



ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Απεικόνιση των διαφορετικών σταδίων  
της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Parhyale*  
*hawaiensis* με τη χρήση φωτοακουστικής  
μικροσκοπίας στο πεδίο των συχνοτήτων

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΥΣΙΚΗΣ

Σοφία Βελέντζα  
ph4790

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	2
1. Θεωρητική εισαγωγή .....	3
1.1 Φωτοακουστικό φαινόμενο.....	3
1.2 Φωτοακουστική μικροσκοπία (Photoacoustic Microscopy –PAM) ....	4
1.3 Το πρόβλημα της σκέδασης.....	6
1.4 Φωτοακουστική μικροσκοπία οπτικής ανάλυσης (OR-PAM) και ακουστικής ανάλυσης (AR-PAM) .....	6
1.5 Φωτοακουστική μικροσκοπία OR-PAM στο πεδίο χρόνου και στο πεδίο συχνοτήτων.....	12
1.6 Εφαρμογές φωτοακουστικής μικροσκοπίας στην βιοϊατρική .....	16
2. <i>Parhyale hawaiiensis</i> .....	20
3. Υλικά και μέθοδοι.....	26
3.1 Προετοιμασία δείγματος.....	26
3.2 Πειραματική διάταξη .....	27
3.3 Ανακατασκευή εικόνων .....	29
4. Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση .....	35
5. Συμπεράσματα .....	38
Πηγές.....	40

## Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτελεί η απεικόνιση των διαφορετικών σταδίων της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Parhyale hawaiensis* με την μέθοδο της φωτοακουστικής μικροσκοπίας. Χρησιμοποιώντας ένα χαμηλού κόστους φωτοακουστικό μικροσκόπιο στο πεδίο των συχνοτήτων (FDPM) με έναν απλό αποδιαμορφωτή συχνοτήτων καταφέραμε να επιτύχουμε επαρκή απορρόφηση ακτινοβολίας και ακριβή ανακατασκευή εικόνων που απεικονίζουν με μεγάλη επιτυχία την εμβρυϊκή εξέλιξη των *Parhyale hawaiensis* από το πρώτο κύτταρο μέχρι ακόμη και τα τελικά της στάδια. Διαμορφώνοντας την ένταση μίας συνεχούς πηγής laser στα 9.5 MHz, παράχθηκαν μονοχρωματικά φωτοακουστικά κύματα που ανιχνεύθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του πλάτους και της φάσης. Τα δεδομένα στη συνέχεια επεξεργάστηκαν, ώστε να παραχθεί η μέγιστη προβολή του πλάτους αλλά και η επιφανειακή ανακατασκευή του δείγματος, αναδεικνύοντας τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εμβρύων με υψηλή ανάλυση και αντίθεση. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας είναι πολύ σημαντικά, καθώς μπορούν να χαράξουν τον δρόμο για την ευρύτερη υιοθέτηση της οικονομικής αυτής διαγνωστικής μεθόδου στην αναπτυξιακή βιολογία για την απεικόνιση θεμελιωδών λειτουργιών σε μικροσκοπικούς οργανισμούς-μοντέλα χωρίς την χρήση χρωστικών και σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους απεικόνισης.

# 1. Θεωρητική εισαγωγή

## 1.1 Φωτοακουστικό φαινόμενο

Το φωτοακουστικό ή οπτικοακουστικό φαινόμενο είναι ο σχηματισμός υπερηχητικών κυμάτων λόγω της απορρόφησης του φωτός από το δείγμα. Για να προκληθεί το φαινόμενο, η ένταση της ακτινοβολίας πρέπει να μεταβάλλεται είτε περιοδικά (modulated light) είτε παλμικά (pulsed light), οδηγώντας σε θερμοελαστική επέκταση που προκαλεί την εκπομπή ενός ακουστικού κύματος. Επομένως είναι εφικτή η παραγωγή του φαινομένου με την χρήση είτε ενός παλμικού laser είτε ενός συνεχούς laser με την κατάλληλη οπτική διαμόρφωση, όπως θα παρουσιάσω παρακάτω σε αυτή την εργασία.

Όσο το δείγμα ακτινοβολείται, απορροφά ενέργεια που μετατρέπεται σε θερμότητα και ως συνέπεια αυτού διαστέλλεται. Αυτή η διαστολή (και αντίστοιχα συστολή, όταν δεν ακτινοβολείται) μεταφράζεται ως διαφορά στην πίεση και ανιχνεύεται με κατάλληλους πιεζοηλεκτρικούς ανιχνευτές ως υπέρηχος. Η χρονική διαφορά στην ηλεκτρική έξοδο αυτών των ανιχνευτών είναι το φωτοακουστικό σήμα.

Αυτές οι μετρήσεις είναι χρήσιμες, για να καθορίσουν συγκεκριμένες ιδιότητες του μελετούμενου δείγματος. Το πλάτος του φωτοακουστικού σήματος εξαρτάται από την ποσότητα της ενέργειας που απορροφάται καθώς και από το χρόνο που εναποτίθεται η δέσμη στο δείγμα [17].

Για να διατυπώσουμε με μαθηματικά το φωτοακουστικό φαινόμενο, ξεκινάμε από την εξίσωση θερμικής διαστολής:  $\nabla \xi(\vec{r}, t) = -k p(\vec{r}, t) + \beta T(\vec{r}, t)$  (1)

όπου  $\xi$ : η μέση μετατόπιση από την θέση ισορροπίας,  $k$ : η ισοθερμική συμπιεστότητα,

$\beta$ : ο θερμικός συντελεστής διαστολής του όγκου,  $p$ : η συνάρτηση της πίεσης και  $T$ : η συνάρτηση της θερμοκρασίας.

$$k = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial P} \right)_T, \quad \beta = \frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_P$$

Η εξίσωση (1) εξηγεί πως η επέκταση του όγκου του μέσου (αριστερό μέλος) είναι ίση με το άθροισμα δύο παραγόντων (δεξί μέλος), με τον πρώτο όρο να δείχνει την παραγόμενη πίεση, ενώ ο δεύτερος είναι μία συνάρτηση της θερμοκρασίας του αντικειμένου. Οι θετικές πιέσεις τείνουν να συρρικνώσουν το αντικείμενο, πράγμα που εξηγεί το αρνητικό πρόσημο στον πρώτο όρο. Ο δεύτερος όρος εκφράζει μία γραμμική εξάρτηση της επέκτασης του όγκου με την θερμοκρασία, καθώς η θέρμανση ενός αντικειμένου θα οδηγήσει σε διαστολή του [19].

Χρειαζόμαστε επίσης τον νόμο του Νεύτωνα σε μία μορφή που μας δίνει την δύναμη ανά όγκο:

$$\rho \frac{\partial^2 \vec{\xi}(\vec{r}, t)}{\partial t^2} = -\nabla p(\vec{r}, t) \quad (2) \text{ με την αντίστοιχη απόκλιση του : } \rho \frac{\partial^2}{\partial t^2} \nabla \vec{\xi}(\vec{r}, t) = -\nabla^2 p(\vec{r}, t) \quad (3)$$

Στην εξίσωση (2) ο αριστερός όρος αντιπροσωπεύει την πυκνότητα μάζας επί την επιτάχυνση και ο δεξιός είναι η δύναμη που εφαρμόζεται ανά μονάδα όγκου. Για την καλύτερη κατανόηση της σχέσης πίεσης/δύναμης χρησιμοποιούμε ένα κυβικό χωρίο όγκου του οποίου η μάζα δίνεται από την εξίσωση:  $m = \rho \cdot dA \cdot dz$  όπου  $dA$ : η επιφάνεια και  $dz$ : το ύψος.

Από τον νόμο του Νεύτωνα:  $F = m \cdot a = \rho \cdot dA \cdot dz \cdot a = -dp \cdot dA \rightarrow \rho \cdot a = -\frac{dp}{dz}$  ή στην πιο γενική περίπτωση:  $\rho \cdot \vec{a} = -\nabla \vec{p}$

Αντικαθιστώντας την (1) στην (3) προκύπτει:  $(\nabla^2 - \rho \kappa \frac{\partial^2}{\partial t^2}) p(\vec{r}, t) = -\beta \rho \frac{\partial^2 T(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (4)$  και

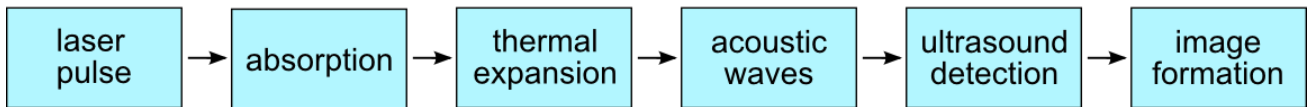
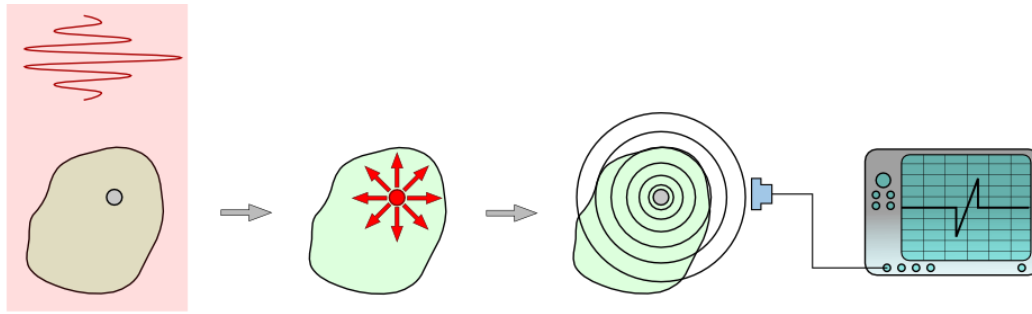
χρησιμοποιώντας την σχέση για την ταχύτητα του ήχου  $u_s = \sqrt{\frac{1}{\rho \kappa}}$  καταλήγουμε στην παρακάτω

εξίσωση:  $(\nabla^2 - \frac{1}{u_s^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2}) p(\vec{r}, t) = -\frac{\beta}{\kappa u_s^2} \frac{\partial^2 T(\vec{r}, t)}{\partial t^2} \quad (5)$ . Το αριστερό μέρος της εξίσωσης (5) δείχνει την

πίεση συναρτήσει του χρόνου και του χώρου ενώ το δεξί αναφέρεται στην πηγή παραγωγής θερμικής ενέργειας. Συνεπώς, δεν μπορεί να παραχθεί κύμα χωρίς χρονικά εξαρτώμενη ακτινοβολία [19].

## 1.2 Φωτοακουστική μικροσκοπία (Photoacoustic Microscopy –PAM)

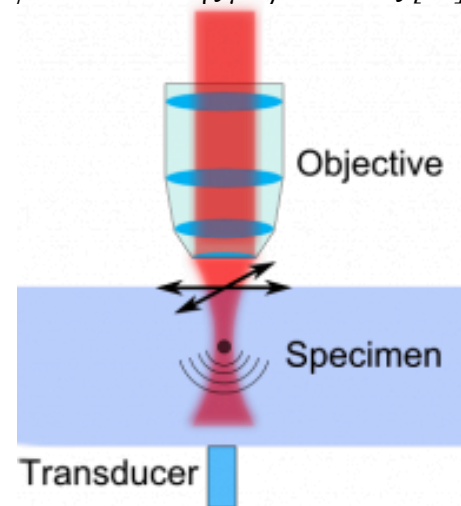
Η φωτοακουστική μικροσκοπία (PAM) είναι μία υβριδική τεχνική απεικόνισης που ανιχνεύει την οπτική αντίθεση με τη χρήση του φωτοακουστικού φαινομένου. Σε αντίθεση με τις συμβατικές τεχνικές οπτικής μικροσκοπίας, το PAM εκμεταλλεύεται την αδύναμη ακουστική σκέδαση στον ιστό και συνεπώς ξεπερνά το οπτικό όριο διάχυσης (~1 mm στον μαλακό ιστό). Το PAM μπορεί να δώσει εικόνες υψηλής ευκρίνειας στο επιθυμητό βάθος απεικόνισης μέχρι κάποια mm. Επίσης μπορεί να απεικονίσει περισσότερα μόρια, ενδογενή ή εξωγενή, στο μήκος κύματος της απορρόφησής τους από ότι άλλες τεχνικές με βάση τον φθορισμό όπως η wide-field, η συνεστιακή και η πολυφωτονική μικροσκοπία. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο πως η PAM μπορεί ταυτόχρονα να απεικονίζει ανατομικές, λειτουργικές, μοριακές και μεταβολικές αντιθέσεις in vivo [16], [17].



Εικ. 1 Σχηματική αναπαράσταση της φωτοακουστικής μικροσκοπίας με παλμικό laser. Τα στοχευμένα χρωμοφόρα απορροφούν την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η ακτινοβολία που απορροφάται μετατρέπεται σε θερμότητα, γεγονός που αυξάνει την θερμοκρασία και συνεπώς την πίεση στην γύρω περιοχή, λόγω του θερμοελαστικού φαινομένου. Η πίεση διαδίδεται ως φωτοακουστικά κύματα από το σημείο ενδιαφέροντος προς την επιφάνεια, τα οποία ανιχνεύονται με έναν υπερηχητικό transducer. Τα ανιχνευόμενα κύματα ανακατασκευάζονται ως εικόνες [20].

Το εκπεμπόμενο φως συνήθως είναι παλμικό ή διαμορφώνεται σε μία συγκεκριμένη συχνότητα και το επεξεργασμένο φωτοακουστικό σήμα αναλύεται με έναν ενισχυτή ως προς την φάση και το πλάτος του. Για την μέτρηση της πίεσης μέσα στο επιλεγμένο δείγμα χρειάζονται πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες που εισάγονται ή προσκολλώνται στο δείγμα. Η κλίμακα του χρόνου καταγραφής είναι από nanoseconds έως και πολλά microseconds. Ένας υπερηχητικός transducer ανιχνεύει το ακουστικό κύμα, για να σχηματίσει μία εικόνα που χαρτογραφεί την αρχική απορρόφηση ακτινοβολίας του ιστού.

Εικ.2 Σχηματική απεικόνιση φωτοακουστικής μικροσκοπίας [20]



Καθώς η σκέδαση υπερήχων στον ιστό ( $\sim 1.2 \times 10^{-3} \text{ mm}^{-1}$  στο ανθρώπινο δέρμα στα 5 MHz) είναι πάνω από τρεις τάξεις μεγέθους πιο αδύναμη από την οπτική σκέδαση ( $\sim 10 \text{ mm}^{-1}$  στο ανθρώπινο δέρμα στα 700 nm), η φωτοακουστική μικροσκοπία μπορεί να επιτύχει μεγάλης ακρίβειας ακουστική ανάλυση σε βάθη πέρα από το όριο διάχυσης. Το φωτοακουστικό σήμα που λαμβάνουμε από τους αισθητήρες πίεσης εξαρτάται από τις φυσικές ιδιότητες του συστήματος, τον μηχανισμό που παράγει το φωτοακουστικό σήμα, το υλικό του δείγματος και την συχνότητα διαμόρφωσης συχνότητας, το είδος της παλμικής ακτινοβολίας, καθώς και τις ιδιότητες των αισθητήρων [16], [5].

### 1.3 Το πρόβλημα της σκέδασης

Λόγω της σκέδασης του φωτός η *in vivo* απεικόνιση του ιστού με το οπτικό μικροσκόπιο ήταν περιορισμένη, γεγονός που οδήγησε στην ανάπτυξη νέων μεθόδων με βελτιωμένο βάθος απεικόνισης και υψηλότερη ανάλυση. Στις συμβατικές οπτικές τεχνικές απεικόνισης το βάθος απεικόνισης προσδιορίζεται από τη μέση ελεύθερη διαδρομή ενός φωτονίου. Η μέση ελεύθερη διαδρομή είναι η μέση απόσταση που διανύει ένα φωτόνιο, μέχρι να σκεδαστεί. Η σκέδαση εμφανίζεται σε ένα ευρύ φάσμα μηκών κύματος, όπως σε ακτίνες X ή ακτίνες γ, αλλά είναι ιδιαίτερα ισχυρή στο υπεριώδες, στο ορατό (450–650 nm) και σε φασματικές περιοχές κοντά στο υπέρυθρο (650 nm – 1 mm), γεγονός που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις των φωτονίων με τις διάφορες κυτταρικές δομές [5].

Στα πλαίσια της έρευνας συχνά επιλέγεται η περιοχή που ονομάζεται οπτικό παράθυρο (700nm - 1mm), αφού τα συγκεκριμένα μήκη κύματος  $\lambda$  μπορούν να διεισδύουν πιο βαθιά στους ιστούς και δίνουν έντονη απορρόφηση από τους βιολογικούς απορροφητές (όπως η αιμοσφαιρίνη, η μελανίνη και άλλοι). Μέσω της οπτικής αντίθεσης που δημιουργείται λαμβάνουμε σημαντικές βιολογικές και λειτουργικές πληροφορίες για το δείγμα. Η σκέδαση αποτελεί πρόβλημα για πολλές τεχνικές απεικόνισης, όχι όμως για την φωτοακουστική βιοϊατρική, που ξεπερνά το όριο λόγω σκέδασης, δίνει την δυνατότητα απεικόνισης σε πραγματικό χρόνο και έχει βελτιωμένο βάθος απεικόνισης [5].

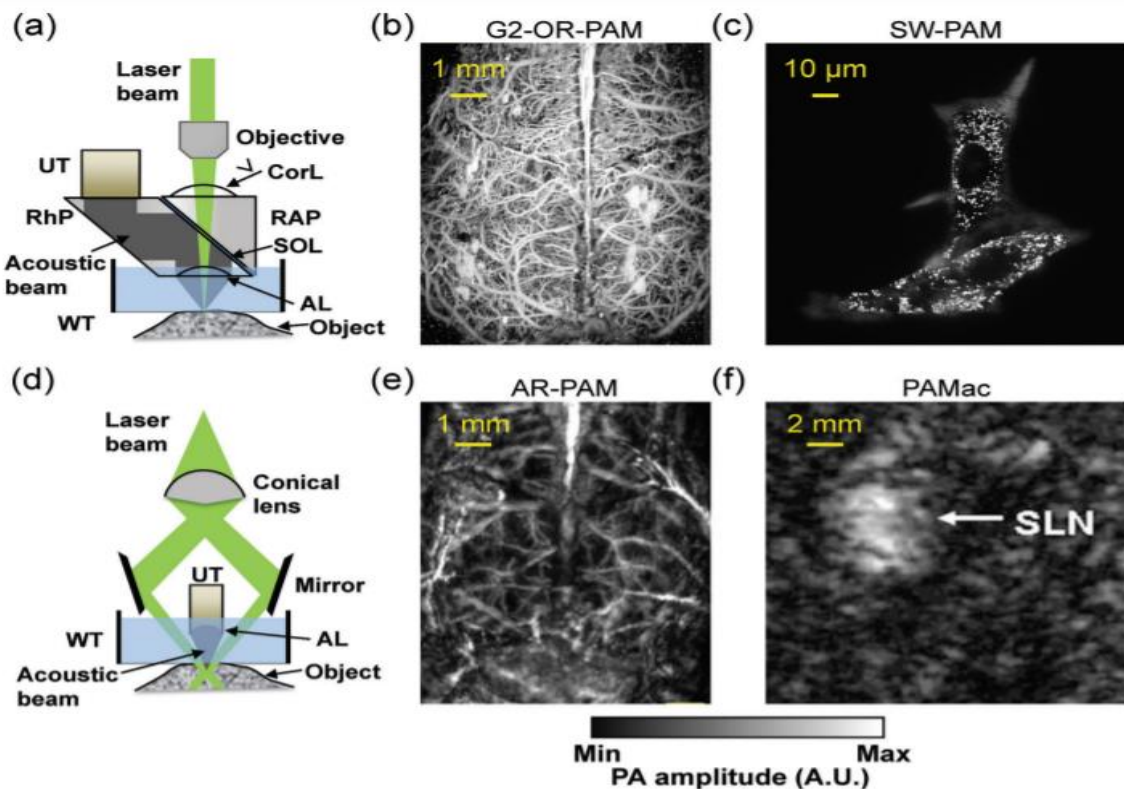
### 1.4 Φωτοακουστική μικροσκοπία οπτικής ανάλυσης (OR-PAM) και ακουστικής ανάλυσης (AR-PAM)

Ενώ η αξονική ανάλυση της φωτοακουστικής μικροσκοπίας καθορίζεται κυρίως από το βάθος απεικόνισης και την συχνότητα απόκρισης του υπερηχητικού transducer, η πλευρική ανάλυση καθορίζεται από την συνδυαστική point spread κατανομή των διπλών εστιών.

Η PAM διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες: την PAM οπτικής ανάλυσης (OR-PAM), όπου η οπτική εστίαση είναι πολύ στενότερη από την ακουστική εστίαση, και την PAM ακουστικής ανάλυσης (AR-PAM), όπου η ακουστική εστίαση είναι στενότερη. Αυτός ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το πόσο καλά εστιασμένη είναι η δέσμη του λέιζερ αλλά και ο ανιχνευτής των ηχητικών κυμάτων σε σχέση με αυτή [8].

Στο όριο της οπτικής διάχυσης η OR-PAM έχει πλεονεκτική θέση έναντι της AR-PAM σε χωρική ανάλυση, επειδή η δέσμη μπορεί να εστιαστεί σε ένα πολύ στενό σημείο χάρη στα μικρά οπτικά κύματα, σε αντίθεση με την ακουστική ανίχνευση. Ωστόσο, πέρα από το όριο διάχυσης η AR-PAM

μπορεί να πετύχει καλύτερη εστίαση εκμεταλλευόμενη την αδύναμη ακουστική σκέδαση. Συνεπώς, και οι δύο τεχνικές είναι εξίσου χρήσιμες αναλόγως το δείγμα και το είδος της διάγνωσης [8],[16].



Εικ. 3 α) Δεύτερης γενιάς οπτικής ανάλυσης φωτοακουστική μικροσκοπία (G2-OR-PAM) όπου η πλευρική ανάλυση καθορίζεται από την περιορισμένη λόγω περίθλασης οπτική εστίαση. AL: ακουστικός φακός, CorL: correction lens, RAP: δεξιά στραμμένο πρίσμα, RhP: ρομβοειδές πρίσμα, SOL: στρώμα ελαίου σιλικόνης, UT: υπερηχητικός transducer, WT: δεξαμενή νερού. β) G2-OR-PAM εγκεφαλικών αγγείων σε ζωντανό αρουραίο με αφαίρεση του δέρματος της κεφαλής αλλά διατηρώντας το κρανίο ανέπαφο. γ) SW-PAM (Sub-Wavelength Photoacoustic Microscopy) σε ένα κύτταρο μελανώματος, όπου διαφορετικά μελανοσώματα μπορούν να διακριθούν. δ) Σκοτεινού πεδίου AR-PAM. ε) AR-PAM σκοτεινού πεδίου εγκεφαλικών αγγείων σε ζωντανό αρουραίο με το δέρμα της κεφαλής και το κρανίο ανέπαφο. ς) PAMac (Deep photoacoustic macroscopy) του sentinel λεμφικού αδένα (SLN) σε έναν ζωντανό αρουραίο. [16]

### Πλευρική ανάλυση

Όπως και στην συνεστιακή μικροσκοπία, η OR-PAM μπορεί να τεθεί σε λειτουργία ανάκλασης, μετάδοσης ή διπλής ακτινοβολίας, ανάλογα με την επιθυμητή εφαρμογή. Συνήθως η δέσμη laser είναι στενά εστιασμένη, με διάμετρο από αρκετές εκατοντάδες nm έως αρκετά mm, ανάλογα με το αριθμητικό άνοιγμα (NA) του οπτικού φακού εστίασης, το μήκος κύματος της δέσμης διέγερσης και



το επιθυμητό βάθος απεικόνισης. Συγκεκριμένα στην OR-PAM, η δέσμη του λέιζερ είναι καλύτερα εστιασμένη άρα επιτυγχάνεται υψηλή ανάλυση (~ 1 μm) αλλά μικρό βάθος διείσδυσης (~ 1 mm). Ενδεικτικά, έχει επιτευχθεί ανάλυση έως και 220 nm σε μέγιστο βάθος 100 μm [16].

Η εικόνα 3a δείχνει ένα χαρακτηριστικό σύστημα 2<sup>ης</sup> γενιάς OR-PAM σε λειτουργία ανάκλασης. Ένα παλμικό nanosecond laser είναι στενά εστιασμένο στον ιστό από έναν αντικειμενικό φακό. Ένας οπτικοακουστικός συνδυαστής δέσμης που αποτελείται από ένα στρώμα ελαίου σιλικόνης μεταξύ δύο πρισμάτων χρησιμοποιείται για την ομοαξονική και ομοεστιακή ευθυγράμμιση της οπτικής ακτινοβολίας και της ακουστικής ανίχνευσης [16].

Τα υπερηχητικά κύματα που προκύπτουν εστιάζονται αρχικά από έναν κοίλο ακουστικό φακό στο κάτω μέρος του συνδυαστή (numerical aperture: 0.44) και ύστερα ανιχνεύονται από έναν υπερηχητικό transducer ευρέος φάσματος (central frequency: 50 MHz) που βρίσκεται στην επιφάνεια του πρίσματος. Ένας διορθωτικός φακός προστίθεται, ώστε να αντισταθμίσει την οπτική απόκλιση του πρίσματος.

Εφόσον η διάμετρος του ακουστικού φακού (~45μm) είναι πάνω από δέκα φορές μεγαλύτερη από αυτή του σημείου οπτικής εστίασης, η ευαισθησία ανίχνευσης μέσα στην περιοχή εστίασης είναι σχεδόν ομογενής. Συνεπώς, η πλευρική ανάλυση  $RL_{OR}$  του OR-PAM δίνεται από το (περιορισμένο λόγω περίθλασης) μέγεθος κηλίδας της οπτικής εστίας, σύμφωνα με τη σχέση:

$$RL_{OR}=0.51\frac{\lambda_0}{NA_0} \quad (1)$$

Όπου  $\lambda_0$ : το οπτικό μήκος κύματος και  $NA_0$ : το αριθμητικό άνοιγμα του φακού εστίασης. Η  $RL$  είναι η ελάχιστη απόσταση για την οποία δύο σημειακά αντικείμενα μπορούν να διακριθούν.

Η σταθερά 0.51 αντικατοπτρίζει το full width at half maximum (FWHM) του σημείου οπτικής εστίασης σε ένταση φωτός. Η μείωση της  $RL_{OR}$ , δηλαδή η βελτίωση της εστίασης, μπορεί να επιτευχθεί είτε αυξάνοντας το  $NA_0$  του αντικειμενικού φακού, είτε χρησιμοποιώντας ένα μικρότερο μήκος κύματος διέγερσης, μειώνοντας όμως το μέγιστο βάθος απεικόνισης. Η πλευρική ανάλυση του OR-PAM μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω με την χρήση ενός αντικειμενικού φακού εμβαπτισμένου σε λάδι με μέγιστη πειραματική τιμή αριθμητικού ανοίγματος  $NA_0=1.6$ . Η OR-PAM μπορεί να διακρίνει τα βασικά εγκεφαλικά τριχοειδή αγγεία σε έναν ζωντανό αρουραίο με αφαίρεση του δέρματος της κεφαλής αλλά διατηρώντας το κρανίο ανέπαφο [16].

Σε αντίθεση με την OR-PAM, η AR-PAM τυπικά χρησιμοποιείται στη λειτουργία ανάκλασης, καθώς είναι σχεδιασμένη κυρίως για πυκνά δείγματα. Η εικόνα 3d δείχνει ένα αντιπροσωπευτικό σύστημα AR-PAM ανάκλασης σκοτεινού πεδίου. Στο AR-PAM, όπου ο ανιχνευτής είναι καλύτερα

εστιασμένος σε μια περιοχή, επιτυγχάνεται χαμηλότερη ανάλυση (~25 μm) αλλά υψηλό βάθος διείσδυσης (~3-4 mm). Δεδομένου ότι η ακουστική σκέδαση είναι πολύ πιο αδύναμη από την οπτική σκέδαση στον ιστό, η στενή ακουστική εστίαση μπορεί να διατηρηθεί σε βάθος. Αν και η ακουστική σκέδαση είναι ασθενής στον ιστό, τα σήματα υπερήχων υψηλής συχνότητας υφίστανται ισχυρή εξασθένηση.

Η δέσμη laser από μία πολυλειτουργική οπτική ίνα περνά διαμέσω ενός κωνικού φακού και αποδίδει ένα μοτίβο ακτινοβολίας σε σχήμα δακτυλίου. Η δέσμη στη συνέχεια εστιάζεται ασθενώς στον ιστό, με την εστιακή περιοχή να επικαλύπτει ομοαξονικά την εστίαση ενός υπερηχητικού transducer τοποθετημένου στο σκοτεινό σημείο της ακτινοβολίας. Η ακουστική εστίαση επιτυγχάνεται με έναν κοίλο ακουστικό φακό στερεωμένο στην επιφάνεια του transducer. Αναλόγως με τον σχεδιασμό του συστήματος, εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένας γεωμετρικά εστιασμένος transducer. Η διαμόρφωση σκοτεινού πεδίου μπορεί να μειώσει σημαντικά τα επιφανειακά σήματα (για παράδειγμα από την μελανίνη στην επιφάνεια της επιδερμίδας του ανθρώπου) και διευκολύνει την συνεστιακή ευθυγράμμιση των οπτικοακουστικών κυμάτων. [16].

Επειδή η οπτική δέσμη ακόμη και σε απουσία σκέδασης (>2 mm) είναι πολύ πιο φαρδιά από την ακουστική εστίαση, η πλευρική ανάλυση  $RL_{AR}$  του AR-PAM δίνεται από την σχέση:

$$RL_{AR} = 0.71 \frac{\lambda_A}{NA_A} = 0.71 \frac{u_A}{NA_A \cdot f_A} \quad (2)$$

όπου  $NA_A$ : το αριθμητικό άνοιγμα του υπερηχητικού transducer,  $u_A$ : η ταχύτητα του ήχου στο μέσο,  $\lambda_A$ : το μήκος κύματος και  $f_A$ : η συχνότητα του φωτοακουστικού κύματος. Η σταθερά 0.71 είναι και σε αυτή την περίπτωση το σημείο FWHM του ακουστικού σημείου εστίασης σε ακουστικό πλάτος [16].

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι η σταθερά αυτή είναι περίπου  $\sqrt{2}$  φορές αυτή της σχέσης (1), αφού αντιπροσωπεύει το ακουστικό πλάτος αντί για την ένταση που ανιχνεύεται από τον transducer. Το σύστημα της εικόνας 3d έχει φτάσει την μέγιστη πλευρική ανάλυση  $RL_{AR} = 45 \mu m$  με μέγιστο βάθος απεικόνισης 3 mm χρησιμοποιώντας  $NA_A = 0.44$  και  $f_A = 50 \text{ MHz}$ . Η AR-PAM μπορεί να διακρίνει τα βασικά εγκεφαλικά τριχοειδή αγγεία σε έναν ζωντανό αρουραίο με ανέπαφο το δέρμα της κεφαλής αλλά και το κρανίο.

Όπως φαίνεται και από την εξίσωση (2), η πλευρική ανάλυση του AR-PAM μπορεί να διαμορφωθεί ανάλογα με τις τιμές των  $f_A$  και  $NA_A$ . Συνήθως, με παλμικές διεγέρσεις nanoseconds η  $f_A$  εξαρτάται αρκετά από την ακουστική απόσβεση στον ιστό. Η συχνότητα του υπερηχητικού transducer επιλέγεται ώστε να ταιριάζει με την ανιχνεύσιμη συχνότητα σήματος. Παρ' όλο που τα κύματα υψηλών συχνοτήτων προσφέρουν γραμμική πλευρική ανάλυση, αποσβαίνουν γρηγορότερα, οδηγώντας σε πιο

ρηγό βάθος απεικόνισης. Μία τυπική τιμή της ακουστικής απόσβεσης συναρτήσει των συχνοτήτων είναι  $0.6 \text{ dB cm}^{-1} \text{ MHz}^{-1}$  στον μαλακό ιστό. Αντιθέτως, οι χαμηλών συχνοτήτων υπέρηχοι προσφέρουν μεγαλύτερο βάθος. Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας έναν transducer 5 MHz, η φωτοακουστική μικροσκοπία μεγάλου βάθους διεξόδου (PAMac) μειώνει την πλευρική ανάλυση σε 560  $\mu\text{m}$  και επεκτείνει το βάθος απεικόνισης σε μερικά εκατοστά (εικόνα 3f) [16].

Η πλευρική ανάλυση της PAM είναι καλύτερη στο βάθος που αντιστοιχεί στην εστία του αντικειμενικού φακού για την OR-PAM, ή του ακουστικού φακού για την AR-PAM. Στα δύο άκρα της ζώνης εστίασης, η πλευρική ανάλυση μειώνεται κατά  $\sqrt{2}$  λόγω της περίθλασης. Η ζώνη εστίασης για την OR-PAM μπορεί να υπολογιστεί ως:

$$Z_{\text{OR}} = \frac{1.8\lambda_{\text{O}}}{NA_{\text{O}}^2} \quad (3)$$

Η ζώνη εστίασης για την AR-PAM μπορεί να βρεθεί από τη σχέση:

$$Z_{\text{AR}} = \frac{2.4\lambda_{\text{A}}}{NA_{\text{A}}^2} \quad (4)$$

Στο τέλος της ζώνης εστίασης, η πλευρική ανάλυση μειώνεται κατά έναν παράγοντα 2. Οι σταθερές στις δύο εξισώσεις (3) και (4) διαφέρουν επειδή η πρώτη βασίζεται στην ένταση του φωτός και η δεύτερη στο ακουστικό πλάτος. Για να επιτευχθεί υψηλή πλευρική ανάλυση για μία διευρυμένη κλίμακα βάθους, η σάρωση βάθους μπορεί να χρησιμοποιηθεί, υποβιβάζοντας όμως την ταχύτητα της απεικόνισης [16].

### Αξονική ανάλυση

Η αξονική ανάλυση τόσο στο OR-PAM όσο και στο AR-PAM παραμένει ίδια, καθώς εξαρτάται από την ταχύτητα του ήχου στο μέσο διάδοσης και από το εύρος των συχνοτήτων που μπορεί να ανιχνεύσει ο ανιχνευτής υπέρηχων.

Η αξονική ανάλυση της OR-PAM και της AR-PAM μοιράζονται την ίδια σχέση:

$$R_{\text{A,OR/AR}} = \frac{0.88u_{\text{A}}}{\Delta f_{\text{A}}} \quad (5),$$

που βασίζεται στην υπόθεση ότι η φωτοακουστική απόκριση σε έναν σημειακό στόχο ακολουθεί μία γκαουσιανή κατανομή συχνοτήτων. Το  $\Delta f_{\text{A}}$  είναι το εύρος ζώνης (bandwidth) του φωτοακουστικού σήματος, το οποίο είναι κατά προσέγγιση το εύρος ζώνης ανίχνευσης του υπερηχητικού transducer και είναι συχνά ανάλογο της κεντρικής συχνότητας  $f_{\text{A}}$ .

Αυτό, όμως, βασίζεται στην υπόθεση ότι το εύρος ζώνης του φωτοακουστικού σήματος είναι πολύ πιο φαρδύ από το εύρος ζώνης ανίχνευσης. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, οι υψηλές συχνότητες των ακουστικών κυμάτων αποσβαίνουν γρηγορότερα από τις χαμηλές συχνότητες, και συνεπώς το εύρος ζώνης του φωτοακουστικού κύματος μειώνεται με το βάθος απεικόνισης, συντελώντας σε χαμηλότερη αξονική ανάλυση στα μεγαλύτερα βάθη. Χρησιμοποιώντας υπερηχητικούς transducers με μία κεντρική συχνότητα 50 MHz και ένα one-way -6 dB bandwidth of 100%, G2-OR-PAM στην εικόνα 3a και σκοτεινού πεδίου AR-PAM στην εικόνα 3d έχουν φτάσει στην ίδια αξονική ανάλυση των 15  $\mu\text{m}$ , παρά τις διαφορετικές τους πλευρικές αναλύσεις [16].

Εκτός από τους συμβατικούς πιεζοηλεκτρικούς transducers ευρείας ζώνης, μία λεπτή ταινία μικροδακτυλίου ενισχυτή σήματος έχει χρησιμοποιηθεί για οπτική ανίχνευση ακουστικών κυμάτων σε OR-PAM σύστημα. Το ακουστικό εύρος ζώνης του ενισχυτή μπορεί να φτάσει πιθανώς μέχρι 1 GHz, που οδηγεί σε μία αξονική ανάλυση  $\sim 2 \mu\text{m}$  θυσιάζοντας όμως το βάθος διείσδυσης. Παρομοίως, μία ταινία υπερηχητικού αισθητήρα πολυμερούς Fabry-Perot με ακουστικό εύρος ζώνης 100 MHz έχει διερευνηθεί για χρήση στην OR-PAM, φτάνοντας μία αξονική ανάλυση των 10  $\mu\text{m}$ .

Αυτές οι τεχνικές στο πεδίο του χρόνου συνήθως απαιτούν ογκώδεις και κοστοβόρες διατάξεις. Χρειάζεται επίσης εκπαιδευμένο προσωπικό για την χρήση και την συντήρησή τους καθώς και ελεγχόμενο περιβάλλον για την λήψη έγκυρων αποτελεσμάτων. Επιπλέον υπάρχει άνω όριο στην λήψη εικόνων, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει μικρό εύρος μηκών κύματος. Τα προβλήματα αυτά έχουν επηρεάσει την υιοθέτηση της φωτοακουστικής μικροσκοπίας και τομογραφίας στην κλινική εξέταση. Βασικός στόχος επομένως είναι η λήψη εικόνων με υψηλή ταχύτητα, υψηλή ανάλυση και φθηνές λύσεις κατασκευής [10].

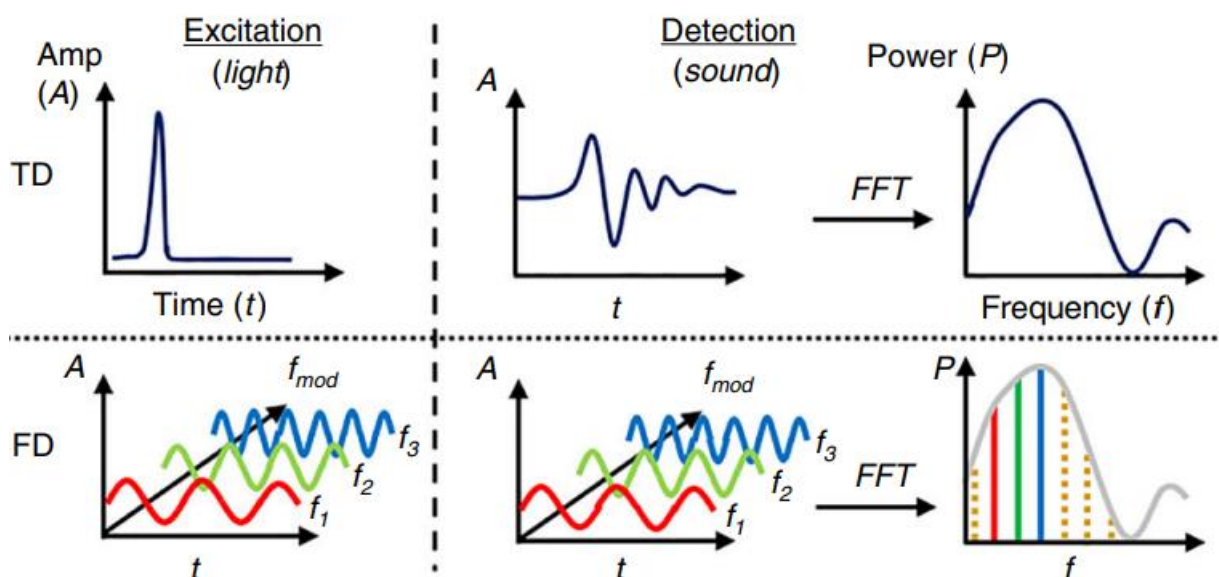
Προκειμένου να αναπτυχθούν τέτοια συστήματα, απαιτείται η χρήση των συνεχούς εκπομπής (CW) lasers έναντι των παλμικών που χρησιμοποιούνται ως επί των πλείστον στην φωτοακουστική μικροσκοπία. Συγκεκριμένα τα CW lasers είναι φθηνά, έχουν μεγάλο εύρος μηκών κύματος και δεν υπάρχει κανένας περιορισμός στην λήψη εικόνων. Τα lasers αυτά, ωστόσο, δεν καλύπτουν την ανάγκη για περιοδική ακτινοβολία του δείγματος [10].

Για την κάλυψη αυτής της ανάγκης προτείνεται η χρήση ενός ακουστοοπτικού μετατροπέα (AOM), ο οποίος διαμορφώνει το φως περιοδικά. Ο AOM αποτελείται από έναν ανιχνευτή υπερήχων, έναν κρύσταλλο και έναν ακουστικό απορροφητή. Η λειτουργία του βασίζεται στο φωτοελαστικό φαινόμενο. Συγκεκριμένα, η μηχανική πίεση προκαλεί μεταβολές στην πυκνότητα του κρυστάλλου, οι οποίες παραμορφώνουν το υλικό και οδηγούν τελικά στην μεταβολή του δείκτη διάθλασής του. Ο πιεζοηλεκτρικός ανιχνευτής συνδέεται με τον κρύσταλλο, τίθεται σε λειτουργία με μία πηγή παραγωγής ηλεκτρομαγνητικών παλμών και ξεκινά να δονείται.

Αυτές οι δονήσεις μεταφέρονται στον κρύσταλλο και έτσι παράγονται τα ακουστικά κύματα. Στο άκρο του κρυστάλλου, ένας απορροφητής συλλέγει τα κύματα αυτά. Έτσι δημιουργείται μία περιοδική μεταβολή της μηχανικής πίεσης και συνεπώς μία περιοδική μεταβολή του δείκτη διάθλασης του κρυστάλλου.

## 1.5 Φωτοακουστική μικροσκοπία OR-PAM στο πεδίο χρόνου και στο πεδίο συχνοτήτων

Η πιο συνήθης μέθοδος φωτοακουστικής μικροσκοπίας είναι στο πεδίο του χρόνου (time domain - TD) με ημιτονοειδή διαμόρφωση παλμικών lasers. Η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα λήψης εικόνων με υψηλή αναλογία σήματος προς θόρυβο (signal to noise ratio - SNR) λόγω της διέγερσης των δειγμάτων με εξαιρετικά σύντομους παλμούς υψηλής ενέργειας. Στη συνέχεια θα αναλυθεί η διαφορετική μέθοδος OR-PAM, αυτή στο πεδίο των συχνοτήτων (frequency domain - FD) και οι διαφορές μεταξύ των δύο τεχνικών. Γενικά, η αποτελεσματική παραγωγή φωτοακουστικών σημάτων απαιτεί να πληρούνται οι συνθήκες απομόνωσης θερμότητας και πίεσης [3], [10].



Εικ. 4) Σχηματική σύγκριση μεταξύ οπτοακουστικής μικροσκοπίας στο πεδίο του χρόνου (TD) και στο πεδίο των συχνοτήτων (FD) [4].

Η ανάλυση στο πεδίο του χρόνου δείχνει πώς αλλάζει το σήμα με την πάροδο του χρόνου. Αντιθέτως, η ανάλυση στο πεδίο των συχνοτήτων δείχνει πώς κατανέμεται το σήμα σε διαφορετικές συχνότητες από ένα επιλεγμένο φάσμα συχνοτήτων.

Για έναν παλμό στο πεδίο του χρόνου η ένταση δίνεται από τη σχέση:

$$I(t) = \frac{E}{\theta} f(t/\theta), (1)$$

όπου  $E$ : η ροή,  $t$ : ο χρόνος και  $\theta$ : η παράμετρος πλάτους του παλμού. Έτσι δίνεται η προκύπτουσα πίεση ως:

$$p(t) = \frac{\sigma\beta 1}{4\pi c_p r} \cdot \frac{E}{\theta^2} \cdot \frac{d}{d\hat{t}} f(\hat{t}) \quad (2)$$

όπου  $\beta 1$ : ο πρώτος συντελεστής στο ανάπτυγμα της σειράς του συντελεστή θερμικής διαστολής,  $\sigma$ : η οπτική τομή του μελετούμενου σωματιδίου,  $c_p$ : η ειδική θερμοχωρητικότητα,  $r$ : η απόσταση μεταξύ πηγής και ανιχνευτή, και  $\hat{t} = \frac{t - r/c}{\theta}$ , με το  $c$  να ορίζει την ταχύτητα του ήχου [3].

Στη συνέχεια, παραλείπεται ο όρος  $\frac{\sigma\beta 1}{4\pi c_p r}$ , καθώς δεν επηρεάζει τη σύγκριση μεταξύ παλμικής και διαμορφωμένης διέγερσης και στόχος δεν είναι η ακριβής αριθμητική μέτρηση. Για παλμική διέγερση χρησιμοποιείται ένας παλμός με την Γκαουσιανή μορφή:

$$I_G(t) = \frac{E_G}{\tau_G \sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{t^2}{\tau_G^2}\right) \quad (3),$$

όπου  $E_G$  είναι η αντίστοιχη ροή και  $2\tau_G$  είναι η διάρκεια του παλμού, όπως ορίζεται στη μείωση της έντασης κατά  $1/e$ . Στη συνέχεια, βρίσκουμε την χρονικά εξαρτημένη πίεση για έναν Γκαουσιανό παλμό  $p_G(t)$  και τη μέγιστη τιμή της,  $p_{G,max} = \max\{p_G(t)\}$ , ως εξής:

$$P_G(t) \propto \frac{2tE_G}{\tau_G^3 \sqrt{\pi}} \exp\left(-\frac{t^2}{\tau_G^2}\right) \quad (4), \quad P_{G,max} \propto \sqrt{\frac{2}{e\pi}} \frac{E_G}{\tau_G^2} \quad (5).$$

Για την περίπτωση του OR-PAM στο πεδίο συχνοτήτων χρησιμοποιείται ημιτονοειδής διαμόρφωση με μία ένταση της μορφής:

$$I_S(t) = I_0(1 + \sin(2\pi f_S t)) \quad (6),$$

όπου,  $I_0$  είναι η μέση οπτική ένταση και  $f_S$  η συχνότητα διαμόρφωσης.

Η ένταση μπορεί να ξαναγραφτεί ως:

$$I_S(t) = \frac{E_S}{2\pi\tau_S} (1 + \sin(t/\tau_S)) \quad (7)$$

$$\text{με } \tau_S = 1/(2\pi f_S) \text{ και } E_S = I_0/f_S \text{ [3].}$$

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση (2), καταλήγουμε στην εξίσωση της παραγόμενης πίεσης  $p_S(t)$  και τη μέγιστη τιμή της,  $p_{S,max}$  ως:

$$p_S(t) \propto 2\pi f_S^2 E_S \cos(2\pi f_S t) = 2\pi I_0 f_S \cos(2\pi f_S t) \quad (8), \quad p_{S,max}(t) \propto 2\pi I_0 f_S \quad (9)$$

Αν το laser που χρησιμοποιείται έχει αντιστάθμιση λόγω CW, τότε η μέση ένταση  $I_0$  μπορεί να υπολογιστεί αφαιρώντας αυτή την αντιστάθμιση,  $I_{cw}$ , από την ολική μέση ένταση,  $I_{0t}$ .

$$I_0 = I_{0t} - I_{cw} \quad (10)$$

Η ολική μέση ένταση  $I_{0t}$  μπορεί να υπολογιστεί πειραματικά με ένα δυναμόμετρο.

Τέλος, μπορεί να υπολογιστεί ο λόγος της μέγιστης παραγόμενης πίεσης για παλμικά και ημιτονοειδή κύματα διαιρώντας τις σχέσεις (5) και (9).

$$\frac{P_{G,max}}{P_{S,max}} = \sqrt{\frac{1}{2\pi e} \cdot \frac{1}{\pi} \cdot \frac{E_G}{I_0} \cdot \frac{1}{t_G^2 \cdot f_S}} \approx \frac{1}{4\pi} \cdot \frac{E_G}{I_0} \cdot \frac{1}{t_G^2 \cdot f_S} \quad (11)$$

Στα πλαίσια της έρευνας μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχει το SNR (signal to noise ratio) που προκύπτει με τις δύο τεχνικές [10], [16]. Το SNR δίνεται από τη σχέση:  $SNR_G = p_{G,max} \cdot \xi / NEP$  (12), όπου ο παράγοντας  $\xi$  περιγράφει την επίδραση του transducer στο σημείο της μέγιστης πίεσης και NEP είναι η ισοδύναμη πίεση θορύβου (noise equivalent pressure). Επιπλέον με την χρήση μίας lock-in τεχνικής το SNR μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά στην περίπτωση της ημιτονοειδούς διαμόρφωσης. Αφού ο θόρυβος αυξάνεται με την τετραγωνική ρίζα του bandwidth, εκτιμάται η βελτίωση του SNR κατά:

$$\chi = \sqrt{\frac{B_{Det}}{B_{LIA}}} \quad (13),$$

όπου  $B_{Det}$  είναι το εύρος ζώνης υπερηχητικής ανίχνευσης και  $B_{LIA} = \frac{1}{2\pi t_{LIA}}$  είναι η ζώνη εύρους της lock-in ανίχνευσης [3].

Για την ημιτονοειδή διαμόρφωση, το SNR υπολογίζεται από τη σχέση  $SNR_S = p_{S,max} \cdot \chi / NEP$  (14), όπου NEP η ισοδύναμη πίεση θορύβου. Προκειμένου να βρεθεί ο λόγος των SNR της παλμικής και της ημιτονοειδούς διαμόρφωσης, υποθέτουμε ότι το NEP είναι το ίδιο και για τις δύο και ο λόγος τους προκύπτει ίσος με:

$$\frac{SNR_G}{SNR_S} = \frac{P_{G,max} \cdot \xi}{NEP} \cdot \frac{NEP}{P_{S,max} \cdot \chi} \approx \frac{1}{4\pi} \cdot \frac{E_G}{I_0} \cdot \frac{1}{t_G^2 \cdot f_S} \cdot \frac{\xi}{\chi} \quad (15)$$

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι υπολογισμοί για διαφορετικές πειραματικές τιμές της συχνότητας διαμόρφωσης και του χρόνου ολοκλήρωσης του lock-in. Αυτοί οι υπολογισμοί έγιναν με την υπόθεση ότι και στις δύο μεθόδους διέγερσης τα όρια του MPE (maximum permissible exposure), δηλαδή της μέγιστης επιτρεπτής έκθεσης, δεν ξεπεράστηκαν, η φωτοκαταστροφή ήταν χαμηλή και το θερμικό stress ήταν συγκρίσιμο και στις δύο μεθόδους [3].

## SNR ratios for 4ns pulsed excitation and sinusoidal modulation

$f_s$	$\tau_{LIA}$	$SNR_G/SNR_S$	$SNR_S/SNR_G$
5 MHz	10 ms	45	0.022
100 MHz	10 ms	2.3	0.44
100 MHz	1 ms	1.3	0.78

Οι τιμές του MPE για το δέρμα και ένα μήκος κύματος 405 nm είναι  $200 \text{ J/m}^2$  για παλμική διέγερση και  $1.1 \times (\tau/\text{sec})^{0.25} \text{ J/m}^2$  για ημιτονοειδή διέγερση, όπου ως  $\tau$  εκφράζεται ο χρόνος έκθεσης σε sec. Η μέγιστη ένταση για την περίπτωση της ημιτονοειδούς διαμόρφωσης,  $I_{0,\max}$ , δίνεται από την σχέση:

$$I_{0,\max} = 1.1 \cdot 10^4 \times (\tau/\text{sec})^{-0.75} \text{ W/m}^2 \quad (16)$$

Για τους υπολογισμούς αυτούς η τιμή του  $\xi$  επιλέχθηκε να είναι 1/20, όπως εκτιμήθηκε από τον transducer που χρησιμοποιήθηκε, και το εύρος ζώνης ανίχνευσης να είναι διπλάσιο της κεντρικής συχνότητας του transducer, δηλαδή στα 100 MHz. Για τυπικές τιμές της συχνότητας διαμόρφωσης στα 5 MHz και έναν χρόνο ενσωμάτωσης 10 ms το SNR της παλμικής διέγερσης είναι περίπου 45 φορές καλύτερο από αυτό της ημιτονοειδούς διέγερσης [3].

Το SNR της ημιτονοειδούς περίπτωσης μπορεί να βελτιωθεί με την χρήση ταχύτερης διαμόρφωσης laser. Με μία συχνότητα διέγερσης στα 100 MHz, το SNR της ημιτονοειδούς μορφής αναμένεται να είναι μόνο κατά έναν παράγοντα 2 χαμηλότερο από αυτό της παλμικής. Μία επιπλέον βελτίωση του λόγου SNR υπέρ της ημιτονοειδούς διαμόρφωσης είναι δυνατή μειώνοντας τον χρόνο ενσωμάτωσης και επιταχύνοντας την σάρωση, καθώς το SNR είναι ανάλογο της έντασης του laser αλλά αντιστρόφως ανάλογο της ρίζας του εύρους ζώνης της lock-in ανίχνευσης,  $B_{LIA}$ .

Η μείωση του χρόνου σε 1 ms και η διατήρηση της συχνότητας στα 100 MHz οδηγούν σε ένα SNR συγκρίσιμο με αυτό της παλμικής διέγερσης. Για την χρήση συχνοτήτων στα χαμηλότερα MHz μπορούν να αξιοποιηθούν transducers με χαμηλότερη κεντρική συχνότητα. Τέτοιοι transducers είναι διαθέσιμοι με μεγαλύτερο μέγεθος και έχουν καλύτερη απόκριση τάσης-πίεσης. Με έναν τέτοιο transducer το SNR εκτιμάται πως είναι καλύτερο για την ημιτονοειδή περίπτωση. Χρησιμοποιώντας έναν transducer ενίσχυσης, το SNR για την ίδια περίπτωση μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά [3].



## 1.6 Εφαρμογές φωτοακουστικής μικροσκοπίας στην βιοϊατρική

Μέχρι τώρα διαφορετικές μέθοδοι απεικόνισης, συμπεριλαμβανομένης της US imaging, MRI, X-ray CT και PET έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται ενεργά. Η φωτοακουστική μικροσκοπία (PAM) ή γενικότερα η φωτοακουστική απεικόνιση (PAI), όταν εισάγεται συμπληρωματικά στις μεθόδους αυτές, δίνει πολλά σημαντικά πλεονεκτήματα. Το PAI είναι προτιμότερο έναντι του US imaging καθώς μπορεί να δώσει όχι μόνο μορφολογικές αλλά και λειτουργικές πληροφορίες. Ακόμη, το PAI έχει ελάχιστους περιορισμούς για τους ασθενείς συγκριτικά με το MRI (π.χ. δεν επιτρέπει την παρουσία μεταλλικών ιατρικών συσκευών στο σώμα του ασθενούς). Άλλο ένα πλεονέκτημα της χρήσης PAI συστημάτων είναι η μη-ιονίζουσα ακτινοβολία που απαιτείται για αυτή τη μέθοδο, σε αντίθεση με την ιονίζουσα ακτινοβολία του CT. Η φωτοακουστική απεικόνιση μπορεί να εφαρμοστεί απλώς με την χρήση ενδογενών χρωμοφόρων χάρη στην αντίθεση λόγω απορρόφησης από τον ιστό, ενώ τεχνικές όπως η PET απαιτούν την λήψη ραδιοισοτόπων από τον ασθενή, επιβαρύνοντας έτσι την υγεία του [12]. Παρακάτω παραθέτονται κάποιες αντιπροσωπευτικές εφαρμογές της φωτοακουστικής μικροσκοπίας στο πεδίο των συχνοτήτων.

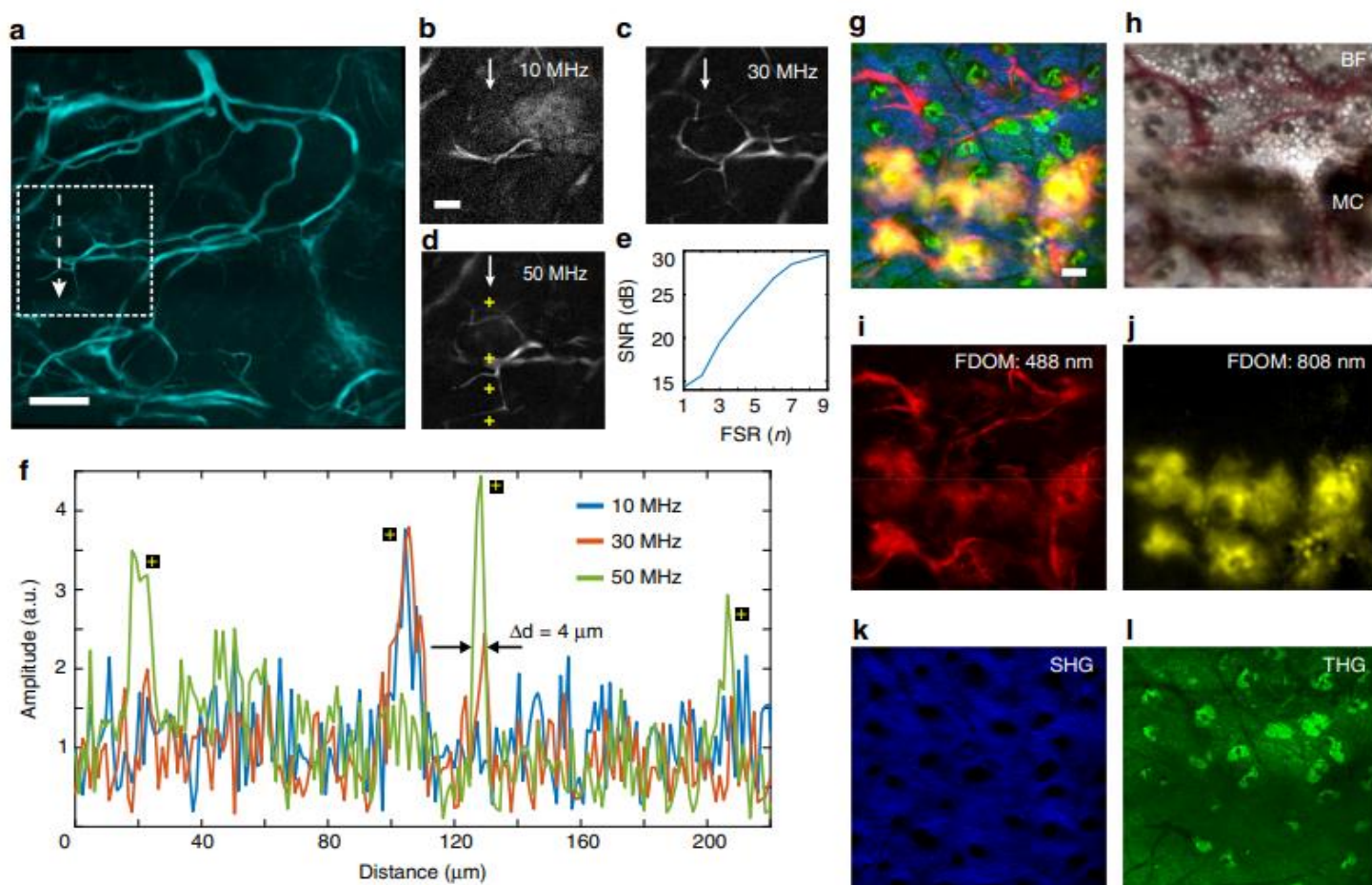
Η πρώτη εφαρμογή αφορά ένα σύστημα φωτοακουστικού μικροσκοπίου στο πεδίο των συχνοτήτων που χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση ιστού *in vivo* στο αυτί ενός ποντικίου υπό αναισθησία (Hsd athymic nude foxn1), σε μήκος κύματος 488 nm χρησιμοποιώντας συχνότητες από 10 ως 50 MHz με βήμα 5 Hz. Ένα field of view (FOV)  $360 \times 360 \mu\text{m}^2$  σαρώθηκε με βήμα 1.2  $\mu\text{m}$ . Τα γειτονικά FOVs ενώθηκαν μαζί ώστε να σχηματιστεί μία συνολική περιοχή  $960 \times 960 \mu\text{m}^2$ , στην οποία διακρίνονταν οι διάμετροι των microvasculatures (μικρών τριχοειδών αγγείων) που διακυμαίνονταν από 4  $\mu\text{m}$  μέχρι και 33  $\mu\text{m}$  (Εικ. 5a) [4].

Οι εικόνες που ανακατασκευάστηκαν σε μοναδικές συχνότητες διαμόρφωσης (Εικ. 5b–d) αντιστοιχούν στην περιοχή σημειωμένη με ένα διακεκομμένο κουτί στο 5a, δείχνοντας μία σχέση μεταξύ της συχνότητας διαμόρφωσης και το μέγεθος των οπτικών απορροφητών στην εικόνα. Αποδείχθηκε πως οι εικόνες μοναδικής συχνότητας εμφανίζουν μόνο ένα μέρος από τα χαρακτηριστικά του απεικονιζόμενου αντικειμένου και αποτυγχάνουν στην ανακατασκευή μίας εικόνας υψηλής αξιοπιστίας που να περιλαμβάνει όλες τις δομές ενός αντικειμένου.

Συγκεκριμένα, μικροσκοπικές λεπτομέρειες όπως μικρά αγγεία ήταν ξεκάθαρα ορατά στην εικόνα 50 MHz (Εικ. 5d), όχι όμως σε εικόνες που λήφθηκαν στα 10 και 30 MHz (Εικ. 5b, c). Τα μεγαλύτερα αγγεία φάνηκαν πιο ομογενή σε εικόνες που λήφθηκαν στα 10 και 30 MHz σε σύγκριση με αυτές στα 50 MHz, με βάση την ανάλυση της Εικ. 5f. Αυτή η μέτρηση αποκαλύπτει επίσης τη σχέση μεταξύ χωρικής συχνότητας του αντικειμένου και της συχνότητας οπτικής διαμόρφωσης,

δείχνοντας ότι πολλαπλές συχνότητες διαμόρφωσης που συνδέονται με τις χωρικές συχνότητες του δείγματος είναι απαραίτητες για την ανάλυση μίας εικόνας χωρίς artifacts. Όπως ήταν αναμενόμενο, το SNR της εικόνας αυξήθηκε από  $\sim 14$  dB σε μία συχνότητα στα  $\sim 30$  dB με τη χρήση εννέα συχνοτήτων.

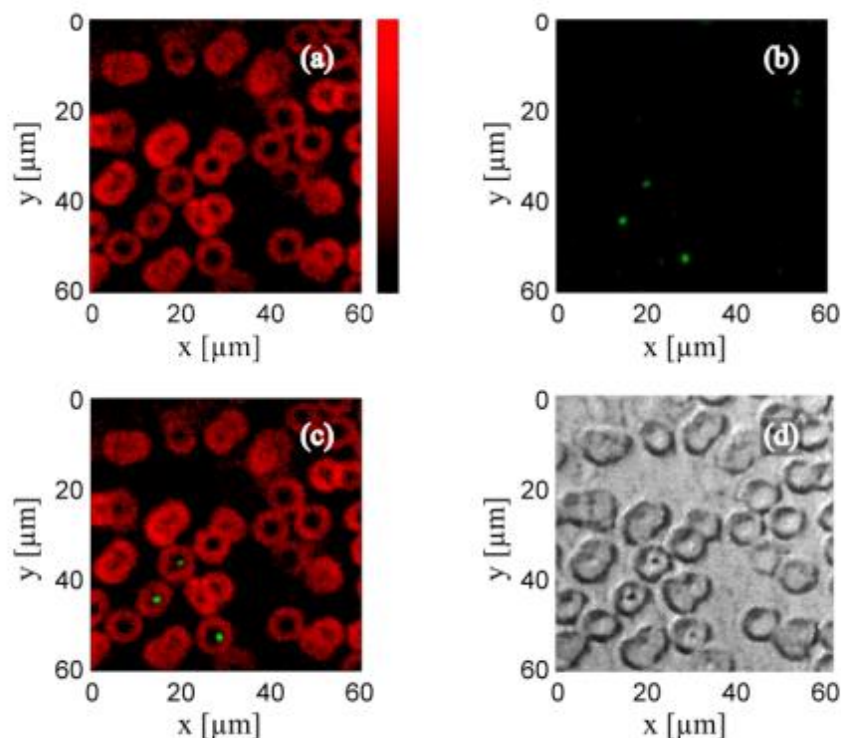
Επόμενο βήμα της έρευνας ήταν η *in vivo* απεικόνιση ενός αυτιού ποντικού που περιείχε B16F10 murine μεταστατικά κύτταρα μελανώματος μέσω ταυτόχρονης διέγερσης σε 2 μήκη κύματος (488 nm και 808 nm) κωδικοποιημένα σε διαφορετικές συχνότητες διαμόρφωσης, γεγονός που θα ήταν αδύνατο με τη χρήση PM στο πεδίο του χρόνου. Η απεικόνιση στα 488 nm είναι ευαίσθητη στα αιμοφόρα αγγεία χάρη στην υψηλή απορρόφηση αιμογλοβίνης, ενώ η απεικονιζόμενη κυτταρική γραμμή B16F10 αποκρίνεται σε μήκη κύματος του κοντινού υπέρυθρου. Η εμφάνιση των B16F10 κυττάρων μέσω FDOM ήταν αναμενόμενη στα 488 nm και στα 808 nm, χάρη στο επίπεδο φάσμα οπτικής απορρόφησης της μελανίνης που περιέχουν, ενώ η vasculature θα ήταν σχεδόν άρατη στα 808 nm λόγω της ασθενούς απορρόφησης αιμογλοβίνης στο κοντινό υπέρυθρο φως [4].



Εικ. 5) Απεικόνιση *in vivo* αυτιού ποντικού με FDOM μονού και διπλού μήκους κύματος.[4]

5a) FDOM απεικόνιση σε  $\lambda=488\text{ nm}$ . Η εικόνα ανακατασκευάστηκε από συνδυασμό 9 διαφορετικών συχνοτήτων σε εύρος 10 - 50 MHz. Scale bar: 150  $\mu\text{m}$ . b - d) Εικόνες στα 10, 30 και 50 MHz αντίστοιχα που παρουσιάζουν τις δομές στο διακεκομμένο κουτί στην εικόνα 4a. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . e) SNR ως συνάρτηση των  $n$  συχνοτήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανακατασκευή. f) Όψη προφίλ του διακεκομμένου κουτιού στο 4a που δείχνει τη σχέση μεταξύ της συχνότητας διαμόρφωσης και της ανάλυσης. Οι κίτρινοι σταυροί τονίζουν αυτή τη σχέση. Η διαμόρφωση στα 50 MHz δείχνει ξεκάθαρα μικρότερες δομές, μέχρι και 4  $\mu\text{m}$ , ενώ αυτή στα 10 MHz δεν μπορεί. g-l) Οι εικόνες SHG, THG και FDOM διπλού μήκους κύματος (g) δείχνουν εξαιρετική αντίθεση χωρίς δείκτες, επιτρέποντας έτσι την διαφοροποίηση των αγγείων και μελανοκυττάρων που φάνηκε με το FDOM 488 nm (i). h) Εικόνα φωτεινού πεδίου που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της υβριδικής απεικόνισης. j) Εικόνα FDOM στα 808 nm που αναδεικνύει τα B16F10 μελανοκύτταρα στο αυτί του ποντικιού. k) Εικόνα SHG που δείχνει την κατανομή κολλαγόνου στην επιδερμίδα. l) Εικόνα THG που δείχνει την μορφολογία των ιστών. [4]

Η δεύτερη εφαρμογή αφορά την χρήση FOR-PAM για την απεικόνιση ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ένα δείγμα αίματος.



Εικ. 6 a) Εικόνα FOR-PAM και b) φθορισμού ερυθρών αιμοσφαιρίων στο ανθρώπινο αίμα. c) Εικόνα επικάλυψης των δύο εικόνων a και b. d) Εικόνα μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου στην ίδια περιοχή [3].

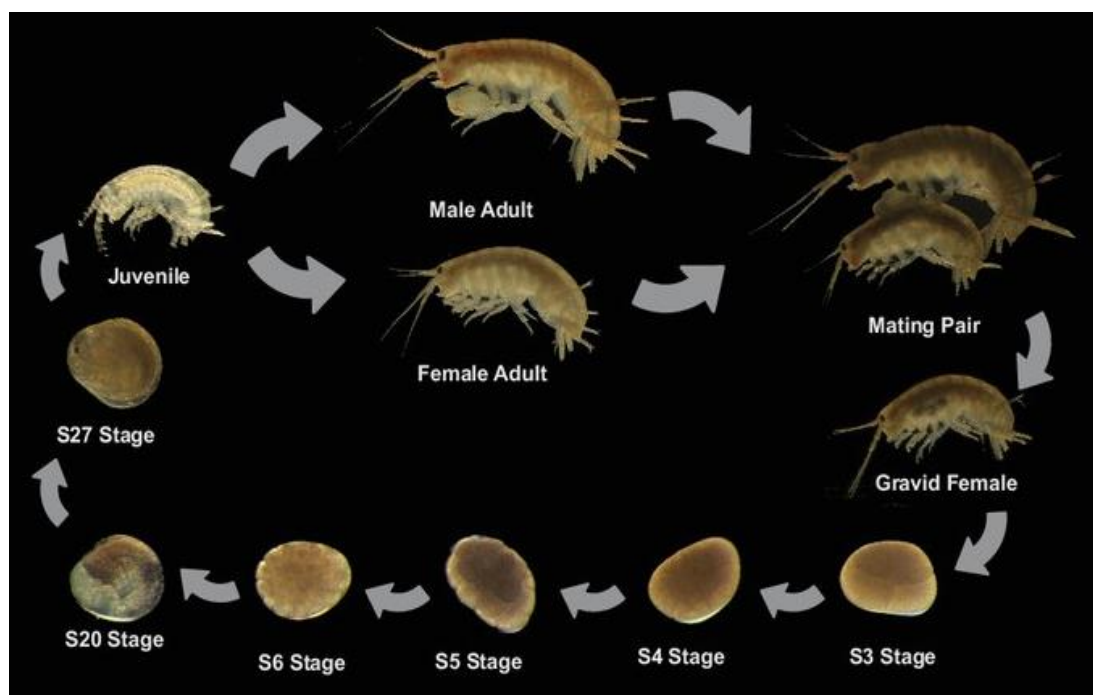
Η εικόνα 6 παρουσιάζει φωτοακουστικές μετρήσεις και μετρήσεις φθορισμού ενός δείγματος αίματος χωρίς βαφή. Η κηλίδα αίματος στέγνωσε με αέρα και στερεώθηκε με μεθανόλη σε μία διαφάνεια μικροσκοπίου. Το laser διέγερσης διαμορφώθηκε σε μία συχνότητα 10 MHz και η μέση ισχύς του laser πριν τον αντικειμενικό φακό ήταν 10 mW. Οι εικόνες φωτοακουστικής μικροσκοπίας και μικροσκοπίας φθορισμού καταγράφηκαν ταυτόχρονα. Οι εικόνες αυτές αποτελούνται από  $101 \times 101$  pixels μετρημένα σε μία περιοχή  $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ . Ο χρόνος λήψης εικόνων ήταν 300 s.

Στην εικόνα fOR-PAM 6a τα ερυθρά αιμοσφαίρια διακρίνονται ξεκάθαρα ως κόκκινοι δακτύλιοι. Στην εικόνα 6b φαίνεται η εικόνα φθορισμού. Εκεί διακρίνονται τρία έντονα σημεία φθορισμού. Η σύγκριση της εικόνας επικάλυψης της φωτοακουστικής εικόνας και αυτής του φθορισμού με την εικόνα μικροσκοπίας φωτεινού πεδίου (Εικ. 6(d)) δείχνει πως τα φωτεινά σημεία αντιστοιχούν στις δομές στο κέντρο των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

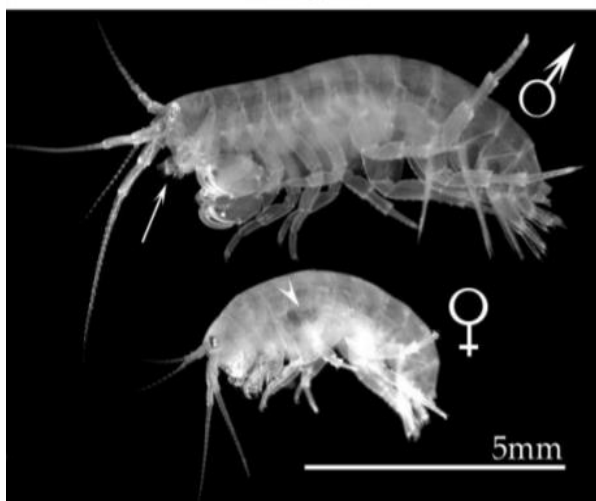
Τα ερυθρά αιμοσφαίρια συνήθως δεν εμφανίζουν φθορισμό. Πιθανόν τα φωτεινά σημεία να προκύπτουν από erythrocyte encapsulations, π.χ. από Heinz bodies. Παρ' όλ' αυτά δεν αποκλείεται ο φθορισμός αυτός να προκύπτει από μόλυνση ή artifacts. Το μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου μας δίνει πληροφορίες μόνο για την δομή του δείγματος, όχι όμως για τη χημική του σύσταση. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει την ανάγκη για πολυμορφική απεικόνιση και συνεπώς τη σημασία τόσο του FDOM αλλά και της μικροσκοπίας φθορισμού για τη χημική ανάλυση ενός δείγματος, γεγονός που το μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου αδυνατεί να επιτύχει.

## 2. Parhyale hawaiiensis

Το είδος *Parhyale hawaiiensis* είναι ένα αμφίποδο οστρακόδερμο που χρησιμοποιείται συχνά στην έρευνα και τη γενετική ανάλυση. Αποτελεί συχνά δείγμα για έρευνα καθώς τα έμβρυά του είναι εύκολα διαχειρίσιμα, διάφανα και διατηρούνται απλά σε ASW (Artificial Sea Water), δηλαδή διαλυμένο θαλασσινό αλάτι σε καθαρισμένο νερό με συγκέντρωση 34 g/l μέχρι να φτάσει σε ειδική βαρύτητα 1.022. Η in vivo απεικόνιση των ζωντανών εμβρύων είναι σημαντική για την αναγνώριση του σταδίου ανάπτυξης του οργανισμού πριν την οποιαδήποτε επεξεργασία [6].

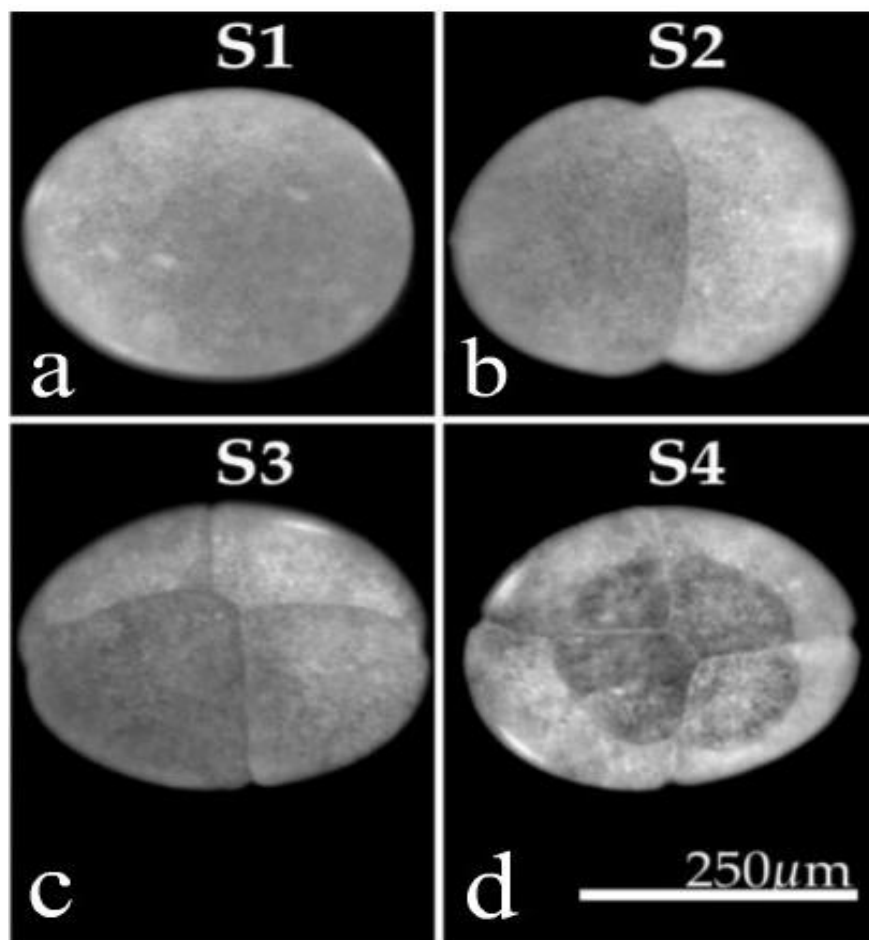


Εικ. 7) Τα στάδια ανάπτυξης του *Parhyale hawaiiensis*. [15]



Εικ. 8) Αντιπροσωπευτική εικόνα του αρσενικού (πάνω) και του θηλυκού (κάτω) ενήλικου *Parhyale hawaiiensis*. [7]

Εικ. 9) Έμβρυα *Parhyale hawaiensis* στα στάδια 1-4. a) S1, ένα ακέραιο κύτταρο. b) S2, δύο κύτταρα. c) S3, 4 κύτταρα. d) S4, έμβρυο με 8 κύτταρα [6]



Τα διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης κατηγοριοποιούνται ως εξής [6] :

S1 Stage 1 (0–4 h) 1 κύτταρο:

Κάθε ωοθήκη απελευθερώνει τα αυγά της σε έναν λεπτό σάκο που επεκτείνεται και διαλύεται μέσα σε δύο ώρες από την απελευθέρωσή τους. Αρχικά τα αυγά προσκολλώνται το ένα στο άλλο και είναι άμορφα, ενώ στη συνέχεια σκληραίνουν και αποκτούν ένα ελλειπτικό, ωοειδές σχήμα. Το χρώμα της λεκίθου (yolk) μπορεί να είναι καφέ, πράσινο, γκρι ή μωβ, και εξαρτάται από την διατροφή των ζώων.

S2 Stage 2 (4–6 h) 2 κύτταρα:

Η πρώτη αυλάκωση είναι πάντα ολική, μεσημβρινή (meridional cleavage) και πάντοτε κάθετη στον μεγάλο άξονα του αυγού. Η αυλάκωση είναι συνήθως ελαφρώς άνιση και οδηγεί σε ένα έμβρυο με δύο κύτταρα.

S3 Stage 3 (6–7.5 h) 4 κύτταρα:

Η δεύτερη αυλάκωση είναι ολική και κάθετη στον μεγάλο άξονα του αυγού και στον animal-vegetal άξονα. Είναι επίσης ελαφρώς ασύμμετρη και οδηγεί στα 4 κύτταρα του εμβρύου. Η δεύτερη

αυλάκωση ξεκινάει στον vegetal και μεταδίδεται στον animal pole. Σε αυτό το στάδιο οι πυρήνες είναι εύκολα διακρίσιμοι μέσα στη λέκιθο.

#### S4 Stage 4 (7.5–9 h) 8 κύτταρα:

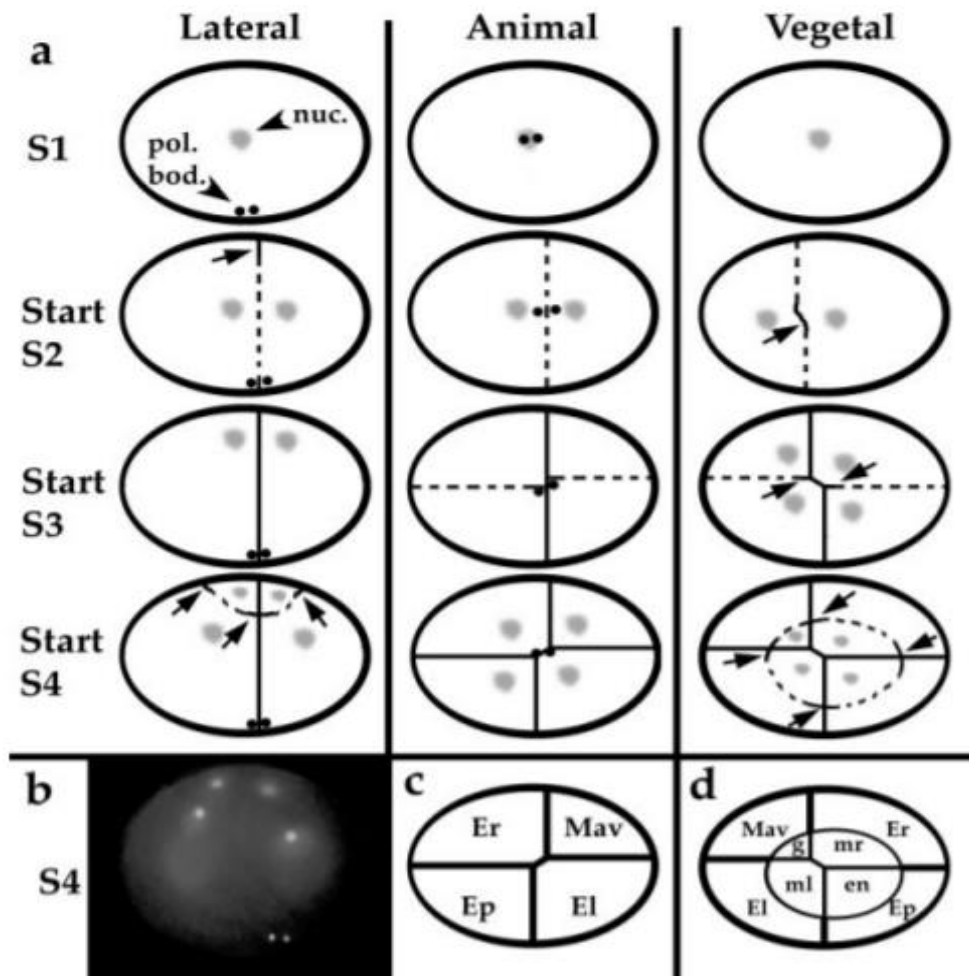
Κατευθείαν μόλις γίνει η τρίτη αυλάκωση, το σχήμα της λέκιθου αλλάζει και γίνεται πιο πεπλατυσμένο στον animal pole και προοδευτικά πιο θολοειδές στον vegetal pole. Η τρίτη αυλάκωση είναι ολική και κάθετη στο επίπεδο της πρώτης και της δεύτερης αυλάκωσης. Αυτή η αυλάκωση είναι πάντα αρκετά άνιση. Σε αυτό το στάδιο το επίπεδο διαχωρίζεται σε 4 μακρομερή και 4 μικρομερή σύμφωνα με την Εικόνα 9. Τα 4 μακρομερή είναι τα Er (Ectoderm right), El (Ectoderm left), Ep (Ectoderm posterior) και Mav (Mesoderm visceral) και τα μικρομερή είναι τα en (endoderm), g (germ line), ml (mesoderm left) και mr (mesoderm right).

#### S5 Stage 5 (9.5–12 h) Διαχωρισμός λεκίθου, 16–128 κύτταρα:

Μετά το στάδιο των 8 πρώτων κυττάρων το έμβρυο ξεκινά τη μετάβαση σε μία διεργασία ασύμμετρης διάσπασης που οδηγεί στον διαχωρισμό της λεκίθου προς το εσωτερικό του αυγού. Για τις επόμενες ώρες, τα μακρομερή Er, El και Ep παρουσιάζουν μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης από τα υπόλοιπα πέντε τμήματα. Ο διαχωρισμός της λεκίθου προς το κέντρο του εμβρύου συσχετίζεται με μία συνεχή μείωση του μεγέθους των πυρηνούχων κυττάρων και την αυξημένη ορατότητα των κυτοπλασματικών νησιών.

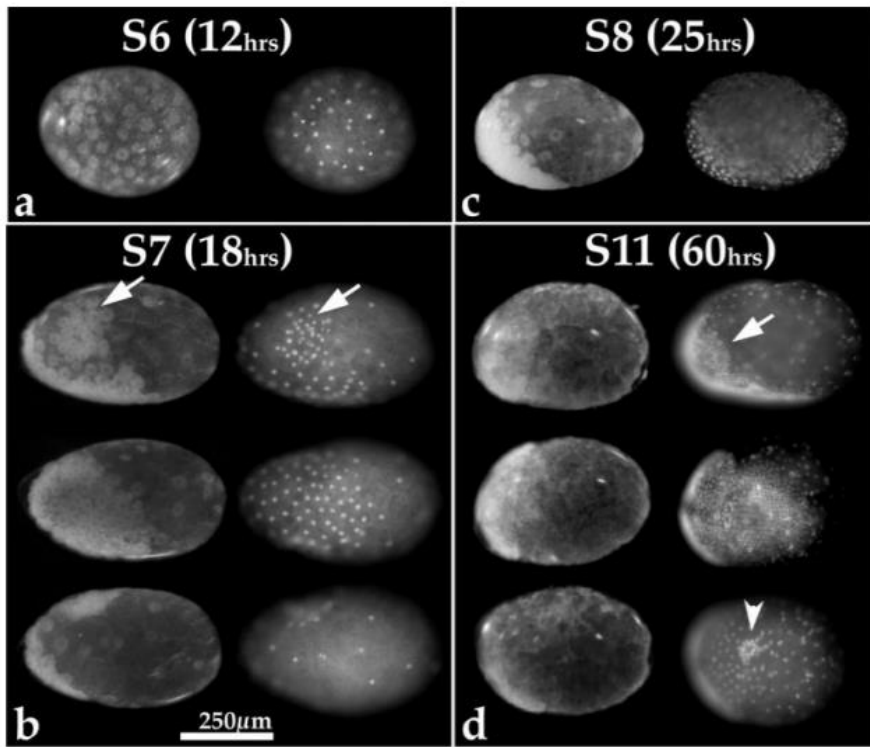
#### S6 Stage 6 (12 h) Soccerball:

Μετά από 12 περίπου ώρες ανάπτυξης όλα τα κύτταρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης φτάνουν σχεδόν στο ίδιο μέγεθος χάρη στον επιταχυνόμενο ρυθμό διαίρεσης. Αυτό το στάδιο ονομάζεται soccerball. Σε αυτό το στάδιο το μεγαλύτερο μέρος της λεκίθου φαίνεται να έχει χωριστεί προς το κέντρο του αυγού και το κέντρο να είναι σχεδόν άδειο από πυρήνες. Τα κυτταρικά σώματα φαίνονται στην επιφάνεια του αυγού σαν λευκά κυτοπλασματικά νεφελώματα με μία κεντρική, ξεκάθαρη οπή, δηλαδή τον κυτταρικό πυρήνα.



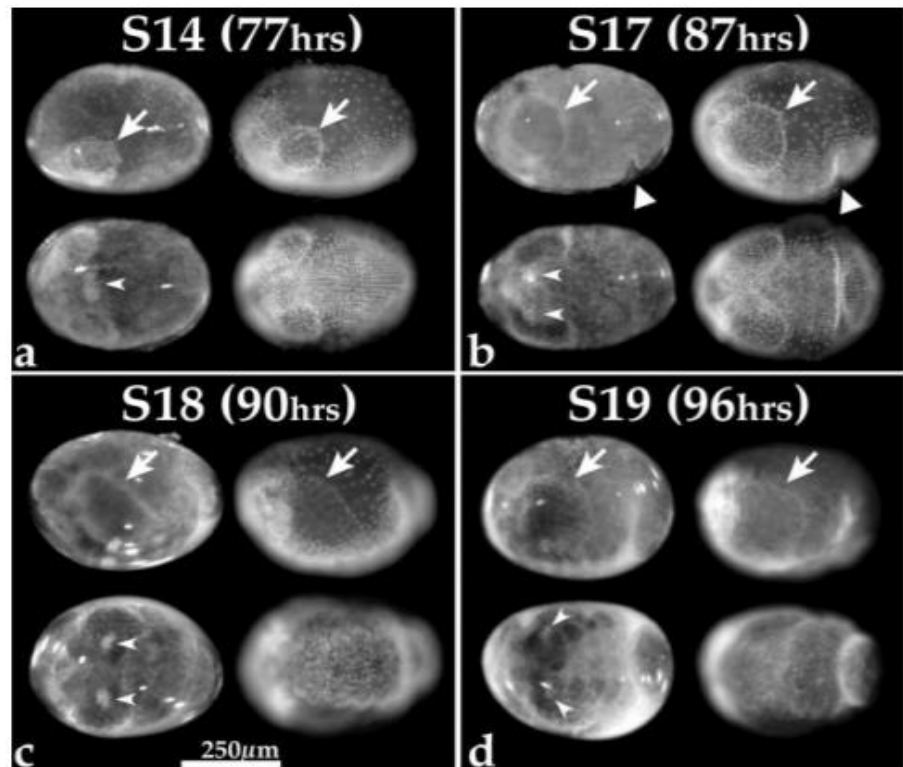
Εικ. 10) *Parhyale hawaiensis* στα στάδια χωρισμού S1-S4 των εμβρύων. α) Οι στήλες από τα αριστερά προς τα δεξιά δείχνουν την πλευρική, την animal και την vegetal όψη του εμβρύου. Ένα βέλος δείχνει την αρχική θέση του κάθε χωρισμένου επιπέδου και η τελική θέση του κάθε χωρίου φαίνεται με διακεκκομένες γραμμές. Οι ανοικτές γκρι κηλίδες αντιπροσωπεύουν τους πυρήνες και τα δύο πολικά σώματα φαίνονται με δύο μαύρες κουκκίδες. Τα πολικά σώματα χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των animal (ζωικός) και vegetal (φυτικός) αξόνων. β) Μία πλευρική άποψη ενός S4 εμβρύου βαμμένου με DAPI με εμφανείς τις σχετικές θέσεις των τεσσάρων πυρήνων και των δύο πολικών σωμάτων. Σχηματική απεικόνιση των μακρομερών του ζωικού άξονα και των μικρομερών του φυτικού άξονα (c),(d) [6].

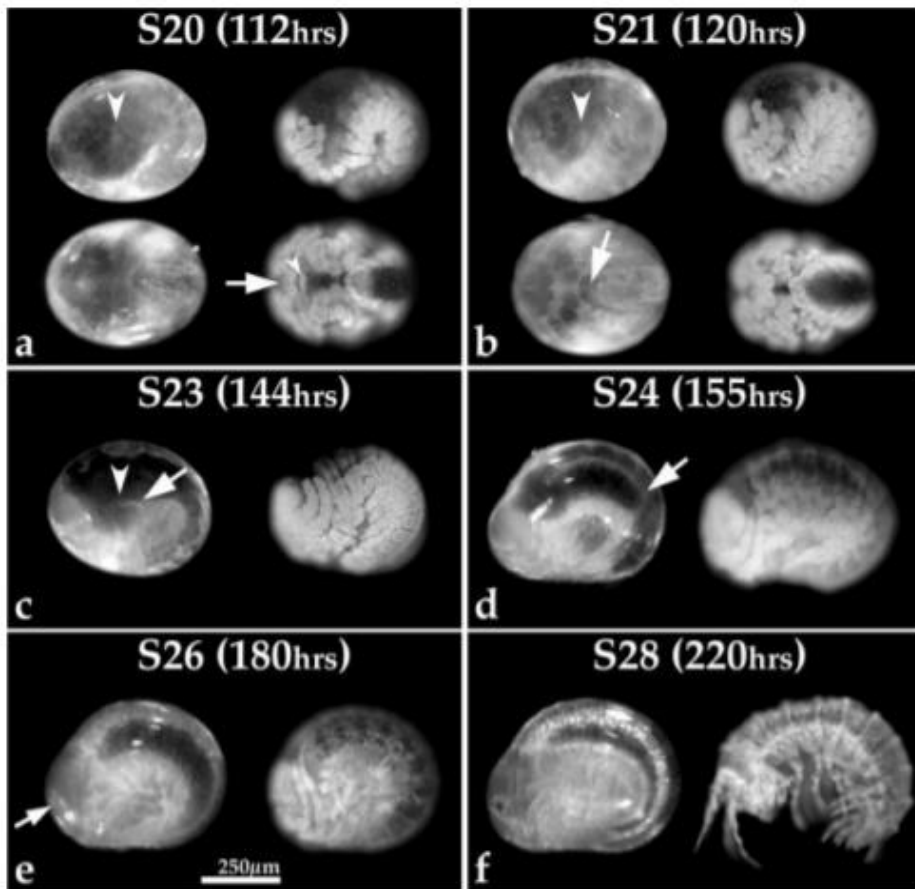




Εικ. 11) *P. hawaiiensis* light microscopy και DAPI a) S6, “soccerball”, απεικόνιση φωτεινού πεδίου ζωντανού εμβρύου (αριστερά) και αντίστοιχη εικόνα φθορισμού DAPI (δεξιά). Τα περισσότερα κύτταρα είναι περίπου ίδιου μεγέθους και είναι ισομερώς καταναμημένα στην περιφέρεια του αυγού. b) S7, στάδιο “rosette”: Το ίδιο έμβρυο απεικονίζεται με διαφορετικούς προσανατολισμούς με μικροσκοπία φωτεινού πεδίου και βαφή με DAPI. Τα λευκά βέλη δείχνουν τη θέση των κυττάρων και των πυρήνων τους. Η μεσαία εικόνα του ζεύγους δείχνει την μετακίνηση των κυττάρων στην θέση του μελλοντικού *germdisc*. c) S8, σχηματισμός του *germdisc*. d) S11, σχηματισμός των εκτοδερμικών κυτταρικών γραμμών. Το ίδιο έμβρυο απεικονίζεται σε διαφορετικούς προσανατολισμούς [6][7].

Εικ. 12 a) S14, το λευκό βέλος στην πλευρική όψη (πάνω), δείχνει το ωσειδές σχήμα του μέσου εντέρου. Το λευκό βέλος δείχνει την θέση των γενετικών κυτταρικών νεφελωμάτων, καθώς διαχωρίζονται το ένα από το άλλο. b) S17, ορατή είναι πλέον η κοιλιακή κάμψη. Τα λευκά τρίγωνα δείχνουν το σημείο στο οποίο αρχίζει ο σχηματισμός της οπίσθιας κοιλιακής κάμψης. Τα λευκά βέλη δείχνουν τη θέση των μετακινούμενων κυττάρων. c) S18, Η εμβάθυνση της κοιλιακής κάμψης είναι ξεκάθαρα εμφανής στο πίσω τεταρτημόριο του αυγού. Το κοιλιακό πεδίο DAPI δείχνει τον σχηματισμό των σπονδύλων κατά μήκος του εμβρύου. d) S19, Το λευκό βέλος δείχνει τη θέση του ωσειδούς μέσου εντέρου. Η πίσω πλευρά του εμβρύου έχει επεκταθεί πλευρικά [6],[7].





Εικ. 13) πλευρικές (πάνω) και κοιλιακές (κάτω) όψεις στα a και b, και μόνο πλευρικές όψεις στα c-f. a) S20, το πίσω τεταρτημόριο στενεύει, το δεύτερο κύμα μίτωσης έχει περάσει από όλα τα υποχωρία του εξωδέρματος και εμφανίζεται το τελευταίο μέρος της ουράς (telson). Το labrum (λευκό βέλος) είναι εμφανές κεντρικά και επεκτείνεται προς τα πίσω, προς το stomodeum (περιοχή μεταξύ εγκεφάλου και περικαρδίου) μεταξύ των κεραιών του εμβρύου. b) S21, Γίνεται εμφανές το οπισθοεντερικό proctodeum. Τα λευκά βέλη σε πλευρική όψη (πάνω) δείχνουν τη θέση των κυτταρικών συμπυκνωμάτων. Στην στομαχική όψη (κάτω) φαίνεται ξεκάθαρα το οπισθοεντερικό proctodeum στην πίσω πλευρά του εμβρύου. Το labrum έχει επεκταθεί σημαντικά [6].

c) S23, Το έντερο αρχίζει να επεκτείνεται. Το λευκό βέλος δείχνει την αρχική οπίσθια επέκταση του πεπτικού συστήματος. d) S24, Το λευκό βέλος δείχνει την επέκταση του πεπτικού συστήματος. Οι κόκκοι της λεκίθου έχουν καθαρίσει από την κεφαλή. e) S26) Έχουν σχηματιστεί τα λευκά μάτια και η καρδιά του εμβρύου χτυπά. Το λευκό βέλος δείχνει τη θέση των αναπτυσσόμενων ραβδομερών. Οι σπόνδυλοι έχουν αρχίσει να παίρνουν το τελικό τους σχήμα. f) S28. Το έμβρυο αρχίζει να αποκτά κίτρινη επιδερμίδα. Τα ραβδομερή στους οφθαλμούς φαίνονται έντονα κόκκινα, τα άκρα έχουν πάρει την τελική μορφή τους και το πεπτικό σύστημα είναι σημαντικά κενό από αποθέματα λεκίθου.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1 Προετοιμασία δείγματος

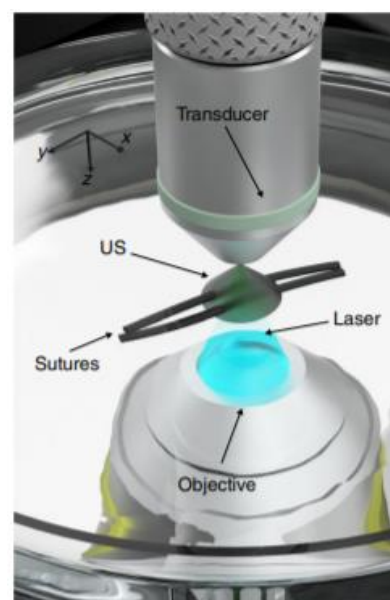
Για τους σκοπούς του πειράματος τα έμβρυα συλλέγονται από αναισθητοποιημένα θηλυκά *Parhyale hawaiiensis* και διαχωρίζονται με βάση το στάδιο της ανάπτυξης. Το δείγμα τοποθετείται σε μία οπτικά διαφανή δεξαμενή που έπειτα γεμίζουμε με ASW. Για την στήριξη των εμβρύων στο γυαλί της δεξαμενής χρησιμοποιείται τζελ αгарόζης χαμηλού σημείου τήξης που διαλύεται με ASW σε συγκέντρωση 0.7%. Κάθε έμβρυο στερεώνεται στη θέση του με μία λαβίδα εντός μισού λεπτού μέχρι η αгарόζη να στεγνώσει. Αφού στεγνώσει, η δεξαμενή γεμίζεται με το ASW. Η χρήση του ASW είναι απαραίτητη για την διατήρηση των εμβρύων ζωντανών. Το ASW χρησιμοποιείται επίσης ως μέσο σύζευξης μεταξύ του σήματος της πηγής και του transducer.

### 3.2 Πειραματική διάταξη

Το φωτοακουστικό μικροσκόπιο συγχωτάει ενσωματώνει ένα laser συνεχούς εκπομπής (CW) (MDL-III-488, CNI, Changchun, China; μέγιστη ένταση εξόδου: 100 mW) σε μήκος κύματος  $\lambda=488$  nm. Ένας θετικός φακός (A, εστιακή απόσταση: 15 cm) εστιάζει τη δέσμη στο ενεργό άνοιγμα ενός freespace οπτοακουστικού διαμορφωτή (AOM; TEM-200-50, Brimrose, Maryland, U.S.; εύρος ζώνης διαμόρφωσης: 50 MHz) που διαμορφώνει την ένταση της ακτινοβολίας. Ο οπτοακουστικός διαμορφωτής απαιτεί την εισαγωγή ενός ημιτονοειδούς κύματος τάσης 9.5 MHz (εύρος: 0–1 V) που καθορίζεται από μία παλμογεννήτρια (FG; DG5252, Rigol, Oregon, U.S.; μέγιστη συχνότητα: 250 MHz).

Το διαμορφωμένο φως ευθυγραμμίζεται με τη χρήση ενός δεύτερου θετικού φακού (B, εστιακή απόσταση: 15 cm) και στη συνέχεια φιλτράρεται μέσω μίας μικρής οπής  $\sim 5$ mm σε διάμετρο, ώστε να απομονώνει μόνο την πρώτη τάξη του μοτίβου περίθλασης που προκύπτει. Η φιλτραρισμένη ακτινοβολία οδηγείται σε έναν γαλβανομετρικό σαρωτή (GM; Scancube 7, Scanlab, Puchheim, Germany) που σαρώνει τη δέσμη κατά μήκος του δείγματος, για να επιτευχθεί γρήγορη απόκτηση εικόνων. Ένα οπτικό τηλεσκόπιο δύο θετικών φακών (C, εστιακή απόσταση: 7.5 cm; D; Εστιακή απόσταση: 17.5 cm) χρησιμοποιείται για επαρκή επέκταση της δέσμης, πριν ανακλαστεί η ακτινοβολία σε ένα κατάλληλα διαμορφωμένο αντίστροφο οπτικό μικροσκόπιο (Diaphot, Nikon, Tokyo, Japan).

Ένας αντικειμενικός φακός (Obj; Achromat 8X, LOMO, St. Petersburg, Russia; Αριθμητικό άνοιγμα (NA): 0.25) συγκεντρώνει το φως στο δείγμα (S) που είναι τοποθετημένο στον πυθμένα μίας οπτικά διαφανούς δεξαμενής νερού (WT) και σφιχτά στερεωμένο χρησιμοποιώντας ένα λεπτό στρώμα gel αγαρόζης. Τα φωτοακουστικά κύματα που παράγονται ανιχνεύονται με έναν σφαιρικό πιεζοηλεκτρικό υπερηχητικό transducer που είναι στερεωμένος σε ένα σύστημα manual XYZ stages και βυθισμένος στη δεξαμενή νερού σε μία θέση ελαφρώς εκτός εστίασης για την επέκταση του field of view (FOV). Το απιονισμένο νερό στην δεξαμενή λειτουργεί ως συνδετικό μέσο μεταξύ του σήματος της πηγής και του transducer διασφαλίζοντας την επαρκή διάδοση και ανίχνευση των φωτοακουστικών κυμάτων.



Εικ. 14) Σχηματική απεικόνιση σάρωσης με transducer [4].

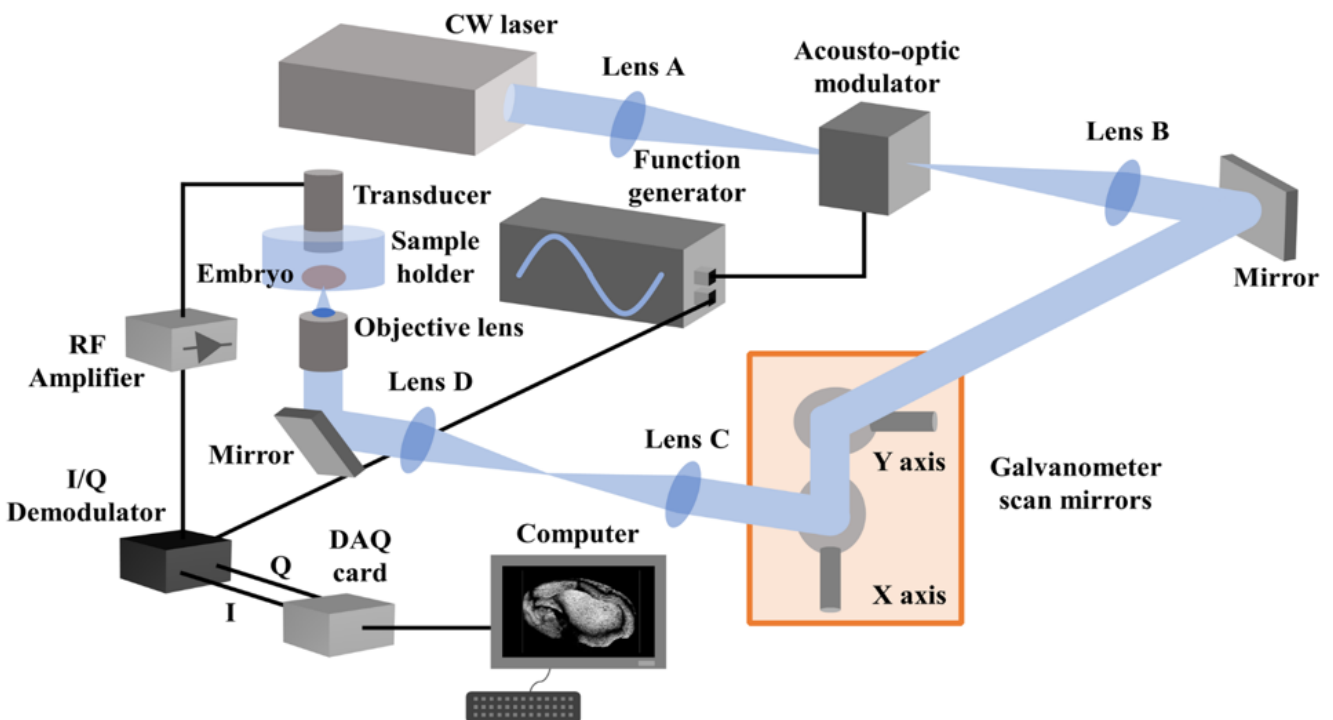
Τα σήματα που παράγονται βελτιώνονται από δύο χαμηλού θορύβου RF ενισχυτές (AMP, TB-414-8A+, Mini-Circuits, Camberley, England; ενίσχυση: 31 dB) συνδεδεμένους σε σειρά ώστε να δίνουν

συνολική ενίσχυση 62db πριν την μετάδοσή τους σε έναν I/Q demodulator (IQ, AD8333, Analog Devices, Massachusetts, U.S.; bandwidth: DC to 50 MHz) [1].

Ο demodulator λαμβάνει επίσης ένα 4X τοπικό σήμα ταλαντωτή στα 40MHz από ένα δεύτερο κανάλι, για να δώσει τις I και Q τιμές που καταγράφονται και αποθηκεύονται με ένα DAQ (data acquisition card-DAQ, PCIe-6363, National Instruments, Texas, U.S.; maximum sampling rate: 2 MS/s) και έναν υπολογιστή σε συγχρονισμό με τον γαλβανομετρικό σαρωτή. Οι τιμές I και Q χρησιμοποιούνται, για να καθορίσουν τις τιμές του πλάτους και της φάσης του φωτοακουστικού σήματος μέσω των σχέσεων:  $\text{πλάτος} = \sqrt{I^2 + Q^2}$  και  $\text{φάση} = \tan^{-1}\left(\frac{Q}{I}\right)$ .

Για τη βελτίωση του λόγου σήματος/θορύβου (SNR) χρειάστηκε ένας μέσος όρος 500 μετρήσεων για τον υπολογισμό των I/Q τιμών που οδήγησαν στον υπολογισμό του πλάτους και της φάσης. Η ανάλυση των εικόνων είναι  $500 \times 500$  pixels.

Η τυπική ισχύς στο επίπεδο του δείγματος που έχει καταγραφεί έχει μετρηθεί στα 20 mW, επιβεβαιώνοντας ότι δεν υπάρχει καταστροφή λόγω ακτινοβολίας την ώρα της απεικόνισης. Ο έλεγχος και ο συγχρονισμός του μικροσκοπίου έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας custom developed προγράμματα. Τέλος, όλα τα καταγεγραμμένα δεδομένα επεξεργάζονται με το Matlab και ένα open source javascript based λογισμικό- το ImageJ [1]



Εικ. 15) α) Τρισδιάστατη αναπαράσταση της διάταξης του frequency domain (FD) φωτοακουστικού μικροσκοπίου.

### 3.3 Ανακατασκευή εικόνων

Η εξάρτηση του πλάτους και της φάσης από την σχετική απόσταση μεταξύ εστιακού σημείου και transducer μελετήθηκε με την χρήση ενός κομματιού μαύρης ταινίας ως δείγματος για επαρκή παραγωγή φωτοακουστικών σημάτων. Οι μετρήσεις της φάσης και του πλάτους λήφθηκαν με την σταδιακή προσέγγιση του transducer προς την πηγή χρησιμοποιώντας τον άξονα Z της χειροκίνητης βάσης. Η εικόνα 16α δείχνει τις μετρήσεις του πλάτους που καταγράφηκαν για μία συνολική κατακόρυφη μετατόπιση 430  $\mu\text{m}$  με βήμα 10  $\mu\text{m}$ . Τα σημεία των δεδομένων επιπλέον προσαρμόστηκαν σε μία ημιτονοειδή συνάρτηση ( $R_2=0.987$ ) έχοντας την τυπική μορφή:  $y = y_0 + A \sin(kx + \phi)$  για την εκτίμηση της απόκλισης του φωτοακουστικού πλάτους ( $y_0=7.294 \text{ mV}$ ), την μέγιστη απόλυτη διαφορά μεταξύ του πλάτους και της απόκλισης ( $A = 1.502 \text{ mV}$ ), τον κυματαριθμό ( $k = 4.254 \times 10^{-2} \mu\text{m}^{-1}$ ) και την αρχική φάση ( $\phi = -219.9 \text{ deg}$ ).

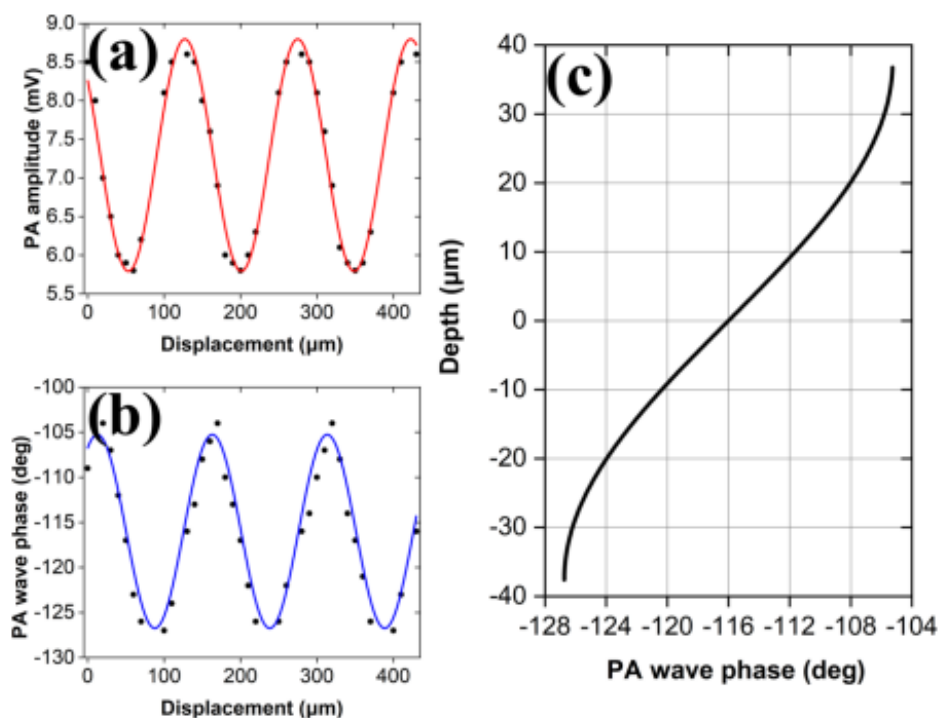
Επίσης, ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος της παρατηρούμενης ταλάντωσης υπολογίστηκε ως  $\lambda=2\pi/k$  ώστε να δίνει τιμή ίση με 147.7  $\mu\text{m}$ , που αντιστοιχεί με υψηλή ακρίβεια στο ακουστικό μήκος κύματος στο απιονισμένο νερό για συχνότητα διέγερσης  $\sim 10 \text{ MHz}$  (148  $\mu\text{m}$  at 20°C). Η ταλαντωτική συμπεριφορά του φωτοακουστικού πλάτους ως συνάρτηση της κατακόρυφης θέσης του ανιχνευτή μπορεί να ερμηνευθεί φυσικά με βάση την παρεμβολή του φωτοακουστικού σήματος στην πεπερασμένη επιφάνεια του transducer. Αυτό σημαίνει πως το σχεδόν σφαιρικό μέτωπο του φωτοακουστικού κύματος αλληλεπιδρά με την επιφάνεια του transducer σε ελαφρώς διαφορετικές χρονικές στιγμές, καταλήγοντας σε μία συλλογική απόκριση που εξαρτάται από τις τοπικές συνθήκες, και συνεπώς τη σχετική θέση μεταξύ της πηγής και του transducer [1].

Η ερμηνεία αυτή υποστηρίζεται επιπλέον από το γεγονός ότι το πλάτος της ταλάντωσης επαναλαμβάνεται ακολουθώντας μία κατακόρυφη μετατόπιση ίση με το αντίστοιχο μήκος κύματος, όπως θα έπρεπε να παρατηρείται στην περίπτωση της παρεμβολής κυμάτων. Όμως, οι εικόνες φωτοακουστικής μικροσκοπίας απαιτούν το καταγραφόμενο πλάτος να είναι ανεξάρτητο από την σχετική θέση του transducer και ανάλογο μόνο με τις τοπικές συνθήκες απορρόφησης του δείγματος. Αυτή η ασάφεια στο πλάτος μπορεί να εξαλειφθεί με την καταγραφή μίας επιπλέον μέτρησης με αλλαγή φάσης 90 μοιρών, δίνοντας απευθείας μία διαφορετική τιμή στην τάση της ακουστοοπτικής συσκευής. Υπό αυτές τις συνθήκες και με την χρήση της προηγούμενης εξίσωσης (1), η ανεξάρτητη παράμετρος οπτικής απορρόφησης  $A$  μπορεί να υπολογιστεί μέσω της σχέσης:

$$A = \sqrt{(y_{0deg} - y_0)^2 + (y_{90deg} - y_0)^2} \quad (2)$$

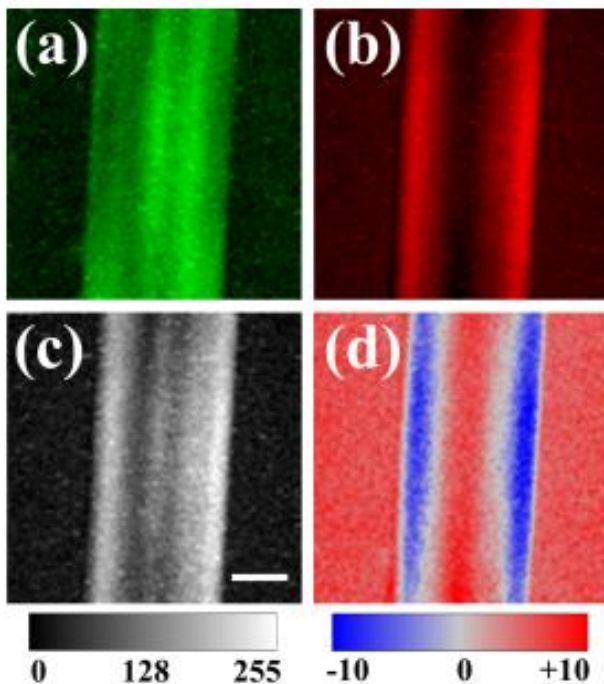
Όπου  $y_{0deg}$  και  $y_{90deg}$  αντιπροσωπεύουν τις μετρήσεις του πλάτους στις 0 και 90 μοίρες, που καταγράφονται για μία σταθερή θέση του transducer. Από την άλλη, η εικόνα 16b αντιπροσωπεύει την ταυτόχρονη λήψη της μέτρησης της φάσης, παρομοίως προσαρμοσμένη σύμφωνα με την ημιτονοειδή συνάρτηση ( $R_2 = 0.940$ ) ώστε να δώσει την αντίστοιχη μετατόπιση φάσης ( $y_{0pha} = -116$  deg), τη μέγιστη απόλυτη διαφορά μεταξύ της καταγεγραμμένης φάσης και της μετατόπισης ( $A_{pha} = 10.74$  deg), τον κυματαριθμό  $k_{pha} = 4.178 \times 10^{-2} \mu\text{m}^{-1}$ , καθώς και την παράμετρο της αρχικής φάσης ( $\phi_{pha} = 59.6$  deg). Σε αντίθεση με το αναμενόμενο εύρος φάσης 360 μοιρών του φωτοακουστικού κύματος ως συνάρτηση της κατακόρυφης απόστασης του transducer, ο υπερηχητικός ανιχνευτής παρουσιάζει περιορισμένο εύρος περίπου 21.5 μοιρών, που προκύπτει από μία μέση τιμή της φάσης καθ'όλη την επιφάνεια του transducer σε αντιστοιχία με τις μετρήσεις του φωτοακουστικού πλάτους που αναφέρθηκαν προηγουμένως [1].

Οι παράγοντες προσαρμογής των σημείων των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την δημιουργία μίας καμπύλης βαθμονόμησης που έχει μία τυπική αντιστρόφως ημιτονοειδή μορφή (Εικ 16c). Το γράφημα δείχνει το σχετικό βάθος της παραγωγής PA σημάτων ως συνάρτηση της φάσης σε μία κλίμακα ίση με το μισό του ακουστικού μήκους κύματος. Αυτό σημαίνει ότι αν τα επιφανειακά χαρακτηριστικά του δείγματος στην αξονική διεύθυνση παρουσιάζουν μία μεταβλητότητα μεγαλύτερη από  $\sim 74 \mu\text{m}$ , θα υπάρχει κάποια αβεβαιότητα στον καθορισμό του βάθους του PA σήματος, τουλάχιστον στην περίπτωση της μοναδικής συχνότητας διαμόρφωσης.



Εικ. 16 a) Μετρήσεις πλάτους φωτοακουστικού σήματος ως συνάρτηση της σχετικής απόστασης από τον ανιχνευτή. Η κόκκινη καμπύλη αντιπροσωπεύει την ημιτονοειδή προσαρμογή των σημείων των δεδομένων. b) Παρόμοιες μετρήσεις φάσης φωτοακουστικού σήματος με προσαρμογή των δεδομένων στην ημιτονοειδή μορφή (μπλέ καμπύλη). c) Αντιστρόφως ημιτονοειδής καμπύλη που παρουσιάζει το σχετικό βάθος του φωτοακουστικού σήματος ως συνάρτηση της ανιχνευόμενης φάσης, όπως αυτή προκύπτει από το b) [1].

Η εικόνα 17a παρουσιάζει μία εικόνα πλάτους σε πράσινο χρώμα που απεικονίζει ένα μέρος του phantom sample σαρώνοντας μία περιοχή 520  $\mu\text{m}$  με 520  $\mu\text{m}$ , που μεταφράζεται ως 200  $\times$  200 pixels. Μία επακόλουθη εικόνα πλάτους που καταγράφηκε με διαφορά φάσης 90 μοιρών σε σύγκριση με την εικόνα 17a φαίνεται στην εικόνα 17b (κόκκινο χρώμα), αποκαλύπτοντας μία διαφορετική κατανομή αντίθεσης λόγω της ημιτονοειδούς διαμόρφωσης του φωτοακουστικού σήματος. Συνδυάζοντας τις δύο προηγούμενες εικόνες πλάτους μέσω της εξίσωσης (2), δημιουργείται μία πλήρως ανακατασκευασμένη εικόνα πλάτους (Εικ. 17c), που εμφανίζει τις ιδιότητες οπτικής απορρόφησης του δείγματος. Οι διαφορές στο σήμα καθ' όλη την επιφάνεια μπορούν να αποδοθούν στις πιθανές παρεμβολές των φωτοακουστικών κυμάτων με τις αντίθετες ανακλάσεις που προκύπτουν από το γυάλινο υπόστρωμα της δεξαμενής νερού. Ένας χάρτης της φωτοακουστικής φάσης παρουσιάζεται στην εικόνα 17d, για να αναδείξει την πλήρη κλίμακα των καταγεγραμμένων φάσεων ( $\pm 10.74$  deg) στο κυλινδρικό phantom δείγμα.



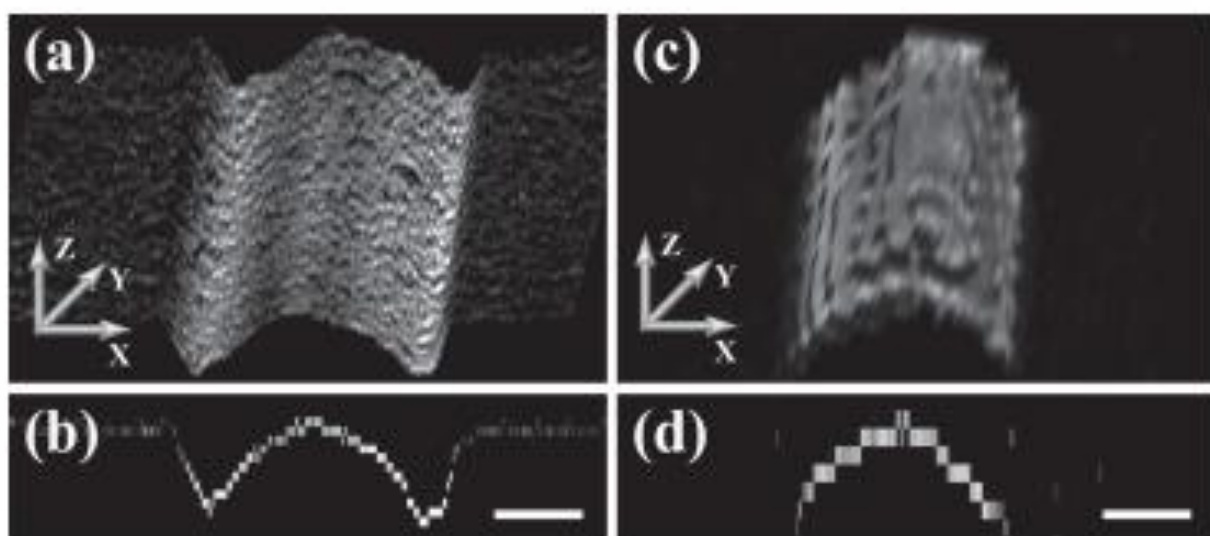
Εικ. 17 a) Φωτοακουστική εικόνα πλάτους ενός πλαστικού κυλινδρικού phantom δείγματος στις 0 μοίρες. b) Αντίστοιχη εικόνα πλάτους με αλλαγή φάσης 90 μοιρών. c) Ανακατασκευή πλήρους εικόνας πλάτους του δείγματος. Οι τιμές κάτω από την μπάρα ασπρόμαυρης κλίμακας αντιπροσωπεύουν την φωτεινότητα των 8-bit pixels (scale bar: 100 $\mu\text{m}$ ). d) Ταυτόχρονα καταγεγραμμένη εικόνα φάσης. Οι τιμές κάτω από την έγχρωμη κλίμακα αντιπροσωπεύουν την αλλαγή φάσης σε μοίρες [1].



Με στόχο την ακριβή ανακατασκευή της επιφάνειας έχει γίνει ανάλυση στον χώρο της πλήρους εικόνας του πλάτους της εικόνας 17c, με βάση τον αντίστοιχο χάρτη της φάσης και την καμπύλη βαθμονόμησης (16c). Η τελική επεξεργασμένη εικόνα φαίνεται στην εικόνα 18a, όπου διακρίνεται η μισή κυλινδρική επιφάνεια του phantom δείγματος με επαρκή χωρική ανάλυση. Ένα προφίλ στο επίπεδο XZ της ανακατασκευασμένης εικόνας επίσης φαίνεται στην εικόνα 18b, για να τονίσει την ακρίβεια της προτεινόμενης προσέγγισης για τον καθορισμό του βάθους του PA σήματος σε μία συγκεκριμένη κλίμακα, δείχνοντας επιπλέον τα αναμενόμενα artifacts στα όρια του δείγματος, ως αποτέλεσμα της ασάφειας της φάσης [1].

Εκτός αυτού το ίδιο δείγμα απεικονίστηκε με ένα συμβατικό φωτοακουστικό μικροσκόπιο στο πεδίο χρόνου εξοπλισμένο με τον ίδιο αντικειμενικό φακό και τον ίδιο transducer για την ανίχνευση σημάτων. Σε αυτή την περίπτωση, κάθε καταγεγραμμένη κυματομορφή τροποποιήθηκε με τον υπολογισμό του συντελεστή του μετασχηματισμού Hilbert της, ώστε να καθοριστεί η χρονική στιγμή που αντιστοιχεί στην κάθε μέγιστη τιμή. Οι μετρήσεις του χρόνου πτήσης μεταφράστηκαν στη συνέχεια σε βάθη στην επιφάνεια του δείγματος, συνυπολογίζοντας την ταχύτητα του ήχου στο απιονισμένο νερό (1480 m/s).

Η εικόνα 18c δείχνει την απεικόνιση της ημικυλινδρικής επιφάνειας του δείγματος με φωτοακουστικό μικροσκόπιο στο πεδίο του χρόνου (βήμα: 2.5  $\mu\text{m}$ ; ενέργεια παλμού: 200 nJ, 20 averages ανά σημείο), που είναι απευθείας συγκρίσιμο με την αντίστοιχη ανακατασκευή στο πεδίο των συχνοτήτων της εικόνας 16a. Μία ανακατασκευασμένη εικόνα XZ του δείγματος που δημιουργείται από τις σχετικές καθυστερήσεις των PA TD σημάτων παρουσιάζεται στην εικόνα 16d, επιβεβαιώνοντας την υψηλή χωρική ακρίβεια στη λήψη επιφανειακών εικόνων με το μικροσκόπιο στο πεδίο των συχνοτήτων.

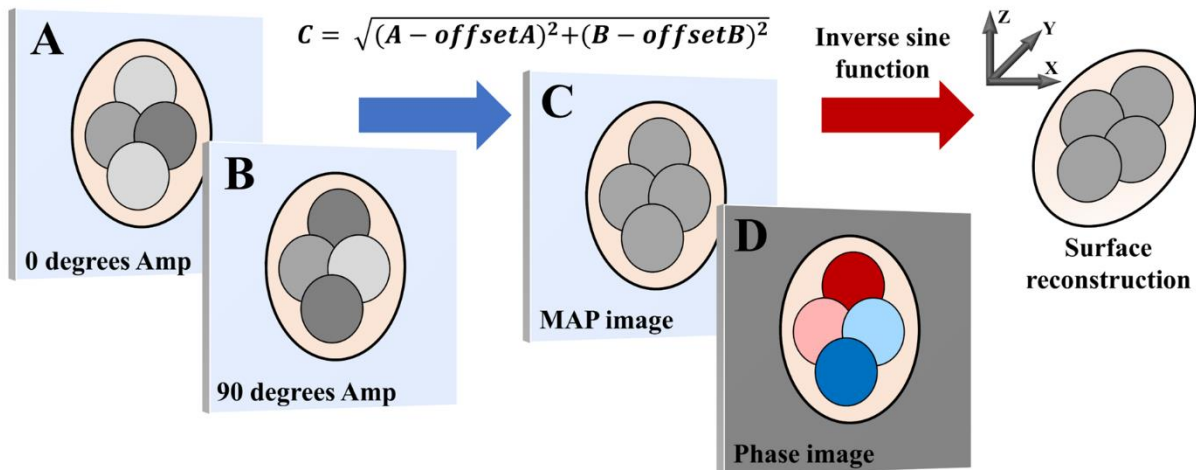


Εικ. 18 a) Επιφανειακή ανακατασκευή του κυλινδρικού phantom sample μέσω καταγραφής πλάτους και φάσης στο φωτοακουστικό μικροσκόπιο στο πεδίο των συχνοτήτων. b) Τυπικό προφίλ XZ της ανακατασκευής όπως φαίνεται στο a). c) Αντίστοιχη επιφανειακή ανακατασκευή με τη χρήση μετρήσεων πτήσης σε PA μικροσκόπιο στο πεδίο του χρόνου (TD). d) Προφίλ XY της ανακατασκευής στο c). Scale bar: 100μm [1].

Οι απεικονίσεις του phantom δείγματος έδειξαν τις δυνατότητες πλήρους ανακατασκευής του PA μικροσκοπίου στο πεδίο των συχνοτήτων χρησιμοποιώντας μία μοναδική συχνότητα στα 10 MHz, αλλά έδειξαν ταυτόχρονα τα πιθανά artifacts που μπορεί να εμφανιστούν για έναν παράγοντα μεταβλητότητας βάθους μεγαλύτερο από το μισό του ακουστικού μήκους κύματος.

Ένας αποτελεσματικός τρόπος, για να διορθωθεί ένα τέτοιο πρόβλημα, είναι να περιοριστεί δραστικά η περιοχή της φωτοακουστικής διέγερσης στην αξονική διάσταση με την αύξηση του αριθμητικού ανοίγματος του φακού εστίασης. Αξιοποιώντας το πλήρες αριθμητικό άνοιγμα (0.2) (ένταση στο δείγμα:  $1.98 \times 10^5 \text{ W/cm}^2$ ), προκύπτει ένα βάθος εστίασης στα 12 μm, που είναι περισσότερο από έξι φορές μικρότερο από το μέγιστο εύρος βάθους που μπορεί να ανακατασκευαστεί μέσω μετρήσεων της φάσης χωρίς καμία ασάφεια [1].

Έχοντας διερευνήσει τις δυνατότητες του FDPM στην 2D απεικόνιση των βιολογικών δειγμάτων, επόμενο βήμα είναι η επιφανειακή ανακατασκευή με την χρήση επιπλέον των καταγεγραμμένων φάσεων των φωτοακουστικών κυμάτων κατά την σάρωση των δειγμάτων.



Εικ. 19. Διαδικασία ανακατασκευής εικόνων.

Η τελική ανακατασκευή προβολής μέγιστου πλάτους (MAP) στην εικόνα C δίνεται από την εξίσωση:

$$C = \sqrt{(A - \text{offsetA})^2 + (B - \text{offsetB})^2} \quad (1)$$

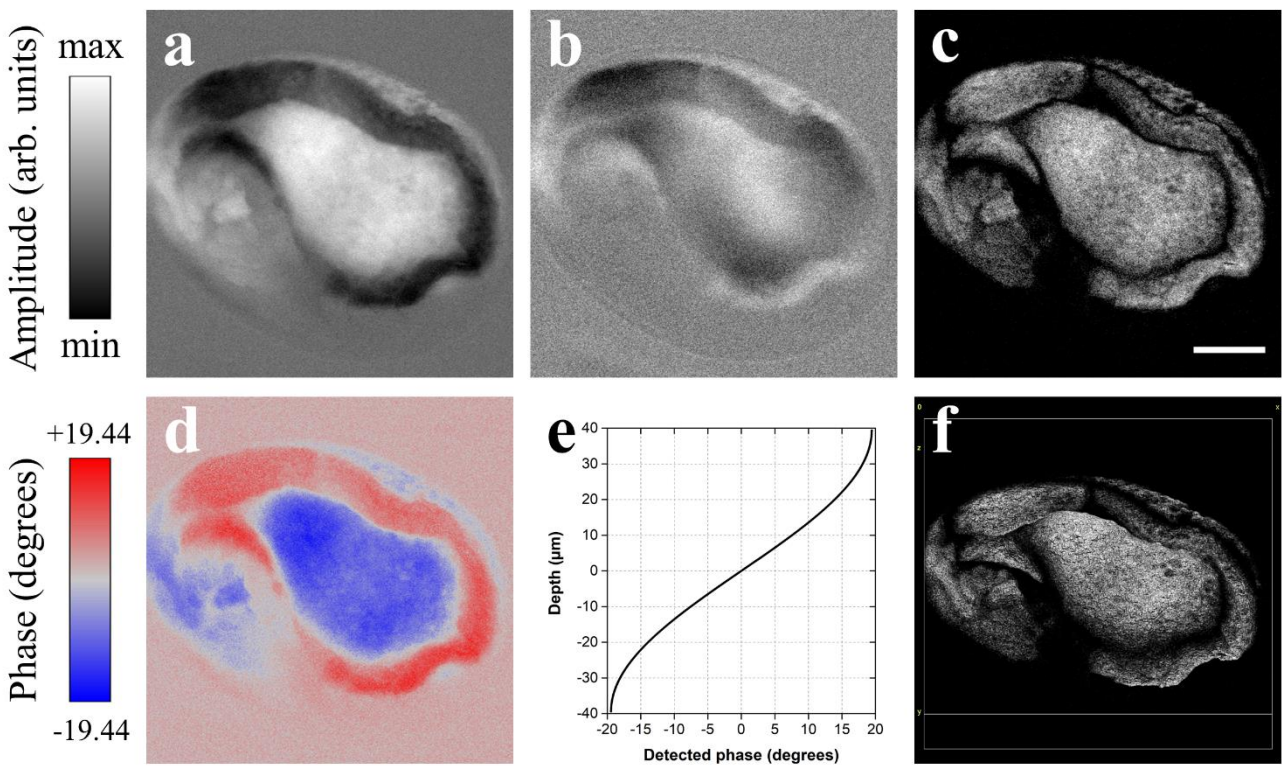
Όπου A και B είναι οι καταγεγραμμένες εικόνες στις 0 και 90 μοίρες, ενώ τα offsetA και offsetB αντιστοιχούν στις τιμές απόκλισης του αποδιαμορφωτή, όταν δεν ανιχνεύθηκε κανένα σήμα. Η

επιφανειακή ανακατασκευή των εμβρύων προκύπτει με την αντιστοιχία κάθε pixel της C σε μία μέτρηση βάθους ανάλογα με την κάθε μέτρηση φάσης της D, χρησιμοποιώντας την αντίστροφη ημιτονεϊδή συνάρτηση της μορφής:

$$Depth = \frac{\lambda_{ac}}{2\pi} \sin^{-1}\left(\frac{Ph}{R}\right) \quad (2),$$

Όπου  $\lambda_{ac}$  είναι το ακουστικό μήκος κύματος στο θαλασσινό νερό (~160  $\mu\text{m}$ ), και το R αντιστοιχεί στην απόλυτη μέγιστη τιμή φάσης που δίνεται από τον αποδιαμορφωτή (19.44 μοίρες).

Η εικόνα 20a παρουσιάζει την εικόνα πλάτους του *Parhyale hawaiiensis* σε ένα από τα τελευταία στάδια της ανάπτυξής του (S24; dorsolateral view) μετατοπισμένο κατά 0 μοίρες σε σύγκριση με το τοπικό σήμα ταλάντωσης του αποδιαμορφωτή, ενώ η εικόνα 20b παρουσιάζει την αντίστοιχη εικόνα με αλλαγή φάσης 90 μοίρες.



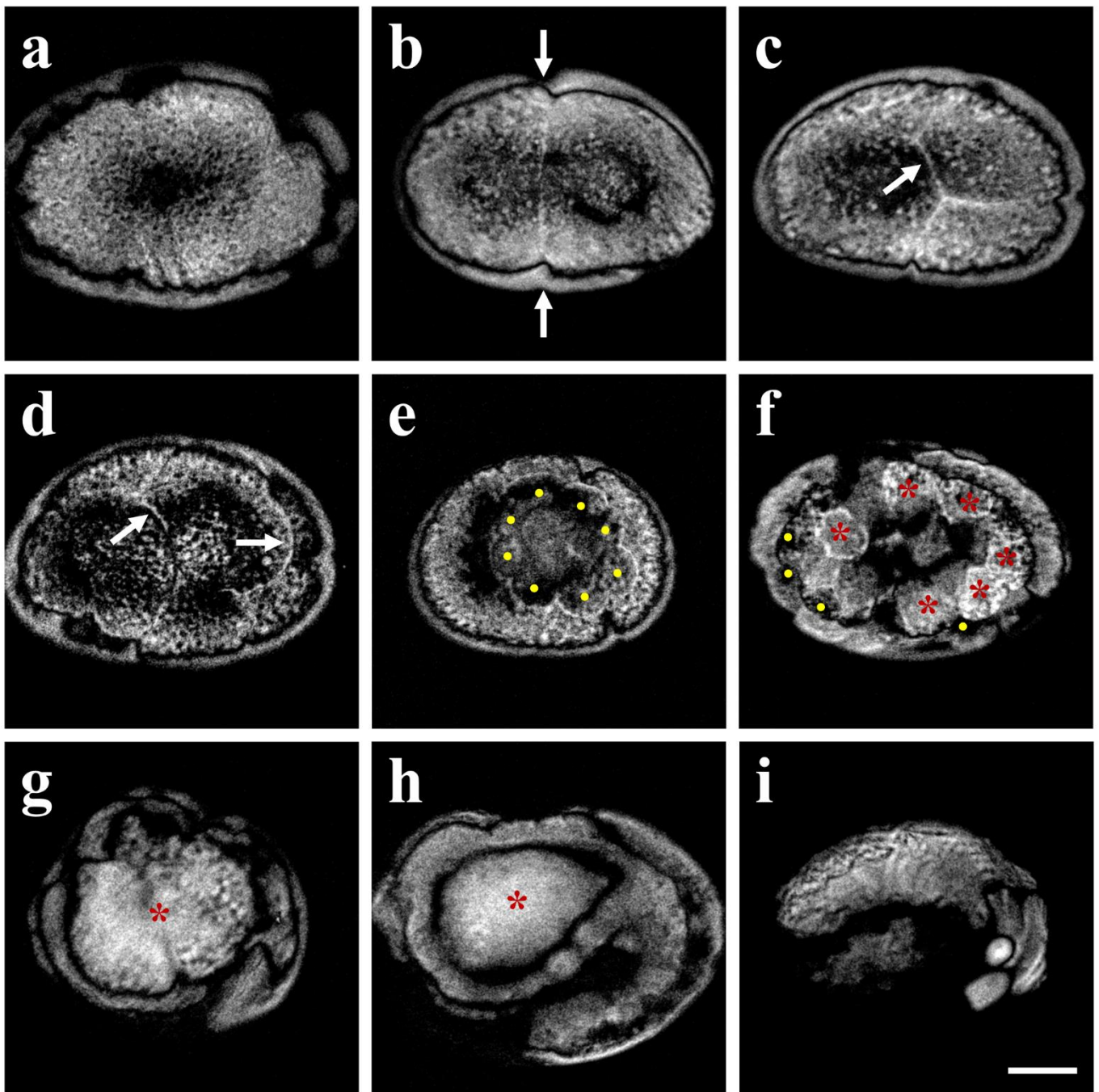
Εικ. 20 a) Εικόνα πλάτους στις 0 μοίρες. b) Εικόνα πλάτους στις 90 μοίρες. c) Ανακατασκευασμένη εικόνα MAP του εμβρύου. Scalebar: 100  $\mu\text{m}$ . d) Εικόνα καταγραφής φάσης. e) Αντίστροφη ημιτονοειδής συνάρτηση που συνδέει την καταγεγραμμένη φάση με τις αντίστοιχες τιμές βάθους. f) Επιφανειακή ανακατασκευή του εμβρύου.

Η εφαρμογή της εξίσωσης (1) στα δεδομένα πλάτους έδωσε την ανακατασκευή εικόνων με τις πληροφορίες οπτικής απορρόφησης του εμβρύου χωρίς artifacts (Εικ. 20c). Μία ταυτόχρονα κατασκευασμένη εικόνα φάσης παρουσιάζεται στην εικόνα 20d με μπλε και κόκκινο χρώμα, ώστε να αναδειχθεί η χωρική κατανομή των φάσεων σε όλο το δείγμα. Κάθε καταγραφή φάσης συσχετίζεται άμεσα με το αντίστοιχο βάθος του φωτοακουστικού σήματος μέσω της εξίσωσης (2), όπως φαίνεται στην εικόνα 20e. Συνδυάζοντας τα δεδομένα στις εικόνες 20c-e, προκύπτει η επιφανειακή

ανακατασκευή του εμβρύου (Εικ. 20f), η οποία χαρτογραφεί τα πλήρη ανατομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά του εμβρύου με υψηλή χωρική ακρίβεια και αντίθεση.

#### 4. Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση

Οι παρακάτω εικόνες αποτελούν τα βέλτιστα αποτελέσματα απεικόνισης εννέα διαφορετικών σταδίων της εμβρυακής ανάπτυξης του *Parhyale hawaiensis* με την χρήση του φωτοακουστικού μικροσκοπίου.



Εικ. 21. Έμβρυα *Parhyale hawaiensis* απεικονίζονται σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξής τους με FDPA μικροσκοπία. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

- **Εικόνα 21a)** Το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο S1, με τον μοναδικό πυρήνα του κυττάρου να εμφανίζεται με μαύρο χρώμα στο κέντρο του αυγού και την λέκιθο να τον περιβάλλει (άσπρο χρώμα). Οι κόκκοι της λέκιθου παρουσιάζουν έντονο φωτοακουστικό σήμα. Η λέκιθος περικλείει την πρωτοπλασματική περιοχή που εμφανίζεται με σκούρο χρώμα στο κέντρο του αυγού.
- **Εικόνα 21b)** Το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο S2. Οι δύο κυτταρικοί πυρήνες εμφανίζονται με μαύρο χρώμα. Η πρώτη αυλάκωση των κυττάρων είναι εμφανής κάθετα στον μεγάλο άξονα του εμβρύου. Η λέκιθος και το πρωτόπλασμα έχουν παρόμοια κατανομή με αυτή του S1. Ισχυρό φωτοακουστικό σήμα ανιχνεύεται στις στενά τοποθετημένες κυτταρικές μεμβράνες των δύο ελαφρώς άνισων βλαστομερών (λευκά βέλη).
- **Εικόνα 21c)** Το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο S3, η δεύτερη αυλάκωση είναι κάθετη στην προηγούμενη και αποτελείται πλέον από 4 κύτταρα. Στην εικόνα που καταγράφηκε φαίνονται τμήματα και από τα τέσσερα διαφορετικά κύτταρα καθώς και οι γραμμές των κυτταρικών τους μεμβρανών. Οι μεμβράνες των δύο μεγαλύτερων βλαστομερών (αριστερά και δεξιά) ακουμπούν το ένα το άλλο, ενώ τα δύο μικρότερα βλαστομερή είναι διαχωρισμένα.
- **Εικόνα 21d)** Το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο S4 και αποτελείται από 8 κύτταρα. Η τρίτη αυλάκωση είναι κάθετη στο επίπεδο των δύο προηγούμενων και οδηγεί στον σχηματισμό των 4 μακρομερών (animal pole), που περιέχουν μεγάλο μέρος της λέκιθου, και 4 μικρομερών (vegetal pole) με μικρή περιεκτικότητα λεκίθου (δεν εμφανίζονται στην εικόνα). Τα λευκά βέλη δείχνουν τις κυτταρικές μεμβράνες που τα διαχωρίζουν.
- **Εικόνα 21e)** S5 με 16 κύτταρα. Ο vegetal pole γίνεται εμφανής μετά την τέταρτη αυλάκωση στο στάδιο των 16 κυττάρων, όπου τα 8 μικρομερή παρουσιάζονται ως σκούρα κύτταρα (κίτρινες κουκκίδες) και τα 8 μακρομερή παράγουν έντονο φωτοακουστικό σήμα.
- **Εικόνα 21f)** S6 (Soccerball). Τα κυτταρικά σώματα φαίνονται στην επιφάνεια του αυγού σαν λευκά κυτοπλασματικά νεφελώματα με μία κεντρική, ξεκάθαρη οπή, δηλαδή τον κυτταρικό πυρήνα. Σε αυτό το στάδιο, η περισσότερη λέκιθος φαίνεται να χωρίζεται προς το κέντρο του αναπτυσσόμενου εμβρύου (κόκκινοι αστερίσκοι). Στο κέντρο του αυγού φαίνονται πλέον λιγότερο οι πυρήνες. Το έμβρυο σχηματίζει ένα στρώμα ισομεγέθων κυττάρων χωρίς λέκιθο στην περιφέρεια του αυγού (κίτρινες κουκκίδες).

- **Εικόνα 21g) S18:** Η λέκιθος διακρίνεται ως μία λευκή μάζα που περιβάλλεται από το αναπτυσσόμενο έμβryo. Η οπίσθια κοιλιακή κάμψη γίνεται εμφανής.
- **Εικόνα 21h) (S22).** Η κοιλιακή χώρα και το στομάχι του εμβρύου έχουν σχηματιστεί πλήρως. Στην στομαχική περιοχή φαίνεται το οπισθοεντερικό proctodeum στην πίσω πλευρά του εμβρύου. Η λέκιθος στο κέντρο έχει περιβληθεί πλήρως από το έντερο. Το έμβryo έχει πλήρως επιμηκυνθεί στο μπροστά και στο κοιλιακό μέρος του. Ισχυρά φωτοακουστικά κύματα παράγονται επίσης από το περιβάλλον εντοσθιακό και σωματικό μεσόδερμα.
- **Εικόνα 21i)** Στο στάδιο S26 είναι εμφανή τα αναπτυσσόμενα ραβδομερή στη ράχη του εμβρύου. Επίσης εμφανές είναι το κάτω μέρος του εντέρου. Οι σπόνδυλοι του εμβρύου αποκτούν την τελική τους μορφή πριν την εκκόλαψη. Στο προχωρημένο αυτό στάδιο της οργανογέννεσης, η χωρική κατανομή σήματος σκιαγραφεί τους διαμήκεις και κυκλικούς μύες που περιβάλλουν το έντερο.

## 5. Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, η εργασία αυτή ανάδειξε τις δυνατότητες ενός φωτοακουστικού μικροσκοπίου στο πεδίο των συχνοτήτων με στόχο την απεικόνιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης του *Parhyale hawaiiensis*. Το μικροσκόπιο χρησιμοποιεί μία κεντρική συχνότητα διαμόρφωσης στα 9.5 MHz και τα βιολογικά δείγματα που μελετήθηκαν αφορούσαν διαφορετικά στάδια από το πρώτο κύτταρο ως και το στάδιο S26 της ανάπτυξης του εμβρύου.

Τα μονοχρωματικά φωτοακουστικά κύματα που παράχθηκαν ανιχνεύθηκαν και στη συνέχεια αναλύθηκαν, ώστε να αντλήσουμε τις τιμές του πλάτους και της φάσης. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την επιφανειακή ανακατασκευή των δειγμάτων και είχαν επαρκή ανάλυση για την άντληση βιολογικών και λειτουργικών πληροφοριών του εμβρύου, αρκετά καλό SNR, ενώ το δείγμα φάνηκε να παραμένει ανέπαφο και σταθερό, παρά τις πολλαπλές σαρώσεις. Οι εικόνες ήταν αρκετά διαυγείς και συγκρίσιμες με αυτές ενός μικροσκοπίου φθορισμού.

Η πλευρική ανάλυση του FDOM καθορίζεται από την περίθλαση της οπτικής ακτινοβολίας ενώ το βάθος απεικόνισης εξαρτάται από τη φάση του demodulator. Η ασάφεια στην φάση μπορεί να βελτιωθεί, είτε αλλάζοντας την εστίαση της δέσμης με μείωση όμως του βάθους πεδίου, είτε με την καταγραφή πολλαπλών εικόνων σε διαφορετικές συχνότητες, πράγμα που καθιστά την σάρωση πολύ πιο αργή και αυξάνει την πιθανότητα για σφάλματα λόγω μετακίνησης του δείγματος *in vivo*.

Ένας πιθανός τρόπος βελτίωσης του συστήματος θα ήταν η προσθήκη ενός δεύτερου laser με άλλη κεντρική συχνότητα, καθώς διαφορετικοί οργανισμοί περιέχουν διαφορετικούς βιολογικούς απορροφητές, και συνεπώς απορροφούν ακτινοβολία σε διαφορετικά μήκη κύματος. Η προσθήκη περισσότερων συχνοτήτων μπορεί να δώσει επίσης την δυνατότητα για αξονική ανάλυση, γεγονός αδύνατο στην περίπτωση της μοναδικής συχνότητας διαμόρφωσης.

Εναλλακτικά, το σύστημα θα μπορούσε να αναβαθμιστεί ώστε να ανιχνεύει ταυτόχρονα και σήματα φθορισμού, για παράδειγμα από διαγονιδιακούς οργανισμούς, δίνοντάς μας συμπληρωματικές εικόνες ως μία υβριδική τεχνική απεικόνισης. Στο σύντομο μέλλον προβλέπεται επίσης η ελάττωση του χρόνου σάρωσης και επεξεργασίας του δείγματος με την ενσωμάτωση ενός αλγορίθμου νευρωνικών δικτύων. Αυτός ο αλγόριθμος θα καταφέρει να αφαιρεί τον θόρυβο από τις εικόνες που λαμβάνονται χωρίς να απαιτούνται πολλαπλές σαρώσεις και μάλιστα σε πολύ λιγότερο χρόνο. Έτσι, η τεχνική γίνεται ακόμη πιο πρακτική, ενώ παράλληλα το δείγμα βρίσκεται εκτεθειμένο στην έντονη ακτινοβολία για μικρότερο χρονικό διάστημα.

Η χρήση του FDOM έχει το πλεονέκτημα της υψηλής ανάλυσης και αντίθεσης της απεικόνισης χωρίς ανάγκη για χρωστικές [1]. Επιπλέον, ένα σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι το χαμηλό

κόστος σε σχέση με τα συμβατικά μικροσκόπια που χρησιμοποιούν αρκετά ακριβές διατάξεις με Q-switched lasers και κοστίζουν εκατοντάδες χιλιάδες ευρώ. Πιο συγκεκριμένα, το φωτοακουστικό μικροσκόπιο στο πεδίο συχνοτήτων στοιχίζει μία τάξη μεγέθους λιγότερο από τα συμβατικά μικροσκόπια.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας συντελούν στην ευρύτερη υιοθέτηση της μεθόδου της φωτοακουστικής μικροσκοπίας ως εργαλείου για την διερεύνηση της ανάπτυξης άλλων οργανισμών όπως οι *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis* και άλλοι. Η ενσωμάτωση ενός τέτοιου μικροσκοπίου στην κλινική διάγνωση μπορεί να αποτελέσει σημαντική προσθήκη στις ήδη υπάρχουσες τεχνικές, όπως για παράδειγμα στη μικροσκοπία φθορισμού, ανάλογα πάντα με το είδος της εφαρμογής αλλά και το βιολογικό περιεχόμενο του δείγματος. Ο συνδυασμός της μεθόδου αυτής με την μικροσκοπία φθορισμού έχει ήδη δώσει πολύ καλά αποτελέσματα. Συνεπώς, ένα τέτοιο μικροσκόπιο μπορεί να διευρύνει περαιτέρω τις δυνατότητες απεικόνισης ιστού, σε ασθενείς και μη, καθώς και την κατανόησή μας για το πώς είναι δομημένοι και πώς λειτουργούν ορισμένοι βιολογικοί μηχανισμοί και μικροοργανισμοί.



## Πηγές

- [1] G.J. Tserevelakis, K.G. Mavrakis, N. Kakakios, and G. Zacharakis, “Full image reconstruction in frequency-domain photoacoustic microscopy by means of low-cost I/Q demodulator”, *Opt. Letters*, 46, 4718-4721 (2021) <https://doi.org/10.1364/OL.435146>
- [2] P. Mohajerani, S. Kellnberger, V. Ntziachristos, “Frequency domain optoacoustic tomography using amplitude and phase”, *Photoacoustics*, 2(3), 111–118 (2014) <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2014.06.002>
- [3] G. Langer, B. Buchegger, J. Jacak, T.A. Klar, and T. Berer, “Frequency domain photoacoustic and fluorescence microscopy,” *Biomed Opt Express*. 7(7), 2692-702 (2016) <https://doi.org/10.1364/OL.435146>
- [4] S. Kellnberger, D. Soliman, G.J. Tserevelakis, et al., “Optoacoustic microscopy at multiple discrete frequencies,” *Light Sci Appl* 7, 109 (2018) <https://doi.org/10.1038/s41377-018-0101-2>
- [5] S. Telenkov, A. Mandelis, B. Lashkari, and M. Forcht , "Frequency-domain photothermoacoustics: Alternative imaging modality of biological tissues", *Journal of Applied Physics* 105, 102029 (2009) <https://doi.org/10.1063/1.3116136>
- [6] WE. Browne, AL. Price, M. Gerberding, NH. Patel, “Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*”, *Genesis*. (2005) Jul;42(3):124-49. doi: 10.1002/gene.2014
- [7] E. Jay Rehm, et al. "The crustacean *Parhyale hawaiiensis*: a new model for arthropod development." *Cold Spring Harbor Protocols* 2009.1 (2009): pdb-emo114.doi: 10.1101/pdb.emo114. PMID: 20147009.
- [8] Z. Hosseinaee, M. Le, K. Bell, & P. H. Reza, Towards non-contact photoacoustic imaging [review], *Photoacoustics*, Volume 20, 2020, 100207, ISSN 2213-5979, <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2020.100207>.
- [9] P.M. Carvalho, M.R. Felício, N.C. Santos, S. Gonçalves, MM. Domingues. Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Front Chem*. 2018;6:237. Published 2018 Jun 25. doi:10.3389/fchem.2018.00237

- [10] S. Telenkov, A. Mandelis, “Signal-to-noise analysis of biomedical photoacoustic measurements in time and frequency domains”, *Rev.Sci. Instruments*, 81(12), 124901 (2010). <https://doi.org/10.1063/1.3505113>
- [11] S. Kellnberger, N.C. Deliolanis, D. Queirós, G. Sergiadis, and V. Ntziachristos “In vivo frequency domain optoacoustic tomography”, *Opt. Letters*, 37(16), 3423-3425 (2012). <https://doi.org/10.1364/OL.37.003423>
- [12] M. Seong, S.L. Chen, “Recent advances toward clinical applications of photoacoustic microscopy: a review”, *Sci. China Life Sci.* 63, 1798–1812 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11427-019-1628-7>
- [13] J.Yao, & L. V.Wang, “Sensitivity of photoacoustic microscopy”, *Photoacoustics*, 2(2), 87–101. (2014). doi:10.1016/j.pacs.
- [14] T. Wang, Y. Yang, U. Alqasemi, P. D.Kumavor, X.Wang, M. Sanders, M. Brewer, & Q. Zhu, Characterization of ovarian tissue based on quantitative analysis of photoacoustic microscopy images. *Biomedical optics express*, 4(12), 2763–2768 (2013). <https://doi.org/10.1364/BOE.4.002763>
- [15] D. Kao, A.G. Lai, E. Stamataki, S. Rosic, N. Konstantinides, E. Jarvis, A. Di Donfrancesco, N. Pouchkina-Stancheva, M. Semon, M. Grillo, H. Bruce, S. Kumar, I. Siwanowicz, A. Le, A. Lemire, M.B. Eisen, C. Extavour, W.E. Browne, C. Wolff, M. Averof, N.H. Patel, P. Sarkies, A. Pavlopoulos, & A. Aboobaker, “The genome of the crustacean *parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion”, *eLife*, vol. 5, no. November 2016, e20062. <https://doi.org/10.7554/eLife.20062.001>
- [16] J. Yao, and L.V. Wang, , “Photoacoustic microscopy”, *Laser & Photonics Reviews*, 7: 758-778. (2013) <https://doi.org/10.1002/lpor.201200060>
- [17] E. Lüscher, P. Korpiun, H.J. Coufal, R. Tilgner, “Photoacoustic Effect Principles and Applications”, Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, Braunschweig (1984) <https://doi.org/10.1007/978-3-663-06820-4>
- [18] X. Yang, Y.H. Chen, F. Xia, M. Sawan, “Photoacoustic imaging for monitoring of stroke diseases: A review”, *Photoacoustics*. 2021;23:100287. Published 2021 Jul 24. doi:10.1016/j.pacs.2021.100287
- [19] L. V. Wang, & H. Wu, *Biomedical optics: Principles and imaging*. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience (2007).
- [20] Research center for non-destructive testing GMBH, <https://www.recendt.at/en/PA.html>

- [21] E. Stamatakis, A. Pavlopoulos, Non-insect crustacean models in developmental genetics including an encomium to *Parhyale hawaiiensis*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 39 (2016) 149-156. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.07.004>.
- [22] J. Rallis, K. Gintan, A. Pavlopoulos, Chapter 16 - *Parhyale hawaiiensis*, Crustacea, in: A. Boutet and B. Schierwater (Eds.) *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology: Established and Emerging*, CRC Press, Boca Raton, Florida (2021).
- [23] A. Pavlopoulos, Z. Kontarakis, D.M. Liubicich, J.M. Serano, M. Akam, N.H. Patel, M. Averof, Probing the evolution of appendage specialization by hox gene misexpression in an emerging model crustacean. *PNAS*, 106 (2009) 13897-13902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902804106>
- [24] F. Alwes, C. Enjolras, M. Averof, 2016. Live imaging reveals the progenitors and cell dynamics of limb regeneration. *ELife*, 5:e19766 <https://doi.org/10.7554/eLife.19766>
- [25] F. Alwes, B. Hinchey, C.G. Extavour, Patterns of cell lineage, movement, and migration from germ layer specification to gastrulation in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Dev. Biol.*, 359 (2011) 110-123 <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.07.029>
- [26] C. Wolff, J-Y. Tinevez, T. Pietzsch, E. Stamatakis, B. Harich, L. Guignard, S. Preibisch, S. Shorte, P. J. Keller, P. Tomancak, A. Pavlopoulos, 2018. Multi-view light-sheet imaging and tracking with the MaMuT software reveals the cell lineage of a direct developing arthropod limb. *ELife*, 7:e34410 <https://doi.org/10.7554/eLife.34410>
- [27] A.P. Ramos, O. Gustafsson, N. Labert, I. Salecker, D.E. Nilsson, M. Averof, 2019. Analysis of the genetically tractable crustacean *Parhyale hawaiiensis* reveals the organisation of a sensory system for low-resolution vision. *BMC Biol.*, 17,67 <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0676-y>
- [28] H.S. Bruce, N.H. Patel, Knockout of crustacean leg patterning genes suggests that insect wings and body walls evolved from ancient leg segments. *Nat. Ecol. Evol.* 4 (2020) 1703-1712 <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01349-0>
- [29] Z. Kontarakis, A. Pavlopoulos, Transgenesis in Non-Model Organisms: The Case of *Parhyale*. *Methods mol. biol.*, 1196 (2014) 145–81 [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1242-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1242-1_10)
- [30] G.J. Tserevelakis, G. Zacharakis, High precision photoacoustic interferometer for the determination of the speed of sound in liquid media. *Opt. Expr.*, 30 (2022) <https://doi.org/10.1364/OE.455557>
- [31] M. Erfanzadeh, Q. Zhu, Photoacoustic imaging with low-cost sources; A review. *Photoacoustics*, 14 (2019) 1-11 <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2019.01.004>

[32] H. Zhong, T. Duan, H. Lan, M. Zhou, F. Gao, 2018. Review of low-cost photoacoustic sensing and imaging based on laser diode and light-emitting diode. *Sensors (Switzerland)*, 18, 2264 <https://doi.org/10.3390%2Fs18072264>

[33] O. Hugon, B. van der Sanden, M. Inglebert, O. Jacquin, C. Misbah, E. Lacot, Multi-wavelength photo-acoustic microscopy in the frequency domain for simultaneous excitation and detection of dyes. *Biomed. Opt. Express*, 10 (2019) 932-943. <https://doi.org/10.1364/BOE.10.000932>

[34] Tserevelakis GJ, Velentza S, Liaskas I, Archontidis T, Pavlopoulos A, Zacharakis G. Imaging *Parhyale hawaiiensis* embryogenesis with frequency domain photoacoustic microscopy: A novel tool in developmental biology. *J Biophotonics*. 2022 Sep 4:e202200202. doi: 10.1002/jbio.202200202.