

# Ειδικές Τεχνικές Βιοαπεικόνισης (ΒΙΟΛ-403ΔΕΜ)

Μάθημα επιλογής κοινό και για τις δύο κατευθύνσεις

Μονάδες ECTS: 4

13 διαλέξεις κάθε Δευτέρα 15.00-17.00

Αμφιθέατρο Β, Τμήμα Βιολογίας

Διδάσκων:

Δρ. Γιώργος Ι. Τσερεβελάκης

ΕΔΙΠ, Τμήμα Βιολογίας Π.Κ.

Γραφείο 308α, 3<sup>ος</sup> όροφος

Τηλ. 2810394423

Email: [tserevel@uoc.gr](mailto:tserevel@uoc.gr)

## Ενδεικτική βιβλιογραφία μαθήματος:

1. Simon R. Cherry, Ramsey D. Badawi, Jinyi Qi, “Essentials of In Vivo Biomedical Imaging”, CRC Press, 2015.
2. Κυριάκος Ψαρράκος, Ελισάβετ Μολυβδά - Αθανασοπούλου, Άννα Γκοτζαμάνη - Ψαρράκου, Αναστάσιος Σιούντας «Επίτομη Ιατρική Φυσική», University Studio Press, 2012
3. Lihong V. Wang, Hsin-I Wu, “Biomedical Optics: Principles and Imaging”, Wiley, 2007.
4. Guy Cox, “Optical Imaging Techniques in Cell Biology” 2nd Edition, CRC Press, 2012.
5. James B. Pawley, “Handbook of Biological Confocal Microscopy” 3<sup>rd</sup> Edition, Springer Science, 2006.

## Βαθμολογία:

Τελική εξέταση: 70 %

Παρουσίαση: 30%

(εφόσον βαθμός τελικής εξέτασης  $\geq 5$ )

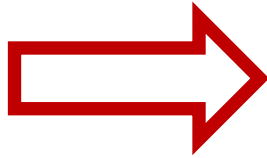
ή

Τελική εξέταση: 100 %

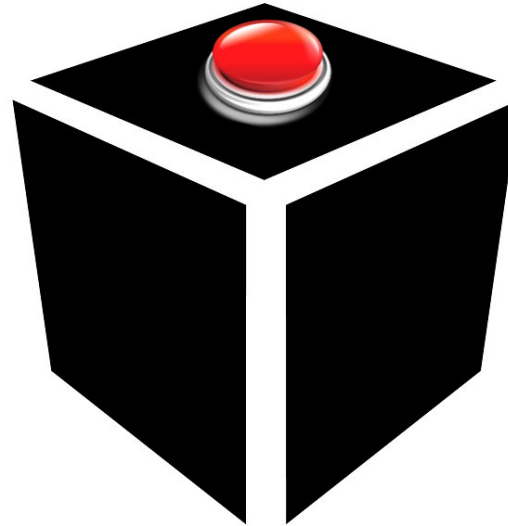
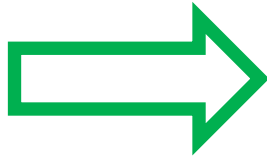
# Η προσέγγιση του μαύρου κουτιού

Πάτα το  
κουμπί

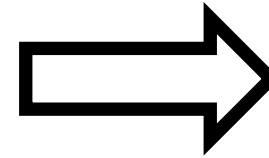
Βιολογικό  
δείγμα



Ρυθμίσεις  
καταγραφής



Εικόνες



Job done!

Απεικονιστικό  
σύστημα



Γιατί χρειάζεται να  
ανοίξουμε το μαύρο κουτί;

# Η προσέγγιση της θεμελιώδους κατανόησης

Σκοπός  
μαθήματος



Εισαγωγή στις αρχές των κύριων απεικονιστικών τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται στη βιοϊατρική έρευνα σε νανοσκοπικό, μικροσκοπικό, μεσοσκοπικό και μακροσκοπικό επίπεδο

*Στο τέλος του εξαμήνου θα μπορείτε να απαντάτε στα εξής ερωτήματα:*

Μπορεί η απεικόνιση να δώσει απάντηση στο βιολογικό μου ερώτημα;

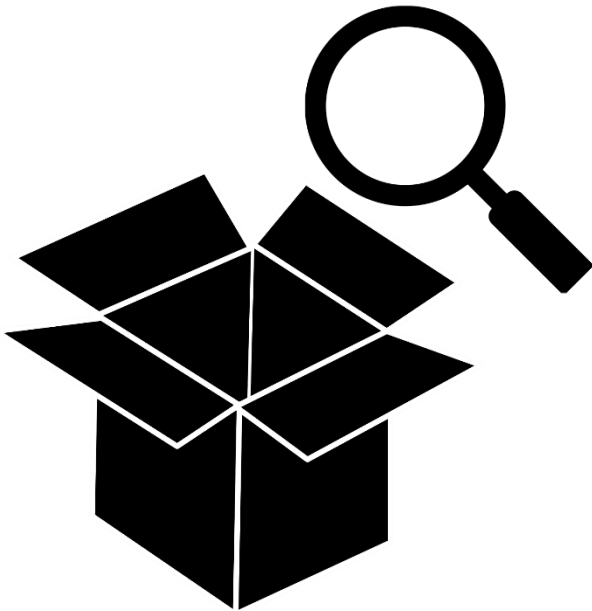
Ποια τεχνική θα πρέπει να χρησιμοποιήσω για μια συγκεκριμένη εφαρμογή;

Πώς ακριβώς δουλεύει η τεχνική που χρησιμοποιώ και ποιοι είναι οι υποκείμενοι φυσικοί μηχανισμοί;

Τι είδους πληροφορία μπορεί να μου δώσει κάθε τεχνική;

Ποιά τα πλεονεκτήματα της κάθε απεικονιστικής τεχνικής και ποιοι οι περιορισμοί της;

Πώς μπορώ να αναλύσω και να ερμηνεύσω τις εικόνες που καταγράφω;

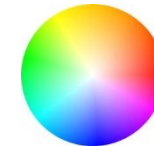




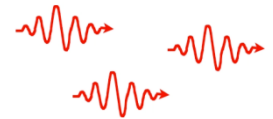
VISION



Δυνατότητα  
εστίασης



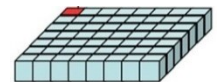
10 εκατ.  
χρώματα



Ανίχνευση ενός  
φωτονίου



~50 μm  
ανάλυση

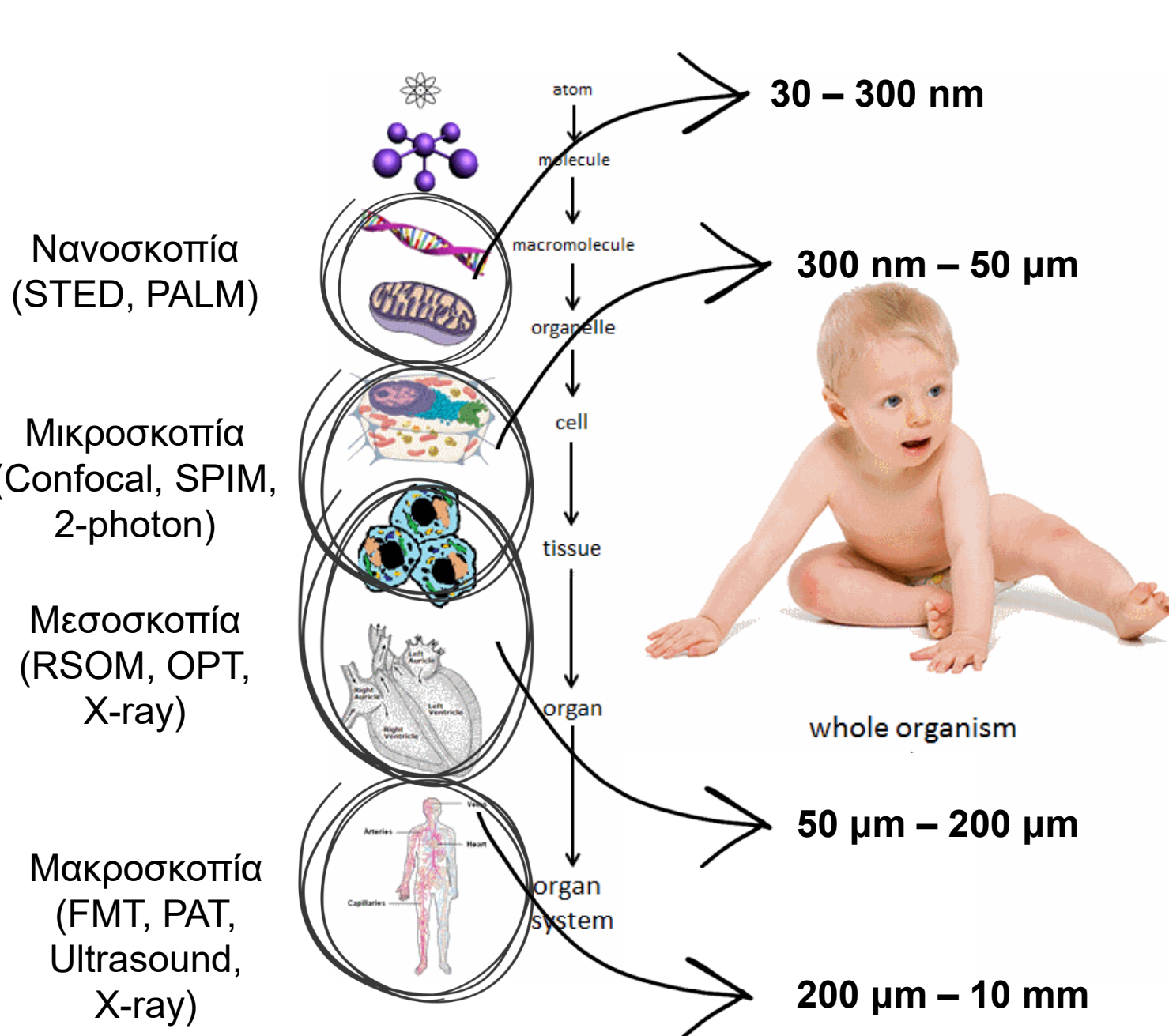


200.000  
κονία/mm<sup>2</sup>

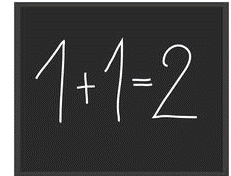


Εστίαση:  
25 cm - Άπειρο





Γιατί το φως;



Ευκολία χρήσης



Χαμηλό κόστος



Μη καταστρεπτικό

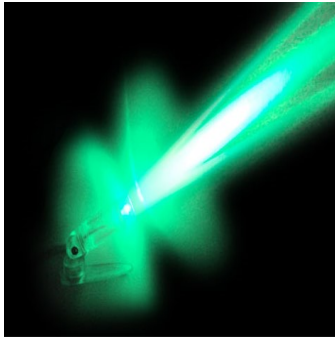


Υψηλή ανάλυση

# Γενικό μοντέλο μεθόδων απεικόνισης



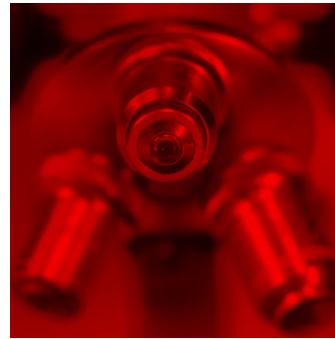
Κάποια μορφή  
ενέργειας



*Αλληλεπίδραση  
ενέργειας-ύλης*



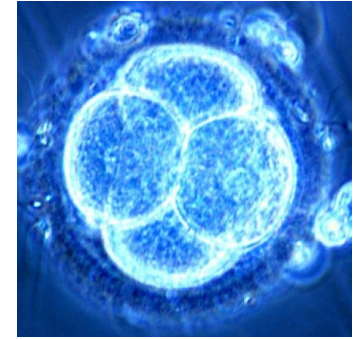
Παραγωγή  
σήματος



*Ανίχνευση σήματος και  
καταγραφή*



Επεξεργασία και  
ανακατασκευή



*Εικόνα*

Οπτική ακτινοβολία

Ακουστικά κύματα

Ακτίνες X

Ραδιενέργεια

Φωτοπολλαπλασιαστές  
ή Φωτοδίοδοι

CCD camera

Πιεζοηλεκτρικός  
μετατροπέας

Σπινθηριστής

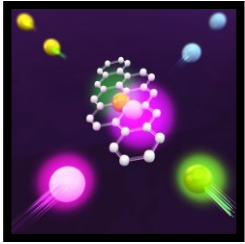
Ευθεία καταγραφή

Raster Scan

Αλγόριθμος Filtered  
Back-projection

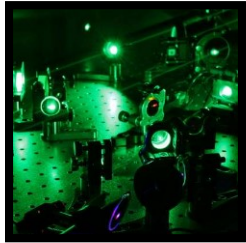
# Light-matter interactions reveal fundamental biological mechanisms

1



**Understanding** of fundamental interactions between light and biological molecules

2



**Design, development and optimization** of imaging systems according to application's specific requirements

3



**Recording and processing** of generated signals to provide a reconstruction of the investigated tissue

4

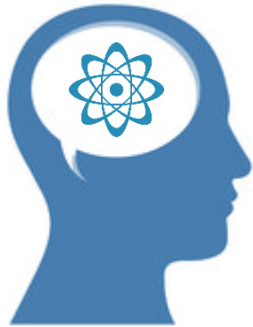
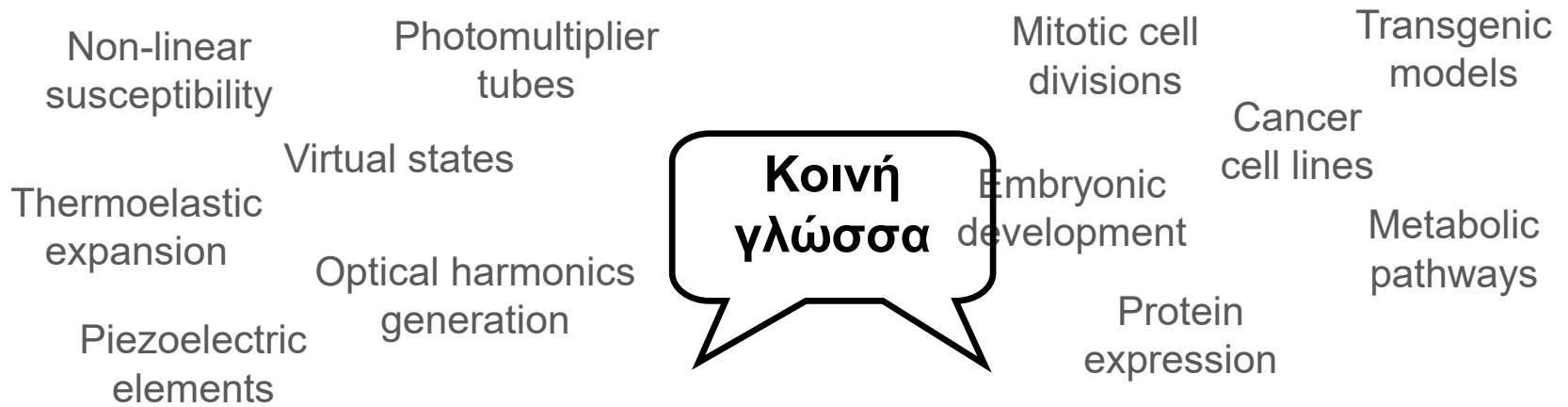


**Interpretation** of the acquired images in collaboration with biologists / doctors

5



**Elucidation** of biological mechanisms and / or extraction of medical diagnostic information at a molecular level



Φυσικοί /  
Μηχανικοί



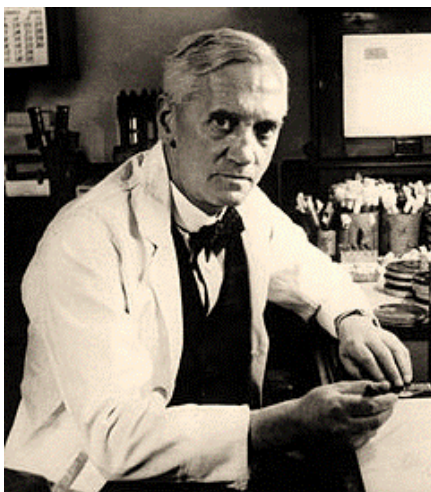
Βιολόγοι



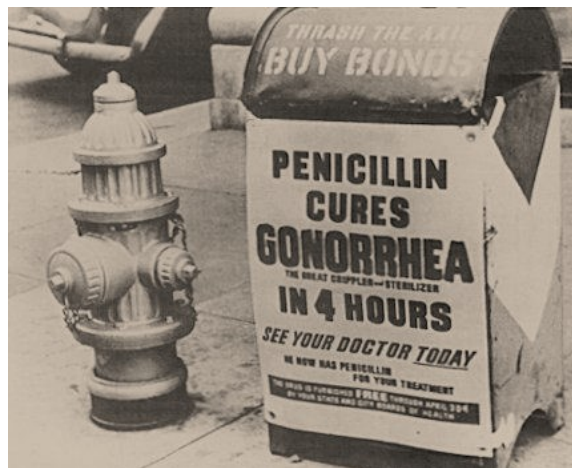
100 χρόνια πριν...



...1928



Vintage διαφήμιση  
πενικιλίνης



Η πενικιλίνη μπορούσε  
να θεραπεύσει

- ✓ Σηψαιμία
- ✓ Οστρακιά
- ✓ Διφθερίτιδα
- ✓ Σύφιλη
- ✓ Γονόρροια
- ✓ Μηνιγγίτιδα

# Τα τέσσερα εμπειρικά «αξιώματα» στη βιοϊατρική απεικόνιση

1. Δεν υπάρχει μία λύση για όλα τα προβλήματα
2. Η ισχύς εν τη ενώσει
3. Κάπου κερδίζεις, κάπου χάνεις
4. Ποτέ μη λες ποτέ

# 1. Δεν υπάρχει μία λύση για όλα τα προβλήματα

Διαφορετικές απαιτήσεις σε τεχνικές απεικόνισης ανάλογα με:



- Το βαθμό λεπτομέρειας που απαιτείται



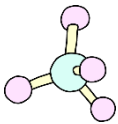
- Το μέγιστο βάθος απόκτησης εικόνας



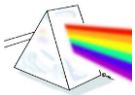
- Τον απαιτούμενο τύπο απεικονιστικής αντίθεσης



- Την ταχύτητα των διεργασιών που μελετούνται



- Την ευαισθησία ανίχνευσης βιομορίων ενδιαφέροντος



- Τις φυσικές ιδιότητες του ιστού (π.χ. μηχανικές, οπτικές κτλ)



- Τη γεωμετρία της εξεταζόμενης περιοχής

## 2. Η ισχύς εν τη ενώσει

Πολυτροπική απεικόνιση (multimodal imaging): Η συνδυαστική προσέγγιση των πλεονεκτημάτων δύο ή περισσότερων τεχνικών απεικόνισης σε ένα όργανο με σκοπό την απόκτηση περισσότερης πληροφορίας

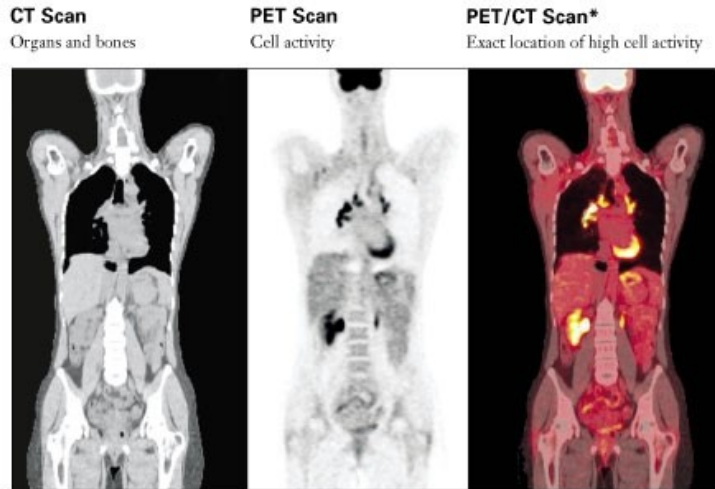
### Μπορεί να γίνει:

α) Διαδοχικά, συνδυάζοντας χωρικά δεδομένα που έχουν ληφθεί σε διαφορετικές χρονικές στιγμές

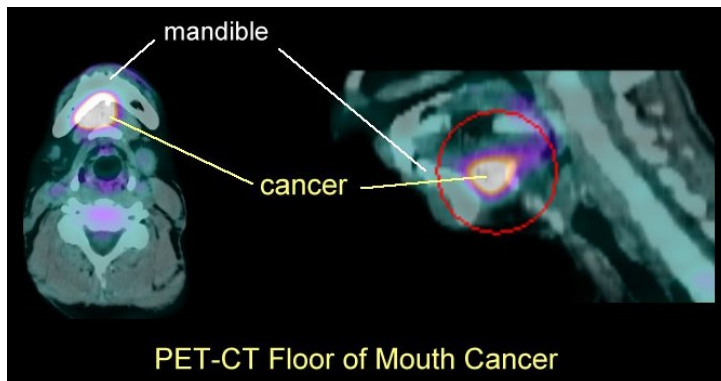
β) Υβριδικά, καταγράφοντας δεδομένα ταυτόχρονα με αποτέλεσμα τον εγγενή χωρικό και χρονικό συνδυασμό τους

## 2. Η ισχύς εν τη ενώσει

### Συνδυασμένη απεικόνιση PET/CT

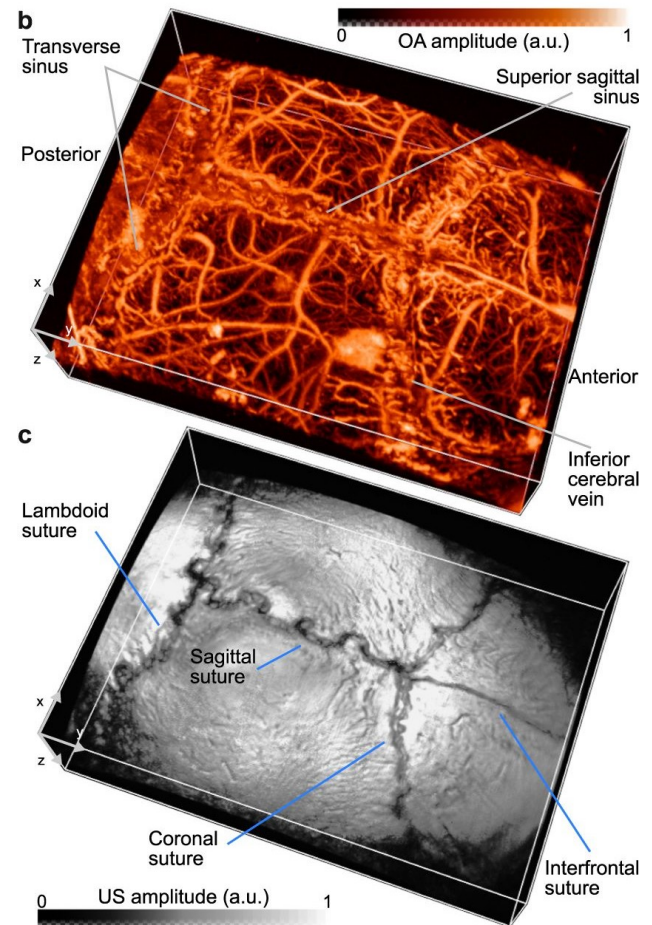


<https://affiliatedpet.com/patients/>



[http://www.aboutcancer.com/throat\\_anatomy\\_pet.htm](http://www.aboutcancer.com/throat_anatomy_pet.htm)

### Συνδυασμένη φωτοακουστική /υπερηχογραφική απεικόνιση

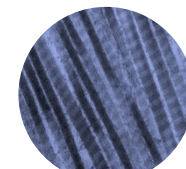


Estrada et al, Sci.Rep., 2018

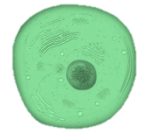
Powered by



Vessels



Collagen



Keratinocytes

interesting vessel



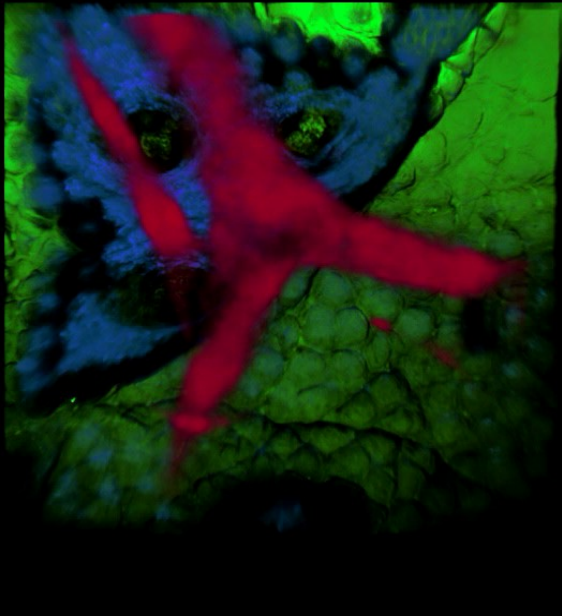
Getting around

Show: Traffic · Transit · Bicycling · Terrain

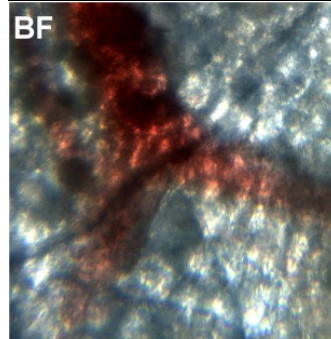
Directions

- ✓ High imaging depth (*RSOM*)
- ✓ High resolution (*PAM* + *Harmonics*)
- ✓ High contrast
- ✓ Label free

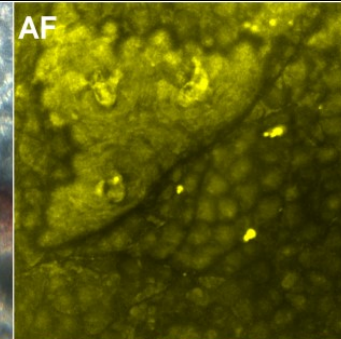
MPOM



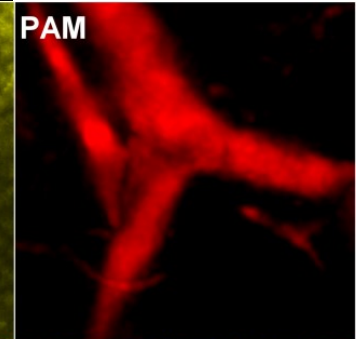
BF



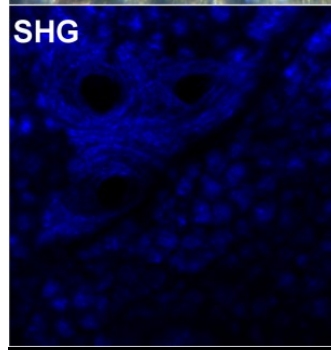
AF



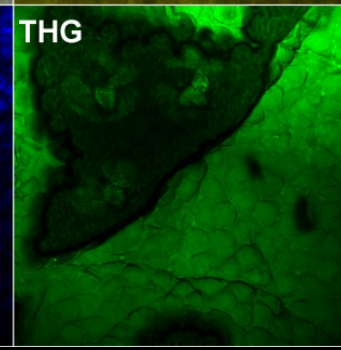
PAM



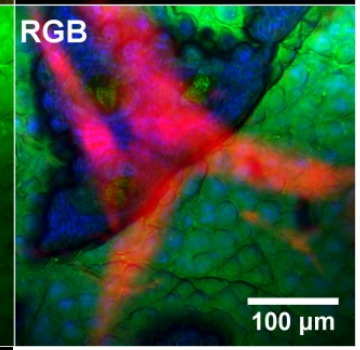
SHG



THG



RGB

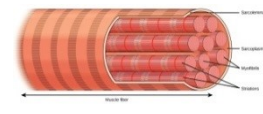


PAMRSOMSHGImageTHG

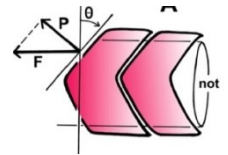
Powered by



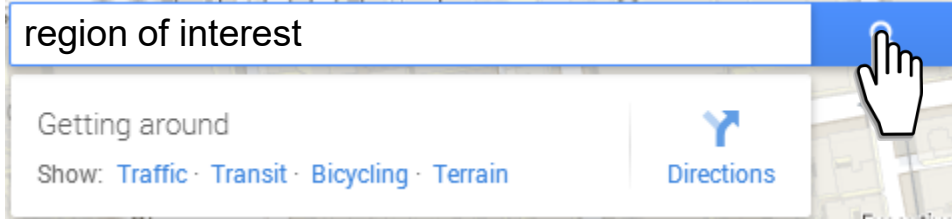
Melanocytes



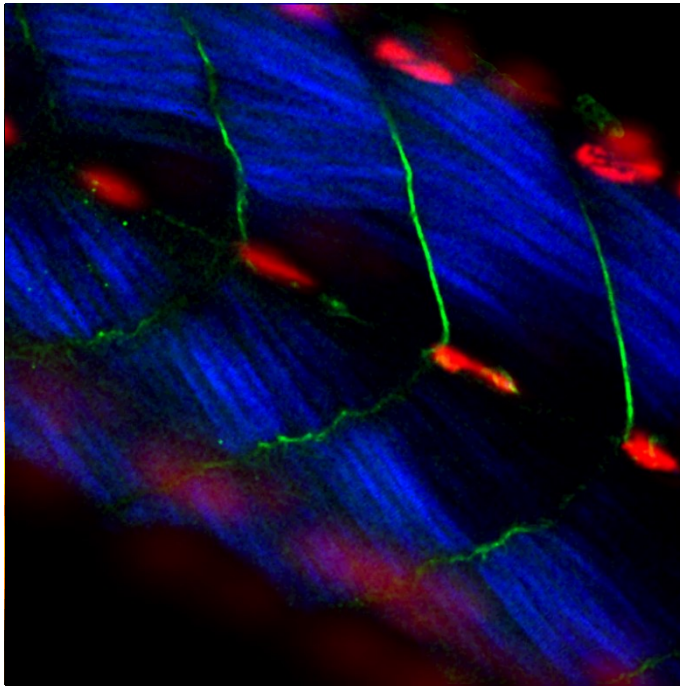
Muscle fibrils



Myoseptum



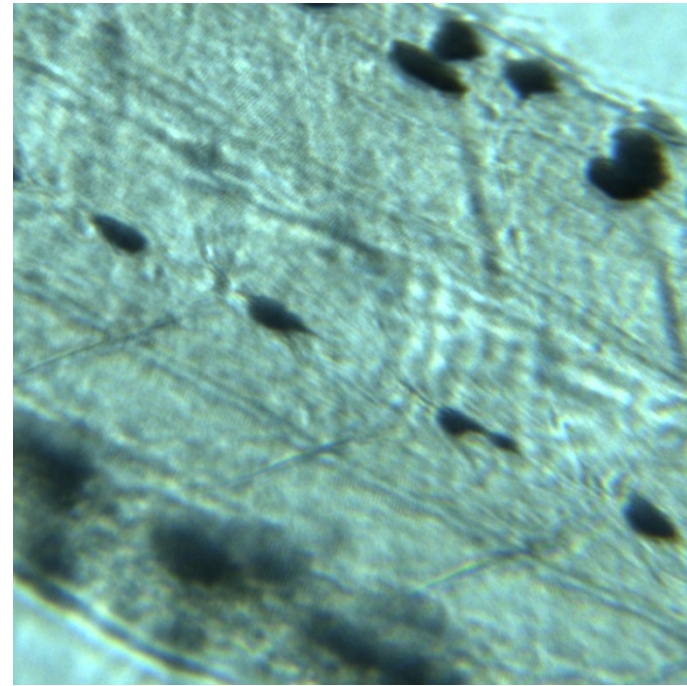
- ✓ High imaging depth (*RSOM*)
- ✓ High resolution (*PAM* + *Harmonics*)
- ✓ High contrast
- ✓ Label free



PAM

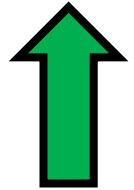
SRGOM

THG

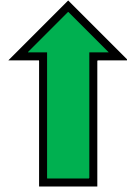


Brightfield

### 3. Κάπου κερδίζεις, κάπου χάνεις



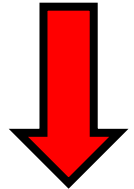
Μεγάλος βαθμός  
λεπτομέρειας



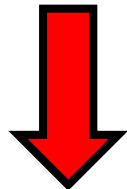
Μεγάλη ταχύτητα  
απεικόνισης



Μεγάλη ευαισθησία  
ανίχνευσης



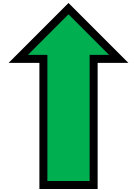
Μικρό βάθος  
απεικόνισης



Μικρή ευαισθησία  
ανίχνευσης



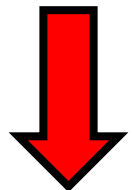
Μεγάλη εναπόθεση  
ενέργειας



Εξειδικευμένη  
αντίθεση



Συνδυασμένη  
πληροφορία



Προσθήκη  
εξωγενών  
παραγόντων



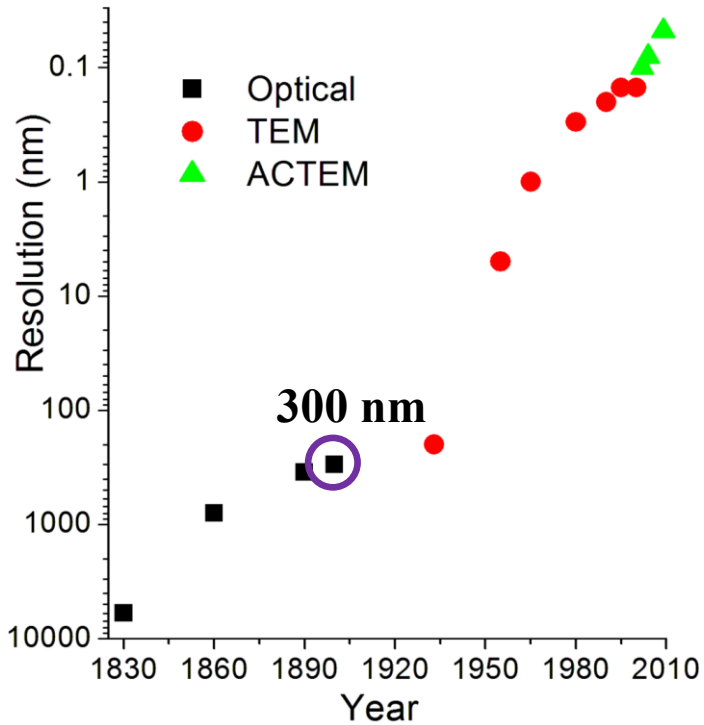
Μεγάλο κόστος /  
πολυπλοκότητα



Βέλτιστη εξισορρόπηση  
ανάλογα με τις ανάγκες της  
εφαρμογής απεικόνισης

# 4. Ποτέ μη λες ποτέ

Εξέλιξη της ανάλυσης οπτικών και ηλεκτρονικών μικροσκοπίων



Pennycook, S.J. et al, MRS Bulletin, 2011

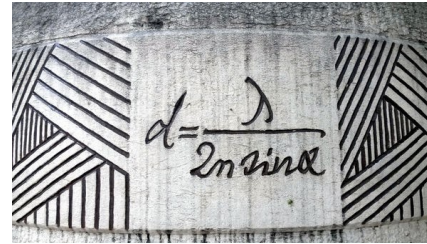
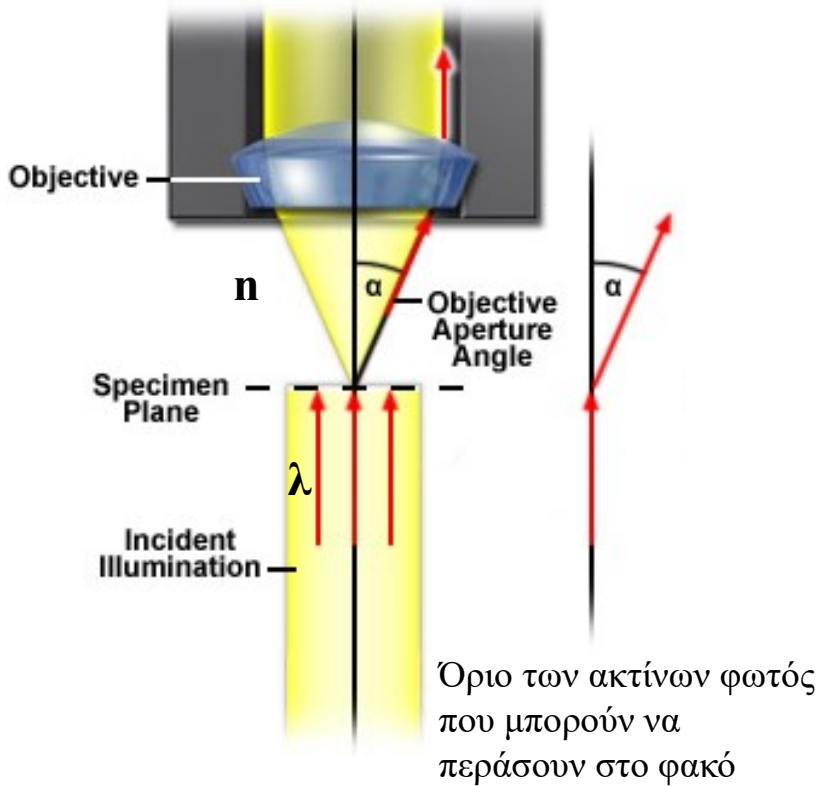


Ernst Karl Abbe  
(1840-1905)



Περιθλαστικό όριο στο βαθμό λεπτομέρειας ενός μικροσκοπίου

# 4. Ποτέ μη λες ποτέ



d: Η μικρότερη λεπτομέρεια που μπορεί να γίνει διακριτή

λ: Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που φωτίζει το δείγμα

n: Ο δείκτης διάθλασης του μέσου στο οποίο γίνεται η παρατήρηση

α: Η ημίσεια γωνία του κώνου φωτός που σκεδάζεται από το δείγμα και μπορεί να περάσει στο φακό



$\lambda = 550 \text{ nm}$   
 $n = 1$   
 $\sin \alpha = 0.9$



**$d \sim 300 \text{ nm}$**



**$n = 1.5$**

**$d_{\text{max}} \sim 200 \text{ nm}$**

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/resolution.html>



Από το 1873 έως το 1999 (126 χρόνια!) πιστεύαμε ότι το περιθλαστικό όριο όπως διατυπώθηκε από τον Abbe έθετε το μέγιστο βαθμό λεπτομέρειας ενός οπτικού μικροσκοπίου ώσπου...

## 4. Ποτέ μη λες ποτέ



**Stefan Hell**



*Ο ουρανός, το μόνο όριό μας...*



Ο περιορισμός στη χωρική ανάλυση της μικροσκοπίας φθορισμού είναι τεχνικός και δεν καθορίζεται από θεμελιώδεις φυσικούς νόμους

## The Nobel Prize in Chemistry 2014



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Eric Betzig

Prize share: 1/3



© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

Stefan W. Hell

Prize share: 1/3



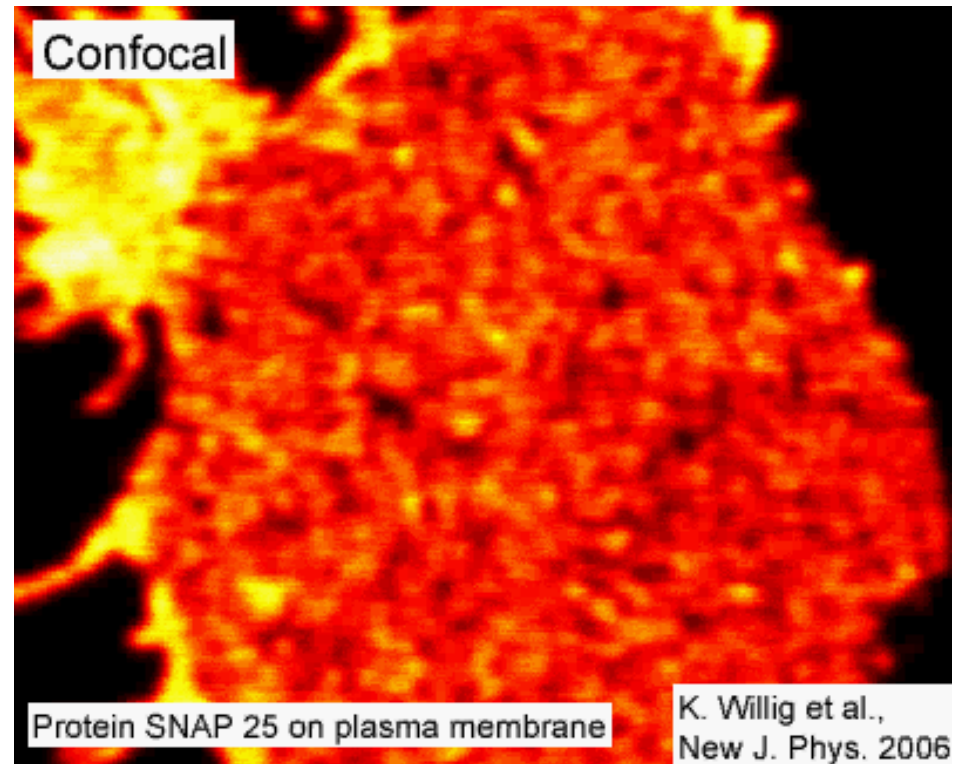
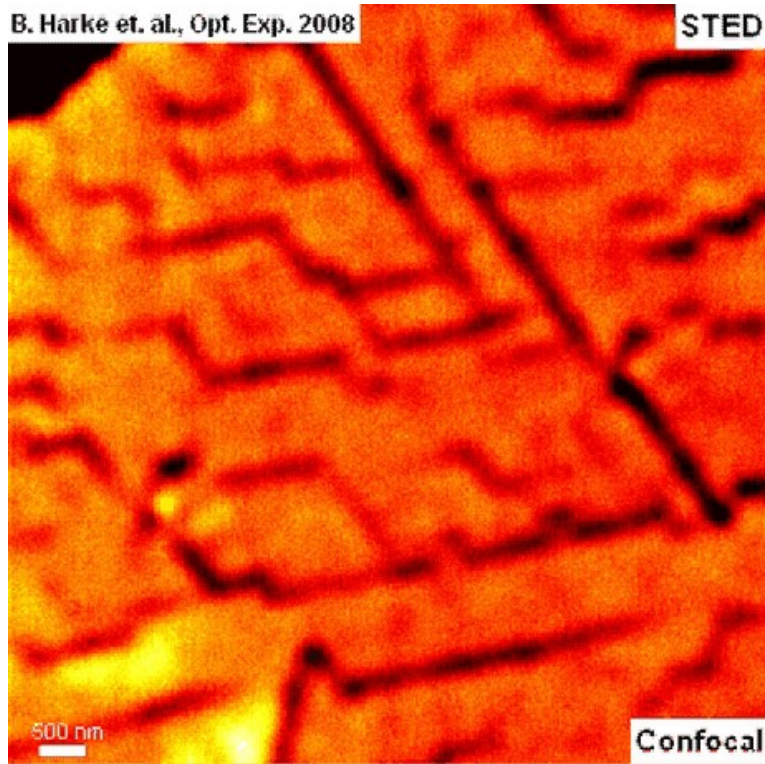
© Nobel Media AB. Photo: A. Mahmoud

William E. Moerner

Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Chemistry 2014 was awarded jointly to Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner "for the development of super-resolved fluorescence microscopy."

## 4. Ποτέ μη λες ποτέ



# 4. Ποτέ μη λες ποτέ

## Σκέδαση Rayleigh

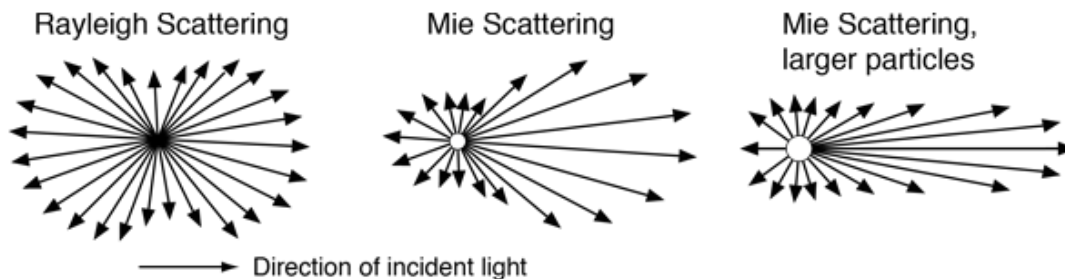
- Οφείλεται σε σωματίδια τα οποία είναι πολύ μικρά ( $<0.1\lambda$ ) σε σχέση με το μήκος κύματος
- Εξαρτάται από το μήκος κύματος ως  $1/\lambda^4$
- Τα μπλε μήκη κύματος σκεδάζονται 4X περισσότερο από τα κόκκινα
- Το φως σκεδάζεται κυρίως παράλληλα στην κατεύθυνση διάδοσης του φωτός (προς τα εμπρός και προς τα πίσω)

## Σκέδαση Mie

- Οφείλεται σε σωματίδια τα οποία είναι συγκρίσιμα ή μεγαλύτερα σε σχέση με το μήκος κύματος
- Ασθενική εξάρτηση από το μήκος κύματος
- Όλα τα μήκη κύματος σκεδάζονται σχεδόν το ίδιο
- Το φως σκεδάζεται κυρίως στην κατεύθυνση διάδοσης του φωτός προς τα εμπρός

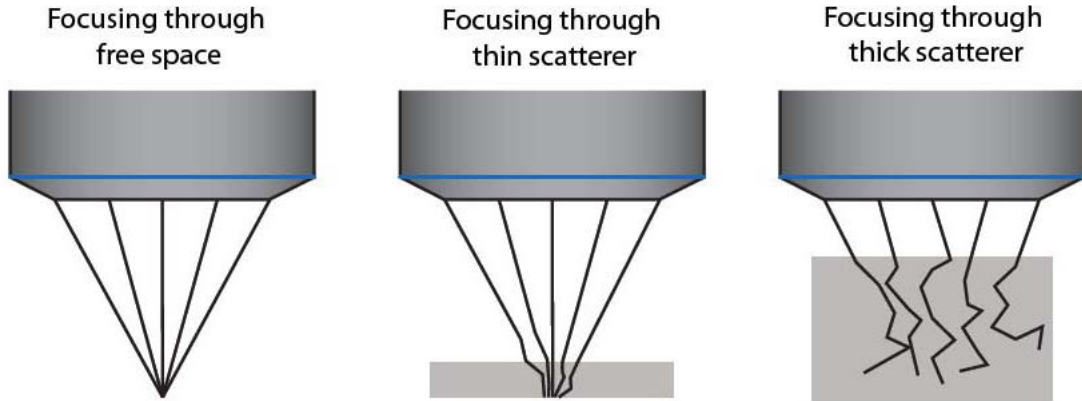


Τα δύο είδη σκέδασης του φωτός από σωματίδια




# 4. Ποτέ μη λες ποτέ

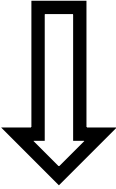
The Problem: scattering (limits conventional approaches to superficial layers)



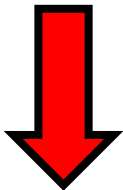
Το φως σκεδάζεται ως συσσωρευτικό αποτέλεσμα επιμέρους γεγονότων διάθλασης, ανάκλασης και περίθλασης από τα σωματίδια που αποτελούν τον ιστό.



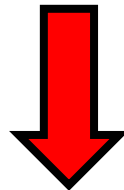
Τυπικός συντελεστής σκέδασης σε ιστό ( $\lambda=700\text{ nm}$ ):  $10\text{ mm}^{-1}$



Σε βάθος  $1/10\text{ mm} = 100\text{ }\mu\text{m}$ , η ένταση του φωτός έχει μειωθεί στο  $\sim 37\%$  της αρχικής



Μείωση ποσότητας φωτός ανά επιφάνεια



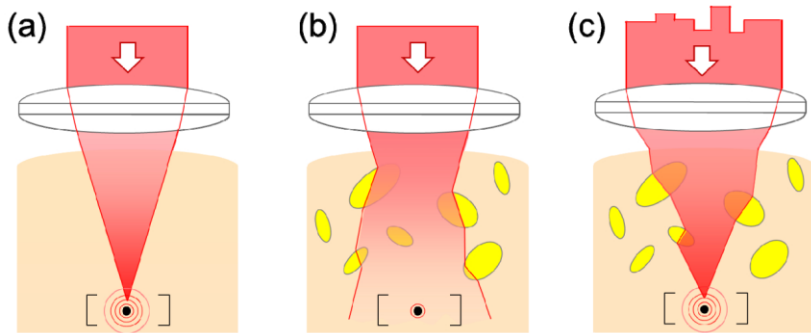
Μείωση βαθμού λεπτομέρειας που «θολώνει» την εικόνα

**Συμπέρασμα:**

Η οπτική μικροσκοπία περιορίζεται σε επιφανειακή παρατήρηση ιστών (βάθος  $< 200\text{ }\mu\text{m}$ ) λόγω των υψηλών ιδιοτήτων σκέδασης που οδηγεί σε διάχυση του φωτός

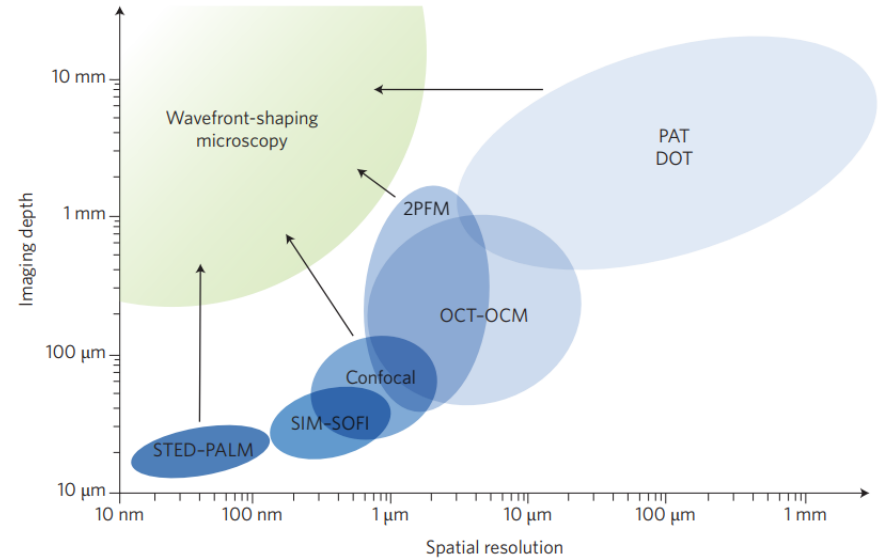
# 4. Ποτέ μη λες ποτέ

Μπορούμε να εστιάσουμε το φως διαμέσου ενός σκεδάζοντος υλικού χρησιμοποιώντας διατάξεις **Spatial Light Modulator (SLM)**

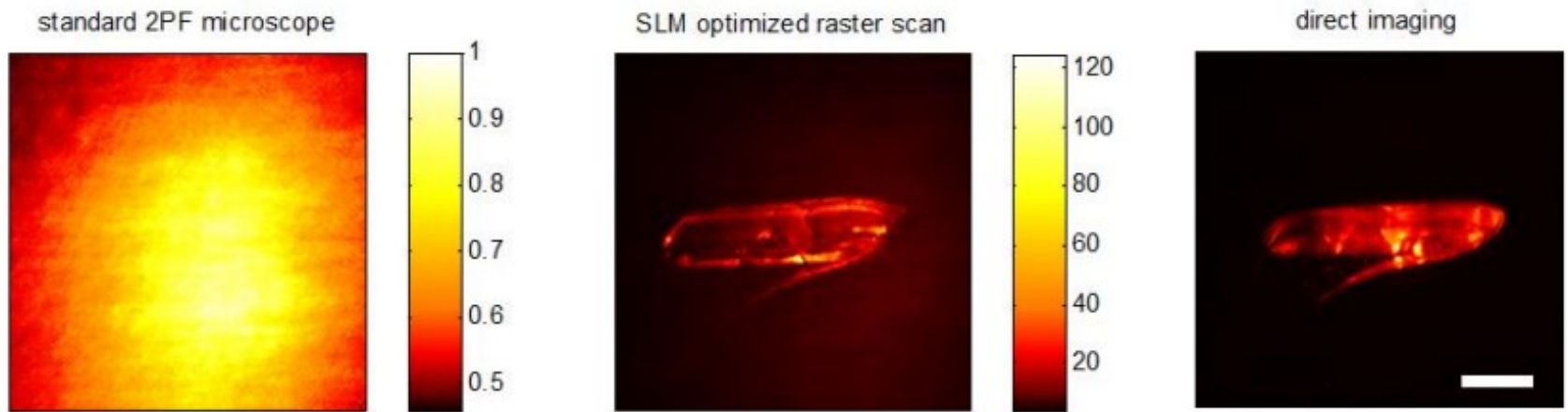


Jang et al, Opt. Express, 2013

Προς την κατεύθυνση διατάξεων υψηλής ανάλυσης και μεγάλου απεικονιστικού βάθους



Gigan et al, Nat. Photonics, 2017



Katz et al, Noninvasive nonlinear imaging through strongly-scattering turbid layers, arxiv.org

# Ύλη μαθήματος

## Ειδικές Τεχνικές Βιοαπεικόνισης (ΒΙΟΛ-403ΔΕΜ)

1. Εισαγωγή στις τεχνικές βιοαπεικόνισης
2. Υπολογιστική Τομογραφία
3. Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων
4. Υπερηχογραφικές τεχνικές απεικόνισης
5. Φωτοακουστική τομογραφία
6. Εισαγωγή στην οπτική μικροσκοπία
7. Μικροσκοπία φθορισμού I (Widefield, Confocal)
8. Μικροσκοπία φθορισμού II (SPIM)
9. Μη γραμμική μικροσκοπία (SHG, THG, TPEF)
10. Φωτοακουστική μικροσκοπία
11. Μικροσκοπία Raman (SRS, CARS)
12. Νανοσκοπία (STED, PALM)

Ακτίνες Χ

Ραδιενέργεια

Ακουστικά κύματα

Οπτική  
ακτινοβολία