



Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών,
Τμήμα Βιολογίας



Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας
Ερευνητικό Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ (IESL)
Εργαστήριο Βιοφωτονικής και Μοριακής Απεικόνισης

Πτυχιακή εργασία

**In vivo απεικόνιση της ανάπτυξης εμβρύων *Parhyale hawaiiensis* με
την χρήση υβριδικής confocal και φωτοακουστικής μικροσκοπίας**

Ευτυχία Καζάση

A.M. 3350

Επιστημονικά Υπεύθυνος: Δρ. Γεώργιος Τσερεβελάκης
Υπεύθυνο μέλος ΔΕΠ Τμήματος Βιολογίας: Καθηγητής Μιχαήλ Παυλίδης
Υπεύθυνος Εργαστηρίου υποδοχής: Δρ. Ιωάννης Ζαχαράκης

Ηράκλειο Κρήτης 2024

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ιωάννη Ζαχαράκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεξαχθεί η εργασία μου στο εργαστήριο Βιοφωτονικής και Μοριακής Απεικόνισης όπου είναι υπεύθυνος, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Γεώργιο Τσερεβελάκη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια, τον χρόνο που αφιέρωσε και την γενικότερη συμπαράστασή του τόσο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης όσο και κατά τη συγγραφή της πτυχιακή εργασίας.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Μιχαήλ Παυλίδη (Μέλος ΔΕΠ Τμήματος Βιολογίας) που δέχτηκε να είναι μέλος της επιτροπής αξιολόγησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αναστάσιο Παυλόπουλο, υπεύθυνο του εργαστηρίου Ανάπτυξης και Μορφογένεσης, για την πολύτιμη βοήθειά του στην ερμηνεία της βιολογικής πληροφορίας.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στον συμφοιτητή μου Γεώργιο Βλάχο, για την συνεργασία όλο αυτό το διάστημα και την προετοιμασία των δειγμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και τους φίλους μου που ήταν δίπλα μου όλο αυτό τον καιρό.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	7
1.1 Γιατί επιλέχθηκε ο οργανισμός <i>Parhyale hawaiensis</i> για την παρούσα επιστημονική μελέτη;	7
1.2 Φυσικό περιβάλλον και κύκλος ζωής.....	7
1.3 Μορφολογία.....	8
1.4 Γονιδίωμα.....	8
1.5 Live απεικόνιση εμβρύων <i>Parhyale hawaiensis</i>	9
2. Υλικά και Μέθοδοι	10
2.1 Προετοιμασία δειγμάτων	10
2.1.1 Συλλογή εμβρύων	10
2.1.2 Επιλογή εμβρύων για πειράματα	10
2.1.3 Μέθοδος mounting.....	11
2.2 Περιγραφή διάταξης (set-up)	11
2.2.1 Το υβριδικό μικροσκόπιο	11
2.2.2 Επεξεργασία εικόνων.....	15
2.2.3 Φωτοακουστικό φαινόμενο – Αρχές	16
2.2.4 Φθορισμός.....	17
3. Αποτελέσματα	20
3.1 Υβριδική live in vivo απεικόνιση label free εμβρύων <i>Parhyale Hawaiensis</i>	20
3.2 Υβριδική live in vivo απεικόνιση σημασμένων εμβρύων <i>Parhyale Hawaiensis</i>	22
3.3 Χαρακτηρισμός του υβριδικού συστήματος απεικόνισης ως προς την απόδοση παραγωγής σήματος PA και την πλευρική χωρική ανάλυση	27
4. Συζήτηση	30
5. Βιβλιογραφία	34

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του υβριδικού confocal fluorescence και FDPA μικροσκοπίου	14
Εικόνα 2: Το υβριδικό μικροσκόπιο φθορισμού και φωτοακουστικής μικροσκοπίας στο εργαστήριο	15
Εικόνα 3: Σχεδιαγραμματική περιγραφή του φωτοακουστικού φαινομένου	16
Εικόνα 4: Κυματομορφή φωτοακουστικού σήματος	16
Εικόνα 5: Μετατόπιση Stokes	18
Εικόνα 6: Διάγραμμα Jablonski	18
Εικόνα 7: Υβριδική απεικόνιση μη σημασμένων εμβρύων <i>Parhyale hawaiensis</i>	21
Εικόνα 8: Σχηματισμός πεπτικού συστήματος	22
Εικόνα 9: Φωτοακουστικές εικόνες της ίδιας μέτρησης όπου απεικονίζεται η σταδιακή σχηματοποίηση της λεκίθου και η εμφάνιση των ορίων του μεσενδοδέρματος, που υπάρχει μόνο κατά το στάδιο της γαστριδίωσης	23
Εικόνα 10: Σχηματισμός μεσεντέρου και διεύρυνση dorsal organ	24
Εικόνα 11: Αλλαγές στην οργάνωση της λεκίθου	24
Εικόνα 12: Σχηματισμός dorsal organ (συγκέντρωση των κυττάρων σε ένα δακτύλιο και αύξηση του μεγέθους τους)	25
Εικόνα 13: Μετακίνηση της λεκίθου και δημιουργία εγκόλπωσης που ενδεχομένως σχετίζεται με κάποια φυσική αλληλεπίδραση του dorsal organ με το eggshell του εμβρύου (άσπρο πλαίσιο)	25
Εικόνα 14: Συμπληρωματικότητα στην πληροφορία που συλλέγεται από τα δύο φαινόμενα, με την απουσία της λεκίθου στην φωτοακουστική εικόνα (δεξιά) στο σημείο που εντοπίζεται το dorsal organ στην εικόνα φθορισμού (αριστερά)	26
Εικόνα 15: Χρονικός και χωρικός χαρακτηρισμός των δεσμών διέγερσης	27

Περίληψη

Το αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis*, της ευρύτερης κατηγορίας των καρκινοειδών, αποτελεί ανερχόμενο πρότυπο οργανισμό μοντέλο για αναπτυξιακές, γενετικές και εξελικτικές αναλύσεις. Πρόσφατα, πληθώρα τεχνικών οπτικής μικροσκοπίας, κυρίως βασιζόμενες στον φθορισμό, έχουν αξιοποιηθεί για την μελέτη του παρυάλου σχετικά με τα ανατομικά χαρακτηριστικά του, τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης που ακολουθεί και την ανακατασκευή των κυτταρικών σειρών του. Αποσκοπώντας στην λήψη επιπλέον πληροφοριών, γίνεται πρόταση για ένα νέο χαμηλού κόστους υβριδικό σύστημα απεικόνισης που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά του φθορισμού και της frequency-domain φωτοακουστικής μικροσκοπίας, καταγράφοντας ταυτόχρονα τόσο τις ακτινοβολιτικές όσο και τις μη ακτινοβολιτικές μοριακές χαλαρώσεις, μετά από διέγερση των δειγμάτων από μια πηγή λέιζερ ρυθμιζόμενης έντασης. Το υβριδικό μικροσκόπιο αξιολογείται ως προς την ικανότητα του για in vivo απεικόνιση αγρίου τύπου και σημασμένων με φθορίζουσες χρωστικές εμβρύων *Parhyale* που βρίσκονται σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Οι δύο τεχνικές απεικόνισης που συνδυάζονται δίνουν εξαιρετικά συμπληρωματική πληροφορία σχετικά με την θέση των κυττάρων, την κατανομή της λεκίθου σε αυτά, την κίνηση των πυρήνων, τις κυτταρικές μεμβράνες και την συμπεριφορά των διαφόρων δομών των κυττάρων κατά την εμβρυογένεση. Τα ευρήματα από αυτή την μελέτη θα βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση του ανερχόμενου οργανισμού μοντέλου *Parhyale hawaiiensis* και μπορούν να σταθούν ως η αρχή για την ευρύτερη υιοθέτηση φθινών υβριδικών μεθόδων οπτικής και φωτοακουστικής μικροσκοπίας στην αναπτυξιακή βιολογία, αναβαθμίζοντας έτσι σημαντικά τις δυνατότητες των τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται σήμερα.

Λέξεις-κλειδιά: in vivo, label-free, *Parhyale hawaiiensis*, εμβρυογένεση, αναπτυξιακή βιολογία, λέκίθος, φθορισμός, φωτοακουστική μικροσκοπία, υβριδική απεικόνιση

Abstract

The amphipod *Parhyale hawaiiensis*, belonging to the broader category of crustaceans, serves as an emerging model organism for developmental, genetic, and evolutionary analyses. Recently, a plethora of optical microscopy techniques, primarily fluorescence-based, have been employed to study *Parhyale* regarding its anatomical features, patterns of gene expression, and reconstruction of cell lineages. Aiming to gather additional information, a proposal is made for a new low-cost hybrid imaging system that combines features of fluorescence and frequency-domain photoacoustic microscopy, simultaneously recording both radiative and radiationless molecular relaxations after the sample excitation from an intensity-modulated laser source. The hybrid microscope is evaluated for its ability to provide *in vivo* imaging of wild-type unlabeled and fluorescently labeled *Parhyale* embryos at different developmental stages. The two combined imaging techniques offer highly complementary information regarding cell positioning, yolk distribution within them, nucleus movement, cell membranes, and the behavior of various cell structures during embryogenesis. Findings from this study will aid in a better understanding of the emerging model organism *Parhyale hawaiiensis* and can serve as a starting point for the wider adoption of affordable hybrid optical and photoacoustic microscopy methods in developmental biology, thus significantly enhancing the capabilities of the technologies used today.

Keywords: *in vivo*, label-free, *Parhyale hawaiiensis*, embryogenesis, developmental biology, yolk, fluorescence, photoacoustic microscopy, hybrid imaging

1. Εισαγωγή

1.1 Γιατί επιλέχθηκε ο οργανισμός *Parhyale hawaiiensis* για την παρούσα επιστημονική μελέτη;

Το αμφίποδο *Parhyale hawaiiensis* ανήκει στα καρκινοειδή, που είναι μια μεγάλη ταξινομική ομάδα της συνομοταξίας των αρθροπόδων. Τα καρκινοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εξωομάδα των εντόμων και με τον τρόπο αυτό να συντελέσουν στην κατανόηση της εξέλιξης των αρθροπόδων. Ο οργανισμός *Parhyale hawaiiensis* αποτελεί ανερχόμενο πειραματικό μοντέλο για αναπτυξιακές, γενετικές και εξελικτικές αναλύσεις και δίνει την δυνατότητα να καλυφθούν ταξινομικά κενά σε τωρινές ανάλογες μελέτες. Η μελέτη του αμφιπόδου *Parhyale hawaiiensis* έχει εξέχουσα σημασία για τον τομέα της βιολογίας, καθώς σε όλα τα αμφίποδα λείπουν σε μεγάλο βαθμό λεπτομερείς πληροφορίες για τα αναπτυξιακά στάδια που ακολουθούν κατά την πορεία της εμβρυογένεσης [1].

Υπάρχουν πολλοί λόγοι που καθιστούν τον οργανισμό *Parhyale hawaiiensis* ιδανικό πειραματικό μοντέλο για αναπτυξιακές και άλλου τύπου μελέτες. Ως μέλος της ομάδας των καρκινοειδών, φέρει μια πληθώρα ποικίλων σωματικών εξαρτημάτων που συνεισφέρουν στην ανακάλυψη αναπτυξιακών και εξελικτικών διαφορών ανάμεσα στα είδη [2][3]. Επίσης έχει αρκετά μικρό μέγεθος, της τάξης των 2cm και μικρότερο, με αποτέλεσμα να μπορεί να διατηρηθεί με μεγάλη ευκολία σε πυκνές καλλιέργειες στο εργαστήριο. Είναι πολύ ανθεκτικός οργανισμός σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών θερμοκρασίας, αλατότητας και ποιότητας νερού. Τα αναπτυσσόμενα έμβρυα *Parhyale hawaiiensis* είναι οπτικά διαφανή και συνεπώς επιτρέπουν λεπτομερή μικροσκοπική ανάλυση in situ και την χρήση φθοροφόρων μορίων για την απεικόνισή τους σε πραγματικό χρόνο in vivo [1]. Πλεονεκτήματα του οργανισμού είναι επίσης ο σχετικά μικρός χρόνος γενεάς, το χαμηλό κόστος συντήρησης και ανάπτυξής του στο εργαστήριο και η καθημερινή διαθεσιμότητα σε εκατοντάδες έμβρυα όλων των επιθυμητών σταδίων, καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου [4].

1.2 Φυσικό περιβάλλον και κύκλος ζωής

Ο παρύαλος έχει παγκόσμια κατανομή και ζει σε δια- και μέσο- παλιρροιακά νερά στις τροπικές περιοχές του Ειρηνικού, της Ινδίας και της Βραζιλίας και σε βραχώδεις περιοχές και λιβάδια φυκιών σε ρηχούς θαλάσσιους βιότοπους όπως είναι οι εκβολές ποταμών και οι κόλποι. Επίσης, κάνουν μεγάλους και πυκνούς πληθυσμούς σε μαγγρόβια δάση, περιβάλλοντα με απότομες αλλαγές στην αλατότητα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως τα άτομα *Parhyale hawaiiensis* έχουν μεγάλη αντοχή απέναντι στις μεγάλες και γρήγορες θερμοκρασιακές και ωσμωτικές αλλαγές και αλλαγές στην διαθεσιμότητα θρεπτικών που επικρατούν στα θαλάσσια περιβάλλοντα που ζουν, γεγονός που τα κάνει ιδανικά για την διατήρησή τους στο εργαστήριο [1][2][4][5].

Χαρακτηρίζεται ως σαπροφάγος/παρασιτοφάγος οργανισμός, τρεφόμενος με υπολείμματα οργανικής ύλης. Το μέγεθος του πληθυσμού του ποικίλει κατά την διάρκεια του χρόνου και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Σε ευνοϊκές συνθήκες υπάρχει ταχεία αύξηση του πληθυσμού, η οποία ενισχύεται από την συνεχή

αναπαραγωγική ικανότητα (γεννήσεις όλο τον χρόνο), την αναλογία φύλων που έχει μεγαλύτερη κλίση προς τα θηλυκά άτομα και το φαινόμενο του πολυβολτινισμού, σύμφωνα με το οποίο γεννιούνται πολλοί γόννοι σε ένα χρόνο [4]. Παρόλο τον μικρό αριθμό απογόνων ανά γέννα, ο τελικός αριθμός γόνων στον πληθυσμό είναι αρκετά μεγάλος λόγω της σχετικά γρήγορης σεξουαλικής ωρίμανσής τους σε ενήλικα άτομα και την μικρή θνησιμότητα των εμβρύων, τα οποία προστατεύονται σε ειδικό κοιλιακό σάκο που φέρουν τα θηλυκά άτομα [2][4].

1.3 Μορφολογία

Τα ενήλικα άτομα *Parhyale hawaiiensis* εμφανίζουν στο σώμα τους ένα τμηματικό μοτίβο οργάνωσης, συνηθισμένο στα μαλακόστρακα καρκινοειδή, που περιλαμβάνει τις δομές της κεφαλής, του θώρακα (pereon) και της κοιλιάς (pleon) τα οποία φέρουν συγκεκριμένο αριθμό τμημάτων. Στην περιοχή της κεφαλής τοποθετούνται αισθητήριες κεραίες και εξαρτήματα για την συλλογή τροφής. Κάθε τμήμα του κυρίου σώματος διαθέτει ένα ζευγάρι εξαρτημάτων, των οποίων η σωστή θέση καθορίζεται από μια οικογένεια γονιδίων, ορθόλογων των Hox που εμφανίζονται στην *Drosophila*, ονόματι Ultrabithorax (Ubx), που εκφράζονται κατά μήκος του πρόσθιου-οπίσθιου άξονα του εμβρύου [5]. Κατά μήκος του εγγύς και άπω άξονα των άκρων εμφανίζεται επίσης μια τμηματοποίηση που ελέγχεται από μια ομάδα εξελικτικά συντηρημένων γονιδίων που υπάρχουν σε όλα τα αρθρόποδα. Η συντηρημένη αυτή ομάδα γονιδίων είναι ο κρίκος που συνδέει εξελικτικά τα έντομα με τα αρθρόποδα, λόγω του κοινού αυτού μοτίβου στα πόδια.

Όσον αφορά την μορφολογία των εμβρύων *Parhyale hawaiiensis*, αυτά περιβάλλονται από ένα διαφανές κέλυφος αυγού αλλά στο εσωτερικό τους περιέχουν τον κρόκο που είναι αδιαφανής στο ορατό φως [6]. Η πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη των ατόμων λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του αυγού, δημιουργώντας μια αντίθεση μεταξύ του εμβρύου και του υποκείμενου αδιαφανούς κρόκου που είναι αρχικά συγκεντρωμένος στο κέντρο του εμβρύου και στην συνέχεια απομονώνεται στο αναπτυσσόμενο έντερο [4]. Τα έμβρυα του παρυάλου έχουν μήκος περίπου 500 μm . Τα δύο πολικά σωμάτια είναι ορατά ως φωτεινά σημεία στην επιφάνεια του αυγού και η θέση τους συμβάλει στον προσδιορισμό του φυτικού και ζωικού πόλου. Όλη η διαδικασία της εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι χωρισμένη σε 30 στάδια, από το στάδιο 1 που το έμβρυο είναι ενός κυττάρου έως το στάδιο 30 που γίνεται εκκόλαψη [1].

1.4 Γονιδίωμα

Η έλλειψη γνώσεων και για το γονιδίωμα του *Parhyale hawaiiensis* οδήγησε τους ερευνητές στην αλληλούχιση, τον σχολιασμό (annotation) και την ανακατασκευή από μικρότερα τμήματα DNA (assembly) του γονιδιώματος. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε στο γενετικό υλικό που απομονώθηκε από ένα ενήλικο αρσενικό άτομο, το οποίο πάρθηκε από μια σειρά προερχόμενη από ένα μόνο θηλυκό άτομο μετά από δύο γύρους ζευγαρώματος. Το μέγεθος του γονιδιώματος υπολογίστηκε ότι είναι 3,6 Gb που το κατατάσσει σε ένα από τα μεγαλύτερα γονιδιώματα στο ζωικό βασίλειο, με το γενετικό υλικό να είναι κατανομημένο σε 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων. Εκτός από το μεγάλο του μέγεθος, το γονιδίωμα του *Parhyale* φέρει ένα μεγάλο αριθμό επαναλήψεων και πολυμορφισμών, καθώς εμφανίζει και υψηλά επίπεδα

ετεροζυγωτίας. Στόχος της αλληλούχισης και της ανασυγκρότησης του γονιδιώματος είναι να βρεθούν γενετικά χαρακτηριστικά που θα αποτελέσουν κλειδιά στην έρευνα για τον παρύαλο [7].

1.5 Live απεικόνιση εμβρύων *Parhyale hawaiiensis*

Η χρήση τεχνικών μικροσκοπίας για την live in vivo απεικόνιση των εμβρύων *Parhyale hawaiiensis* προσφέρει κατάλληλες συνθήκες παρατήρησης ολόκληρης της διαδικασίας ανάπτυξης, ξεκινώντας από ένα κύτταρο και συνεχίζοντας στα επόμενα στάδια. Τελευταία, η ανάπτυξη διαγονιδιακών σειρών εμβρύων, η διαθεσιμότητα πληθώρας φθορίζουσων χρωστικών για την σήμανση των κυττάρων, σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος και την διαφάνεια που χαρακτηρίζει τα έμβρυα *Parhyale*, καθιστούν τον οργανισμό αυτό ιδανικό για εύκολη παρατήρηση της ανάπτυξης [2][5]. Παράλληλα με την θέσπιση του οργανισμού *Parhyale hawaiiensis* ως ιδανικό οργανισμό μοντέλο για αναπτυξιακές, γενετικές και περιβαλλοντικές μελέτες, γίνεται προσπάθεια υιοθέτησης ενός πιο κατάλληλου και ευέλικτου μηχανισμού απεικόνισης. Τεχνικές μικροσκοπίας όπως μικροσκοπία φθορισμού (widefield), συνεστιακή μικροσκοπία (confocal), μικροσκοπία φθορισμού λεπτού φύλλου (SPIM) και ηλεκτρονική μικροσκοπία έχουν ήδη βρει εφαρμογή σε πληθώρα πειραμάτων και αναλύσεων. Στην μελέτη αυτή γίνεται πρόταση ενός νέου οικονομικού υβριδικού απεικονιστικού συστήματος, που αξιοποιεί frequency domain φωτοακουστική μικροσκοπία (FDPA) και παραδοσιακή μικροσκοπία φθορισμού (confocal) [6].

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι, πρώτον η αξιολόγηση του νέου αυτού υβριδικού συστήματος απεικόνισης που ενσωματώνει FDPA και παραδοσιακές μεθόδους συνεστιακής μικροσκοπίας, ως προς τις εφαρμογές που μπορεί να αξιοποιηθεί και δεύτερον η συλλογή νέων βιολογικών πληροφοριών που αφορούν στην αναπτυξιακή και στα εμβρυικά στάδια που χαρακτηρίζουν τον οργανισμό μοντέλο *Parhyale hawaiiensis*. Τα πειράματα αυτής της μελέτης πραγματοποιήθηκαν τόσο σε μη σημασμένα όσο και σε σημασμένα με φθορισμό έμβρυα *Parhyale*, in-vivo. Αποδεικνύεται ότι ο συνδυασμός των δύο μηχανισμών αντίθεσης που προκύπτουν από τη μοριακή αποδιέγερση χωρίς ακτινοβολία (FDPA) και τη μοριακή αποδιέγερση με ακτινοβολία (φθορισμός) προσφέρει εξαιρετικά συμπληρωματικές διαγνωστικές πληροφορίες, οι οποίες μπορεί να είναι πολύτιμες για τη διαλεύκανση διαφόρων θεμελιωδών βιολογικών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του οργανισμού.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η εμβρυογένεση του παρυάλου διαρκεί συνολικά 10 μέρες (250 h) στους 26 °C και είναι χωρισμένη σε 30 εμβρυικά στάδια, ενώ η διάρκεια της κάθε γενεάς είναι περίπου 6-8 εβδομάδες όταν τα άτομα είναι διατηρημένα μεταξύ 26-28 °C στο εργαστήριο. Τα έμβρυα αναπτύσσονται άμεσα και εκκολάπτονται μορφολογικά πανομοιότυπα με τα ενήλικα άτομα [1]. Τα ενήλικα άτομα είναι ανθεκτικά στις περιβαλλοντικές αλλαγές θερμοκρασίας και αλατότητας και συνεπώς μπορούν να διατηρηθούν εύκολα σε πυκνές εργαστηριακές καλλιέργειες, με μόνη βασική προϋπόθεση τον συνεχή αερισμό των καλλιεργειών με αντλίες λόγω της μικρής ανθεκτικότητας των ατόμων σε υποξικές συνθήκες [4]. Το γεγονός αυτό καθιστά τα έμβρυα *Parhyale* ιδανικά για μια πληθώρα πειραματικών χειρισμών.

2.1.1 Συλλογή εμβρύων

Τα αυγά μπορούν εύκολα να αφαιρεθούν από το θηλυκό άτομο, χωρίς αυτό να τραυματιστεί και στην συνέχεια διατηρούνται σε πιάτα Petri με αποστειρωμένο αλμυρό νερό. Σε ένα μείγμα 10 μL γαρυφαλέλαιου και 50 mL φιλτραρισμένου θαλασσινού νερού μεταφέρονται τα θηλυκά άτομα *Parhyale hawaiiensis* που φέρουν έμβρυα στον κοιλιακό σάκο, με σκοπό την αναισθητοποίησή τους. Μετά από ανακίνηση, αφαιρούνται τα αναισθητοποιημένα πλέον θηλυκά άτομα και μεταφέρονται σε μία σταγόνα μείγματος γαρυφαλέλαιου και αποστειρωμένου θαλασσινού νερού σε ένα τρυβλίο Petri που έχει επιστρωθεί με ειδικής μορφής σιλκόνη (Sylgard). Η μετακίνηση και ο χειρισμός των θηλυκών ατόμων μπορεί να γίνει είτε με λαβίδες είτε με πιπέτες που το άκρο τους έχει κοπεί κατάλληλα για να επιτρέπει την ελεύθερη κίνηση των ατόμων. Τα θηλυκά άτομα τοποθετούνται στην συνέχεια στην βάση στερεοσκοπίου, έχοντας εκτεθειμένη προς τα πάνω την κοιλιακή θήκη όπου υπάρχουν τα έμβρυα και ακινητοποιούνται στην θέση αυτή με την χρήση λαβίδων. Γίνεται εξαγωγή των εμβρύων από την θήκη, περνώντας το αμβλύ άκρο μιας πιπέτας Pasteur στην κοιλιακή χώρα των ατόμων με κατεύθυνση από πίσω προς τα εμπρός σε όλο το μήκος της θήκης (posterior-to-anterior direction). Τα έμβρυα που συλλέγονται, απομακρύνονται και καθαρίζονται με 3-4 αλλαγές αποστειρωμένου θαλασσινού νερού και στην συνέχεια διατηρούνται σε ειδικούς δίσκους καλλιέργειας μέσα σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Τα ενήλικα θηλυκά άτομα μεταφέρονται σε νέο θαλασσινό νερό, μέχρι να ξαναβρούν πλήρως τις αισθήσεις τους και να μεταφερθούν πίσω στις δεξαμενές με τα υπόλοιπα αμφίποδα [8].

2.1.2 Επιλογή εμβρύων για πειράματα

Ένα κομμάτι των πειραμάτων αφορούσε μη σημασμένα δηλαδή label free έμβρυα, τα οποία συλλέχθηκαν από αγρίου τύπου (wild type) εργαστηριακές καλλιέργειες, για να πραγματοποιηθεί η απεικόνιση της αναπτυξιακής τους πορείας χωρίς την χρήση κάποιου φθοροφόρου. Για το δεύτερο μέρος των πειραμάτων για την λήψη συμπληρωματικών ή νέων πληροφοριών για την εμβρυογένεση του *Parhyale* χρησιμοποιήθηκαν σημασμένα έμβρυα. Τα έμβρυα αυτά πάρθηκαν από την διαγονιδιακή σειρά *PhHS > H2B-mRFP* και εκφράζουν

μια θερμοεπαγόμενη, μονομερή κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη που έχει συζευχθεί με την ιστόνη H2B της *Drosophila* για την γενετική επισήμανση όλων των πυρήνων. Για να παραχθεί η *PhHS > H2B-mRFP* διαγονιδιακή σειρά ατόμων *Parhyale* και να γίνει επισήμανση με φθορισμό της χρωματίνης και άρα των πυρήνων των ατόμων, έγινε σύντηξη των κωδικών αλληλουχιών της ιστόνης H2B της *Drosophila* και της *mRFP* μονομερής κόκκινης φθορίζουσας χρωστικής. Η νέα αυτή αλληλουχία DNA τέθηκε υπό τον έλεγχο ενός θερμικά επαγόμενου υποκινητή του οργανισμού *Parhyale*. Τα άτομα της διαγονιδιακής σειράς υπόκεινται σε θερμικό σοκ για μία ώρα στους 37 °C ώστε να επαχθεί η έκφραση της φθορίζουσας χρωστικής. Ο πυρηνικός φθορισμός H2B-mRFP εμφανίζει πικ περίπου στις 12 ώρες μετά το θερμικό σοκ και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα μέχρι και 24 ώρες μετά, σε όλα τα κύτταρα και σε όλη της διάρκεια του κυτταρικού κύκλου [6][9].

2.1.3 Μέθοδος mounting

Τόσο τα μη σημασμένα αγρίου τύπου έμβρυα όσο και τα σημασμένα έμβρυα από την διαγονιδιακή σειρά *PhHS > H2B-mRFP*, για να είναι εφικτό να παρατηρηθούν, υποβάλλονται σε μια διαδικασία που ονομάζεται mounting. Επιλεγμένα έμβρυα στο κατάλληλο/επιθυμητό εμβρυικό στάδιο τοποθετούνται στο τζαμάκι του ειδικά κατασκευασμένου sample holder και τους προστίθεται μια σταγόνα 0,7 % w/v αργής τήξης αγαρόζη που έχει παρασκευαστεί σε φιλτραρισμένο τεχνητό θαλασσίνο νερό στους 40 °C. Με λεπτούς χειρισμούς με την χρήση λεπίδων τα έμβρυα τοποθετούνται στην επιθυμητή θέση για παρατήρηση, στην διάρκεια του μισού λεπτού που θέλει η αγαρόζη για να κρυώσει και να πήξει. Μετά από 5-10 λεπτά από την τοποθέτηση της σταγόνας της αγαρόζης, η οποία έχει γίνει πλέον μιας μορφής gel, προστίθεται στο sample holder φιλτραρισμένο τεχνητό θαλασσίνο νερό και τα έμβρυα είναι πλέον έτοιμα για παρατήρηση [6][11].

2.2 Περιγραφή διάταξης (set-up)

Ο οργανισμός *Parhyale hawaiiensis* αποτελεί ιδανικό οργανισμό μοντέλο για συγκριτικές εξελικτικές και αναπτυξιακές μελέτες, μέσω live απεικόνισης των αναπτυσσόμενων εμβρύων με ένα νέο οικονομικό υβριδικό μικροσκόπιο που συνδυάζει φθορισμό και φωτοακουστικό φαινόμενο. Σκοπός είναι η διερεύνηση διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων τόσο σε μη σημασμένα (label-free) όσο και σε σημασμένα από φθορίζουσες ουσίες έμβρυα *Parhyale* in vivo, αξιοποιώντας την υψηλή χωρική ανάλυση και αντίθεση που δημιουργείται από τον συνδυασμό μη ακτινοβολιακών (FDPA) και ακτινοβολιακών (φθορισμός) μοριακών χαλαρώσεων, που οδηγεί στην λήψη εξαιρετικά συμπληρωματικών πληροφοριών [6][11].

2.2.1 Το υβριδικό μικροσκόπιο

Το υβριδικό μικροσκόπιο φθορισμού και frequency domain φωτοακουστικού φαινομένου (**Εικόνα 1**) περιλαμβάνει δυο πηγές λέιζερ συνεχούς κύματος (CW) που εκπέμπουν ορατή ακτινοβολία στα 488 nm (MDL-III-488, CNI, Changchun, China; maximum optical power: 100 mW) και 532 nm (CW532-04-80, Roithner Lasertechnik GmbH, Wien, Austria; maximum optical power: 80 mW) αντίστοιχα. Το επιθυμητό μήκος κύματος διέγερσης για την μέτρηση επιλέγεται μέσω ενός αναδιπλούμενου καθρέπτη flip mount (FMM), ο οποίος είναι

τοποθετημένος στο σημείο που συναντιούνται τα μονοπάτια των δύο δεσμών λέιζερ. Ένας θετικός φακός (L1) εστιάζει την επιλεγμένη δέσμη λέιζερ στο ενεργό άνοιγμα ενός free space ακουστοπτικού διαμορφωτή (AOM; TEM-200-50, Brimrose, Sparks Glencoe, MD, USA), που διαμορφώνει χρονικά την στιγμιαία ένταση της ακτινοβολίας. Για την αναλογική διαμόρφωση, εφαρμόζεται στον ακουστοπτικό διαμορφωτή μια ημιτονοειδής τάση με επιλεγμένη συχνότητα 9.5 MHz από μια γεννήτρια σημάτων (FG; DG5252, Rigol, Beaverton, OR, USA). Η δέσμη λέιζερ που εξέρχεται από τον ακουστοπτικό διαμορφωτή στην συνέχεια ευθυγραμμίζεται και συγκεντρώνεται από ένα δεύτερο θετικό φακό (L2) και φιλτράρεται μέσω ενός μικρού ανοίγματος (AP) με διάμετρο 5 mm για να απομονωθεί το μέγιστο της πρώτης τάξης περίθλασης, που αντιστοιχεί στην επιθυμητή ακτινοβολία διέγερσης. Η μεταβαλλόμενη έντασης δέσμη λέιζερ διέρχεται από ένα διχροϊκό καθρέπτη (DM; MSR-5051, UQG Optics, Cambridge, UK) και καθοδηγείται στην συνέχεια από ένα γαλβανομετρικό σαρωτή (GMS; SG2203, Sino-Galvo, Zhenjiang City, China) λόγω του οποίου επιτυγχάνεται πιο γρήγορη λήψη εικόνας. Ένα οπτικό τηλεσκόπιο 4f που αποτελείται από δύο θετικούς φακούς, τους L3 και L4, χρησιμοποιείται για να επεκτείνει την δέσμη του λέιζερ (~2,3×) πριν αυτή ανακλαστεί από ένα ευρυζωνικό κάτοπτρο (M) προς ένα τροποποιημένο ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο (Diaphot, Nikon, Tokyo, Japan). Ο αντικειμενικός φακός του μικροσκοπίου (OL; Plan Infinity 10X, Cnscope, Beijing, China; numerical aperture: 0.25) εστιάζει το φως στα έμβρυα *Parhyale hawaiiensis* (E) που έχουν τοποθετηθεί στον πυθμένα ενός ειδικά κατασκευασμένου δοχείου με οπτικά διαφανή βάση (SH), που είναι γεμάτο με τεχνητό θαλασσινό νερό. Ο δειγματοφορέας αυτός μπορεί να κινηθεί με ειδικό μοχλό στον XY άξονα ώστε να βρεθούν τα έμβρυα στην κατάλληλη θέση ως προς την δέσμη λέιζερ και επίσης ο αντικειμενικός φακός με την σειρά του μπορεί να κινηθεί στον άξονα Z για να βρεθεί το κατάλληλο εστιακό επίπεδο. Τα φωτοακουστικά κύματα που παράγονται, ανιχνεύονται από ένα σφαιρικά εστιασμένο πιεζοηλεκτρικό μετατροπέα υπερήχων (UT; A312S-N-SU, Olympus, Tokyo, Japan; nominal central frequency: 10 MHz, F0.50IN-PTF), ο οποίος είναι βυθισμένος στο νερό που περιέχεται στο ειδικό δοχείο που έχει τοποθετηθεί προηγουμένως το δείγμα, σε θέση ελαφρώς εκτός της οπτικής εστίασης για την επίτευξη μεγαλύτερου οπτικού πεδίου. Το τεχνητό θαλασσινό νερό μέσα στο δοχείο έχει ρόλο μέσου διάδοσης των φωτοακουστικών κυμάτων από την πηγή, δηλαδή τα έμβρυα, έως τον μετατροπέα που τα ανιχνεύει. Ακολουθεί η ενίσχυση των σημάτων από δύο ενισχυτές χαμηλού θορύβου (A; TB-414-8A+, Mini-Circuits, Camberley, England) που συνδέονται σε σειρά και προσφέρουν μια αύξηση στην ένταση του σήματος κατά 62 dB και στην συνέχεια το φιλτράρισμα των σημάτων από ένα narrow bandpass RF filter (RFF; 10 MHz BPF, SV1AFN.com, Athens, Greece) που αφήνει να περάσουν μόνο οι συχνότητες που βρίσκονται μέσα στο εύρος 9-11 MHz. Στην συνέχεια, τα σήματα φτάνουν τελικά σε ένα αποδιαμορφωτή I/Q (I/Q, AD8333, Analog Devices, Wilmington, MA, ΗΠΑ) ο οποίος εκτιμά τις τιμές πλάτους των φωτοακουστικών κυμάτων. Ο αποδιαμορφωτής λαμβάνει επίσης ένα 4X σήμα τοπικού ταλαντωτή στα 38 MHz από ένα δεύτερο κανάλι της γεννήτριας σημάτων παρέχοντας τιμές I και Q οι οποίες ψηφιοποιούνται στην συνέχεια από μια κάρτα απόκτησης δεδομένων (DAQ; PCIE-6363, National Instruments, Austin, TX, USA) και αποθηκεύονται σε ένα υπολογιστή (PC). Η ψηφιοποίηση των σημάτων I και Q γίνεται σε συγχρονισμό με τις κινήσεις των καθρεπτών στο γαλβανομετρικό σαρωτή. Οι τιμές I και Q χρησιμοποιούνται απευθείας για την εκτίμηση του πλάτους (Amp) των φωτοακουστικών κυμάτων μέσω της μαθηματικής εξίσωσης:

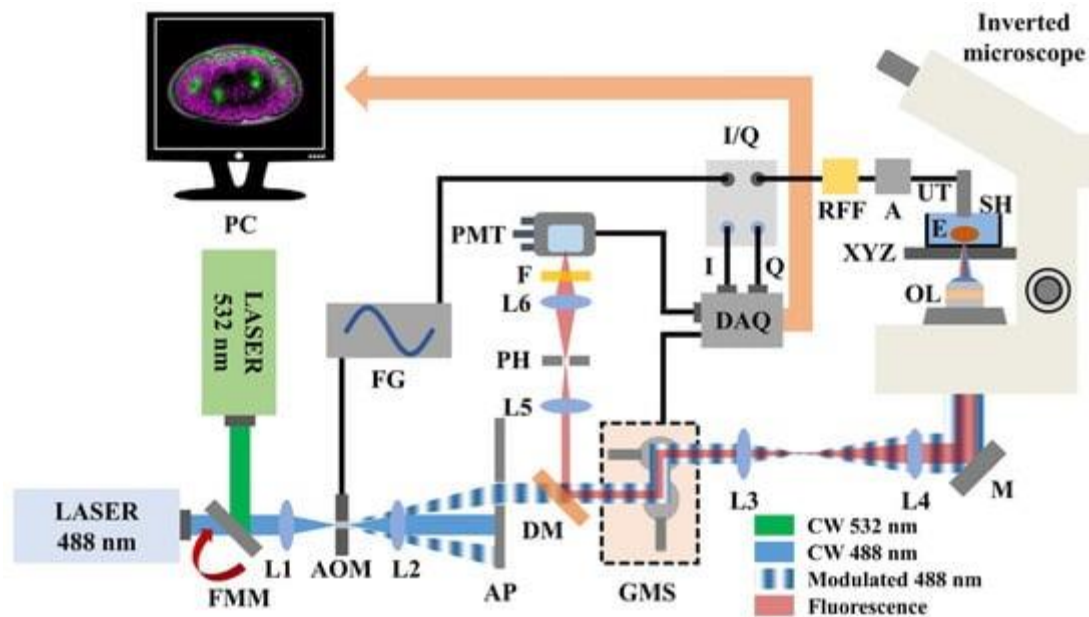
$$Amp = \sqrt{I^2 + Q^2}$$

Η PA ανακατασκευή των εμβρύων προκύπτει από τον συνδυασμό των εικόνων που παίρνονται από 2 διακριτές απεικονίσεις οι οποίες πραγματοποιούνται με μετατόπιση της φάσης της τάσης κατά 0° και 90° στον ακουστοπτικό διαμορφωτή, συγκριτικά με το σήμα του τοπικού ταλαντωτή. Η τελική PA εικόνα (C) είναι αντιπροσωπευτική των ιδιοτήτων οπτικής απορρόφησης των εμβρύων και υπολογίζεται από την εξίσωση:

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

όπου τα A και B είναι οι καταγεγραμμένες εικόνες πλάτους στις 0° και 90° ενώ τα offsetA και offsetB αντιστοιχούν στις αντίστοιχες τιμές πλάτους υποβάθρου (background) του αποδιαμορφωτή όταν δεν λαμβάνεται φωτοακουστικό σήμα [6].

Σχετικά με το μονοπάτι που ακολουθεί η ανακλώμενη από τα έμβρυα ακτινοβολία φθορισμού, αυτή συλλέγεται από τον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου, μεταδίδεται μέσω του τηλεσκοπίου επέκτασης δέσμης 4f, αποσαρώνεται από τους καθρέπτες του γαλβανομετρικού σαρωτή και τελικά ανακλάται από ένα διχροϊκό καθρέπτη (DM). Η ευθυγράμμιση της δέσμης φθορισμού γίνεται με την χρήση ενός θετικού φακού (L5) και στην συνέχεια γίνεται η εστίασή της μέσω μιας οπής διαμέτρου 50 μm (PH) που αξιοποιείται για να απορριφθεί όλη η εκτός εστίασης ακτινοβολία που συλλέχθηκε από τον αντικειμενικό φακό. Η εντός εστίασης ακτινοβολία φθορισμού περνάει από ένα δεύτερο θετικό φακό (L6) και φιλτράρεται από ένα long-pass οπτικό φίλτρο (F; FGL570, Thorlabs, Newton, NJ, USA; cut-off wavelength: 570 nm) ώστε να αποκοπεί το ανακλώμενο τμήμα της ακτινοβολίας διέγερσης. Τα σήματα τελικά ανιχνεύονται από ένα χαμηλού θορύβου φωτοπολλαπλασιαστή (PMT) (H957-15, Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) και ψηφιοποιούνται ταυτόχρονα με τις I και Q τιμές, χρησιμοποιώντας ένα τρίτο αναλογικό κανάλι εισόδου της κάρτας DAQ πριν την καταγραφή τους από τον υπολογιστή [6].

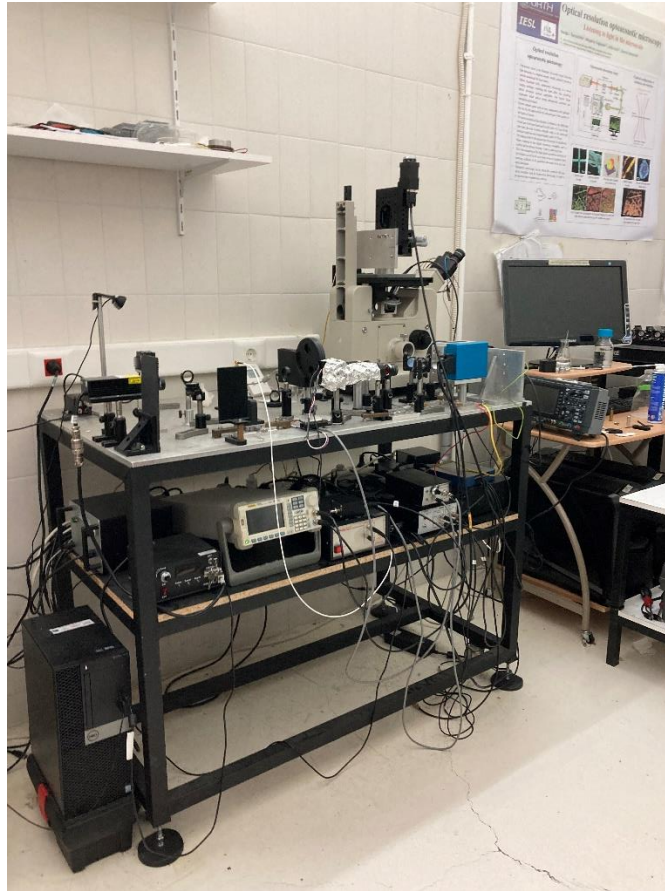


Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του υβριδικού *confocal fluorescence* και *FDPA* μικροσκοπίου. Οι συντομογραφίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραπάνω εικόνα είναι οι εξής: *FMM*, αναδιπλούμενος καθρέπτης; *L(1-6)*, θετικοί φακοί; *AOM*, ακουστοοπτικός διαμορφωτής; *FG*, γεννήτρια ημιτονοειδούς σήματος; *AP*, άνοιγμα μικρής διαμέτρου; *DM*, διχροϊκός καθρέπτης; *GMS*, γαλβανομετρικός σαρωτής; *M*, *broadband* καθρέπτης; *OL*, αντικειμενικός φακός; *E*, έμβρυο; *XYZ*, οι άξονες στους οποίους μπορεί να κινηθεί το δείγμα; *SH*, βάση τοποθέτησης δείγματος; *UT*, σφαιρικά εστιασμένοι πιεζοηλεκτρικοί μετατροπέας υπερήχων; *A*, *RF*, ενισχυτές χαμηλού θορύβου; *RFF*, *bandpass RF* φίλτρο; *I/Q*, αποδιαμορφωτής; *DAQ*, κάρτα καταγραφής δεδομένων; *PMT*, χαμηλού θορύβου φωτοπολλαπλασιαστής; *F*, *long-pass* οπτικό φίλτρο; *PH*, *pinhole*; *PC*, ηλεκτρονικός υπολογιστής.

Για την διασφάλιση της καλής ποιότητας εικόνων, έγινε προσπάθεια ώστε ο λόγος σήματος προς θόρυβο (SNR) να παραμείνει υψηλός. Η ενίσχυση του σήματος και η ελαχιστοποίηση του θορύβου λοιπόν, έγινε με την λήψη και τον συνδυασμό πολλών καρέ κατά την απεικόνιση (*averaging frames*) των εμβρύων ανά κάθε σημείο σάρωσης. Επίσης για την αποφυγή του φαινομένου της φωτολευκανσης, που ενισχύει τον θόρυβο, εκτιμήθηκε έπειτα από πειραματικές μετρήσεις η κατάλληλη ισχύς του λέιζερ που είναι όσο το δυνατό λιγότερο βλαπτική για τα έμβρυα και επιπλέον μειώθηκε ο χρόνος έκθεσης των εμβρύων στην ακτινοβολία, με το να ακτινοβολούνται μόνο κατά την διάρκεια της μέτρησης (χρήση *time interval* μεταξύ των μετρήσεων). Οι εικόνες που πάρθηκαν έχουν ανάλυση 256×256 pixels, με το μέγεθος του κάθε pixel να είναι $2.34 \mu\text{m}$ και άρα το οπτικό πεδίο να αντιστοιχεί σε $600 \times 600 \mu\text{m}^2$. Πριν συνδυαστούν οι εικόνες από τον φθορισμό και το φωτοακουστικό φαινόμενο γίνεται κανονικοποίηση της φωτεινότητας των pixels [6].

Το υβριδικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα επιστημονική έρευνα (**Εικόνα 2**) είναι πλήρως αυτοματοποιημένο, με την βοήθεια ειδικά ανεπτυγμένων προγραμμάτων στο περιβάλλον προγραμματισμού MATLAB για τον συγχρονισμό και τον έλεγχο της λειτουργίας του μικροσκοπίου. Μέσω ενός προγράμματος του MATLAB γίνεται επίσης επεξεργασία των δεδομένων που αποθηκεύονται στην κάρτα καταγραφής και

μεταφέρονται στον υπολογιστή, όπως για παράδειγμα η ανακατασκευή των εικόνων που έχουν παρθεί στις διαφορετικές φάσεις 0° και 90° (reconstruction) [6].



Εικόνα 2: Το υβριδικό μικροσκόπιο φθορισμού και φωτοακουστικής μικροσκοπίας στο εργαστήριο

2.2.2 Επεξεργασία εικόνων

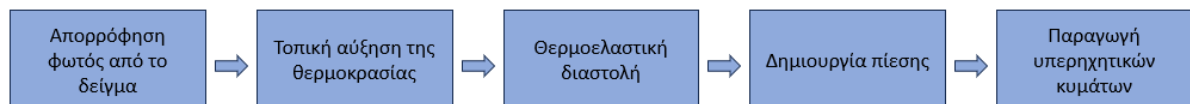
Οι εικόνες που συλλέχθηκαν από τις διαφορετικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, υπέστησαν επεξεργασία και ανάλυση μέσω της εφαρμογής ImageJ, που αποτελεί ένα open source πρόγραμμα image processing για επιστημονικό υλικό. Για την σύνθεση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε χρώμα magenta για τα φωτοακουστικά σήματα και πράσινο χρώμα για τα σήματα του φθορισμού.

Για την ταυτόχρονη επεξεργασία όλων των εικόνων, κατασκευάστηκε ένα macro με συγκεκριμένες εντολές για τα διάφορα features. Από την εφαρμογή ImageJ ανοίγουμε ένα recorder (plugins → macros → record), στο οποίο εμφανίζονται όλες οι εντολές που τρέχουν και οι οποίες θα παρθούν ώστε να γραφτεί το macro για την επεξεργασία των εικόνων. Το macro που δημιουργήθηκε (plugins → new → macro) φέρει εντολές για αλλαγή στην αντίθεση / enhance contrast (run("Enhance Contrast...", "saturated=0.1 normalize");), στο local contrast (run("Enhance Local Contrast", "blocksize=12 histogram=256 maximum=2");) και για την αφαίρεση του θορύβου (run("Non-local Means Denoising", "sigma=4 smoothing_factor=1");). Οι παράμετροι που αξιοποιήθηκαν σε κάθε εντολή έχουν

αποφασιστεί έπειτα από δοκιμές που έγιναν κατά την επεξεργασία των εικόνων και έχει φανεί ότι δίνουν το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα όσον αφορά την ανάλυση και την ποιότητα των εικόνων που προκύπτουν.

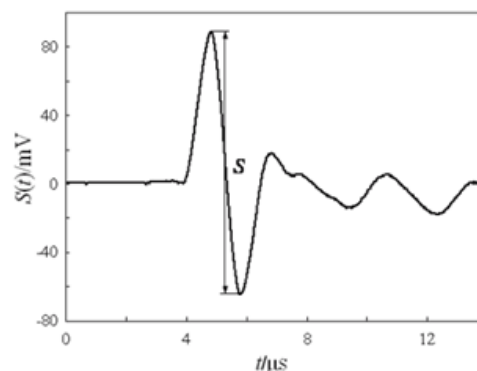
2.2.3 Φωτοακουστικό φαινόμενο – Αρχές

Φωτοακουστικό φαινόμενο είναι το φαινόμενο κατά το οποίο παράγονται ακουστικά κύματα έπειτα από την απορρόφηση φωτός από το δείγμα (**Εικόνα 3**). Δέσμη λέιζερ εξέρχεται από μία παλμική ή χρονικά μεταβαλλόμενη (ως προς την ένταση) πηγή και διαδίδεται προς το δείγμα. Πραγματοποιείται απορρόφηση του φωτός από τα μόρια του εμβρύου *Parhyale Hawaensis*, με αποτέλεσμα η ενέργεια της ακτινοβολίας να μετατρέπεται σε θερμότητα και συνεπώς τοπική αύξηση της θερμοκρασίας που με την σειρά της προκαλεί την θερμοελαστική διαστολή του οργανισμού. Έπειτα, δημιουργείται πίεση, δηλαδή πυκνώματα και αραιώματα, που παίρνουν την μορφή υπερηχητικών κυμάτων και τα οποία στην συνέχεια συλλέγονται σε μορφή σήματος από ένα σφαιρικά εστιασμένο πιεζοηλεκτρικό μετατροπέα υπερήχων για να μετατραπούν σε αξιοποιήσιμη πληροφορία [36].



Εικόνα 3: Σχεδιαγραμματική περιγραφή του φωτοακουστικού φαινομένου

Τα φωτοακουστικά κύματα που συλλέγονται από τον υπερηχητικό μετατροπέα έχουν κυματομορφή όμοια με αυτή που απεικονίζεται στην **Εικόνα 4**, όπου υπάρχει μία θετική και μία αρνητική κορυφή που αντιστοιχούν στα πυκνώματα και αραιώματα των φωτοακουστικών κυμάτων. Το peak-to-peak πλάτος (S) αποτελεί δείκτη του βαθμού απορρόφησης της ακτινοβολίας από την εκάστοτε περιοχή του δείγματος.



Εικόνα 4: Κυματομορφή φωτοακουστικού σήματος. Το S αντιστοιχεί στο peak-to-peak πλάτος μεταξύ πυκνώματος και αραιώματος.

Η κυματομορφή του φωτοακουστικού κύματος που προκύπτει φέρει αξιοποιήσιμη πληροφορία για την περιοχή απεικόνισης και αλλάζει μορφή ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της διέγερσης (πχ χώρος, χρόνος παλμού) και του ανιχνευτή (πχ σχήμα, γεωμετρία, μέγεθος).

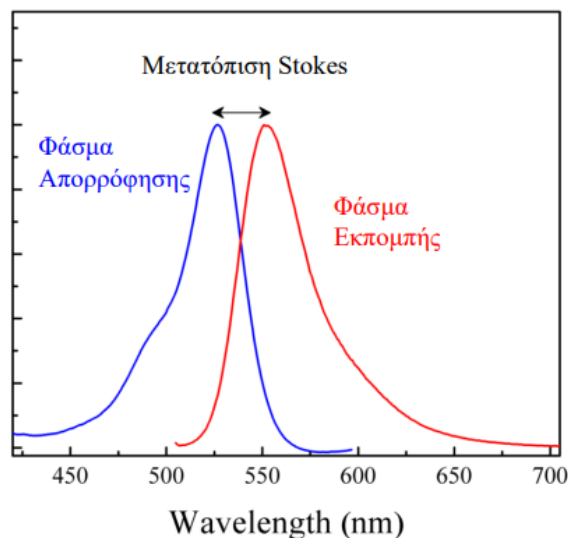
Στην φωτοακουστική μικροσκοπία, η απεικονιστική αντίθεση που αξιοποιείται προκειμένου να συλλεχθεί η απαραίτητη πληροφορία για την διάκριση λεπτομερειών στην τελική εικόνα, προέρχεται από μεταβολές του συντελεστή απορρόφησης μεταξύ των διαφορετικών δομών του δείγματος (πχ λέκιθος, κυτταρική μεμβράνη, eggshell κ.ά) [36].

Η φωτοακουστική μικροσκοπία λοιπόν είναι μια υβριδική τεχνική απεικόνισης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε *in vivo* μετρήσεις, ανιχνεύοντας ακουστικά την οπτική αντίθεση στα έμβρυα *Parhyale hawaiiensis* μέσω του φωτοακουστικού φαινομένου. Σε αντίθεση με άλλες τεχνικές απεικόνισης, η φωτοακουστική μικροσκοπία εκμεταλλεύεται την χαμηλή σκέδαση των ηχητικών κυμάτων που περνάνε από τις διάφορες δομές των εμβρύων και έτσι υπερβαίνει το όριο της οπτικής διάχυσης. Λόγω αυτών των πλεονεκτημάτων η τεχνική της φωτοακουστικής μικροσκοπίας μπορεί να προσφέρει εικόνες υψηλής ανάλυσης σε μεγάλα βάθη απεικόνισης μέσα στον οργανισμό (έως και μερικά χιλιοστά) [10][36].

2.2.4 Φθορισμός

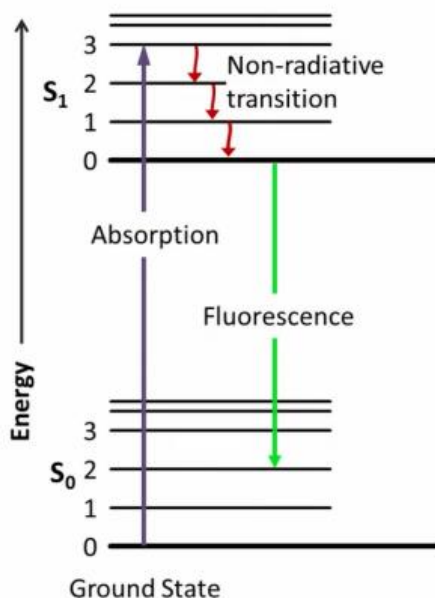
Φθορισμός ονομάζεται η εκπομπή φωτός από μια ουσία που έχει απορροφήσει φως ή άλλου είδους ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Στις περισσότερες περιπτώσεις που αφορούν βιολογικές παρατηρήσεις το εκπεμπόμενο φως φθορισμού έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος και άρα μικρότερη ενέργεια σε σχέση με την απορροφούμενη ακτινοβολία. Ανάλογα με την χρωστική που θέλουμε να διεγείρουμε υπάρχει ένα φάσμα μηκών κύματος διέγερσης, τα οποία απορροφά το μόριο της χρωστικής και ανάλογα εκπέμπει ακτινοβολία φθορισμού πάλι σε ένα εύρος μηκών κύματος. Εκτός από τον φθορισμό που εκπέμπεται από το δείγμα λόγω της ύπαρξης χρωστικών υπάρχει και ο αυτοφθορισμός που παράγουν κάποιες δομές του δείγματος χωρίς την ύπαρξη φθοροφόρου, όπως η λέκιθος στην περίπτωση του οργανισμού *Parhyale hawaiiensis* [37].

Η μετατόπιση Stokes στις διεργασίες φθορισμού είναι η διαφορά στα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης και μέγιστης εκπομπής φθορισμού μιας ουσίας. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5** η απορρόφηση για μία χρωστική είναι ιδιαίτερα έντονη στα 520 nm και σε μεγαλύτερα μήκη κύματος σταδιακά μειώνεται. Το φάσμα εκπομπής φθορισμού εμφανίζει μέγιστο περίπου στα 560 nm. Τα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης είναι κατοπτρικά και η κατανομή του πρώτου είναι ανεξάρτητη από το μήκος κύματος διέγερσης. Αντίθετα, η ένταση του φθορισμού εξαρτάται από το μήκος κύματος διέγερσης και είναι μέγιστη όταν αυτό αντιστοιχεί στη μέγιστη τιμή του φάσματος απορρόφησης.



Εικόνα 5: Μετατόπιση Stokes. Η διαφορά στα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης και εκπομπής

Μέρος της ενέργειας των φωτονίων διέγερσης μετατρέπεται σε θερμότητα λόγω μη ακτινοβολητικών διαδικασιών με αποτέλεσμα τα φωτόνια φθορισμού να έχουν μεγαλύτερα μήκη κύματος και μικρότερες ενέργειες συγκριτικά με τα αντίστοιχα της διέγερσης (Stokes shift), μια διαδικασία που μπορεί να περιγραφεί σε ένα διάγραμμα ηλεκτρονικών καταστάσεων Jablonski, όπως αυτό που απεικονίζεται στην **Εικόνα 6**.



Εικόνα 6: Διάγραμμα Jablonski. Ένα φθορίζον μόριο απορροφά φωτόνιο με αποτέλεσμα την διέγερση ενός e^- σε υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο. Κατά την επιστροφή του στην χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση το e^- εκπέμπει ένα φωτόνιο μικρότερης ενέργειας από αυτό που προκάλεσε τη διέγερση.

Προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα των εικόνων φθορισμού, αφαιρείται ο φθορισμός που προέρχεται εκτός του εστιακού επιπέδου. Για τον σκοπό αυτό, ο φθορισμός που περνάει από τον διχροϊκό καθρέπτη επιστρέφοντας από το δείγμα, εστιάζεται και από ένα δεύτερο φακό διαμέσου μιας οπής (pinhole) με διάμετρο $\sim 20-50$ μm , η οποία βρίσκεται στην εστιακή απόσταση του φακού. Μόνο οι παράλληλες ακτίνες που προέρχονται από το εστιακό επίπεδο περνάνε μέσα από την οπή, ενώ οι υπόλοιπες (συγκλίνουσες ή αποκλίνουσες) αποκόπτονται αποτελεσματικά [37].

Σημαντικός περιορισμός για τον φθορισμό είναι το φαινόμενο της φωτολεύκανσης. Αποτελεί μια μη αναστρέψιμη καταστροφή ενός διεγερμένου φθοροφόρου λόγω φωτοχημικών μεταβολών των μορίων έπειτα από παρατεταμένη έκθεση σε ακτινοβολία. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητη η χρήση ανθεκτικών φθοροφόρων, ταιριαστών με το εκάστοτε πείραμα όσον αφορά το φάσμα απορρόφησης και τη διάρκεια που απαιτείται η έκθεσή τους στην ακτινοβολία, καθώς και η χρήση τους σε ικανοποιητικές ποσότητες. Ακόμα, ο περιορισμός της φωτολεύκανσης μπορεί να πραγματοποιηθεί επιτυγχάνοντας την ακτινοβολία του δείγματος μόνο κατά την διάρκεια των μετρήσεων αλλά και ελαχιστοποιώντας την ένταση διέγερσης.

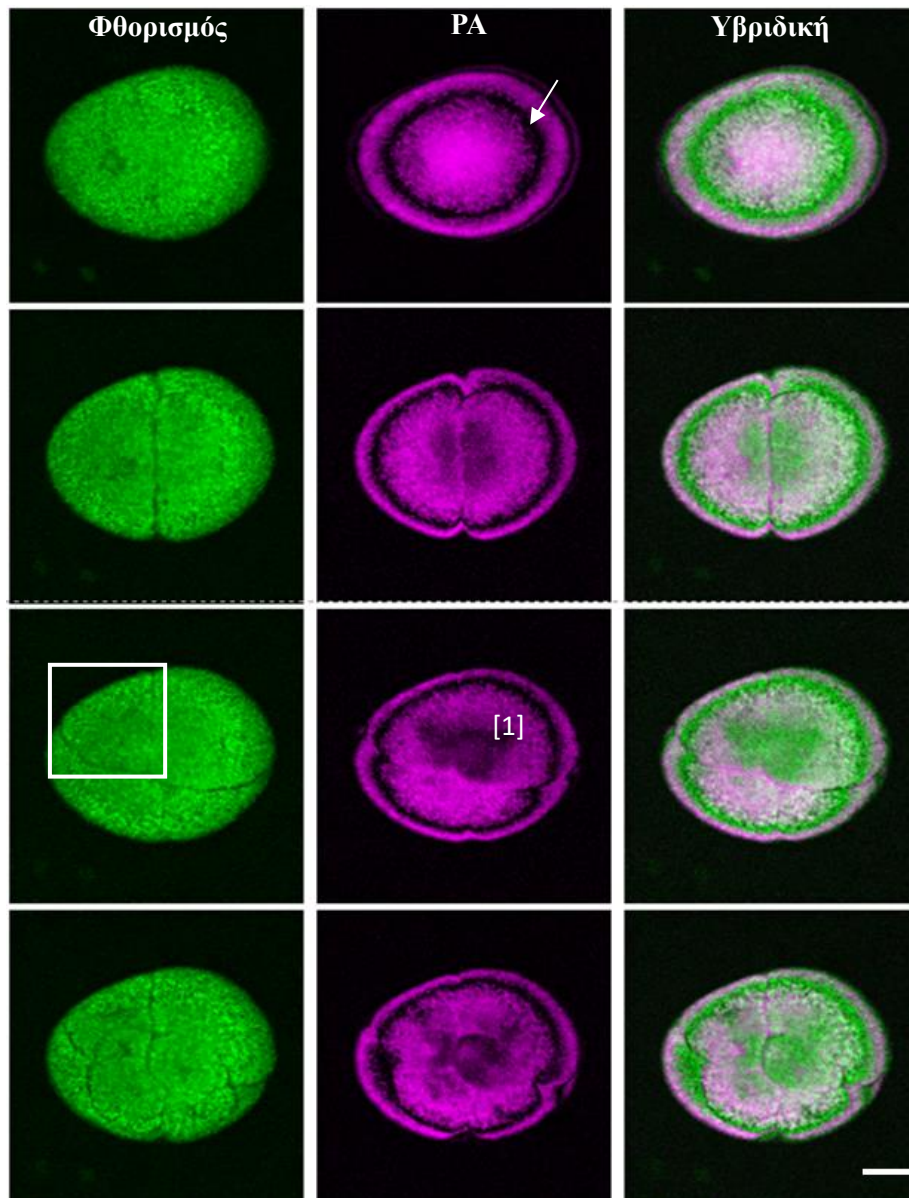
3. Αποτελέσματα

3.1 Υβριδική live in vivo απεικόνιση label free εμβρύων *Parhyale Hawaiiensis*

Το προτεινόμενο υβριδικό σύστημα απεικόνισης χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των κυτταρικών συμπεριφορών ζωντανών αναπτυσσόμενων εμβρύων *Parhyale* σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Το πρώτο μέρος των πειραμάτων αφορούσε την απεικόνιση μη σημασμένων εμβρύων *Parhyale*, τα οποία παράγουν έντονα σήματα προερχόμενα κυρίως από τον αυτοφθορισμό του κρόκου (yolk) αλλά και το eggshell. Ο αυτοφθορισμός ανιχνεύεται από όλα τα βλαστομερή που παράγονται κατά τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις, τα οποία είναι πλούσια σε λέκιθο και μέσω αυτού φαίνονται ευδιάκριτα τα όρια που σχηματίζουν τα βλαστομερή μεταξύ τους (μεμβράνες). Επιπλέον, τα σήματα από το φωτοακουστικό φαινόμενο μας δείχνουν τον τρόπο που κατανέμεται η λέκιθος στα θυγατρικά κύτταρα μετά τις διαιρέσεις που πραγματοποιούνται, καθώς και την συμπεριφορά του eggshell κατά την διάρκεια των διαιρέσεων. Για τις μετρήσεις των label free εμβρύων χρησιμοποιήθηκε ως πηγή λέιζερ αυτή που εκπέμπει ορατή ακτινοβολία στα 488 nm, ένα μήκος κύματος διέγερσης που προκαλεί ισχυρά σήματα τόσο φωτοακουστικά όσο και αυτοφθορισμού. Επίσης, η ένταση της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε είναι περίπου 14 mW, μετρημένη με την χρήση powermeter, κατάλληλη για την αποφυγή της φωτολευκανσης και καταστροφής των δειγμάτων. Οι εικόνες έχουν χρονική διαφορά 10 min μεταξύ τους και για την κάθε μια έχουν παρθεί 20 averaging frames.

Οι εικόνες που συλλέγονται από τις δύο διαφορετικές τεχνικές απεικόνισης, εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα στην πληροφορία όντας αρκετά συμπληρωματικές αλλά από την σύγκρισή τους υπάρχουν εμφανείς διαφορές μεταξύ των σημάτων. Το eggshell είναι διαφανές με αποτέλεσμα το φως να περνάει μέσα από αυτό και έπειτα ο αδιαφανής κρόκος εμποδίζει την περαιτέρω διείσδυση του φωτός. Τα σήματα από το φωτοακουστικό φαινόμενο αποκαλύπτουν την βαθύτερη οργάνωση και κατανομή της λεκίθου στο εσωτερικό των βλαστομερών γύρω από το χωρίς λέκιθο πρωτόπλασμα (κυτταρόπλασμα και πυρήνας) στο κέντρο τους. Τα σήματα αυτά κάνουν επίσης εμφανές το eggshell που περιβάλλει το έμβρυο και το διαχωρίζουν από το εσωτερικό, μέσω ενός κενού που εμφανίζεται σαν artifact στις φωτοακουστικές εικόνες. Το artifact που εμφανίζεται στο eggshell του εμβρύου ενδέχεται να οφείλεται σε παρεμβολές που κάνουν μεταξύ τους τα φωτοακουστικά κύματα, μετά από πολλαπλές ανακλάσεις τους στη διεπιφάνεια μεταξύ του eggshell και του εσωτερικού του αυγού που οφείλονται στις διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες των δύο. Στα μη σημασμένα έμβρυα *Parhyale hawaiiensis* έγιναν μετρήσεις συνεχούς παρακολούθησης στον χρόνο και λήψεις εικόνων ανά τακτά χρονικά διαστήματα, για να μελετηθούν και να απεικονιστούν τα αναπτυξιακά στάδια που ακολουθεί ο οργανισμός καθώς αναπτύσσεται αλλά και επιπλέον λεπτομέρειες όπως ο τρόπος κατανομής της λεκίθου στα βλαστομερή που προκύπτουν από τις διαιρέσεις. Οι λήψεις που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 7**, αποτελούν αντιπροσωπευτικές εικόνες που απομονώθηκαν από το timelapse video ενός εμβρύου που ξεκινάει από 1 κύτταρο και φτάνει έως τα 8. Παρατηρείται ότι στην διαίρεση από δύο σε τέσσερα κύτταρα και από τέσσερα σε οκτώ κύτταρα γίνεται μια άνιση κατανομή της λεκίθου στα βλαστομερή που προκύπτουν (3^η και 4^η σειρά, **Εικόνα 7**). Στο S3 στάδιο των 4 κυττάρων, τα δύο ίσου μεγέθους κύτταρα από το στάδιο

S2 διασπάστηκαν στον x άξονα και προέκυψαν δύο μικρότερα βλαστομερή. Μετά από την τρίτη διαίρεση, κάθετη στα δύο προηγούμενα επίπεδα διάσπασης, το έμβρυο βρίσκεται πλέον στο στάδιο των 8 κυττάρων (S4), αποτελούμενο από 4 μεγάλα μακρομερή που διατηρούν το μεγαλύτερο ποσοστό της λεκίθου και εδράζονται στον ζωικό πόλο και 4 θυγατρικά βλαστομερή, τα μικρομερή, που είναι φτωχά σε λέκιθο, συνεπώς μικρότερου μεγέθους και εδράζονται στον φυτικό πόλο του εμβρύου.

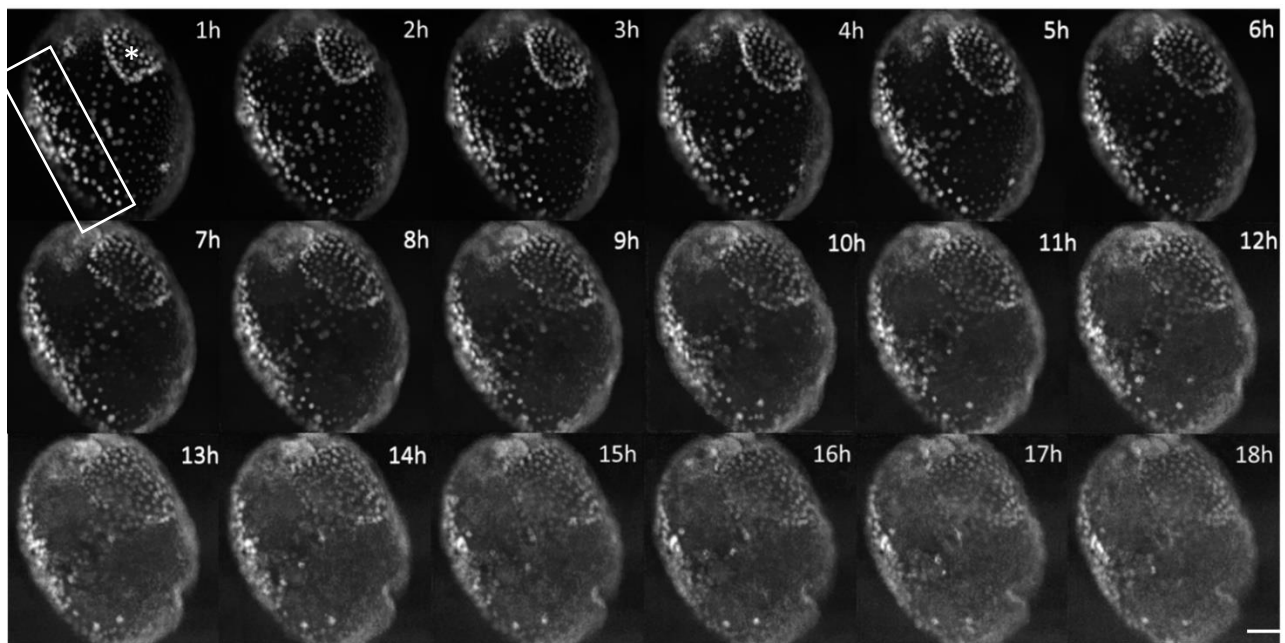


Εικόνα 7: Υβριδική απεικόνιση μη σημασμένων εμβρύων *Parhyale hawaiiensis*. Οι εικόνες παραπάνω απεικονίζουν τα στάδια S1 (one cell), S2 (two cells), S3 (four cells) και S4 (eight cells), αντίστοιχα για κάθε σειρά. Το πράσινο χρώμα αφορά τις εικόνες φθορισμού ενώ το magenta τις φωτοακουστικές εικόνες. [1] Αναπαριστά την περιοχή του πρωτοπλάσματος (κυτταρόπλασμα και πυρήνας) στην οποία απουσιάζει η λέκιθος. Το άσπρο βέλος δείχνει το artifact που εμφανίζεται στο eggshell λόγω σκέδασης των φωτοακουστικών σημάτων. Το άσπρο

πλαίσιο περιβάλλει το ένα από τα δύο μικρομερή που προκύπτουν στο στάδιο των 4 κυττάρων, όπου είναι εμφανής η άνιση κατανομή της λεκίθου. Το scale bar αντιστοιχεί σε 100 μm .

3.2 Υβριδική live in vivo απεικόνιση σημασμένων εμβρύων *Parhyale Hawaiensis*

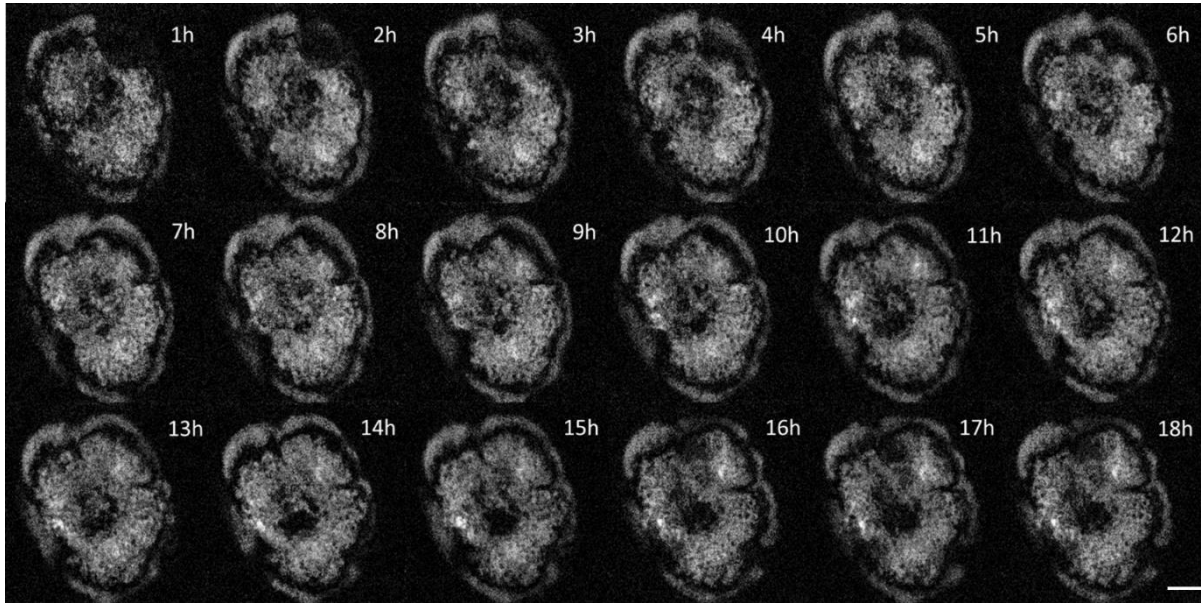
Για το δεύτερο μέρος των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν σημασμένα έμβρυα *Parhyale* από την διαγονιδιακή σειρά *PhHS > H2B-mRFP* που εκπέμπουν φθορισμό. Με σκοπό την μείωση του αυτοφθορισμού της λεκίθου, για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε ως πηγή λείζερ αυτό που εκπέμπει ακτινοβολία στα 532 nm όπου γίνεται διέγερση της κόκκινης χρωστικής. Η θερμοεπαγόμενη αυτή φθορίζουσα χρωστική είναι συζευγμένη με την ιστόνη H2B ούτως ώστε ο φθορισμός που ανιχνεύεται να προέρχεται αποκλειστικά από τους πυρήνες των βλαστομερών.



Εικόνα 8: Σχηματισμός πεπτικού συστήματος. Οι παραπάνω εικόνες φθορισμού απεικονίζουν το έμβρυο κατά την διάρκεια της γαστριδίωσης, όπου λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός του μεσενδοδέρματος που θα δώσει στην συνέχεια το ενδόδερμα και το μεσόδερμα. Ο αστερίσκος στο έμβρυο της πρώτης φωτογραφίας αντιπροσωπεύει τα κύτταρα πρόδρομους δημιουργίας του μεσεντέρου, και το άσπρο πλαίσιο αφορά τα κύτταρα του dorsal midline. Το scale bar αντιστοιχεί σε 100 μm .

Στην διαδοχική σειρά λήψεων φθορισμού που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 8** παρατηρούμε την διαδικασία σχηματισμού του πεπτικού συστήματος. Αρχίζει να σχηματίζεται μια πρώτη στιβάδα, το μεσενδόδερμα που αποτελείται από μια ομάδα κυττάρων του εμβρύου τα οποία είναι παρόντα σε αυτό μόνο κατά την διάρκεια της γαστριδίωσης. Από αυτή την διδυναμική ομάδα κυττάρων δημιουργούνται αργότερα οι δύο από τις τρεις βλαστικές στιβάδες, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα. Η αρχή σχηματισμού του μεσενδοδέρματος που απεικονίζεται στην **Εικόνα 8** είναι μια από τις κινήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την γαστριδίωση. Το συγκεκριμένο έμβρυο κατά την απεικόνισή του μεταβαίνει από το εμβρυικό στάδιο ανάπτυξης

S14 στο S18, και διατηρεί μια ραχιοπλευρική όψη με στρέψη προς τα δεξιά (dorsolateral right view). Ορισμένα βλαστικά κύτταρα της στιβάδα του μεσενδοδέρματος αποτελούν πρόδρομους των κυττάρων του μεσεντέρου (midgut precursors) που θα δώσουν γένεση τελικά στο επιθήλιο του μεσεντέρου (midgut epithelium). Η κυκλική δομή κυττάρων στο πάνω μέρος του εμβρύου αποτελεί τους πρόδρομους του μεσενδοδέρματος που θα δημιουργήσουν μετέπειτα το μεσέντερο (άσπρος αστερίσκος), ενώ στην αριστερή πλευρά του εμβρύου τα έντονα φθορίζοντα κύτταρα που σχηματίζουν μια ευθεία αποτελούν το dorsal midline στην ραχιαία πλευρά του εμβρύου (άσπρο περίγραμμα).

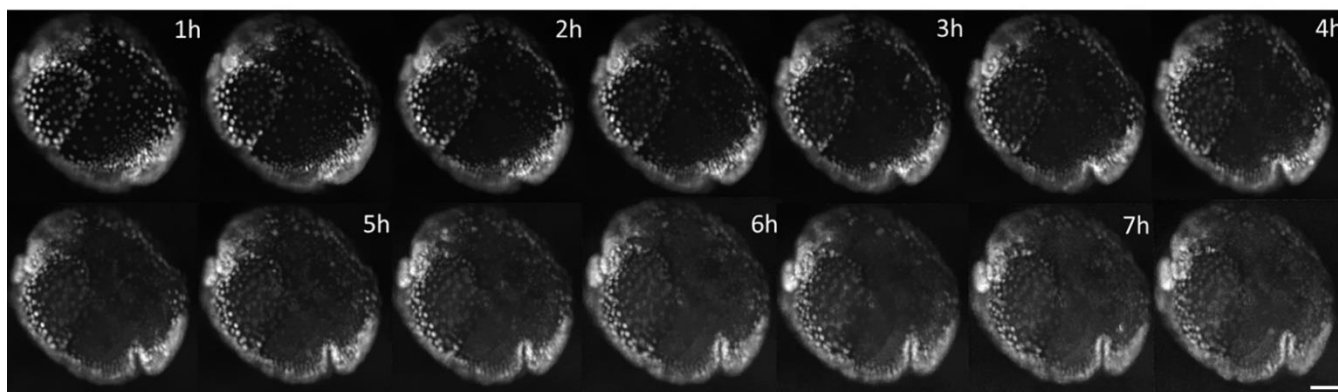


Εικόνα 9: Φωτοακουστικές εικόνες της ίδιας μέτρησης όπου απεικονίζεται η σταδιακή σχηματοποίηση της λεκίθου και η εμφάνιση των ορίων του μεσενδοδέρματος, που υπάρχει μόνο κατά το στάδιο της γαστριδίωσης. Το scale bar αντιστοιχεί σε 100 μm .

Στις αντίστοιχες φωτοακουστικές εικόνες του ίδιου εμβρύου (**Εικόνα 9**) παρατηρείται η σταδιακή εγκόλπωση της λεκίθου. Αρχίζουν να δημιουργούνται περισφίξεις στο εσωτερικό του αυγού, κινητικότητα στην λέκιθο, καθώς επίσης αρχίζουν να εμφανίζονται και τα όρια του μεσοδέρματος.

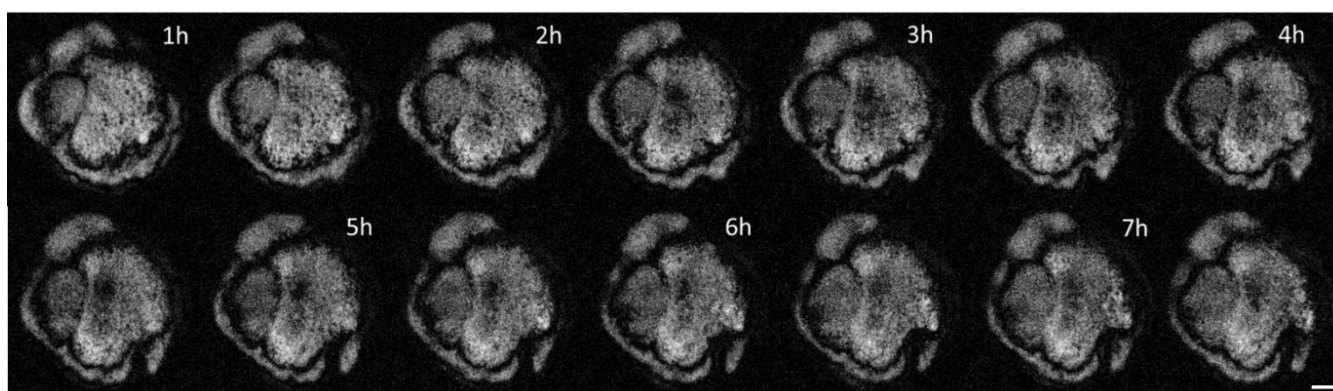
Για την λήψη των εικόνων της συγκεκριμένης μέτρησης χρησιμοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το λέιζερ που εκπέμπει στα 532 nm με στόχο τη λήψη πιο έντονων σημάτων φθορισμού. Όσον αφορά τις παραμέτρους της διάταξης, η ένταση της ακτινοβολίας ήταν 10 mW, το gain του φωτοπολλαπλασιαστή στην τιμή 7.1, με 20 averaging frames για την κάθε εικόνα και με χρονική διαφορά 1 h μεταξύ των μετρήσεων.

Οι επόμενες μετρήσεις (**Εικόνα 10**) που ελήφθησαν σε άλλη ημερομηνία αποτελούν αναπτυξιακά χρονική συνέχεια αυτής που παρουσιάστηκε προηγουμένως, με το έμβρυο που απεικονίστηκε να βρίσκεται στο αναπτυξιακό στάδιο S18. Τα κύτταρα στο στάδιο αυτό επεκτείνονται και αποκτούν μεγαλύτερο μέγεθος, μετακινούμενα κοιλιακά (ventrally) προς σχηματισμό του μεσεντέρου (midgut). Στις εικόνες φθορισμού επίσης διακρίνεται ο τρόπος που διευρύνεται σταδιακά η κυκλική διάταξη των πρόδρομων κυττάρων του μεσεντέρου, με το πέρασμα του χρόνου, πιάνοντας ολοένα και μεγαλύτερο χώρο στο εσωτερικό του εμβρύου.



Εικόνα 10: Σχηματισμός μεσεντέρου και διεύρυνση dorsal organ. Από τα σήματα φθορισμού παρατηρούνται η σταδιακή κοιλιακή μετακίνηση των κυττάρων καθώς και η διόγκωσή τους, ενώ παράλληλα αυξάνεται το μέγεθος που καταλαμβάνει η στεφάνη κυττάρων του dorsal organ. Το scale bar αντιστοιχεί σε 100 μm .

Οι φωτοακουστικές εικόνες από το αντίστοιχο έμβρυο (**Εικόνα 11**), έδειξαν ότι η λέκιθος τις πρώτες ώρες είναι αρκετά συμπαγής και όσο περνάει η ώρα αρχίζει να σχηματοποιείται. Γίνεται οπίσθια (posterior) επέκταση της λεκίθου, η οποία ενώνεται από δεξιά και αριστερά δημιουργώντας μια μεγάλη μάζα στο μπροστινό μέρος του εμβρύου και μια μικρότερη μάζα στο πίσω μέρος που είναι η ουρά.

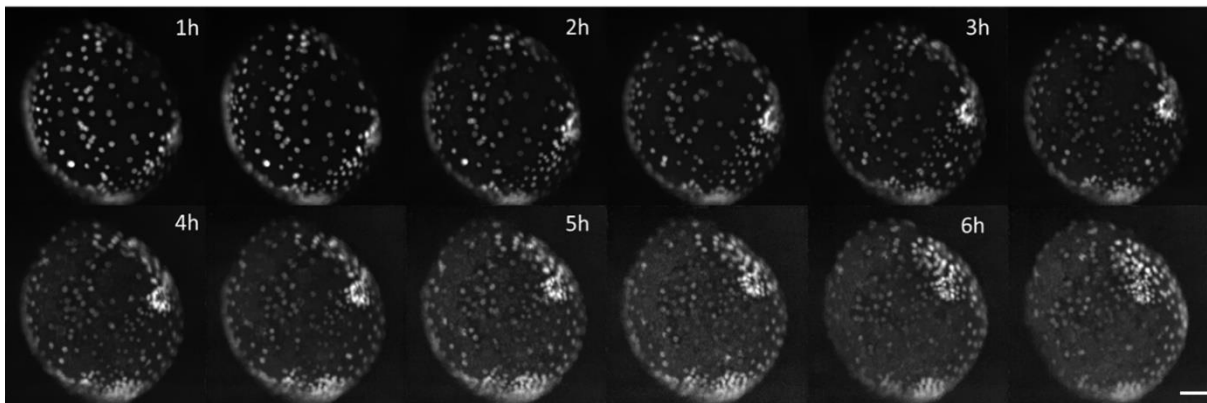


Εικόνα 11: Αλλαγές στην οργάνωση της λεκίθου. Η αρχικά συμπαγής μάζα της λεκίθου σταδιακά σχηματοποιείται και κατανέμεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο εμπρόσθιο μέρος του εμβρύου και λιγότερο στο πίσω μέρος που θα αποτελέσει την ουρά αργότερα. Το scale bar αντιστοιχεί σε 100 μm .

Για την λήψη αυτών των εικόνων χρησιμοποιήθηκε το λέιζερ των 532 nm για τη συλλογή σε μεγάλο βαθμό του φθορισμού. Όσον αφορά τις παραμέτρους της διάταξης, η ένταση της ακτινοβολίας ήταν 10 mW, το gain του φωτοπολλαπλασιαστή στην τιμή 7.2, με 20 averaging frames για την κάθε εικόνα και με χρονική διαφορά 30 min μεταξύ των μετρήσεων.

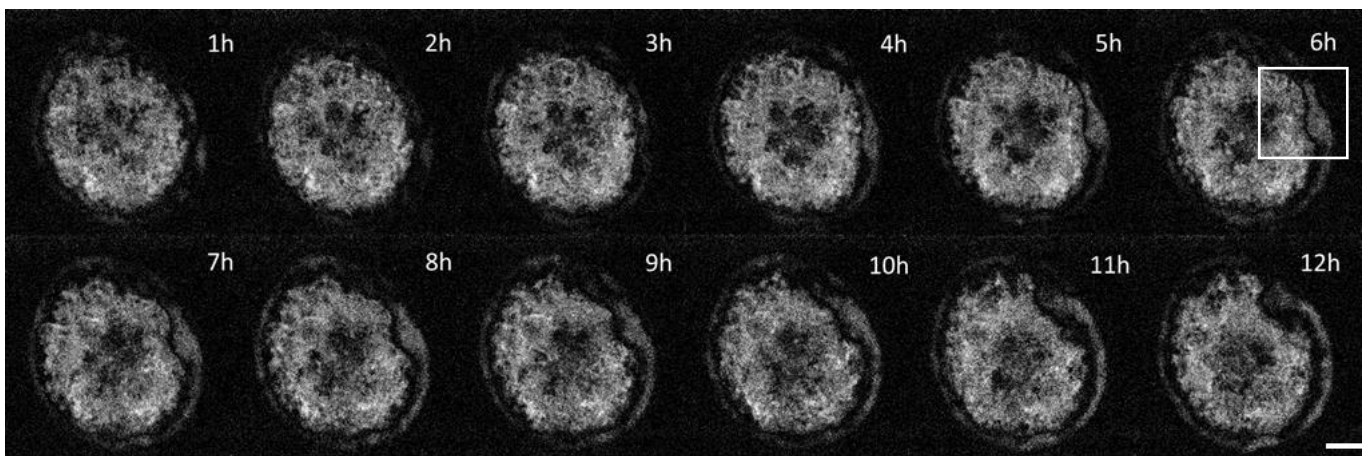
Οι παρακάτω μετρήσεις αφορούν σε ένα έμβρυο το οποίο βρίσκεται στο στάδιο ανάπτυξης S13-S14 και η θέση που διατηρεί είναι ραχιοπλευρική με μια κλίση προς τα δεξιά (dorsolateral right view). Στις εικόνες φθορισμού (**Εικόνα 12**) που πάρθηκαν κατά την μέτρηση,

παρατηρείται η διαδικασία σχηματισμού της δομής του dorsal organ, με την σταδιακή συγκέντρωση μιας ομάδας κυττάρων που δημιουργούν τελικά μια στεφάνη. Το dorsal organ πιστεύεται ότι διατηρεί ένα ενεργό ωσμωρυθμιστικό ρόλο στο εσωτερικό του αυγού [1]. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στο εμπρόσθιο (anterior) τμήμα του εμβρύου και φαίνεται πως τα κύτταρα που σχηματίζουν το dorsal organ έρχονται σταδιακά στην επιφάνεια του αυγού από βαθύτερα στρώματα, δίνοντας έτσι ισχυρά σήματα φθορισμού καθ' όλη την διάρκεια επειδή δεν παθαίνουν άμεσα φωτολευκάνση.



Εικόνα 12: Σχηματισμός dorsal organ (συγκέντρωση των κυττάρων σε ένα δακτύλιο και αύξηση του μεγέθους τους). Το scale bar αντιστοιχεί σε 100 μm .

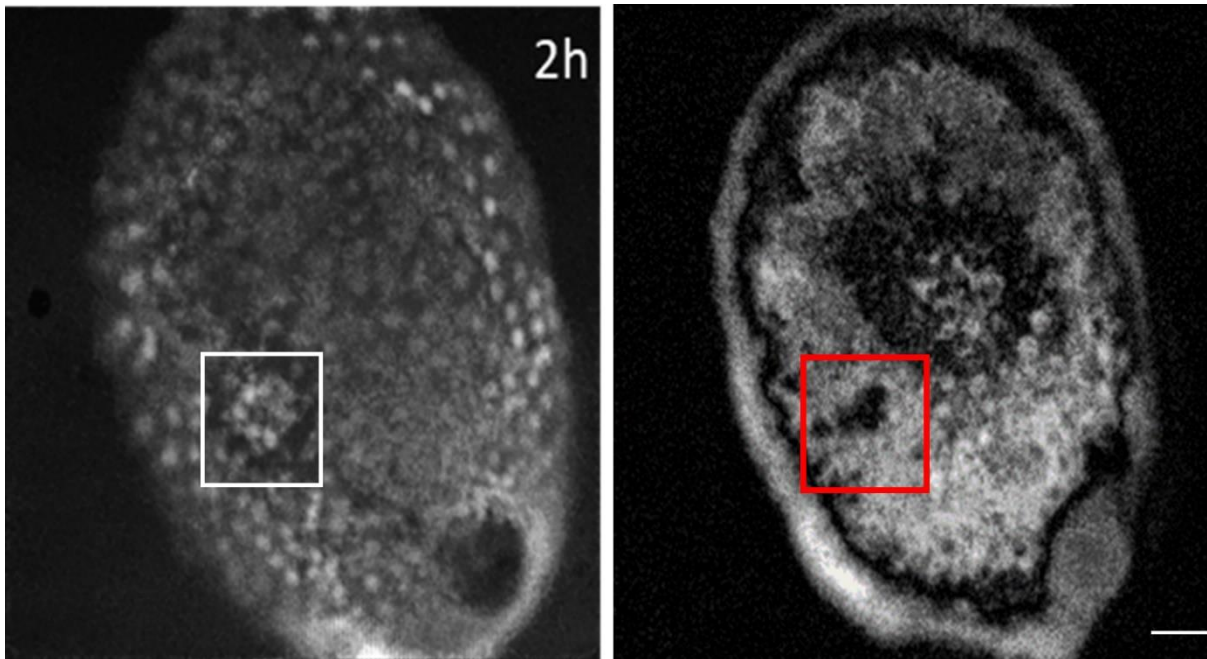
Οι φωτοακουστικές εικόνες του αντίστοιχου εμβρύου (**Εικόνα 13**) δείχνουν πως η λέκιθος έχει αρχικά ομοιόμορφα όρια, τα οποία καθώς προχωράει η ανάπτυξη αλλάζουν ανάλογα με την περιοχή και τις διεργασίες που πραγματοποιούνται εκεί. Από την 6^η ώρα παρακολούθησης όπου έχει σχηματιστεί το dorsal organ και μετά, υπάρχει μια εγκόλπωση στην λέκιθο στο δεξιό μέρος του εμβρύου που ενδέχεται να αντικατοπτρίζει κάποια φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ του dorsal organ και του eggshell (άσπρο πλαίσιο).



Εικόνα 13: Μετακίνηση της λεκίθου και δημιουργία εγκόλπωσης που ενδεχομένως σχετίζεται με κάποια φυσική αλληλεπίδραση του dorsal organ με το eggshell του εμβρύου (άσπρο πλαίσιο). Το scale bar αντιστοιχεί σε 100 μm .

Οι εικόνες της συγκεκριμένης μέτρησης πάρθηκαν με το λέιζερ των 532 nm και όσον αφορά τις παραμέτρους της διάταξης εφαρμόστηκαν ως ένταση της ακτινοβολίας τα 7.5 mW, τιμή gain στον φωτοπολλαπλασιαστή αρχικά 7 και μετά από κάποιες λήψεις 7.5, 40 averaging frames για την κάθε εικόνα και 30 min χρονική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων.

Τέλος, το έμβryo που απεικονίζεται στις παρακάτω εικόνες (**Εικόνα 14**) βρίσκεται στο στάδιο S15 της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στην εικόνα φθορισμού (αριστερά) φαίνεται το πλήρως σχηματισμένο dorsal organ, ο αδιαφανής δακτύλιος διογκωμένων κυττάρων στο άσπρο πλαίσιο. Παράλληλα στην φωτοακουστική εικόνα (δεξιά), που είναι αρκετά συμπληρωματική με αυτή του φθορισμού, είναι εμφανές το κενό που έχει σχηματιστεί στην λέκιθο λόγω της τοποθέτησης του dorsal organ (κόκκινο πλαίσιο).

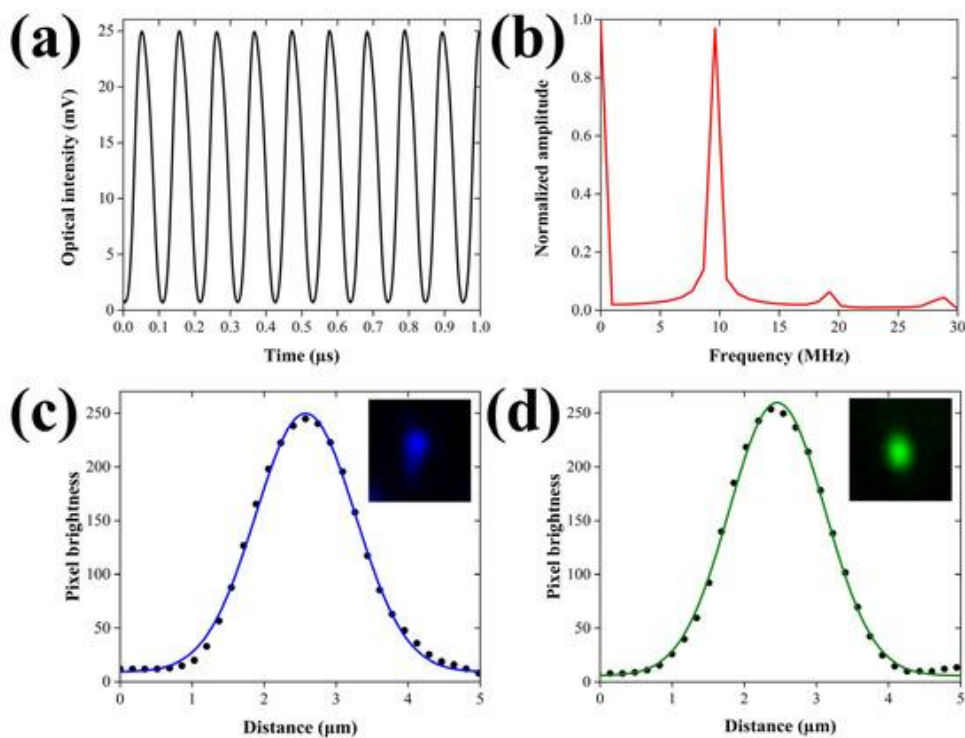


Εικόνα 14: Στις παραπάνω εικόνες είναι εμφανής η συμπληρωματικότητα στην πληροφορία που συλλέγεται από τα δύο φαινόμενα, με την απουσία της λεκίθου στην φωτοακουστική εικόνα (δεξιά) στο σημείο που εντοπίζεται το dorsal organ στην εικόνα φθορισμού (αριστερά). Το scale bar αντιστοιχεί σε 100 μm .

Η λήψη των παραπάνω εικόνων έγινε με την χρήση του λέιζερ που εκπέμπει στα 532 nm, η ένταση της ακτινοβολίας πήρε την τιμή 14 mW, το gain που δόθηκε στο φωτοπολλαπλασιαστή ήταν 8.5, κάθε εικόνα προέκυψε από 20 averaging frames και ο χρόνος μεταξύ δύο μετρήσεων ήταν 10 min. Η μικρή χρονική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων και η σχετικά υψηλή ενέργεια που χρησιμοποιήθηκε για την περίπτωση αυτή, ευθύνονται για την πρόκληση της φωτολεύκανσης που είναι φανερή κυρίως στην εικόνα του φθορισμού 2 ώρες μετά την πρώτη λήψη, όπως φαίνεται στο αριστερό τμήμα της **Εικόνα 14**.

3.3 Χαρακτηρισμός του υβριδικού συστήματος απεικόνισης ως προς την απόδοση παραγωγής σήματος PA και την πλευρική χωρική ανάλυση

Ο χαρακτηρισμός του υβριδικού συστήματος απεικόνισης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ως προς τη διαμόρφωση της έντασης και τη χωρική ανάλυση, έχει αναλυθεί σε προηγούμενη εργασία [6]. Για την ποσοτική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας διέγερσης φωτοακουστικών (PA) σημάτων, έγινε αρχικά καταγραφή του χρονικού προφίλ της δέσμης λέιζερ διαμορφωμένης έντασης χρησιμοποιώντας ένα γρήγορο φωτοανιχνευτή (DET025A, Thorlabs, Newton, NJ, USA; Bandwidth: 2 GHz). Στην **Εικόνα 15** το (a) απεικονίζει την ταλαντωτική συμπεριφορά της διαμορφωμένης οπτικής έντασης ($\lambda = 488 \text{ nm}$) για ένα χρονικό παράθυρο 1 μs , μετά την μέση τιμή 64 κυματομορφών. Το peak-to-peak πλάτος της ταλάντωσης υπολογίστηκε στα 24.3 mV ενώ η αντίστοιχη μέση τιμή υπολογίζεται στα 12.85 mV. Το βάθος διαμόρφωσης που ορίζεται ως το μισό των μεταβολών από κορυφή σε κορυφή (peak-to-peak) διαιρούμενο με τη μέση τιμή, είναι ίσο με 94.6%, προσεγγίζοντας τη βέλτιστη απόδοση για τη δημιουργία PA σημάτων. Αυτή η μικρή απόκλιση από την ιδανική τιμή του 100% μπορεί να εξηγηθεί από την ελαφρώς ατελή απόκριση του ακουστοοπτικού διαμορφωτή στην εφαρμοζόμενη τάση υψηλής συχνότητας των 9.5 MHz. Το ίδιο χρονικό προφίλ της δέσμης διέγερσης αξιολογήθηκε επίσης και για το μήκος κύματος των 532 nm, δίνοντας παρόμοιους δείκτες απόδοσης.



Εικόνα 15: Χρονικός και χωρικός χαρακτηρισμός των δεσμών διέγερσης. (a) Χρονική διαμόρφωση της έντασης του λέιζερ διέγερσης των 488 nm, όπως μετρείται από μια γρήγορη φωτοδίοδο (b) Κανονικοποιημένο φάσμα πλάτους του χρονικού προφίλ, που δείχνει μια κυρίαρχη κορυφή στα 9.5 MHz (c) Πλευρικό προφίλ μικροσφαιριδίου φθορισμού 520 nm με προσαρμοσμένη καμπύλη Gauss, χρησιμοποιώντας το μήκος κύματος 488 nm. Το ένθετο απεικονίζει την εικόνα φθορισμού του σφαιριδίου (οπτικό πεδίο: $8.24 \times 8.24 \mu\text{m}^2$) (d) Πλευρικό

προφίλ φθορίζοντος μικροσφαιριδίου 520 nm με προσαρμοσμένη καμπύλη Gauss, χρησιμοποιώντας το μήκος κύματος 532 nm. Ομοίως το ένθετο απεικονίζει την εικόνα φθορισμού του σφαιριδίου για ίδιο οπτικό πεδίο.

Επιπλέον, δημιουργήθηκε ένα κανονικοποιημένο φάσμα πλάτους με την εφαρμογή ενός γρήγορου μετασχηματισμού Fourier (FFT) στην οπτική κυματομορφή που αποκτήθηκε, διερευνώντας την κατανομή της ενέργειας μεταξύ των συνιστωσών συχνότητας που προέκυψαν. Το αντίστοιχο γράφημα, απεικονίζεται στην **Εικόνα 15** (b) και αποκαλύπτει μια κυρίαρχη κορυφή με κέντρο τα 9.5 MHz, η οποία συμπίπτει τόσο με τη συχνότητα της ημιτονοειδούς τάσης που παρέχεται από τη γεννήτρια σημάτων όσο και με την πραγματική κεντρική συχνότητα του μετατροπέα υπερήχων όπως δίνεται από τον κατασκευαστή. Ωστόσο, το φάσμα εμφανίζει δύο ακόμη κορυφές χαμηλότερου πλάτους στα 19 και 28.5 MHz, αντίστοιχα, που αντιπροσωπεύουν την αναμενόμενη δεύτερη και τρίτη αρμονική στην οπτική διαμόρφωση. Οι λόγοι πλάτους μεταξύ της θεμελιώδους συχνότητας και των αρμονικών έχουν υπολογιστεί σε 15.16 (δεύτερη αρμονική) και 22.05 (τρίτη αρμονική), αντίστοιχα. Οι προαναφερθείσες τιμές βρίσκονται σε μεγάλη συμφωνία με τις προδιαγραφές του ακουστο-οπτικού διαμορφωτή, επαληθεύοντας τη βέλτιστη απόδοση της διάταξης. Σημαντικό είναι να επισημανθεί ότι οι συνεισφορές της δεύτερης και τρίτης αρμονικής, δεν αναμένεται να επηρεάσουν πρακτικά τα παραγόμενα και ανιχνευόμενα φωτοακουστικά σήματα, λόγω της χρήσης φίλτρου RF στενής διέλευσης ζώνης (9-11 MHz στα -3 dB) και του περιορισμένου εύρους ζώνης του μετατροπέα υπερήχων.

Με στόχο την εκτίμηση της μέγιστης δυνατής απόδοσης των τρόπων φωτοακουστικής αντίθεσης και φθορισμού, πραγματοποιήθηκε στην συνέχεια χαρακτηρισμός της χωρικής ανάλυσης του υβριδικού. Καθώς και οι δύο τεχνικές απεικόνισης παρουσιάζουν μια πλευρική ανάλυση που τελικά καθορίζεται από την πλευρική έκταση (lateral extent) της εστίας της δέσμης διέγερσης, είναι προφανές ότι τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού θα συμπίπτουν μεταξύ τους. Για να δειχθεί αυτό, μετρήθηκαν φθορίζοντα σφαιρίδια διαμέτρου 520 nm (Fluorescent Estapor® Microspheres, Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA) τοποθετημένα σε γέλη αγαρόζης, χρησιμοποιώντας τα δύο διαθέσιμα μήκη κύματος διέγερσης. Η **Εικόνα 15** (c) δείχνει μια γραφική παράσταση που αναπαριστά το προφίλ του εκπεμπόμενου φθορισμού για το απεικονιζόμενο σφαιρίδιο με τη χρήση μήκους κύματος διέγερσης 488 nm. Με μπλε χρώμα εμφανίζεται η καμπύλη Gauss ($R^2 = 0.997$) πάνω στην οποία προσαρμόζονται τα σημεία, για την εξαγωγή του πλήρους πλάτους στη μισή μέγιστη τιμή (FWHM) των 1.63 μm . Η ληφθείσα εικόνα φθορισμού του σφαιριδίου παρουσιάζεται ως ένθετο που βρίσκεται στο επάνω δεξί τμήμα του γραφήματος, καλύπτοντας μια περιοχή 8.24 x 8.24 μm^2 . Δεδομένου ότι η διάμετρος του μετρούμενου σφαιριδίου είναι άμεσα συγκρίσιμη με το μήκος κύματος διέγερσης και υποθέτοντας ότι ο οπτικός φωτισμός και το αρχικό προφίλ φθορισμού του σφαιριδίου ακολουθούν γκαουσιανή κατανομή, η πλευρική ανάλυση R μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρήση του εξής τύπου [32]:

$$R = \sqrt{d_{exp}^2 - d_{bead}^2} \quad (a)$$

όπου το d_{exp} αντιπροσωπεύει το μετρούμενο και το d_{bead} το πραγματικό FWHM του σφαιριδίου, λαμβάνοντας υπόψη ότι η διάμετρος του σφαιριδίου (520 nm) αντιστοιχεί σε $\pm 3\sigma$

του γκαουσιανού προφίλ. Υπό αυτές τις συνθήκες, η εξίσωση (a) παρέχει πλευρική ανάλυση 1.54 μm , η οποία είναι χειρότερη από το FWHM της θεωρητικά προβλεπόμενης κηλίδας περιορισμένης περίθλασης RDL που δίνεται από την εξίσωση:

$$R_{DL} = 0.51 \frac{\lambda}{NA} \quad (b)$$

(όπου λ είναι το μήκος κύματος διέγερσης και NA το αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού φακού), με αντίστοιχη τιμή που προσεγγίζει το 1 μm . Η παρατηρούμενη απόκλιση από τη βέλτιστη απόδοση μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ποιότητας της δέσμης λέιζερ, της παρουσίας οπτικών εκτροπών, καθώς και της πεπερασμένης ακρίβειας της διαδικασίας σάρωσης. Παρόμοια ανάλυση πραγματοποιήθηκε για το μήκος κύματος των 532 nm, μετά τη μέτρηση των ίδιων φθορίζοντων σφαιριδίων. Σε αυτήν την περίπτωση, το προφίλ φθορισμού του σφαιριδίου, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15** (d) προσαρμόστηκε με μια γκαουσιανή καμπύλη ($R^2 = 0.998$) για να δώσει μια τιμή FWHM ίση με 1.56 μm , που αντιστοιχεί σε πλευρική ανάλυση 1.47 μm μέσω της εξίσωσης (a). Η τελευταία τιμή παρουσιάζει ξανά απόκλιση από το σημείο περιορισμένης περίθλασης, το οποίο έχει FWHM ίσο με 1.09 μm , όπως προβλέπεται από την εξίσωση (b). Ωστόσο, δεδομένου ότι το τυπικό μέγεθος των εμβρύων *Parhyale Hawaiensis* είναι της τάξης των μερικών εκατοντάδων μm (περίπου 500 μm) [1], μπορεί να βγει το συμπέρασμα ότι η επιτευχθείσα πλευρική ανάλυση είναι επαρκής για την περιγραφή των σημαντικότερων δομικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων με τη χρήση και των δύο τεχνικών μικροσκοπίας [6].

4. Συζήτηση

Η επιλογή των κατάλληλων τεχνικών απεικόνισης εξαρτάται από τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος και σχετίζεται με το βάθος απεικόνισης που προσφέρει η τεχνική, το βαθμό λεπτομέρειας και απεικονιστικής αντίθεσης που απαιτείται, την ταχύτητα των διεργασιών που μελετιούνται καθώς και τον οργανισμό που έχει επιλεγεί. Αποσκοπώντας στη λήψη του βέλτιστου δυνατού απεικονιστικού αποτελέσματος είναι συχνό να χρησιμοποιείται υβριδική μικροσκοπία, ο συνδυασμός δηλαδή δύο διαφορετικών μεθόδων απεικόνισης, ώστε να καταγράφονται δεδομένα ταυτόχρονα αξιοποιώντας τα πλεονεκτήματα των τεχνικών αυτών συνδυαστικά. Στην παρούσα επιστημονική μελέτη προτάθηκε ένα υβριδικό σύστημα μικροσκοπίας που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της μικροσκοπίας φθορισμού (confocal) και της frequency domain φωτοακουστικής μικροσκοπίας (FDPA), για την παρακολούθηση της εμβρυϊκής ανάπτυξης τόσο φθορίζοντα σημασμένων όσο και αγρίου τύπου εμβρύων *Parhyale hawaiensis* in vivo.

Η μικροσκοπία φθορισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτη in vivo διεργασιών και προσφέρει στην τελική εικόνα υψηλή απεικονιστική αντίθεση και επιλεκτικότητα απεικόνισης, δίνοντας την δυνατότητα ποσοτικοποίησης της πληροφορίας που συλλέγεται. Παράλληλα, η φωτοακουστική μικροσκοπία μπορεί να πραγματοποιήσει απεικόνιση σε μεγάλα βάθη λόγω της μικρής σκέδασης που έχουν τα ηχητικά κύματα και χαρακτηρίζεται επίσης από υψηλή χωρική ανάλυση. Ο συνδυασμός λοιπόν αυτών των δύο τεχνικών σε ένα υβριδικό μικροσκόπιο, δίνει αλληλοσυμπληρωματική πληροφορία και εξαιρετικά λεπτομερή αποτελέσματα για τον οργανισμό υπό μελέτη [36][37].

Παλαιότερες μελέτες έχουν αναδείξει τις πολλαπλές εφαρμογές και προοπτικές χρήσης της φωτοακουστικής μικροσκοπίας. Ιδιαίτερα στο πεδίο των βιοϊατρικών επιστημών [12][13], χρησιμοποιείται ευρέως για την λήψη μοριακών, δομικών και λειτουργικών πληροφοριών από την απεικόνιση βιολογικών ιστών και οργανισμών. Η φωτοακουστική μικροσκοπία μπορεί να προσφέρει συμπληρωματική πληροφορία όταν ενσωματώνεται σε ένα υβριδικό σύστημα με άλλες οπτικές απεικονιστικές τεχνικές. Υπάρχουν δύο τύποι φωτοακουστικής μικροσκοπίας, η καθιερωμένη time-domain και η frequency-domain. Η βασική διαφορά μεταξύ τους είναι ότι στην πρώτη η διέγερση γίνεται με παλμούς ακτινοβολίας και η ανίχνευση στον χρόνο ενώ στην δεύτερη η διέγερση γίνεται με ακτινοβολία ημιτονοειδούς μορφής, δηλαδή μονής συχνότητας, που είναι γνωστή όπως και το πλάτος, με μόνο άγνωστο την φάση που μπορεί όμως να υπολογιστεί μαθηματικά και να γίνει τελικά η ανίχνευση. Αρχικά ο συνδυασμός τεχνικών αφορούσε την time-domain φωτοακουστική μικροσκοπία με άλλες τεχνικές όπως η μικροσκοπία φθορισμού, η πολυφωτονική απεικόνιση (multiphoton imaging) και η οπτική τομογραφία συνοχής (OCT) [14]. Αξίζει να αναφερθεί ότι, αυτές οι εξελίξεις στην υβριδική απεικόνιση έχουν βρει διάφορες σημαντικές εφαρμογές, όπως η ευαίσθητη ανίχνευση των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων σε ποντίκια [14][15][16][17], η σκιαγράφιση της ανατομίας των οφθαλμών [18][19][20], η διερεύνηση των εμβρύων και των προνυμφών του ψαριού Zebrafish [21][22], η μέτρηση της περιεκτικότητας σε μελανίνη στα λέπια των ψαριών [23], καθώς και η χωρική χαρτογράφηση των χρωστικών ουσιών στους φυτικούς ιστούς [24]. Ωστόσο τα υβριδικά αυτά πειραματικά συστήματα χρησιμοποιούσαν ακριβές πηγές λέιζερ

νανοδευτερολέπτου Q-switched για την αποτελεσματική διέγερση των PA σημάτων, κάνοντας την απόκτηση τους οικονομική πρόκληση για την πλειονότητα των ερευνητικών εργαστηρίων. Ένας επιπλέον περιορισμός αυτών των συστημάτων αφορά στην απαίτηση πολύ γρήγορων DAQ καρτών για την καταγραφή και ψηφιοποίηση των φωτοακουστικών σημάτων που παράγονται από την time-domain φωτοακουστική μικροσκοπία, γεγονός το οποίο αυξάνει περαιτέρω το κόστος απόκτησής τους. Αποσκοπώντας στην δημιουργία πιο προσιτών οικονομικά υβριδικών συστημάτων απεικόνισης που συνδυάζουν φωτοακουστικό φαινόμενο με οπτικές τεχνικές, τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ως εναλλακτική λύση μια πειραματική διάταξη όπως αυτή της παρούσας μελέτης που αξιοποιεί frequency domain φωτοακουστική μικροσκοπία και φθορισμό για την λήψη συμπληρωματικής πληροφορίας [6][14][25].

Εκτός από τις προαναφερθείσες τεχνικές απεικόνισης που έχουν αξιοποιηθεί για την μελέτη του οργανισμού *Parhyale hawaiensis*, διαφορετικοί τύποι οπτικής μικροσκοπίας όπως η Multi-view μικροσκοπία λεπτού φύλλου φωτός (SPIM), η 4-D μικροσκοπία, η brightfield μικροσκοπία και η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε άλλες μελέτες για την απεικόνιση εμβρυϊκών και μετεμβρυϊκών διεργασιών για αρκετές ημέρες ανάπτυξης του οργανισμού [26]. Η μικροσκοπία SPIM βασίζεται στον φωτισμό του δείγματος με ένα πολύ λεπτό φύλλο φωτός που πέφτει κάθετα προς αυτό και δημιουργείται με την εστίαση του φωτός με ένα κυλινδρικό φακό. Είναι κατάλληλη τεχνική απεικόνισης για την μελέτη του τρόπου με τον οποίο σχηματίζονται οι ιστοί και τα όργανα από διαφορετικές σειρές κυττάρων και δίνει την δυνατότητα καταγραφής μεγάλης χρονικής διάρκειας δυναμικών βιολογικών διεργασιών με πολύ μικρά επίπεδα φωτολεύκανσης, υψηλή χωροχρονική ανάλυση και μεγάλο βάθος απεικόνισης [38]. Επίσης μέσω της multidirectional μορφής αυτής της τεχνικής τα δείγματα μπορούν να απεικονιστούν από πολλαπλές γωνίες και οι λήψεις να συνδυαστούν υπολογιστικά για την ανακατασκευή ολόκληρου του οργανισμού. Σκοπός αυτών των μελετών είναι η παρακολούθηση των συντονισμένων κινήσεων κυτταρικών σειρών, που μπορεί να βοηθήσει στην αποσαφήνιση των μηχανισμών μορφογένεσης σε μια πληθώρα οργανισμών. Παράδειγμα αποτελεί η παρακολούθηση του τρόπου σχηματισμού και ανάπτυξης των άκρων στον οργανισμό *Parhyale hawaiensis*, που σε συνδυασμό με δεδομένα λογισμικού για την παρακολούθηση κυττάρων, αποκάλυψε την κυτταρική αρχιτεκτονική και δυναμική πίσω από την μορφογένεση και την σχέση των διεργασιών αυτών με την έκφραση των σχετικών γονιδίων [9][27]. Σχετικά με την 4D-μικροσκοπία, αυτή αφορά την 3D απεικόνιση στο χρόνο και στηρίζεται στις αρχές της μικροσκοπίας αντίθετης φάσης με την χρήση Nomarski οπτικών, όπου αξιοποιούνται δύο δέσμες λέιζερ, μια ως δέσμη αναφοράς και μια η οποία υπόκειται σε αλλαγή φάσης λόγω διαφορετικού δείκτη διάθλασης των στοιχείων του δείγματος, οι οποίες δέσμες τελικά συμβάλουν και συλλέγεται η απαιτούμενη πληροφορία. Στον οργανισμό *Parhyale hawaiensis* και οι τρεις βλαστικές στιβάδες είναι καθορισμένες από το εμβρυϊκό στάδιο των 8 κυττάρων. Με την χρήση live απεικόνισης και 4-D μικροσκοπίας σε συνδυασμό με ένα λογισμικό ανάλυσης κυτταρικής γενεολογίας έγινε παρακολούθηση της εμβρυϊκής ανάπτυξης εμβρύων παρυάλου από το πρώιμο cleavage έως τα πρώτα στάδια του βλαστικού δίσκου, σε κυτταρικό επίπεδο. Στις μελέτες αυτές γίνεται παρακολούθηση των κυτταρικών σειρών και της συμπεριφοράς των κυττάρων και των κυτταρικών ομάδων που εμπλέκονται στην κυτταρική κίνηση και την γαστριδίωση [28][29]. Επιπλέον η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) η οποία αξιοποιεί μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων για την

απεικόνιση των δειγμάτων έχει χρησιμοποιηθεί σε όχι in vivo μελέτες που συσχετίζουν την αλλαγή στην γονιδιακή έκφραση με εξελικτικές αλλαγές στην μορφολογία. Για παράδειγμα στον παρύαλο παρατηρήθηκαν αλλαγές στην μορφολογία των θωρακικών εξαρτημάτων του οργανισμού μετά από διαφορετική έκφραση του γονιδίου *Ubx*, το οποίο ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια γονιδίων *Hox* που είναι χαρακτηριστικά για τα σωματικά πλάνα που ακολουθεί εξελικτικά ο οργανισμός [30].

Ένα ενδιαφέρον κομμάτι της αναπτυξιακής του *Parhyale* που μπορεί να ερευνηθεί μελλοντικά και να απεικονιστεί με την βοήθεια του υβριδικού συστήματος που παρουσιάζεται σε αυτή την εργασία, είναι ο απροσδιόριστος ακόμη μηχανισμός διαίρεσης που ακολουθούν τα κύτταρα μεταξύ του εμβρυικού σταδίου S6 (στάδιο soccer ball) και την αρχή της γαστριδίωσης [33]. Λίγο πριν το στάδιο του soccer ball όλα τα βλαστομερή εμφανίζουν ομοιόμορφα κατανεμημένη λέκιθο με το κυτταρόπλασμα να είναι συγκεντρωμένο γύρω από τους πυρήνες. Αργότερα κατά την ανάπτυξη χάνεται σταδιακά ο συγχρονισμός στην διαίρεση των κυττάρων, τα μακρομερή διαιρούνται πολύ πιο γρήγορα από τα μικρομερή και σε αυτή την φάση τα κύτταρα υπόκεινται σε μια ασυνήθιστη διαίρεση απομακρύνοντας την λέκιθο από το εσωτερικό τους, η οποία συγκεντρώνεται στο κέντρο του αυγού [4][28]. Ενώ στον οργανισμό *Parhyale hawaiiensis* ο μηχανισμός που δημιουργεί αυτή την μάζα λεκίθου και τα βλαστομερή μόνο με πυρήνα δεν είναι σαφής, στο συγγενικό αμφίποδο *Orchestia cavimana* η λέκιθος εξωθείται από τα κύτταρα μέσω μιας επιφανειακής διάσπασης που στερείται φάση S του κυτταρικού κύκλου [28][34]. Το κομμάτι αυτό λοιπόν έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να μελετηθεί ώστε να καλυφθεί η έλλειψη γνώσεων που υπάρχει σχετικά με τον συγκεκριμένο αναπτυξιακό μηχανισμό.

Η παρουσιαζόμενη διάταξη θα μπορούσε να αναβαθμιστεί περαιτέρω μέσω της ενσωμάτωσης εναλλακτικών πηγών λέιζερ CW που εκπέμπουν είτε υπεριώδη είτε υπέρυθη ακτινοβολία, επιτρέποντας την αποτελεσματική διέγερση διαφόρων ενδογενών μορίων των ιστών, όπως DNA/RNA ή λιπιδικές εναποθέσεις [31]. Επίσης η επιλογή χρωστικών με μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην ακτινοβολιακή έκθεση δίνει την δυνατότητα πιο μακροχρόνιας παρατήρησης των δειγμάτων και τον περιορισμό σε σημαντικό βαθμό της φωτολεύκανσης, διατηρώντας το SNR των μετρήσεων σε υψηλές τιμές. Η χρήση Lock-in ενισχυτών για την συλλογή, ενίσχυση και πολλαπλασιασμό των PA σημάτων αναμένεται επίσης να βελτιώσει την ευαισθησία του συστήματος, ελαχιστοποιώντας έτσι το χρόνο λήψης εικόνας και την οπτική ενέργεια που εναποτίθεται στο έμβρυο. Όσον αφορά τη συνεστιακή λειτουργία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρόσθετες μονάδες PMT για την ταυτόχρονη καταγραφή διαφορετικών ετικετών φθορισμού, προσφέροντας τη δυνατότητα πολυτροπικής απεικόνισης. Η ενσωμάτωση στο σύστημα ενός άξονα που θα περιστρέφει το δείγμα κατά την διάρκεια των μετρήσεων, θα προσέφερε την δυνατότητα λήψης εικόνων από πολλαπλές προβολές (Multiview) και την 3D ανακατασκευή των δειγμάτων [35]. Επιπλέον, οι τεχνικές παράμετροι του υβριδικού μικροσκοπίου (π.χ. αριθμητικό άνοιγμα του αντικειμενικού, μέγεθος οπής, λόγος διαστολής δέσμης, συχνότητα οπτικής διαμόρφωσης) πρέπει να προσαρμόζονται προσεκτικά ανάλογα με τις οπτικές, γεωμετρικές και μορφολογικές ιδιότητες των εξεταζόμενων δειγμάτων, καθώς και με την απαιτούμενη χωρική ανάλυση, το βάθος πεδίου και το οπτικό πεδίο. Αυτή η βελτιστοποίηση θα διευρύνει τις δυνατότητες εφαρμογής

της προτεινόμενης τεχνικής, επιτρέποντας σημαντικά βελτιωμένες παρατηρήσεις σε διάφορους πρότυπους οργανισμούς-μοντέλα σε αναπτυξιακές μελέτες, όπως η *Drosophila melanogaster*, ο *Danio rerio*, ο *Xenopus tropicalis*, τα έμβρυα *Mus musculus* και άλλοι. Ως εκ τούτου, αναμένουμε ότι τα ευρήματα της παρούσας μελέτης θα ανοίξουν το δρόμο για την ευρύτερη υιοθέτηση φθηνών υβριδικών διαγνωστικών μεθόδων οπτικής και PA στην αναπτυξιακή βιολογία, αναβαθμίζοντας σημαντικά τις τωρινές δυνατότητες απεικόνισης.

5. Βιβλιογραφία

- [1] Browne, W. E., Price, A. L., Gerberding, M., & Patel, N. H. (2005). Stages of embryonic development in the amphipod crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. *Genesis* (New York, N.Y. : 2000), 42(3), 124–149. <https://doi.org/10.1002/gene.20145>
- [2] Averof. (2022). The crustacean *Parhyale*. *Nature Methods*, 19, 1015–1016.
- [3] Rehm, E. J., Hannibal, R. L., Chaw, R. C., Vargas-Vila, M. A., & Patel, N. H. (2009). Antibody staining of *Parhyale hawaiiensis* embryos. *Cold Spring Harbor protocols*, 2009(1), pdb.prot5129. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5129>
- [4] Rallis J, Kapai G, Pavlopoulos A. (2021) *Parhyale hawaiiensis*, Crustacea. Chapter 16 in *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology: Established and Emerging*, CRC Press, 289-306.<https://doi.org/10.1201/9781003217503>
- [5] Paris, M., Wolff, C., Patel, N. H., & Averof, M. (2022). The crustacean model *Parhyale hawaiiensis*. *Current topics in developmental biology*, 147, 199–230. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2022.02.001>
- [6] Tserevelakis, G.J.; Tekonaki, E.; Kalogeridi, M.; Liaskas, I.; Pavlopoulos, A.; Zacharakis, G. Hybrid Fluorescence and Frequency-Domain Photoacoustic Microscopy for Imaging Development of *Parhyale hawaiiensis* Embryos. *Photonics* 2023, 10, 264. <https://doi.org/10.3390/photonics10030264>
- [7] Damian Kao, Alvina G Lai, Evangelia Stamataki, Silvana Rosic, Nikolaos Konstantinides, Erin Jarvis, Alessia Di Donfrancesco, Natalia Pouchkina-Stancheva, Marie Sémon, Marco Grillo, Heather Bruce, Suyash Kumar, Igor Siwanowicz, Andy Le, Andrew Lemire, Michael B Eisen, Cassandra Extavour, William E Browne, Carsten Wolff, Michalis Averof, Nipam H Patel, Peter Sarkies, Anastasios Pavlopoulos, Aziz Aboobaker (2016) The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion *eLife* 5:e20062 <https://doi.org/10.7554/eLife.20062>
- [8] Rehm, E. J., Hannibal, R. L., Chaw, R. C., Vargas-Vila, M. A., & Patel, N. H. (2009). Fixation and dissection of *Parhyale hawaiiensis* embryos. *Cold Spring Harbor protocols*, 2009(1), pdb.prot5127. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5127>
- [9] Wolff, C., Tinevez, J. Y., Pietzsch, T., Stamataki, E., Harich, B., Guignard, L., Preibisch, S., Shorte, S., Keller, P. J., Tomancak, P., & Pavlopoulos, A. (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>
- [10] Yao, J., & Wang, L. V. (2013). Photoacoustic Microscopy. *Laser & photonics reviews*, 7(5), 10.1002/lpor.201200060. <https://doi.org/10.1002/lpor.201200060>
- [11] Tserevelakis, G. J., Velentza, S., Liaskas, I., Archontidis, T., Pavlopoulos, A., & Zacharakis, G. (2022). Imaging *Parhyale hawaiiensis* embryogenesis with frequency domain photoacoustic microscopy: A novel tool in developmental biology. *Journal of biophotonics*, 15(12), e202200202. <https://doi.org/10.1002/jbio.202200202>
- [12] Yao, J., & Wang, L. V. (2014). Sensitivity of photoacoustic microscopy. *Photoacoustics*, 2(2), 87–101. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2014.04.002>

- [13] Jeon, S., Kim, J., Lee, D., Baik, J. W., & Kim, C. (2019). Review on practical photoacoustic microscopy. *Photoacoustics*, 15, 100141. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2019.100141>
- [14] Dadkhah, A., & Jiao, S. (2021). Integrating photoacoustic microscopy with other imaging technologies for multimodal imaging. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 246(7), 771–777. <https://doi.org/10.1177/1535370220977176>
- [15] Rao, B., Soto, F., Kerschensteiner, D., & Wang, L. V. (2014). Integrated photoacoustic, confocal, and two-photon microscope. *Journal of biomedical optics*, 19(3), 36002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.3.036002>
- [16] Park, J., Park, B., Kim, T. Y., Jung, S., Choi, W. J., Ahn, J., Yoon, D. H., Kim, J., Jeon, S., Lee, D., Yong, U., Jang, J., Kim, W. J., Kim, H. K., Jeong, U., Kim, H. H., & Kim, C. (2021). Quadruple ultrasound, photoacoustic, optical coherence, and fluorescence fusion imaging with a transparent ultrasound transducer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(11), e1920879118. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920879118>
- [17] Dadkhah, A., Zhou, J., Yeasmin, N., & Jiao, S. (2018). Integrated multimodal photoacoustic microscopy with OCT- guided dynamic focusing. *Biomedical optics express*, 10(1), 137–150. <https://doi.org/10.1364/BOE.10.000137>
- [18] Zhang, W., Li, Y., Yu, Y., Derouin, K., Qin, Y., Nguyen, V. P., Xia, X., Wang, X., & Paulus, Y. M. (2020). Simultaneous photoacoustic microscopy, spectral-domain optical coherence tomography, and fluorescein microscopy multi-modality retinal imaging. *Photoacoustics*, 20, 100194. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2020.100194>
- [19] Tserevelakis, G. J., Avtzi, S., Tsilimbaris, M. K., & Zacharakis, G. (2017). Delineating the anatomy of the ciliary body using hybrid optical and photoacoustic imaging. *Journal of biomedical optics*, 22(6), 60501. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.22.6.060501>
- [20] Tserevelakis, G. J., Mavrakis, K. G., Pantazopoulou, D., Lagoudaki, E., Detorakis, E., & Zacharakis, G. (2020). Hybrid autofluorescence and photoacoustic label-free microscopy for the investigation and identification of malignancies in ocular biopsies. *Optics letters*, 45(20), 5748–5751. <https://doi.org/10.1364/OL.403435>
- [21] Hosseinaee, Z.; Tummon Simmons, J.A.; Reza, P.H. Dual-Modal Photoacoustic Imaging and Optical Coherence Tomography [Review]. *Front Phys* 2020, 8, 616618. <https://doi.org/10.3389/fphy.2020.616618>
- [22] Soliman, D., Tserevelakis, G. J., Omar, M., & Ntziachristos, V. (2015). Combining microscopy with mesoscopy using optical and optoacoustic label-free modes. *Scientific reports*, 5, 12902. <https://doi.org/10.1038/srep12902>
- [23] Tserevelakis, G. J., Pavlidis, M., Samaras, A., Barmparis, G. D., Mavrakis, K. G., Draganidis, I., Oikonomou, A., Fanouraki, E., Tsironis, G. P., & Zacharakis, G. (2022). Hybrid confocal fluorescence and photoacoustic microscopy for the label-free investigation of melanin accumulation in fish scales. *Scientific reports*, 12(1), 7173. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11262-0>

- [24] Tserevelakis, G. J., Tsagkaraki, M., & Zacharakis, G. (2016). Hybrid photoacoustic and optical imaging of pigments in vegetative tissues. *Journal of microscopy*, 263(3), 300–306. <https://doi.org/10.1111/jmi.12396>
- [25] Jeon, S., Kim, J., Lee, D., Baik, J. W., & Kim, C. (2019). Review on practical photoacoustic microscopy. *Photoacoustics*, 15, 100141. <https://doi.org/10.1016/j.pacs.2019.100141>
- [26] Stamataki, E., & Pavlopoulos, A. (2016). Non-insect crustacean models in developmental genetics including an encomium to *Parhyale hawaiiensis*. *Current opinion in genetics & development*, 39, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.07.004>
- [27] Carsten Wolff, Jean-Yves Tinevez, Tobias Pietzsch, Evangelia Stamataki, Benjamin Harich, Stephan Preibisch, Spencer Shorte, Philipp J. Keller, Pavel Tomancak, Anastasios Pavlopoulos. (2017). Reconstruction of cell lineages and behaviors underlying arthropod limb outgrowth with multi-view light-sheet imaging and tracking. bioRxiv 112623; <https://doi.org/10.1101/112623>
- [28] Alwes, F., Hinchey, B., & Extavour, C. G. (2011). Patterns of cell lineage, movement, and migration from germ layer specification to gastrulation in the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Developmental biology*, 359(1), 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.07.029>
- [29] Hejnowicz, A., & Schnabel, R. (2006). What a couple of dimensions can do for you: Comparative developmental studies using 4D microscopy--examples from tardigrade development. *Integrative and comparative biology*, 46(2), 151–161. <https://doi.org/10.1093/icb/icj012>
- [30] Pavlopoulos, A., Kontarakis, Z., Liubicich, D. M., Serano, J. M., Akam, M., Patel, N. H., & Averof, M. (2009). Probing the evolution of appendage specialization by Hox gene misexpression in an emerging model crustacean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 13897–13902. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902804106>
- [31] Buma, T., Conley, N. C., & Choi, S. W. (2017). Multispectral photoacoustic microscopy of lipids using a pulsed supercontinuum laser. *Biomedical optics express*, 9(1), 276–288. <https://doi.org/10.1364/BOE.9.000276>
- [32] George J. Tserevelakis, Dominik Soliman, Murad Omar, and Vasilis Ntziachristos, "Hybrid multiphoton and optoacoustic microscope," *Opt. Lett.* 39, 1819-1822 (2014) <https://doi.org/10.1364/OL.39.001819>
- [33] Chaw RC, Patel NH. Independent migration of cell populations in the early gastrulation of the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Developmental Biology*. 2012Nov;371(1):94-109. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.012>. PMID: 23046627.
- [34] Wolff, C., & Scholtz, G. (2002). Cell lineage, axis formation, and the origin of germ layers in the amphipod crustacean *Orchestia cavimana*. *Developmental biology*, 250(1), 44–58. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0789>
- [35] Mylonakis, M., Tserevelakis, G. J., Vlachos, G., Fanouraki, E., Pavlopoulos, A., Pavlidis, M., & Zacharakis, G. (2024). Bimodal optical and optoacoustic multiview

microscope in the frequency-domain. Optics letters, 49(3), 462–465.
<https://doi.org/10.1364/OL.510384>

- [36] Ιστοχώρος του μαθήματος ΒΙΟΛ-403 Ειδικές Τεχνικές Βιοαπεικόνισης (Υπεύθυνος Δρ. Γ. Τσερεβελάκης), Διάλεξη για τη Φωτοακουστική μικροσκοπία, <https://pc4b.gr/pdf/biol-403dem/05-pat.pdf>
- [37] Ιστοχώρος του μαθήματος ΒΙΟΛ-403 Ειδικές Τεχνικές Βιοαπεικόνισης (Υπεύθυνος Δρ. Γ. Τσερεβελάκης), Διάλεξη για τη Μικροσκοπία Φθορισμού, <https://pc4b.gr/pdf/biol-403dem/07-mikroskopia-fthorismou-1.pdf>
- [38] Ιστοχώρος του μαθήματος ΒΙΟΛ-403 Ειδικές Τεχνικές Βιοαπεικόνισης (Υπεύθυνος Δρ. Γ. Τσερεβελάκης), Διάλεξη για τη Μικροσκοπία λεπτού φύλλου φωτός (SPIM), <https://pc4b.gr/pdf/biol-403dem/08-mikroskopia-fthorismou-2.pdf>