



Τμήμα Φυσικής

Διπλωματική Εργασία

“Απεικόνιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Parhyale Hawaiensis* συνδυαστικά με την χρήση φωτοακουστικής μικροσκοπίας και label-free μικροσκοπίας φθορισμού”

“Imaging *Parhyale Hawaiensis* embryogenesis with hybrid autofluorescence and label-free photoacoustic microscopy”

Ιωάννης Ζουράρος

Ph4997

Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Μακρής (Μέλος ΔΕΠ Τμήμα Φυσικής)

Η εργασία έλαβε χώρα στο

Εργαστήριο Βιοφωτονικής και Μοριακής απεικόνισης (LBMI)

με επικεφαλής τον κύριο Ιωάννη Ζαχαράκη

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήθελα ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με τον τρόπο τους στην δημιουργία της. Αρχικά, νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον δρ. Ιωάννη Ζαχαράκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του στο εργαστήριο βιοφωτονικής και μοριακής απεικόνισης (LBMI) και την εμπιστοσύνη του ως προς το πρόσωπό μου.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δρ. Γεώργιο Τσερεβελάκη για την αμέριστη συμπαράσταση του και την βοήθεια που μου προσέφερε όλους αυτούς τους μήνες ,οδηγώντας με στο να αγαπήσω τον τομέα της βιοαπεικόνισης μέσα από τις πολύτιμες και πολύωρες συζητήσεις μας γύρω από την εργασία και όχι μόνο.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κωνσταντίνο Μακρή (Μέλος ΔΕΠ Τμήματος Φυσικής) και τον κύριο Γεώργιο Βασιλάκη (Principal Researcher), οι οποίοι δέχτηκαν να είναι μέλη της επιτροπής αξιολόγησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, η οποία στάθηκε αρωγός σε αυτή την προσπάθεια και κατ' επέκταση στις σπουδές μου στο τμήμα Φυσικής, και στους φίλους μου που ήταν κοντά μου όλον αυτό τον καιρό.

Περιεχόμενα

- 1 [Εισαγωγή](#)
- 2 [Parhyale Hawaiensis](#)
- 3 [Single photon Fluorescence](#)
 - 3.1 [Εισαγωγή](#)
 - 3.2 [Απορρόφηση Φωτονίου](#)
 - 3.3 [Ημικλασική προσέγγιση της αυθόρμητης εκπομπής](#)
- 4 [Μικροσκοπία Φθορισμού](#)
 - 4.1 [Εισαγωγή](#)
 - 4.2 [Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού](#)
 - 4.3 [SPIM \(Selective Plane Illumination Microscopy\)](#)
- 5 [Φωτοακουστικό Φαινόμενο](#)
 - 5.1 [Εισαγωγή](#)
 - 5.2 [Διάδοση του υπέρηχου](#)
 - 5.2.1 [Ακουστικά κύματα](#)
 - 5.2.2 [Ανάκλαση και διάδοση ακουστικών κυμάτων](#)
 - 5.2.3 [Γενική φωτοακουστική εξίσωση](#)
 - 5.2.4 [Φωτοακουστική εξίσωση υπό την συνθήκη του thermal confinement](#)
 - 5.2.5 [Προϋποθέσεις για ικανοποιητική παραγωγή θερμότητας](#)
- 6 [Φωτοακουστική Μικροσκοπία](#)
 - 6.1 [Εισαγωγή](#)
 - 6.2 [OR-PAM](#)
 - 6.3 [AR-PAM](#)
 - 6.4 [Εφαρμογές της PAM στην βιοιατρική](#)
- 7 [Υλικά και Μέθοδοι](#)
 - 7.1 [Προετοιμασία δείγματος](#)
 - 7.2 [Υβριδικό σύστημα](#)
- 8 [Αποτελέσματα](#)
- 9 [Συμπεράσματα](#)
- 10 [Μελλοντικές Προοπτικές](#)
- 11 [Βιβλιογραφία](#)

(1) Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η μέλετη της εμβρυϊκής ανάπτυξης του ανερχόμενου οργανισμού μοντέλο *Parhyale hawaiiensis* με την χρήση ενός πρωτότυπου υβριδικού συστήματος απεικόνισης φωτοακουστικής μικροσκοπίας (Photoacoustic Microscopy) και label-free μικροσκοπίας φθορισμού (Confocal Microscopy). Η μελέτη αυτή αποσκοπούσε στην ανάδειξη πληροφορίας για τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των εμβρύων μέσω της συνεστιακής μικροσκοπίας, καθώς και στην εξαγωγή πρωτότυπης και συνάμα συμπληρωματικής πληροφορίας για την κατανομή της λεκίθου (yolk) κατά τα πρώιμα και μεταγενέστερα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Η κατανομή της λεκίθου συνιστά ένα μείζον θέμα υπό διερεύνηση στην αναπτυξιακή βιολογία καθώς έχει καίριο ρόλο πραγματοποίηση των μιτωτικών διαιρέσεων και κατ' επέκταση στην εμβρυϊκή ανάπτυξη συνολικά.

(2) *Parhyale Hawaiiensis*

Το *Parhyale hawaiiensis*, όπως αναφέραμε και κατά την εισαγωγή θεωρείται ένας ανερχόμενος οργανισμός μοντέλο. Οι οργανισμοί μοντέλα είναι μη ανθρώπινα είδη που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο για να βοηθήσουν τους επιστήμονες να εξάγουν συμπεράσματα για διάφορες βιολογικές διεργασίες. Είναι συνήθως οργανισμοί που είναι εύκολο να διατηρηθούν και να αναπαραχθούν σε εργαστηριακό περιβάλλον και χαρακτηρίζονται από robust έμβρυα (δηλαδή έμβρυα τα οποία διατηρούν όλα τα λειτουργικά και μορφολογικά τους χαρακτηριστικά σε ποικίλα περιβάλλοντα και συνθήκες, τα οποία συνθέτουν τον φαινότυπο). Μερικοί χαρακτηριστικοί οργανισμοί μοντέλα που έχουν εκτενώς μελετηθεί είναι οι εξής:

- Mouse (*Mus Musculus*)
- Zebrafish (*Danio Rerio*)
- Western Clawed Frog (*Xenopus Tropicalis*)
- Fruit Fly (*Drosophila Melanogaster*)
- Yeast (*Saccharomyces Cerevisiae*)
- Nematode Worm (*Caenorhabditis Elegans*)

Ο λόγος για τον οποίο εντάσσεται στην κατηγορία των ανερχόμενων οργανισμών μοντέλων έγκειται στο γεγονός ότι έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα επιδεκτικός σε πειραματικούς χειρισμούς (π.χ εύκολη εξαγωγή των εμβρύων από τον εμβρυακό σάκο) και ότι αναπαράγεται εύκολα στο εργαστηριακό περιβάλλον σε μεγάλους αριθμούς.

Πιο συγκεκριμένα το *Parhyale hawaiiensis* είναι ένα παρασιτοφάγο (τρέφεται με νεκρή οργανική ύλη και οργανική ύλη που βρίσκεται σε αποσύνθεση), το οποίο εμφανίζει μία circumtropical (θεωρείται η κατανομή ενός είδους που εμφανίζεται μόνο στο ένα ημισφαίριο), intertidal (αναφέρεται στην περιοχή πάνω από την στάθμη της θάλασσας σε χαμηλή παλίρροια και στην περιοχή κάτω από την επιφάνεια στην περίπτωση εμφάνισης υψηλής παλίρροιας), shallow water (βρίσκεται σε ρηχά νερά) κατανομή, και συναντάται σε συμπλέγματα ειδών (δηλαδή σε ομάδες από στενά συνδεδεμένους οργανισμούς, οι οποίοι έχουν σχεδόν πανομοιότυπη εμφάνιση και λειτουργικά χαρακτηριστικά σε βαθμό που οι διαφορές μεταξύ τους είναι συχνά δυσδιάκριτες). Έχει αναφερθεί ότι εμφανίζεται σε μεγάλους πληθυσμούς

(περισσότεροι από 3.000 ανά τετραγωνικό μέτρο) γύρω από φύλλα mangrove (είναι συνήθως θάμνοι ή δέντρα που αναπτύσσονται σε παράκτιες περιοχές ή σε νερά με υψηλότερη αλατότητα από το γλυκό νερό) που βρίσκονται σε αποσύνθεση σε περιβάλλοντα που υπόκεινται σε γρήγορες μεταβολές στην αλατότητά τους.



Εικόνα 2.1: Αναπαράσταση του *Parhyale Hawaiiensis*

Η περίοδος αναπαραγωγής των θηλυκών *Parhyale Hawaiiensis* διαρκεί περί τις 2 εβδομάδες μόλις φτάσουν σε σεξουαλική ωριμότητα. Η εμβρυογένεση είναι σχετικά σύντομη, διαρκεί περίπου 10 ημέρες στους 26 °C (79 °F). Η ανάπτυξη των εμβρύων στο εσωτερικό των θηλυκών γίνεται στο ventral brood pouch (μια θήκη που σχηματίζεται στην κοιλιά του θηλυκού μέσα στην οποία μεγαλώνουν τα έμβρυα). Η εμβρυϊκή ανάπτυξη του *Parhyale Hawaiiensis* γίνεται σε 30 διακριτά στάδια, τα οποία είναι εύκολα αναγνωρίσιμα σε ζωντανά ζώα ή μέσω αναγνώρισης μοριακών δεικτών - είναι μόρια τα οποία αναγνωρίζοντάς τα και κατ' επέκταση υπολογίζοντας την συγκέντρωσή τους σε έναν οργανισμό μπορούμε να εξάγουμε κάποια συμπεράσματα για την λειτουργία του οργανισμού – (π.χ. Υπάρχουν ορισμένες πρωτεΐνες που είναι μοριακοί δείκτες της νόσου του Alzheimer σε ένα άτομο από το οποίο έχουν ληφθεί) σε σταθερά δείγματα. Τα εκκολαπτόμενα έμβρυά τους διαθέτουν ένα πλήρες συμπλήρωμα τμημάτων και appendages (σύνθετες δομές που αποτελούνται από πολλαπλούς ιστούς οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται αυτόνομα) που είναι παρόμοια στην μορφολογία τους με εκείνα των ενήλικων ζώων.

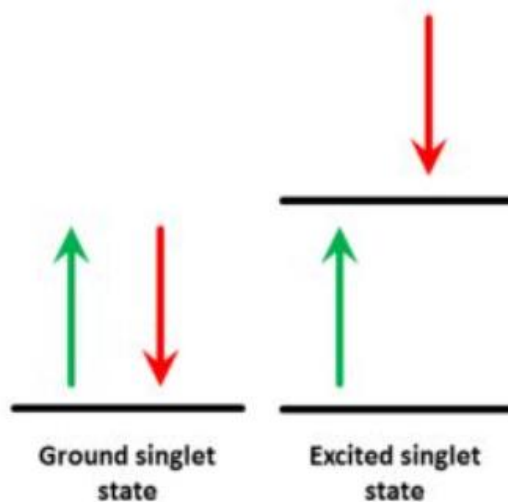
Παρακάτω θα μελετήσουμε εκτενώς τον φθορισμό και το φωτοακουστικό φαινόμενο σε ποιοτικό επίπεδο αλλά και ως προς τον μαθηματικό τους φορμαλισμό που είναι αναγκαίος για την βαθύτερη κατανόηση αυτών των φαινομένων. Στην συνέχεια, ορμώμενοι από την ποιοτική τους ανάλυση θα περιγράψουμε τις απεικονιστικές τεχνικές που αντιστοιχίζονται σε καθένα από αυτά τα φαινόμενα.

(3) Single photon fluorescence

(3.1) Εισαγωγή

Ο φθορισμός ορίζεται ως η εκπομπή φωτός από μια ουσία που έχει απορροφήσει φως ή άλλου είδους ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι τα εκπεμπόμενα φωτόνια (φωτόνια φθορισμού) να έχουν μεγαλύτερο μήκος κύματος και κατά συνέπεια χαμηλότερη ενέργεια σε σχέση με τα προσπίπτοντα φωτόνια. Για να έχουμε μια βαθύτερη κατανόηση του φαινομένου του φθορισμού θα εισάγουμε στη μελέτη μας την έννοια της πολυπλοκότητας του συστήματος των σπιν.

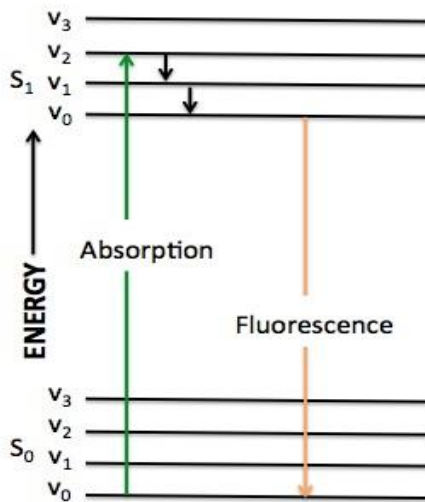
Οι καταστάσεις singlet και triplet ενός μορίου σχετίζονται με τις καταστάσεις σπιν των ηλεκτρονίων του. Μέσα σε ένα μόριο, τα ηλεκτρόνια διατάσσονται σε ζεύγη των δύο, τα οποία καταλαμβάνουν το ίδιο τροχιακό αλλά έχουν αντίθετα σπιν λόγω της αρχής του Pauli (απαγορευτική αρχή), η οποία δηλώνει ότι δύο ή περισσότερα πανομοιότυπα σωματίδια με ημιακέραιο σπιν (δηλαδή φερμιόνια) δεν μπορούν να καταλάβουν την ίδια κβαντική κατάσταση μέσα στο ίδιο κβαντικό σύστημα ταυτόχρονα. Η singlet κατάσταση ορίζεται ως η περίπτωση όπου το συνολικό σπιν είναι μηδέν επειδή τα δύο ηλεκτρόνια έχουν αντίθετα σπιν, ο ίδιος κανόνας εφαρμόζεται επίσης στην περίπτωση της διεγερμένης singlet κατάστασης για το συνολικό σπιν, αλλά η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι ένα ηλεκτρόνιο του ζεύγους βρίσκεται σε τροχιακό υψηλότερης ενέργειας.



Εικόνα 3.1: Διάταξη των ηλεκτρονίων για τις singlet καταστάσεις

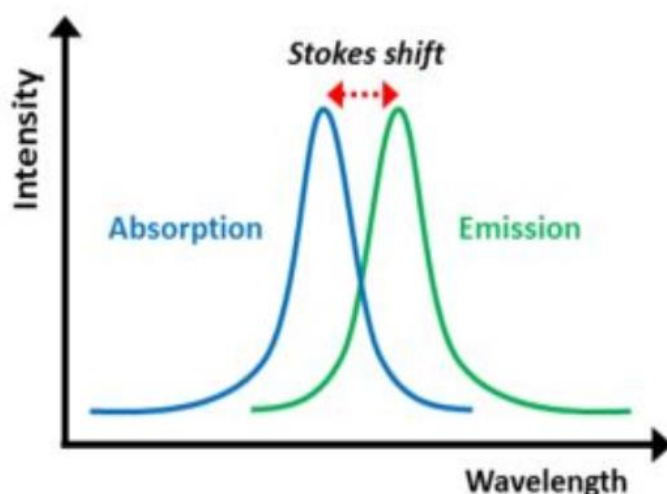
Οι μαύρες γραμμές που διακρίνονται στο σχήμα 1 αντιπροσωπεύουν τη διεγερμένη και τη βασική singlet κατάσταση του μορίου ενώ οι παράλληλες λεπτότερες γραμμές απεικονίζουν τις δονητικές στάθμες. Ο φθορισμός τυπικά, ορίζεται ως η εκπομπή φωτονίων, η οποία προκύπτει ως αποτέλεσμα της αποδιέγερσης ενός ηλεκτρονίου από τη χαμηλότερη διεγερμένη singlet κατάσταση στη βασική singlet κατάσταση, συνεπώς το εκπεμπόμενο φωτόνιο θα έχει ενέργεια ίση με την ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της

διεγερμένης singlet κατάστασης και του δονητικού επιπέδου της βασικής singlet κατάστασης. Συνεπώς, οι φασματικές ιδιότητες του φθορισμού δεν εξαρτώνται από το διεγείρον μήκος κύματος.



Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση (Jablonski diagram) της απορρόφησης του φωτονίου και κατόπιν του φθορισμού

Κατά τη διάρκεια του φθορισμού παρατηρούμε μια διαφορά στην ενέργεια και επομένως στο μήκος κύματος των εκπεμπόμενων φωτονίων σε σχέση με το μήκος κύματος των προσπίπτοντων φωτονίων, λόγω του γεγονότος, ότι αμέσως μετά τη διέγερση του ηλεκτρονίου (μερικά picosecond), επέρχεται μια ταχεία μείωση της δονητικής ενέργειας (δονητική χαλάρωση), κατά την οποία δεν εκπέμπεται ακτινοβολία, αφού η υπολειπόμενη ενέργεια καταναλώνεται με την μορφή κινητικής ενέργειας ή θερμότητας. Αυτή η μετατόπιση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος των φωτονίων φθορισμού σε σχέση με την διεγείρουσα ακτινοβολία ονομάζεται μετατόπιση Stokes.



Εικόνα 3.3: Η μετατόπιση Stokes δείχνει ανάγλυφα την διαφορά στην ενέργεια των απορροφούμενων και των εκπεμπόμενων φωτονίων φθορισμού

Κατά συνέπεια, η διαδικασία του φθορισμού μπορεί να χωριστεί σε δύο διακριτά στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την απορρόφηση του φωτονίου με ενέργεια περίπου ίση με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ της θεμελιώδους και της διεγερμένης στάθμης. Εν συνεχεία, το ηλεκτρόνιο θα παραμείνει στη διεγερμένη στάθμη για ένα μέσο χρονικό διάστημα της τάξης των 10^{-8} s (10 ns). Κατά τη διεξαγωγή του δεύτερου σταδίου, πραγματοποιείται η αποδιέγερση του ηλεκτρονίου στη θεμελιώδη στάθμη ακολουθούμενη από την εκπομπή ενός φωτονίου φθορισμού. Στα επόμενα κεφάλαια θα προσεγγίσουμε τον φθορισμό μέσω της ημικλασικής θεωρήσης. Η ημικλασική προσέγγιση αντιμετωπίζει το ατομικό σύστημα από την σκοπιά της κβαντομηχανικής και την προσπίπτουσα ακτινοβολία ως ένα κλασικό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που υπακούει στις εξισώσεις του Maxwell και όχι ως ρεύμα φωτονίων.

(3.2) Απορρόφηση φωτονίου

Σε αυτό το σκέλος θα χρησιμοποιήσουμε τους νόμους της κβαντικής μηχανικής για να υπολογίσουμε την πιθανότητα μετάβασης ενός φωτονίου που οδηγεί στην εκπομπή του φθορισμού. Η ανάλυσή μας ξεκινά με την υπόθεση ότι το οπτικό πεδίο που αλληλεπιδρά με την ύλη είναι ένα μονοχρωματικό κύμα γωνιακής συχνότητας ω που έχει τη γενική μορφή:

$$E(t) = Ee^{-i\omega t} + E^*e^{i\omega t} \quad (3.1)$$

Το ηλεκτρικό στοιχείο του οπτικού πεδίου θα αλληλεπιδράσει με το ατομικό σύστημα έτσι ώστε η Χαμιλτονιανή H (έκφραση της ενέργειας) του ατόμου να μπορεί να εκφραστεί ως το άθροισμα της Χαμιλτονιανής του ελεύθερου ατόμου H_0 συν τον όρο $V(t)$, ο οποίος αναπαριστά την ενέργεια αλληλεπίδρασης με το εφαρμοζόμενο πεδίο. Συνεπώς η Χαμιλτονιανή θα έχει την μορφή :

$$\hat{H} = H_0 + \hat{V}(t) \quad (3.2)$$

Όπου ο όρος που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση πεδίου-ατόμου δίνεται από την σχέση:

$$\hat{V}(t) = -\hat{\mu}E(t) \quad (3.3)$$

Ο τελεστής $\hat{\mu}$ εκφράζει την διπολική ροπή του ηλεκτρονίου και δίνεται από τον τύπο:

$$\hat{\mu} = e\hat{r} \quad (3.4)$$

Όπου το e αναφέρεται στο φορτίο του ηλεκτρονίου και το \hat{r} είναι ο τελεστής της θέσης, ο οποίος αναπαριστά την απόσταση του ηλεκτρονίου από τον πυρήνα. Η κυματοσυνάρτηση του ατόμου $\hat{\psi}(\vec{r}, t)$, ως γνωστόν, ικανοποιεί την χρονοεξαρτημένη εξίσωση του Schrodinger:

$$i\hbar \frac{\partial \hat{\psi}(\vec{r}, t)}{\partial t} \hat{r} = \hat{H}\hat{\psi}(\vec{r}, t) \quad (3.5)$$

Λαμβάνοντας υπόψιν και την (3.2.2) η (3.2.5) μετασχηματίζεται ως εξής:

$$i\hbar \frac{\partial \hat{\psi}(\vec{r}, t)}{\partial t} \hat{r} = (\hat{H}_0 + \hat{V}(t))\hat{\psi}(\vec{r}, t) \quad (3.6)$$

Όπως γνωρίζουμε, η λύση της εξίσωσης Schrodinger για το ελεύθερο άτομο (When $\hat{H} = \hat{H}_0$) έχει την μορφή :

$$\psi_n(\vec{r}, t) = u_n(\vec{r})e^{-i\omega_n t} \quad (3.7)$$

Όπου

$$\omega_n = E_n/\hbar \quad (3.8)$$

Τώρα έχουμε ένα πλήρες σύνολο ιδιοκαταστάσεων, ώστε να μπορούμε να εκφράσουμε τη λύση (3.2.7) ως τον γραμμικό συνδυασμό αυτών των ιδιοκαταστάσεων και παίρνουμε:

$$\psi(\vec{r}, t) = \sum_n \alpha_n(t)u_n(\vec{r})e^{-i\omega_n t} \quad (3.9)$$

Θεωρούμε επίσης δεδομένο ότι το χωρικό μέρος της κυματοσυνάρτησης του ελεύθερου ατόμου $u_n(\vec{r})$ ικανοποιεί το πρόβλημα των ιδιοτιμών:

$$\widehat{H}_0 u_n(\vec{r}) = E_n u_n(\vec{r}) \quad (3.10)$$

Εν συνεχεία, αντικαθιστούμε τις (3.7) (3.9) (3.10) στην (3.6) και προκύπτει:

$$\int u_m(\vec{r})^* i\hbar \sum_n \frac{d\alpha_n(t)}{dt} u_n(\vec{r}) e^{-i\omega_n t} dr^3 = \int u_m(\vec{r})^* i\hbar \sum_n u_n(\vec{r}) \alpha_n(t) e^{-i\omega_n t} dr^3 \quad (3.11)$$

Ακολούθως, θα εφαρμόσουμε την συνθήκη ορθοκανονικότητας:

$$\int u_m(\vec{r})^* u_n(\vec{r}) dr^3 = \delta_{mn} \quad (3.12)$$

Συνεπώς έχουμε την τελική μορφή :

$$i\hbar \frac{\partial \alpha_m(t)}{\partial t} = \sum_n \alpha_n(t) V_{mn} e^{-i\omega_{mn} t} \quad (3.13)$$

Όπου

$$\omega_{mn} = \omega_m - \omega_n \quad (3.14)$$

$$V_{mn} = \int u_m(\vec{r})^* \widehat{V} u_n(\vec{r}) dr^3 \quad (3.15)$$

Η εξίσωση (3.13) δεν μπορεί να λυθεί αναλυτικά, συνεπώς πρέπει να χρησιμοποιήσουμε μια προσεγγιστική μέθοδο επίλυσης, όπως οι τεχνικές των διαταραχών . Η ολοκληρωμένη μελέτη της τεχνικής της διαταραχών που εφαρμόστηκε για τη λύση της εξ.(3.13) θα παραλειφθεί. Στόχος αυτής της εργασίας δεν είναι να προσεγγίσει αυτό το πεδίο των μαθηματικών, αλλά να αναδείξει τον τρόπο που λειτουργεί ο φθορισμός και τα κύρια χαρακτηριστικά του.

Συνεπώς η λύση της εξίσωσης (3.13) είναι:

$$\alpha_m^{(1)}(t) = \frac{\mu_{mg} E}{\hbar(\omega_{mg} - \omega)} \left[e^{i(\omega_{mg} - \omega)t} - 1 \right] \quad (3.16)$$

Όπου το $\alpha_m^{(1)}(t)$ είναι ο δεύτερος όρος της δυναμοσειράς που χρησιμοποιήθηκε για την προσεγγιστική επίλυση της διαφορικής εξίσωσης (3.13) κατά την διαδικασία της γραμμικής απορρόφησης. Ο όρος μ_{mg} δίνεται από το ολοκλήρωμα:

$$\mu_{mg} = \int u_m(\vec{r})^* \hat{\mu} u_g(\vec{r}) d\vec{r}^3 \quad (17)$$

Όπου ο τελεστής $\hat{\mu}$ εκφράζει την διπολική ροπή του ηλεκτρονίου όπως προαναφέραμε (3.4) και αντίστοιχα έχουμε τα χωρικά μέρη της κυματοσυνάρτησης $u_m(\vec{r})$ και $u_g(\vec{r})$. Τα γράμματα m και g αντιπροσωπεύουν την θεμελιώδη στάθμη (g) και οποιαδήποτε στάθμη (m).

Ο όρος $a_m^{(1)}(t)$ ορίζεται ως το πλάτος πιθανότητας, του οποίου το μέτρο (στους μιγαδικούς αριθμούς) εκφράζει πόσο πιθανό είναι να πραγματοποιηθεί η μετάβαση του ηλεκτρονίου από μια κατάσταση l σε μια κατάσταση m . Άρα η πιθανότητα $p_m^{(1)}(t)$ το άτομο να βρίσκεται στην κατάσταση m την χρονική στιγμή t μέσω της απορρόφησης ενός φωτονίου είναι:

$$p_m^{(1)}(t) = \frac{|\mu_{mg} E|^2}{\hbar^2} \cdot \frac{4 \sin^2 \left[\frac{(\omega_{mg} - \omega)t}{2} \right]}{(\omega_{mg} - \omega)^2} \quad (3.18)$$

Διαπιστώνουμε ότι ο τριγωνομετρικός όρος του παράγοντα πιθανότητας μετάβασης για μεγάλες τιμές του χρόνου αλληλεπίδρασης ($t \rightarrow \infty$) θα είναι εξαιρετικά υψηλός και στενός, συνεπώς μπορεί να προσεγγιστεί από τη σχέση ($t \rightarrow \infty$):

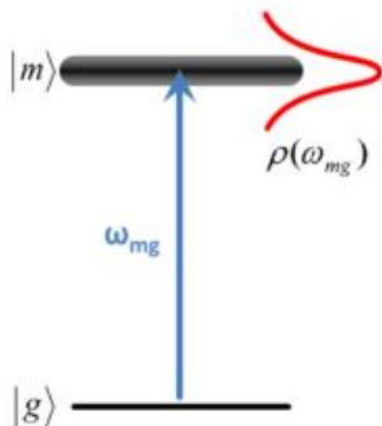
$$f(t) \approx 2\pi t \delta(\omega_{mg} - \omega) \quad (3.19)$$

Όπου δ είναι η συνάρτηση δέλτα του Dirac. Συνεπώς, η πιθανότητα $p_m^{(1)}(t)$ θα είναι:

$$p_m^{(1)}(t) = \frac{|\mu_{mg} E|^2 t}{\hbar^2} \cdot 2\pi \delta(\omega_{mg} - \omega) \quad (3.20)$$

Το αποτέλεσμα στο οποίο καταλήξαμε στην εξίσωση (3.20) δεν ανταποκρίνεται σε μια φυσική κατάσταση. Στις πραγματικές περιπτώσεις η συχνότητα μετάβασης ω_{mg} έχει συνεχή κατανομή και δεν προσδιορίζεται ακριβώς λόγω των μηχανισμών φασματικής διαπλάτυνσης όπως το thermal Doppler broadening.

Στη συνέχεια, θα εισάγουμε τον όρο της πυκνότητας των τελικών καταστάσεων $\rho(\omega_{mg})$ που ορίζεται μέσω του γινομένου $\rho(\omega_{mg}) d\omega_{mg}$, ως η πιθανότητα η συχνότητα μετάβασης να βρίσκεται μεταξύ ω_{mg} και $\omega_{mg} + d\omega_{mg}$.



Εικόνα 3.4: Η κατάσταση $|m\rangle$ κατανέμεται σε μια πυκνότητα δυνατών καταστάσεων η οποία περιγράφεται από την συνάρτηση $\rho(\omega_{mg})$

Συνεπώς, η πιθανότητα υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις δυνατές τιμές της συχνότητας μετάβασης. Συνεπώς η (20) μετασχηματίζεται ως εξής:

$$p_m^{(1)}(t) = \frac{|\mu_{mg}E|^2 t}{\hbar^2} \int \rho(\omega_{mg}) 2\pi \delta(\omega_{mg} - \omega) d\omega_{mg} = \frac{|\mu_{mg}E|^2 t}{\hbar^2} \rho(\omega_{mg} = \omega) \quad (3.21)$$

Εν κατακλείδι, υπολογίσαμε την πιθανότητα μετάβασης που εκφράζει το ποσοστό των ατόμων που βρέθηκαν στο ανώτερο επίπεδο m μετά το χρόνο t . Αντίστοιχα, μπορούμε να υπολογίσουμε τον ρυθμό μετάδοσης, ο οποίος εκφράζει το ποσοστό των ατόμων που μετακινούνται στο επίπεδο m από το επίπεδο g στην περίπτωση γραμμικής απορρόφησης, όπως παρουσιάζεται παρακάτω:

$$R_{mg}^{(1)} = \frac{p_m^{(1)}(t)}{t} = \frac{|\mu_{mg}E|^2}{\hbar^2} \rho(\omega_{mg} = \omega) \quad (3.22)$$

Ένας άλλος τρόπος για να αναπαραστήσουμε πόσο πιθανό είναι να πραγματοποιηθεί μια φυσική διαδικασία, έρχεται με τον υπολογισμό της ενεργούς διατομής. Η ενεργός διατομή αντανακλά την πιθανότητα να λάβει χώρα μια συγκεκριμένη διαδικασία όταν κάποιο είδος διεγείρουσας ακτινοβολίας (π.χ. δέσμη σωματιδίων, ηχητικό κύμα, φως ή ακτίνες X) προσπίπτει σε ένα σώμα. Η ενεργός διατομή $\sigma_{mg}^{(1)}(\omega)$ για την γραμμική απορρόφηση είναι:

$$R_{mg}^{(1)} = \sigma_{mg}^{(1)}(\omega) F \quad (3.23)$$

Το F είναι το photon flux της δέσμης (photons/unit area/unit time) και δίνεται από τον τύπο:

$$F = \frac{I}{\hbar\omega} \quad (3.24)$$

I είναι η ένταση της ακτινοβολίας και εκφράζεται ως εξής:

$$I = 2n\varepsilon_0 c |E|^2 \quad (3.25)$$

Όπου n είναι ο δείκτης διάθλασης του μέσου, c είναι η ταχύτητα του φωτός, E είναι το πλάτος του πεδίου και ε_0 είναι η διαπερατότητα του κενού. Ο συνδυασμός των εξισώσεων (3.23) (3.24) (3.25) μας οδηγεί σε μια πιο συμπαγή μορφή:

$$\sigma_{mg}^{(1)}(\omega) = \frac{\pi\omega |\mu_{mg}|^2 \rho(\omega_{mg} = \omega)}{n\varepsilon_0 c \hbar} \quad (3.26)$$

(3.3) Ημικλασική προσέγγιση της αυθόρμητης εκπομπής

Όπως αναφέραμε στην εισαγωγή σχετικά με την αυθόρμητη εκπομπή, η ημικλασική προσέγγιση δεν είναι ο σωστός τρόπος για να περιγράψουμε αυτό το φαινόμενο, αλλά δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα για την περίπτωση ενός ασθενούς πεδίου διέγερσης. Η ολοκληρωμένη μελέτη της αυθόρμητης εκπομπής απαιτεί να δούμε τα πράγματα από την οπτική της κβαντικής ηλεκτροδυναμικής, αλλά δεν είναι ο σκοπός αυτής της εργασίας να

μελετήσει αυτό το φαινόμενο στη γενική περίπτωση, επομένως το αντιμετωπίζουμε από την ημικλασική σκοπιά.

Ας υποθέσουμε για ένα τυχαίο άτομο, το οποίο αρχικά μεταβαίνει στην διεγερμένη κατάσταση $|2\rangle$, με ενέργεια E_2 και στην συνέχεια επανέρχεται πίσω στην $|1\rangle$ με ενέργεια E_1 . Οι αντιπροσωπευτικές κυματοσυναρτήσεις για αυτές τις δύο καταστάσεις είναι:

$$\psi_1(\vec{r}, t) = u_1(\vec{r})e^{-i\left(\frac{E_1}{\hbar}\right)t} \quad (3.27)$$

$$\psi_2(\vec{r}, t) = u_2(\vec{r})e^{-i\left(\frac{E_2}{\hbar}\right)t} \quad (3.28)$$

Όπου $u_1(\vec{r})$ και $u_2(\vec{r})$ είναι οι ιδιοσυναρτήσεις που αντιπροσωπεύουν τις δύο στάσιμες καταστάσεις. Η μετάβαση $|2\rangle \rightarrow |1\rangle$ του ατόμου μπορεί να εκφραστεί σαν ένας γραμμικός συνδυασμός των κυματοσυναρτήσεων των δύο καταστάσεων όπως φαίνεται παρακάτω:

$$\psi(\vec{r}, t) = \alpha_1(t)\psi_1(\vec{r}, t) + \alpha_2(t)\psi_2(\vec{r}, t) \quad (3.29)$$

Στην περίπτωση μας, οι συντελεστές $\alpha_1(t)$ και $\alpha_2(t)$ είναι χρονικά εξαρτημένοι μιγαδικοί αριθμοί, των οποίων το μέτρο μας δίνει τις πιθανότητες να βρούμε το άτομο στην στάθμη $|1\rangle$ ή $|2\rangle$ την χρονική στιγμή t . Το σύστημά μας έχει μόνο δύο δυνατές καταστάσεις τις οποίες μπορεί να καταλάβει το άτομο, επομένως για την συνολική πιθανότητα θα ισχύει:

$$|\alpha_1(t)|^2 + |\alpha_2(t)|^2 = 1 \quad (3.30)$$

Ακολούθως, είμαστε σε θέση να προσδιορίσουμε την ηλεκτρική διπολική ροπή του ατόμου $\vec{\mu}$, της οποίας η πληροφορία ουσιαστικά αναδεικνύει πως εκδηλώνεται η αυθόρμητη εκπομπή και δίνεται από την εξής σχέση:

$$\vec{\mu} = \int e|\psi(\vec{r}, t)|^2 r dV \quad (3.31)$$

Όπου το e αντικατοπτρίζει το φορτίο του ηλεκτρονίου και το ολοκλήρωμα υπολογίζεται σε όλο τον όγκο του ατόμου.

Συνεπώς από τις (3.27) (3.28) (3.29) (3.30) και (3.31) έχουμε:

$$\begin{aligned} \vec{\mu} = & \int e\vec{r}|\alpha_1|^2|u_1|^2 dV + \int e\vec{r}|\alpha_2|^2|u_2|^2 dV \\ & + \int e\vec{r}[\alpha_1\alpha_2^*u_1u_2^*e^{i\omega_0 t} + \alpha_1^*\alpha_2u_1^*u_2e^{-i\omega_0 t}]dV \quad (3.32) \end{aligned}$$

Ο τελευταίος όρος της (3.32) ταλαντώνεται σε συχνότητα ω_0 , η οποία δίνεται από την σχέση:

$$\omega_0 = \frac{E_2 - E_1}{\hbar} \quad (3.33)$$

Αυτός ο όρος μπορεί να γραφεί στην μορφή:

$$\vec{\mu}_{osc} = \vec{\mu}_0 \cos(\omega_0 t + \varphi) \quad (3.34)$$

Όπου το $\vec{\mu}_0$ είναι ένα πραγματικό διάνυσμα που δείχνει το πλάτος της διπολικής ροπής, της οποίας το «μέγεθος» δίνεται από τον τύπο:

$$\mu_o = [(2\alpha_1\alpha_2^*\vec{\mu}_{21}) \cdot (2\alpha_1^*\alpha_2\vec{\mu}_{21})]^{1/2} = 2|\alpha_1\alpha_2^*\vec{\mu}_{21}| \quad (3.35)$$

Το $\vec{\mu}_{21}$ είναι το στοιχείο του πίνακα που περιγράφει τον τελεστή της ηλεκτρικής διπολικής ροπής και δίνεται από τον τύπο:

$$\vec{\mu}_{21} = \int u_2^* e\vec{r}u_1 dV \quad (3.36)$$

Η ακτινοβολητική δύναμη που προέρχεται από την ταλαντούμενη ηλεκτρική διπολική ροπή περιγράφεται από την σκοπιά της κλασικής ηλεκτροδυναμικής ως εξής:

$$P = \frac{n\mu^2\omega_0^4}{12\pi\epsilon_0 c^3} \quad (3.37)$$

Όπου το n είναι ο δείκτης διάθλασης του μέσου, c είναι η ταχύτητα του φωτός, ϵ_0 είναι η διαπερατότητα του κενού και το «μέγεθος» μ_0 της ηλεκτρικής διπολικής ροπής το οποίο θεωρείται ίσο με μ . Επιπλέον, ο ρυθμός διάσπασης του ατόμου δίνεται από την σχέση:

$$P = -\frac{dE}{dt} \quad (3.38)$$

Όπου E είναι η ενέργεια του ατόμου:

$$E = |a_1|^2 E_1 + |a_2|^2 E_2 \quad (3.39)$$

Συνεπώς από τις (3.30) (3.35) (3.37) (3.38) (3.39) εξάγουμε την διαφορική εξίσωση αυτής της μορφής:

$$\frac{d|a_2|^2}{dt} = -\frac{1}{t_{sp}} (1 - |a_2|^2)^2 |a_2|^2 \quad (3.40)$$

t_{sp} ορίζεται ως ο χρόνος που το ηλεκτρόνιο παραμένει στην στάθμη $|2\rangle$ μέχρι την αποδιέγερσή του στην στάθμη $|1\rangle$, ο οποίος έχει υπολογιστεί κατά προσέγγιση:

$$t_{sp} \approx 10^{-8} \text{ s} = 10 \text{ ns} \quad (3.41)$$

Με αυτά τα δεδομένα είμαστε σε θέση να λύσουμε την συνήθη διαφορική εξίσωση (3.40), από την οποία εξάγουμε το εξής αποτέλεσμα:

$$|a_2|^2 = \frac{1}{2} \left[1 - \tanh\left(\frac{t - t_0}{2t_{sp}}\right) \right] \quad (3.42)$$

Παρατηρούμε ότι αυτό το αποτέλεσμα δεν ανταποκρίνεται στον εκθετικό νόμο για τη διάσπαση του ατόμου που προβλέπεται από την κβαντική ηλεκτροδυναμική θεωρία στη γενική περίπτωση. Ωστόσο, στην περίπτωση της ασθενούς διέγερσης $|a_2|^2 \ll 1$ η διαφορική εξίσωση (3.40) προσεγγίζεται ως εξής:

$$\frac{d|a_2|^2}{dt} = -\frac{1}{t_{sp}} |a_2|^2 \quad (3.43)$$

Με την αντίστοιχη λύση:

$$|a_2(t)|^2 = |a_2(0)|^2 e^{-t/t_{sp}} \quad (3.44)$$

Από την (3.44) βλέπουμε ότι $|a_2(0)|^2 = 1$ όταν $t_0 = \infty$, το οποίο συνεπάγεται ότι το άτομο δεν διασπάται, συνεπώς θα παραμείνει στην διεγερμένη στάθμη για άπειρο χρόνο, άρα θα ισχύει

$$\frac{d|a_2|^2}{dt} = 0 \quad (3.45)$$

Σε αυτό το σημείο, εγείρεται ένα σημαντικό ερώτημα για την κατάσταση ισορροπίας του ατόμου. Πιο συγκεκριμένα, είναι σωστό να υποθέσουμε ότι αυτή είναι η κατάσταση ισορροπίας του ατόμου (εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν διασπάται)? Η διαταραχή του ατόμου είναι η απάντηση στο πρόβλημά μας. Θα ξεκινήσουμε την ανάλυση, υποθέτοντας ότι το άτομο είναι διαταραγμένο, συνεπώς υπάρχει πιθανότητα το άτομο να βρίσκεται στην στάθμη $|1\rangle$ ($|a_1(t)|^2 \neq 0$ και $|a_2(t)|^2 < 1$ αντίστοιχα). Άμεσο επακόλουθο αυτού, είναι το γεγονός ότι εμφανίζεται η διπολική ροπή, ταλαντούμενη με γωνιακή συχνότητα ω_0 , το οποίο συνεπάγεται ότι θα έχουμε ακτινοβολία στον περιβάλλοντα χώρο κατά την διάσπαση του ατόμου και την μετάβασή του εν συνεχεία στην στάθμη $|1\rangle$. Επομένως η πιθανότητα $|a_2(t)|^2$ θα συνεχίσει να μειώνεται, το οποίο καθιστά πρακτικά ασταθή την ισορροπία.

Συμπερασματικά, βλέπουμε ότι η ημικλασική θεώρηση προσεγγίζει σε μεγάλο βαθμό την αστάθεια που υπάρχει στην ισορροπία του ατομικού συστήματος. Εξηγεί το φαινόμενο του φθορισμού ικανοποιητικά, προβλέποντας παράλληλα, με ικανοποιητική ακρίβεια τον χρόνο ζωής της διεγερμένης στάθμης (~ 10 ns) εφαρμόζοντας τους κατάλληλους περιορισμούς (περίπτωση ασθενούς διέγερσης του ατόμου)

Στην συνέχεια θα παραθέσουμε κάποια γενικά στοιχεία για την μικροσκοπία φθορισμού, καθώς και τις δύο καθιερωμένες τεχνικές απεικόνισης, για τις οποίες ο φθορισμός αποτελεί την φαιά ουσία του τρόπου λειτουργίας του. Αυτές είναι:

- Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού (confocal microscopy)
- SPIM (Selective Plane Illumination Microscopy)

(4) Μικροσκοπία φθορισμού

(4.1) Εισαγωγή

Το 1904 ο Γερμανός μικροσκόπος August Kohler μελετούσε τη χρήση του υπεριώδους φωτός αποσκοπώντας στην αύξηση της ανάλυσης του μικροσκοπίου. Κατά την διάρκεια αυτής της μελέτης, παρατήρησε ότι ορισμένα αντικείμενα εξέπεμπαν ακτινοβολία όταν είχαν ακτινοβοληθεί προηγουμένως με υπεριώδες φως. Αυτή η εκπομπή φωτός ονομάζεται φθορισμός, τον οποίο έχουμε αναλύσει εκτενώς στην προηγούμενη ενότητα. Ο φθορισμός έχει τεράστια επίδραση στον κλάδο της μικροσκοπίας και έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της ευαισθησίας του στην ανίχνευση των φθορίζοντων μορίων.

Τα μικροσκοπία φθορισμού δίνουν το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα όταν το υλικό που συνθέτει το φόντο είναι μη φθορίζον και μελανό, με αυτή την συνθήκη επιτυγχάνουμε υψηλή αντίθεση

στην απεικόνιση. Η ευαισθησία της τεχνικής έχει βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια με τη χρήση των φθοροφόρων, δηλαδή ουσιών, όπου το συστατικό που φθορίζει κατά την ακτινοβόληση προσκολλάται σε ένα συγκεκριμένο αντίσωμα, έτσι ώστε να εξάγουμε πληροφορία από τις υπό μελέτη περιοχές οι οποίες δεν φθορίζουν εγγενώς κατά την ακτινοβόληση. Παράλληλα οι συγκεκριμένες ουσίες αποκρίνονται άμεσα και εκπέμπουν φωτόνια φθορισμού κατά την ακτινοβόληση, το οποίο είναι καίριας σημασίας για τους βιολόγους σε περίπτωση *in vivo* παρακολούθησης μεταβατικών γεγονότων που έχουν πολύ μικρή χρονική κλίμακα (π.χ. εμβρυογένεση).

Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι φθορισμού με βάση τις ιδιότητες κάθε δείγματος. Πρώτον, υπάρχει ο αυτοφθορισμός που σχετίζεται με τον φθορισμό που παρουσιάζουν πολλές φυσικές ενώσεις ως εγγενές χαρακτηριστικό τους όταν διεγείρονται με σχετικά μικρά μήκη κύματος. Αντίθετα, σε ορισμένες περιπτώσεις τα συστατικά που βρίσκονται σε βιολογικούς ιστούς δεν είναι έχουν την ιδιότητα του αυτοφθορισμού (π.χ. αδρεναλίνη, ισταμίνη κ.λπ.) αλλά μπορεί να γίνουν φθορίζοντα μετά από χημική επεξεργασία που ονομάζεται επαγόμενος φθορισμός που αναφέραμε προηγουμένως.

Η μικροσκοπία φθορισμού έχει πληθώρα εφαρμογών, όπως στην αξιολόγηση διαφόρων οφθαλμικών παθήσεων, ποσοτικοποιώντας και εξάγοντας ποιοτικά συμπεράσματα εν γένει για τα ενδοθηλιακά κύτταρα του κερατοειδούς. Στη φαρμακοβιομηχανία αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της διαδικασίας παρασκευής φαρμακευτικών φιλμ (λεπτής μεμβράνης), για τον ποιοτικό έλεγχο και την ομοιογενή κατανομή του υλικού κατά την σύνθεση των φαρμάκων. Η μικροσκοπία φθορισμού χρησιμοποιείται επίσης για τη μελέτη των βιοφίλμ, τα οποία είναι πολύπλοκες πορώδεις δομές, οι οποίες θεωρούνται ιδανικοί βιότοποι για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Στο επόμενο σκέλος θα παραθέσουμε τις δύο βασικές τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού, οι οποίες έχουν καθιερωθεί στον κλάδο της απεικόνισης και συγκεκριμένα στο τομέα της βιοαπεικόνισης.

(4.2) Συνεστιακή Μικροσκοπία

Η συνεστιακή μικροσκοπία είναι μία καθιερωμένη τεχνική (τελευταία 40-50 χρόνια) η οποία προσφέρει την δυνατότητα λήψης πληροφορίας από μεγάλα απεικονιστικά βάθη στους ιστούς, διατηρώντας παράλληλα την υψηλή ανάλυση, λαμβάνοντας οπτικές τομές του δείγματος οι οποίες εν συνεχεία ανασυνδυάζονται συνθέτοντας τρισδιάστατες ανακατασκευές των αντικειμένων που απεικονίζονται. Η βασική αρχή της συνεστιακής μικροσκοπίας είναι ότι τα οπτικά στοιχεία της διάταξης, τα οποία είναι υπεύθυνα για τον φωτισμό και την μετέπειτα ανίχνευση της ακτινοβολίας είναι εστιασμένα στο ίδιο spot size (σημείο), το οποίο καθορίζεται από το όριο περίθλασης του φωτός, το οποίο εν συνεχεία μετακινείται στο δείγμα «σαρώνοντάς» το, ώστε να δημιουργηθεί η πλήρης εικόνα στον ανιχνευτή.

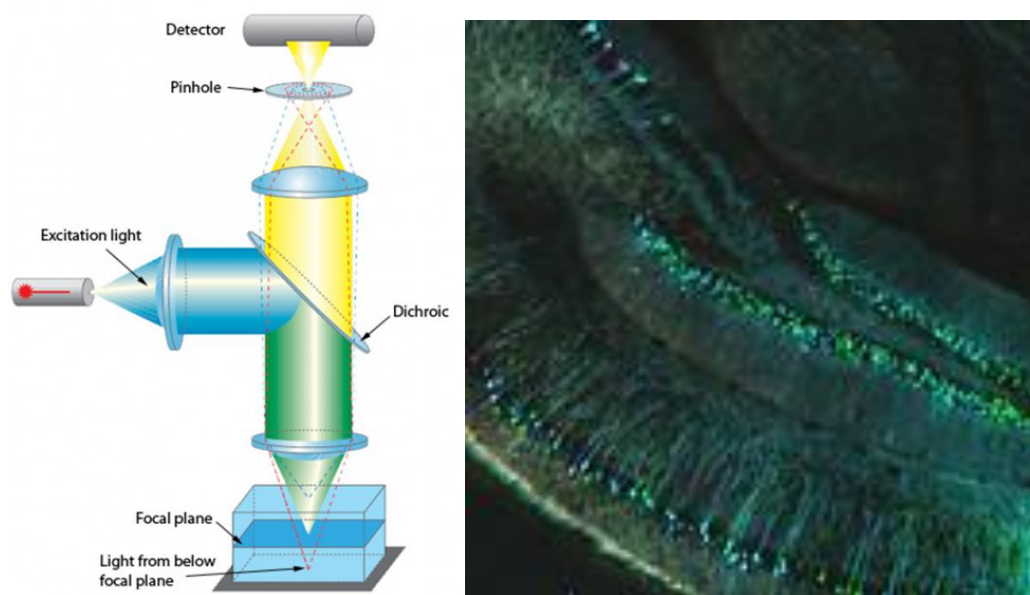
Το χαρακτηριστικό όμως που προσδίδει την υψηλή ανάλυση στις εικόνες που λαμβάνουμε είναι το pinhole (οπτή) που παρεμβάλλεται ανάμεσα στον ανιχνευτή και στον αντικειμενικό φακό. Το pinhole επιτρέπει την διέλευση φωτονίων φθορισμού μόνο από το εστιακό επίπεδο της δέσμης απορρίπτοντας τα φωτόνια φθορισμού εκτός εστιακού επιπέδου, τα οποία προκαλούν blurring (θόλωση) των εικόνων.

Στην οπτική μικροσκοπία, η ανάλυση καθορίζεται από το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού NA , από τις ιδιότητες του υπό μελέτη δείγματος (δείκτης διάθλασης n) και από το μήκος κύματος της δέσμης. Οι εξισώσεις που δείχνουν πως προσδιορίζεται η πλευρική και η αξονική ανάλυση ενός συνεστιακού μικροσκοπίου είναι οι εξής:

$$R_{Lateral} = 0.4 \frac{\lambda}{NA} \quad (4.1)$$

$$R_{Axial} = 1.4\lambda \frac{n}{(NA)^2} \quad (4.2)$$

Όπου R είναι η ελάχιστη απόσταση για την οποία δύο σημειακά αντικείμενα μπορούν να διακριθούν, λ είναι το μήκος κύματος ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται και NA είναι το «αριθμητικό πλάτος» του φακού εστίασης. Η καλύτερη ανάλυση που μπορεί να επιτευχθεί πλευρικά είναι $R_{Lateral} \sim 0,2 \mu m$ και $R_{Axial} \sim 0,6 \mu m$ αξονικά, αν και στην πράξη αυτό δεν επιτυγχάνεται πάντα. Παρά τις σπές, η αξονική ανάλυση στο συνεστιακό μικροσκόπιο εξακολουθεί να είναι χειρότερη από την πλευρική ανάλυση, όπως και στην widefield μικροσκοπία φθορισμού. Ενδεικτικά, παρατίθεται παρακάτω μια τυπική διάταξη ενός confocal μικροσκοπίου καθώς και μια αντιπροσωπευτική μέτρηση σε αυτό:

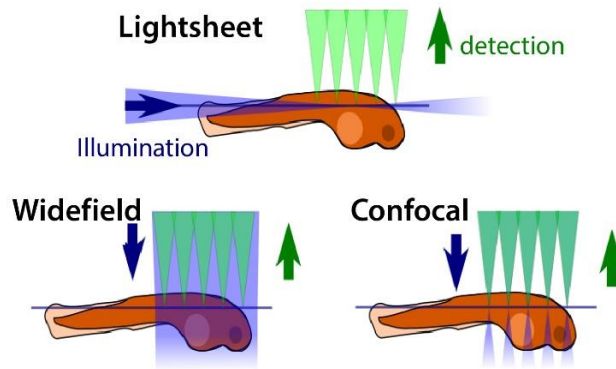


Εικόνα 4.1: Στην εικόνα αριστερά φαίνεται μια τυπική διάταξη ενός συνεστιακού μικροσκοπίου, τα δύο βασικά του στοιχεία είναι ο διχρωϊκός καθρέφτης (Dichroic) και η οπή (pinhole), τα οποία θα περιγράψουμε αναλυτικά στην συνέχεια. Στην εικόνα δεξιά φαίνεται η αναπαράσταση του εσωτερικού του εγκεφάλου ενός ποντικού

(4.3) SPIM (Selective Plane Illumination Microscopy)

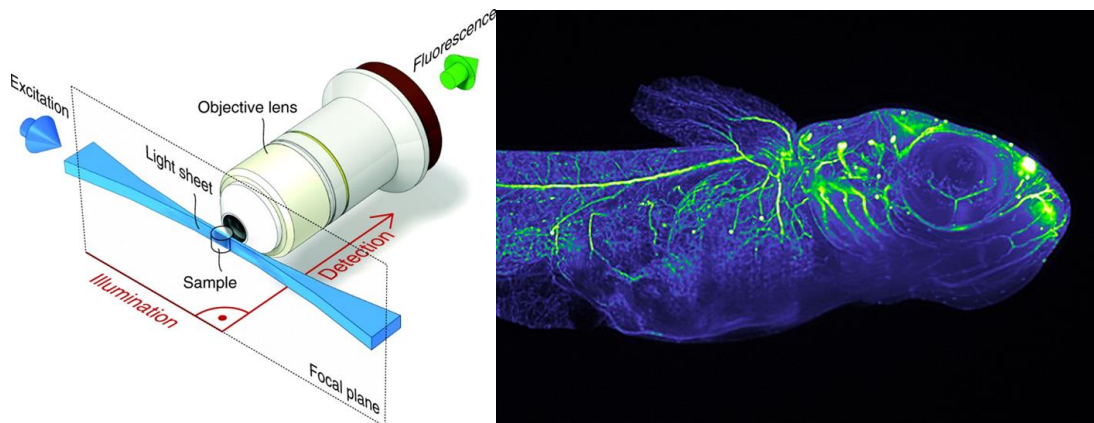
Το SPIM είναι μια τεχνική απεικόνισης που συνδυάζει την ταχύτητα για widefield απεικονίσεις και συνάμα χαμηλή φωτολευκανση του δείγματος ή των φθοροφόρων που εισάγουμε στο δείγμα, λόγω μικρού χρόνου έκθεσης του δείγματος στην ακτινοβολία της δέσμης του λέιζερ, έχοντας τα ηνία τα τελευταία χρόνια στον κλάδο της μικροσκοπίας φθορισμού. Η ιδιότητα που χαρακτηρίζει το SPIM είναι ο επίπεδος φωτισμός του εστιακού επιπέδου του δείγματος από το πλάι μέσω ενός λεπτού «φύλλου φωτός». Συνεπώς γίνεται αντιληπτό ότι λαμβάνουμε φωτόνια φθορισμού μόνο από το εστιακό επίπεδο (χωρίς να χρειαστεί να αποκόψουμε τα φωτόνια εκτός εστιακού επιπέδου όπως στο confocal, καθώς δεν υπάρχουν) ελαχιστοποιώντας έτσι την φωτοκαταστροφή που μπορεί να προκύψει στο

εσωτερικό του δείγματος (αν υπάρξει αλληλεπίδραση της δέσμης με σημεία εκτός εστιακού επιπέδου και παρατεταμένα). Σε αντίθεση με το συνεστιακό μικροσκόπιο που ανιχνεύει μόνο ένα pixel τη φορά, στο SPIM λόγω του φωτισμού μέσω του φύλλου φωτός εξάγουμε άμεσα την πληροφορία καθώς με αυτόν τον τύπο φωτισμού του δείγματος λαμβάνεται κατευθείαν η επιθυμητή οπτική τομή, όπως φαίνεται ανάγλυφα παρακάτω:



Εικόνα 4.2: Σύγκριση του τρόπου φωτισμού του δείγματος ανάμεσα στις τρεις τεχνικές widefield, confocal και SPIM

Η περαιτέρω ανάλυση της τεχνικής δεν έχει σχέση με τον χαρακτήρα αυτής της εργασίας διότι δεν χρησιμοποιήθηκε κατά την λήψη των μετρήσεων, απλώς θα παραθέσω παρακάτω τυπικά τον τρόπο φωτισμού και την καταγραφή του φθορισμού καθώς και μια αντιπροσωπευτική μέτρηση μέσω του SPIM.



Εικόνα 4.3 : Στην εικόνα αριστερά αναπαρίσταται ο φωτισμός του δείγματος μέσω ενός λεπτού φύλλου φωτός και κατόπιν η καταγραφή του φθορισμού από την CCD κάμερα. Στην εικόνα δεξιά φαίνεται η απεικόνιση ενός Medaka του γένους των *oryziinae* (rice fish)

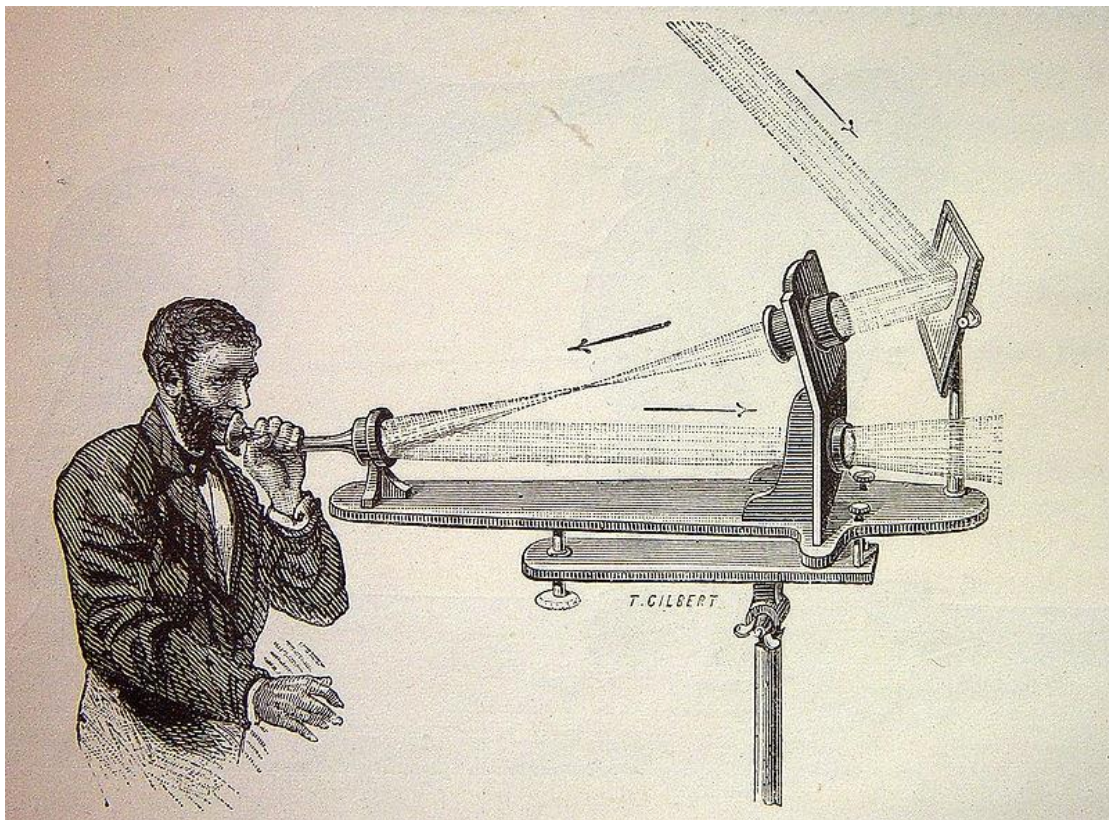
Στην συνέχεια θα κάνουμε μια εκτενή αναφορά στην φωτοακουστική μικροσκοπία, την οποία χρησιμοποιήσαμε συνδυαστικά με την συνεστιακή μικροσκοπία κατά τις μετρήσεις που πραγματοποιήσαμε, καθώς και στο πως αναδύεται το φωτοακουστικό φαινόμενο μέσω μιας ποιοτικής ανάλυσης ως προς τον μαθηματικό του φορμαλισμό.

(5) Φωτοακουστικό φαινόμενο

(5.1) Εισαγωγή

Το φωτοακουστικό φαινόμενο είναι η παραγωγή ακουστικών κυμάτων λόγω της θερμοελαστικής διαστολής του δείγματος μετά την απορρόφηση χρονικά μεταβαλλόμενης ακτινοβολίας. Το πλάτος του παραγόμενου κύματος PA είναι ανάλογο της ροής του λέιζερ (F) και του συντελεστή απορρόφησης (μ) και προσδιορίζεται επίσης από την ισόθερμη συμπιεστότητα (κ) και τον θερμικό συντελεστή διαστολής όγκου (β).

Το φωτοακουστικό φαινόμενο ανακαλύφθηκε τυχαία το 1880 από τον A. G. Bell κατά την ενασχόλησή του με την ανάπτυξη του φωτοφώνου, μιας συσκευής που επιτρέπει τη μετάδοση της ομιλίας μέσω μιας δέσμης φωτός. Αρχικά το όνομα του φαινομένου ονομάστηκε «οπτοακουστικό φαινόμενο», αλλά άλλαξε κατόπιν, για να μην συγχέεται με το «ακουστοοπτικό φαινόμενο», το οποίο σχετίζεται με την αλλαγή του δείκτη διάθλασης ενός μέσου λόγω της παρουσίας ηχητικών κυμάτων, τα οποία προκύπτουν από τις αλληλεπιδράσεις του φωτός στο εσωτερικό του κρυστάλλου. Ο Bell και ο συνεργάτης του, S. Tainter, παρατήρησαν ότι το φωτοακουστικό φαινόμενο εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την απορρόφηση της ακτινοβολίας, έτσι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η πηγή της ακτινοβολίας καθορίζει τον τύπο του ήχου που παράγεται.



Εικόνα 5.1: Αναπαράσταση του φωτοακουστικού φαινομένου

Το φωτοακουστικό φαινόμενο δεν βρέθηκε ποτέ ξανά στο προσκήνιο μέχρι την έρευνα του R.M White το 1963, η οποία πραγματεύεται την παραγωγή ηχητικών κυμάτων υψηλής συχνότητας σε ένα στερεό μέσο, λόγω της απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας,

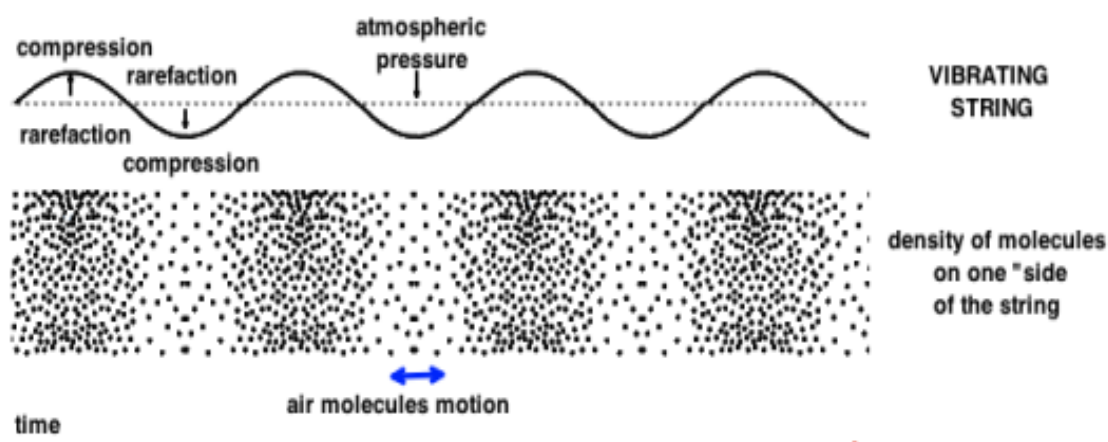
καθώς και από την εργασία των M.J. Brienza και A.J. De Maria το 1967 πάνω στα Q-switched lasers, τα οποία παρήγαγαν έντονα υπερηχητικά κύματα λόγω της θέρμανσης μεταλλικών μεμβρανών που περικλύουν την επιφάνεια πιεζοηλεκτρικών κρυστάλλων που βρίσκονται στο εσωτερικό των laser. Το 1977, οι R.J. O Von Gutfeld και R.L. Melcher έθεσαν τα θεμέλια για το φωτοακουστικό φαινόμενο και της χρήσης του ως απεικονιστικής τεχνικής, ορίζοντας τις μηχανικές οριακές συνθήκες για την θερμοελαστική διαστολή (την οποία θα περιγραφουμε παρακάτω), καταφέροντας συνάμα να ενισχύσουν το παραγόμενο ακουστικό πλάτος. Εν συνεχεία, το έργο των Wickramasinghe et al. στην διαμόρφωση ενός τυπικού ακουστικού μικροσκοπίου και στην εν γένει μετατροπή του σε φωτοακουστικό ήταν καίριας σημασίας για τη φωτοακουστική απεικόνιση . Η τροποποίηση έγινε με την αντικατάσταση του ακουστικού αντικειμενικού φακού με έναν οπτικό. Με αυτόν τον τρόπο η οπτική δέσμη του λέιζερ (με ενεργό υλικό Nd: YAG με διακόπτη Q-switch) εστιάστηκε σε κύκλο με διάμετρο 2 μm . Η ανίχνευση των ακουστικών κυμάτων έγινε με χρήση ενός πιεζοηλεκτρικού μετατροπέα από το αρχικό μικροσκόπιο. Το 1979 ο Rosencwaig πρότεινε την ιδέα ενός μικροσκοπίου με σύστημα πιεζοηλεκτρικής ανίχνευσης βασιζόμενος στο γεγονός ότι τα θερμικά κύματα που αναδύονταν κατά τη διάρκεια του φωτισμού του δείγματος προέρχονταν από περιοχές με διαφορετικές απορροφητικές ιδιότητες.

(5.2) Διάδοση του υπέρηχου

(5.2.1) Ακουστικά κύματα

Το ακουστικό κύμα είναι ένας τύπος διάδοσης πίεσης μέσω αδιαβατικών συμπίεσεων και αποσυμπίεσεων, το οποίο ταξιδεύει με ταχύτητα χαρακτηριστική του μέσου στο οποίο διαδίδεται. Τα ακουστικά κύματα είναι διαμήκη και έχουν τα ακόλουθα γνωρίσματα που τα καθορίζουν:

- Πλάτος (S_0): Η μέγιστη μετατόπιση απ' την θέση ισορροπίας
- Πλάτος κύματος πίεσης (P_0): Η μέγιστη πίεση σε συνάρτηση με τιμή της πίεσης στην θέση ισορροπίας.
- Ταχύτητα του ήχου c : Ο ρυθμός διάδοσης στο μέσο
- Συχνότητα f : ο αριθμός των κυκλικών διεργασιών που πραγματοποιούνται ανά δευτερόλεπτο.
- Ένταση I : Η εκπομπή ή ο ρυθμός απορρόφησης της ακουστικής ενέργειας ανά μονάδα χρόνου.



Εικόνα 5.2: Η αναπαράσταση ενός τυπικού ακουστικού κύματος. Στις περιοχές όπου η πυκνότητα των μορίων είναι υψηλή, η πίεση αυξάνεται, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση χαμηλής πυκνότητας των μορίων.

Τα ακουστικά κύματα διαδίδονται σε διάφορους τύπους υλικών, τα οποία έχουν ένα κοινό γνώρισμα, την ειδική ακουστική αντίσταση Z , η οποία αποτελεί ένα μέτρο που χαρακτηρίζει την διάδοση του κύματος σε οποιοδήποτε μέσο και δίνεται από τον τύπο $Z = \rho c$ (5.1) όπου ρ είναι η πυκνότητα του μέσου και c είναι η ταχύτητα του ήχου μέσα σε αυτό .

(5.2.2) Ανάκλαση και διάδοση των ακουστικών κυμάτων

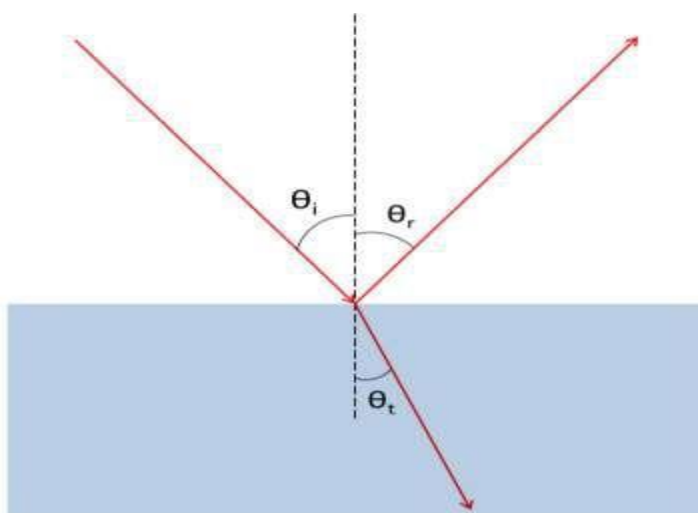
Όταν το εισερχόμενο ακουστικό κύμα με ειδική ακουστική αντίσταση Z_1 προσπίπτει σε ένα δεύτερο μέσο με ειδική ακουστική αντίσταση Z_2 , ένα μέρος του κύματος ανακλάται και το υπόλοιπο διαθλάται στο δεύτερο μέσο. Αυτή η διαδικασία περιγράφεται μαθηματικά από τον νόμο του Snell όπως παρατίθεται στην συνέχεια.

$$\frac{\sin\theta_i}{\sin\theta_r} = \frac{c_1}{c_2} \quad (5.2)$$

Όπου τα γράμματα i και r είναι αντιπροσωπευτικά για το προσπίπτον και το ανακλώμενο κύμα. Στην περίπτωση όπου δεν υπάρχει καθόλου διάδοση $\theta_t = 90^\circ$, ο νόμος του Snell παίρνει την μορφή :

$$\sin\theta_c = \frac{c_1}{c_2} \quad (5.3)$$

Όπου $\theta_i = \theta_c$, και το c αντιπροσωπεύει την κρίσιμη γωνία.



Εικόνα 5.3: Παραπάνω απεικονίζεται η ανάκλαση και η διάθλαση, θ_i : η γωνία που σχηματίζει το προσπίπτον κύμα με το επίπεδο , θ_r : η γωνία του ανακλώμενου κύματος and θ_t η γωνία του διαθλώμενου κύματος (μεταφέρεται στο μέσο)

Η διάδοση και η ανάκλαση των ακουστικών κυμάτων δίνεται ποσοτικά από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\text{Συντελεστής διέλευσης: } T = \frac{p_t}{p_i} = \frac{2Z_2 \cos \theta_i}{2Z_2 \cos \theta_i + Z_1 \cos \theta_t} \quad (5.4)$$

$$\text{Συντελεστής ανάκλασης: } R = \frac{p_r}{p_i} = \frac{Z_2 \cos \theta_i - Z_1 \cos \theta_t}{2Z_2 \cos \theta_i + Z_1 \cos \theta_t} \quad (5.5)$$

Στην περίπτωση της κάθετης πρόσπτωσης έχουμε $\theta_i = \theta_t = 0^0$ και οι παραπάνω εξισώσεις παίρνουν την μορφή:

$$T = \frac{2Z_2}{Z_2 + Z_1} \quad (5.6) \quad R = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \quad (5.7)$$

Τέλος, υπάρχει μια γενική εξίσωση που συνδέει τους συντελεστές μεταξύ τους για οποιεσδήποτε γωνίες : $T = 1 + R$ (5.8)

(5.2.3) Γενική φωτοακουστική εξίσωση

Το φωτοακουστικό φαινόμενο περιγράφεται από την μερική διαφορική εξίσωση, γνωστή και ως “γενική φωτοακουστική εξίσωση”, η οποία προκύπτει από δυο εξισώσεις τις οποίες θα αναλύσουμε περαιτέρω:

Αρχικά, θα ξεκινήσουμε απ’ την εξίσωση θερμικής διαστολής :

$$\nabla \cdot \vec{\xi}(\vec{r}, t) = -\kappa \cdot p(\vec{r}, t) - \beta \cdot T(\vec{r}, t) \quad (5.9)$$

Όπου το $\vec{\xi}$ αντιπροσωπεύει την μετατόπιση του μέσου απ’ την κατάσταση ισορροπίας, το κ είναι ο συντελεστής ισόθερμης συμπιεστότητας, το β είναι ο θερμικός συντελεστής της διαστολής του όγκου, το p χαρακτηρίζει την πίεση και το T την θερμοκρασία. Η ισόθερμη συμπιεστότητα (την οποία και αναφέραμε), ορίζεται ως εξής:

$$\kappa = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad (5.10)$$

Εκφράζει την κλασματική μεταβολή του όγκου ως προς την πίεση, υπό σταθερή θερμοκρασία. Αντίστοιχα ο θερμικός συντελεστής της διαστολής όγκου περιγράφεται ως εξής :

$$\beta = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_P \quad (5.11)$$

Ο οποίος δείχνει την κλασματική μεταβολή του όγκου ως προς την θερμοκρασία, υπό σταθερή πίεση.

Η εξαγωγή της δεύτερης εξίσωσης προκύπτει κάνοντας την εξής υπόθεση:

Θεωρούμε ότι έχουμε ένα απειροστό κύβο της μορφής: $dm = \rho \cdot dA \cdot dz$ (5.12). Όπου dm είναι η απειροστή μάζα, dA η απειροστή επιφάνεια, dz το απειροστό ύψος and ρ είναι η πυκνότητα του κύβου.

Εν συνεχεία, από τον δεύτερο νόμο του Νεύτωνα έχουμε ότι :

$$F = dm \cdot a \quad (5.13)$$

Συνεπώς, από τις (5.12) και (5.13) προκύπτει :

$$F = \rho \cdot dA \cdot dz \cdot a \quad (5.14)$$

Όμως είναι γνωστό ότι: $F = p \cdot A$ (5.15). Ακολουθώντας, συνδυάζοντας τις δύο εξισώσεις έχουμε:

$$-dp \cdot dA = \rho \cdot dA \cdot dz \cdot a = -dp = \rho \cdot dz \cdot a \Rightarrow \rho \cdot a = -\frac{dp}{dz} \quad (5.16)$$

Σε μια πιο γενική μορφή η (5.16) μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$\rho \cdot \vec{a} = -\nabla p(\vec{r}, t) \Rightarrow \rho \frac{\partial^2}{\partial t^2} \vec{\xi}(\vec{r}, t) = -\nabla p(\vec{r}, t) \quad (5.17)$$

Συνεπώς παίρνοντας την απόκλιση της (17) έχουμε:

$$\rho \frac{\partial^2}{\partial t^2} [\nabla \cdot \vec{\xi}(\vec{r}, t)] = -\nabla^2 p(\vec{r}, t) \quad (5.18)$$

Η εξίσωση (5.18) είναι γνωστή και ως εξίσωση της «αόρατης» δύναμης. Κατόπιν συνδυάζοντας την εξίσωση θερμικής διαστολής και της «αόρατης» δύναμης έχουμε:

$$(5.9), (5.18) \Rightarrow \beta \frac{\partial^2}{\partial t^2} [-\kappa p(\vec{r}, t) + \beta T(\vec{r}, t)] = -\nabla^2 p(\vec{r}, t) \quad (19).$$

Αναδιατάσσοντας τους όρους στην παραπάνω εξίσωση προκύπτει:

$$\left(\nabla^2 - \rho \kappa \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) p(\vec{r}, t) = -\beta \rho \frac{\partial^2 T(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (5.20).$$

Από την εξίσωση Newton-Laplace μπορούμε να εξάγουμε την ταχύτητα διάδοσης του ήχου:

$$u_s = \sqrt{\frac{K}{\rho}} \quad (5.21)$$

Όπου το K γνωστό και ως bulk modulus, δείχνει την ικανότητα του μέσου να αντιστέκεται σε μεταβολές του όγκου κάτω από συνθήκες ομοιογενούς πίεσης. Το bulk modulus K και η συμπιεστότητα κ είναι αντίστροφα μεταξύ τους, συνεπώς η ταχύτητα του ήχου δίνεται ως εξής:

$$u_s = \sqrt{\frac{1}{\rho \kappa}} \quad (5.22)$$

Επομένως, είμαστε σε θέση να εξάγουμε την γενική φωτοακουστική εξίσωση :

$$(5.20), (5.22) \Rightarrow \left(\nabla^2 - \frac{1}{u_s^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) p(\vec{r}, t) = -\frac{\beta}{\kappa u_s^2} \frac{\partial^2 T(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (5.23).$$

Η αριστερή πλευρά της εξίσωσης περιγράφει την διάδοση του κύματος πίεσης, ενώ η δεξιά πλευρά είναι ο όρος πηγή της εξίσωσης. Συμπερασματικά, διαπιστώνουμε ότι μόνο μέσω της χρονικά μεταβαλλόμενης θέρμανσης του δείγματος παράγονται ακουστικά κύματα πίεσης, σε αντίθεση με την σταθερή (χρονικά αμετάβλητη) θέρμανση.

(5.2.4) Φωτοακουστική εξίσωση υπό την συνθήκη του thermal confinement

Η συνθήκη του Thermal confinement προκύπτει στην περίπτωση όπου το χρονικό εύρος του παλμού του laser είναι αμελητέο σε σχέση με το thermal relaxation time που αποτελεί τον χρόνο που απαιτείται, ώστε ένα αντικείμενο να επιστρέψει σε θερμοκρασία δωματίου. Συνεπώς μπορούμε να εξάγουμε τα εξής στοιχεία απ' την θεμελιώδη εξίσωση:

$$Q = m C_v T \quad (5.24)$$

Όπου το Q είναι η θερμική ενέργεια, m η μάζα του αντικειμένου, C_V η ειδική θερμοχωρητικότητα κάτω από σταθερό όγκο και T είναι η απόλυτη θερμοκρασία. Ακολουθώντας παραγωγίζοντας ως προς τον χρόνο προκύπτει :

$$\frac{dQ}{dt} = mC_V \frac{dT}{dt} = \rho V C_V \frac{dT}{dt} \quad (5.25)$$

Σε αυτό το σημείο, θα εισάγουμε την συνάρτηση θέρμανσης H (Ενθαλπία), η οποία ορίζεται ρητά, ως το ποσό της θερμικής ενέργειας ανά μονάδα όγκου και ανά μονάδα επιφάνειας (S.I. units: $\frac{J}{m^3s}$). Συνεπώς απ' την (5.25) προκύπτει:

$$H = \rho C_V \frac{dT}{dt} \quad (5.26)$$

Απ' την θερμοδυναμική είναι γνωστό επίσης ότι:

$$\frac{C_P}{C_V} = \frac{\kappa}{\beta_S} \quad (5.27)$$

Όπου C_P και C_V , είναι οι ειδικές θερμοχωρητικότητες κάτω υπό σταθερή πίεση και όγκο αντίστοιχα και β_S είναι η ισεντροπική συμπίεσιτότητα, η οποία αναπαρίσταται ως εξής:

$$\beta_S = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_S \quad (5.28)$$

Επιπροσθέτως, από την η εξίσωση της κατάστασης (η οποία μας δίνει πληροφορίες για το πως σχετίζονται οι θερμοδυναμικές μεταβλητές μεταξύ τους) έχουμε ότι:

$$u_s^2 = \left(\frac{\partial P}{\partial \rho} \right)_S \quad (5.29)$$

Συνδυάζοντας τις (5.28) και (5.29) προκύπτει :

$$\beta_S = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_S \frac{\partial \rho}{\partial \rho} = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial \rho}{\partial P} \right)_S \frac{\partial V}{\partial \rho} = -\frac{1}{V u_s^2} \frac{\partial V}{\partial \rho} = -\frac{1}{V u_s^2} \frac{\partial \left(\frac{m}{\rho} \right)}{\partial \rho} = \frac{1}{\rho u_s^2} \quad (5.30)$$

Επομένως, λαμβάνοντας υπόψιν τις (5.27) και (5.30) έχουμε:

$$K = \frac{C_P}{\rho u_s^2 C_V} \quad (5.31)$$

Αντικαθιστώντας τις (5.24) και (5.31) στην (5.23), ο όρος πηγής (δεξιό μέρος) αλλάζει μορφή και γίνεται:

$$-\frac{\beta}{\kappa u_s^2} \frac{\partial^2 T(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = -\frac{\beta}{C_P} \frac{\partial H(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (5.32).$$

Συνεπώς, καταλήγουμε στην εξής σχέση:

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{u_s^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) p(\vec{r}, t) = -\frac{\beta}{C_P} \frac{\partial H(\vec{r}, t)}{\partial t} \quad (5.33)$$

Εν κατακλείδι, από την παραπάνω εξίσωση διαπιστώνουμε ότι για την παραγωγή ενός διαδιδόμενου κύματος πίεσης είναι αναγκαία συνθήκη η ύπαρξη μιας χρονικά μεταβαλλόμενης πηγής. Διαφορετικά, το δεξιό μέρος της εξίσωσης (5.33), θα ήταν ίσο με μηδέν και το φωτοακουστικό φαινόμενο δεν θα λάμβανε χώρα.

Η ενθαλπία $H(\vec{r}, t)$ μπορεί να αναλυθεί σε 2 μέρη, ένα με χωρική και ένα με χρονική εξάρτηση μέσω του χωρισμού των μεταβλητών, όπως φαίνεται παρακάτω:

$$H(\vec{r}, t) = H_S(\vec{r})H_T(t) \quad (5.34)$$

Ο όρος $H_S(\vec{r})$ αντικατοπτρίζει την πυκνότητα της ενέργειας που έχει αποθεθεί στο σώμα J/m^3 , ενώ ο όρος $H_T(t)$ δείχνει πως εξελίσσεται χρονικά η διέγερση του σώματος. Συνεπώς η εξίσωση (5.33) παίρνει την μορφή:

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{u_s^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) p(\vec{r}, t) = -\frac{\beta H_S(\vec{r})}{C_p} \frac{\partial H_T(t)}{\partial t} \quad (5.35)$$

Η εξίσωση (5.35) περιγράφει ανάγλυφα το φωτοακουστικό φαινόμενο κάτω από την συνθήκη του thermal confinement που ορίσαμε προηγουμένως. Αν υποθέσουμε ότι ο κάθε παλμός του λέιζερ μπορεί να έχει κατά προσέγγιση το προφίλ μιας δέλτα συνάρτησης, τότε η (5.35) μετασχηματίζεται ως εξής:

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{u_s^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) p(\vec{r}, t) = -\frac{\beta H_S(\vec{r})}{C_p} \frac{\partial \delta(t)}{\partial t} \quad (5.36)$$

Αυτή είναι η τελική μορφή της φωτοακουστικής εξίσωσης.

(5.2.5) Προϋποθέσεις για ικανοποιητική παραγωγή θερμότητας

Από την εξίσωση (5.9) καθίσταται προφανές ότι, αν το χρονικό εύρος του παλμού του λέιζερ είναι πολύ μικρότερο από τα thermal (το ορίσαμε προηγουμένως) και stress relaxation time (η μείωση της πίεσης ανά μονάδα επιφάνειας ενός υλικού σε συνάρτηση με τον χρόνο κάτω υπό σταθερή μηχανική τάση), η μεταβολή του όγκου θα είναι αμελητέα, επομένως το αριστερό μέρος της (5.9) θα είναι ίσο με μηδέν. Στην περίπτωση όπου έχουμε ομοιογενή φωτισμό στο δείγμα, η αναδύομενη πίεση p_0 μετά τον παλμό του λέιζερ θα είναι της μορφής:

$$p_0 = \frac{\beta T}{\pi} \quad (5.37)$$

Λαμβάνοντας υπόψιν την (5.24), η εξίσωση (5.37) παίρνει την μορφή:

$$Q = mC_V T \Rightarrow \frac{Q}{V} = \rho C_V T \Rightarrow T = \frac{Q}{\rho C_V V} \quad (5.38)$$

Ο λόγος Q/V εκφράζει την θερμική ενέργεια ανά μονάδα όγκου και εκφράζεται σαν συνάρτηση της ειδικής οπτικής απορρόφησης A (Απορροφούμενη δέσμη του laser ανά μονάδα όγκου) (J/m^3). Συνεπώς έχουμε:

$$\frac{Q}{V} = \eta_{th} A \quad (5.39)$$

Ο όρος η_{th} ορίζεται ως το ποσοστό της απορροφούμενης οπτικής ενέργειας που μετατρέπεται σε θερμότητα, επομένως η εξίσωση (5.38) γίνεται :

$$T = \frac{\eta_{th}A}{\rho C_V} \quad (5.40)$$

Από τις εξισώσεις (5.37) και (5.40) έχουμε:

$$p_0 = \frac{\beta}{\kappa \rho C_V} \eta_{th}A \quad (5.41)$$

Λαμβάνοντας υπόψιν τις (5.31) και (5.41), η αρχική φωτοακουστική πίεση μπορεί να εκφραστεί :

$$p_0 = \frac{\beta u_s^2}{C_P} \eta_{th}A \quad (5.42)$$

Για να εξάγουμε την (42) σε μια πιο συμπαγή μορφή θα εισάγουμε την αδιάστατη παράμετρο Gruneisen Γ ως εξής:

$$\Gamma \equiv \frac{\beta u_s^2}{C_P} \quad (5.43)$$

Συνεπώς, η (5.42) γίνεται:

$$p_0 = \Gamma \eta_{th}A \quad (5.44)$$

Η αρχική φωτοακουστική πίεση που προκύπτει υπό την συνθήκη του stress confinement δηλαδή, στην περίπτωση όπου το χρονικό εύρος του παλμού του laser είναι αμελητέο σε σχέση με το stress relaxation time θα είναι ανάλογη με το χωρικό μέρος της προαναφερθείσας συνάρτησης $H_S(\vec{r})$, με συντελεστή αναλογίας την παράμετρο Gruneisen Γ , την οποία ορίσαμε προηγουμένως. Συνεπώς από τις (5.42) και (5.43) έχουμε:

$$H_S(\vec{r}) = \eta_{th}A \quad (5.45).$$

Αντικαθιστώντας την ειδική οπτική απορρόφηση A με την ποσότητα $F\mu_a$, όπου F είναι το optical fluence (J/cm^2) και το μ_a αντιστοιχεί στον οπτικό συντελεστή απορρόφησης (cm^{-1}) για το εφαρμοζόμενο κύμα, η (5.44) θα πάρει εκ νέου την μορφή:

$$p_0 = \Gamma \eta_{th} \mu_a F \quad (5.46).$$

Τέλος, σε συνάρτηση με το optical fluence (J/cm^2) και τον οπτικό συντελεστή απορρόφησης (cm^{-1}) έχουμε για την $H_S(\vec{r})$ την σχέση:

$$H_S(\vec{r}) = \eta_{th} \mu_a F(\vec{r}) \quad (5.47).$$

Στην συνέχεια θα παραθέσουμε κάποια γενικά στοιχεία για την φωτοακουστική μικροσκοπία ως απεικονιστική μέθοδο και ενδεικτικές εφαρμογές της στην βιοιατρική

(6) Φωτοακουστική μικροσκοπία

(6.1) Εισαγωγή

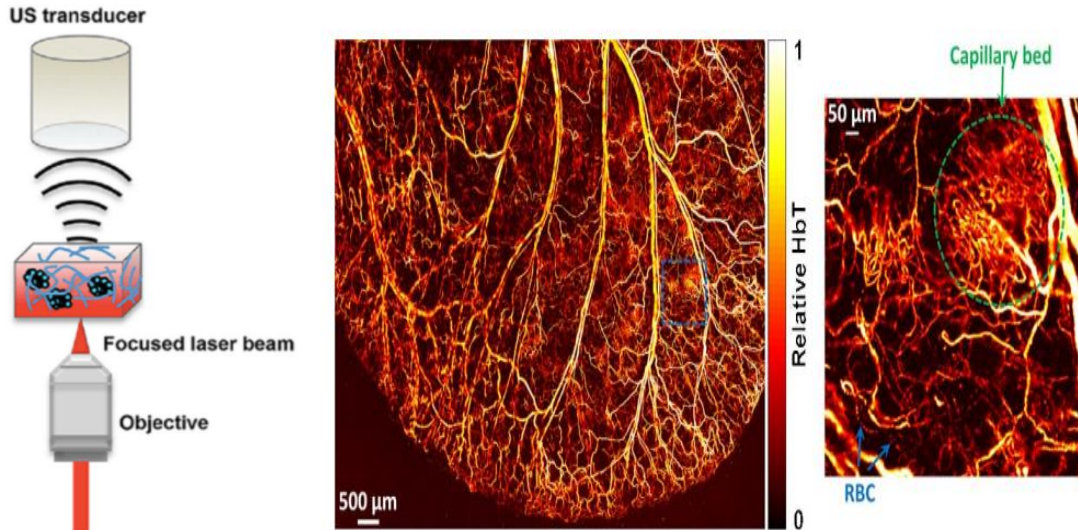
Τις τελευταίες δεκαετίες η φωτοακουστική μικροσκοπία (PAM) έχει χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα βιολογικών και ιατρικών εφαρμογών. Η τεχνική βασίζεται στην εκδήλωση του φωτοακουστικού φαινομένου, το οποίο μελετήσαμε ενδελεχώς παραπάνω και ποιοτικά και ως προς τον μαθηματικό του φορμαλισμό. Η PAM προσφέρει μοριακή απεικόνιση σε βάθη (>1mm) διατηρώντας παράλληλα υψηλή χωρική ανάλυση σε αντίθεση με άλλες συμβατικές τεχνικές όπως η υπερηχογραφία. Η φωτοακουστική μικροσκοπία αξιοποιεί το γεγονός ότι ο αναδύμενος υπέρηχος εξασθενεί πολύ λιγότερο σε σχέση με το φως, πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι συντελεστής εξασθένησης του υπέρηχου στην περιοχή των μερικών MHz (~5MHz) είναι κατά τρεις τάξεις μικρότερος (10^{-3}) σε σχέση με αυτόν του φωτός, διεισδύοντας έτσι σε μεγαλύτερα απεικονιστικά βάθη. Επομένως, η φωτοακουστική μικροσκοπία δίνει την δυνατότητα λήψης εικόνων σε μεγάλα απεικονιστικά βάθη, αναδύοντας παράλληλα τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη οργανισμού σε υψηλή ανάλυση. Η οπτοακουστική μικροσκοπία, χωρίζεται σε δύο υποκατηγορίες, την OR-PAM (Οπτικής ανάλυσης) και την AR-PAM (Ακουστικής ανάλυσης). Η διάκριση αυτή γίνεται με βάση την εστίαση της δέσμης του λέιζερ αλλά και της θέσης του ανιχνευτή των ηχητικών κυμάτων σε σχέση με την δέσμη. Εν συνεχεία θα αναλύσουμε περαιτέρω αυτές τις δύο μεθόδους προεξάρχουσας της OR-PAM η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά την λήψη των μετρήσεων.

(6.2) OR-PAM

Στην φωτοακουστική μικροσκοπία οπτικής ανάλυσης η εστίαση πραγματοποιείται με βάση την δέσμη του λέιζερ επιτυγχάνοντας υψηλή ανάλυση (~1μm) αλλά μικρό βάθος διείσδυσης (~1mm). Συγκεκριμένα, η πλευρική ανάλυση $R_{L,OR}$ στην OR-PAM προσδιορίζεται ως εξής:

$$R_{L,OR} = 0.51 \frac{\lambda_0}{NA_0} \quad (6.1)$$

Όπου $R_{L,OR}$ είναι η ελάχιστη απόσταση για την οποία δύο σημειακά αντικείμενα μπορούν να διακριθούν, λ_0 είναι το μήκος κύματος ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται και NA_0 είναι το «αριθμητικό πλάτος» του φακού εστίασης. Από την εξίσωση (6.1), συμπεραίνουμε ότι μειώνοντας το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και αυξάνοντας παράλληλα το αριθμητικό άνοιγμα του φακού έχουμε μείωση του $R_{L,OR}$, δηλαδή βελτίωση της εστίασης, με μειωμένο ωστόσο βάθος απεικόνισης. Ενδεικτικά, έχει επιτευχθεί ανάλυση έως και 220 nm σε μέγιστο βάθος 100 μm, ενώ για ιστούς το μέγιστο βάθος απεικόνισης περιορίζεται στο 1mm λόγω σκεδάσεων.



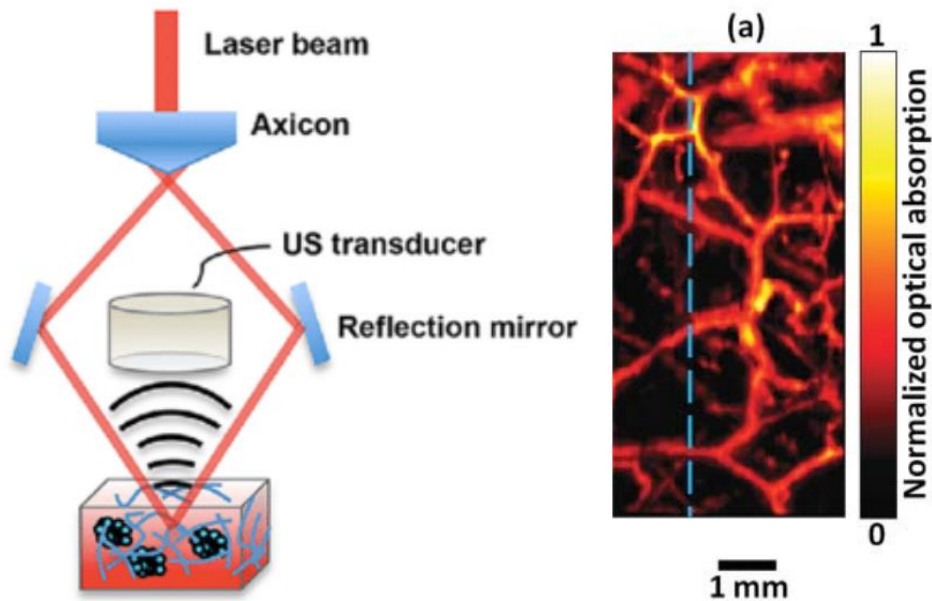
Εικόνα 6.1: Στην εικόνα αριστερά απεικονίζεται η τυπική δομή του OR-PAM μικροσκοπίου και συγκεκριμένα φαίνεται η εστίαση της δέσμης του λέιζερ απ' τον αντικειμενικό φακό και εν συνεχεία η παραγωγή του υπέρηχου που ανιχνεύεται απ' τον πιεζοηλεκτρικό μετατροπέα. Μια τυπική εφαρμογή του OR-PAM αναπαριστάται στην εικόνα δεξιά, όπου απεικονίζεται το αυτί ενός ζωντανού ποντικού και συγκεκριμένα φαίνεται η συγκέντρωση της ολικής αιμοσφαιρίνης, αποκαλύπτοντας έτσι την αγγειακή ανατομία του.

(6.3) AR-PAM

Στην φωτοακουστική μικροσκοπία ακουστικής ανάλυσης η εστίαση πραγματοποιείται με βάση την θέση του ανιχνευτή ως προς το δείγμα, επιτυγχάνοντας έτσι υψηλότερα βάθη διείσδυσης (~3-4mm) αλλά με χαμηλότερη πλευρική ανάλυση (~25μm). Συγκεκριμένα, η πλευρική ανάλυση $R_{L,AR}$ στην AR-PAM προσδιορίζεται ως εξής:

$$R_{L,AR} = 0.71 \frac{v_A}{NA_A \cdot f_A} \quad (6.2)$$

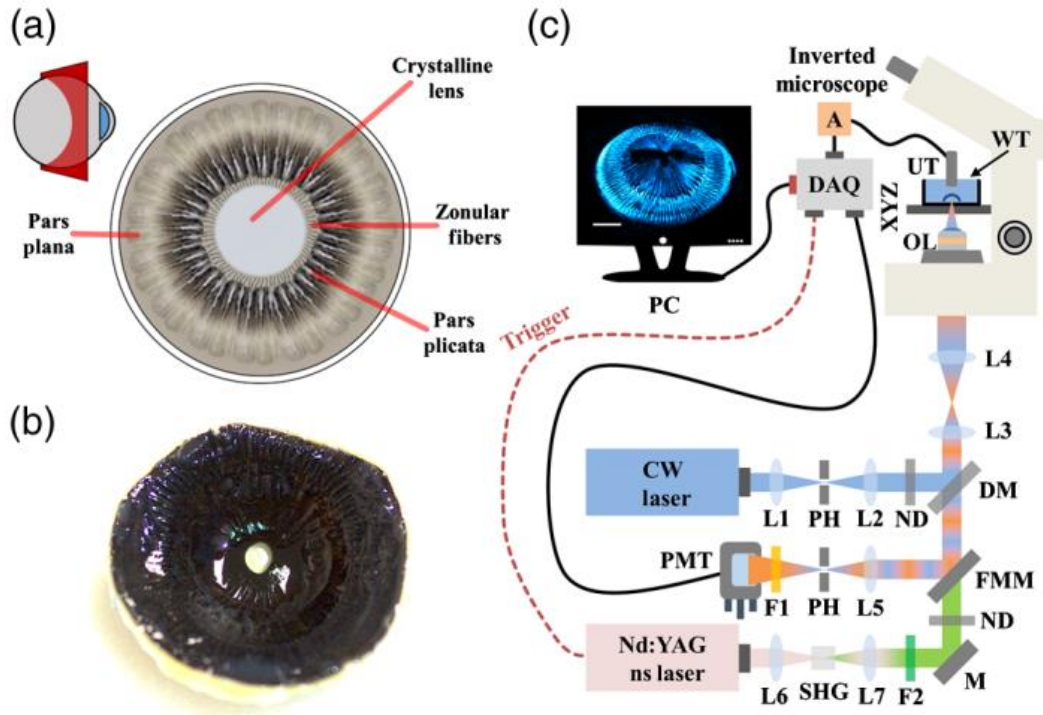
Όπου $R_{L,AR}$ είναι η ελάχιστη απόσταση για την οποία δύο σημειακά αντικείμενα μπορούν να διακριθούν, NA_A είναι το αριθμητικό άνοιγμα του ανιχνευτή υπερήχων, v_A είναι η ταχύτητα του ήχου στο μέσο διάδοσης και f_A είναι η συχνότητα των υπερήχων. Συνεπώς παρατηρούμε ότι με μείωση της ταχύτητας του ήχου v_A (με αλλαγή του μέσου διάδοσης) σε συνάρτηση με την αύξηση του αριθμητικού πλάτους του ανιχνευτή NA_A , επιτυγχάνεται η μείωση του $R_{L,AR}$. Ενδεικτικά έχει επιτευχθεί βάθος απεικόνισης της τάξεως των μερικών εκατοστών με την μείωση όμως της ανάλυσης στα 560 μm.



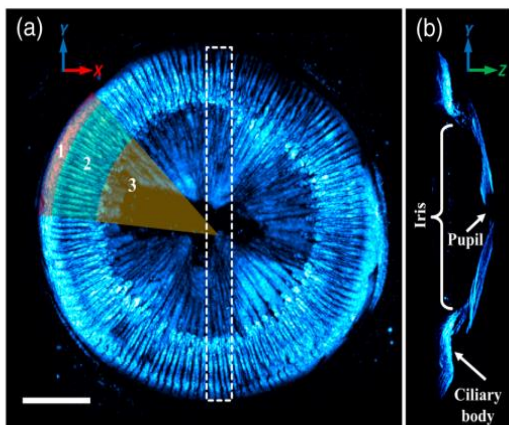
Εικόνα 6.2: Στην εικόνα αριστερά απεικονίζεται η τυπική δομή του AR-PAM μικροσκοπίου και συγκεκριμένα φαίνεται ότι ο transducer έχει προσαρμοστεί εγγύτερα στο δείγμα (σε σχέση με την OR-PAM) ώστε να λαμβάνει υπέρηχους από μεγαλύτερα βάθη στο δείγμα. Μια τυπική εφαρμογή του OR-PAM αναπαριστάται στην εικόνα δεξιά, όπου φαίνεται η παλάμη ενός εθελοντή, πιο συγκεκριμένα, οι φωτεινές περιοχές στην εικόνα δείχνουν το φωτοακουστικό σήμα που παράγεται από τα αιμοφόρα αγγεία

(6.4) Εφαρμογές του PAM στην βιοιατρική

Η φωτοακουστική μικροσκοπία έχει αξιοποιηθεί σε πληθώρα προκλινικών μελετών οι οποίες περιστρέφονται γύρω από διάφορους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί ως απεικονιστική τεχνική στους κλάδους της αγγειακής βιολογίας, στην ογκολογία, στην νευρολογία, στην οφθαλμολογία, στην δερματολογία, στην γαστρεντερολογία και στην καρδιολογία. Παρακάτω θα παραθέσουμε μια εκ των εφαρμογών της φωτοακουστικής μικροσκοπίας, η οποία έλαβε χώρα στο εργαστήριο βιοφωτονικής και μοριακής απεικόνισης (LBMI-ΙΗΔΛ) του ΙΤΕ και αφορά την μελέτη των ανατομικών πληροφοριών της ίριδας. Στην παρακάτω μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια υβριδική διάταξη, η οποία αξιοποιούσε ταυτόχρονα 2 απεικονιστικές τεχνικές, την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και την φωτοακουστική μικροσκοπία (PA).



Εικόνα 6.3:(a) Σχηματική αναπαράσταση του πρόσθιου τμήματος του οφθαλμού (b) τομή υγιούς ματιού κουνελιού (c) Υβριδική διάταξη οπτικής και φωτοακουστικής μικροσκοπίας. Abbreviations: L(1-7), lenses; PH, pinhole; ND, neutral density filters; DM, dichroic mirror; FMM, flip mount mirror; F1, long-pass filter; PMT, photomultiplier tube; SHG, second harmonic generation crystal; F2, bandpass filter; M, mirror; OL, objective lens; XYZ, 3-D translation stages; WT, water tank; UT, ultrasonic transducer; A, amplifier; DAQ, data acquisition card; and PC, recording computer.



Εικόνα 6.4: (a) Δείχνει μια ανακατασκευή απεικόνισης PA ενός ολόκληρου δείγματος ακτινωτού σώματος/ίριδας που αφαιρέθηκε από μάτι κουνελιού. (b) Πλάγια όψη της περιοχής που υποδεικνύεται με το διακεκομμένο πλαίσιο της εικόνας

Στο επόμενο σκέλος της εργασίας, θα παρουσιάσουμε την πρωτότυπη υβριδική διάταξη που χρησιμοποιήσαμε κατά την λήψη των μετρήσεων, στην οποία έλαβε χώρα η ταυτόχρονη απεικόνιση του *Parhyale Hawaiensis* συνδυαστικά με τις μεθόδους της συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy) και της φωτοακουστικής μικροσκοπίας οπτικής ανάλυσης (OR-PAM), δίνοντας συνάμα μια περιληπτική αναφορά για την προετοιμασία του δείγματος κατά την διάρκεια των μετρήσεων.

(7) Υλικά και Μέθοδοι

(7.1) Προετοιμασία δείγματος

Τα έμβρυα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απεικόνιση, συλλέγονταν από αναισθητοποιημένα θηλυκά *Parhyale* που βρίσκονταν στην περίοδο της εγκυμοσύνης. Τα επιλεγμένα έμβρυα στο κατάλληλο στάδιο τοποθετούνταν στην επιφάνεια του holder και ενσωματώνονταν στην συνέχεια σε ένα διάλυμα αγαρόζης με συγκέντρωση 0,7% w/v χαμηλής τήξης (SeaPlaque, Lonza), η οποία παρασκευαζόταν χρησιμοποιώντας φιλτραρισμένο τεχνητό θαλασσινό νερό στους 40⁰ C. Κάθε έμβρυο τοποθετούνταν στην επιθυμητή όψη με την χρήση μιας λεπτής λαβίδας όσο αναμέναμε να κρυώσει η αγαρόζη. Μετά από περίπου 10 λεπτά, το δείγμα εμποτιζόταν με θαλασσινό νερό (το οποίο λειτουργεί ως συνεκτικό μέσο για την καλύτερη διάδοση των παραγόμενων υπερήχων, δίνοντάς μας εικόνες με μεγαλύτερη αντίθεση), καθώς είχε πήξει η αγαρόζη σε ικανοποιητικό βαθμό. Μετά το πέρας αυτής της διαδικασίας, τα δείγματα ήταν έτοιμα για απεικόνιση.

(7.2) Υβριδικό Σύστημα

Το πρωτότυπο υβριδικό σύστημα μικροσκοπίας ενσωματώνει δύο διεγείρουσες δέσμες και τις πορείες που ακολουθούν κατά την ακτινοβολήση, καθεμία από τις οποίες είναι αφιερωμένη στις αντίστοιχη απεικονιστική μέθοδο PA (Photoacoustic Microscopy) και CF (Confocal Microscopy) που εμπεριέχει. Οι 2 ξεχωριστές διαδρομές συγχωνεύονται με την χρήση κατάλληλων διχρωϊκών κατόπτρων (DM1 και DM2) – τα οποία έχουν την ιδιότητα να ανακλούν ή να επιτρέπουν την διέλευση της ακτινοβολίας ανάλογα με το εφαρμοζόμενο μήκος κύματος – έτσι ώστε να επιτευχθεί η ταυτόχρονη διέγερση και κατόπιν η ανίχνευση των σημάτων AF (Autofluorescence) και PA (Photoacoustic), τα οποία με τη σειρά τους παρέχουν 2 διαφορετικές και συνάμα συμπληρωματικές εικόνες.

Σε πρώτη φάση θα περιγράψουμε την πορεία της δέσμης για το συνεστιακό μικροσκόπιο. Το συγκεκριμένο μικροσκόπιο χρησιμοποιεί ένα λέιζερ συνεχούς κύματος (CW) (CPS450, Thorlabs, Newton, NJ, ΗΠΑ, ισχύς εξόδου 4,5 mW) που εκπέμπει στα 450 nm, ως πηγή διέγερσης του αυτοφθορισμού. Λόγω του εξαιρετικά ελλειπτικού της σχήματος, η οπτική ακτινοβολία κινείται μέσω ενός τηλεσκοπίου αποτελούμενο από δύο θετικούς φακούς (L1 και L2, F1=50 mm, F2=40 mm) και ένα pinhole διαμέτρου 25 μm (PH1), δίνοντας έτσι στην ακτινοβολία το προφίλ μιας Γκαουσιανής δέσμης. Εν συνεχεία, το οπτικό σύστημα που ενσωματώνει άλλους δύο θετικούς φακούς (L3 και L4, F3=75 mm, F4=50 mm) σε μεταβλητή μεταξύ τους απόσταση χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της απόκλισης της δέσμης, ρυθμίζοντας με ακρίβεια την αξονική επικάλυψη των δύο δεσμών στο επίπεδο του δείγματος. Κατόπιν η

φιλτραρισμένη (ως προς την μορφή της) δέσμη διέρχεται μέσα από ένα σετ neutral density φίλτρων (NDK01, Thorlabs, Newton, NJ, ΗΠΑ), τα οποία συμβάλλουν στην εξασθένιση της ενέργειας της δέσμης, έτσι ώστε για να αποφευχθούν τυχόν φαινόμενα φωτοκαταστροφής στο εξεταζόμενο δείγμα. Στη συνέχεια, η δέσμη ανακλάται από ένα long-pass διχρωϊκό κάτοπτρο – το οποίο ανακλά μήκη κύματος μεγαλύτερα από το μήκος κύματος αποκοπής - (DM1; DMLP505, Thorlabs, Newton, NJ, USA; μήκος κύματος αποκοπής: 505 nm) κατόπιν η διάμετρος της δέσμης επεκτείνεται κατά 3X φορές, διερχόμενη από ένα telescope (L5 και L6, F5=50 mm, F6=150 mm). Με τελικό στάδιο την είσοδο της δέσμης σε ένα τροποποιημένο ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο (Labovert, Leitz, Wetzlar, Γερμανία).

Στο εσωτερικό του μικροσκοπίου, η δέσμη περνάει από έναν αντικειμενικό φακό (OL, Achromat 8X, LOMO, Αγία Πετρούπολη, Ρωσία, NA: 0,2), ο οποίος εστιάζει το φως απευθείας στο δείγμα το οποίο είναι τοποθετημένο στην επιφάνεια μιας οπτικά διαπερατής θήκης – όπως αναφέραμε είναι εμποτισμένη με θαλασσινό νερό και το δείγμα περιβάλλεται από αгарόζη -. Αυτή η θήκη (stage) είναι προσαρτημένη σε ένα σύστημα τρισδιάστατης κίνησης υψηλής ακρίβειας (XYZ), το οποίο αποτελείται από ένα ταχύ XY stage (8MTF-75LS05, Standa, Vilnius, Λιθουανία) που σαρώνει το δείγμα και τον ενσωματωμένο χειροκίνητο έλεγχο Z του μικροσκοπίου, μέσω του οποίου επιλέγεται το εστιακό επίπεδο για την βέλτιστη απεικόνιση. Στην συνέχεια, ένα μέρος της οπισθοσκεδάζουσας ακτινοβολίας AF συλλέγεται από τον αντικειμενικό φακό, το οποίο μεταφέρεται κατόπιν μέσω των διχρωϊκών κατόπτρων DM1 και DM2 (DMLP550, Thorlabs, Newton, NJ, ΗΠΑ, μήκος κύματος αποκοπής: 550 nm) σε ένα long-pass φίλτρο (F1, FGL570, Thorlabs, Newton, NJ, ΗΠΑ, μήκος κύματος αποκοπής: 570 nm) αποκόπτοντας την διεγείρουσα ακτινοβολία. Τέλος, χρησιμοποιώντας έναν θετικό φακό (L7; F7=30 mm), η ακτινοβολία AF εστιάζεται και διέρχεται από το pinhole – επιτρέπει να διέλθουν τα φωτόνια φθορισμού μόνο από το εστιακό επίπεδο της δέσμης - διαμέτρου 50 μm (PH2).

Η εναπομείνουσα AF ακτινοβολία ανιχνεύεται τελικά από έναν φωτοπολλαπλασιαστή χαμηλού θορύβου (PMT) (H6780-20, Hamamatsu, Hamamatsu City, Ιαπωνία). Τα σήματα που δημιουργούνται, καταγράφονται στην συνέχεια από μια Data Acquisition Card (DAQ) (PCIe-9852, ADLINK, Ταϊπέι, Ταϊβάν, ρυθμός δειγματοληψίας: 200 MS/s, εύρος ζώνης: 90 MHz) και στη συνέχεια αποθηκεύονται σε έναν υπολογιστή, όπου λαμβάνεται ο μέσος όρος που προκύπτει για 30 διαφορετικές μετρήσεις – για τον σχηματισμό ενός pixel της εικόνας -, για την βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο (SNR) .

Όσον αφορά την πορεία της δέσμης για το φωτοακουστικό μικροσκόπιο, η πηγή της ακτινοβολίας είναι ένα παλμικό λέιζερ – όχι συνεχές όπως στον φθορισμό – (με ενεργό υλικό) Nd:YAG που εκπέμπει στα 1064 nm (QIR 1064-200-S, CrystaLaser LC, Reno, NV, ΗΠΑ, μέγιστη ενέργεια παλμού: 29,4 μJ, διάρκεια παλμού: 10 ns). Στο λέιζερ το triggering (πυροδότηση) γίνεται εξωτερικά από ένα function generator (FG; 33600A Series Trueform, Keysight Technologies, Santa Rosa, CA, USA) με ρυθμό επανάληψης ορισμένο στα 5 kHz, συγχρονίζοντας παράλληλα την καταγραφή και την σάρωση της δέσμης του λέιζερ. Η δέσμη εστιάζεται κατόπιν σε ένα LBO (Lithium triborate) κρύσταλλο δεύτερης αρμονικής (SHG) (Castech Inc, Fuzhou, Κίνα) που μετατρέπει μερικώς το μήκος κύματος της ακτινοβολίας (από τα 1064 nm) στα 532 nm και στη συνέχεια διέρχεται από ένα σύστημα φακών (L8 και L9, F8=F9=100 mm). Μετέπειτα, παρεμβάλλεται ένα band-pass φίλτρο (F2; FF01-531/40-25, Semrock, Rochester, NY, USA), το οποίο χρησιμοποιείται για να απορρίψει την υπολειπόμενη ακτινοβολία στο κοντινό υπέρυθρο. Κατόπιν η φιλτραρισμένη -ως προς το μήκος κύματος- ακτινοβολία διέρχεται μέσα από έναν γραμμικό πολωτή (P; LPVISE200-A, Thorlabs, Newton, NJ, ΗΠΑ), ο οποίος συμβάλλει στην εξασθένιση της ενέργειας της δέσμης - ο τρόπος με τον οποίο γίνεται περιγράφεται ανάγλυφα από τον νόμο του Malus -. Ακολούθως, η δέσμη

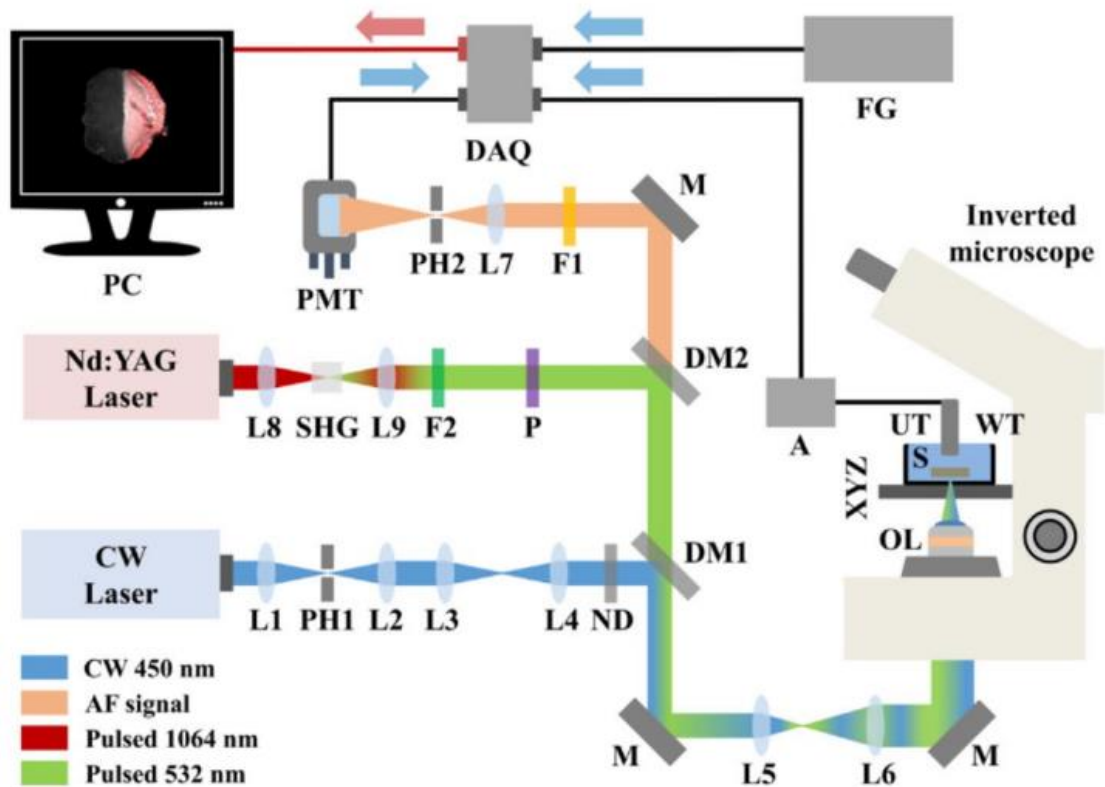
διέγερσης PA ανακλάται από το διχρωϊκό κάτοπτρο DM2 και διέρχεται από το DM1, έτσι ώστε να υπάρχει επικάλυψη των δεσμών PA και AF. Αφού περάσει από το τηλεσκόπιο -που επεκτείνει την δέσμη κατά 3X- (L5 και L6), η παλμική ακτινοβολία εστιάζεται τελικά από τον ίδιο αντικειμενικό φακό (OL) στο υπό παρατήρηση δείγμα.

Τα παραγόμενα κύματα πίεσης (φωτοακουστικό φαινόμενο) ανιχνεύονται από έναν πιεζοηλεκτρικό μετατροπέα συχνότητας 20 MHz (UT; V373-SU, Olympus, Τόκιο, Ιαπωνία; -6 dB εύρος ζώνης: 13,3–32,9 MHz, Εστιακή απόσταση: 31,3 mm), ο οποίος είναι βυθισμένος στο θαλασσινό νερό της οπτικά διαπερατής θήκης, διαμορφωμένος ομοεστιακά και ομοαξονικά σε σχέση με την οπτική εστίαση. Το θαλασσινό νερό στη δεξαμενή χρησιμεύει ως μέσο σύζευξης μεταξύ της πηγής του παραγόμενου κύματος πίεσης και του ανιχνευτή, διασφαλίζοντας την αποτελεσματική μετάδοση των κυμάτων PA, ενώ συνάμα αποτελεί κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των εμβρύων του *Parhyale Hawaienesis* κατά την διάρκεια της απεικονιστικής διαδικασίας.

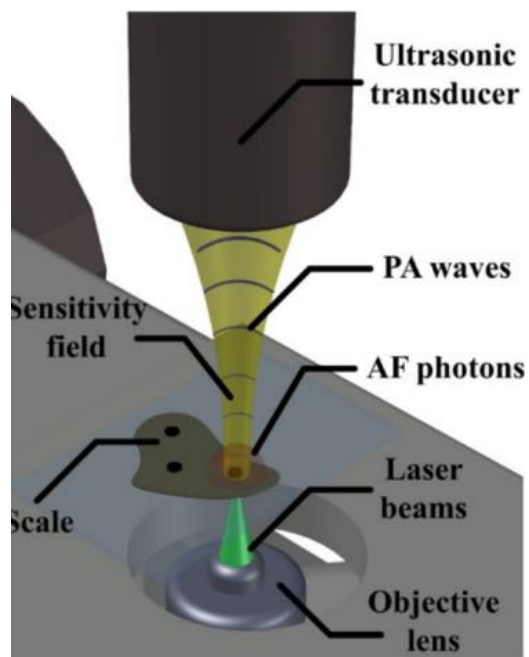
Τα παραγόμενα σήματα ενισχύονται από δύο RF ενισχυτές χαμηλού θορύβου (A; TB-414-8A+, Mini-Circuits, Camberley, England; gain: 31 dB), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι σε σειρά προσδίδοντας έτσι συνολικό gain στα σήματα 62 dB, πριν από την ψηφιοποίηση και την καταγραφή τους από την DAQ. Για την βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο SNR, υπολογίζεται ο μέσος όρος 30 κυματομορφών για τον σχηματισμό κάθε τιμής pixel που συνθέτει την φωτοακουστική εικόνα μέγιστης προβολής πλάτους (MAP).

Ο συνολικός χρόνος που απαιτείται για την καταγραφή μιας τυπικής εικόνας στην υβριδική διάταξη CF και PA 400 x 400 pixels είναι περίπου 20 λεπτά. Η πλευρική ανάλυση του συστήματος καθορίζεται αποκλειστικά όριο περίθλασης του και εκτιμάται περίπου στα 2,5 μm , για το φωτοακουστικό μικροσκόπιο (PA) και στα 2,2 μm για το συνεστιακό μικροσκόπιο. Αντίστοιχα, το βάθος εστίασης για τη μέθοδο PA υπολογίστηκε περίπου στα ~50 μm . Τέλος, ο έλεγχος και ο συγχρονισμός του υβριδικού μικροσκοπίου έγινε με την χρήση του προγραμματιστικού περιβάλλοντος του LabVIEW, ενώ όλα τα καταγεγραμμένα δεδομένα επεξεργάστηκαν μέσω του MATLAB και του ImageJ, το οποίο είναι λογισμικό ανοιχτού κώδικα που βασίζεται σε Java..

Παρακάτω παρατίθεται μια γενική κάτοψη της διάταξης καθώς και μια αναπαράσταση του φωτισμού του δείγματος και της καταγραφής των παραγόμενων υπερήχων.



Εικόνα 7.1: Σχηματική αναπαράσταση του υβριδικού συστήματος απεικόνισης: L (1–9) lenses, M mirror, PH (1–2) pinholes, ND neutral density filters, DM (1–2) dichroic mirrors, F (1–2) optical filters, PMT photomultiplier tube, SHG second harmonic generation crystal, P linear polarizer, OL objective lens, XYZ 3D translation stages, WT water tank, S scale sample, UT ultrasonic transducer, A amplifier, DAQ data acquisition card, FG function generator, PC recording computer

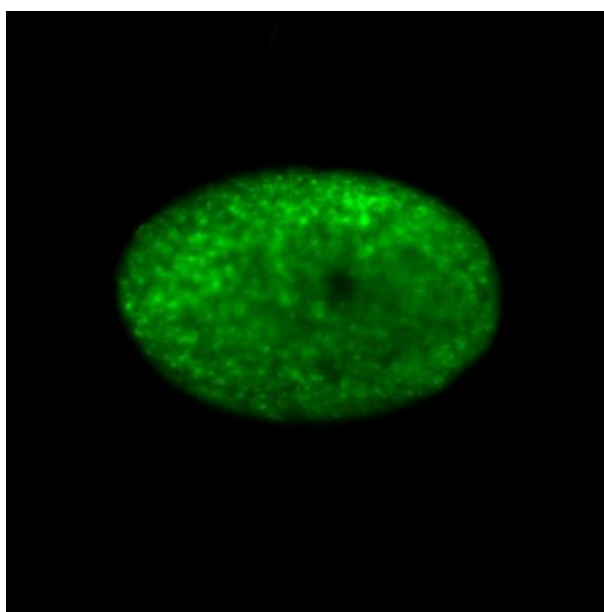


Εικόνα 7.2: Αναπαράσταση της πορείας της δέσμης προς το δείγμα και του παραγόμενου υπέρηχου.

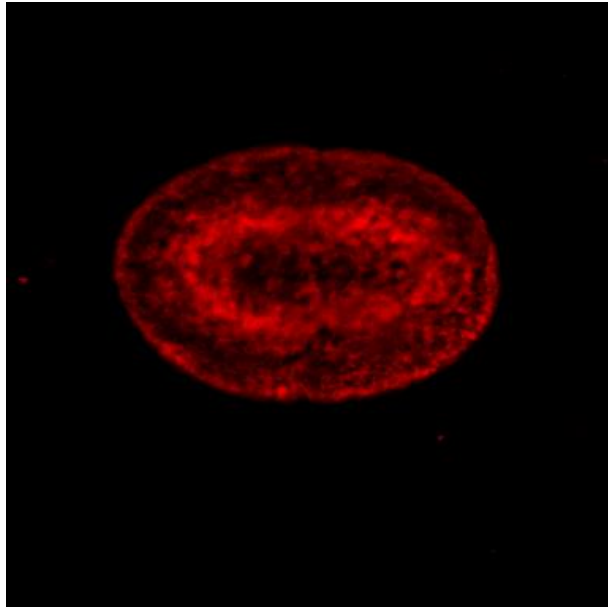
Στην επόμενη ενότητα θα παρουσιάσουμε μερικά χαρακτηριστικά αποτελέσματα που λάβαμε κατά την διάρκεια των μετρήσεων των πρώιμων αλλά και των μεταγενέστερων σταδίων της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Parhyale Hawaiensis*, συνδυαστικά με την χρήση της φωτοακουστικής μικροσκοπίας (PA) και της label-free -χωρίς την χρήση φθοροφόρων, που αποσκοπούν στην ανάδειξη της πληροφορίας ενός οργανισμού – μικροσκοπίας φθορισμού (AF).

(8) Αποτελέσματα

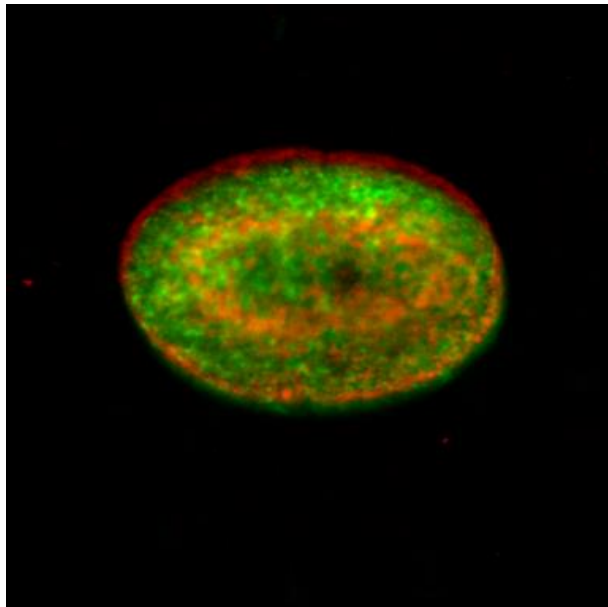
Stage 2: 4 cells (4-6 h εμβρυϊκής ανάπτυξης, 1,6-2,4% εμβρυϊκής ανάπτυξης)



Αυτοφθορισμός: Διακρίνεται η μεμβράνη που περιβάλλει τα κύτταρα που συνθέτουν το έμβρυο

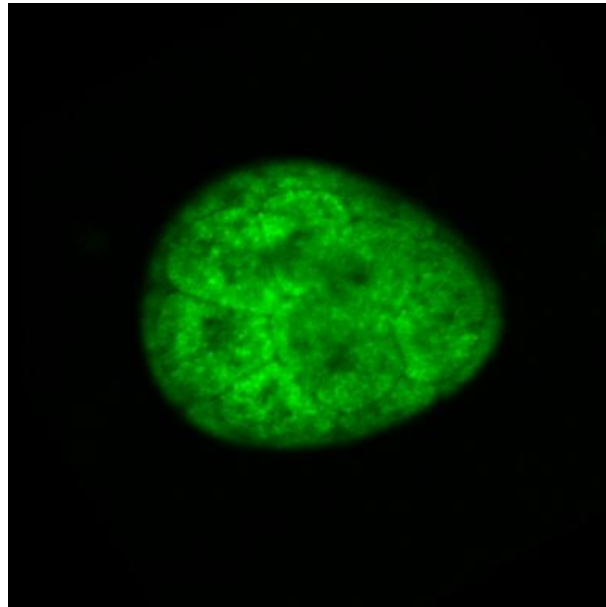


Φωτοακουστικό: Φαίνεται ο διαχωρισμός του κυττάρου σε 2 πρωτοπλασματικές περιοχές και η διαίρεση της λεκίθου (yolk) σε 2 μέρη

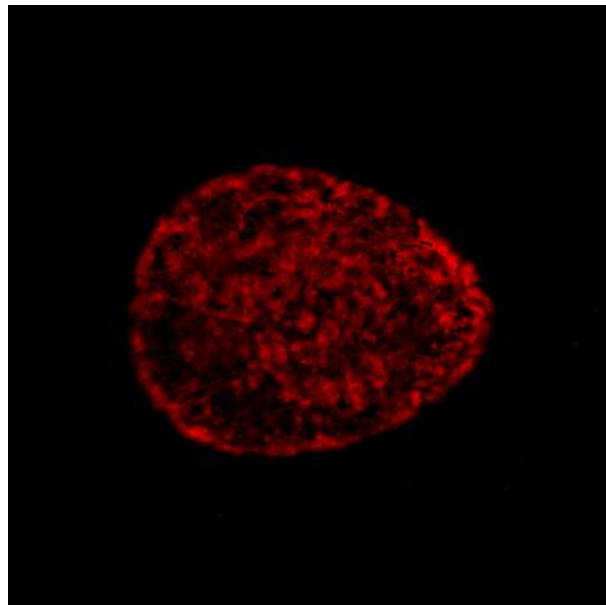


Hybrid: Σύνθεση των 2 απεικονίσεων της φωτοακουστικής και της συνεστιακής μικροσκοπίας, όπου αναδεικνύεται ανάγλυφα η συμπληρωματικότητά τους

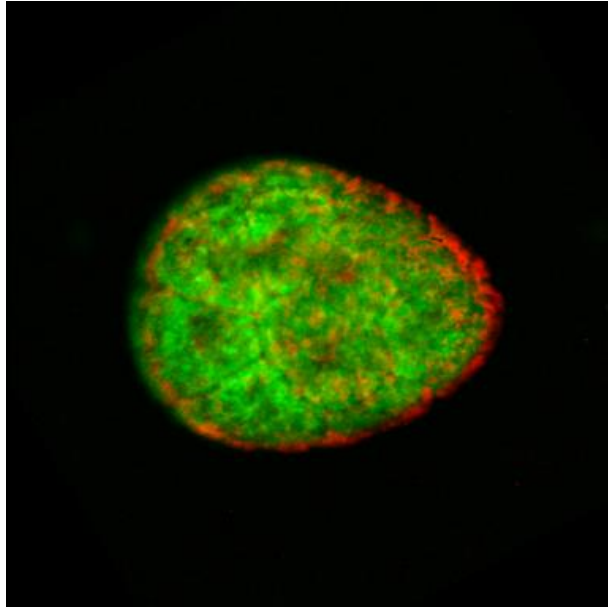
Stage 5: 64 cells (9,5-12 h εμβρυϊκής ανάπτυξης, 3,6-4,8% εμβρυϊκής ανάπτυξης)



Αυτοφθορισμός: Απεικονίζονται οι μεμβράνες που περιβάλλουν τα κύτταρα και οι πυρήνες στο εσωτερικό των κυττάρων

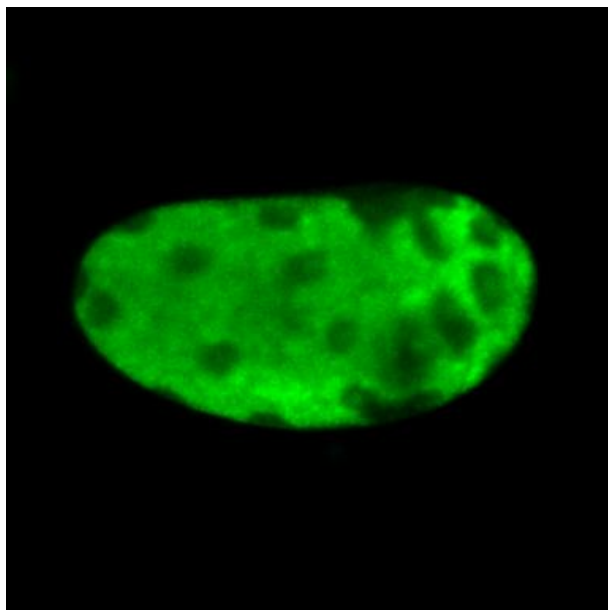


Φωτοακουστικό: Διακρίνεται ότι η λέκιθος ξεκινάει να συγκεντρώνεται προς τα μέσα

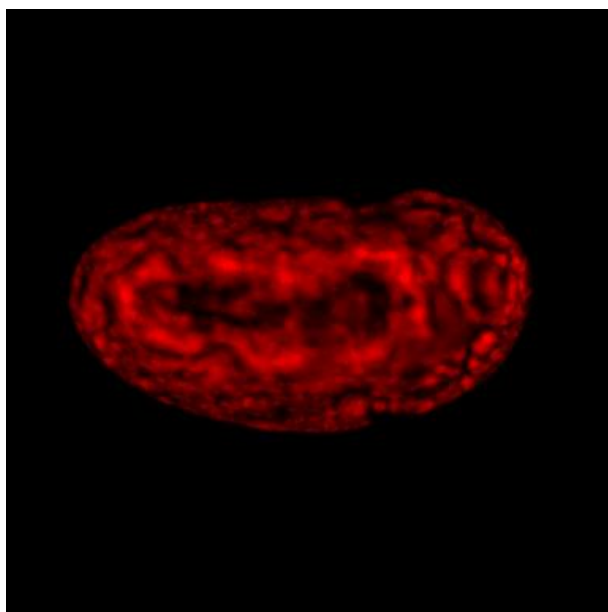


Hybrid: Σύνθεση των 2 απεικονίσεων της φωτοακουστικής και της συνεστιακής μικροσκοπίας, όπου αναδεικνύεται ανάγλυφα η συμπληρωματικότητά τους

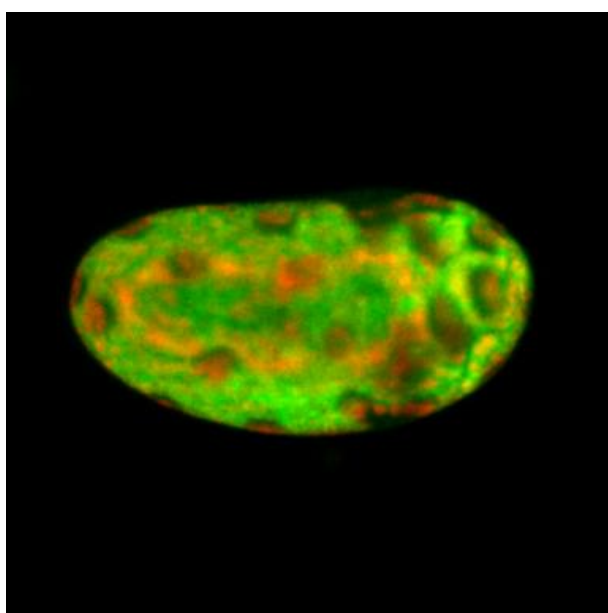
Stage 6: 128 cells (9,5-12 h εμβρυϊκής ανάπτυξης, 3,6-4,8% εμβρυϊκής ανάπτυξης)



Αυτοφθορισμός: Απεικονίζονται οι μεμβράνες που περιβάλλουν τα κύτταρα και οι πυρήνες στο εσωτερικό των κυττάρων

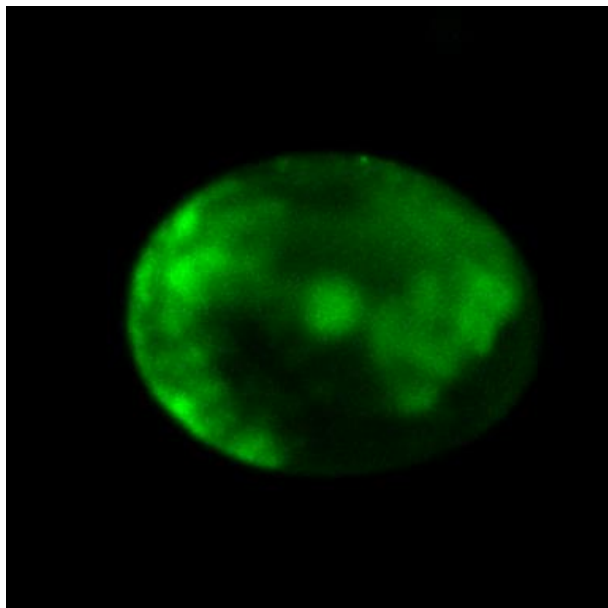


Φωτοακουστικό: Διακρίνεται η συγκέντρωση της λεκίθου προς τα μέσα

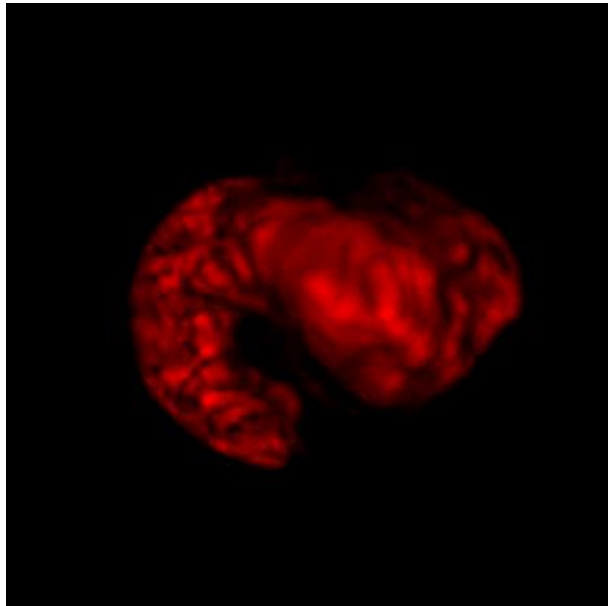


Hybrid: Σύνθεση των 2 συμπληρωματικών απεικονίσεων της φωτοακουστικής και της συνεστιακής μικροσκοπίας

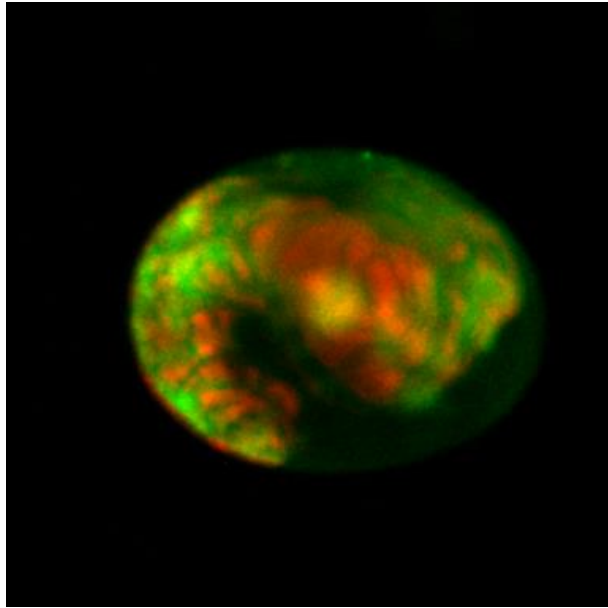
Stage 20: (112 h εμβρυϊκής ανάπτυξης 44,8% εμβρυϊκής ανάπτυξης)



Αυτοφθορισμός: Απεικονίζεται το έντερο του εμβρύου που έχει σχηματιστεί σε προχωρημένο στάδιο της εμβρυϊκής ανάπτυξης

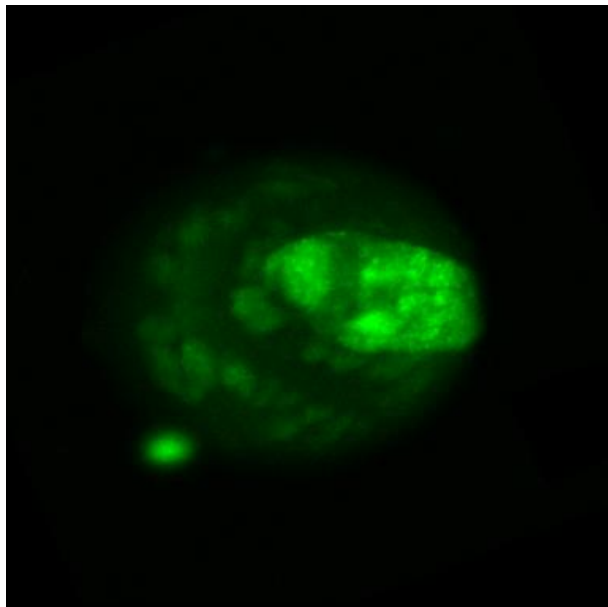


Φωτοακουστικό: Απεικονίζεται το έντερο του εμβρύου και το yolk sac που το περιβάλλει

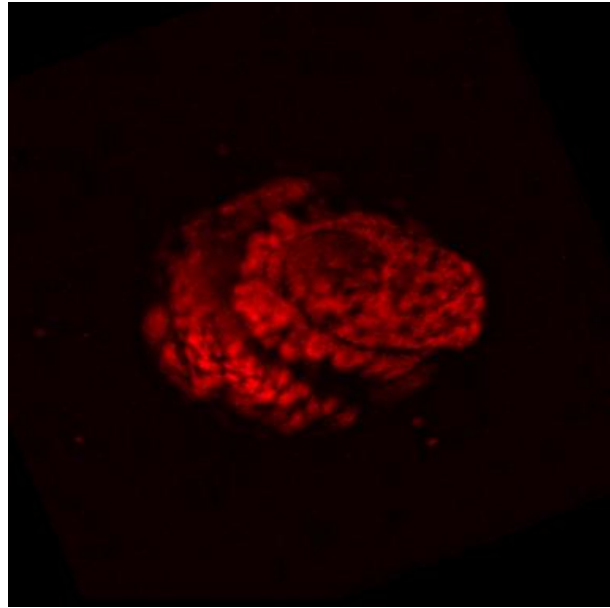


Hybrid: Σύνθεση των 2 συμπληρωματικών απεικονίσεων της φωτοακουστικής και της συνεστιακής μικροσκοπίας

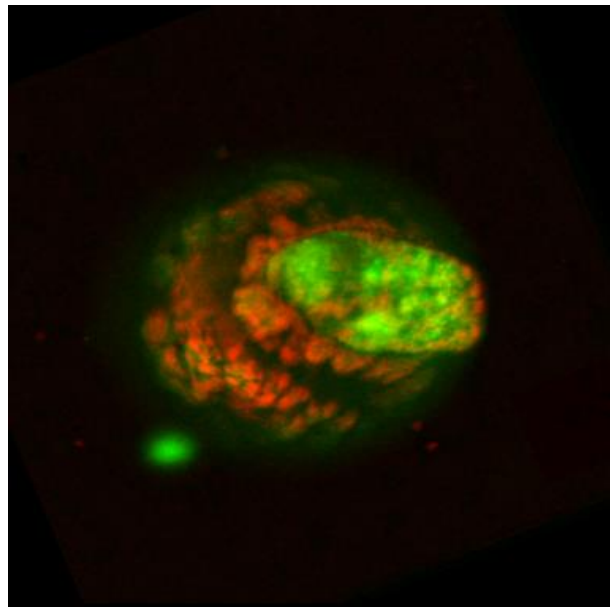
Stage 21: (117 h εμβρυϊκής ανάπτυξης 48% εμβρυϊκής ανάπτυξης)



Αυτοφθορισμός: Απεικόνιση των ποδιών (σκούρο πράσινο και οι ραβδώσεις που προκαλούν την αντίθεση) και της ουράς (ανοιχτό πράσινο)

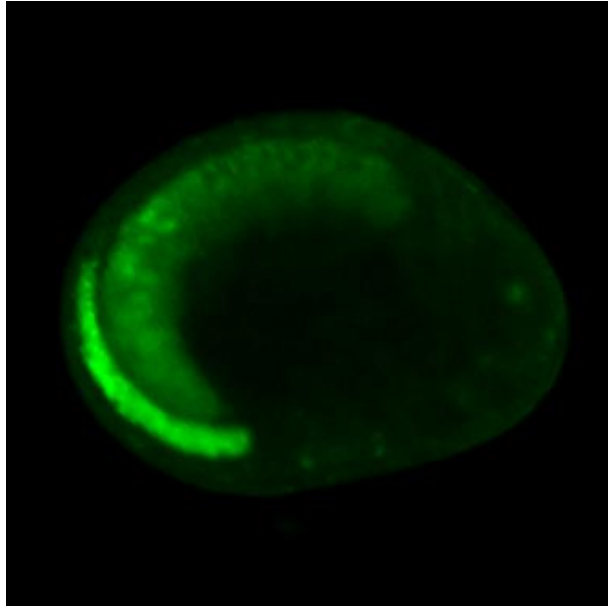


Φωτοακουστικό: Απεικόνιση των ποδιών και της ουράς, με έντονη απορρόφηση από τους μύες στο πόδι

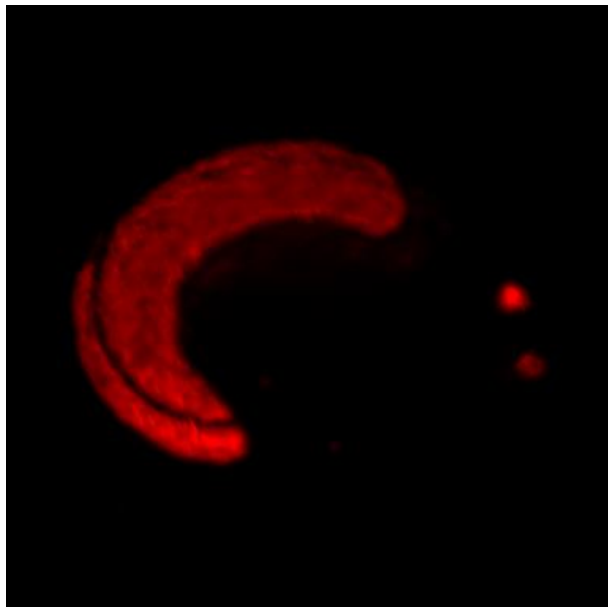


Hybrid: Σύνθεση των 2 συμπληρωματικών απεικονίσεων της φωτοακουστικής και της συνεστιακής μικροσκοπίας

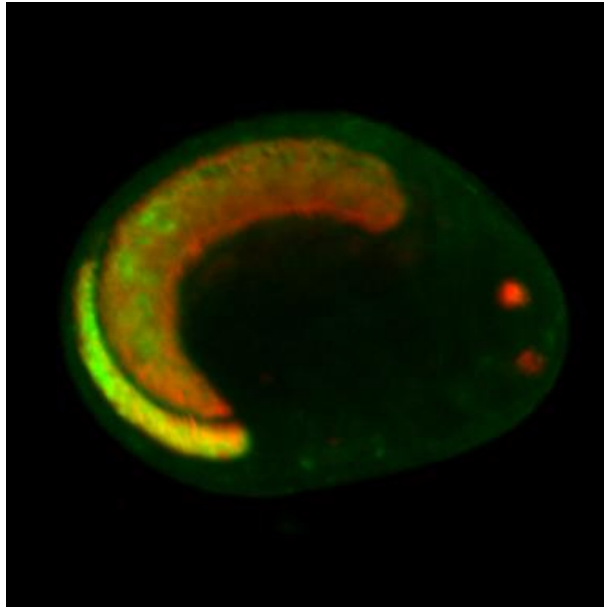
Stage 26: (180 h εμβρυϊκής ανάπτυξης 72% εμβρυϊκής ανάπτυξης)



Αυτοφθορισμός: Απεικόνιση του ανεπτυγμένου παρυάλου και ασθενής πληροφορία από το ένα μάτι



Φωτοακουστικό: Αντίστοιχη πληροφορία με εντονότερο σήμα και από τα 2 μάτια (ενδεχομένως λόγω της μελανίνης που απορροφάει έντονα)



Hybrid: Σύνθεση των 2 συμπληρωματικών απεικονίσεων της φωτοακουστικής και της συνεστιακής μικροσκοπίας

(9) Συμπεράσματα

Μέσω του πρωτότυπου υβριδικού συστήματος απεικόνισης έγινε με επιτυχία η in-vivo παρακολούθηση της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Parhyale Hawaiensis*, καθώς τα επιλεγμένα ανά στάδιο ανάπτυξης έμβρυα, συνέχισαν να εξελίσσονται κατά την μετρητική διαδικασία, το οποίο συνεπάγεται άμεσα, ότι το σύστημα ήταν κατάλληλα διαμορφωμένο ως προς τις παραμέτρους ακτινοβολήσης, καθώς δεν προκλήθηκε φωτοτοξικότητα – η φωτοτοξικότητα είναι μια διαδικασία κατά την οποία επέρχεται καταστροφή των εικονιζόμενων οργανισμών/κυττάρων όταν ακτινοβολούνται για παρατεταμένο διάστημα από λέιζερ υψηλής ισχύος – στα υπό μελέτη δείγματα. Συνάμα το υβριδικό σύστημα ήταν σε θέση να καταγράψει αυτές τις μεταβολές κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, το αποτελεί αναγκαία συνθήκη για την όσο το δυνατόν καλύτερη in-vivo απεικόνιση των εμβρύων, ειδικά στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης όπου (όπως φαίνεται ανάγλυφα παραπάνω) οι χρόνοι παραμονής του εμβρύου είναι πολύ μικροί (της τάξεως αρκετών λεπτών) σε κάθε στάδιο ανάπτυξης.

Παράλληλα, όπως επικαλείται και εξ ονόματος (υβριδικό σύστημα) η διάταξη, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα η απεικόνιση των εμβρύων με την χρήση δύο απεικονιστικών τεχνικών, της φωτοακουστικής μικροσκοπίας οπτικής ανάλυσης (OR-PAM) και της συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού (Confocal Microscopy). Η απεικόνιση με την χρήση των δύο αυτών μεθόδων αποσκοπούσε στην εξαγωγή συμπληρωματικής πληροφορίας για την ανάπτυξη των εμβρύων (ειδικότερα στα πρώιμα στάδια), όπου φαίνεται χαρακτηριστικά στις παραπάνω μετρήσεις, ότι δεν υπάρχει επικάλυψη στις εικόνες από τις 2 τεχνικές, συνεπώς αντιλαμβανόμαστε ότι αναδύεται μια τελειώς διαφορετική πληροφορία από την εκάστοτε τεχνική ως προς την δομή του εμβρύου.

Επιπροσθέτως, η εξαγωγή των δομικών χαρακτηριστικών των εμβρύων κατά την απεικόνιση έγινε label-free, δηλαδή δίχως την εισαγωγή ουσιών οι οποίες σε πρώτη φάση «αλλοιώνουν» τον οργανισμό στον οποίο εισέρχονται, καθώς παύει να είναι wild-type, δηλαδή ένας οργανισμός του οποίου ο φαινότυπος, ο γονότυπος ή ένα γονίδιο του είναι χαρακτηριστικά ενός ευρύτερου πληθυσμού οργανισμών σε αντίθεση με ένα φυσικά ή εργαστηριακά μεταλλαγμένο οργανισμό. Η label-free απεικόνιση βοήθησε συνάμα στην αποφυγή φαινόμενων φωτολεύκανσης που έχουν παρατηρηθεί στην μικροσκοπία φθορισμού. Η φωτολεύκανση είναι μια διαδικασία κατά την οποία, η φθορίζουσα ουσία (φθοροφόρο) που έχουμε εισάγει στον οργανισμό - για περισσότερη απεικονιστική πληροφορία - κατά την ακτινοβόληση μεταβάλλεται χημικά με τέτοιο τρόπο που θα είναι αμετάκλητα ανίκανο να φθορίσει. Η φωτολεύκανση προκαλείται από υψηλής έντασης ακτινοβολία ή/και από παρατεταμένη έκθεση του δείγματος στην ακτινοβολία.

Σε αυτό το σημείο θα σταθούμε στα επιμέρους στοιχεία τα οποία προέκυψαν από την κάθε τεχνική. Η συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού συνιστά εδώ και αρκετές δεκαετίες μια παγιωμένη απεικονιστική τεχνική, μέσω της οποίας έχει εξαχθεί πληροφορία ως προς τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των οργανισμών. Έτσι και στην συγκεκριμένη περίπτωση πήραμε στοιχεία για τα κύτταρα και τις μεμβράνες (που τα περιβάλλουν) στα πρώιμα στάδια καθώς ανάγλυφη πληροφορία για το μυϊκό σύστημα, το έντερο και τα μάτια των εμβρύων στα προχωρημένα στάδια της εμβρυογένεσης. Συνάμα, μπορούμε να προσδιορίσουμε τις ουσίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την υπέρξη του αυτοφθορισμού στα έμβρυα του *Parhyale Hawaiensis* μέσα από την μελέτη των φασμάτων εκπομπής και απορρόφησης αυτοφθορισμού για το εφαρμοζόμενο μήκος κύματος. Παρακάτω παρατίθενται οι συγκεκριμένες ουσίες:

- NADP⁺
- NADPH
- TRP

Η πληροφορία που λάβαμε με την χρήση της φωτοακουστικής μικροσκοπίας σχετιζόταν με την κατανομή της λεκίθου (yolk) κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Parhyale Hawaiensis*, που ήταν και το κίνητρο αυτής της μελέτης, διότι αποτελεί ένα μείζον θέμα υπό διερεύνηση στον κλάδο της αναπτυξιακής βιολογίας, καθώς όπως αναφέραμε η λεκίθος είναι θρεπτικό συστατικό απαραίτητο για τις μιτωτικές διαιρέσεις και την εν γένει ανάπτυξη του εμβρύου. Το φωτοακουστικό σήμα που λάβαμε από την λεκίθο πρόέρχεται από τα pigments (χρωματοφόρα) που συνθέτουν το yolk και το yolk sac κατ' επέκταση στα προχωρημένα στάδια της εμβρυογένεσης, πιο συγκεκριμένα τα pigments που απαντώνται στον παρύαλο αποκαλούνται καροτενοειδή (π.χ η φυκοξανθίνη και η ασταξανθίνη, οι οποίες είναι καροτενοειδή των φαιοφυκών και είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση. Δυνητικά μπορούν να βοηθήσουν σε μελέτες καταπολέμησης του καρκίνου) και είναι υπεύθυνα για το έντονο φωτοακουστικό σήμα που λάβαμε κατά τις μετρήσεις μας στα πρώιμα στάδια αλλά και στα μεταγενέστερα κατά τον σχηματισμό του yolk-sac που περιβάλλει το έντερο. Τέλος λάβαμε περαιτέρω πληροφορία σε σχέση με τη συνεστιακή μικροσκοπία και από τα δύο μάτια του εμβρύου - όταν το έμβρυο ήταν σχεδόν ολοκληρωτικά ανεπτυγμένο στο 26^ο απ' τα συνολικά 30 στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης - το οποίο οφείλεται στην μελανίνη που βρίσκεται στο εσωτερικό των ματιών του *Parhyale Hawaiensis*.

(10) Μελλοντικές Προοπτικές

Μέσα από πολύωρες εργαστηριακές μελέτες εξάχθηκαν κάποια συμπεράσματα τα οποία θα μπορούσαν μελλοντικά να συνδράμουν στην περαιτέρω και συνάμα πολύπλευρη ανάπτυξη της απεικονιστικής διαδικασίας για το πρωτότυπο υβριδικό σύστημα. Αρχικά, η εισαγωγή του συστήματος των Galvo mirrors (γαλβανομετρικοί καθρέφτες), οι οποίοι συνθέτουν ένα σύστημα καθρεφτών μέσω του οποίου η δέσμη του λέιζερ μετακινείται σε διαφορετικές κατευθύνσεις περιστρέφοντας και προσαρμόζοντας τις γωνίες των καθρεφτών ως σύστημα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η πολύ υψηλής ταχύτητας και συνάμα λεπτομερής σάρωση του δείγματος. Χαρακτηριστικά, η υψηλής ανάλυσης εικόνας που φαίνονται στα αποτελέσματα (400X400 pixels) λαμβάνονταν σε χρόνο περί τα 18 λεπτά μέσω της μηχανικής σάρωσης – όπου έχουμε οριζόντια και κατακόρυφη μετατόπιση του δείγματος ως προς την δέσμη για να λάβουμε τις επιθυμητές οπτικές τομές – το οποίο όσο εύλογο και αν φαίνεται σαν χρονικό διάστημα δεν παύει να αποτελεί μια συνθήκη κατά την οποία υπάρχει ο κίνδυνος να χαθεί η επιθυμητή πληροφορία ειδικά στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης, όπου η μετάβαση από το ένα στο άλλο πραγματοποιείται μέσα σε λεπτά . Αυτό καθιστά την απεικόνιση πολύ απαιτητική διαδικασία, η οποία δεν επιδέχεται λάθη από τον χειριστή του μικροσκοπίου, καθώς μπορεί να υπάρξει αλλαγή του επιθυμητού σταδίου που θέλουμε να απεικονιστεί μέσα σε μερικά λεπτά. Αντιθέτως, οι αντίστοιχες υψηλής ακρίβειας εικόνες μπορούν να ληφθούν μέσα σε μερικά λεπτά με την χρήση των Galvos, συνεπώς η μελέτη μπορεί να γίνει με μεγάλη ακρίβεια λαμβάνοντας πληθώρα απεικονίσεων για το κάθε στάδιο ξεχωριστά, επιτρέποντας ουσιαστικά την επανάληψη πολλαπλών μετρήσεων – σε περίπτωση λάθους – σε κάθε επιμέρους στάδιο, συμβάλλοντας παράλληλα στην δημιουργία μιας πλήρους βάσης δεδομένων σε in-vivo μελέτες εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Επιπροσθέτως, με την εισαγωγή των Galvos (υψηλή απεικονιστική ταχύτητα) μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε stained δείγματα, δηλαδή δείγματα τα οποία έχουν σημανθεί με την χρήση φθοροφόρων ,ουσίες των οποίων το συστατικό που φθορίζει κατά την ακτινοβολία προσκολλάται σε ένα συγκεκριμένο αντίσωμα, έτσι ώστε να εξάγουμε πληροφορία από τις υπό μελέτη περιοχές οι οποίες δεν φθορίζουν εγγενώς όταν ακτινοβοληθούν . Η σήμανση αυτή είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί καθώς με την χρήση των Galvos έχουμε υψηλή ταχύτητα, το οποίο συνεπαγεται ότι μπορούμε να επιτύχουμε μικρό χρόνο έκθεσης του φθοροφόρου στην ακτινοβολία από το λέιζερ. Συνεπώς, μπορούμε λάβουμε επιπρόσθετη πληροφορία για τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των εμβρύων, η οποία δεν είχε εξαχθεί μέσω του αυτόφθορισμού (CF).

Επιπλέον φαίνεται πως υπάρχουν προοπτικές ως προς το κομμάτι της multiview απεικόνισης η οποία μπορεί να εφαρμοστεί στα δείγματα και να μας δώσει μια ολιστική εικόνα για τα έμβρυα. Μέσω της multiview απεικόνισης λαμβάνονται εικόνες από όλες τις πλευρές/προοπτικές του υπό μελέτη δείγματος και εν συνεχεία, οι ληφθείσες αυτές εικόνες επεξεργάζονται μέσω ειδικών αλγορίθμων back- projection και γίνεται η ανακατασκευή μιας σύνθετης εικόνας (3D) σε αντίθεση με τις απεικονίσεις που πραγματοποιήσαμε, στις οποίες λάβαμε πληροφορία μόνο για τομές του εμβρύου, υπό συγκεκριμένη προοπτική. Συνεπώς

εφαρμόζοντας την multiview απεικόνιση μπορούμε να εξάγουμε πολύ περισσότερα συμπεράσματα για ολόκληρη την δομή του εμβρύου, εμπλουτίζοντας έτσι την μελέτη μας γύρω από την εμβρυϊκή ανάπτυξη και όχι μόνο.

Τέλος, εφαρμόζοντας διαφορετικά μήκη κύματος κατά την ακτινοβολήση μπορούμε να αναδείξουμε νέα πληροφορία για την δομή των εμβρύων σε σχέση με την προϋπάρχουσα, καθώς για κάθε μήκος κύματος έχουμε διαφορετική αλληλεπίδραση της δέσμης με το δείγμα. Η επιλογή και κατ' επέκταση η εφαρμογή διαφορετικών μηκών κύματος ακτινοβολήσης εντάσσεται στον κλάδο της multiwavelength απεικόνισης. Μερικά αντιπροσωπευτικά παραδείγματα εφαρμογής multiwavelength απεικόνισης σε αντίστοιχους οργανισμούς έχουν δείξει ότι μπορεί να εξαχθεί πληροφορία ως προς την σύνθεση των λιπιδίων στα υπέρυθρα μήκη κύματος ($\lambda \sim 1300 - 1500 \text{ nm}$), καθώς και για την δομή των DNA και RNA label-free σε μήκη κύματος στο κοντινό υπεριώδες ($\lambda \sim 250$).

Βιβλιογραφία

1. William E. Browne, Alivia L. Price, Matthias Gerberding, Niham H. Patel (2005) “Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*”. *Genesis* 42(3), 124-49, <https://doi.org/10.1002/gene.20145>
2. Kao D, Lai AG, Stamataki E, Rosic S, Konstantinides N, Jarvis E, et al. (2016) “The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion”. *eLife* 5, <https://doi.org/10.7554/eLife.20062>
3. R.W. Boyd. “Nonlinear Optics (Third Edition)”. *Academic Press, Burlington. MA* (2008)
4. A.F.J Levi. “Applied Quantum Mechanics (Second Edition)”. *Cambridge Univ. Press, New York* (2006)
5. Τσερεβελάκης Γεώργιος. Διδακτορική διατριβή (2013). “Nonlinear optical procedures for the diagnostics and processing of biological samples by using ultra-short laser pulses”
6. Partha Partim Mondal, Alberto Diaspro. “Fundamentals of Fluorescence Microscopy”
7. Michiel Muller. “Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy (Second Edition)”. *Spie Press, Bellingham, Washington USA* (2006)
8. Fadero T.C, et al. (2018) “LITE microscopy: Tilted light-sheet excitation of model organisms offers high resolution and low photobleaching”. *The Journal of Cell Biology*, 217(5), 1869-1882, <https://doi.org/10.1083/jcb.201710087>
9. Κακακίος Νικήτας, Διπλωματική Εργασία (2022). “Φωτοακουστική μικροσκοπία στο πεδίο των συχνοτήτων μέσω της χρήσης αποδιαμορφωτή χαμηλού κόστους”
10. Κληρονόμου Ευγενία, Διπλωματική Εργασία (2021). “Detecting hidden sketch drawings and fresco layers using a novel photoacoustic, diagnostic approach”
11. Junjie Yao, Lihong V. Wang (2013). “Photoacoustic Microscopy”. *Laser & Photonics Reviews*, 7(5), 758-778, <https://doi.org/10.1002/lpor.201200060>

12. George J. Tservelakis, Kostas G. Mavrakis, et al. (2020) “Hybrid autofluorescence and photoacoustic label-free microscopy for the investigation and identification of malignancies in ocular biopsies”. *Optics Letters*, 45(20) <https://doi.org/10.1364/OL.403435>
13. Dominik Soliman, George J. Tservelakis, et al. (2015) “Combining microscopy with mesoscopy using optical and optoacoustic label-free modes”. *Scientific Reports* 5:12902 <https://doi.org/10.1038/srep12902>
14. Junjie Yao, Lihong V. Wang. (2014) “Sensitivity of photoacoustic microscopy”. *Photoacoustics* 2(2) <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2014.04.002>
15. Seungwan Jeon, Jongbeom Kim, Donghyun Lee et al. (2019) “Review on practical photoacoustic microscopy”. *Photoacoustics* 15 <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2019.100141>
16. Christopher P. Favazza, Omar Jassim et al. (2011) “In vivo photoacoustic microscopy of human cutaneous microvasculature and a nevus”. *Journal of Biomedical Optics*, 16(1), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3055592/>
17. George J. Tservelakis et al. (2017) , “Delineating the anatomy of the ciliary body using hybrid optical and photoacoustic imaging”. *Journal of Biomedical Optics*, 22(6), <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.6.060501>
18. George J. Tservelakis et al. (2022) “Hybrid confocal fluorescence and photoacoustic microscopy for the label-free investigation of melanin accumulation in fish scales”. *Scientific Reports*, 12(7173), <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11262-0>
19. George J. Tservelakis et al. (2022) “Imaging Parhyale hawaiiensis embryogenesis with frequency domain photoacoustic: A novel tool in developmental biology”. *Journal of Biophotonics*, <https://doi.org/10.1002/jbio.202200202>