμού). Στην περίπτωση του συντελεστή αμοιβαίας πληροφορίας επιθυμούμε να βρούμε το σημείο ολικού μεγίστου. Συνήθως, οι συναρτήσεις που χρησιμοποιούνται ως κριτήριο ομοιότητας στη διαδικασία της ευθυγράμμισης παρουσιάζουν εκτός από τα ολικά ακρότατα και τοπικά ακρότατα. Για αυτό και οι μέθοδοι βελτιστοποίησης που χρησιμοποιούνται χαρακτηρίζονται ως μέθοδοι τοπικής ή ολικής βελτιστοποίησης. Οι μέθοδοι τοπικής βελτιστοποίησης ξεκινούν από ένα αρχικό σημείο (το οποίο μπορεί έχει επιλεγεί τυχαία ή κάνοντας μία διαδικασία προ-ευθυγράμμισης) και βρίσκουν με επαναληπτικό τρόπο κάθε φορά ένα νέο σημείο (κοντά στο προηγούμενο αποδεκτό σημείο), το οποίο οδηγεί στο πλησιέστερο σημείο ακροτάτου. Αν το αρχικό σημείο είναι κοντά στο σημείο ολικού ακροτάτου τότε θα συγκλίνουν σε αυτό, διαφορετικά θα συγκλίνουν σε τοπικό ακρότατο. Το πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι ότι είναι υπολογιστικά αποδοτικές και συγκλίνουν γρήγορα στην τελική λύση. Είναι κατάλληλες για ομαλές (κυρτές) συναρτήσεις που έχουν ένα μοναδικό ακρότατο ή λίγα τοπικά ακρότατα. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων είναι η μέθοδος Simplex, η μέθοδος του Powell, μέθοδος των συζυγών κλίσεων κ.α. [58]. Στην περίπτωση μη κυρτών συναρτήσεων ή συναρτήσεων με αρκετά τοπικά ακρότατα, προτιμάται η χρήση κάποιας μεθόδου ολικής βελτιστοποίησης. Συνήθως, αυτές οι μέθοδοι ξεκινούν από πολλά αρχικά σημεία και δοκιμάζονται επαναληπτικά διάφορα σημεία με την ελπίδα θα οδηγήσουν στο ολικό ακρότατο. Με άλλα λόγια, μία μέθοδος τοπικής βελτιστοποίησης «κινείται» προς μία κατεύθυνση, ενώ μία μέθοδος ολικής βελτιστοποίησης κινείται προς πολλαπλές κατευθύνσεις. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ολικής βελτιστοποίησης, όπως: εξελικτικοί αλγόριθμοι (evolutionary algorithms) [59], προσομοίωση απόψησης (simulated annealing) [58], διαφορική εξέλιξη (differential evolution) [60], βελτιστοποίηση σμήνους σωματιδίων (swarm particle optimization) [61], μεταερευτικοί αλγόριθμοι (metaheuristic algorithms) [62]. Οι μέθοδοι ολικής βελτιστοποίησης απαιτούν γενικά περισσότερους

υπολογιστικούς πόρους και χρόνο σε σύγκριση με τις μεθόδους τοπικής βελτιστοποίησης.

Η προτεινόμενη μέθοδος χρησιμοποιεί τον εξελικτικό αλγόριθμο (1+1) [63]. Είναι ένας απλός αλλά αποτελεσματικός αλγόριθμος ολικής βελτιστοποίησης που εφαρμόζει εξελικτικές αρχές. Ο αλγόριθμος ξεκινάει από ένα αρχικό σημείο (το οποίο επιλέγεται τυχαία) που θεωρείται ως «γονέας». Κάθε επανάληψη αποτελείται από τα ακόλουθα βήματα:

- **Μετάλλαξη:** Ο «γονέας» «μεταλλάσσεται» για να δημιουργήσει ένα νέο σημείο, που ονομάζεται «απόγονος». Η «μετάλλαξη» περιλαμβάνει την τροποποίηση των τιμών του «γονέα» με την προσθήκη ενός μικρού τυχαίου διανύσματος που λαμβάνεται ως δείγμα από μια προκαθορισμένη κατανομή.
- **Αξιολόγηση:** Υπολογίζεται η τιμή της συνάρτησης στο νέο σημείο («απόγονος»).
- **Επιλογή:** Η τιμή της συνάρτησης συγκρίνεται με αυτή που αντιστοιχεί στον «γονέα». Εάν ο «απόγονος» δίνει καλύτερη τιμή της συνάρτησης, τότε αντικαθιστά τον «γονέα». Διαφορετικά, ο «γονέας» παραμένει αμετάβλητος.
- **Προσαρμογή:** Οι παράμετροι της κατανομής που χρησιμοποιείται στην μετάλλαξη μπορούν να προσαρμοστούν ανάλογα με το εάν ο «απόγονος» οδηγεί ή όχι σε καλύτερη τιμή συνάρτησης σε σχέση με τον «γονέα».
- **Τερματισμός:** Οι επαναλήψεις συνεχίζονται μέχρι να ικανοποιηθεί ένα κριτήριο τερματισμού, όπως η επίτευξη ενός μέγιστου αριθμού επαναλήψεων ή η επίτευξη της επιθυμητής ποιότητας λύσης.

Έστω I_0, I_1, \dots, I_{N-1} ($I_0 = S_0$) είναι οι εικόνες (κλίμακας του γκρίζου) που προέκυψαν από το προηγούμενο βήμα. Κάθε εικόνα I_i ευθυγραμμίζεται με τη μετασχηματισμένη έκδοση της προηγούμενης εικόνας I_{i-1} ($i = 2, 3, \dots, N - 1$). Η εικόνα I_1 ευθυγραμμίζεται με την εικόνα I_0 . Έτσι, δημιουργείται ένα νέο σύνολο εικόνων $\{J_0, J_1, \dots, J_{N-1}\}$, όπου J_i είναι η μετασχηματισμένη έκδοση της εικόνας I_i ($i = 1, 2, \dots, N - 1$) και $J_0 = I_0$. Η ευθυγράμμιση περιλαμβάνει τη μεγιστοποίηση της αμοιβαίας πληροφορίας σε σχέση με τις παραμέτρους ενός 2-D μετασχηματισμού τύπου affine, μέσω της μεθόδου βελτιστοποίησης (1+1). Για τον υπολογισμό της αμοιβαίας πληροφορίας χρησιμοποιήθηκαν ιστογράμματα των 50 bins. Τα ιστογράμματα υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας 500 pixels από τις εικόνες. Η επιλογή αυτών των παραμέτρων έγινε με βάση με το σκεπτικό να μειωθεί ο υπολογιστικός φόρτος χωρίς να μειωθεί η ακρίβεια. Το αποτέλεσμα κάθε ευθυγράμμισης αξιολογήθηκε οπτικά. Σε περίπτωση αποτυχίας εγγραφής, οι εικόνες ευθυγραμμίστηκαν χειροκίνητα. Η Εικόνα 3.3 παρουσιάζει ένα παράδειγμα εφαρμογής της προαναφερθείσας μεθόδου ευθυγράμμισης. Η Εικόνα 3.3(α) παρουσιάζει την εικόνα αναφοράς και η Εικόνα 3.3(β) παρουσιάζει την κινούμενη εικόνα. Η Εικόνα 3.3(γ) παρουσιάζει τη σύνθεση των δύο εικόνων όπου φαίνεται η έλλειψη ευθυγράμμισης. Η Εικόνα 3.3(δ) παρουσιάζει τη σύνθεση της εικόνας αναφοράς και της μετασχηματισμένης κινούμενης εικόνας, όπου παρατηρείται διόρθωση των γεωμετρικών αποκλίσεων.



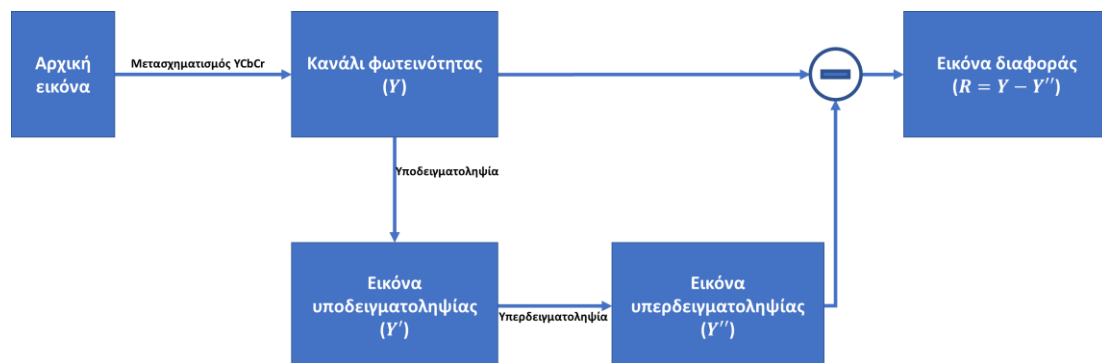
Εικόνα 3.3. Διαδικασία ευθυγράμμισης. Περίπτωση αδενοκαρκινώματος με μεγέθυνση $\times 50$. (α) Εικόνα αναφοράς. (β) Εικόνα προς ευθυγράμμιση. (γ) Σύντηξη των δύο εικόνων με χρήση άλφα ανάμειξης πριν από την ευθυγράμμιση. (δ) Σύντηξη των δύο εικόνων με χρήση άλφα ανάμειξης μετά την ευθυγράμμιση.

3.3.3 Επαναδειγματοληψία υψηλής διακριτικής ικανότητας

Υποθέτοντας ότι οι γραμμές και οι στήλες κάθε εικόνας J_i ($i = 0, 1, 2, \dots, N - 1$) έχουν αντιστοιχιστεί στην κατεύθυνση y και x αντίστοιχα (δηλαδή xy επίπεδο), δημιουργήθηκαν νέες εικόνες που αντιστοιχούν στα επίπεδα xz και yz . Η κατεύθυνση z εκχωρήθηκε στην κατεύθυνση της στοίβας εικόνων. Αυτές οι νέες εικόνες επέτρεψαν την οπτικοποίηση των εικόνων σε άλλα επίπεδα. Σε κάθε περίπτωση, η κατεύθυνση z αντιστοιχούσε στις γραμμές των εικόνων που δημιουργήθηκαν. Αυτές οι εικόνες είχαν χαμηλή ανάλυση, καθώς ο αριθμός των γραμμών ήταν σημαντικά μικρότερος από τον αριθμό των στηλών (π.χ. 21×1920 ή 30×1920). Επομένως, ήταν υποχρεωτική η δημιουργία εικόνων με υψηλότερη ανάλυση (περισσότερες γραμμές), δηλαδή η αύξηση του αριθμού των γραμμών. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν εικόνες υπερ-υψηλής διακριτικής ικανότητας με χρήση βαθιάς μάθησης [64]. Συγκεκριμένα, ένα συνελκτικό νευρωνικό δίκτυο (CNN) [65] κατασκευάστηκε για να απεικονίσει εικόνες χαμηλής ανάλυσης σε εικόνες υψηλής ανάλυσης, χρησιμοποιώντας μια στρατηγική υπολειπόμενης μάθησης (residual learning)²³.

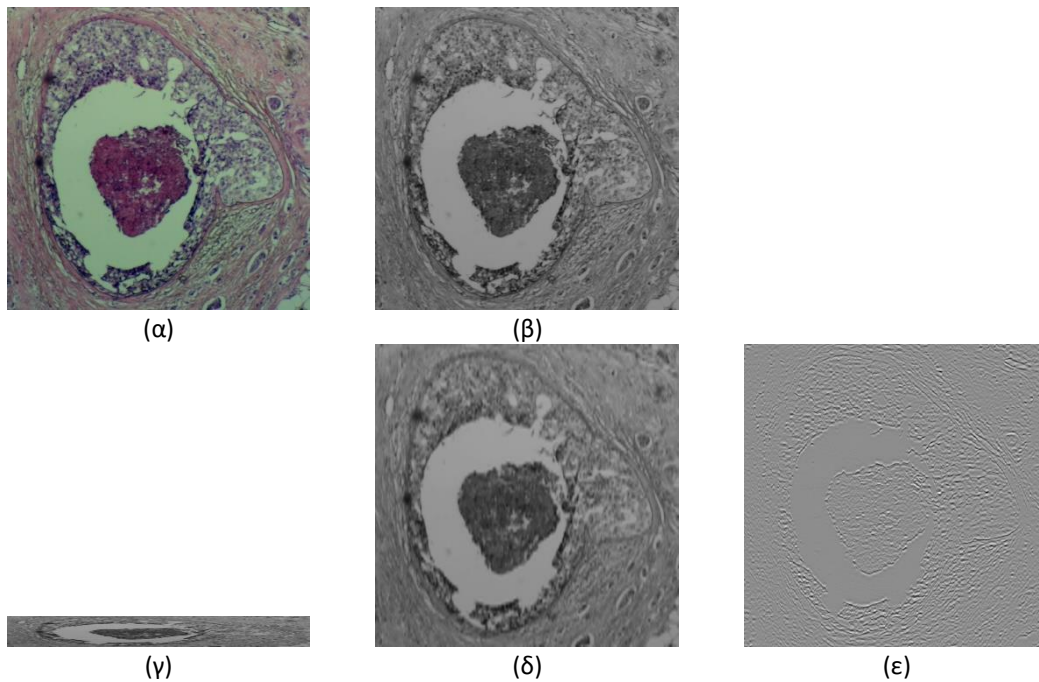
²³ Η υπολειμματική μάθηση, επίσης γνωστή ως υπολειμματικά δίκτυα ή ResNets, είναι μια αρχιτεκτονική βαθιάς μάθησης που παρουσιάστηκε από τους Kaiming He, et al. στην εργασία τους το 2015 με τίτλο "Deep Residual Learning for Image Recognition". Τα υπολειμματικά δίκτυα αποτελούν σημαντική πρόοδο στον τομέα των βαθιών νευρωνικών δικτύων συνελκτικής μάθησης (CNN) και έχουν υιοθετηθεί ευρέως για διάφορες εργασίες όρασης υπολογιστών, όπως η ταξινόμηση εικόνων, η ανίχνευση αντικειμένων και η κατάτμηση εικόνων.

Όπως είναι γνωστό, κατά την επαναδειγματοληψία με μια τυπική μέθοδο (π.χ. κυβική παρεμβολή), η παραγόμενη εικόνα πάσχει από θόλωση, καθώς οι λεπτομέρειες υψηλής συχνότητας καταστέλλονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Το CNN είναι σε θέση να εκτιμήσει αυτές τις λεπτομέρειες υψηλής συχνότητας. Οι λεπτομέρειες προστίθενται στην εικόνα που δημιουργείται χρησιμοποιώντας μια τυπική μέθοδο επαναδειγματοληψίας, με αποτέλεσμα μια πιο ευκρινή εικόνα. Υποθέτοντας ότι είναι διαθέσιμο ένα σύνολο εικόνων RGB υψηλής ανάλυσης με διαστάσεις $M \times N$, η κατασκευή του CNN έχει ως εξής: κάθε εικόνα RGB μετατρέπεται στον χρωματικό χώρο YCbCr (φωτεινότητα (Y), μπλε χρωματισμός (Cb) και κόκκινος χρωματισμός (Cr)). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ανθρώπινη όραση επηρεάζεται περισσότερο από αλλαγές στη φωτεινότητα παρά από αλλαγές στο χρώμα, το κανάλι φωτεινότητας (Y) χρησιμοποιείται για να σχηματίσει το σύνολο εκπαίδευσης για το CNN. Συγκεκριμένα, κάθε στήλη του καναλιού Y υποδειγματοληπτείται σύμφωνα με τον επιθυμητό συντελεστή κλίμακας χρησιμοποιώντας μια τυπική μέθοδο επαναδειγματοληψίας (κυβική παρεμβολή). Έτσι, η εικόνα που προκύπτει (Y') έχει διαστάσεις $\frac{M}{s} \times N$ (s υποδηλώνει τον παράγοντα κλίμακας). Στη συνέχεια, κάθε στήλη του Y' επαναδειγματοληπτείται στην αρχική διάσταση σχηματίζοντας ξανά μια εικόνα (Y'') με $M \times N$ εικονοστοιχεία. Υπολογίζεται η διαφορά μεταξύ των εικόνων Y και Y'' , σχηματίζοντας μια εικόνα διαφοράς ($R = Y - Y''$). Η εικόνα διαφοράς περιέχει τις λεπτομέρειες υψηλής συχνότητας που χάθηκαν από την αρχική εικόνα Y κατά την επαναδειγματοληψία. Η Εικόνα 3.4 δείχνει τη διαδικασία δημιουργίας της εικόνας διαφοράς, ενώ η Εικόνα 3.5 παρουσιάζει ένα παράδειγμα της δημιουργίας μιας εικόνας διαφοράς από μια εικόνα μικροσκοπίου.



Εικόνα 3.4. Μπλοκ διάγραμμα της διαδικασίας για τη δημιουργία της εικόνας διαφοράς.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ



Εικόνα 3.5. Παράδειγμα δημιουργίας εικόνας διαφοράς. Περίπτωση αδενοκαρκινώματος (1080×1080) με μεγέθυνση $\times 50$. (α) Αρχική εικόνα RGB. (β) Εικόνα καναλιού φωτεινότητας (Y) (1080×1080). (γ) Υποδειγματοληψία εικόνας (Y') κατά 10 με χρήση κυβικής παρεμβολής (108×1080). (δ) Υπερδειγματοληψία εικόνας (Y'') κατά 10 χρησιμοποιώντας κυβική παρεμβολή (1080×1080). (ε) Εικόνα διαφοράς ($R = Y - Y''$) (1080×1080).

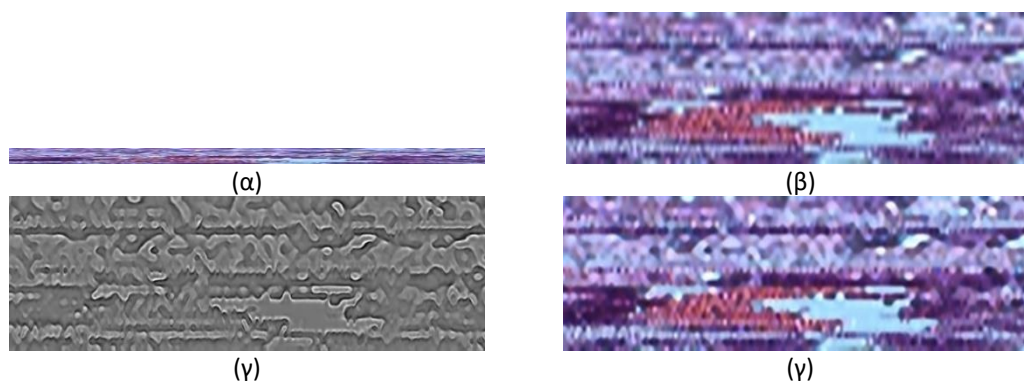
Το CNN εκπαιδεύτηκε χρησιμοποιώντας ως εισόδους περιοχές από την εικόνα Y'' και ως επιθυμητές εξόδους τις αντίστοιχες περιοχές από την εικόνα R . Εικόνες από την βάση δεδομένων IAPR TC-12 Benchmark [66] χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση του CNN. Η βάση δεδομένων περιέχει 20.000 εικόνες. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί συντελεστές δειγματοληψίας (5, 10 και 20) προκειμένου να υπάρχει η δυνατότητα επαναδειγματοληψίας με διαφορετικούς συντελεστές, εάν είναι απαραίτητο. Επιλέχθηκαν τυχαία 64 περιοχές (μεγέθους 41×41) από κάθε εικόνα. Με τυχαίο τρόπο επιλέχθηκε αν μία περιοχή θα περιστραφεί ή όχι κατά 90 μοίρες. Επίσης, με τυχαίο τρόπο επιλέχθηκε αν θα γίνει ή όχι οριζόντιος καθρεπτισμός μίας περιοχής. Η αρχιτεκτονική του CNN περιέχει 20 συνελκτικά επίπεδα συνολικά:

- Ένα επίπεδο εισαγωγής εικόνας που λειτουργεί στις περιοχές της εικόνας
- Δεκαοκτώ (18) δισδιάστατα επίπεδα συνέλιξης. Κάθε επίπεδο περιέχει 64 φίλτρα μεγέθους 3×3 και ακολουθείται από ένα επίπεδο Rectified Linear Unit (ReLU) προκειμένου να εισαχθεί μη γραμμικότητα στο δίκτυο
- Ένα επίπεδο εξόδου παλινδρόμησης για ένα νευρωνικό δίκτυο

Το δίκτυο εκπαιδεύτηκε χρησιμοποιώντας τη στοχαστική κάθοδος βαθμίδας (stochastic gradient descent)²⁴ με βελτιστοποίηση ορμής (momentum optimization)²⁵ [67] για 100 εποχές με συνολικό αριθμό 61.600 επαναλήψεων. Ο ρυθμός μάθησης ορίστηκε αρχικά στο 0,1 και μειώθηκε κατά παράγοντα 10 κάθε 10 εποχές.

Μόλις το δίκτυο εκπαιδεύτηκε, έγινε δεκαπλασιασμός του αριθμού των γραμμών των εικόνων που αντιστοιχούν στα επίπεδα xz και yz . Συγκεκριμένα, κάθε εικόνα αναλύθηκε στον χρωματικό χώρο $YCbCr$. Σε κάθε εικόνα καναλιού (Y, Cb, Cr) αυξήθηκε κατά 10 ο αριθμός των γραμμών, χρησιμοποιώντας κυβική παρεμβολή. Η νέα εικόνα Y τροφοδοτήθηκε ως είσοδος στο CNN. Η έξοδος του CNN ήταν η εικόνα διαφοράς, η οποία προστέθηκε στην εικόνα Y . Η νέα εικόνα Y μαζί με τις νέες εικόνες Cb και Cr συνδυάστηκαν για να σχηματίσουν την τελική εικόνα.

Η εκπαίδευση του δικτύου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το MATLAB® R2021a και διήρκεσε περίπου 5 ώρες σε έναν σταθμό εργασίας με CPU AMD® Ryzen 5 2600, 16 GB RAM και GPU NVIDIA® με δυνατότητα CUDA (GeForce GTX 1660). Το Σχήμα 10 παρουσιάζει ένα παράδειγμα της μεθόδου επαναδειγματοληψίας. Η Εικόνα 3.6(α) δείχνει ένα τμήμα μιας δισδιάστατης εικόνας επιπέδου xz . Η Εικόνα 3.6(β), Εικόνα 3.6(γ) και Εικόνα 3.6(δ) δείχνουν την εικόνα που λήφθηκε μετά από κυβική παρεμβολή, την εικόνα διαφοράς και την εικόνα από το CNN, αντίστοιχα. Ο συντελεστής επαναδειγματοληψίας ήταν 10. Όπως φαίνεται, η εικόνα από το CNN είναι πιο ευκρινής από την εικόνα από την κυβική παρεμβολή.



Εικόνα 3.6. Μέθοδος επαναδειγματοληψίας. Περίπτωση αδενοκαρκινώματος (1920×1080) με μεγέθυνση $\times 50$. (α) Περιοχή ενδιαφέροντος από δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz . (β) Επαναδειγματοληψία κατά 10 χρησιμοποιώντας κυβική παρεμβολή (743×236). (γ) Εικόνα διαφοράς (743×236). (δ) Επαναδειγματοληψία κατά 10 χρησιμοποιώντας συνελκτικό νευρωνικό δίκτυο (743×236).

²⁴ Η στοχαστική κάθοδος κλίσης (ΣΚΚ) είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος αλγόριθμος βελτιστοποίησης στη μηχανική μάθηση. Πρόκειται για μια παραλλαγή του κλασικού αλγορίθμου βελτιστοποίησης καθόδου κλίσης. Το "στοχαστικό" στον ΣΚΚ αναφέρεται στην τυχαία δειγματοληψία παραδειγμάτων εκπαίδευσης για τον υπολογισμό των ενημερώσεων βαθμίδας.

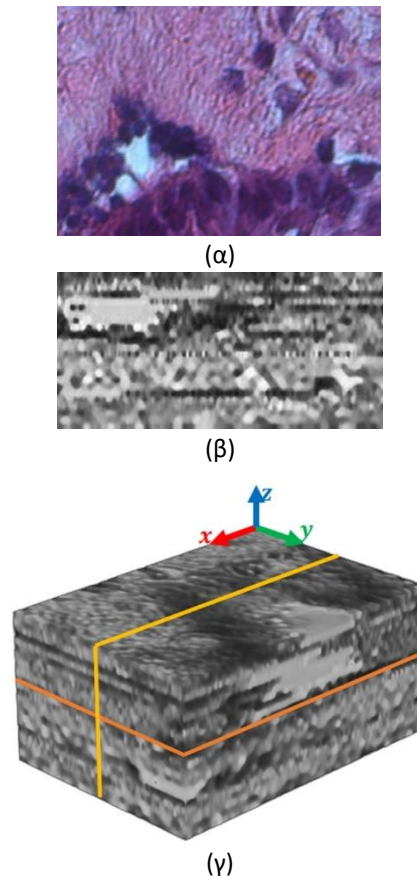
²⁵ Η βελτιστοποίηση ορμής είναι μια βελτίωση του ΣΚΚ. Η βασική ιδέα πίσω από τη βελτιστοποίηση ορμής είναι η εισαγωγή της έννοιας της "ορμής" ή της "ταχύτητας" στην ενημέρωση των παραμέτρων του μοντέλου. Αυτός ο όρος "ορμής" επιτρέπει στον αλγόριθμο βελτιστοποίησης να συσσωρεύει ταχύτητα προς την κατεύθυνση των προηγούμενων κλίσεων και να αποσβένει τις ταλαντώσεις, οδηγώντας σε ταχύτερη και σταθερότερη σύγκλιση.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

Οι δισδιάστατες εικόνες στα επίπεδα xz και yz επιθεωρήθηκαν οπτικά από τον ιστοπαθολόγο για να εκτιμηθεί εάν η δημιουργία του τρισδιάστατου όγκου θα μπορούσε να αποκαλύψει πληροφορίες που κατά τα άλλα δεν ήταν ανιχνεύσιμες στις συμβατικές δισδιάστατες εικόνες.

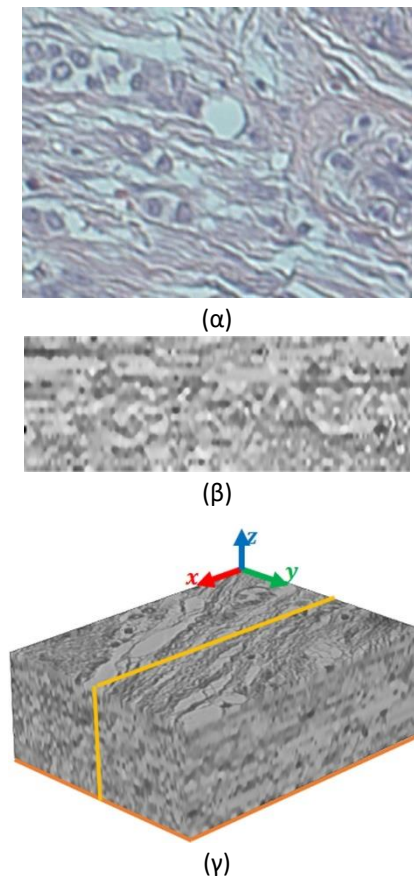
3.4 Αποτελέσματα

Η Εικόνα 3.7 απεικονίζει μια περίπτωση ινοαδενώματος. Η δομή που αποτελείται από τον αυλό περιλαμβάνει το πορογενές τμήμα του ινοαδενώματος. Το υπόλοιπο είναι το ινώδες τμήμα.



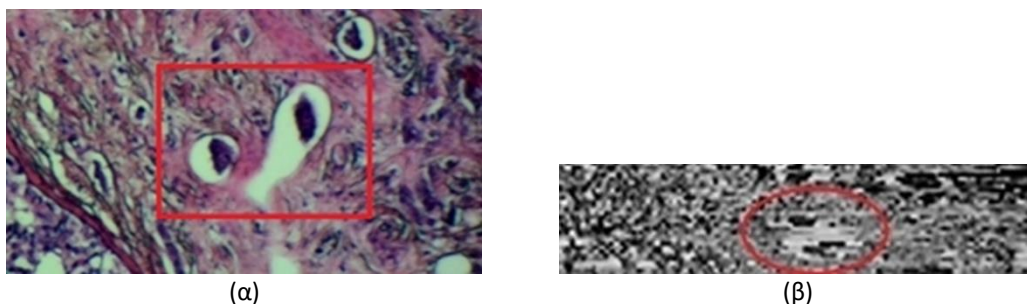
Εικόνα 3.7. Περιοχή ενδιαφέροντος από περίπτωση ινοαδενώματος μαστού (505×357) με μεγέθυνση $\times 400$. (α) Τυπική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy (χρώση H&E) (άνω διατομή όγκου στο (γ)). (β) Ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (μπροστινή διατομή όγκου στο (γ)) (508×242). (γ) Δείγμα όγκου ανακατασκευασμένου ιστού.

Η Εικόνα 3.8 απεικονίζει μια περίπτωση LCIS. Τα νεοπλασματικά κύτταρα βρίσκονται σε μικροαθροίσεις των 4-6 πυρήνων. Η υπόλοιπη περιοχή περιλαμβάνει δεσμοπλαστικό στρώμα του όγκου.



Εικόνα 3.8. Περιοχή ενδιαφέροντος από λοβιακό καρκίνωμα *in situ* με μεγέθυνση $\times 200$. (α) Τυπική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy (χρώση H&E) (άνω διατομή όγκου στο (γ)). (β) Ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (μπροστινή διατομή τόμου στο (γ)). (γ) Δείγμα όγκου ανακατασκευασμένου ιστού.

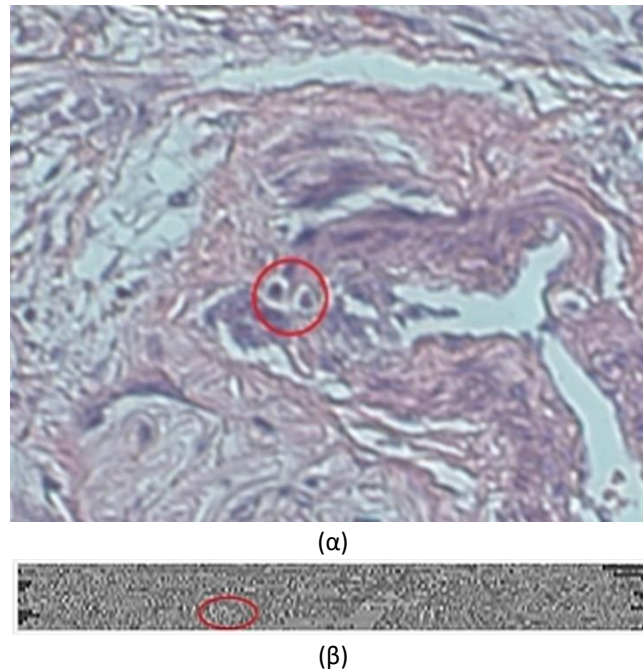
Η Εικόνα 3.9 απεικονίζει τις δισδιάστατες εικόνες στο επίπεδο xy και xz της περιοχής ενδιαφέροντος που καθορίστηκε από τον ιστοπαθολόγο για το πορογενές αδενοκαρκίνωμα μαστού. Το ορθογώνιο στην εικόνα xy (Εικόνα 3.9(α)) απεικονίζει δύο αγγειακά έμβολα, τα οποία φαίνεται να αποτελούν έναν ενιαίο αγγειακό αυλό στην εικόνα xz (Εικόνα 3.9(β)).



Εικόνα 3.9. Περιοχή ενδιαφέροντος από περίπτωση αδενοκαρκινώματος με μεγέθυνση $\times 50$. (α) Συμβατική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy (αριστερά). (β) Ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz της περιοχής ενδιαφέροντος. Το ορθογώνιο στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy απεικονίζει δύο αγγειακά έμβολα, τα οποία φαίνονται να περιλαμβάνουν έναν μόνο αγγειακό αυλό στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (κύκλος).

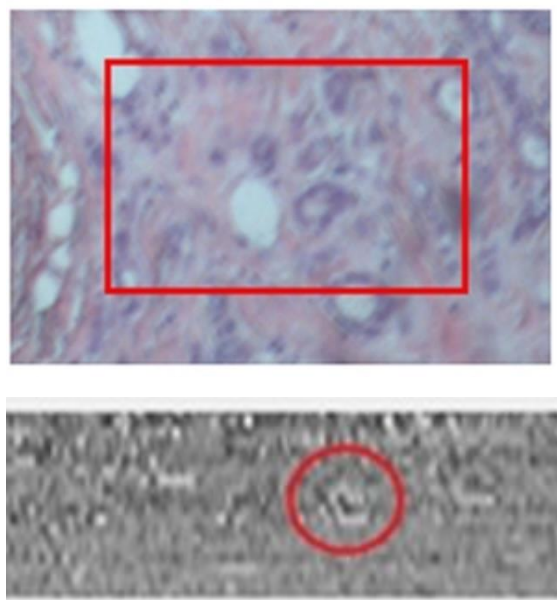
3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

Η Εικόνα 3.10 απεικονίζει τις δισδιάστατες εικόνες στα επίπεδα xy και xz της περιοχής ενδιαφέροντος που καθορίστηκε από τον ιστοπαθολόγο για την περίπτωση LCIS. Ο κύκλος στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy απεικονίζει δύο λοβιακά νεοπλασματικά κύτταρα, που διηθούν το μυϊκό τοίχωμα ενός αγγείου, ενώ ο κύκλος στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz αποκαλύπτει ένα τρίτο λοβιακό νεοπλασματικό κύτταρο στο μυϊκό τοίχωμα, άορατο στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy .



Εικόνα 3.10. Περιοχή ενδιαφέροντος από λοβιακό καρκίνωμα *in situ* με μεγέθυνση $\times 200$. (α) Συμβατική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy . (β) Ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (δεξιά) της περιοχής ενδιαφέροντος. Ο κύκλος στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy απεικονίζει δύο λοβιακά νεοπλασματικά κύτταρα, που διεισδύουν στο μυϊκό τοίχωμα ενός αγγείου, ενώ ο κύκλος στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz αποκαλύπτει ένα τρίτο λοβιακό νεοπλασματικό κύτταρο στο μυϊκό τοίχωμα.

Η Εικόνα 3.11 απεικονίζει τις δισδιάστατες εικόνες στα επίπεδα xy και xz της περιοχής ενδιαφέροντος που καθορίστηκε από τον ιστοπαθολόγο για την περίπτωση DCIS. Στην δισδιάστατη εικόνα του επιπέδου xz , εντοπίστηκε ένα νεοπλασματικό έμβολο του πόρου, σε έναν αγγειακό χώρο (εντός του αυλού του αγγείου μπορούμε να απεικονίσουμε μια ομάδα πορογενών νεοπλασματικών κυττάρων. Το εύρημα αυτό δεν μπορούσε να αναπαραχθεί με σαφήνεια στις δισδιάστατες εικόνες στο επίπεδο xy .



Εικόνα 3.11. Περιοχή ενδιαφέροντος από πορογενές καρκίνωμα *in situ* με μεγέθυνση $\times 100$. (α) Συμβατική δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy , (β) ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz (δεξιά) της περιοχής ενδιαφέροντος. Στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz , εντοπίστηκε ένα νεοπλασματικό έμβολο του πόρου, σε έναν αγγειακό χώρο (μέσα στον αυλό του αγγείου μπορούμε να δούμε μία νεοπλασματική συστάδα πορογενών κυττάρων). Αυτό το εύρημα δεν μπορούσε να αναπαραχθεί με σαφήνεια στις εικόνες του άξονα xy και για σύγκριση έχει επισημανθεί η (κατά προσέγγιση) περιοχή του ευρήματος με ένα κόκκινο τετράγωνο.

3.5 Σχολιασμός Αποτελεσμάτων

Σε αυτό το κεφάλαιο, αποδεικνύεται ότι η τρισδιάστατη ανακατασκευή ιστού είναι εφικτή σε περιβάλλον κλινικής πράξης χρησιμοποιώντας μια σειρά από απλά βήματα που απαιτούν α/ κοπή διαδοχικών τμημάτων ιστού από το δείγμα, β/ λήψη δισδιάστατων ψηφιακών εικόνων xy από κάθε διαδοχικό τμήμα ιστού και γ/ ανακατασκευή του τρισδιάστατου όγκου (εικόνες xz και yz), χρησιμοποιώντας μια διαδικασία ευθυγράμμισης εικόνων σε συνδυασμό με τεχνικές βαθιάς μάθησης (Εικόνα 3.5 έως Εικόνα 3.9).

Σύμφωνα με την αξιολόγηση ενός έμπειρου ιστοπαθολόγου, φαίνεται ότι οι τρισδιάστατες ανακατασκευασμένες εικόνες μπορεί να αποκαλύψουν σε έναν καλά εκπαιδευμένο γιατρό πληροφορίες που δεν είναι σαφώς ορατές ή ακόμη και μη ανιχνεύσιμες στις συμβατικές δισδιάστατες εικόνες του xy επιπέδου. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση αδenoκαρκινώματος (Εικόνα 3.9) η συμβατική δισδιάστατη εικόνα του xy επιπέδου οδήγησε στο συμπέρασμα ότι υπήρχαν πολλαπλά αγγειακά έμβολα, ωστόσο, η ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz έδειξε ότι αυτά τα πολλαπλά έμβολα ήταν στην πραγματικότητα μέρη μιας μοναδικής αγγειακής δομής. Στην περίπτωση LCIS (Εικόνα 3.8), η συμβατική δισδιάστατη εικόνα του επιπέδου xy οδήγησε στην παρατήρηση ότι υπήρχαν δύο λοβιακά νεοπλασματικά κύτταρα που διεισδύουν στο μυϊκό τοίχωμα, ωστόσο, η ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz αποκάλυψε ένα τρίτο

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

λοβιακό νεοπλασματικό κύτταρο στο μυϊκό τοίχωμα, το οποίο δεν μπορούσε να παρατηρηθεί καθαρά στην δισδιάστατη εικόνα του επιπέδου xy . Τέλος, στην περίπτωση DCIS (Εικόνα 3.11), η ανακατασκευασμένη δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xz έδειξε ένα νεοπλασματικό έμβολο του πόρου. Μέσα στον αυλό του αγγείου, ανιχνεύθηκε μία ομάδα πορογενών νεοπλασματικών κυττάρων. Αυτό το εύρημα δεν μπορούσε να παρατηρηθεί καθαρά στην δισδιάστατη εικόνα στο επίπεδο xy .

Η ιδέα του τρισδιάστατου οπτικού τεμαχισμού ιστού δεν είναι νέα. Έχει παρουσιαστεί από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες [36], [39], [40], [35], [68]. Αν και προηγούμενες μελέτες έχουν παρουσιάσει πολλά υποσχόμενες μεθοδολογίες, παρουσιάζουν συγκεκριμένους περιορισμούς. Πρώτον, ορισμένες μέθοδοι απαιτούν σχεδόν πλήρη περιστροφή του δείγματος γύρω από την πηγή φωτός (ή πλήρης περιστροφή της πηγής γύρω από το δείγμα). Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για υψηλές μεγεθύνσεις που απαιτούν τοποθέτηση του δείγματος πολύ κοντά στους αντικειμενικούς φακούς. Δεύτερον, οι περισσότερες σχετικές μέθοδοι δεν μπορούν να θεωρηθούν ως πιθανό άρθρωμα που μπορεί να προσαρμοστεί σε τυπικά μικροσκόπια φωτεινού πεδίου. Η εφαρμογή τους απαιτεί την αγορά ενός ειδικού οργάνου. Τρίτον, οι περισσότερες σχετικές μέθοδοι έχουν πολυάριθμες ιατρικές εφαρμογές, αλλά μόνο λίγες από αυτές μπορούν να θεωρηθούν εφαρμόσιμες για την κλινική πρακτική, παρόλο που η τεχνολογία τους είναι παρούσα στην βιβλιογραφία για περισσότερα από 20 χρόνια. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, η προτεινόμενη τρισδιάστατη μεθοδολογία ανακατασκευής όγκου ιστού δίνει λύση σε όλους τους παραπάνω περιορισμούς. Πρώτον, η προτεινόμενη μέθοδος δεν εξαρτάται από την απόσταση του δείγματος από τους αντικειμενικούς φακούς, καθώς χρησιμοποιεί τυπικές ιστολογικές τομές τοποθετημένες σε συμβατικά πλακίδια μικροσκοπίου. Έτσι, είναι δυνατή η παραγωγή τρισδιάστατων όγκων ιστού σε οποιαδήποτε επιθυμητή μεγέθυνση. Δεύτερον, η προτεινόμενη μέθοδος δεν απαιτεί την αγορά ειδικού οργάνου. Είναι δυνατή η παραγωγή τρισδιάστατων όγκων ιστού χρησιμοποιώντας οποιοδήποτε συμβατικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, χωρίς καμία τροποποίηση/προσθήκη των εξαρτημάτων του μικροσκοπίου, χωρίς αλλαγή των τυπικών βημάτων ρουτίνας χειρισμού των ιστολογικών δειγμάτων (κοπή, χρώση κ.λπ.) και χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένης εκπαίδευσης των εμπλεκόμενων τεχνικών/ιατρών. Τα μόνα πρόσθετα βήματα που εισάγει το προτεινόμενο πρωτόκολλο στο πρωτόκολλο ρουτίνας είναι η δημιουργία πρόσθετων τομών ιστού του ίδιου δείγματος και η εγκατάσταση του προτεινόμενου λογισμικού ανακατασκευής όγκου στον υπολογιστή του μικροσκοπίου. Τρίτον, η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιαδήποτε εφαρμογή ρουτίνας, όχι μόνο για ορισμένα εξειδικευμένα πρωτόκολλα.

Ωστόσο, η προτεινόμενη μέθοδος έχει και ορισμένους περιορισμούς. Ένα από αυτά είναι ότι οι παραγόμενες τρισδιάστατες εικόνες όγκου δεν παρουσιάζουν την ποιότητα ευκρίνειας των τυπικών δισδιάστατων εικόνων ή την ποιότητα ευκρίνειας ορισμένων σχετικών προσεγγίσεων τρισδιάστατης ανακατασκευής ιστού. Το τελευταίο ήταν αναμενόμενο αφού χρησιμοποιούμε περιορισμένο αριθμό λεπτών

φετών (περίπου 20 τομές/δείγμα με πάχος 2 μm). Αυτό σημαίνει ότι μικρές δομές, όπως πυρήνες και/ή κύτταρα, ενδέχεται να εμφανίζονται μόνο σε μικρό αριθμό διαδοχικών τομών (δηλαδή, 3–4 τομές), ένα φαινόμενο που απαιτεί την εφαρμογή παρεμβολής για την παραγωγή της τελικής τρισδιάστατης εικόνας. Ωστόσο, η παρεμβολή, εξ ορισμού, παράγει θολές εικόνες, καθώς περιλαμβάνει μια προσπάθεια προσέγγισης των πληροφοριών που λείπουν (Εικόνα 3.6). Από την άλλη πλευρά, μεγαλύτερες δομές, όπως αυλοί και/ή αγγεία που μπορεί να εμφανιστούν σε μεγάλο αριθμό διαδοχικών τομών ανακατασκευάζονται με καλύτερη ευκρίνεια (Εικόνα 3.9). Γενικά, η ευκρίνεια της εικόνας στην προτεινόμενη μέθοδο μπορεί να βελτιωθεί με την παραγωγή λεπτότερων τομών (πάχους μικρότερο από 2 μm) και μεγαλύτερου αριθμού διαδοχικών τομών (περισσότερες από 20 διαδοχικές τομές). Εκτός από την περιορισμένη διακριτική ικανότητα, ένας άλλος σημαντικός περιορισμός της μελέτης μας είναι ότι εξακολουθεί να απαιτεί φυσικό τεμαχισμό του δείγματος, σε αντίθεση με τις σχετικές μεθόδους που εφαρμόζουν τον οπτικό τεμαχισμό του δείγματος.

Παρά τους προαναφερθέντες περιορισμούς, και παρόλο που οι προκύπτουσες τρισδιάστατες εικόνες στερούνται υψηλής αντίθεσης και ανάλυσης, ο ιστοπαθολόγος ήταν σε θέση να αναγνωρίσει νέες πληροφορίες για τις προκύπτουσες τρισδιάστατες εικόνες, πληροφορίες που δεν ήταν σαφώς παρατηρήσιμες (ή δεν είναι καθόλου παρατηρήσιμες) στις τυπικές δισδιάστατες εικόνες υψηλής ανάλυσης/αντίθεσης. Από αυτή την άποψη, και λαμβάνοντας υπόψη ότι η προσέγγισή μας είναι εύκολο να ενσωματωθεί στην κλινική πρακτική, η προτεινόμενη μεθοδολογία έχει αξία ως πιθανή συμπληρωματική ανάλυση ιστολογικών δειγμάτων .

Μια πιθανή λύση για τη μετατροπή της προτεινόμενης μεθοδολογίας σε μέθοδο οπτικού τεμαχισμού, θα ήταν η τροποποίηση της τράπεζας δείγματος του μικροσκοπίου ευρέως πεδίου ώστε να επιτρέπεται περιορισμένη γωνιακή περιστροφή του δείγματος, προκειμένου να διερευνηθεί εάν είναι δυνατή η ανακατασκευή του πλήρους όγκου του δείγματος χρησιμοποιώντας τις αρχές της υπολογιστικής τομογραφίας περιορισμένης γωνίας [69]. Με αυτόν τον τρόπο, ενδέχεται να μπορούν συνδυαστούν τα πλεονεκτήματα τόσο της προτεινόμενης μεθόδου (πρωτόκολλο ρουτίνας + εφαρμόσιμο για οποιαδήποτε μεγέθυνση), όσο και άλλων τεχνολογιών, όπως η τομογραφία οπτικής προβολής (ευκρινείς εικόνες + οπτική κοπή) σε μία ενιαία προσέγγιση.

4 Τομογραφική Απεικόνιση Τομής Ιστού στη Συμβατική Μικροσκοπία Φωτεινού Πεδίου

Στο προηγούμενο κεφάλαιο παρουσιάστηκε μία τεχνική για την τρισδιάστατη αναπαράσταση ενός δείγματος ιστού, η οποία βασίζεται στον φυσικό τεμαχισμό του. Στο παρόν κεφάλαιο, παρουσιάζεται μια μεθοδολογία για την τομογραφική απεικόνιση τομών ιστού, η οποία βασίζεται στην ιδέα ότι κάθε δείγμα ιστού έχει πεπερασμένο πάχος και, επομένως, είναι δυνατή η δημιουργία εικόνων σε διαφορετικά επίπεδα εντός του δείγματος (οπτικός τεμαχισμός), αποκαλύπτοντας λεπτομέρειες που πιθανώς δεν θα γίνονταν αντιληπτές με άλλο τρόπο. Ο οπτικός τεμαχισμός κατέστη δυνατός με την ανάπτυξη μιας ειδικά κατασκευασμένης τράπεζας μικροσκοπίου που ελέγχεται από Arduino. Η ειδικά κατασκευασμένη τράπεζα μικροσκοπίου, εκτός από τις κανονικές κινήσεις του δείγματος που πρέπει να παρέχει κατά μήκος των αξόνων x , y και z , μπορεί επιπλέον να περιστρέφει το δείγμα γύρω από τον οριζόντιο άξονα. Η περιστροφή αυτή επιτρέπει τη μετατροπή του οπτικού μικροσκοπίου σε γεωμετρία αξονικής τομογραφίας, επιτρέποντας την οπτική τεμαχισμό του δείγματος με τη χρήση αλγορίθμων τομογραφικής ανακατασκευής με βάση την προβολή.

4.1 Εισαγωγή

Η διαγνωστική παθολογία [70] περιλαμβάνει τη διάγνωση διαφόρων ασθενειών με χρήση ιστών, κυττάρων ή άλλου είδους βιολογικού υλικού, συνήθως υπό το οπτικό μικροσκόπιο. Παρόλο που οι σύγχρονες μη επεμβατικές τεχνολογίες ιατρικής απεικόνισης μπορούν να παρέχουν ενδείξεις σχετικά με την παρουσία μιας νόσου, τις περισσότερες φορές, για σοβαρές νόσους όπως ο καρκίνος, η επιβεβαίωση εξακολουθεί να βασίζεται σε ευρήματα σε μικροσκοπικό επίπεδο [71].

Η μικροσκοπική εξέταση δεν είναι εύκολη υπόθεση [70]. Η ακρίβεια της εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η ακριβής δειγματοληψία του βιολογικού υλικού, η κατάλληλη προετοιμασία του δειγματοληπτικού υλικού για τη μικροσκοπική εξέταση, η ακριβής οπτική αξιολόγηση από τον εξειδικευμένο ιατρό. Όλοι αυτοί οι παράγοντες (δειγματοληψία, προετοιμασία, ερμηνεία) έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν διαγνωστικά σφάλματα, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα στη διαχείριση του ασθενούς [72], [73], [74], [75]. Ειδικά στον καρκίνο, τα διαγνωστικά σφάλματα καθορίζουν εάν ένας ασθενής θα επιβιώσει ή όχι [76].

Προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθότητα και η εγκυρότητα της μικροσκοπικής εξέτασης, έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι που στοχεύουν σε διαφορετική πτυχή της διαδικασίας. Πρώτον, η δειγματοληψία του βιολογικού υλικού πρέπει να προέρχεται από την πιο αντιπροσωπευτική περιοχή της

παθολογίας. Αυτό μπορεί να διασφαλιστεί, για παράδειγμα, με βιοψία καθοδηγούμενη από εικόνα [77], [78] με χρήση υπερήχων ή άλλων τεχνολογιών. Δεύτερον, η προετοιμασία του υλικού θα πρέπει να εξασφαλίζει ότι τα πιο κατατοπιστικά χαρακτηριστικά της παθολογίας θα είναι οπτικά αναγνωρίσιμα κατά την εξέταση στο μικροσκόπιο. Για παράδειγμα, στις βιοψίες ιστών χρησιμοποιούνται διάφορες χημικές ουσίες για να χρωματιστούν συγκεκριμένα τμήματα του βιολογικού υλικού (π.χ. χρωματίνη, πρωτεΐνες κ.λπ.) με ένα ξεχωριστό χρώμα [70]. Τρίτον, ο ειδικός ιατρός θα πρέπει να είναι σε θέση να αναγνωρίζει και να ερμηνεύει τα σημαντικότερα ευρήματα στο μεγεθυμένο δείγμα. Η διαδικασία αυτή δεν είναι απλή, μάλλον είναι χρονοβόρα και επίπονη. Ειδικά για βιοψίες ιστών που περιλαμβάνουν πολλαπλές τομές σε πολλαπλά πλακίδια και, συνεπώς, απαιτούν την εξέταση εκατοντάδων/χιλιάδων εικόνων σε διαφορετικές μεγεθύνσεις, μπορεί να προκύψουν διαγνωστικές παγίδες λόγω των ακόλουθων δύο λόγων: α/ ο ειδικός ιατρός μπορεί να χάσει την πιο αντιπροσωπευτική περιοχή του δείγματος και β/ ο ειδικός ιατρός μπορεί να μην ερμηνεύσει σωστά τα απεικονιστικά ευρήματα λόγω έλλειψης εμπειρίας ή δεξιοτήτων [79], [80], [81], [82], [83], [84]. Για να εξασφαλιστούν ακριβή αποτελέσματα, έχουν προταθεί α/ αυτοματοποιημένα συστήματα ικανά να σαρώνουν όλη την έκταση του βιολογικού υλικού και να καθοδηγούν τον ειδικό ιατρό στις πιο αντιπροσωπευτικές περιοχές της παθολογίας [85], [86] και β/ να παρέχουν διαγνωστικές ερμηνείες δεύτερης γνώμης με βάση την αυτοματοποιημένη ανάλυση εικόνας (συστήματα υποστήριξης αποφάσεων) [87], [88], [89].

Η διαγνωστική παθολογία βασίζεται πλήρως σε εικόνες 2D. Το δείγμα ιστού τοποθετείται στην τράπεζα του μικροσκοπίου, και η παρατήρηση του πραγματοποιείται σε επίπεδο 2D. Ειδικά για τις βιοψίες ιστών, παρόλο που το αρχικό δείγμα ιστού είναι τρισδιάστατο, πριν από την παρατήρηση του δείγματος στο μικροσκόπιο, το υλικό προετοιμάζεται/κόβεται σε δισδιάστατες φέτες με τη μικροτόμο, και μετά από κατάλληλη χημική επεξεργασία (π.χ. χρώση), τοποθετείται σε πλακίδιο, η παρατήρηση του οποίου πραγματοποιείται, και πάλι, σε δισδιάστατο επίπεδο.

Ωστόσο, οι δισδιάστατες εικόνες αποτελούν προσέγγιση της τρισδιάστατης πραγματικότητας και ενδέχεται να οδηγήσουν σε λιγότερο ακριβή συμπεράσματα. Το ζήτημα αυτό έχει από καιρό διερευνηθεί στον τομέα της ιατρικής απεικόνισης στη "μακροσκοπική" κλίμακα, δηλαδή στην κλίμακα του ανθρώπινου σώματος. Για παράδειγμα, τα συστήματα υπολογιστικής τομογραφίας (CT) με ακτίνες Χ, τα οποία αναπτύχθηκαν για να παράγουν συνεχόμενες δισδιάστατες οπτικές τομές του σώματος του ασθενούς. Αυτές οι τομές, όταν συνδυάζονται μεταξύ τους, παράγουν μια τρισδιάστατη αναπαράσταση του όγκου του ασθενούς, η οποία έχει αποδειχθεί μια πιο ακριβής προσέγγιση από την τυπική δισδιάστατη ακτινογραφία ακτίνων Χ [90]. Το ερώτημα που τίθεται είναι ένα θα ήταν χρήσιμο να επεκταθεί αυτή η ιδέα στη διαγνωστική παθολογία και, ειδικότερα, στη μικροσκοπική εξέταση ιστού, ο οποίος, εξ ορισμού, είναι ένα τρισδιάστατο υλικό. Το προηγούμενο κεφάλαιο δίνει μία προκαταρκτική απάντηση. Το πρόβλημα με την προσέγγιση που παρουσιάζεται

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

στο Κεφάλαιο 3 είναι ότι το δείγμα πρέπει να τεμαχιστεί, να επεξεργαστεί και να χρωματιστεί με φυσικό τρόπο, αυξάνοντας το συνολικό χρόνο, το κόστος και την πολυπλοκότητα της διαδικασίας.

Στο παρόν κεφάλαιο επεκτείνεται η προσπάθεια για τρισδιάστατη απεικόνιση όγκου ιστού στη μικροσκοπία με τη χρήση οπτικού τεμαχισμού του δείγματος, αντί της φυσικής προσέγγισης τεμαχισμού που ακολουθήσαμε στην προηγούμενη μελέτη μας [91]. Ο οπτικός τεμαχισμός κατέστη δυνατός με την ανάπτυξη μιας προσαρμοσμένης τράπεζας μικροσκοπίου, η οποία επιτρέπει την περιστροφή του δείγματος γύρω από τον οριζόντιο άξονα. Η περιστροφή αυτή επιτρέπει τη μετατροπή του οπτικού μικροσκοπίου σε γεωμετρία αξονικής τομογραφίας, επιτρέποντας την οπτική τεμαχισμό του δείγματος με τη χρήση αλγορίθμων τομογραφικής ανακατασκευής με χρήση προβολών.

4.2 Δεδομένα

Το υλικό περιελάμβανε δείγματα ιστών από το αρχειακό υλικό του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Γ.Ν.Α. "Ιπποκράτειο". Η διαδικασία συλλογής των δεδομένων και το συνολικό ερευνητικό πρωτόκολλο έλαβαν έγκριση τόσο από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Γ.Ν.Α. "Ιπποκράτειο" (Αριθμός Έγκρισης 65/8-11-2021) όσο και από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής (Αριθμός Έγκρισης 108080/30-11-2021).

Κάθε δείγμα ιστού υποβλήθηκε σε τομή με μικροτόμο για την παραγωγή τομών πάχους 10 μm . Στη συνέχεια, οι εν λόγω τομές ιστού χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη (H&E), αριθμήθηκαν και επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου. Για τη λήψη εικόνων χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα απεικόνισης ψηφιακής φωτομικροσκοπίας (LEICA DM 2500) εξοπλισμένο με έγχρωμη φωτογραφική μηχανή LEICA DFC 420 C. Η πηγή φωτισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένας λαμπτήρας βολφραμίου-αλογόνου 12 V, 10 W. Οι εικόνες ψηφιοποιήθηκαν με ανάλυση 1728 \times 1296 εικονοστοιχείων (με μέγεθος εικονοστοιχείου 2,78 μm \times 2,78 μm) και βάθος χρώματος 24 bit. Χρησιμοποιήθηκαν αντικειμενικοί φακοί με συνολικό συντελεστή μεγέθυνσης $\times 100$.

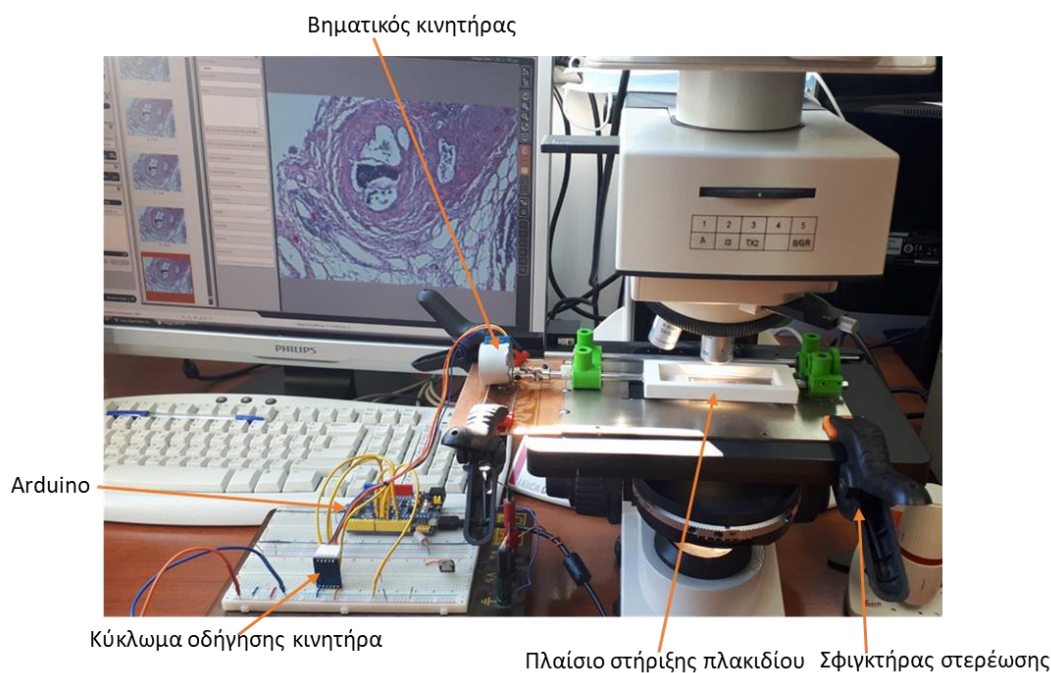
4.3 Μεθοδολογία

Σύμφωνα με την προτεινόμενη μεθοδολογία συλλέγονται εικόνες μίας τομής ιστού υπό διάφορες γωνίες. Οι εικόνες αυτές παίζουν τον ρόλο των προβολών (σε αντιστοιχία με την αξονική τομογραφία) και χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία εικόνων σε διάφορα βάθη του ιστού (οπτικός τεμαχισμός), καθώς και σε διάφορα επίπεδα (αξονικό επίπεδο, στεφανιαίο επίπεδο και οβελιαίο επίπεδο). Η μεθοδολογία περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

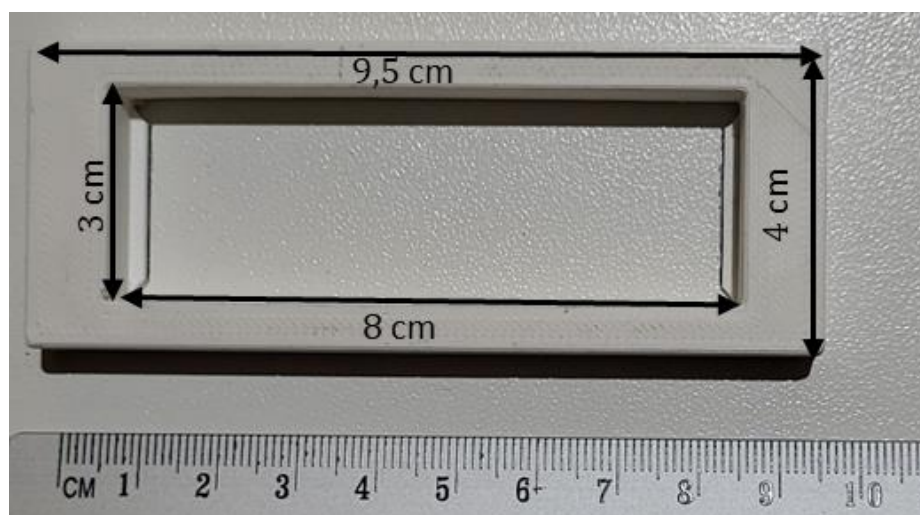
- Συλλογή εικόνων σε διάφορες γωνίες με χρήση προσαρμοσμένης διάταξης
- Ευθυγράμμιση των εικόνων
- Τομογραφική ανακατασκευή

4.3.1 Διάταξη συλλογής εικόνων

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των εικόνων παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.1. Το πλακίδιο με την τομή ιστού στερεώνεται μέσα σε ένα πλαίσιο (Εικόνα 4.2) το οποίο μπορεί να περιστρέφεται μέσω ενός βηματικού κινητήρα το οποίο ελέγχεται από μία πλακέτα τύπου Arduino (Uno Plus [92]).



Εικόνα 4.1. Διάταξη για τη λήψη εικόνων τομής ιστού σε διάφορες γωνίες.

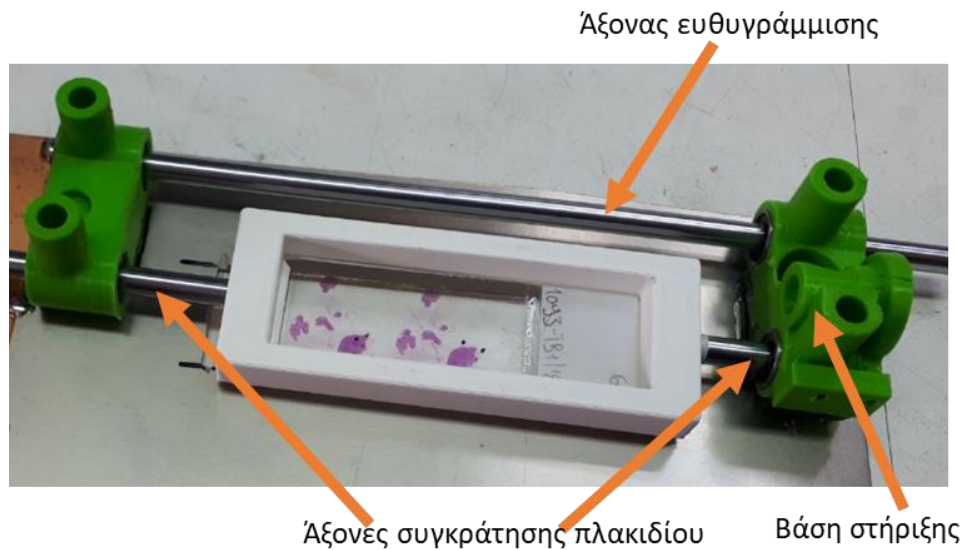


Εικόνα 4.2. Πλαίσιο στήριξης πλακιδίου με τομές ιστού.

Το πλαίσιο στηρίζεται σε δύο βάσεις μέσω δύο αξόνων μήκους 10 cm έκαστος (Εικόνα 4.3) και δύο γραμμικών ρουλεμάν 6 mm (εντός των δύο βάσεων) (Εικόνα 4.4). Επίσης, ένας δεύτερος άξονας μήκους 20 cm βοηθάει στην ευθυγράμμιση της διάταξης. Οι βάσεις στήριξης και το πλαίσιο δημιουργήθηκαν από τρισδιάστατο εκτυπωτή (Crealty 3D Ender 5) με χρήση νήματος PLA. Η κατασκευή τοποθετήθηκε σε πλακέτα

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

από βακελίτη, η οποία προσαρμόστηκε στην τράπεζα του μικροσκοπίου με χρήση σφιγκτήρων (Εικόνα 4.1).

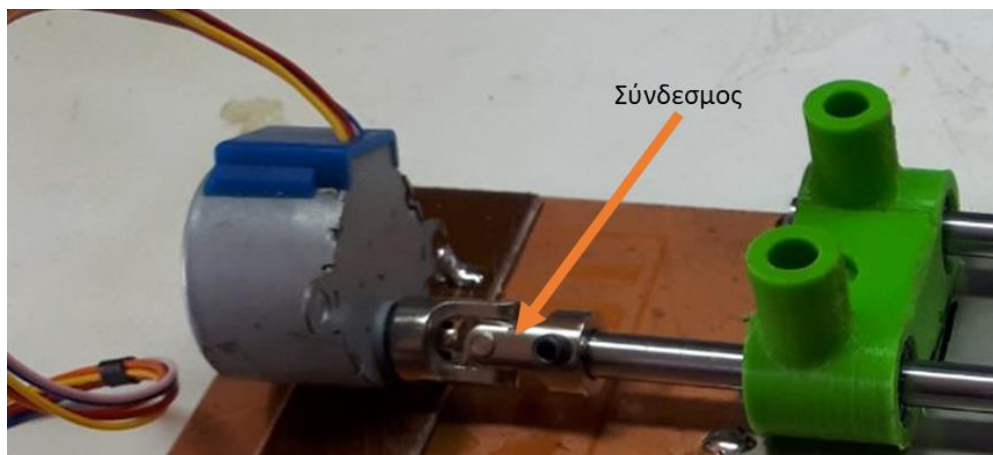


Εικόνα 4.3. Διάταξη συγκράτησης πλαισίου.



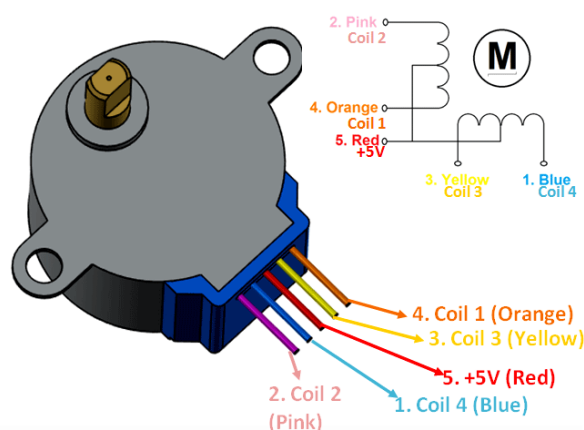
Εικόνα 4.4. Βάση στήριξης με τα γραμμικά ρουλεμάν.

Ο ένας από τους δύο άξονες συγκράτησης του πλαισίου συνδέεται με τον βηματικό κινητήρα μέσω κατάλληλου συνδέσμου (Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5. Σύνδεση του βηματικού κινητήρα με τον άξονα περιστροφής μέσω κατάλληλου συνδέσμου.

Η περιστροφή του πλαισίου επιτυγχάνεται με χρήση του βηματικού κινητήρα 28BYJ-48, ο οποίος παρουσιάζει χαμηλό κόστος και ευκολία χρήσης του με πλακέτες τύπου Arduino ή Raspberry Pi. Ο κινητήρας 28BYJ-48 είναι ένας μονοπολικός βηματικός κινητήρας (Εικόνα 4.6). Διαθέτει τέσσερα πηνία που ενεργοποιούνται διαδοχικά για να κάνουν τον άξονα του κινητήρα να περιστρέφεται με διακριτά βήματα. Τυπικά, το βήμα της γωνίας περιστροφής είναι $5,625^\circ$ και συνεπώς χρειάζονται 64 βήματα για μια πλήρη περιστροφή 360° . Εντούτοις, ο κινητήρας 28BYJ-48 έχει ενσωματωμένο μηχανισμό μείωσης ταχυτήτων με λόγο 64:1, το οποίο σημαίνει ότι το βήμα της γωνίας περιστροφής μπορεί να γίνει $0,088^\circ$ (περίπου 4096 βήματα για μια πλήρη περιστροφή 360°). Η τάση λειτουργίας είναι συνήθως 5V και το ρεύμα ανά πηνίο είναι συνήθως περίπου 50mA.



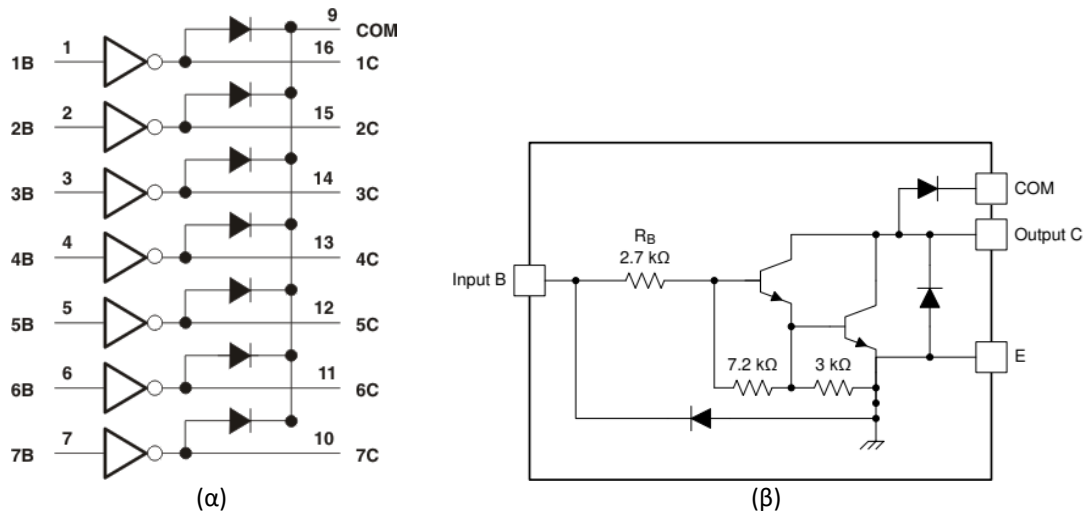
Εικόνα 4.6. Ο βηματικός κινητήρας 28BYJ-48 (Πηγή²⁶).

Ο έλεγχος του 28BYJ-48 γίνεται συνήθως με έναν οδηγό βηματικού κινητήρα, όπως το ULN2003 [93]. Το ULN2003 είναι ένα ολοκληρωμένο κύκλωμα που χρησιμοποιείται συνήθως για την οδήγηση επαγωγικών φορτίων, όπως ρελέ,

²⁶ Components101, "28BYJ-48 - 5V Stepper Motor", <https://components101.com/motors/28byj-48-stepper-motor>

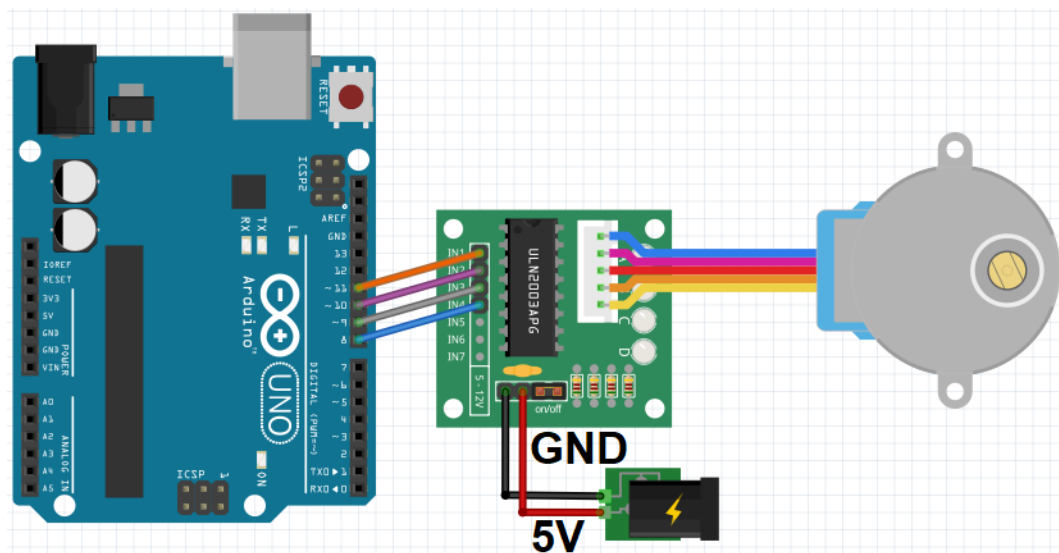
3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

βηματικοί κινητήρες και ηλεκτρομαγνητικά πηνία. Το ULN2003 περιέχει επτά ζεύγη τρανζίστορ Darlington, καθιστώντας το κατάλληλο για την οδήγηση έως και επτά διαφορετικών φορτίων ανεξάρτητα (Εικόνα 4.7). Κάθε ζεύγος αποτελείται από δύο τρανζίστορ NPN συνδεδεμένα σε μια διάταξη που παρέχει υψηλό κέρδος ρεύματος, καθιστώντας το ικανό να οδηγεί φορτία με υψηλότερες απαιτήσεις ρεύματος.



Εικόνα 4.7. (α) Απλοποιημένο μπλοκ διάγραμμα του ULN2003. (β) Υλοποίηση κάθε βαθμίδας (Πηγή: [93]).

Η Εικόνα 4.8 παρουσιάζει τη συνδεσμολογία του κινητήρα 28BYJ-48 με πλακέτα τύπου Arduino.



Εικόνα 4.8. Συνδεσμολογία βηματικού κινητήρα 28BYJ-48 με Arduino μέσω του κυκλώματος οδήγησης ULN2003A (Πηγή²⁷).

²⁷ DIY Engineers, “28BYJ-48 & ULN2003 – Stepper Motor Control”, <https://www.diyengineers.com/2021/11/25/28byj-48-uln2003-stepper-motor-control/>

Το Arduino και η κάμερα του μικροσκοπίου είναι συνδεδεμένα σε υπολογιστή, στον οποίο εκτελείται πρόγραμμα γραμμένο στη γλώσσα Python. Το εν λόγω πρόγραμμα δίνει εντολή στο Arduino για εκτέλεση μία περιστροφής του πλακιδίου και αφού εκτελεστεί η περιστροφή συλλέγει την εικόνα από την κάμερα του μικροσκοπίου. Η εν λόγω διάταξη προσομοιάζει τη λειτουργία ενός αξονικού τομογράφου με τη διαφοροποίηση ότι η πηγή (λάμπα φωτισμού) και ο ανιχνευτής (κάμερα) παραμένουν σταθερά και περιστρέφεται το δείγμα.

Η επικοινωνία του προγράμματος Python με το Arduino γίνεται μέσω μίας ειδικής βιβλιοθήκης της Python (PyFirmata) [94] που παρέχει έναν τρόπο επικοινωνίας με πλακέτες Arduino χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο Firmata [95]. Το πρωτόκολλο Firmata είναι ένα τυποποιημένο πρωτόκολλο που επιτρέπει σε εξωτερικό λογισμικό να επικοινωνεί και να ελέγχει πλακέτες Arduino χωρίς να χρειάζεται να γραφτεί ειδικός κώδικας στο Arduino για κάθε συγκεκριμένη εργασία. Με την PyFirmata, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η Python για την αποστολή εντολών σε μία πλακέτα Arduino, την ανάγνωση δεδομένων από αισθητήρες, τον έλεγχο διάφορων ενεργοποιητών όπως LED, κινητήρες και σερβομηχανισμοί. Απλοποιεί τη διαδικασία αλληλεπίδρασης με το υλικό Arduino μέσω ενός υψηλού επιπέδου API Python.

Η επικοινωνία του προγράμματος Python με την κάμερα του μικροσκοπίου γίνεται με χρήση της γνωστής βιβλιοθήκης OpenCV (Open Source Computer Vision Library) [96]. Η OpenCV είναι μία βιβλιοθήκη λογισμικού ανοικτού κώδικα η οποία παρέχει μια ολοκληρωμένη σουίτα εργαλείων και λειτουργιών για εργασίες που σχετίζονται με την όραση υπολογιστών, την επεξεργασία εικόνας και βίντεο και τη μηχανική μάθηση. Χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορους τομείς, όπως η ρομποτική, η έρευνα για την όραση υπολογιστών, η ανάλυση εικόνας και βίντεο κ.λπ.

Ο επόμενος ενδεικτικός κώδικας Python²⁸ παρουσιάζει την περιστροφή του βηματικού κινητήρα από 0° έως 10° με βήμα 1° και τη λήψη και αποθήκευση εικόνας σε κάθε γωνία.

```
import pyfirmata
import time
import cv2

# ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΕΙΡΙΑΚΗΣ ΘΥΡΑΣ ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ ARDUINO
board = pyfirmata.Arduino('COM4')

# ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΚΡΟΔΕΚΤΩΝ ΤΟΥ ARDUINO ΟΠΟΥ ΣΥΝΔΕΟΝΤΑΙ ΟΙ ΑΚΡΟΔΕΚΤΕΣ
# IN1, IN2, IN3, IN4 ΤΟΥ ULN2003
motor_pins = [8, 9, 10, 11]

# ΚΑΘΥΣΤΕΡΗΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΒΗΜΑΤΩΝ
step_delay = 0.005 # 5 milliseconds

# ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΒΗΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΔΕΞΙΟΣΤΡΟΦΗ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗ
clockwise_sequence = [
    [1, 0, 0, 0],
```

²⁸ Ο κώδικας προϋποθέτει ότι έχει φορτωθεί η βιβλιοθήκη Firmata στο Arduino και έχουν εγκατασταθεί οι βιβλιοθήκες pyfirmata και opencv στην Python.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

```
[0, 1, 0, 0],
[0, 0, 1, 0],
[0, 0, 0, 1]
]

# ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΒΗΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΑΡΙΣΤΕΡΟΣΤΡΟΦΗ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗ
counterclockwise_sequence = list(reversed(clockwise_sequence))

# ΣΥΝΑΡΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΙΝΗΣΗ ΤΟΥ ΚΙΝΗΤΗΡΑ ΠΡΟΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ
def step_motor(direction, num_steps):
    if direction == "clockwise":
        sequence = clockwise_sequence
    elif direction == "counterclockwise":
        sequence = counterclockwise_sequence
    else:
        return

    for _ in range(num_steps):
        for i in range(4):
            board.digital[motor_pins[i]].write(sequence[i])
            time.sleep(step_delay)

# ΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΚΑΜΕΡΑ
cap = cv2.VideoCapture(0)

# ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝ Η ΣΥΝΔΕΣΗ ΗΤΑΝ ΕΠΙΤΥΧΗΣ
if not cap.isOpened():
    print("Error: Could not open camera.")
    exit()

# ΚΟΙΝΟ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΑΡΧΕΙΟΥ
base_filename = "image"

# ΔΕΞΙΟΣΤΡΟΦΗ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ 0 ΕΩΣ 10 ΜΟΙΡΕΣ
for angle in range(10)

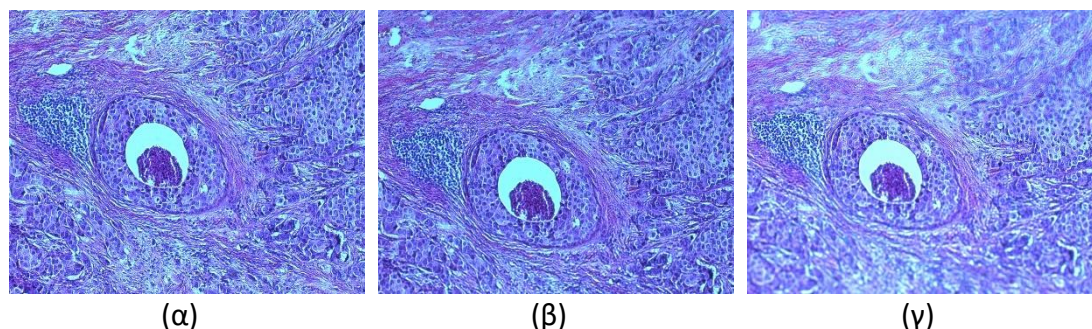
    # ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΕΙΚΟΝΑΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΕΡΑ
    ret, frame = cap.read()

    # ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝ Η ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ ΗΤΑΝ ΕΠΙΤΥΧΗΣ
    if not ret:
        print("Error: Could not read frame.")
        cap.release() # ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΚΑΜΕΡΑΣ
        exit()

    # ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΕΙΚΟΝΑΣ ΩΣ ΑΡΧΕΙΟ
    filename = f"{base_filename}_{angle:04d}.jpg"
    cv2.imwrite(filename, frame)

    step_motor("clockwise", num_steps=11) # ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΗ 1 ΜΟΙΡΑ
    for pin in motor_pins: # ΔΙΑΚΟΠΗ ΚΙΝΗΤΗΡΑ
        board.digital[pin].write(0)
# ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΜΕ ARDUINO
board.exit()
```

Η Εικόνα 4.9 παρουσιάζει ενδεικτικές εικόνες ιστού χωρίς περιστροφή (οριζόντια θέση) και με περιστροφή 5° και 10°.



Εικόνα 4.9. Εικόνες μικροσκοπίου από την περιστροφή πλακιδίου ιστού. (α) Χωρίς περιστροφή. (β) Περιστροφή 5°. (γ) Περιστροφή 10°.

4.3.2 Ευθυγράμμιση εικόνων

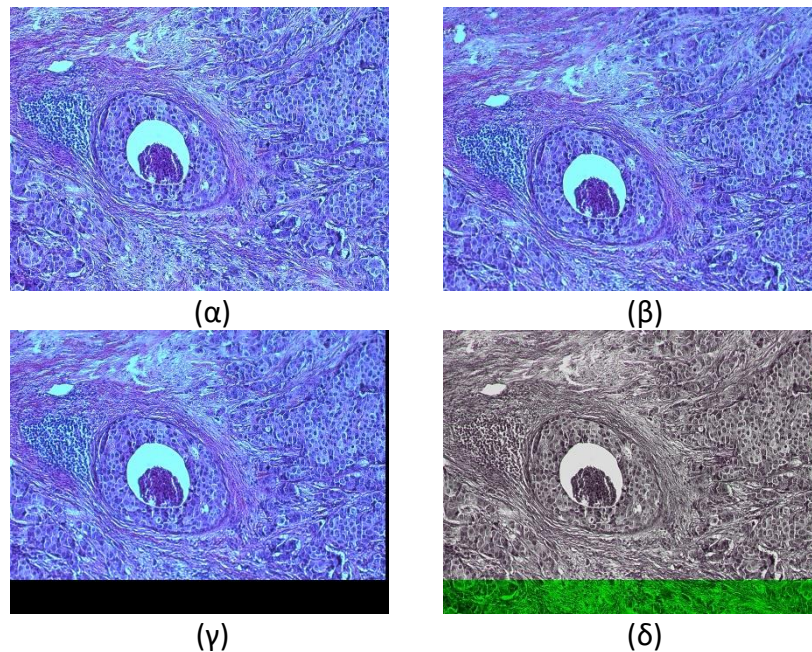
Ιδανικά, η περιστροφή του πλακιδίου με τον ιστό θα πρέπει να γίνεται γύρω από τον οριζόντιο άξονα που διέρχεται από τον κέντρο του πλακιδίου, διαφορετικά ο ιστός θα φαίνεται μετατοπισμένος στην αντίστοιχη εικόνα. Καθώς στην προτεινόμενη διάταξη μπορεί να υπάρχουν μικρές αποκλίσεις από τον ιδανικό άξονα περιστροφής, γίνεται ευθυγράμμιση κάθε εικόνας με την εικόνα που αντιστοιχεί στην οριζόντια θέση (0°) (εικόνα αναφοράς), με χρήση της μεθόδου συσχέτισης φάσης [97].

Η ευθυγράμμιση εικόνων με συσχέτιση φάσης είναι μια τεχνική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν πρόκειται για εικόνες που έχουν υποστεί μετασχηματισμούς μετάθεσης, περιστροφής ή κλιμάκωσης. Η συσχέτιση φάσης λειτουργεί με την ανάλυση της αναπαράστασης του πεδίου συχνότητων των εικόνων για τον προσδιορισμό της χωρικής τους μετατόπισης. Τα βήματα που περιλαμβάνει είναι:

- **Μετατροπή εικόνων στο πεδίο συχνότητας:** οι εικόνες μετασχηματίζονται από το χωρικό πεδίο στο πεδίο της συχνότητας χρησιμοποιώντας τον γρήγορο μετασχηματισμό Fourier (FFT).
- **Υπολογισμός του φάσματος διασταυρούμενης ισχύος:** Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τον υπολογισμό του φάσματος διασταυρούμενης ισχύος των δύο μετασχηματισμένων εικόνων. Αυτό γίνεται πολλαπλασιάζοντας τους συντελεστές του μετασχηματισμού Fourier της μιας εικόνας με τους μιγαδικούς συζυγείς των συντελεστών του μετασχηματισμού Fourier της άλλης εικόνας. Το αποτέλεσμα αντιπροσωπεύει την ομοιότητα μεταξύ των δύο εικόνων στο πεδίο της συχνότητας.
- **Υπολογισμός της συσχέτισης φάσης:** Η συσχέτιση φάσης λαμβάνεται από το φάσμα διασταυρούμενης ισχύος με τη λήψη του αντίστροφου μετασχηματισμού Fourier. Η εικόνα συσχέτισης φάσης κωδικοποιεί πληροφορίες σχετικά με τη σχετική μετατόπιση μεταξύ των δύο εικόνων εισόδου. Η κορυφή της εικόνας συσχέτισης φάσης υποδεικνύει τη μετατόπιση μεταξύ των εικόνων.
- **Εύρεση της κορυφής:** Εντοπίζεται η κορυφή της εικόνας συσχέτισης φάσης, η οποία αντιστοιχεί στη σχετική μετάθεση μεταξύ των δύο εικόνων. Η θέση αυτής της κορυφής παρέχει την οριζόντια και κατακόρυφη μετατόπιση που απαιτείται για την ευθυγράμμιση των εικόνων.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

Η Εικόνα 4.10 παρουσιάζει ένα ενδεικτικό παράδειγμα ευθυγράμμισης.



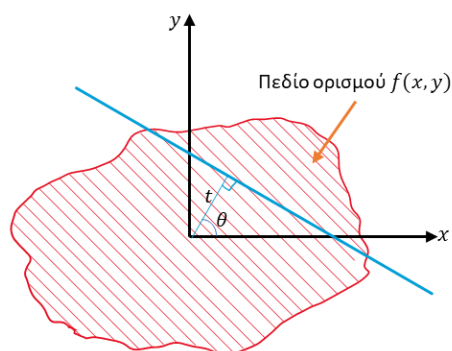
Εικόνα 4.10. Παράδειγμα ευθυγράμμισης. (α) Εικόνα αναφοράς (το πλακίδιο στην οριζόντια θέση). (β) Εικόνα για περιστροφή 5° πριν την ευθυγράμμιση. (γ) Εικόνα μετά την ευθυγράμμιση. (δ) Σύνηξη της εικόνας αναφοράς με την ευθυγραμμισμένη εικόνα.

4.3.3 Τομογραφική ανακατασκευή

Από το προηγούμενο βήμα, προκύπτει ένα σύνολο ευθυγραμμισμένων εικόνων κλίμακας του γκρίζου. Αν c_j ($j = 1, 2, \dots$) συμβολίζει μια οποιαδήποτε στήλη κάθε εικόνας, τότε οι τιμές της στήλης c_j μπορούν να θεωρηθούν ως (οπτικές) προβολές και να εφαρμοστούν μέθοδοι ανακατασκευής από προβολές που χρησιμοποιούνται στην αξονική τομογραφία, όπως για παράδειγμα η φιλτραρισμένη οπισθοπροβολή [98] ή αλγεβρικές τεχνικές ανακατασκευής (ART) [98].

4.3.3.1 Φιλτραρισμένη οπισθοπροβολή

Έστω μία συνάρτηση δύο μεταβλητών $f(x, y)$ και μία ευθεία με παραμέτρους (θ, t) όπου t είναι η κάθετη απόσταση της αρχής των αξόνων από την ευθεία και θ είναι η γωνία που σχηματίζει η κάθετος στην ευθεία με τον οριζόντιο άξονα (Εικόνα 4.11).



Εικόνα 4.11. Ορισμός ευθείας για τον υπολογισμό του μετασχηματισμού Radon.

Η εξίσωση της ευθείας είναι:

$$x \cos \theta + y \sin \theta = t \quad (4.1)$$

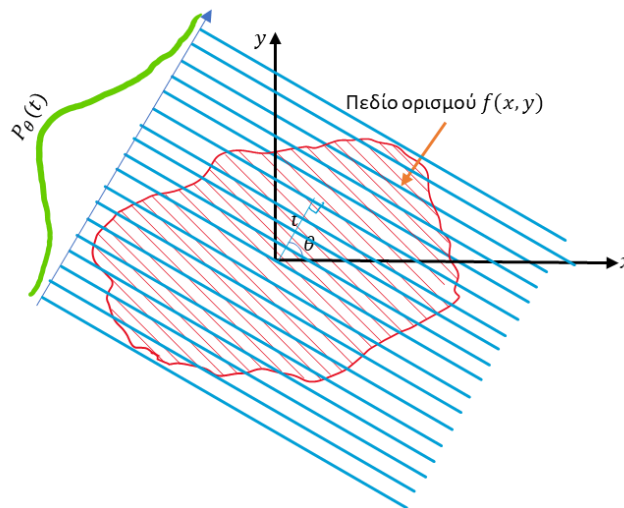
Το γραμμικό ολοκλήρωμα, $R(\theta, t)$, της συνάρτησης $f(x, y)$ κατά μήκος της ευθείας ορίζεται ως εξής:

$$R(\theta, t) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy \quad (4.2)$$

Το ολοκλήρωμα αυτό είναι γνωστό ως **μετασχηματισμός Radon** της συνάρτησης.

Μία **προβολή** της συνάρτησης σχηματίζεται συνδυάζοντας ένα σύνολο γραμμικών ολοκληρωμάτων. Η πιο απλή προβολή, $P_{\theta}(t)$, είναι η **παράλληλη προβολή** που σχηματίζεται υπολογίζοντας το μετασχηματισμό Radon για διάφορες τιμές της παραμέτρου t και με σταθερή τιμή της παραμέτρου θ (Εικόνα 4.12):

$$P_{\theta}(t) = R(\theta, t) \quad (4.3)$$



Εικόνα 4.12. Δημιουργία παράλληλης προβολής για σταθερή γωνία θ .

Ο μετασχηματισμός Fourier της συνάρτησης $f(x, y)$ και της προβολής $P_{\theta}(t)$ ορίζονται ως εξής:

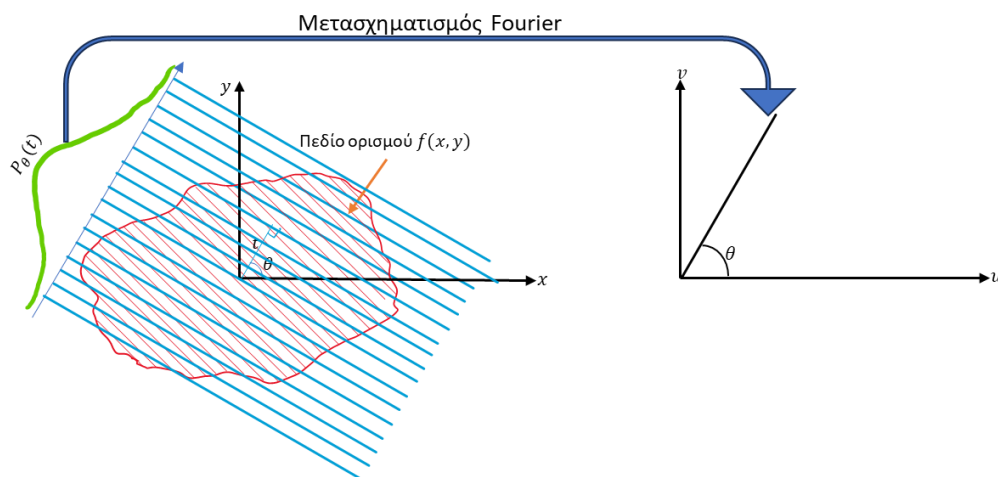
$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-j2\pi(ux+vy)} dx dy \quad (4.4)$$

$$S_{\theta}(w) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta}(t) e^{-j2\pi wt} dt \quad (4.5)$$

Μπορεί να αποδειχθεί ότι ισχύει [98]:

$$S_{\theta}(w) = F(w \cos \theta, w \sin \theta) \quad (4.6)$$

Η σχέση (4.6) αποτελεί το **θεώρημα τομής Fourier** και υποδεικνύει ότι ο μετασχηματισμός Fourier μίας προβολής $P_{\theta}(t)$ δίνει τις τιμές του μετασχηματισμού Fourier της συνάρτησης σε σημεία που είναι σε ακτινική γραμμή υπό γωνία θ (Εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.13. Ο μετασχηματισμός Fourier της παράλληλης προβολής μίας συνάρτησης δίνει τον μετασχηματισμό Fourier της συνάρτησης κατά μήκος μίας ακτινικής γραμμής στη γωνία της προβολής.

Το θεώρημα τομής Fourier είναι η βάση για την ανακατασκευή μίας εικόνας από προβολές. Συγκεκριμένα, με βάση το εν λόγω θεώρημα προκύπτει ότι λαμβάνοντας τις παράλληλες προβολές μίας συνάρτησης σε γωνίες $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_k$ και υπολογίζοντας τους αντίστοιχους μετασχηματισμούς Fourier μπορεί να καθοριστούν οι τιμές του μετασχηματισμού Fourier της συνάρτησης σε ακτινικές γραμμές. Αν ληφθεί ένα άπειρο πλήθος παράλληλων προβολών, τότε ο μετασχηματισμός Fourier της συνάρτησης θα είναι γνωστός για κάθε (u, v) , και με χρήση του αντίστροφου μετασχηματισμού Fourier μπορεί να προκύψει η συνάρτηση:

$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(u, v) e^{j2\pi(ux+vy)} dudv \quad (4.7)$$

Έστω ότι οι συντεταγμένες (u, v) του πεδίου συχνότητας μετατρέπονται σε πολικές συντεταγμένες (w, θ) με βάση τις σχέσεις:

$$u = w \cos \theta$$

$$v = w \sin \theta$$

Επιπλέον, αλλάζοντας τα διαφορικά:

$$dudv = wdwd\theta$$

ο αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier από τη σχέση (4.7) γράφεται:

$$f(x, y) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} F(w, \theta) e^{j2\pi w(x \cos \theta + y \sin \theta)} w dw d\theta \quad (4.8)$$

Το ολοκλήρωμα ως προς τη γωνία θ μπορεί να διαχωριστεί σε δύο ολοκληρώματα: για θ μεταξύ 0 και π και για θ μεταξύ π και 2π :

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_0^{\infty} F(w, \theta) e^{j2\pi w(x \cos \theta + y \sin \theta)} w dw d\theta + \int_0^{\pi} \int_0^{\infty} F(w, \theta + \pi) e^{j2\pi w(x \cos(\theta + \pi) + y \sin(\theta + \pi))} w dw d\theta$$

Χρησιμοποιώντας την ιδιότητα του μετασχηματισμού Fourier:

$$F(w, \theta + \pi) = F(-w, \theta)$$

προκύπτει η ακόλουθη σχέση:

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \left[\int_{-\infty}^{\infty} F(w, \theta) |w| e^{j2\pi w t} dw \right] d\theta \quad (4.9)$$

όπου έχει τεθεί $t = x \cos \theta + y \sin \theta$.

Εάν ο δισδιάστατος μετασχηματισμός Fourier $F(w, \theta)$ αντικατασταθεί από τον μετασχηματισμό Fourier της προβολής σε γωνία θ , $S_{\theta}(w)$, προκύπτει:

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \left[\int_{-\infty}^{\infty} S_{\theta}(w) |w| e^{j2\pi w t} dw \right] d\theta \quad (4.10)$$

Το παραπάνω ολοκλήρωμα μπορεί να γραφτεί ως:

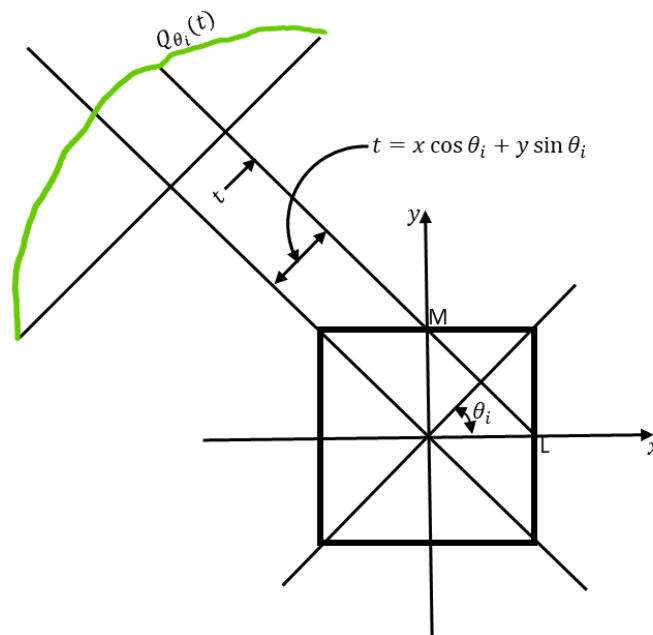
$$f(x, y) = \int_0^{\pi} Q_{\theta}(x \cos \theta + y \sin \theta) d\theta \quad (4.11)$$

όπου:

$$Q_{\theta}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} S_{\theta}(w) |w| e^{j2\pi w t} dw \quad (4.12)$$

Η σχέση (4.12) αντιπροσωπεύει το φιλτράρισμα της προβολής με φίλτρο που έχει απόκριση συχνότητας $|w|$. Για τον λόγο αυτό η $Q_{\theta}(t)$ ονομάζεται **φιλτραρισμένη προβολή**.

Η σχέση (4.11) σημαίνει ότι ο υπολογισμός της συνάρτησης $f(x, y)$ γίνεται με **οπισθοπροβολή** των φιλτραρισμένων προβολών. Συγκεκριμένα, για κάθε (x, y) αντιστοιχεί μία τιμή του $t = x \cos \theta + y \sin \theta$ για δοσμένη γωνία θ και η φιλτραρισμένη προβολή Q_{θ} συνεισφέρει στην ανακατασκευή με την τιμή της για $t = x \cos \theta + y \sin \theta$. Αυτό εξηγείται περαιτέρω στην Εικόνα 4.14. Για μία συγκεκριμένη τιμή της γωνίας θ , η τιμή του t είναι η ίδια για όλα για κάθε (x, y) στη γραμμή LM. Ως εκ τούτου, η φιλτραρισμένη προβολή θα έχει την ίδια συνεισφορά στην ανακατασκευή σε όλα αυτά τα σημεία. Με βάση αυτή την παρατήρηση, προκύπτει ότι κατά τη διαδικασία της ανακατασκευής κάθε φιλτραρισμένη προβολή προβάλλεται πίσω στο πεδίο ορισμού της συνάρτησης.



Εικόνα 4.14. Αναπαράσταση οπισθοπροβολής. Η φιλτραρισμένη προβολή στη θέση t έχει την ίδια συνεισφορά σε όλα τα σημεία στο επίπεδο $x - y$ κατά μήκος της γραμμής LM.

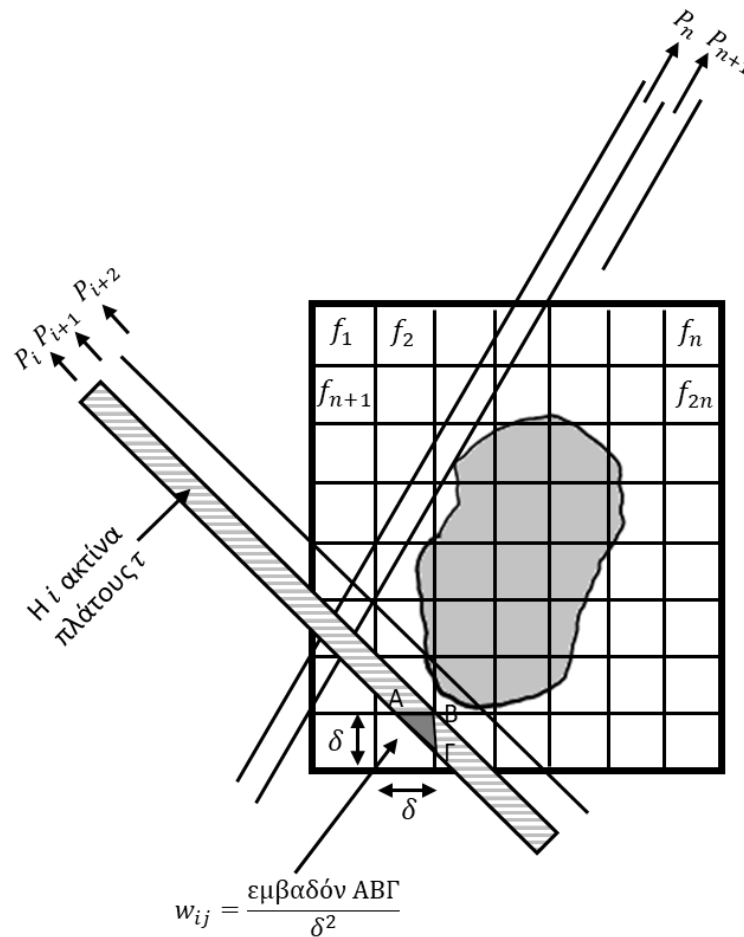
Όπως αναφέρθηκε, ο όρος $|w|$ δίνει την απόκριση συχνότητας του φίλτρου για το φιλτράρισμα των προβολών. Πρόκειται για μία συνάρτηση με μορφή ράμπας, η οποία δεν είναι ολοκληρώσιμη καθώς οι τιμές της εκτείνονται στο $\pm\infty$ με αποτέλεσμα να μην ορίζεται ο αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier αυτής. Στην πράξη, μηδενίζονται οι τιμές της $|w|$ εκτός ενός συγκεκριμένου διαστήματος συχνοτήτων. Ο πιο απλός τρόπος για αν επιτευχθεί αυτό είναι να διατηρηθούν αναλλοίωτες οι τιμές της συνάρτησης εντός του διαστήματος και να μηδενιστούν οι τιμές της εκτός αυτού. Δηλαδή η συνάρτηση $|w|$ πολλαπλασιάζεται με συνάρτησης μορφής π. Όμως ο τρόπος αυτός δημιουργεί τεχνικά σφάλματα. Συνήθως η συνάρτηση $|w|$ πολλαπλασιάζεται με μία πιο ομαλή συνάρτηση όπως είναι η συνάρτηση παραθύρου Hann:

$$H(w) = \begin{cases} \frac{1}{L} \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos \left(\frac{2\pi w}{L} \right) \right), & |w| \leq \frac{L}{2} \\ 0, & |w| > \frac{L}{2} \end{cases}$$

4.3.3.2 Αλγεβρικές Τεχνικές Ανακατασκευής

Μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση για την τομογραφική απεικόνιση συνίσταται στην υπόθεση ότι η οι τιμές των pixels μίας εικόνας είναι άγνωστοι και δημιουργούνται αλγεβρικές εξισώσεις για τους αγνώστους ως προς τα μετρούμενα δεδομένα προβολής. Αν και εννοιολογικά αυτή η προσέγγιση είναι πολύ απλούστερη από τη μέθοδο της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής δεν έχει την ακρίβεια και την ταχύτητα υλοποίησης της τελευταίας. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατό να μετρηθεί ένας μεγάλος αριθμός προβολών ή οι προβολές δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες σε 180° ή 360° (αναγκαίες συνθήκες στην τεχνική της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής για να προκύψουν αποτελέσματα με την ακρίβεια που επιθυμείται στην ιατρική απεικόνιση). Οι αλγεβρικές τεχνικές είναι επίσης χρήσιμες όταν οι διαδρομές διάδοσης ενέργειας μεταξύ της πηγής και ανιχνευτή υπόκεινται σε κάμψη ακτίνων λόγω διάθλασης ή όταν η διάδοση της ενέργειας υφίσταται εξασθένηση κατά μήκος των διαδρομών ακτίνων.

Έστω $f(x, y)$ μία συνάρτηση, που αντιπροσωπεύει μία εικόνα, και ένα τετραγωνικό πλέγμα στο πεδίο ορισμού της συνάρτησης. Θεωρείται ότι στο κελί j του πλέγματος η συνάρτηση $f(x, y)$ έχει σταθερή τιμή f_j , όπου $j = 1, 2, \dots, N$ και N είναι ο συνολικός αριθμός των κελιών (Εικόνα 4.15). Για τις αλγεβρικές τεχνικές μια ακτίνα ορίζεται κάπως διαφορετικά. Μια ακτίνα είναι τώρα μια «παχιά» γραμμή που διασχίζει το επίπεδο (x, y) . Για να φανεί αυτό στην Εικόνα 4.15, έχει γραμμοσκιαστεί μία ακτίνα ώστε να έχει πλάτος τ . Στις περισσότερες περιπτώσεις το πλάτος της ακτίνας είναι περίπου ίσο με το πλάτος του κελιού της εικόνας. Το ολοκλήρωμα γραμμής μπορεί να ονομαστεί τώρα άθροισμα κατά μήκος μίας ακτίνας.



Εικόνα 4.15. Στις αλγεβρικές μεθόδους ανακατασκευής, ένα τετραγωνικό πλέγμα τοποθετείται στο πεδίο ορισμού της εικόνας. Οι τιμές της εικόνας θεωρούνται σταθερές σε κάθε κελί του πλέγματος.

$$\sum_{j=1}^N w_{ij} f_j = p_i \quad (4.13)$$

όπου $i = 1, 2, \dots, M$, M είναι το συνολικό πλήθος ακτίνων (σε όλες τις προβολές) και w_{ij} είναι ο συντελεστής βάρους που αντιπροσωπεύει τη συνεισφορά του κελιού j στο ολοκλήρωμα ακτίνας i . Ο συντελεστής w_{ij} ισούται με το ποσοστό του εμβαδού του j κελιού το οποίο τέμνεται από την i ακτίνα, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.15. Γενικά, οι περισσότεροι συντελεστές w_{ij} έχουν μηδενικές τιμές καθώς μόνο ένα μικρό πλήθος κελιών συνεισφέρουν σε κάθε άθροισμα κατά μήκος μίας ακτίνας.

Εάν τα M και N είχαν μικρές τιμές, τότε η επίλυση των εξισώσεων που δίνονται από την (4.13) θα μπορούσε να γίνει με χρήση συμβατικών μεθόδων της άλγεβρας. Όμως, στην πράξη το N μπορεί να είναι 65.000 (για εικόνες 256×256) ή μεγαλύτερο και στις περισσότερες περιπτώσεις για εικόνες αυτού του μεγέθους, το M θα έχει παρόμοια τιμή. Για αυτές τις τιμές των M και N το μέγεθος του πίνακα $[w_{ij}]$ θα είναι 65.000×65.000 που καθιστά απαγορευτική τη χρήση κάποιας συμβατικής μεθόδου επίλυσης γραμμικού συστήματος εξισώσεων. Ακόμα και όταν $M < N$ θα πρέπει να

χρησιμοποιηθεί μία μέθοδος (ελάχιστα τετράγωνα) για την κατά προσέγγιση ικανοποίηση των εξισώσεων στην (4.13).

Για μεγάλες τιμές των M και N υπάρχουν επαναληπτικές μέθοδοι για την επίλυση των εξισώσεων (4.13). Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην «μέθοδο των προβολών» που προτάθηκε αρχικά από τον Kaczmarz [99] και στην συνέχεια επεκτάθηκε από τον Tanabe [100]. Συγκεκριμένα, αναπτύσσοντας τις εξισώσεις που δίνονται από την (4.13) έχουμε:

$$\begin{aligned} w_{11}f_1 + w_{12}f_2 + w_{13}f_3 + \dots + w_{1N}f_N &= p_1 \\ w_{21}f_1 + w_{22}f_2 + w_{23}f_3 + \dots + w_{2N}f_N &= p_2 \\ &\vdots \\ w_{M1}f_1 + w_{M2}f_2 + w_{M3}f_3 + \dots + w_{MN}f_N &= p_M \end{aligned} \quad (4.14)$$

Μία εικόνα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σημείο με συντεταγμένες $\mathbf{f} = (f_1, f_2, \dots, f_N)$ στον N -διάστατο χώρο. Στον χώρο αυτό, κάθε μία από τις παραπάνω εξισώσεις αντιπροσωπεύει ένα υπερεπίπεδο. Εάν υπάρχει μία μοναδική λύση αυτών των εξισώσεων, τότε το σημείο τομής όλων αυτών των υπερεπιπέδων είναι ένα μοναδικό σημείο που αντιπροσωπεύει αυτή τη λύση. Η έννοια αυτή απεικονίζεται στην Εικόνα 4.16, όπου για απλότητα έχει θεωρηθεί η περίπτωση δύο μόνο μεταβλητών f_1 και f_2 που ικανοποιούν τις εξισώσεις:

$$\begin{aligned} w_{11}f_1 + w_{12}f_2 &= p_1 \\ w_{21}f_1 + w_{22}f_2 &= p_2 \end{aligned} \quad (4.15)$$

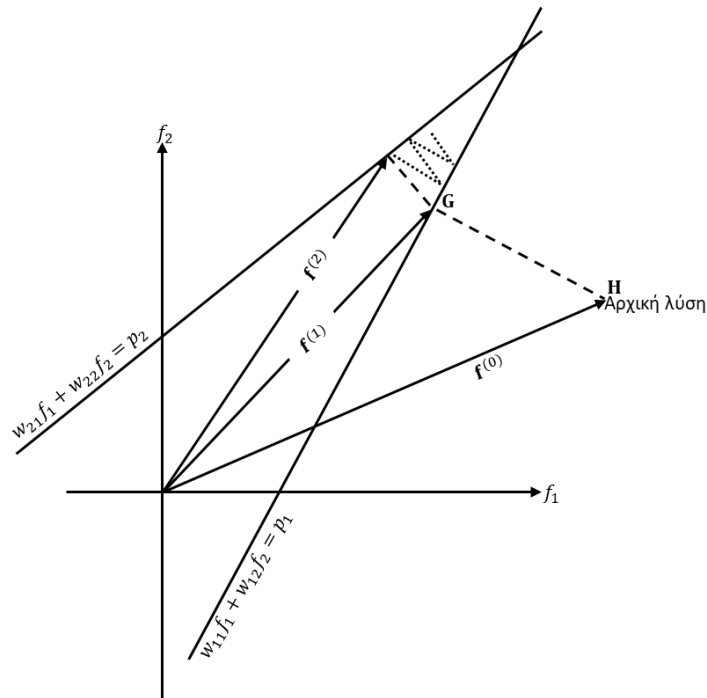
Η διαδικασία για την εύρεση της λύσης ξεκινάει με μία αρχική τυχαία επιλεγμένη λύση. Στη συνέχεια, γίνεται προβολή της στην πρώτη γραμμή και εκ νέου προβολή του προκύπτοντος σημείου στη δεύτερη γραμμή και πάλι προβολή στην πρώτη γραμμή κ.ο.κ. Εάν υπάρχει μία μοναδική λύση, οι επαναλήψεις θα συγκλίνουν πάντα σε αυτό το σημείο.

Έστω $\mathbf{f}^{(0)} = (f_1^{(0)}, f_2^{(0)}, \dots, f_N^{(0)})$ η αρχική λύση. Συνήθως, ως αρχική λύση επιλέγεται η μηδενική. Η αρχική λύση προβάλλεται στο υπερεπίπεδο που περιγράφεται από την πρώτη εξίσωση στη (4.14), δίνονται μία νέα λύση ($\mathbf{f}^{(1)}$ στην Εικόνα 4.16). Η λύση $\mathbf{f}^{(1)}$ προβάλλεται στο υπερεπίπεδο που περιγράφεται από την δεύτερη εξίσωση στη (4.14) δίνοντας τη λύση $\mathbf{f}^{(2)}$ κ.ο.κ. Γενικεύοντας, όταν η λύση $\mathbf{f}^{(i-1)}$ προβάλλεται στο υπερεπίπεδο που περιγράφεται από την i -στη εξίσωση στη (4.14), τότε η λύση που προκύπτει θα είναι [98]:

$$\mathbf{f}^{(i)} = \mathbf{f}^{(i-1)} - \frac{\mathbf{f}^{(i-1)} \cdot \mathbf{w}_i - p_i}{\mathbf{w}_i \cdot \mathbf{w}_i} \mathbf{w}_i \quad (4.16)$$

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

όπου $\mathbf{w}_i = (w_{i1}, w_{i2}, \dots, w_{iN})$ και $\mathbf{w}_i \cdot \mathbf{w}_i$ είναι το εσωτερικό γινόμενο του \mathbf{w}_i με τον εαυτό του.



Εικόνα 4.16. Γραφική απεικόνιση της μεθόδου του Kaczmarz επίλυσης αλγεβρικών εξισώσεων στις δύο διαστάσεις.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η υπολογιστική διαδικασία για την αλγεβρική ανακατασκευή αποτελείται από την έναρξη με μια αρχική (τυχαία) λύση, λαμβάνοντας διαδοχικές προβολές στα υπερεπίπεδα που αντιπροσωπεύονται από τις εξισώσεις (4.14) μέχρι να προκύψει η $\mathbf{f}^{(M)}$. Στην επόμενη επανάληψη, η $\mathbf{f}^{(M)}$ προβάλλεται στο υπερεπίπεδο που αντιπροσωπεύεται από την πρώτη εξίσωση της (4.14), και στη συνέχεια διαδοχικά στα υπόλοιπα υπερεπίπεδα της (4.14), για να δώσει τη $\mathbf{f}^{(2M)}$ και ούτω καθεξής. Ο Tanabe [100] έδειξε ότι εάν υπάρχει μια μοναδική λύση \mathbf{f}_s στο σύστημα των εξισώσεων (4.14), τότε:

$$\lim_{k \rightarrow \infty} \mathbf{f}^{(kM)} = \mathbf{f}_s \quad (4.17)$$

Εάν στην Εικόνα 4.16, τα δύο υπερεπίπεδα είναι κάθετα μεταξύ τους, τότε αν δίνεται μια αρχική λύση είναι δυνατόν να φτάσουμε στη σωστή λύση σε δύο μόνο επαναλήψεις. Από την άλλη πλευρά, εάν τα δύο υπερεπίπεδα έχουν πολύ μικρή γωνία μεταξύ τους, το k στην (4.17) μπορεί να αποκτήσει μεγάλη τιμή (ανάλογα με την αρχική λύση) πριν επιτευχθεί η σωστή λύση. Επομένως, οι γωνίες μεταξύ των υπερεπίπεδων επηρεάζουν σημαντικά τον ρυθμό σύγκλισης προς τη λύση. Εάν τα M υπερεπίπεδα στην (4.14) μπορούσαν να γίνουν ορθογώνια το ένα ως προς το άλλο, η σωστή λύση θα έβγαινε με ένα μόνο πέρασμα από τις M εξισώσεις (υποθέτοντας ότι υπάρχει μια μοναδική λύση). Αν και θεωρητικά μια τέτοια ορθογωνοποίηση είναι δυνατή χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, τη διαδικασία Gram-Schmidt, στην πράξη

δεν είναι υπολογιστικά εφικτή. Η πλήρης ορθογωνοποίηση θα έχει επίσης την τάση να ενισχύει τα αποτελέσματα του πάντα παρόντος θορύβου μέτρησης στην τελική λύση. Στην [101] προτάθηκε ένα σχήμα ορθογωνοποίησης κατά ζεύγη το οποίο είναι υπολογιστικά πιο εύκολο στην εφαρμογή και ταυτόχρονα αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα σύγκλισης. Μια απλούστερη τεχνική, που προτάθηκε για πρώτη φορά στην [102] είναι να επιλεγθεί προσεκτικά η σειρά με την οποία εξετάζονται τα υπερεπίπεδα. Δεδομένου ότι κάθε υπερεπίπεδο αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό ολοκληρώμα ακτίνων, είναι πολύ πιθανό τα γειτονικά ολοκληρώματα ακτίνων (και επομένως τα υπερεπίπεδα) να είναι σχεδόν παράλληλα. Επιλέγοντας υπερεπίπεδα που αντιπροσωπεύουν ευρέως διαχωρισμένα ολοκληρώματα ακτίνων, είναι δυνατό να βελτιωθεί ο ρυθμός σύγκλισης της προσέγγισης Kaczmarz.

Όταν $M < N$, δεν υπάρχει μοναδική λύση του συστήματος εξισώσεων (4.14) και στην πραγματικότητα, είναι δυνατός ένας άπειρος αριθμός λύσεων. Για παράδειγμα, αν υποθεθεί ότι είναι διαθέσιμη μόνο η πρώτη από τις δύο εξισώσεις στην (4.15) για τον υπολογισμό των δύο αγνώστων f_1 και f_2 , τότε η λύση μπορεί να βρίσκεται οπουδήποτε στη γραμμή που αντιστοιχεί σε αυτή την εξίσωση. Δεδομένης της αρχικής λύσης $\mathbf{f}^{(0)}$, το καλύτερο που θα μπορούσε να κάνει κανείς υπό τις περιστάσεις θα ήταν να σχεδιάσει μια προβολή από το σημείο $\mathbf{f}^{(0)}$ σε αυτή τη γραμμή και να ονομάσει το προκύπτον $\mathbf{f}^{(1)}$ ως τελική λύση. Συνεπώς, η λύση που λαμβάνεται με αυτόν τον τρόπο αντιστοιχεί σε εκείνο το σημείο της γραμμής που είναι πιο κοντά στην αρχική εικασία. Αυτό το αποτέλεσμα έχει αποδειχθεί από τον Tanabe [100] ο οποίος έδειξε ότι όταν $M < N$, η επαναληπτική προσέγγιση που περιγράφεται παραπάνω συγκλίνει σε μια λύση, έστω \mathbf{f}'_s , έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται το $\|\mathbf{f}'_s - \mathbf{f}^{(0)}\|$.

Σε εφαρμογές που απαιτούν μεγάλο αριθμό προβολών και όπου γίνονται ανακατασκευές μεγάλου μεγέθους, η δυσκολία με τη χρήση της (4.16) έγκειται στον υπολογισμό, την αποθήκευση και τη γρήγορη ανάκτηση των συντελεστών βάρους w_{ij} . Για παράδειγμα, έστω μια εικόνα με ένα πλέγμα 100×100 , με 100 προβολές και 150 ακτίνες σε κάθε προβολή. Ο συνολικός αριθμός των συντελεστών βαρύτητας, w_{ij} , που απαιτείται σε αυτή την περίπτωση είναι 10^8 , ο οποίος είναι ένας τεράστιος αριθμός και μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στη γρήγορη αποθήκευση και ανάκτηση σε εφαρμογές όπου η ταχύτητα ανακατασκευής είναι σημαντική.

Για να παρακαμφθούν οι δυσκολίες υλοποίησης που προκαλούνται από τους συντελεστές βάρους, έχουν προταθεί πολλές άλλες αλγεβρικές προσεγγίσεις, πολλές από τις οποίες είναι προσεγγίσεις της (4.16). Για να συζητήσουμε μερικές από τις πιο εφαρμόσιμες προσεγγίσεις, αναδιατυπώνουμε πρώτα την (4.16) σε μια ελαφρώς διαφορετική μορφή:

$$f_j^{(i)} = f_j^{(i-1)} + \frac{p_i - q_i}{\sum_{k=1}^N w_{ik}^2} w_{ij} \quad (4.18)$$

όπου:

$$q_i = \mathbf{f}^{(i-1)} \cdot \mathbf{w}_i = \sum_{k=1}^N f_k^{(i-1)} w_{ik} \quad (4.19)$$

Αυτές οι εξισώσεις λένε ότι όταν προβάλλουμε την $(i - 1)$ -οστή λύση στο i -οστό υπερεπίπεδο [i -οστή εξίσωση στην (4.14)] το επίπεδο του γκρι του j -οστού στοιχείου, του οποίου η τρέχουσα τιμή είναι $f_j^{(i-1)}$, λαμβάνεται διορθώνοντας την τρέχουσα τιμή του κατά $\Delta f_j^{(i)}$, όπου:

$$\Delta f_j^{(i)} = f_j^{(i)} - f_j^{(i-1)} = \frac{p_i - q_i}{\sum_{k=1}^N w_{ik}^2} w_{ij} \quad (4.20)$$

Πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ το p_i είναι το μετρούμενο άθροισμα κατά μήκος της i -οστής ακτίνας, το q_i μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι το υπολογισμένο άθροισμα κατά μήκος της ίδιας ακτίνας με βάση την $(i - 1)$ -οστή λύση για τα επίπεδα γκρι της εικόνας. Η διόρθωση Δf_j στο j -οστό κελί λαμβάνεται υπολογίζοντας πρώτα τη διαφορά μεταξύ του μετρούμενου και του υπολογισμένου αθροίσματος κατά μήκος της ακτίνας, κανονικοποιώντας τη διαφορά αυτή με $\sum_{k=1}^N w_{ik}^2$ και αναθέτοντας στη συνέχεια την τιμή αυτή σε όλα τα κελιά εικόνας στην i -οστή ακτίνα, ενώ κάθε ανάθεση σταθμίζεται με το αντίστοιχο w_{ij} .

Τεχνική ART (Algebraic Reconstruction Technique)

Σε πολλές υλοποιήσεις της εν λόγω τεχνικής τα w_{ik} στην (4.20) αντικαθίστανται απλώς από 1 και 0, ανάλογα με το αν το κέντρο του k -οστού κελιού εικόνας βρίσκεται εντός της i -οστής ακτίνας. Στην περίπτωση αυτή ο παρονομαστής στην (4.20) δίνεται από τη σχέση $\sum_{k=1}^N w_{ik}^2 = N_i$ που είναι ο αριθμός των κελιών εικόνας των οποίων τα κέντρα βρίσκονται εντός της i -οστής ακτίνας. Η διόρθωση στο j -οστό κελί εικόνας από την i - εξίσωση στην (4.14) μπορεί τώρα να γραφεί ως εξής:

$$\Delta f_j^{(i)} = \frac{p_i - q_i}{N_i} \quad (4.21)$$

για όλα τα κελιά των οποίων τα κέντρα βρίσκονται εντός της i -οστής ακτίνας. Ουσιαστικά επιμερίζεται η διαφορά $(p_i - q_i)/N_i$ σε αυτά τα κελιά εικόνας. Στη (4.21), τα q_i υπολογίζονται χρησιμοποιώντας την έκφραση (4.19), εκτός του ότι τώρα χρησιμοποιείται η δυαδική προσέγγιση για τα w_{ik} .

Η προσέγγιση στην (4.21), αν και εύκολη στην εφαρμογή, οδηγεί συχνά σε τεχνικά σφάλματα στις ανακατασκευασμένες εικόνες, ειδικά αν το N_i δεν είναι μια καλή

προσέγγιση του παρονομαστή. Ανώτερες ανακατασκευές μπορούν να ληφθούν εάν η (17) αντικατασταθεί από:

$$\Delta f_j^{(i)} = \frac{p_i}{L_i} - \frac{q_i}{N_i} \quad (4.22)$$

όπου L_i , είναι το μήκος (κανονικοποιημένο με δ , όπως ορίζεται στην Εικόνα 4.15) της i -οστής ακτίνας που διέρχεται από την περιοχή ανακατασκευής.

Η ART παρουσιάζει συνήθως τεχνικά σφάλματα, τα οποία προκαλούνται από τις ασυνέπειες που εισάγονται στο σύνολο των εξισώσεων από τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως για τα w_{ik} . Το αποτέλεσμα είναι ότι τα υπολογισμένα αθροίσματα κατά μήκος ακτίνων στην (4.19) είναι συνήθως κακές προσεγγίσεις των αντίστοιχων μετρούμενων αθροισμάτων κατά μήκος ακτίνων. Είναι δυνατόν να μειωθούν τα τεχνικά σφάλματα στις ανακατασκευές ART με χρήση χαλάρωσης, κατά την οποία ενημερώνουμε ένα εικονοστοιχείο κατά $a \cdot \Delta f_j^{(i)}$, όπου το a είναι μικρότερο από 1. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η παράμετρος χαλάρωσης a γίνεται συνάρτηση του αριθμού των επαναλήψεων, δηλαδή γίνεται προοδευτικά μικρότερη με την αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων. Οι βελτιώσεις που προκύπτουν στην ποιότητα της ανακατασκευής είναι συνήθως εις βάρος της σύγκλισης.

Τεχνική SIRT (Simultaneous Iterative Reconstructive Technique)

Σε αυτή την προσέγγιση, η οποία σε βάρος της βραδύτερης σύγκλισης, οδηγεί συνήθως σε εικόνες με καλύτερη εμφάνιση από εκείνες που παράγονται με το ART, χρησιμοποιείται και πάλι η (4.21) ή η (4.22) για να υπολογιστεί η αλλαγή $\Delta f_j^{(i)}$ στο j -οστό εικονοστοιχείο που προκαλείται από την i -οστή εξίσωση στην (4.14). Ωστόσο, η τιμή του j -οστού κελιού δεν αλλάζει αυτή τη στιγμή. Πριν από οποιαδήποτε αλλαγή, εξετάζονται όλες οι εξισώσεις και μόνο στο τέλος κάθε επανάληψης αλλάζουν οι τιμές των κελιών, ενώ η αλλαγή για κάθε κελί είναι η μέση τιμή όλων των υπολογισμένων αλλαγών για το συγκεκριμένο κελί. Αυτό αποτελεί μία επανάληψη του αλγορίθμου. Στη δεύτερη επανάληψη, χρησιμοποιείται πάλι η πρώτη εξίσωση της (4.14) και η διαδικασία επαναλαμβάνεται.

SART (Simultaneous Algebraic Reconstruction Technique)

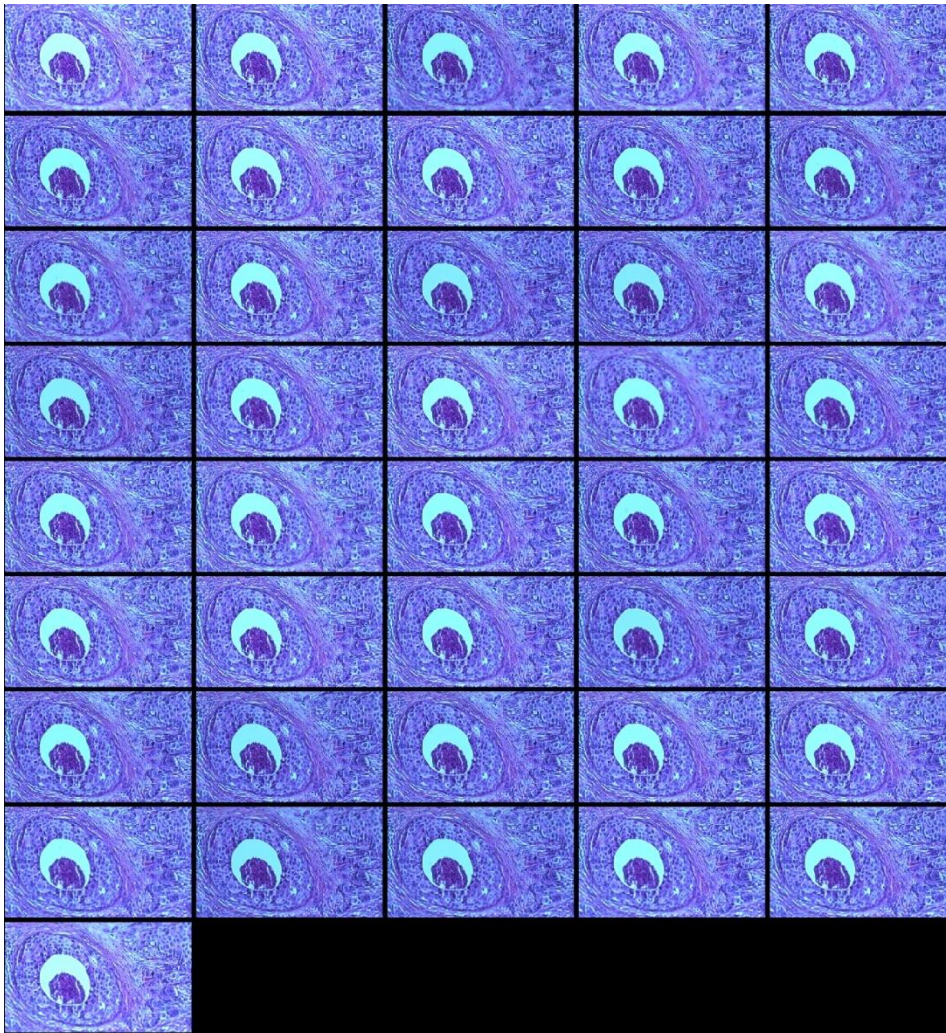
Η SART είναι μία παραλλαγή των αλγεβρικών προσεγγίσεων που συζητήθηκαν παραπάνω, η οποία φαίνεται να συνδυάζει τα καλύτερα στοιχεία της ART και της SIRT. Αυτή η τεχνική, που αναφέρθηκε για πρώτη φορά στην [103], αποδίδει ανακατασκευές καλής ποιότητας και αριθμητικής ακρίβειας σε μία μόνο επανάληψη. Τα βασικά σημεία της τεχνικής είναι: Πρώτον, για να μειωθούν τα σφάλματα στην προσέγγιση των ολοκληρωμάτων κατά μήκος ακτίνων μιας ομαλής εικόνας με πεπερασμένα αθροίσματα, γίνεται χρήση διγραμμικών στοιχείων. Επίσης, για μια κυκλική περιοχή ανακατασκευής, αποδίδονται μόνο μερικά βάρη στο πρώτο και το τελευταίο στοιχείο εικόνας στις επιμέρους ακτίνες. Για να μειωθεί περαιτέρω ο θόρυβος που προκύπτει από τις αναπόφευκτες, αλλά τώρα κατά πάσα πιθανότητα

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

σημαντικά μικρότερες ασυνέπειες με τα πραγματικά δεδομένα προβολής, οι όροι διόρθωσης εφαρμόζονται ταυτόχρονα για όλες τις ακτίνες σε μια προβολή: αυτό έρχεται σε αντίθεση με τις ενημερώσεις ανά ακτίνα στην ART. Επιπλέον, χρησιμοποιείται μια ευρετική διαδικασία για τη βελτίωση της ποιότητας των ανακατασκευών: χρησιμοποιείται ένα διαμήκες παράθυρο Hamming για να δοθεί έμφαση στις διορθώσεις που εφαρμόζονται κοντά στη μέση μιας ακτίνας σε σχέση με εκείνες που εφαρμόζονται κοντά στα άκρα της.

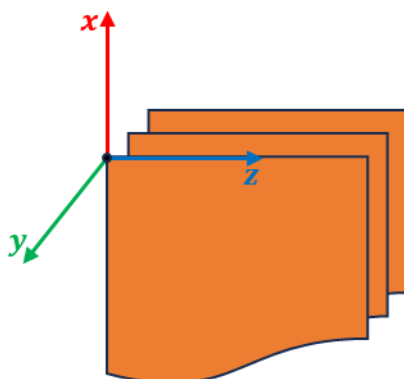
4.4 Αποτελέσματα

Η Εικόνα 4.17 παρουσιάζει τις εικόνες μίας τομής ιστού (μετά την ευθυγράμμιση) για εύρος γωνιών από -10° έως $+10^\circ$ με βήμα $0,5^\circ$ (συνολικά 41 εικόνες). Σε κάθε ευθυγραμμισμένη εικόνα έγινε περικοπή ώστε να αφαιρεθεί η μαύρη περιμετρική περιοχή που προκύπτει μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμού (βλ. Εικόνα 4.10(γ)). Η περικοπή έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε όλες οι εικόνες να έχουν τελικά τις ίδιες διαστάσεις.



Εικόνα 4.17. Εικόνες (μετά την ευθυγράμμιση) τομής ιστού για γωνίες από -10° έως $+10^\circ$ με βήμα $0,5^\circ$. Οι εικόνες είναι διατεταγμένες σε αύξουσα γωνία περιστροφής κατά γραμμές.

Ορίστηκε ένα τρισσορθογώνιο σύστημα αξόνων, όπου ο άξονας z είναι στη διεύθυνση των γραμμών των εικόνων²⁹, ο άξονας x είναι στη διεύθυνση των στηλών των εικόνων και ο άξονας y είναι κάθετος στο επίπεδο των εικόνων (Εικόνα 4.18).



Εικόνα 4.18. Ορισμός συστήματος συντεταγμένων.

Στη συνέχεια, για κάθε στήλη των εικόνων (δηλαδή για σταθερό z) έγινε ανακατασκευή με χρήση δύο μεθόδων:

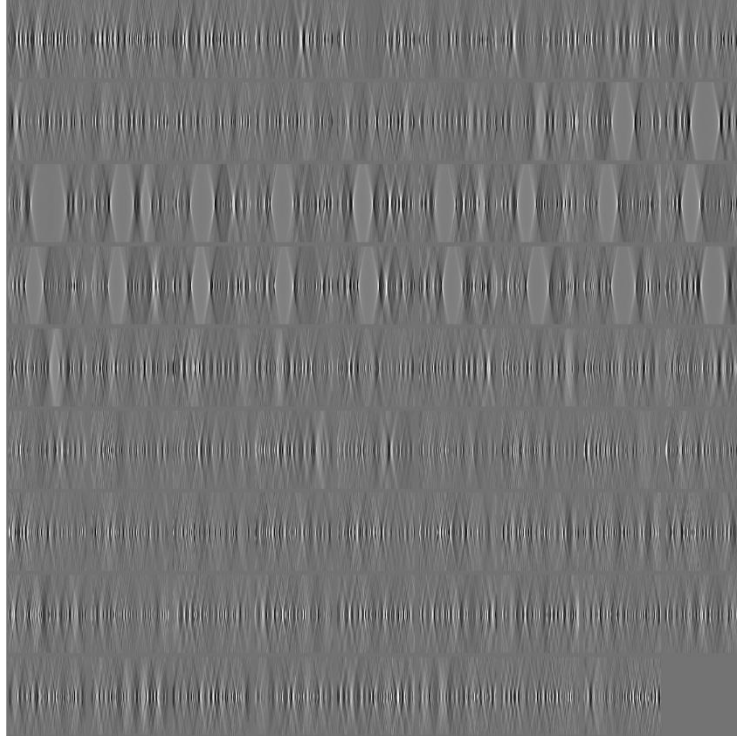
- Φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής
- Αλγεβρικής τεχνικής (ART)

Με αυτό τον τρόπο προέκυψαν εικόνες στο επίπεδο $x - y$ (αξονικό επίπεδο). Το πλήθος των εικόνων ήταν τόσο όσο το πλήθος των στηλών των αρχικών εικόνων. Με αναδιάταξη των γραμμών και των στηλών των εικόνων αυτών προέκυψαν εικόνες στα επίπεδα $y - z$ (οβελιαίο) και $x - z$ (στεφανιαίο).

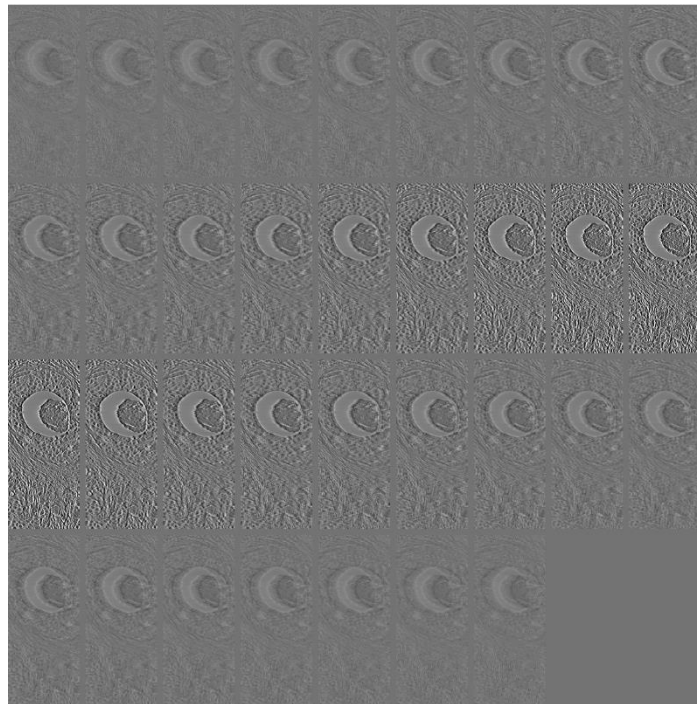
Η Εικόνα 4.19 παρουσιάζει εικόνες της τομογραφικής απεικόνισης στο αξονικό επίπεδο με χρήση της τεχνικής της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής. Η Εικόνα 4.20 και η Εικόνα 4.21 παρουσιάζουν εικόνες της τομογραφικής απεικόνισης στο στεφανιαίο και στο οβελιαίο επίπεδο αντίστοιχα. Σημειώνεται πως για οικονομία χώρου έχει γίνει σμίκρυνση των εικόνων.

²⁹ Ο άξονας z είναι παράλληλος με τον άξονα περιστροφής.

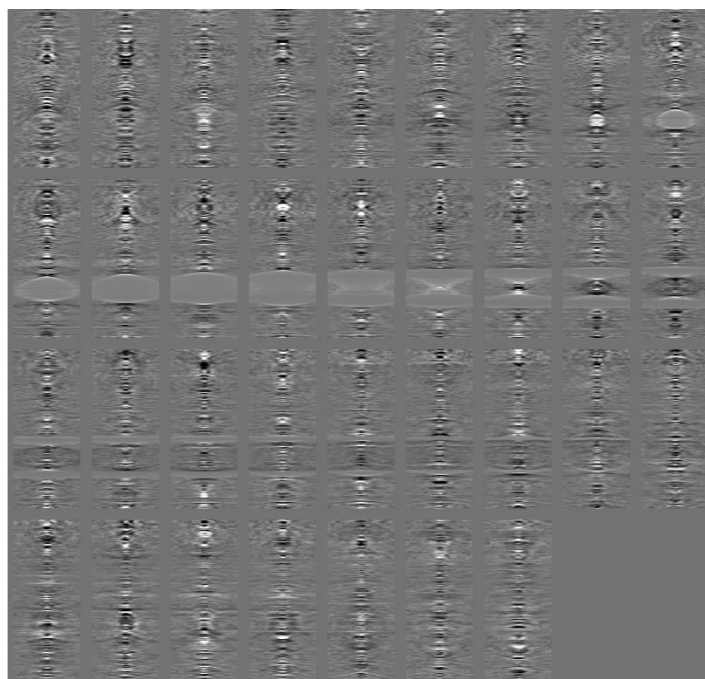
3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ



Εικόνα 4.19. Τομογραφική απεικόνιση στο αξονικό επίπεδο με χρήση της τεχνικής της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής.

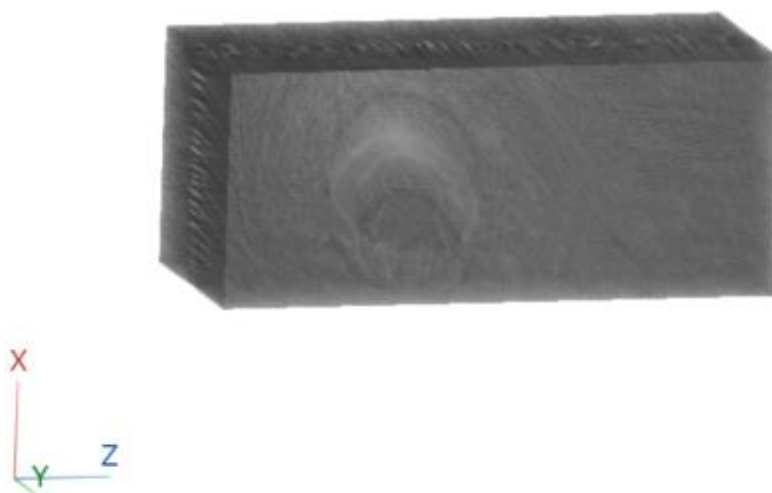


Εικόνα 4.20. Τομογραφική απεικόνιση στο στεφανιαίο επίπεδο με χρήση της τεχνικής της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής.



Εικόνα 4.21. Τομογραφική απεικόνιση στο οβελιαίο επίπεδο με χρήση της τεχνικής της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής.

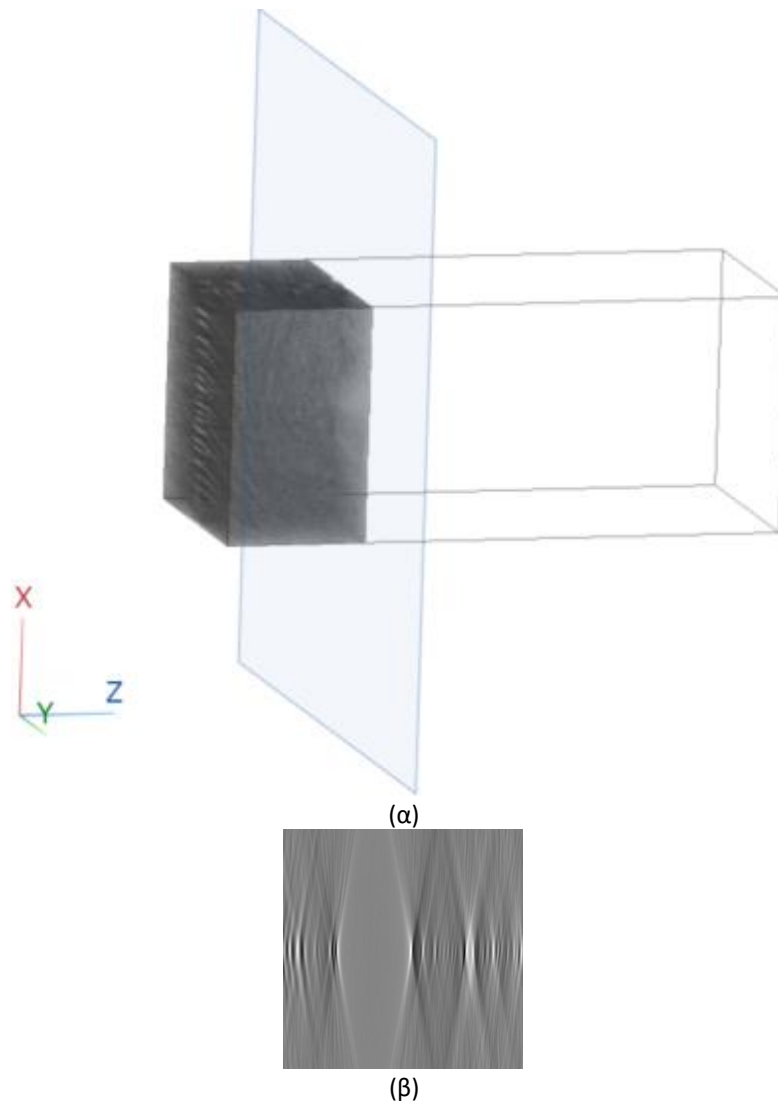
Η Εικόνα 4.22 παρουσιάζει την τρισδιάστατη ανακατασκευή της τομής ιστού χρησιμοποιώντας τις εικόνες που προέκυψαν από την τεχνική της φιλτραρισμένης προβολής.



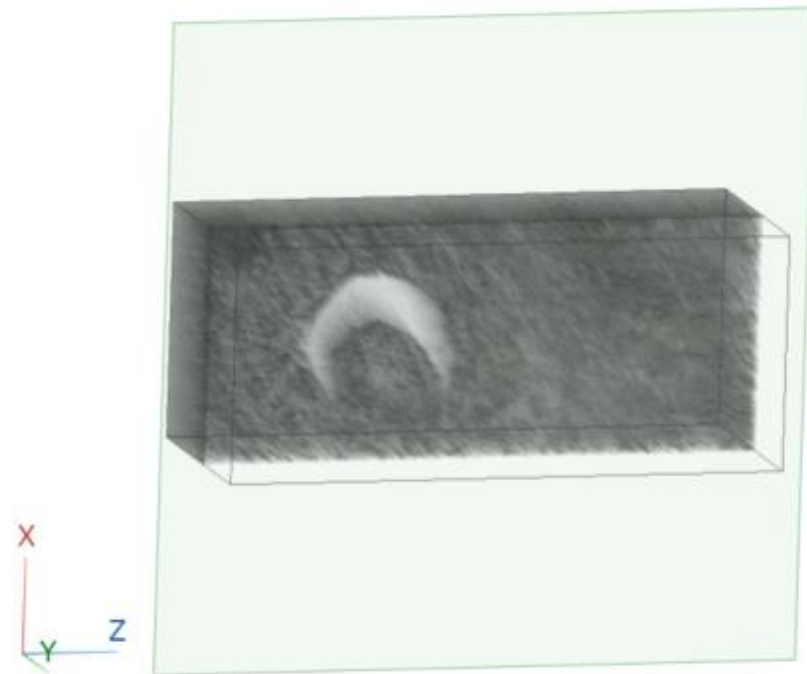
Εικόνα 4.22. Τρισδιάστατη ανακατασκευή τομής ιστού με χρήση της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής.

Η Εικόνα 4.23, Εικόνα 4.24 και η Εικόνα 4.25 παρουσιάζουν παραδείγματα εικόνων που δημιουργούνται στο αξονικό, στο στεφανιαίο και στο οβελιαίο επίπεδο αντίστοιχα.

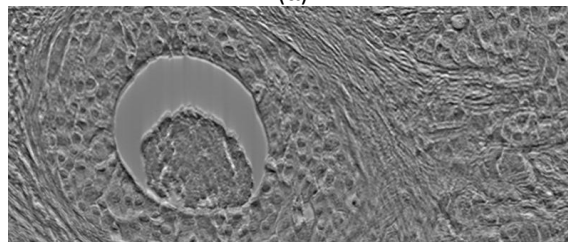
3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ



Εικόνα 4.23. Παράδειγμα εικόνας στο αξονικό επίπεδο με χρήση της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.

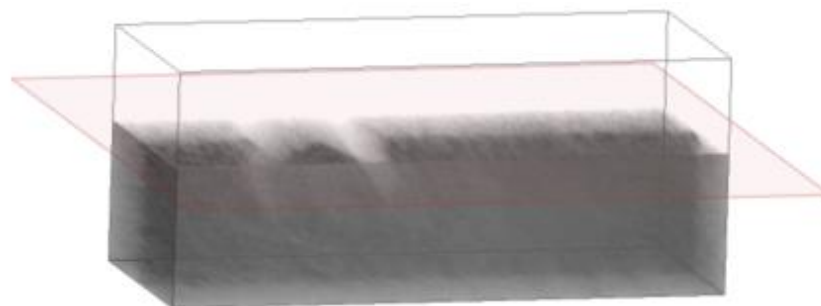


(α)

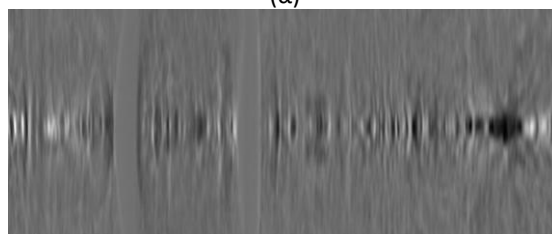


(β)

Εικόνα 4.24. Παράδειγμα εικόνας στο στεφανιαίο επίπεδο με χρήση της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.



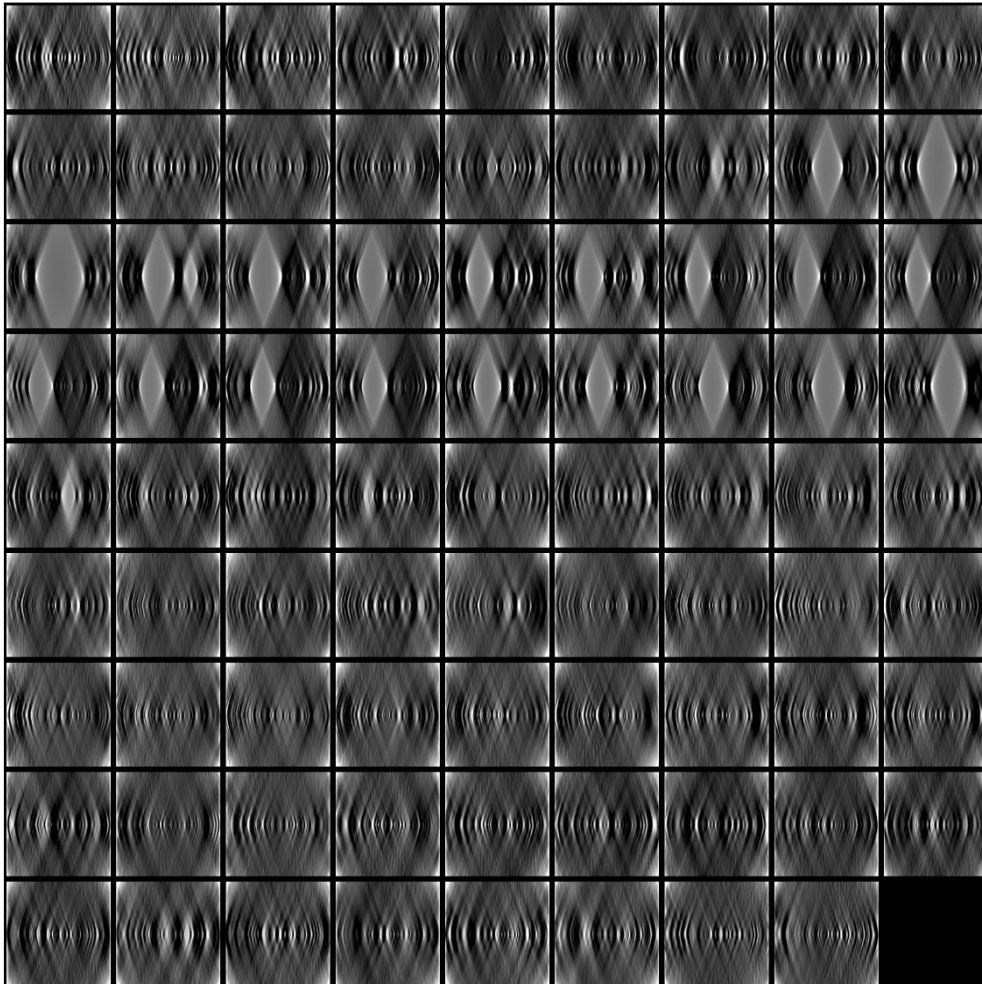
(α)



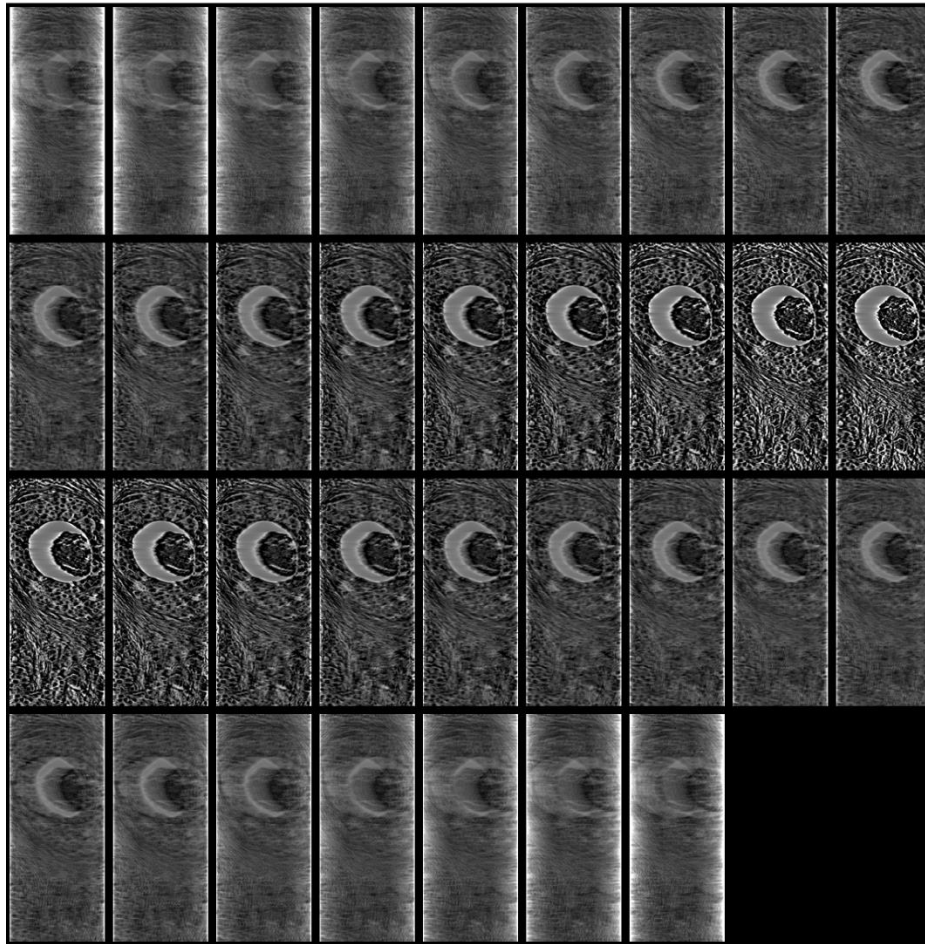
(β)

Εικόνα 4.25. Παράδειγμα εικόνας στο οβελιαίο επίπεδο με χρήση της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.

Η Εικόνα 4.26 παρουσιάζει εικόνες της τομογραφικής απεικόνισης στο αξονικό επίπεδο με χρήση της ART, με χρήση 10 επαναλήψεων. Η Εικόνα 4.27 και η Εικόνα 4.28 παρουσιάζουν εικόνες της τομογραφικής απεικόνισης στο στεφανιαίο και στο οβελιαίο επίπεδο αντίστοιχα.



Εικόνα 4.26. Τομογραφική απεικόνιση στο αξονικό επίπεδο με χρήση της ART.



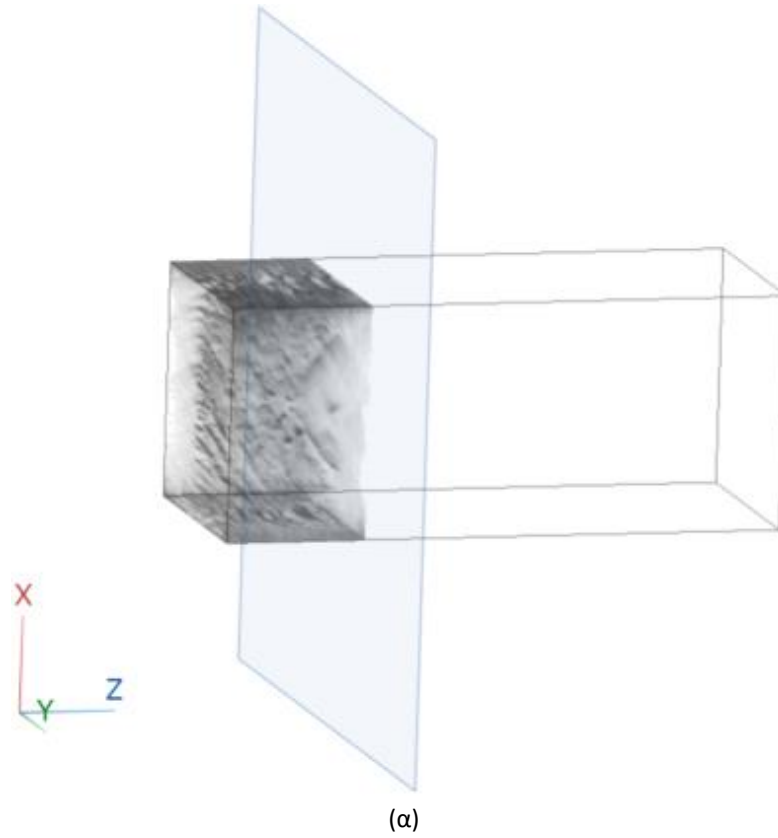
Εικόνα 4.27. Τομογραφική απεικόνιση στο στεφανιαίο επίπεδο με χρήση της ART.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ
ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ



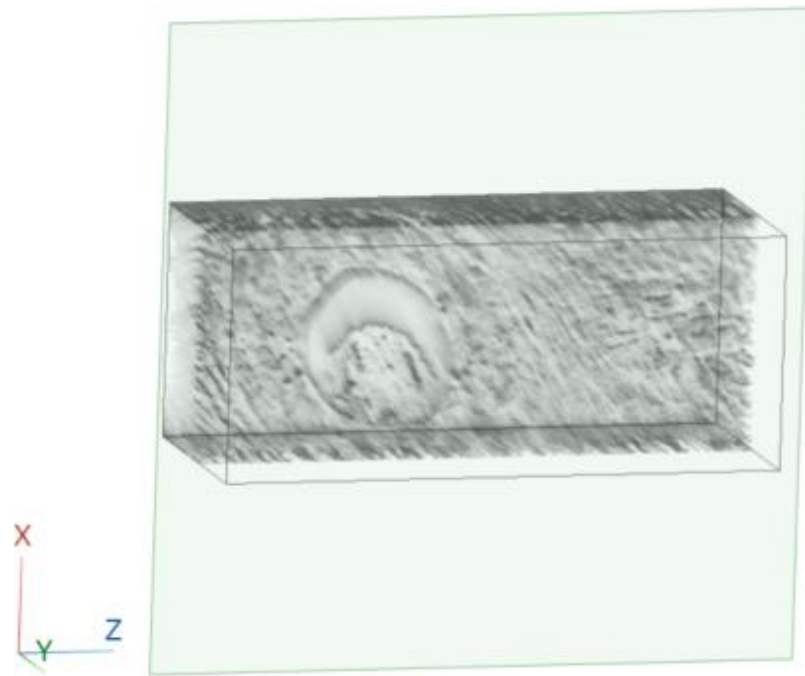
Εικόνα 4.28. Τομογραφική απεικόνιση στο οβελιαίο επίπεδο με χρήση της ART.

Εικόνα 4.29. Τρισδιάστατη ανακατασκευή τομής ιστού με χρήση της ART.

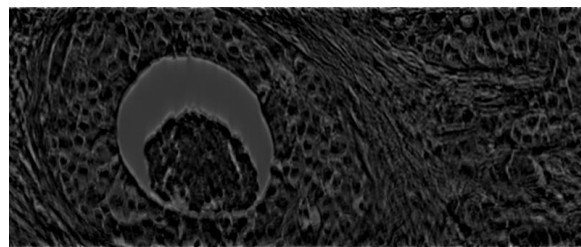


Εικόνα 4.30. Παράδειγμα εικόνας στο αξονικό επίπεδο με χρήση της ART. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

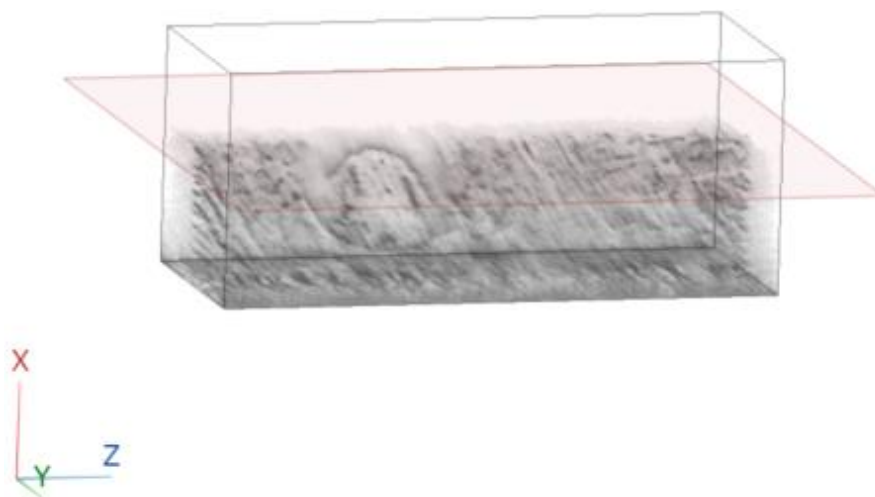


(α)

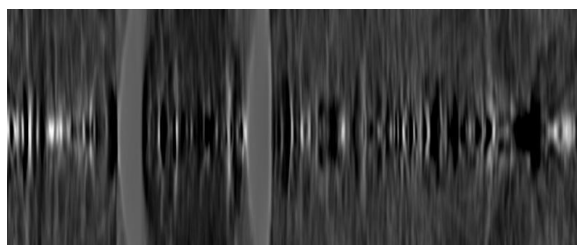


(β)

Εικόνα 4.31. Παράδειγμα εικόνας στο στεφανιαίο επίπεδο με χρήση της ART. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.



(α)

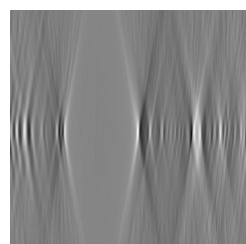


(β)

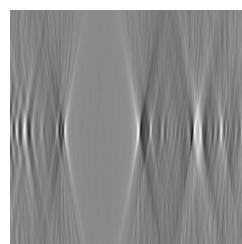
Εικόνα 4.32. Παράδειγμα εικόνας στο οβελιαίο επίπεδο με χρήση της ART. (α) Το επίπεδο που πάρθηκε η εικόνα. (β) Η εικόνα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι οι εικόνες έχουν ικανοποιητική ποιότητα, αλλά όπως ήταν αναμενόμενο παρουσίασαν κάποια τεχνικά σφάλματα, τα οποία είναι ιδιαίτερα εμφανή στις εικόνες του αξονικού επιπέδου (Εικόνα 4.23(β) Εικόνα 4.30(β)). Η ποιότητα των εικόνων θα μπορούσε να βελτιωθεί με χρήση κάποιων από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στην αρχή του κεφαλαίου. Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους ανακατασκευής, φαίνεται ότι η ART παράγει εικόνες με ελαφρώς καλύτερη αντίθεση.

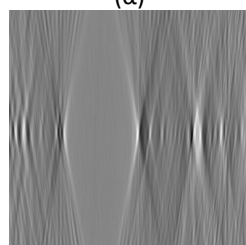
Η Εικόνα 4.33, Εικόνα 4.34 και η Εικόνα 4.35 παρουσιάζουν ενδεικτικές εικόνες που προέκυψαν από τη φιλτραρισμένη οπισθοπροβολή για το αξονικό, το στεφανιαίο και το οβελιαίο επίπεδο αντίστοιχα όταν χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό βήμα γωνίας για τη λήψη προβολών. Συγκεκριμένα, παρατίθενται αποτελέσματα για βήμα γωνίας $0,5^\circ$, 1° , 2° και 4° . Όπως ήταν αναμενόμενο καθώς αυξάνεται το βήμα της γωνίας, τα τεχνικά σφάλματα γίνονται πιο έντονα.



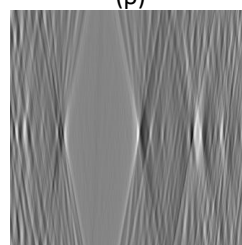
(α)



(β)

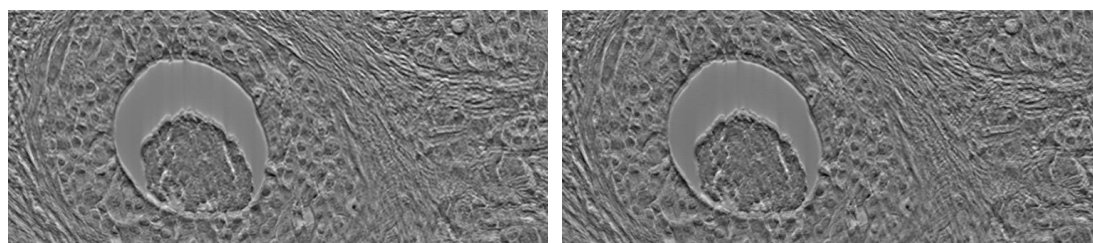


(γ)

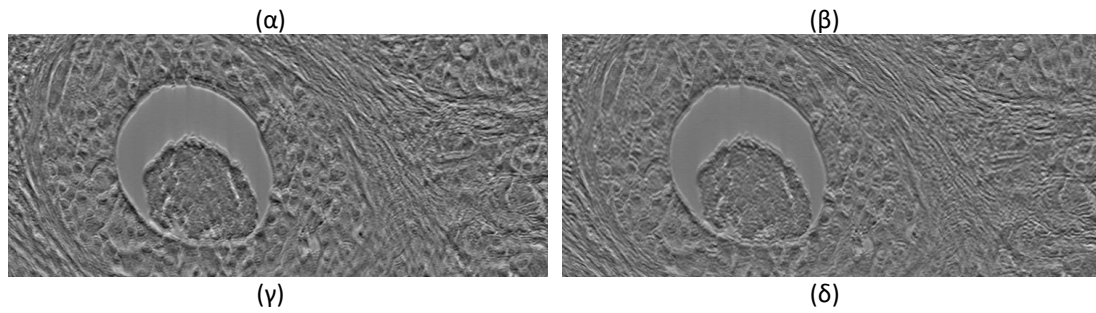


(δ)

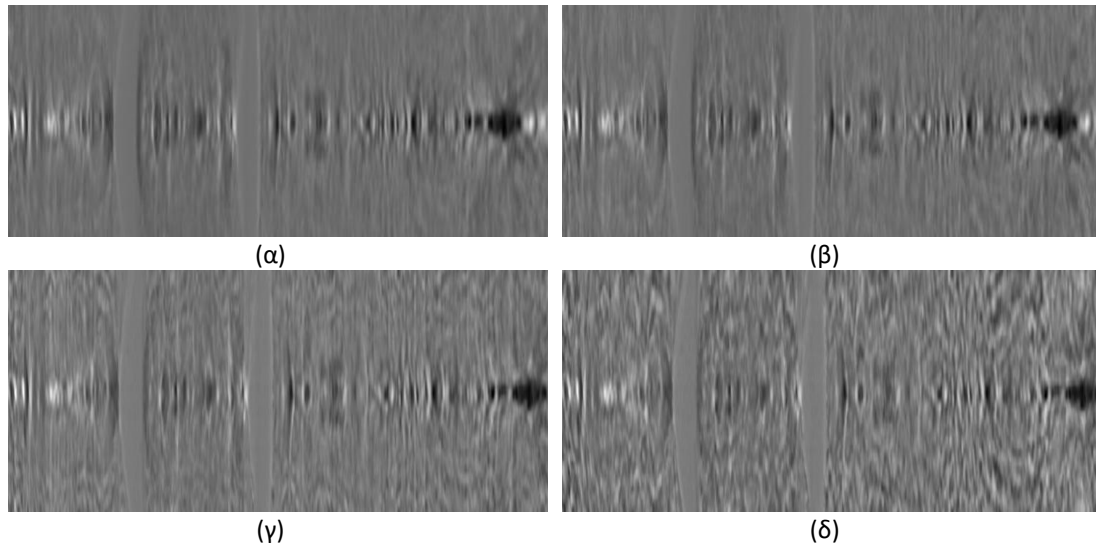
Εικόνα 4.33. Σύγκριση ανακατασκευής στο αξονικό επίπεδο της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής για βήμα γωνιών: (α) $0,5^\circ$ (β) 1° (γ) 2° (δ) 4° .



3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

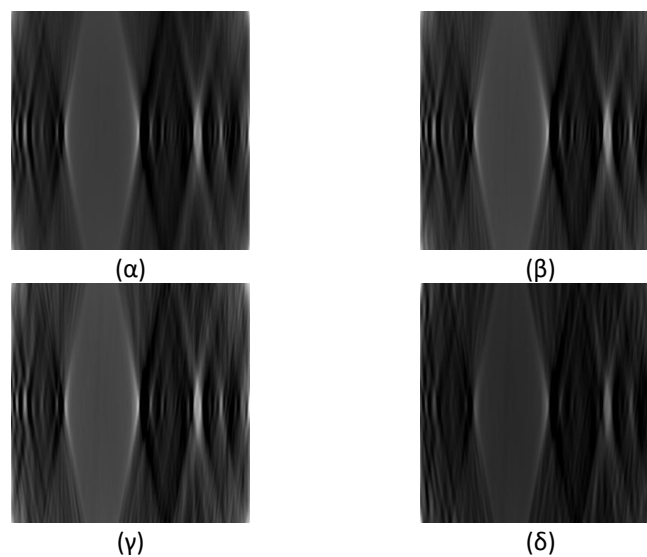


Εικόνα 4.34. Σύγκριση ανακατασκευής στο στεφανιαίο επίπεδο της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής για βήμα γωνιών: (α) $0, 5^\circ$ (β) 1° (γ) 2° (δ) 4° .

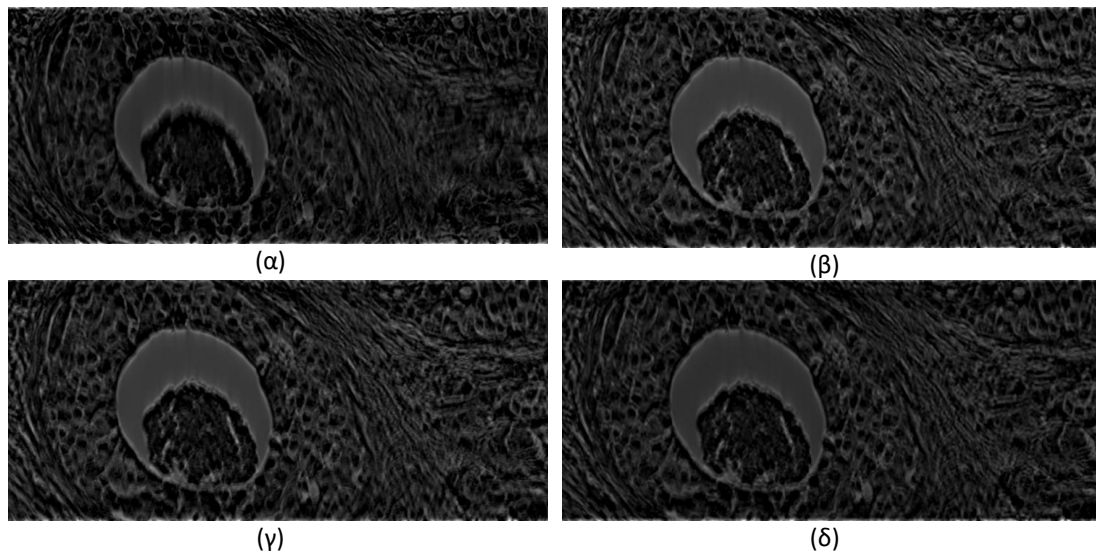


Εικόνα 4.35. Σύγκριση ανακατασκευής στο οβελιαίο επίπεδο της φιλτραρισμένης οπισθοπροβολής για βήμα γωνιών: (α) $0, 5^\circ$ (β) 1° (γ) 2° (δ) 4° .

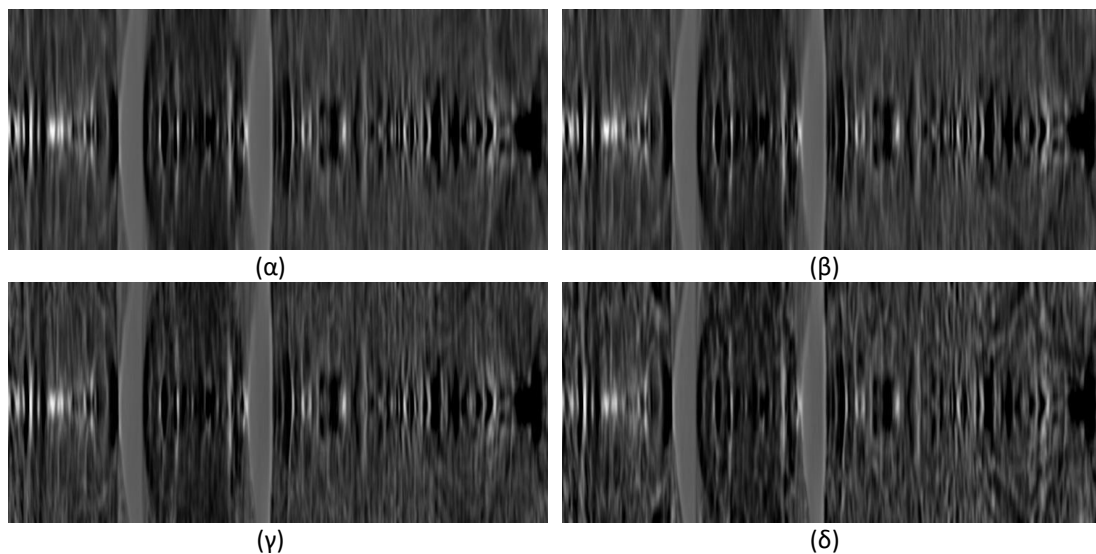
Αντίστοιχα αποτελέσματα για την ART παρουσιάζουν η Εικόνα 4.36, Εικόνα 4.37 και η Εικόνα 4.38.



Εικόνα 4.36. Σύγκριση ανακατασκευής στο αξονικό επίπεδο της ART για βήμα γωνιών: (α) $0, 5^\circ$ (β) 1° (γ) 2° (δ) 4° .

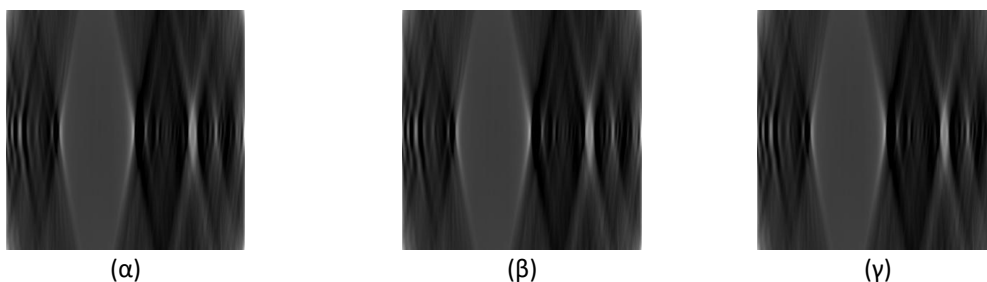


Εικόνα 4.37. Σύγκριση ανακατασκευής στο στεφανιαίο επίπεδο της ART για βήμα γωνιών: (α) 0, 5° (β) 1° (γ) 2° (δ) 4°.

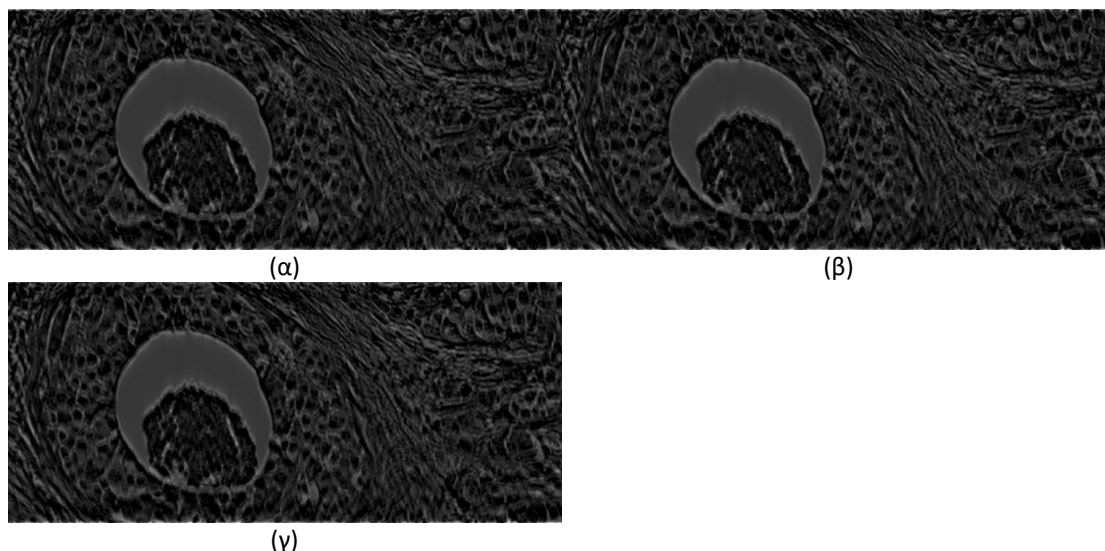


Εικόνα 4.38. Σύγκριση ανακατασκευής στο οβελιαίο επίπεδο της ART για βήμα γωνιών: (α) 0, 5° (β) 1° (γ) 2° (δ) 4°.

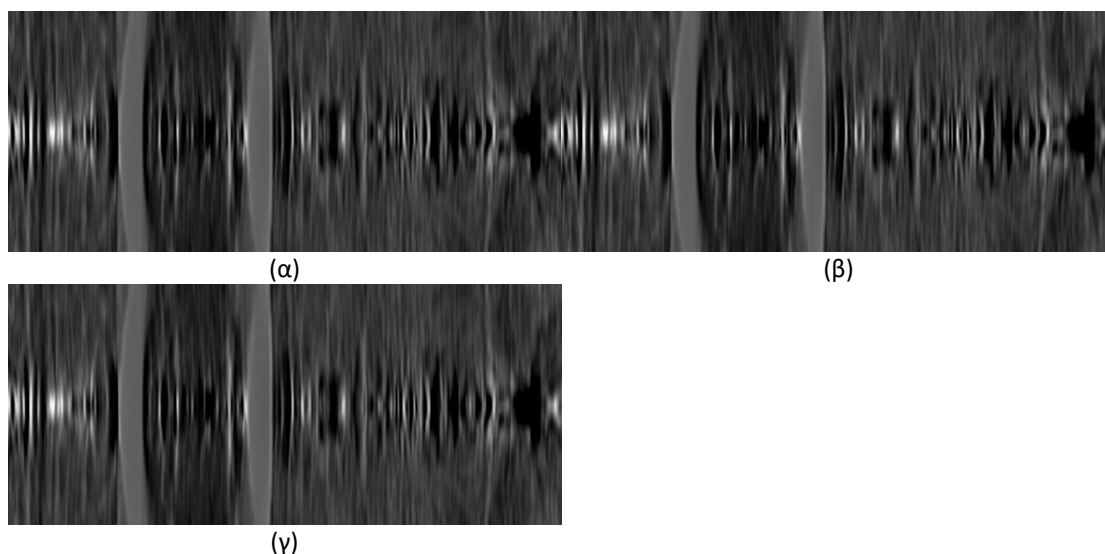
Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα η ART υλοποιήθηκε με χρήση 10 επαναλήψεων. Έγιναν επίσης δοκιμές και 5 και 15 επαναλήψεις. Η Εικόνα 4.39, Εικόνα 4.40, Εικόνα 4.41 παρουσιάζουν ενδεικτικές εικόνες που προέκυψαν για το αξονικό, το στεφανιαίο και το οβελιαίο επίπεδο, αντίστοιχα.



Εικόνα 4.39. Σύγκριση ανακατασκευής στο αξονικό επίπεδο της ART για (α) 10 επαναλήψεις, (β) 5 επαναλήψεις και (γ) 15 επαναλήψεις.



Εικόνα 4.40. Σύγκριση ανακατασκευής στο στεφανιαίο επίπεδο της ART για (α) 10 επαναλήψεις, (β) 5 επαναλήψεις και (γ) 15 επαναλήψεις.



Εικόνα 4.41. Σύγκριση ανακατασκευής στο οβελιαίο επίπεδο της ART για (α) 10 επαναλήψεις, (β) 5 επαναλήψεις και (γ) 15 επαναλήψεις.

Δεν παρατηρείται κάποια οπτική διαφοροποίηση. Συνεπώς, η ανακατασκευή μπορεί να γίνει επιτυχώς ακόμα και με 5 επαναλήψεις της ART.

4.5 Συζήτηση

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται μία μεθοδολογία για την τομογραφική απεικόνιση δειγμάτων ιστού με χρήση μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου. Η προτεινόμενη μεθοδολογία βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε τομή δείγματος έχει πεπερασμένο πάχος και, επομένως, είναι δυνατή η δημιουργία εικόνων σε διαφορετικά επίπεδα εντός της τομής, αποκαλύπτοντας λεπτομέρειες που πιθανώς δεν θα γίνονταν αντιληπτές με άλλο τρόπο. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, χρησιμοποιούνται οι βασικές αρχές της αξονικής τομογραφίας όσον αφορά στην ανακατασκευή εικόνων από προβολές. Δοκιμάστηκαν δύο κλασικοί αλγόριθμοι

ανακατασκευής: η φιλτραρισμένη οπισθοπροβολή και η τεχνική αλγεβρικής ανακατασκευής (ART). Η ανακατασκευή πραγματοποιήθηκε με περιορισμένο εύρος γωνιών για τη λήψη προβολών. Συγκεκριμένα, το εύρος των γωνιών περιορίστηκε μεταξύ -10° και $+10^\circ$ λόγω φυσικών περιορισμών. Οι εικόνες που προέκυψαν ήταν ικανοποιητικής ποιότητας, αλλά, όπως ήταν αναμενόμενο, παρουσίαζαν ορισμένα τεχνικά σφάλματα, τα οποία είναι ιδιαίτερα εμφανή στις εικόνες του αξονικού επιπέδου (Εικόνα 4.23(β) και Εικόνα 4.30(β)). Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους ανακατασκευής, φαίνεται ότι η ART παράγει εικόνες με ελαφρώς καλύτερη αντίθεση.

Παρόλο που οι ανακατασκευασμένες εικόνες μπορεί να μην φαίνονται τόσο ευκρινείς όσο οι αντίστοιχες της κλασικής δισδιάστατης προβολής, η κλινική αξιολόγηση που πραγματοποιήσαμε σε προηγούμενη μελέτη μας, έδειξε ότι οι ανακατασκευασμένες εικόνες βοηθούσαν τον ιατρό να ανακαλύψει νέες πληροφορίες που δεν ήταν εμφανείς στις δισδιάστατες εικόνες [91].

Η έννοια της τρισδιάστατης οπτικής τεμαχισμού των ιστών έχει διερευνηθεί σε προηγούμενες ερευνητικές προσπάθειες από διάφορες ερευνητικές ομάδες [104], [105], [106], [107], [108], [35], [45], [109], [68], [110], [111]. Ορισμένες από τις σημαντικότερες τεχνολογίες που έχουν προταθεί για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος θα μπορούσαν να θεωρηθούν η τομογραφία οπτικής προβολής (OPT) [112] και η μερικώς συνεκτική οπτική τομογραφία περίθλασης (PC-ODT) [113]. Η OPT απαιτεί ένα εξειδικευμένο όργανο κατασκευασμένο παρόμοια με το σύστημα αξονικής τομογραφίας ακτίνων Χ, απαιτεί πλήρη περιστροφή του δείγματος για τη δημιουργία τρισδιάστατων εικόνων όγκου. Η PC-ODT είναι μια μέθοδος που αποκωδικοποιεί και συνδυάζει στοίβες 2D εικόνων με βάση μετρήσεις κατανομής του δείκτη διάθλασης.

Ωστόσο, οι προηγούμενες μελέτες [104], [105], [106], [107], [108], [35], [45], [109], [68], [110], [111] ενδέχεται να παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς. Πρώτον, ορισμένες από τις προτεινόμενες μεθόδους απαιτούν σχεδόν πλήρη περιστροφή του δείγματος γύρω από την πηγή φωτός (ή πλήρη περιστροφή της πηγής γύρω από το δείγμα), γεγονός που τις καθιστά ακατάλληλες για υψηλές μεγεθύνσεις που απαιτούν στενή γειννίαση του δείγματος με τους στόχους. Δεύτερον, οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους δεν μπορούν να ενσωματωθούν ως αρθρωτό στοιχείο σε τυπικά μικροσκόπια φωτεινού πεδίου, απαιτώντας την αγορά ενός ειδικού, εξειδικευμένου οργάνου. Τρίτον, ενώ πολλές από αυτές τις μεθόδους έχουν πιθανές ιατρικές εφαρμογές, μόνο λίγες είναι ρεαλιστικά βιώσιμες για την κλινική πρακτική, παρά το γεγονός ότι είναι διαθέσιμες στην αγορά για πάνω από δύο δεκαετίες.

Αντίθετα, η προτεινόμενη μεθοδολογία τρισδιάστατης ανακατασκευής όγκου ιστού προσφέρει λύσεις σε αυτούς τους περιορισμούς. Πρώτον, δεν εξαρτάται από την απόσταση του δείγματος από τα αντικείμενα και δεν απαιτεί πλήρη περιστροφή του δείγματος. Αυτό επιτρέπει την παραγωγή τρισδιάστατων όγκων ιστών σε οποιαδήποτε επιθυμητή μεγέθυνση, υπό την προϋπόθεση ότι το δείγμα έχει πάχος κοντά στην απόσταση εργασίας του επιλεγμένου αντικειμενικού. Δεύτερον, δεν απαιτεί την απόκτηση ειδικού οργάνου- μπορεί να εφαρμοστεί με οποιοδήποτε

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

κανονικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου αντικαθιστώντας τη βάση του μικροσκοπίου με μια άλλη βάση που επιτρέπει επιπλέον περιστροφή περιορισμένης γωνίας γύρω από τον οριζόντιο άξονα. Τρίτον, η μέθοδος αυτή είναι ευέλικτη και μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών ρουτίνας, χωρίς να περιορίζεται σε εξειδικευμένα πρωτόκολλα.

Ωστόσο, η προτεινόμενη μέθοδος έχει και κάποιους περιορισμούς, ο σημαντικότερος από τους οποίους είναι ότι η ευκρίνεια των ανακατασκευασμένων εικόνων δεν φθάνει την ίδια ποιότητα με εκείνη των τυπικών αρχικών διδιάστατων εικόνων. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο λόγω τόσο της περιορισμένης γωνιακής περιστροφής όσο και του μικρού πάχους του δείγματος (10 μm). Η περιορισμένη γωνιακή περιστροφή μεταφράζεται σε περιορισμένο αριθμό δεδομένων προβολής, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη χρήση μεθόδων που βασίζονται στην παρεμβολή για την ολοκλήρωση του έργου της ανακατασκευής. Το τελευταίο σημαίνει ουσιαστικά ότι μπορούμε να πάρουμε μια πρόχειρη, θολή ιδέα του περιεχομένου της εικόνας. Μια πιθανή λύση είναι ο σχεδιασμός ενός πρωτότυπου του πλακιδίου πάνω στο οποίο είναι τοποθετημένο το δείγμα, ώστε να είναι δυνατή α/ μια ευρύτερη γωνιακή περιστροφή ακόμη και κατά τη χρήση υψηλότερων μεγεθύνσεων όπου το γυάλινο πλακίδιο και ο αντικειμενικός φακός βρίσκονται σε κοντινή απόσταση και β/ η φιλοξενία δειγμάτων μεγαλύτερου μεγέθους, επιτρέποντας τη δημιουργία αυξημένου αριθμού προβολικών επιπέδων κατά τη διαδικασία ανακατασκευής. Ένας άλλος περιορισμός είναι ότι απαιτείται μια ειδική έκδοση της προτεινόμενης πειραματικής πλατφόρμας για την προσαρμογή στη συγκεκριμένη διαμόρφωση κάθε διαφορετικού μικροσκοπίου. Αυτό μπορεί να μετριαστεί με τη δημιουργία μιας καθολικής βάσης μικροσκοπίου συγκράτησης δείγματος που θα περιλαμβάνει τη δυνατότητα περιστροφής του δείγματος. Η προσέγγιση αυτή θα εξαλείψει την ανάγκη προσάρτησης πρόσθετων εξαρτημάτων στο μικροσκόπιο για να καταστεί δυνατή η τρισδιάστατη ανακατασκευή εικόνας.

Δεδομένου ότι χρησιμοποιούμε μια συμβατική λάμπα αλογόνου, άρα μήκη κύματος εντός του οπτικού φάσματος, αντικειμενικό φακό $\times 10$ με αριθμητικό διάφραγμα 0,25 και ψηφιακή κάμερα με πραγματικό μέγεθος εικονοστοιχείου 2,78 $\mu\text{m} \times 2,78 \mu\text{m}$, η διακριτική ανάλυση του πειράματος μπορεί να θεωρηθεί κατά προσέγγιση ότι είναι 5 – 10 μm . Επιπλέον, η διακριτική ανάλυση υποβαθμίζεται περαιτέρω στους ανακατασκευασμένους όγκους λόγω παρεμβολής και ελλিপών δεδομένων προβολής, δεδομένου ότι χρησιμοποιούμε περιορισμένη γωνιακή περιστροφή του δείγματος. Μια πιο ρεαλιστική εκτίμηση της διακριτικής ανάλυσης του πλήρους πειράματος, συμπεριλαμβανομένης της διαδικασίας ανακατασκευής, θα μπορούσε να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο σύγκρισης, για παράδειγμα ένα ειδικά σχεδιασμένο ομοίωμα ή μια πολύ λεπτή φέτα ιστού.

Ένας άλλος περιορισμός της μελέτης είναι η ποσότητα του φωτός εκτός εστίασης που καταγράφεται λόγω του συγκρίσιμου μεγέθους του βάθους εστίασης και του πάχους του ιστού με αποτέλεσμα την περαιτέρω υποβάθμιση της διακριτικής ανάλυσης στους υπολογισμούς ανακατασκευής της εικόνας. Εκτός από τον

περιορισμό του βάθους εστίασης, οι κομητοειδείς εκτροπές³⁰ μπορεί να υποβαθμίσουν περαιτέρω την ποιότητα της εικόνας αυξάνοντας το θόλωμα. Εάν ο τομέας εφαρμογής της προτεινόμενης διάταξης ήταν η διερεύνηση μικρών δομών μεγέθους μερικών μμ, τότε η προτεινόμενη μέθοδος δεν θα παρήγαγε αξιόπιστα αποτελέσματα λόγω του προαναφερθέντος περιορισμού. Ωστόσο, το πεδίο εφαρμογής μας στοχεύει σε πολύ μεγαλύτερες δομές στην ιστοπαθολογία, όπως πυρήνες, συσσωματώσεις πυρήνων, έμβολα, αυλοί κ.λπ. Για το σκοπό αυτό, ζητήσαμε την αξιολόγηση από ένα ειδικό παθολογοανατόμο. Ο παθολογοανατόμος αναγνώρισε ότι οι παραγόμενες εικόνες δεν είχαν επαρκή ανάλυση και αντίθεση. Ωστόσο, παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο παθολογοανατόμος ήταν ακόμη σε θέση να εντοπίσει νέες πληροφορίες εντός των τρισδιάστατων εικόνων, οι οποίες ήταν είτε δύσκολο να παρατηρηθούν είτε εντελώς μη αναγνωρίσιμες στις δισδιάστατες εικόνες. Από αυτή την άποψη, ο παθολογοανατόμος βρήκε τις ανακατασκευασμένες τρισδιάστατες εικόνες πολύτιμες ως συμπληρωματικό σύνολο εικόνων που θα παρουσιαζόταν παράλληλα με τις συμβατικές παθολογοανατόμος εικόνες ιστού υψηλής ανάλυσης και υψηλής αντίθεσης.

Μια πιθανή λύση στους παραπάνω περιορισμούς θα ήταν η τροποποίηση της πειραματικής πλατφόρμας ώστε να είναι δυνατή α/ η ελεγχόμενη κίνηση του δείγματος κατά μήκος του άξονα z , η οποία θα παρήγαγε περισσότερες από μία εικόνες για κάθε προβολή, β/ η αφαίρεση των μη εστιασμένων τμημάτων για κάθε υποεικόνα της υπό εξέταση προβολής και γ/ η συρραφή/σύνδεση/συνδυασμός των καθαρών τμημάτων κάθε υποεικόνας για τη δημιουργία της τελικής εικόνας της συγκεκριμένης προβολής. Επιπλέον, οι υψηλής ποιότητας φακοί της διόρθωσης κομητοειδούς εκτροπής μπορούν να μειώσουν τη συνολική θολούρα στις ανακατασκευασμένες εικόνες που προκύπτουν.

Μια άλλη πιθανή λύση στους ανωτέρω περιορισμούς θα ήταν η χρήση ιστών με πάχος μεγαλύτερο από το βάθος εστίασης. Με αυτόν τον τρόπο, θα εξαλείφαμε, τουλάχιστον θεωρητικά, τον περιορισμό του βάθους εστίασης: Στο σενάριο μεγαλύτερου πάχους ιστού, θα έπρεπε να αντιμετωπίσουμε ένα πρόσθετο σύνολο προβλημάτων: η α/ χρώση είναι δύσκολο να διεισδύσει αποτελεσματικά σε ιστούς μεγαλύτερου πάχους. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η αντίθεση θα μειωθεί, β/ οι παχύτεροι ιστοί είναι πιο δύσκολο να κοπούν με ακρίβεια με τη μικροτόμο, γ/ θα ήταν δύσκολο να στερεωθούν ιστοί μεγαλύτερου πάχους στη συμβατική αντικειμενοφόρο πλάκα του μικροσκοπίου.

Παρά τις προαναφερθείσες προκλήσεις, ο μελλοντικός στόχος για την εξέλιξη αυτής της μελέτης είναι η προσαρμογή της προσέγγισης προς α/ την εξάλειψη της απαίτησης οποιασδήποτε χρώσης (με ανάλογο τρόπο όπως στην αξονική τομογραφία ακτίνων Χ), β/ τη διερεύνηση ιστών με πάχος μέχρι μερικά χιλιοστά,

³⁰ Οπτική εκτροπή που συμβαίνει όταν οι ακτίνες φωτός που εισέρχονται σε έναν φακό δεν εστιάζονται σε ένα σημείο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται παραμορφωμένα σχήματα σαν κομήτες στην εικόνα. Αυτή η εκτροπή είναι πιο έντονη προς την άκρη του οπτικού πεδίου. Η εκτροπή αυτή μπορεί να επηρεάσει τόσο τις εντός όσο και τις εκτός άξονα ακτίνες φωτός, προκαλώντας θόλωση και παραμόρφωση στο σχήμα σημειακών πηγών φωτός, όπως τα αστέρια.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

μέχρι το όριο διείσδυσης του οπτικού φωτός, και γ/ τη βελτίωση της ανάλυσης μέχρι την κλίμακα των μm.

Συμπερασματικά, στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάστηκε μια μέθοδος για την τομογραφική ανακατασκευή υλικού δείγματος ιστού. Η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να προσαρμοστεί σε οποιοδήποτε συμβατικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου με την αντικατάσταση της βάσης του μικροσκοπίου με μία νέα βάση που επιτρέπει την περιστροφή του δείγματος γύρω από τον οριζόντιο άξονα. Χρησιμοποιώντας κλασικούς αλγορίθμους τοπογραφικής ανακατασκευής σε περιορισμένες γωνίες, είναι δυνατή η διερεύνηση του δείγματος σε οποιοδήποτε επιθυμητό οπτικό επίπεδο, αποκαλύπτοντας πληροφορίες που θα ήταν δύσκολο να εντοπιστούν όταν εστιάζουμε μόνο στις συμβατικές δισδιάστατες εικόνες.

5 Συμπεράσματα – Μελλοντικές Επεκτάσεις

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάστηκαν δύο νέες τεχνικές που αφορούν στην τρισδιάστατη αναπαράσταση ιστού από εικόνες συμβατικού μικροσκοπίου. Η πρώτη τεχνική βασίζεται στο φυσικό τεμαχισμό δείγματος ιστού και λαμβάνει ως είσοδο δισδιάστατες εικόνες των τομών ενός ιστού και με τη χρήση κατάλληλων εργαλείων επεξεργασίας εικόνας παράγει τρισδιάστατη ανακατασκευή του ιστού. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3, η προτεινόμενη μέθοδος έχει πλεονεκτήματα αλλά και ορισμένους περιορισμούς. Ένα από τα πλεονεκτήματα της είναι ότι δεν υπάρχει εξάρτηση από την απόσταση του δείγματος από τους αντικειμενικούς φακούς, καθώς χρησιμοποιεί τυπικές ιστολογικές τομές τοποθετημένες σε συμβατικά πλακίδια μικροσκοπίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τρισδιάστατων όγκων ιστού σε οποιαδήποτε επιθυμητή μεγέθυνση. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι ότι δεν απαιτείται η αγορά ειδικού οργάνου, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε συμβατικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, χωρίς καμία τροποποίηση ή προσθήκη εξαρτημάτων του μικροσκοπίου, χωρίς αλλαγή των τυπικών βημάτων ρουτίνας χειρισμού των ιστολογικών δειγμάτων και χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένης εκπαίδευσης των εμπλεκόμενων τεχνικών/ιατρών. Τέλος, η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιαδήποτε δεδομένη εφαρμογή ρουτίνας, όχι μόνο για ορισμένα εξειδικευμένα πρωτόκολλα. Από την άλλη πλευρά, οι τρισδιάστατες εικόνες που παράγονται δεν έχουν το ίδιο επίπεδο ευκρίνειας που συναντάται στις τυπικές δισδιάστατες εικόνες ή στις εικόνες τομογραφίας οπτικής προβολής. Αυτό ήταν αναμενόμενο, δεδομένου ότι γίνεται χρήση περιορισμένου αριθμού τομών με αποτέλεσμα, μικρές δομές όπως πυρήνες ή κύτταρα μπορεί να εμφανίζονται μόνο σε περιορισμένο αριθμό διαδοχικών τομών, συνήθως γύρω στις 3-4 τομές. Για να βελτιωθεί η ευκρίνεια της εικόνας στην προτεινόμενη μέθοδο, μπορεί να είναι απαραίτητο να μειωθεί το πάχος των τομών (τομές <math><2\mu\text{m}</math>) και να αυξηθεί σημαντικά ο αριθμός των διαδοχικών τομών (πέραν των 20 διαδοχικών τομών). Εκτός από την περιορισμένη ανάλυση, ένα άλλος περιορισμός είναι ότι η τεχνική βασίζεται στον φυσικό τεμαχισμό του δείγματος, σε αντίθεση με την τομογραφία οπτικής προβολής, η οποία χρησιμοποιεί οπτικό τεμαχισμό του δείγματος.

Η δεύτερη τεχνική βασίζεται στον οπτικό τεμαχισμό μίας τομής ιστού και αποσκοπεί στην τομογραφική απεικόνιση της τομής ώστε να αποκαλυφθούν πληροφορίες που «κρύβονται» εντός της τομής. Η εφαρμογή της απαιτεί τη χρήση ενός ειδικού μηχανισμού που περιλαμβάνει έναν βηματικό κινητήρα και έναν μικροελεγκτή και έχει τη δυνατότητα να περιστρέφει το πλακίδιο με την τομή του ιστού σε διάφορες γωνίες, σε ένα εύρος $\pm 10^\circ$. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να δημιουργηθούν οπτικές προβολές, σε αντιστοιχία με αυτό που συμβαίνει στην τομογραφία οπτικών προβολών. Η τεχνική αυτή απαιτεί λιγότερο εξειδικευμένο εξοπλισμό από αυτόν που

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

χρειάζεται η τομογραφία οπτικών προβολών. Κάνει χρήση περιορισμένου αριθμού προβολών, το οποίο σημαίνει ότι η διαδικασία εκτελείται γρήγορα. Όμως, ο περιορισμένος αριθμός προβολών δημιουργεί τεχνικά σφάλματα στις εικόνες που προκύπτουν. Η μείωση ή εξάλειψη των σφαλμάτων αυτών μπορεί να γίνει με κάποια τεχνική που έχει προταθεί στη βιβλιογραφία για την τομογραφική ανακατασκευή από περιορισμένο αριθμό προβολών στην αξονική τομογραφία, όπως για παράδειγμα αραιή κανονικοποίηση ή τεχνικές βαθιάς μάθησης με χρήση συνελικτικών νευρωνικών δικτύων.

Βιβλιογραφία

- [1] Pliny the Elder, "The Natural History," London, John Bostock, 1855.
- [2] E. Abbe, "Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der Mikroskopischen Wahrnehmung," *Archives Microscope Anat*, vol. 9, pp. 413-418, 1873.
- [3] E. Abbe, «On the Estimation of Aperture in the Microscope,» *Journal of the Royal Microscopical Society*, τόμ. 1, αρ. 3, pp. 388-423, 1881.
- [4] H. Siedentopf and R. Zsigmondy, "Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung Ultramikroskopischer Teilchen, mit Besonderer Anwendung auf Goldrubingläser," *Annalen der Physik*, vol. 315, no. 1, pp. 1-39, 1902.
- [5] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt and E. H. Stelzer, "Optical Sectioning Deep inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy," *Science*, vol. 305, no. 5686, pp. 1007-1009, 2004.
- [6] F. von Zernike, "Beugungstheorie des Schneidenver-Fahrens und Seiner Verbesserten Form, der Phasenkontrastmethode," *Physica*, vol. 1, no. 7, pp. 689-704, 1934.
- [7] M. Minsky, "Microscopy Apparatus". United States Patent US3013467A, 19 December 1961.
- [8] J. G. White and W. B. Amos, "Confocal Microscopy Comes of Age," *Nature*, vol. 328, no. 6126, pp. 18-184, 1987.
- [9] W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy", *Science (New York)*, vol. 248, no. 4951, pp. 73-76, 1990.
- [10] J. Girkin, *A Practical Guide to Optical Microscopy*, Boca Raton: CRC Press, 2019.
- [11] E. Hecht, *Optics*, London: Pearson, 2017.
- [12] M. H. Weik, "Fresnel reflection," in *Computer Science and Communications Dictionary*, Boston, Springer, 2000.
- [13] G. B. Airy, "On the diffraction of an aobject-glass with circular aperture," *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, pp. 283-291, 1835.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

- [14] A. Koehler, "New method of illumination for photomicrographical purposes," *Journal of the Royal Microscopical Society*, vol. 14, pp. 261-262, 1894.
- [15] L. Gartner, *Textbook of Histology*, Philadelphia: Elsevier, 2017.
- [16] S. W. Hell and J. Wichmann, "Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy," *Optics Letters*, vol. 19, no. 11, pp. 780-782, 1994.
- [17] T. A. Klar and S. W. Hell, "Subdiffraction Resolution in Far-Field Fluorescence Microscopy," *Optics Letters*, vol. 24, no. 14, pp. 954-956, 1999.
- [18] P. Dey, *Basic and Advanced Laboratory*, Springer, 2018.
- [19] D. J. Lowrie Jr., *Histology: An Essential Textbook*, New York: Thieme Publishers, 2020.
- [20] D. Wolfe, "Tissue processing," in *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, S. K. Suvarna, C. Layton and J. D. Bancroft, Eds., Elsevier, 2019, pp. 74-83.
- [21] V. D. Shields and T. Heinbockel, "Introductory Chapter: Histological Microtechniques," in *Histology*, T. Heinbockel and V. D. Shields, Eds., IntechOpen, 2019.
- [22] R. W. Horobin, "Biological staining: mechanisms and theory," *Biotech Histochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 3-13, 2002.
- [23] P. Prentø, «A contribution to the theory of biological staining based on the principles for structural organization of biological macromolecules,» *Biotech Histochem*, τόμ. 76, αρ. 3, pp. 137-161, 2001.
- [24] H. Lyon, *Theory and strategy of histochemistry: a guide to the selection and understanding of techniques*, Berlin: Springer-Verlag, 1991.
- [25] J. K. Chan, "The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology," *Int J Surg Pathol*, vol. 22, no. 1, pp. 12-32, 2014.
- [26] N. S. Goldstein, "Diagnostic errors in surgical pathology," *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 19, no. 4, pp. 743-756, 1999.
- [27] S. S. Raab, D. M. Grzybicki, J. E. Janosky, R. J. Zarbo, F. A. Meier, C. Jensen and S. J. Geyer, "Clinical impact and frequency of anatomic pathology errors in cancer diagnoses," *Cancer*, vol. 104, no. 10, pp. 2205-2013, 2005.
- [28] J. E. Roy and J. L. Hunt, "Detection and classification of diagnostic discrepancies (errors) in surgical pathology," *Advances in Anatomic Pathology*, vol. 17, no. 5, pp. 359-365, 2010.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

- [29] D. E. Newman-Toker, A. C. Schaffer, C. W. Yu-Moe, N. Nassery, A. S. Saber Tehrani, G. D. Clemens, Z. Wang, Y. Zhu, M. Fanai and D. Siegal, "Serious misdiagnosis-related harms in malpractice claims: The "big three" - vascular events, infections, and cancers," *Diagnosis*, vol. 6, no. 3, pp. 227-240, 2019.
- [30] E. David, K. M. Newman-Toker and D. O. Meltzer, "How much diagnostic safety can we afford, and how should we decide? A health economics perspective," *BMJ Quality and Safety*, vol. 22, pp. 11-20, 2013.
- [31] G. D. Schiff, "Diagnosis and diagnostic errors: Time for a new paradigm," *BMJ Quality and Safety*, vol. 23, no. 1, pp. 1-3, 2014.
- [32] C. J. Sheppard, "Resolution and super-resolution," *Microscopy Research and Technique*, vol. 80, no. 6, pp. 590-598, 2017.
- [33] C. J. Sheppard, M. Castello, G. Tortarolo, G. Vicidomini and A. Diaspro, "Image formation in image scanning microscopy, including the case of two-photon excitation," *Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision*, vol. 34, no. 8, pp. 1339-1350, 2017.
- [34] D. L. Spector and R. D. Godlman, Basic methods in microscopy, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.
- [35] J. Sharpe, "Optical projection tomography as a new tool for studying embryo anatomy," *Journal of Anatomy*, vol. 202, no. 2, pp. 175-181, 2003.
- [36] B. Belay, J. T. Koivisto, J. Parraga, O. Koskela, T. Montonen, M. Kellomäki, E. Figueiras and J. Hyttinen, "Optical projection tomography as a quantitative tool for analysis of cell morphology and density in 3D hydrogels," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, 2021.
- [37] M. Paknezhad, S. Y. M. Loh, Y. Choudhury, V. K. C. Koh, T. T. K. Yong, H. S. Tan, R. Kaneshvaran, P. H. Tan, J. Y. S. Peng, W. Yu, Y. B. Tan, Y. Z. Loy, M. H. Tan and H. K. Lee, "Regional registration of whole slide image stacks containing major histological artifacts," *BMC Bioinformatics*, vol. 21, no. 1, 2020.
- [38] S. P. X. Davis, S. Kumar, Y. Alexandrov, A. Bhargava, G. da Silva Xavier, G. A. Rutter, P. Frankel, E. Sahai, S. Flaxman, P. M. W. French and J. McGinty, "Convolutional neural networks for reconstruction of undersampled optical projection tomography data applied to in vivo imaging of zebrafish," *Journal of Biophotonics*, vol. 12, no. 12, 2019.
- [39] W. Du, C. Fei, J. Liu, Y. Li, Z. Liu, X. Zhao and J. Fang, "Optical projection tomography using a commercial microfluidic system," *Micromachines*, vol. 11, no. 3, 2020.

- [40] A. Liu, W. Xiao, R. Li, L. Liu and L. Chen, "Comparison of optical projection tomography and light-sheet fluorescence microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 275, no. 1, pp. 3-10, 2019.
- [41] A. W. Magsam, M. Johnson, T. Villani and M. C. Pierce, "Optical projection tomography with a tissue clearing agent for developmental and reproductive toxicology studies," *Birth Defects Research*, vol. 110, no. 1, pp. 12-16, 2018.
- [42] D. Nguyen, P. Marchand, A. L. Planchette, J. Nilsson, M. Sison, J. Extermann, A. Lopez, M. Sylwestrzak, J. Sordet-Dessimoz, A. Schmidt-Christensen, D. Holmberg, D. van de Ville and T. Lasser, "Optical projection tomography for rapid whole mouse brain imaging," *Biomedical Optics Express*, vol. 8, no. 12, pp. 5637-5650, 2017.
- [43] R. Prunskaitė-Hyyryläinen, "Optical projection tomography imaging to study kidney organogenesis," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1926, pp. 185-199, 2019.
- [44] P. P. Vallejo Ramirez, J. Zammit, O. Vanderpoorten, F. Riche, F. X. Blé, X. H. Zhou, B. Spiridon, C. Valentine, S. E. Spasov, P. W. Oluwasanya, G. Goodfellow, M. J. Fantham, O. Siddiqui, F. Alimagham, M. Robbins, A. Stretton, D. Simatos, O. Haderer, E. J. Rees, F. Ströhl, R. F. Laine and C. F. Kaminski, "OptiJ: Open-source optical projection tomography of large organ samples," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, 2019.
- [45] H. Zhang, L. Waldmann, R. Manuel, H. Boije, T. Haitina and A. Allalou, "zOPT: An open source optical projection tomography system and methods for rapid 3D zebrafish imaging," *Biomedical Optics Express*, vol. 11, no. 8, pp. 4290-4305, 2020.
- [46] T. Watson, N. Andrews, S. Davis, L. Bugeon, M. D. Dallman and J. McGinty, "OPTiM: Optical projection tomography integrated microscope using open-source hardware and software," *PLoS One*, vol. 12, no. 7, 2017.
- [47] M. Soto, J. A. Rodrigo and T. Alieva, "Partially coherent optical diffraction tomography toward practical cell study," *Frontier in Physics*, vol. 17, 2021.
- [48] K. F. Lei, "A review on microdevices for isolating circulating tumor cells," *Micromachines*, vol. 11, no. 5, 2020.
- [49] M. A. Papadaki and S. Agelaki, "Single-cell RNA sequencing uncovers heterogeneous circulating tumor cell subsets in breast cancer," *Cancers*, vol. 14, no. 5, 2022.
- [50] Q. Yang, H. Zhang, T. Wei, A. Lin, Y. Sun, P. Luo and J. Zhang, "Single-cell RNA sequencing reveals the heterogeneity of tumor-associated macrophage in non-

- small cell lung cancer and differences between sexes,” *Frontiers in Immunology*, vol. 12, 2021.
- [51] S. Palit, C. Heuser, G. P. de Almeida, F. J. Theis and C. E. Zielinski, “Meeting the challenges of high-dimensional single-cell data analysis in immunology,” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, 2019.
- [52] W. Shi, X. Liu, Q. Cao, P. Ma, W. le, L. Xie,, J. Ye, W. Wen, H. Tang, W. Su, Y. Zheng and Y. Liu, “High-dimensional single-cell analysis reveals the immune characteristics of COVID-19,” *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 320, no. 1, pp. L84-L98, 2021.
- [53] Y. Wu and K. Zhang, “Tools for the analysis of high-dimensional single-cell RNA sequencing data,” *Nature Reviews. Nephrology*, vol. 16, no. 7, pp. 408-421, 2020.
- [54] J. Pichat, J. E. Iglesias, T. Yousry, S. Ourselin and M. Modat, “A survey of methods for 3D histology reconstruction,” *Medical Image Analysis*, vol. 46, pp. 73-105, 2018.
- [55] R. C. Gonzalez and R. E. Woods, *Digital image processing*, 4th ed., New York: Pearson, 2018.
- [56] J. D. Foley, A. van Dam, M. McGuire, D. F. Sklar, J. D. Foley, S. K. Feiner and K. Akeley, “Transformations in Two Dimensions,” in *Computer Graphics: Principles and Practice*, 3rd ed., Addison-Wesley, 2013.
- [57] J. P. W. Pluim, J. B. A. Maintz and M. A. Viergever, “Mutual-information-based registration of medical images: a survey,” *IEEE Trans Med Imaging*, vol. 22, no. 8, pp. 986-1001, 2003.
- [58] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling and B. P. Flannery, “Minimization or Maximization of Functions,” in *Numerical Recipes: The art of Scientific Computing*, Cambridge University Press, 2007, pp. 502-525.
- [59] T. Bäck, D. B. Fogel και Z. Michalewicz, *Handbook of Evolutionary Computation*, Oxford University Press, 2000.
- [60] K. Price, R. N. Storn and J. A. Lampinen, “Differential Evolution: A Practical Approach to Global Optimization,” Springer, 2006.
- [61] J. Kennedy and R. C. Eberhart, “Particle swarm optimization,” in *Proceedings of the IEEE International Conference on Neural Networks*, Perth, WA, Australia, 1995.
- [62] F. Glover και G. A. Kochenberger, *Handbook of Metaheuristics*, Springer Science & Business Media, 2003.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

- [63] M. Styner, C. Brechbuhler, G. Szckely and G. Gerig, "Parametric estimate of intensity inhomogeneities applied to MRI," *IEEE Transactions on Medical Imaging*, vol. 19, no. 3, pp. 153-165, 2000.
- [64] J. Kim, J. K. Lee and K. M. Lee, "Accurate image super-resolution using very deep convolutional networks," in *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*, 2016.
- [65] Y. LeCun, Y. Bengio and G. Hinton, "Deep learning," *Nature*, vol. 521, pp. 436-444, 2015.
- [66] M. Grubinger, P. Clough, H. Müller και T. Deselaers, «The IAPR TC-12 benchmark: A new evaluation resource for visual information systems,» σε *Proceedings of the international workshop OntoImage*, 2006.
- [67] Y. B. Goodfellow and A. Courville, *Deep learning*, The MIT Press, 2016.
- [68] I. Sabdyusheva Litschauer, K. Becker, S. Saghafi, S. Ballke, C. Bollwein, M. Foroughipour, J. Gaugeler, M. Foroughipour, V. Schavelová, V. László, B. Döme, C. Brostjan, W. Weichert and H. U. Dodt, "3D histopathology of human tumours by fast clearing and ultramicroscopy," *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, 2020.
- [69] Z. Zhu, A. Katsevich, A. J. Kapadia, J. A. Greenberg and S. Pang, "X-ray diffraction tomography with limited projection information," *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, 2018.
- [70] C. Fletcher, *Diagnostic histopathology of tumors*, New York: Elsevier, 1995.
- [71] M. R. Stytz and O. Frieder, "Three-dimensional medical imaging modalities: an overview," *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, vol. 18, no. 1, pp. 1-25, 1990.
- [72] A. S. Azam, I. M. Miligy, P. K. Kimani, H. Maqbool, K. Hewitt, N. M. Rajpoot and D. R. Snead, "Diagnostic concordance and discordance in digital pathology: a systematic review and meta-analysis," *Journal of Clinical Pathology*, vol. 74, no. 7, pp. 448-455, 2021.
- [73] J. E. Roy και J. L. Hunt, «Detection and classification of diagnostic discrepancies (errors) in surgical pathology,» *Advances in Anatomic Pathology*, τόμ. 17, αρ. 5, pp. 359-365, 2010.
- [74] J. D. Schiff, "Diagnosis and diagnostic errors: time for a new paradigm," *BMJ Quality & Safety*, vol. 23, no. 1, pp. 1-3, 2014.
- [75] D. B. Troxel, "Diagnostic pitfalls in surgical pathology--discovered by a review of malpractice claims: Part VII. Random errors," *International Journal of Surgical Pathology*, vol. 9, no. 4, pp. 305-308, 2001.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

- [76] S. S. Raab, D. M. Grzybicki, J. E. Janosky, R. J. Zarbo, F. A. Meier, C. Jensen and S. J. Geyer, "Clinical impact and frequency of anatomic pathology errors in cancer diagnoses," *Cancer*, vol. 104, no. 10, pp. 2205-2213, 2005.
- [77] T. Bondera, P. Schubert, A. van Zyl, R. Pitcher and A. Bagadia, "Diagnostic yield and accuracy of paediatric image-guided fine needle aspiration biopsy of deep organ tumours," *SA Journal of Radiology*, vol. 26, no. 1, p. 2485, 2022.
- [78] A. J. Doyle, K. A. Murray, E. W. Nelson and D. G. Bragg, "Selective use of image-guided large-core needle biopsy of the breast: accuracy and cost-effectiveness," *American Journal of Roentgenology*, vol. 165, no. 2, pp. 281-284, 1995.
- [79] B. Enzinger, P. L. Pfitzinger, B. Ebner, T. Ivanova, Y. Volz, M. Apfelbeck, P. Kazmierczak, C. Stief and M. Chaloupka, "[Common errors, pitfalls, and management of complications of prostate biopsy : The most common diagnostic and procedural challenges of transrectal fusion prostate biopsy in the initial diagnosis of clinically significant prostate cancer]," *Urologie*, vol. 62, no. 5, pp. 479-486, 2023.
- [80] G. Bierzyńska-Macyszyn, B. Białas, A. Lech, T. Stepień and H. Majchrzak, "Trudności diagnostyczne w ocenie materiału z biopsji stereotaktycznej [Diagnostic pitfalls in stereotactic biopsy]," *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, vol. 35, no. 5, pp. 935-940, 2001.
- [81] N. N. Ku, N. Mela, C. E. Cox, D. S. Reintgen and S. V. Nicosia, "Diagnostic Pitfalls in Aspiration Biopsy Cytology of Papillary Breast Lesions," *Cancer Control*, vol. 4, no. 5, pp. 451-457, 1997.
- [82] H. K. Singh, J. F. Silverman, C. N. Powers, K. R. Geisinger and W. J. Frable, "Diagnostic pitfalls in fine-needle aspiration biopsy of the mediastinum," *Diagnostic Cytopathology*, vol. 17, no. 2, pp. 121-126, 1997.
- [83] H. M. Mühlhofer, U. Lenze, F. Lenze, I. C. Rondak, J. Schauwecker, H. Rechl, R. Von Eisenhart-Rothe and F. Pohlig, "Inter- and intra-observer variability in biopsy of bone and soft tissue sarcomas," *Anticancer Research*, vol. 35, no. 2, pp. 961-966, 2015.
- [84] A. M. Hanby, P. A. Hall, N. Rooney, P. Dennis, P. James, P. Richman, S. Buk, D. A. Levison and W. M. Gregory, "An inter-observer and intra-observer variability study on the diagnosis of lymph node biopsy specimens," *European Journal of Cancer*, vol. 28A, no. 11, pp. 1858-1862, 1992.
- [85] S. Lee, M. Amgad, P. Mobadersany, M. McCormick, B. P. Pollack, H. Elfandy, H. Hussein, D. A. Gutman and L. A. Cooper, "Interactive Classification of Whole-Slide Imaging Data for Cancer Researchers," *Cancer Research*, vol. 81, no. 4, pp. 1171-1177, 2021.

- [86] L. Tong, Y. Sha and M. D. Wang, "Improving Classification of Breast Cancer by Utilizing the Image Pyramids of Whole-Slide Imaging and Multi-Scale Convolutional Neural Networks," in *Proc COMPSAC*.
- [87] S. Saxena and M. Gyanchandani, "Machine Learning Methods for Computer-Aided Breast Cancer Diagnosis Using Histopathology: A Narrative Review," *Journal of Medical Imaging and Radiation Sciences*, vol. 51, no. 1, pp. 182-193, 2020.
- [88] C. M. Chen, Y. S. Huang, P. W. Fang, C. W. Liang and R. F. Chang, "A computer-aided diagnosis system for differentiation and delineation of malignant regions on whole-slide prostate histopathology image using spatial statistics and multidimensional DenseNet," *Medical Physics*, vol. 47, no. 3, pp. 1021-1033, 2020.
- [89] C. Mosquera-Lopez, S. Agaian, A. Velez-Hoyos and I. Thompson, "Computer-Aided Prostate Cancer Diagnosis From Digitized Histopathology: A Review on Texture-Based Systems," *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, vol. 8, pp. 98-113, 2015.
- [90] W. A. Kalender, *Computed tomography: fundamentals, system technology, image quality, applications*, Publicis, 2011.
- [91] P. Koudounas, E. Koniaris, I. Manolis, P. Asvestas, S. Kostopoulos, D. Cavouras και D. Glotsos, «Three-dimensional tissue volume generation in conventional brightfield microscopy,» *Microscopy Research and Technique*, τόμ. 85, αρ. 8, pp. 2913-2923, 2022.
- [92] Waveshare, "UNO PLUS," [Online]. Available: https://www.waveshare.com/wiki/UNO_PLUS. [Accessed 10 October 2023].
- [93] Texas Instruments, «ULN200x, ULQ200x High-Voltage, High-Current Darlington Transistor Arrays,» 2022.
- [94] PyPI, "pyFirmata 1.1.0," 10 March 2019. [Online]. Available: <https://pypi.org/project/pyFirmata/>. [Accessed 10 October 2023].
- [95] Arduino, «Firmata,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.arduino.cc/reference/en/libraries/firmata/>. [Πρόσβαση 10 October 2023].
- [96] OpenCV Team, "OpenCV - Open Computer Vision Library," [Online]. Available: <https://opencv.org/>. [Accessed 10 October 2023].
- [97] H. Foroosh, J. B. Zerubia and M. Berthod, "Extension of Phase Correlation to Subpixel Registration," *IEEE Transactions on Image Processing*, vol. 11, no. 33, pp. 188-200, 2002.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

- [98] A. Kak και M. Slaney, Principles of Computerized Tomographic Imaging, New York: IEEE Press, 1999.
- [99] S. Kaczmarz, "Angenäherte Auflösung von Systemen linearer Gleichungen," *Bulletin International de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres*, vol. 35, pp. 355-357, 1937.
- [100] K. Tanabe, "Projection method for solving a singular system of linear equations and its applications," *Numerische Mathematik*, vol. 17, pp. 203-214, 1971.
- [101] R. S. Ramakrishnan, S. K. Mullick, R. K. S. Rathore and R. Subramanian, "Orthogonalization, Bernstein polynomials, and image restoration," *Applied Optics*, vol. 18, no. 4, pp. 464-468, 1979.
- [102] G. N. Hounsfield, «A method of and apparatus for examination of a body by radiation such as x-ray or gamma radiation». Ευρεσιτεχνία 1283915, 1972.
- [103] A. H. Andersen and A. C. Kak, "Simultaneous algebraic reconstruction technique (SART): A superior implementation of the ART algorithm," *Ultrasonic Imaging*, vol. 6, no. 1, pp. 81-94, 1984.
- [104] G. B. Sands, D. A. Gerneke, B. H. Smaill and I. J. Le Grice, "Automated extended volume imaging of tissue using confocal and optical microscopy," in *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference, 2006*, 2006.
- [105] X. Zhai, S. Vyas, J. A. Yeh and Y. Luo, "Two-photon fluorescence imaging of subsurface tissue structures with volume holographic microscopy," *Journal of Biomedical Optics*, vol. 25, no. 12, 2020.
- [106] B. Belay, J. T. Koivisto, J. Parraga, O. Koskela, T. Montonen, M. Kellomäki, E. Figueiras and J. Hyttinen, "Optical projection tomography as a quantitative tool for analysis of cell morphology and density in 3D hydrogels," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, 2021.
- [107] W. Du, C. Fei, J. Liu, Y. Li, Z. Liu, X. Zhao and J. Fang, "Optical Projection Tomography Using a Commercial Microfluidic System," *Micromachines*, vol. 11, no. 3, 2020.
- [108] A. Liu, W. Xiao, R. Li, L. Liu and L. Chen, "Comparison of optical projection tomography and light-sheet fluorescence microscopy," *Journal of Microscopy*, vol. 275, no. 1, pp. 3-10, 2019.
- [109] D. Magee, Y. Song, S. Gilbert, N. Roberts, N. Wijayathunga, R. Wilcox, A. Bulpitt and D. Treanor, "Histopathology in 3D: From three-dimensional reconstruction to multi-stain and multi-modal analysis," *Journal of Pathology Informatics*, vol. 6, 2015.

3-ΔΙΑΣΤΑΤΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗΝ ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΟΥ ΦΩΤΟΣ

- [110] N. M. Dragomir, X. M. Goh and A. Roberts, "Three-dimensional refractive index reconstruction with quantitative phase tomography," *Microscopy Research and Technique*, vol. 71, no. 1, pp. 5-10, 2008.
- [111] R. Fernandez-Gonzalez, A. Jones, E. Garcia-Rodriguez, P. Y. Chen, A. Idica, S. J. Lockett, M. H. Barcellos-Hoff και C. Ortiz-De-Solorzano, «System for combined three-dimensional morphological and molecular analysis of thick tissue specimens,» *Microscopy Research and Technique*, τόμ. 59, αρ. 6, pp. 522-530, 2002.
- [112] T. Watson, N. Andrews, S. Davis, L. Bugeon, M. D. Dallman and J. McGinty, "OPTiM: Optical projection tomography integrated microscope using open-source hardware and software," *PloS One*, vol. 12, no. 7, 2017.
- [113] J. M. Soto, J. A. Rodrigo and T. Alieva, "Partially Coherent Optical Diffraction Tomography Toward Practical Cell Study," *Frontier Physics*, vol. 9, 2021.