

Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών  
Πανεπιστήμιο Κρήτης  
Τμήμα Φυσικής

**Απεικόνιση προεμφυτευτικών  
εμβρύων ποντικών μέσω καταγραφής σημάτων  
γένεσης τρίτης αρμονικής**

**Τσαγκαράκη Μαργαρίτα**

**Επιβλέπων: Καθ. Κ. Φωτάκης**

**Υπεύθυνος Εργασίας: Δρ. Γ. Φιλιππίδης**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λέιζερ (IHΔΛ-IESL) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ITE-FORTH) με διευθύνοντα τον Καθ. Κωνσταντίνο Φωτάκη και αποτελεί το αποτέλεσμα της συνεργασίας του Εργαστηρίου Ανοσολογίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης με διευθύνουσα τη Καθ. Ειρήνη Αθανασάκη.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον καθ. Κωνσταντίνο Φωτάκη που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με την έρευνα και μάλιστα σε έναν εξαιρετικά ενδιαφέρον και καινοτόμο τομέα που συνδυάζει δύο επιστήμες, της φυσικής και της βιολογίας που μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά αποτελέσματα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ Γ Φιλιππίδη που ήταν και ο επιβλέπων της εργασίας μου , για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ,την υποστήριξη , την συνεχή καθοδήγηση και επίβλεψη , δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο ένα ιδανικό περιβάλλον ώστε να αποκτήσω καινούριες γνώσεις και εργαστηριακή εμπειρία.

Να ευχαριστήσω επίσης για την άψογη συνεργασία την Χριστιανα Κυβελίδου υποψήφια διδάκτωρ του τμήματος της βιολογίας που μας παρείχε τα δείγματα , μας καθοδηγούσε και ήταν πάντα στη διάθεση μας για οποιαδήποτε απορία. Επίσης, ευχαριστίες στην Άννα Τσούκο με την οποία εργαστήκαμε μαζί καθ όλη την πειραματική διαδικασία.

Τέλος, να ευχαριστήσω τον Δρ. Γεώργιο Τσερεβελάκη για την ουσιαστική βοήθεια του καθώς και όλα τα μέλη της ομάδας της μη γραμμικής μικροσκοπίας του IHΔΛ, την Βαρβάρα Πετανίδου, την Βαγγελίω Γαυγιωτάκη και την Μερόπη Μαρη.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|  |    |
|--|----|
| Ευχαριστίες.....   | 2  |
| Περίληψη.....  | 4  |
| <b>Κεφάλαιο 1: Μη γραμμική οπτική</b>  |    |
| 1.1 Πολυφωτονικά διεγειρόμενος φθορισμός.....                                    | 5  |
| 1.2 Παραγωγή αρμονικών συχνοτήτων.....   | 6  |
| 1.3 Φωτονική αναπαράσταση και προϋποθέσεις γένεσης δεύτερης αρμονικής συχνότητας |    |
| 1.4 Γένεση τρίτης αρμονικής .....  | 8  |
| 1.5 Τα πλεονεκτήματα της μη γραμμικής μικροσκοπίας.....                          | 11 |
| 1.6 Χρήσεις τρίτης αρμονικής .....   | 14 |
| <b>Κεφάλαιο2: Περιγραφή Πειραματικής Διάταξης</b> .....                          | 15 |
| <b>Κεφάλαιο 3: Πειραματική Διαδικασία</b>  |    |
| 3.1 Εισαγωγή.....  | 18 |
| 3.2 Σκοπός της μελέτης.....  | 20 |
| 3.3 Πειραματική διαδικασία και αποτελέσματα.....                                 | 21 |
| 3.4 Φυσιολογικά και μη ανεπτυγμένα εμβρυα.....                                   | 26 |
| 3.5 Μελλοντικοί στόχοι.....  | 27 |
| Παράθεμα.....  | 28 |
| Βιβλιογραφία.....  | 31 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εξωσωματική γονιμοποίηση η επιλογή των καταλληλότερων εμβρύων είναι απαραίτητη για την επιτυχή εμφύτευση και την επικείμενη εγκυμοσύνη. Πολλά ζευγάρια αναγκάζονται σε πολλαπλές δοκιμές λόγω της υποκειμενικής μικροσκοπικής επιλογής των εμβρύων αφού ένα γενετικά υγιές έμβρυο δεν είναι αναγκαία ικανό για εμφύτευση. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη μιας τεχνικής απεικόνισης που θα εξετάζει την λειτουργικότητα και θα αξιολογεί την υγεία των εμβρύων απαιτείται προκειμένου να βελτιωθεί η επιλογή εμβρύων πριν από την εμφύτευση.

Η μικροσκοπία γένεσης τρίτης αρμονικής (THG) είναι μια νέα μη επεμβατική τεχνική απεικόνισης η οποία απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία των δειγμάτων και καμία χρώση και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την επιλογή εμβρύων και την παρακολούθηση τους κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γονιμοποίησης *in vitro*. Η χρήση της μικροσκοπίας THG έχει προσφέρει πολύτιμες και συμπληρωματικές πληροφορίες ως προς την ενεργειακή κατάσταση των ωαρίων και των εμβρύων πριν από την εμφύτευση, την χρονική εξέλιξη των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης καθώς και την εν δυνάμει ισοδυναμία των βλαστομεριδίων του εμβρύου. Επιπλέον, η ποσοτικοποίηση του σήματος THG θα μπορούσε να επιτρέψει την παράδοση μιας αντικειμενικής αριθμητικής τιμής σε κάθε ωοκύτταρο ή έμβρυο η οποία να αντικατοπτρίζει την περιεκτικότητα του σε λιπιδικά κυστίδια και, κατά συνέπεια θα συσχετίζεται με την ενεργειακή τους κατάσταση

Η εν λόγω μεθοδολογία θα μπορούσε να προσφέρει στα κέντρα εξωσωματικής γονιμοποίησης ένα νέο διαγνωστικό εργαλείο με σκοπό την αύξηση των ποσοστών επιτυχών κυήσεων.

Στην παρούσα μελέτη συνεχίσαμε την διερεύνηση του ρόλου του ενεργειακού προφίλ των προεμφυτευτικών εμβρύων, με την μελέτη της επίδρασης της L-καρνιτίνης στα έμβρυα ποντικών. Η L-καρνιτίνη είναι ένα μικρό μόριο απαραίτητο για τη μεταφορά λιπαρών οξέων από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια με σκοπό τον καταβολισμό τους και την παραγωγή ενέργειας για το κύτταρο

Η L-καρνιτίνη χορηγήθηκε ενέσιμα σε BALB/c θυληκα ποντίκια 4<sup>ww</sup> έως 12 εβδομάδων. Θεραπεία με L-καρνιτίνη για 4 και 5 μέρες φαίνεται να μην έχει κάποια σημαντική επίδραση όμως στις 7 μέρες παρατηρούμε, μεταξύ άλλων, αλλαγές στο σήμα της τρίτης αρμονικής. Ενώ δεν υπάρχει διαφορά στον όγκο των λιπιδικών κυστιδίων, εμφανίζονται συσσωματώματα των δομών αυτών ενώ παράλληλα παρά την ύπαρξη γονιμοποιημένων

εμβρύων μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης στην 3<sup>η</sup> μέρα, οι εγκυμοσύνες δεν ολοκληρώθηκαν.

Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν τη σημασία των λιπιδικών κυστιδίων στο αναπτυσσόμενο προεμφυτευτικό έμβρυο και αναδεικνύουν την χρησιμότητα της THG μικροσκοπίας ως ένα νέο, χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο για την αξιολόγηση της ποιότητας των προεμφυτευτικών εμβρύων και την βελτίωση των αποτελεσμάτων της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής

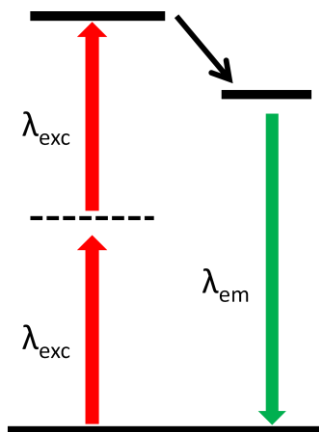
## Κεφάλαιο 1: Μη γραμμική οπτική

Μη γραμμική οπτική είναι η μελέτη φαινομένων που συμβαίνουν λόγω της τροποποίησης των οπτικών ιδιοτήτων ενός υλικού συστήματος από την παρουσία του φωτός. Συνήθως, μόνο εκπεμπόμενο φως από λέιζερ είναι αρκετά έντονο ώστε να τροποποιήσει τις οπτικές ιδιότητες του υλικού συστήματος. Τα φαινόμενα αυτά ονομάζονται μη γραμμικά διότι η απόκριση του υλικού εξαρτάται μη γραμμικά από το εφαρμοζόμενο Η/Μ πεδίο.

Τα μη γραμμικά φαινόμενα που θα εξετάσουμε στη συνέχεια είναι ο πολυφωτονικά διεγερόμενος φθορισμός, η γένεση δεύτερης αρμονικής και κυρίως η γένεση τρίτης αρμονικής που αφορά και την πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας.

### 1.1 Πολυφωτονικά διεγερόμενος φθορισμός

Κατά τον πολυφωτονικά διεγερόμενος φθορισμό έχουμε ταυτόχρονη απορρόφηση  $N$  φωτονίων για τη διέγερση ενός μορίου του υλικού από μια χαμηλή ενεργειακή στάθμη σε μία υψηλότερη και στη συνέχεια αποδιέγερσή του με ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας. Είναι ένα μη σύμφωνο φαινόμενο και εξαρτάται από την  $N$ -οστή δύναμη της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.



**Σχήμα 1: Διφωτονικά διεγερόμενος φθορισμός**

Η πιο απλή περίπτωση του φαινομένου είναι ο διφωτονικά διεγερόμενος φθορισμός. Όπως βλέπουμε και στο διπλανό σχήμα κατά το φαινόμενο αυτό ένα φωτόνιο με ενέργεια περίπου ίση με τη μισή ενεργειακή διαφορά μεταξύ θεμελιώδους και διεγερόμενης στάθμης αλληλεπιδρά με το ηλεκτρόνιο με αποτέλεσμα αυτό να μεταβεί σε μια εικονική ενεργειακή στάθμη (virtual state) για ένα πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Αν μέσα σε αυτό το διάστημα απορροφηθεί κι ένα δεύτερο φωτόνιο ίδιας ενέργειας τότε θα επιτευχθεί η μετάβαση του ηλεκτρονίου στη διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση.

Η μη γραμμικότητα του φαινομένου έγκειται στο ότι η ένταση του διφωτονικού φθορισμού εξαρτάται μη γραμμικά από το τετράγωνο της έντασης της διεγείρουσας ακτινοβολίας.

Ο χρόνος που παραμένει το ηλεκτρόνιο στην εικονική ενεργειακή στάθμη μπορεί να προσδιοριστεί από την αρχή απροσδιοριστίας ενέργειας χρόνου  $\Delta E \cdot \Delta t \approx \hbar$ . Θέτουμε το  $\Delta E$  ίσο με 1eV, που είναι η τυπική τιμή της διαφοράς μεταξύ ενέργειας συντονισμού της ενεργειακής στάθμης μετάβασης και της ενέργειας του απορροφούμενου φωτονίου. Μετά την αντικατάσταση προκύπτει ότι ο χρόνος ζωής μιας εικονικής στάθμης είναι περίπου μισό fs.

$$\Delta E \cdot \Delta t \approx \hbar \Rightarrow \Delta t \approx \frac{\hbar}{\Delta E} \approx 0.5 \text{ fs} \quad (\text{Σχέση 1})$$

## 1.2 Παραγωγή Αρμονικών Συχνοτήτων

Το φως είναι Η/Μ κύμα και όταν διαδίδεται διαμέσου ενός υλικού το ηλεκτρομαγνητικό του πεδίο ασκεί σημαντικές δυνάμεις στα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στοιβάδων του υλικού, με αποτέλεσμα τον περιοδικό διαχωρισμό των φορτίων κατά μία πεπερασμένη μέση απόσταση. Με αυτόν τον τρόπο επάγεται διπολική ροπή. Η συνολική διπολική ροπή ανά μονάδα όγκου ονομάζεται ηλεκτρική πόλωση.

Για ΗΜ πεδία χαμηλής έντασης η ηλεκτρική πόλωση είναι ανάλογη του πεδίου και της ηλεκτρικής επιδεκτικότητας  $1^{ns}$  τάξης του μέσου η οποία μας δείχνει πόσο εύκολα μπορεί να πολωθεί το μέσο και δίνεται από την παρακάτω σχέση

$$P(t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E(t) \quad (\text{Σχέση 2})$$

Για μεγάλες όμως εντάσεις δεν μπορεί να συνεχιστεί η γραμμική απόκριση του μέσου και εμφανίζονται και μη γραμμικοί όροι όπως βλέπουμε στη σχέση 3

$$P(t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E(t) + \varepsilon_0 \chi^{(2)} E^2(t) + \varepsilon_0 \chi^{(3)} E^3(t) + \dots \quad (\text{Σχέση 3})$$

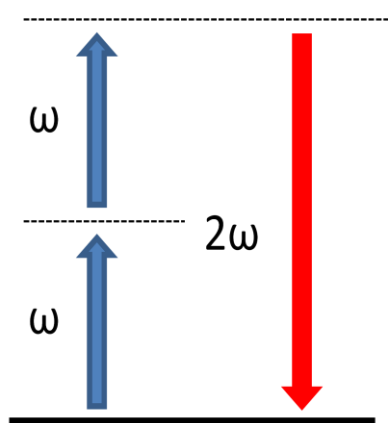
Υποθέτουμε πως στο υλικό προσπίπτει κύμα της μορφής  $E(t) = E_0 \sin \omega t$ . Αντικαθιστώντας στην Σχέση 3 και με χρήση των κατάλληλων τριγωνομετρικών ταυτοτήτων έχουμε την Σχέση 4

$$P(t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E_0 \sin \omega t + \frac{\varepsilon_0 \chi^{(2)}}{2} E_0^2 (1 - \cos 2\omega t) + \frac{\varepsilon_0 \chi^{(3)}}{4} E_0^3 (3 \sin \omega t - \sin 3\omega t) + \dots$$

(Σχέση 4)

Στην Σχέση 4 που προέκυψε, ο πρώτος όρος όπως είδαμε και στη Σχέση 2, είναι η φυσική απόκριση του μέσου λόγω του εφαρμοζόμενου πεδίου  $E(t)$ . Στο δεύτερο κομμάτι εμφανίζεται ένας όρος διπλάσιας της θεμελιώδους συχνότητας, ο  $\cos 2\omega t$ . Η επανεκπεμπόμενη ακτινοβολία λόγω της μεταβαλλόμενης ηλεκτρικής πόλωσης του μέσου θα έχει επίσης συχνότητα  $2\omega$ . Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται γένεση δεύτερης αρμονικής. Αντίστοιχα, στο τρίτο κομμάτι εμφανίζεται ο όρος  $\sin 3\omega t$ , ο οποίος έχει τριπλάσια συχνότητα της θεμελιώδους, συνεπώς πρόκειται για γένεση τρίτης αρμονικής.

### 1.3 Φωτονική αναπαράσταση και προϋποθέσεις γένεσης δεύτερης αρμονικής συχνότητας



**Σχήμα 2: Γένεση Δεύτερης Αρμονικής**

Στην περίπτωση της δεύτερης αρμονικής δύο πανομοιότυπα φωτόνια συχνότητας  $\omega$  συνδυάζονται με τέτοιο τρόπο εντός του μέσου έτσι ώστε να προκύψει ένα φωτόνιο διπλάσιας συχνότητας (Σχήμα 2).

Επιπροσθέτως, η ένταση της ακτινοβολίας δεύτερης αρμονικής είναι ανάλογη του τετραγώνου της έντασης της προσπίπτουσας στο μέσο ακτινοβολίας.

Όπως είναι φανερό και από το σχήμα τα νέα προκύπτοντα φωτόνια δεν παράγονται μέσω διαδικασιών απορρόφησης και ακόλουθης εκπομπής

φωτονίων, αφού οι διακεκομμένες γραμμές αναπαριστούν εικονικές ενεργειακές στάθμες το οποίο σημαίνει ότι δεν λαμβάνει χώρα εναπόθεση ενέργειας στο μέσο.

Οι αρμονικές είναι σύμφωνα φαινόμενα σκέδασης πράγμα που σημαίνει ότι για να λάβει χώρα το φαινόμενο, προϋπόθεση είναι η είναι η ενισχυτική άθροιση των επιμέρους ταλαντούμενων δίπολων.

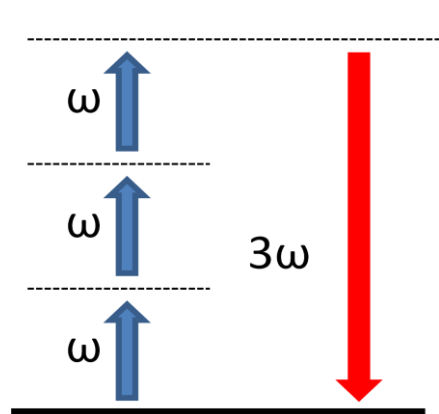
Για την δεύτερη αρμονική οι απαραίτητες συνθήκες είναι τα μόρια του μέσου να είναι μη κεντροσυμμετρικά και η ύπαρξη κατάλληλης χωρικής οργάνωσης ώστε να υπάρχει σύμφωνη άθροιση της ακτινοβολίας του καθενός ξεχωριστά.

Ειδικότερα, τα περισσότερα ιστροπικά υλικά είναι κεντροσυμμετρικά, πράγμα που σημαίνει ότι έχουν αντίστροφη συμμετρία και δεν παράγουν σήμα δεύτερης αρμονικής.



Ως εκ τούτου, προκειμένου να δημιουργηθεί το φαινόμενο, χρειαζόμαστε ένα μέσο μη ιστροπικό και την ύπαρξη κάποιου «σπασίματος» στη συμμετρία του. Αυτό είναι δυνατό σε πολλά κρυσταλλικά υλικά και σε ορισμένες βιολογικές δομές πρωτεΐνης, όπως κολλαγόνο ή των σκελετικών μυών. Η απόδοση της μετατροπής εξαρτάται από το μήκος κύματος διέγερσης, το είδος της δομής που μελετήθηκαν (κολλαγόνο, σκελετικό μυ, κ.λπ.), τη σχετική πόλωση του φωτός σε σχέση με το δείγμα.

#### 1.4 Γένεση τρίτης αρμονικής



**Σχήμα 3: Γένεση τρίτης αρμονικής**

Η φωτονική αναπαράσταση στην περίπτωση της τρίτης αρμονικής φαίνεται στο σχήμα (3). Όπως βλέπουμε τρία πανομοιότυπα φωτόνια συχνότητας  $\omega$  θα δώσουν τελικά ένα φωτόνιο τριπλάσιας συχνότητας

Η ένταση της ακτινοβολίας τρίτης αρμονικής είναι ανάλογη του κύβου της έντασης της προσπίπτουσας στο μέσο ακτινοβολίας. Επίσης ισχύει όπως και για την δεύτερη αρμονική ότι τα προκύπτοντα φωτόνια

δεν παράγονται μέσω διαδικασιών απορρόφησης και ακόλουθης εκπομπής φωτονίων, επομένως δεν λαμβάνει χώρα εναπόθεση ενέργειας στο μέσο. Συνεπώς, μιλάμε για φαινόμενο σκέδασης. Αυτή η εικονική-μετάβαση και η μη εναπόθεση ενέργειας παρέχει μια "μη επεμβατική" φύση επιθυμητή για εφαρμογές μικροσκοπίας, ειδικά για βιολογικά δείγματα.

Ας εξετάσουμε αναλυτικότερα όμως την γένεση τρίτης αρμονικής μια και είναι το φαινόμενο με το οποίο ασχοληθήκαμε στην πειραματική διαδικασία. Γνωρίζουμε ότι η τρίτη αρμονική εξαρτάται από το πραγματικό μέρος της μη γραμμικής ηλεκτρικής επιδεκτικότητας τρίτης τάξης  $\chi^{(3)}$ . Σε αντίθεση με τη δεύτερη αρμονική η παραγωγή της επιτρέπεται σε όλα τα υλικά κεντροσυμμετρικά και μη. Όταν η διεγείρουσα ακτινοβολία είναι γκαουσιανή δέσμη, το σήμα της τρίτης αρμονικής μηδενίζεται εντός ομογενών υλικών ενώ ενισχύεται δραματικά στην περίπτωση ανομοιογενών στο δείκτη διάθλασης ή στη μη γραμμική επιδεκτικότητα τρίτης τάξης.

Έτσι, η THG μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την 3-D απεικόνιση διαφόρων οργάνων. Αυτή η μη επεμβατική, μη καταστρεπτική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση υποκυτταρικών μορφολογικών χαρακτηριστικών και μοριακών διαδικασιών στα βιολογικά δείγματα. Η επανεκπεμπόμενη ακτινοβολία λόγω της μεταβαλλόμενης ηλεκτρικής πόλωσης του μέσου έχει και αυτή συχνότητα  $3\omega$ , γεγονός που οδηγεί στη γένεση τρίτης αρμονικής. Η προκύπτουσα ηλεκτρική πόλωση έχει την πιο κάτω μορφή

$$P(t) = \frac{\epsilon_0 \chi^{(3)}}{4} E_0^3 (3 \sin \omega t - \sin 3\omega t) \quad (\text{Σχέση 6})$$

όπου  $\chi^{(3)}$  η μη γραμμική επιδεκτικότητα τρίτης τάξης. Διαπιστώνουμε την παρουσία μιας σταθερής ποσότητας η οποία εξαρτάται από τον κύβο του πλάτους του ηλεκτρικού πεδίου και άρα την ένταση της ακτινοβολίας. Επίσης, παρουσιάζεται ο όρος  $\sin 3\omega t$  που αντιστοιχεί σε μια μεταβολή της ηλεκτρικής πόλωσης σε συχνότητα τριπλάσια της θεμελιώδους συχνότητας του προσπίπτοντος ηλεκτρομαγνητικού κύματος.

Κατά τη διαδικασία αυτή, το οπτικό πεδίο στο θεμελιώδες μήκος κύματος ( $E_\omega$ ) προκαλεί μια μακροσκοπική πόλωση ( $P_{3\omega}$ ) του τύπου

$$P_{3\omega} \propto \chi^{(3)} E_\omega^3 \quad (\text{Σχέση 7})$$

η οποία με τη σειρά της δημιουργεί ένα πεδίο με συχνότητα ίση με αυτή της τρίτης αρμονικής συχνότητας ( $E_{3\omega}$ ). Η πόλωση αυτή εξαρτάται από τον κύβο της ηλεκτρικής πόλωσης ως εξής:

$$P_{3\omega} \propto [\chi^{(3)}]^2 P_\omega^3 \quad (\text{Σχέση 8})$$

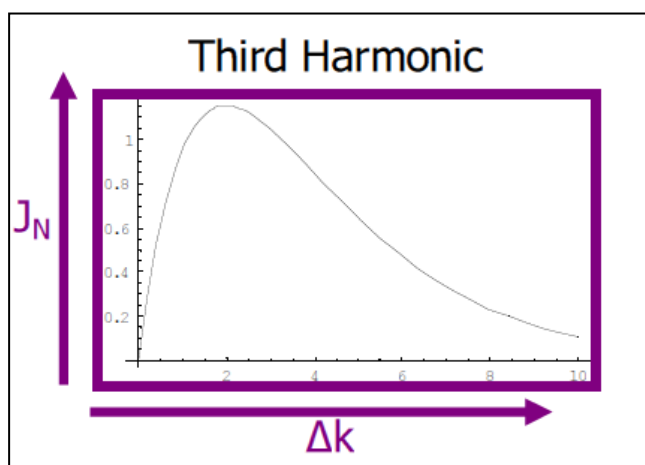
Στην πράξη, η μονοχρωματική ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή αρμονικών συνήθως δεν αποτελεί ένα επίπεδο κύμα αλλά μια γκαουσιανή δέσμη η οποία στην περίπτωση εφαρμογών όπως η μη γραμμική μικροσκοπία χρειάζεται να εστιαστεί ισχυρά πάνω στο μη γραμμικό μέσο. Η επίλυση της μη γραμμικής κυματικής εξίσωσης για το ηλεκτρικό πεδίο μιας τέτοιας δέσμης οδηγεί στην εξίσωση

$$A_N(z) = \frac{iN\omega}{2nc} \chi^{(N)} A_1^N J_N(\Delta k, z_0, z) \quad (\text{Σχέση 9})$$

για το peak amplitude  $A_N(z)$ , δηλαδή το πλάτος του ηλεκτρικού πεδίου της N-οστής αρμονικής στο κέντρο του beam waist  $w_0$ . Το  $J_N(\Delta k, z_0, z)$  αναπαριστά ένα ολοκλήρωμα του οποίου το αποτέλεσμα δίνεται από τη σχέση

$$J_N(\Delta k, z_0, z) = \begin{cases} 0 & \Delta k < 0 \\ \frac{b}{2} \frac{2\pi}{(N-2)!} \left(\frac{b\Delta k}{2}\right)^{N-2} e^{-b\Delta k/2} & \Delta k \geq 0 \end{cases} \quad \text{Σχέση 10)}$$

Η εμφανιζόμενη παράμετρος  $b$  αποτελεί το confocal parameter και ισούται με δύο φορές το μήκος Rayleigh  $z_R$  της θεμελιώδους γκαουσιανής δέσμης. Παρακάτω, αναπαρίσταται η εξάρτηση της τιμής του ολοκληρώματος  $J_N(\Delta k, z_0, z)$  από το wavevector mismatch  $\Delta k$ , το οποίο ισούται με τη διαφορά του τριπλάσιου κυματανύσματος της θεμελιώδους ακτινοβολίας από το κυματόνυσμα της τρίτης αρμονικής ( $\Delta k = 3k_\omega - k_{3\omega}$ ) για τη τρίτη αρμονική.



**Σχήμα 4:** Γράφημα του  $J_N(\Delta k, z_0, z)$  με το wavevector mismatch για THG .

Παρατηρούμε πως το σήμα τρίτης αρμονικής έχει μέγιστο για κάποια θετική τιμή του  $\Delta k$ , ενώ μηδενίζεται ακριβώς όταν πληρείται η συνθήκη perfect phase matching ( $\Delta k=0$ ). Με άλλα λόγια, για να προκύψει τρίτη αρμονική μέσω εστιασμένης γκαουσιανής δέσμης θα πρέπει να υπάρχει θετικό wavevector mismatch, το οποίο μεταφράζεται σε refractive index mismatch τέτοιο ώστε  $n(\omega) > n(3\omega)$ . Όμως αυτό δε συμβαίνει στην περίπτωση της συνηθούς κανονικής διασποράς.

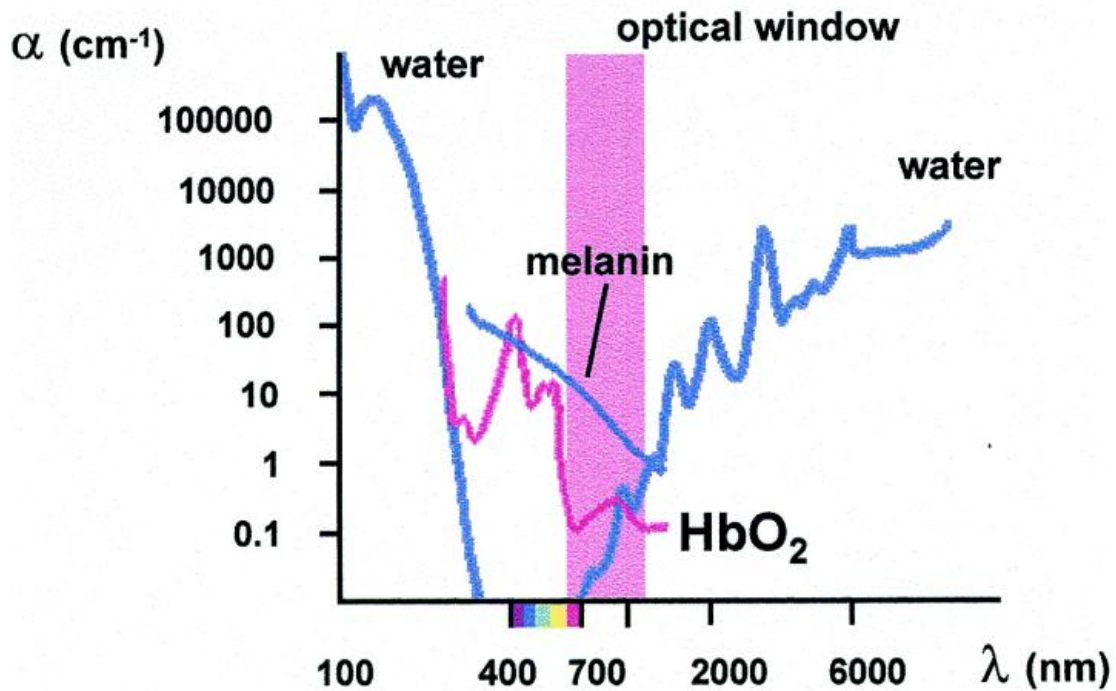
Ποιο είναι το συμπέρασμα λοιπόν; Η τρίτη αρμονική για εστιασμένες γκαουσιανές δέσμες δεν δύναται να παραχθεί εντός ομογενών υλικών αφού η καταστρεπτική συμβολή μεταξύ των συνεισφορών από την αρχή και το τέλος του εστιακού όγκου μηδενίζει το τελικό

σήμα. Ενισχυτική συμβολή και άρα παραγωγή τρίτης αρμονικής θα συμβεί μόνο εφόσον το δείγμα παρουσιάζει εντός του εστιακού όγκου κάποια ανομοιογένεια όσον αφορά είτε τους δείκτες διάθλασης είτε τις μη γραμμικές επιδεκτικότητες τρίτης τάξης. Η ιδιότητα αυτή καθιστά την τρίτη αρμονική εξαιρετικά χρήσιμη σε εφαρμογές απεικόνισης αφού κατά τον τρόπο αυτό μπορούν να εξαχθούν σημαντικές δομικές πληροφορίες για το υπό παρατήρηση αντικείμενο.

### 1.5 Πλεονεκτήματα μη γραμμικής μικροσκοπίας

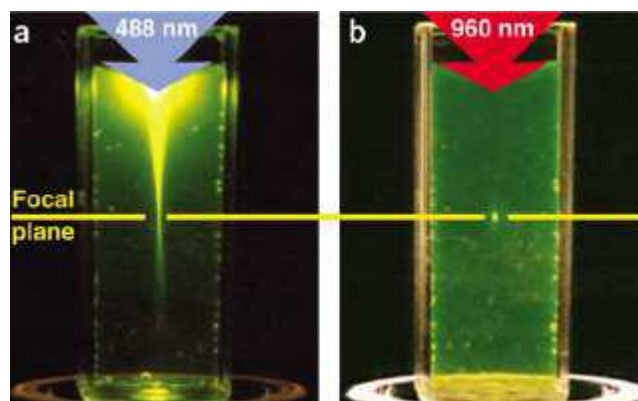
Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι οπτικής απεικόνισης για τη μελέτη βιολογικών δειγμάτων σε μια ευρεία κλίμακα μεγεθών, από ιούς και βακτήρια έως οργανισμούς μακροσκοπικών διαστάσεων. Όσον αφορά την απεικόνιση μικροσκοπικών βιολογικών δειγμάτων, υπάρχουν πλέον ποικίλοι τρόποι απόκτησης contrast μέσω της εκμετάλλευσης φυσικών φαινομένων όπως η σκέδαση, φθορισμός κ.α. Μέσα σε αυτή την πληθώρα μεθόδων και τεχνικών, η χρήση μη γραμμικών διαδικασιών όπως αυτές που προαναφέρθηκαν, προσφέρει έναν συνδυασμό σημαντικών πλεονεκτημάτων σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη οπτικής μικροσκοπίας.

Επειδή στη μη γραμμική μικροσκοπία χρησιμοποιείται κατά κανόνα ακτινοβολία υπερύθρου μήκους κύματος ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ), είναι δυνατό να επιτευχθεί εις βάθος διείσδυση στον ιστό που σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει έως και τα 500  $\mu\text{m}$ . Τούτο συμβαίνει για δύο κυρίως λόγους: 1) για τέτοια μήκη κύματος, τα κύρια συστατικά που αποτελούν έναν ιστό όπως το νερό, η μελανίνη, η αιμογλοβίνη κτλ. παρουσιάζουν ταυτόχρονα όπως φαίνεται και στο *Σχήμα 5* έναν αρκετά χαμηλό συντελεστή απορρόφησης. Με άλλα λόγια ο ιστός καθίσταται σχεδόν διαφανής για ένα «οπτικό παράθυρο» μηκών κύματος από 650 έως 1200 nm. 2) η υπέρυθη H/M ακτινοβολία υφίσταται μειωμένη ελαστική σκέδαση σε σχέση με τις ορατές συχνότητες. Για παράδειγμα κατά τη σκέδαση Rayleigh η οποία εξαρτάται από το αντίστροφο κλάσμα της τέταρτης δύναμης του μήκους κύματος της ακτινοβολίας, το υπέρυθρο φως σκεδάζεται σχεδόν δέκα φορές λιγότερο σε σύγκριση με το ορατό φως.



**Σχήμα 5:** Συντελεστής απορρόφησης συναρτήσει μήκους κύματος για τα κυριότερα συστατικά του ιστού

Η μη γραμμικότητα των φαινομένων και πιο συγκεκριμένα η εκθετική εξάρτησή τους από την προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει ως άμεση συνέπεια την περιορισμένη χωρική έκτασή τους, αφού ένα μη γραμμικό φαινόμενο θα λάβει χώρα σε σημαντικό βαθμό μόνο στην περιοχή όπου η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι αρκετά υψηλή (Σχήμα 6). Το γεγονός αυτό μεταφράζεται ως αυξημένη ανάλυση της μεθόδου απεικόνισης που φτάνει κατά προσέγγιση τα 500 nm. Να αναφέρουμε πως γενικότερα η ανάλυση (resolution) ενός diffraction limited οπτικού συστήματος δίνεται προσεγγιστικά από το λόγο του μήκους κύματος της θεμελιώδους ακτινοβολίας προς το διπλάσιο του αριθμητικού ανοίγματος (Numerical Aperture, NA) του αντικειμενικού φακού (objective lens).



**Σχήμα 6:** Σύγκριση μονοφωτονικής (a) και διφωτονικής (b) διέγερσης

Η δυνατότητα διείσδυσης σε μεγάλο βάθος εντός του ιστού που αναφέρθηκε προηγουμένως, αλλά και το μικρό μέγεθος του εστιακού όγκου παρέχουν εγγενώς το δυναμικό της λήψης τρισδιάστατων εικόνων. Με τον τρόπο αυτό είμαστε σε θέση να έχουμε μια πλήρη και ολοκληρωμένη αίσθηση για το πως διατάσσονται οι παρατηρούμενες δομές στον τρισδιάστατο χώρο.

Ένα από τα συνήθη προβλήματα που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της οπτικής απεικόνισης μικροσκοπικών βιολογικών δειγμάτων αποτελεί το φαινόμενο της φωτοτοξικότητας το οποίο προκαλεί το θάνατο των κυττάρων πολλές φορές εντός μερικών δευτερολέπτων από την έναρξη της ακτινοβολήσης. Αυτό που συμβαίνει είναι ότι μέρος της ενέργειας απορροφάται όχι για ακτινοβολητικές διαδικασίες αλλά τα μόρια οξυγόνου με αποτέλεσμα το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου (singlet oxygen species) που είναι τοξικές για τα ζωντανά κύτταρα. Στο μη γραμμικό μικροσκόπιο το παραπάνω πρόβλημα περιορίζεται δραματικά αφού ο εστιακός όγκος έχει πολύ μικρότερες διαστάσεις σε σχέση για παράδειγμα με ένα ομοεστιακό (confocal) μικροσκόπιο. Κατά συνέπεια κατά τη διάρκεια της τρισδιάστατης σάρωσης σημείου προς σημείο ενός μικροσκοπικού βιολογικού δείγματος δεν υπάρχει σχεδόν καθόλου αλληλοεπικάλυψη των εστιακών όγκων με αποτέλεσμα τη μικρότερη δυνατή έκθεση του στην ακτινοβολία και άρα την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας σχηματισμού τοξικών ριζών για το κύτταρο.

Στην περίπτωση που το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας βρίσκεται εκτός της φασματικής ζώνης απορρόφησης του δείγματος, το μόνο φαινόμενο που θα υπερισχύσει κατά την αλληλεπίδραση τους θα είναι η σκέδαση κατά την οποία δεν αποθηκεύεται ενέργεια μέσα στο δείγμα. Εφόσον η σκέδαση αυτή είναι σύμφωνη όπως για παράδειγμα στη δεύτερη και τρίτη αρμονική, είμαστε σε θέση να αποκτήσουμε contrast χωρίς να προκαλέσουμε ανεπιθύμητα φαινόμενα όπως ο πολυφωτονικός ιονισμός, θερμική καταστροφή κ.α.

Τέλος, μέσω της διαδικασίας παραγωγής αρμονικών συχνοτήτων είναι εφικτή η απεικόνιση ενός βιολογικού δείγματος χωρίς τη χρήση κυτταρικής σήμανσης (labelling) όπως για παράδειγμα η GFP, YFP, DsRED κ.α. Το γεγονός αυτό όχι μόνο απλοποιεί σημαντικά τις διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος αλλά αποφεύγονται παράλληλα και προβλήματα όπως η φωτοχημική καταστροφή της φθορίζουσας ουσίας (photobleaching).

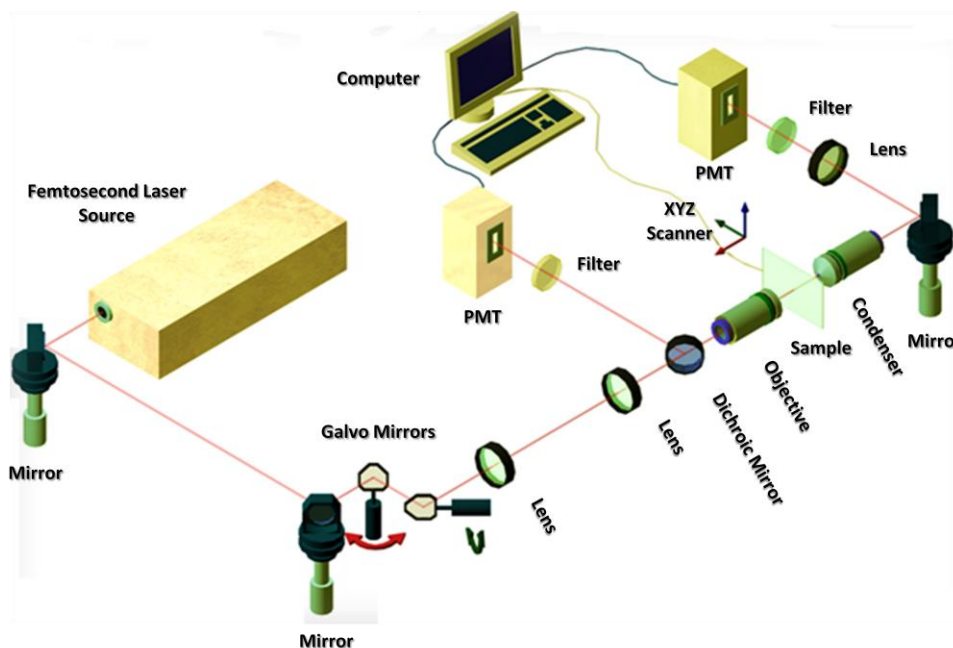
## 1.6 Χρήσεις τρίτης αρμονικής

Τα παραπάνω πλεονεκτήματα που αναφέρονται δηλαδή η μη καταστρεπτική φύση, η βαθιά διείσδυση στον ιστό, η υψηλή ανάλυση, η δυνατότητα τρισδιάστατης απεικόνισης και η μη χρήση σήμανσης καθιστούν την γένεση τρίτης αρμονικής κατάλληλη τεχνική για μελέτη βιολογικών δειγμάτων . Επίσης, η ενίσχυση του σήματος του φαινομένου λόγω ύπαρξης ανομοιογενειών εντός του δείγματος την κάνουν ένα ισχυρό , μη καταστρεπτικό εργαλείο που μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για την δομή, την ανατομία τη μορφολογία για ποικίλα βιολογικά δείγματα σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο εξασφαλίζοντας παράλληλα την βιωσιμότητα του δείγματος.

Η γένεση τρίτης αρμονικής έχει χρησιμοποιηθεί για σημαντικές μελέτες όπως απεικόνιση μιτοχονδρίων, λιπιδίων, ερυθρών αιμοσφαιρίων, νευρώνων, μυϊκών ινών , ροές πλάσματος, έμβρυα, καθώς και σε οργανισμούς όπως *Zebrafish* (Chen et al., 2006; Chu et al., 2003; Sun et al., 2004), *Drosophila* (Debarre et al., 2006; Supatto et al., 2005), *Xenopus laevis* (Oron et al., 2004), *C. elegans* (Tserevelakis et al., 2011; Aviles-Espinosa et al., 2010) και ποντικού (Jesacher et al., 2009; Watanabe et al., 2010).

Στο εργαστήριο μη γραμμικής μικροσκοπίας του ΙΗΔΛ η μικροσκοπία τρίτης αρμονικής χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των διαφορετικών σταδίων εμβρυογένεσης καθώς επίσης και για την απεικόνιση και ποσοτικοποίηση των λιπιδικών εναποθέσεων του οργανισμού μοντέλου *C. Elegans* (Tserevelakis et al., 2011) αλλά και προεμφυτευτικών εμβρύων ποντικών (Kyvelidou et al., 2011) τα οποία θα αναλυθούν εκτενώς στο Κεφάλαιο 3.

## Κεφάλαιο 2: Περιγραφή Πειραματικής Διάταξης



(Σχήμα 7) : Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης

Σε αυτό το κεφάλαιο θα περιγράψουμε την πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματά μας (Σχήμα 7). Η πηγή διέγερσης είναι ένα διοδικό femtosecond λέιζερ με ενεργό υλικό έναν ytterbium doped κρύσταλλο. Η μέση ισχύς του λέιζερ είναι της τάξεως του 1 W, ενώ η διάρκεια του παλμού είναι μικρότερη των 200 fs με ρυθμό επανάληψης τα 50 MHz. Τέλος, το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι στα 1028 nm. Η δέσμη οδηγείται σε ένα τροποποιημένο οπτικό μικροσκόπιο (Nikon Eclipse ME600D) χρησιμοποιώντας μερικά κάτοπτρα όπου και συναντά ένα σετ galvo mirrors, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να μετακινούν τη δέσμη σε δύο διαστάσεις επιτυγχάνοντας έτσι τη δισδιάστατη σάρωση του δείγματος. Εν συνεχεία η δέσμη περνά μέσα από ένα τηλεσκόπιο αποτελούμενο από δύο συγκλίνοντες φακούς ούτως ώστε να αυξήσουμε κατάλληλα τη διάμετρό της και να καλύψουμε πλήρως το back aperture του αντικειμενικού φακού (objective) με σκοπό την επίτευξη της βέλτιστης εστίασης της ακτινοβολίας πάνω στο υπό παρατήρηση δείγμα. Από τη στιγμή που το μη γραμμικό σήμα θα παραχθεί, υπάρχουν δύο κανάλια ανίχνευσης του: ένα κατά την διεύθυνση της δέσμης (transmission mode) και ένα αντίθετα από αυτή (reflection mode). Για τη συλλογή του μη



γραμμικού σήματος στο transmission mode , το οποίο χρησιμοποιούμε για την ανίχνευση του σήματος της γένεσης τρίτης αρμονικής, έχει τοποθετηθεί ένας φακός condenser σε κατάλληλη απόσταση από το δείγμα ο οποίος θα οδηγήσει την ακτινοβολία σε ένα φωτοπολλαπλασιαστή (PMT) αφού πρώτα περάσει διαμέσου ενός κατάλληλου φίλτρου το οποίο θα επιτρέψει αποκλειστικά και μόνο τη διέλευση του επιθυμητού μη γραμμικού σήματος. Οι τιμές σήματος του PMT καταγράφονται σε ένα υπολογιστή από τον οποίο ελέγχονται όλες οι διαδικασίες κατά τη διάρκεια της μέτρησης συμπεριλαμβανομένης και της κίνησης του δείγματος στις τρεις διαστάσεις. Αναφορικά με την ανίχνευση σε reflection mode, το παραγόμενο μη γραμμικό σήμα θα περάσει διαμέσου του αντικειμενικού φακού, θα ανακλαστεί σε ένα διχροϊκό κάτοπτρο και αφού περάσει από κατάλληλο φίλτρο θα οδηγηθεί σε ένα δεύτερο φωτοπολλαπλασιαστή έτσι ώστε να καταγραφεί με παρόμοιο τρόπο στον υπολογιστή.

Πώς ακριβώς όμως επιτυγχάνεται η τρισδιάστατης σάρωσης ενός αντικειμένου. Αρχικά το δείγμα μετακινείται προς τα πάνω έως ότου η πάνω επιφάνειά του να βρίσκεται ακριβώς στο εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού. Τότε οι galvo mirrors του συστήματος αρχίζουν να κινούνται περιοδικά με αποτέλεσμα τη μετακίνηση της δέσμης στη διεύθυνση x και y και τη σάρωση του συγκεκριμένου επιπέδου. Το μη γραμμικό σήμα κατά τη διάρκεια της σάρωσης μεταφράζεται σε τιμές τάσης μέσω του φωτοπολλαπλασιαστή (PMT) οι οποίες όπως προαναφέρθηκε καταγράφονται στον υπολογιστή. Στη συνέχεια το δείγμα μετακινείται προς τα πάνω κατά μια προεπιλεγμένη απόσταση, οπότε το εστιακό επίπεδο σάρωσης θα βρίσκεται πλέον εντός του δείγματος. Η σάρωση μέσω των galvo mirrors θα επαναληφθεί και το σήμα θα καταγραφεί και θα αποθηκευθεί ξεχωριστά. Η παραπάνω διαδικασία θα συνεχιστεί όσες φορές χρειαστεί έως ότου καλυφθεί το σύνολο του όγκου του δείγματος. Οι καταγραφόμενες τιμές τάσης που είναι ανάλογες της έντασης του μη γραμμικού σήματος αποθηκεύονται σε μορφή ενός δισδιάστατου πίνακα 300 επί 300 ή και παραπάνω, ανάλογα με την επιθυμητή ανάλυση της εικόνας. Μέσω ειδικά σχεδιασμένου λογισμικού οι τιμές αυτές μεταφράζονται σε μία από τις 256 αποχρώσεις του γκρι που κυμαίνονται από μαύρο χρώμα για τις ασθενέστερες εντάσεις σήματος έως άσπρο χρώμα για τις πιο ισχυρές. Το αποτέλεσμα της μετάφρασης αυτής είναι ένα σύνολο δισδιάστατων 8bit grayscale εικόνων σε διάφορα βάθη εντός του δείγματος.

Η χρήση του femtosecond (fs) λέιζερ επιτρέπει υψηλές εντάσεις για την αποτελεσματική μη-γραμμική διέγερση, αλλά σε αρκετά χαμηλές ενέργειες, έτσι ώστε να είναι κατάλληλες για βιολογικά δείγματα. Έχουμε ένα femtosecond σύστημα λέιζερ, που εκπέμπει στα 1028 nm, έτσι το παραγόμενο σήμα τρίτης αρμονικής είναι στα 343 nm

Επιπλέον, με την χρησιμοποίηση αυτής της διέγερσης μήκους κύματος (1.028 nm), η απορρόφηση του νερού, η οποία οδηγεί σε ανεπιθύμητα θερμική θέρμανση των βιολογικών δειγμάτων, είναι περιορισμένη.

Η μέση ισχύς λέιζερ στο δείγμα ήταν 20mW (0,4 nJ ανά παλμό) . Μία δύο διαστάσεων (2D) εικόνα THG 500 \_ 500 pixels καταγράφηκε σε λιγότερο από ένα (1) δευτερόλεπτο. Προκειμένου να βελτιωθεί η σήματος προς θόρυβο αναλογία μία 2D οπτική τομή έγινε από είκοσι (20) κατά μέσο όρο σαρώσεις. Άρα ο χρόνος για τη λήψη μιας εικόνας, ήταν τριάντα (30) δευτερόλεπτα. Για να δημιουργηθεί μία τρισδιάστατη (3D) εικόνα για την ανασυγκρότηση του δείγματος μας, μια σειρά από οπτικές τομές 2D που χωρίζονται ανά 2 μm αποκτήθηκαν. Η όλη διαδικασία της συλλογής δεδομένων που απαιτούνται για την ανακατασκευή του 3D THG εικόνες από έμβρυα ποντικού, διήρκεσε 10-15 λεπτά. Το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας Image J (Java-based πρόγραμμα, NIH) χρησιμοποιήθηκε, για την επεξεργασία των λαμβανόμενων δεδομένων και για τη δημιουργία της ανακατασκευής 3D εικόνων. Η ποσοτικοποίηση του σήματος THG θα μπορούσε να επιτρέψει την απόδοση μίας αριθμητικής τιμής σε κάθε έμβρυο που να αντικατοπτρίζει το λιπιδικό του περιεχόμενο. Οι εικόνες που δημιουργούνται είναι 8-bit και είναι γκρι, ενώ με το πρόγραμμα Image J έγινε και η επιλογή της περιοχής του αντιπροσωπεύει τις λιπιδικές εναποθέσεις του εμβρύου, και ο υπολογισμός της μέσης τιμής των pixel καθώς και των αποκλίσεων τους. Επαναλαμβάνοντας αυτή τη διαδικασία για όλες τις φέτες που αποτελούσαν κάθε έμβρυο μπορούμε να υπολογίσουμε τον όγκο των λιπιδίων, το σήμα τους και την διασπορά τους.

## Κεφάλαιο 3: Πειραματική Διαδικασία

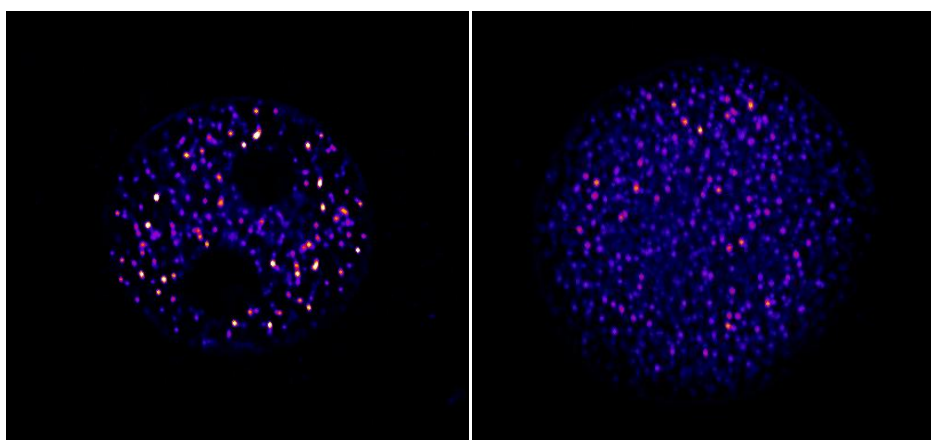
### 3.1 Εισαγωγή

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στην εξωσωματική γονιμοποίηση ( *in vitro* fertilization-IVF) βρίσκεται στην υποκειμενική μικροσκοπική επιλογή των υγιών εμβρύων που θα μεταφερθούν στη μήτρα. Η σημαντική όμως έλλειψη αντιστοιχίας μεταξύ μικροσκοπικής εμφάνισης και της καταλληλότητας του εμβρύου, οδηγεί σε πολλές περιπτώσεις σε ανεπιτυχή έκβαση της εξωσωματικής γονιμοποίησης, αναγκάζοντας τα ζευγάρια σε πολλαπλές δοκιμές, καθιστώντας με αυτόν τον τρόπο την εξωσωματική γονιμοποίηση μια ψυχολογικά, κοινωνικά αλλά και οικονομικά επώδυνη διαδικασία.

Πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν την μορφολογία των εμβρύων με την ποιότητα τους συνδυάζοντας διάφορες μορφολογικές παραμέτρους, στατιστικά μοντέλα πρόβλεψης και αλγορίθμους. Η έλλειψη μιας επιτυχημένης μεθόδου επιλογής των εμβρύων οδηγεί συχνά σε εμφύτευση πολλαπλών εμβρύων στη μήτρα της μητέρας γεγονός το οποίο από τη μία αυξάνει τα ποσοστά εγκυμοσύνης με την ενίσχυση της πιθανότητας εμφύτευσης τουλάχιστον ενός εκ των εμβρύων αλλά παράλληλα, πολύ συχνά οδηγεί σε επικίνδυνες, για τον οργανισμό τόσο μητέρας όσο και του εμβρύου, πολλαπλές κυήσεις. Οι κίνδυνοι μιας πολλαπλής κύησης είναι σημαντικοί, πρόωρος τοκετός, χαμηλό βάρος γέννησης, συγγενείς δυσπλασίες, εμβρυϊκός και βρεφικός θάνατος, μακροπρόθεσμα νοσηματα και αναπηρία μεταξύ των επιζώντων και σοβαρά οικονομικά προβλήματα ( Hazekamp et al . , 2000 ? Ozturk et al , 2001 ) . Επιπλέον , οι διαδικασίες που οδηγούν στην ενδομήτρια μείωση του αριθμού εμβρύων θεωρούνται υψηλού κινδύνου επεμβάσεις , όχι μόνο για την τελική έκβαση της εγκυμοσύνης , αλλά και την ίδια τη μητέρα . Ως εκ τούτου , ο μόνος βέβαιος τρόπος για να επιτευχθεί μονήρης κύηση είναι η επιλογή των καταλληλότερων εμβρύων, δηλαδή εκείνων με το υψηλότερο δυναμικό εμφύτευσης και η εμφύτευση ενός και μόνο εμβρύου. Χρονικά η επιλογή των εμβρύων μπορεί να γίνει από το στάδιο του ζυγώτη ως και το στάδιο της βλαστοκύστης . Η *in vitro* καλλιέργεια των εμβρύων για εκτεταμένες χρονικές περιόδους θα μπορούσε να επιτρέψει την επιλογή υγιέστερων εμβρύων , ωστόσο, όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια της καλλιέργειας , τόσο λιγότερα έμβρυα επιβιώνουν για τη μεταφορά . Ως εκ τούτου ,είναι αναγκαία η ανάπτυξη και η χρήση καινοτόμων τεχνικών στην βιοτεχνολογία και βιοιατρική οι οποίες μέσω της απεικόνισης θα βελτιώσουν την διαδικασία επιλογής εμβρύων σε ένα προγενέστερο στάδιο αυξάνοντας τα ποσοστά επιτυχών κυήσεων.

Η μη γραμμική μικροσκοπία μπορεί να προσφέρει σημαντικά ιστολογικά και μορφολογικά στοιχεία σχετικά με τον αριθμό και την κατανομή των λιπιδικών κυστιδίων (Lipid Bodies, LBs) στο ωοκύτταρο, ή το έμβρυο χωρίς την επεξεργασία των δειγμάτων ή τη χρήση φθορίζουσών ουσιών ή άλλων δεικτών. Η μη-γραμμική μορφή απεικόνισης της THG παρέχει τη δυνατότητα να ληφθούν τομές του ωαρίου ή του εμβρύου και κατά την ανασυγκρότηση των τομών αυτών να σχηματιστεί η συνολική απεικόνιση του κυττάρου μέσω της οποίας μπορεί να γίνει καθορισμός των πυρήνων, καθώς και των λιπιδικών εναποθέσεων. Σε THG εικόνες σε μη γονιμοποιημένα, ώριμα ωοκύτταρα, βρίσκουμε το θηλυκό προπυρήνα στο κέντρο του ωοκυττάρου ενώ το σήμα THG διαχέεται στην κυτταροπλασματική περιοχή και εμφανίζεται πολωμένο. Η πολικότητα αυτή μπορεί να σχετίζεται με το σημείο διείσδυσης των σπερματοζωαρίων.

Τα λιπιδικά κυστίδια (LBs), επίσης γνωστά ως σταγονίδια λιπιδίων (LDS-Lipid Droplets), είναι, μεταξύ άλλων, τα οργανίδια αποθήκευσης λιπιδίων όλων των οργανισμών (Murphy, 2001). Για καιρό θεωρούνταν μόνο ως αδρανή σωματίδια λίπους και είχαν αγνοηθεί σε μεγάλο βαθμό στο παρελθόν. Ωστόσο, πρόσφατα, έχουν αναγνωρισθεί ως δυναμικά οργανίδια με ιδιότητες πολύ πιο περίπλοκες από απλές αποθήκες ενέργειας. Τα λιπίδια όχι μόνο έχουν λειτουργίες που συνδέονται άμεσα με την ενδοκυτταρική ομοιόσταση των λιπιδίων, αλλά θα μπορούσαν επίσης να συμμετέχουν σε φαινομενικά μη συσχετιζόμενες δραστηριότητες, συμπεριλαμβανομένης της ομοιόστασης, την προσωρινή αποθήκευση πρωτεϊνών, την αποδόμηση των πρωτεϊνών και ούτω καθεξής (Fujimoto & Ohsaki, 2006 Martin & Parton, 2006 Murphy, 2001 Welte, 2007). Έχουν επίσης συσχετιστεί με την ωρίμανση ωοκυττάρων και την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου, ενώ, περισσότερα αποτελέσματα έρχονται στο φως που τα συνδέουν με την ενεργοποίηση των κυττάρων και την ανοσοαπόκριση (Bougneres et al., 2009).



**Εικόνα 8:** Στην πρώτη εικόνα βλέπουμε μία κεντρική τομή ενώ στην δεύτερη βλέπουμε μια 3D προβολή ολόκληρου του εμβρύου .

Στην εικόνα 8 μπορούμε να δούμε τις φωτεινές κουκίδες που είναι το σήμα τρίτης αρμονικής που προέρχεται από τα λιπιδικά κυστίδια, ενώ οι σκοτεινές περιοχές είναι οι δύο προπυρήνες που δεν δίνουν σήμα λόγω οπτικής ομοιογένειας.

Όπως είδαμε τα λιπίδια σχετίζονται με τον μεταβολισμό του κυττάρου και επομένως με την ενεργειακή του κατάσταση. Συνεπώς μας δίνεται η δυνατότητα να αξιολογήσουμε όχι μόνο ποιοτικά αλλά και ποσοτικά την καταλληλότητα των προεμφυτευτικών εμβρύων, έτσι ώστε να γίνει η πλέον σωστή επιλογή εκείνου που θα μεταφερθεί στη μήτρα και θα οδηγήσει σε μια επιτυχημένη κύηση. Προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιώντας την απεικόνιση της τρίτης αρμονικής (THG) έχουν συσχετίσει την υγεία του προεμφυτευτικού εμβρύου με την περιεκτικότητά τους σε λιπιδικά κυστίδια αλλά και την κατανομή τους στο εσωτερικό του εμβρύου

### **3.2 Σκοπός της μελέτης**

Όπως εξηγήσαμε και στην εισαγωγή, η μεθοδολογία της τρίτης αρμονικής παρέχει νέες μη επεμβατικές τεχνικές για την παρακολούθηση της ενδοκυτταρικής δομής και λειτουργίας, που σχετίζεται με το ενεργειακό προφίλ του αναπτυσσόμενου εμβρύου και που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην επιλογή του καταλληλότερου εμβρύου κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση.

Σε πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο μη γραμμικής μικροσκοπίας του ΙΗΔΛ κατέστη δυνατή η απεικόνιση προεμφυτευτικών εμβρύων. Ειδικότερα, η απεικόνιση τρίτης αρμονικής μέσω του εντοπισμού λιπιδικών κυστιδίων έχει τη δυνατότητα να προσφέρει αξιόπιστες πληροφορίες σχετικές με το ενεργειακό προφίλ προεμφυτευτικών εμβρύων, τη χρονική εξέλιξη διαφορετικών εμβρυονικών σταδίων, την πολικότητα του εμβρύου πριν την επόμενη μιτωτική διαίρεση καθώς και την ισοδυναμία των βλαστομεριδίων. Η ποσοτικοποίηση του σήματος τρίτης αρμονικής κατέδειξε υψηλότερο σήμα στα έμβρυα που βρισκόντουσαν στο στάδιο των δύο κυττάρων, ενώ υπολογίστηκε διαφορά σήματος 12-18% ανάμεσα σε βλαστομερίδια του ίδιου εμβρύου στο στάδιο των 8 κυττάρων (Kyvelidou et al., 2011).

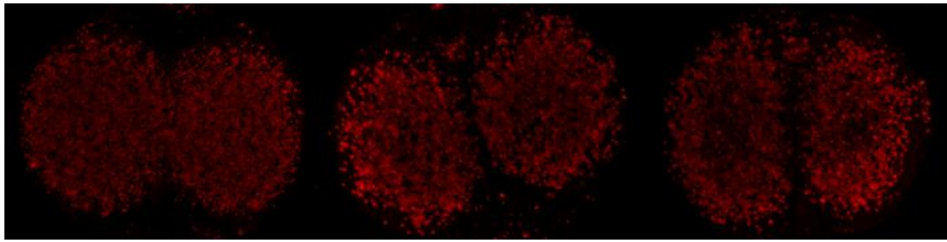
Συνεχίζουμε την διερεύνηση του ρόλου του ενεργειακού προφίλ των προεμφυτευτικών εμβρύων με την μελέτη της επίδρασης της L-καρνιτίνης στα έμβρυα. Η L-καρνιτίνη είναι

ένα μικρό μόριο απαραίτητο για τη μεταφορά λιπαρών από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια με σκοπό τον καταβολισμό τους και την παραγωγή ενέργειας για το κύτταρο. Καθημερινή χορήγηση για επτά ημέρες 2,5 mg L-καρνιτίνης σε νεαρά θηλυκά ποντίκια BALB/c αυξάνει το ποσοστό των κυττάρων του ανοσοποιητικού στην περιτοναϊκή κοιλότητα και την μήτρα, επηρεάζει τα επίπεδα πολλών κυτοκινών στον ορό και το περιτοναϊκό υγρό, ενώ παράλληλα προκαλεί στειρότητα (Dionisourouli et al., 2005). Παρά το επιτυχημένο ζευγάρωμα με υγιή αρσενικά ποντίκια, τα θηλυκά στα οποία είχε χορηγηθεί L-καρνιτίνη για επτά ημέρες δεν προχώρησαν σε εγκυμοσύνη. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διαλευκανθεί ο ρόλος της L-καρνιτίνης στην επίτευξη υγιούς εγκυμοσύνης και να εξεταστεί η ποιότητα των ωαρίων και εμβρύων παρουσία της.

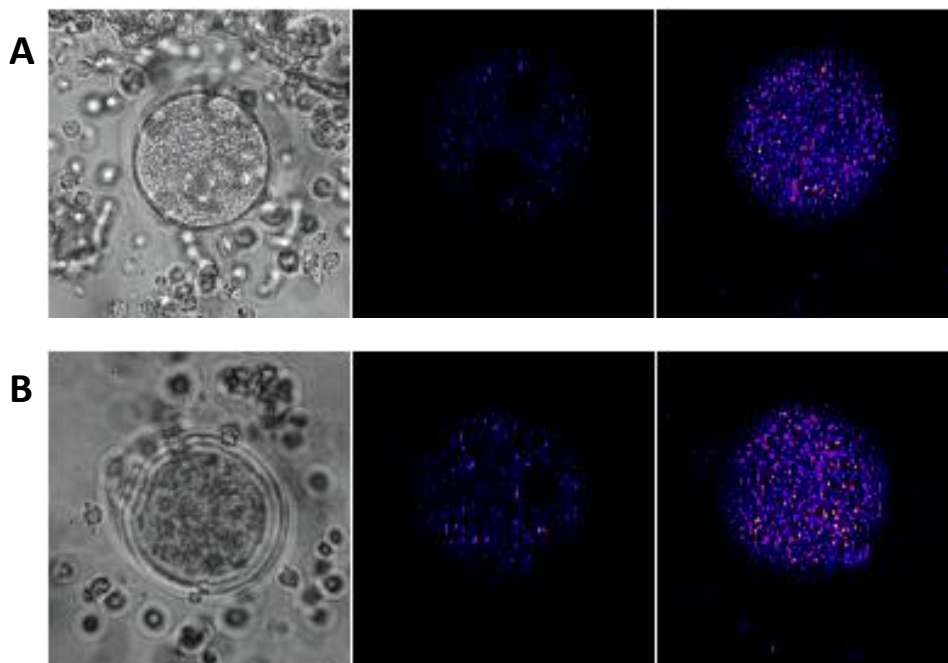
### 3.3 Πειραματική διαδικασία και αποτελέσματα

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν BALB/c ποντίκια 4<sup>wv</sup> έως 12 εβδομάδων στα οποία χορηγήθηκαν καθημερινά 2,5 mg L-καρνιτίνης για 4, 5 και 7 ημέρες πριν από το ζευγάρωμα παράλληλα με χορήγηση ορμονών για την πρόκληση υπερωορρηξίας. Παράλληλα η L-καρνιτίνη εκτός από *in vivo* χρησιμοποιήθηκε και *in vitro* (400 μM) σε καλλιέργειες εμβρύων στο στάδιο του ζυγώτη. Στα *in vivo* πειράματα ελέγχθηκε ο αριθμός και η μορφολογία των εμβρύων καθώς και η παρουσία λιπιδικών κυστιδίων (lipid bodies, LBs) στο εσωτερικό τους με τεχνικές συνεστιακής μικροσκοπίας και με την χρήση της μικροσκοπίας γένεσης τρίτης αρμονικής (Third Harmonic Generation, THG). Επίσης, συλλέχθηκαν δείγματα ωοθηκών για τον έλεγχο της μορφολογίας τους, σπλενοκυττάρων για τον έλεγχο των επιπέδων κυτοκινών και αντιγόνων του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας με τεχνικές ανοσοφθορισμού, καθώς και ορού για τον έλεγχο των επιπέδων ορμονών με τεχνικές ενζυμωσύνδετη ανοσοπροσοφθητική δοκιμή (ELISA -enzyme-linked immunosorbent assay).

Στα *in vivo* πειράματα η χορήγηση L-καρνιτίνης για 4 και 5 ημέρες πριν το ζευγάρωμα δεν φαίνεται να επηρεάζει τον αριθμό και την ποιότητα των εμβρύων (Εικ.9 και 10). Τα θηλυκά στα οποία χορηγήθηκε η L-καρνιτίνη είχαν φυσιολογικές εγκυμοσύνες, ενώ τα θηλυκά τα οποία γεννήθηκαν δεν εμφάνισαν με τη σειρά τους προβλήματα στην ποιότητα των εμβρύων τους.



**Εικ. 9.** Έμβρυα 2-κυττάρων τα οποία συλλέχθηκαν μετά από χορήγηση 4<sup>ωv</sup> ή 5 ημερών L-καρνιτίνης, μετά από χρώση με Nile Red (χρωστική ειδική για την ανίχνευση λιπιδικών κυστιδίων) και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού



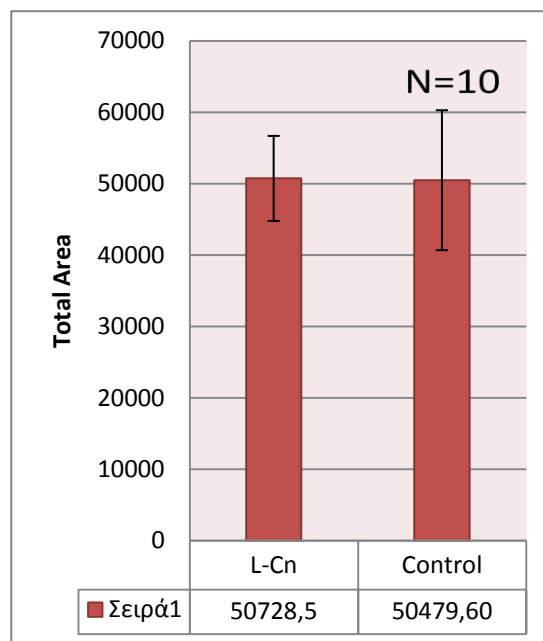
**Εικ. 10.** Μη διαφοροποίηση όγκου λιπιδίων μέσω THG. A:Φυσιολογικό έμβρυο B: Έμβρυο έπειτα από χορήγηση L-καρνιτίνης για 5 μέρες πριν το ζευγάρισμα . Στην πρώτη στήλη βλέπουμε εικόνα white light, στη δεύτερη μία κεντρική τομή ενώ στην τρίτη στήλη έχουμε τρισδιάστατη απεικόνιση ολόκληρου του εμβρύου

Αντίθετα, στις 7 μέρες χορήγησης L-καρνιτίνης παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός εμβρύων μη φυσιολογικής μορφολογίας σε σχέση με τα control. Τα έμβρυα αναπτύχθηκαν *in vivo* μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης, αλλά στην συνέχεια, κατά την 12<sup>η</sup> μέρα εγκυμοσύνης δεν ήταν δυνατό να ανιχνευθούν έμβρυα με ψηλάφηση της μητέρας, ενώ δεν υπήρξαν και γεννήσεις. Όσον αφορά στα λιπιδικά κυστίδια παρατηρήθηκε αύξηση του μέσου εμβαδού τους (Πίνακας 1 και 2, Διάγραμμα 1 και 2).

Τα πειράματα έγιναν σε τρεις διαφορετικές ημερομηνίες και ο αριθμός των δειγμάτων είναι N=10. Στον Πίνακα 1 φαίνονται αναλυτικά οι μετρήσεις για το συνολικό εμβαδόν, ενώ στον Πίνακα 2 έχει υπολογισθεί το μέσο εμβαδό των λιπιδικών κυστιδίων για τα ίδια ακριβώς έμβρυα. Κάθε πίνακας ακολουθείται από το αντίστοιχο διάγραμμα.

|                  | L-Cn            |                  | Control         |
|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Cell2 (2/10)     | 30732           | Cell1(6/11)      | 13664           |
| Cell3 (2/10)     | 30191           | Cell2(6/11)      | 6394            |
| Cell5 (2/10)     | 42586           | Cell11(6/11)     | 11647           |
| Cell1 (6/12)     | 34451           | Cell1(6/12)      | 50043           |
| Cell2 (6/12)     | 38003           | Cell4(6/12)      | 95299           |
| Cell3 (6/12)     | 51769           | Cell5(6/12)      | 40330           |
| Cell5 (6/12)     | 48485           | Cell6(6/12)      | 57347           |
| Cell6 (6/12)     | 71151           | Cell8(6/12)      | 89962           |
| Cell7 (6/12)     | 85522           | Cell9(6/12)      | 80280           |
| Cell8 (6/12)     | 74395           | Cell10(6/12)     | 59830           |
| <b>MeanValue</b> | <b>50728,5</b>  | <b>MeanValue</b> | <b>50479,6</b>  |
| <b>StDev</b>     | <b>19744,84</b> | <b>StDev</b>     | <b>32489,99</b> |
| <b>Sem</b>       | <b>5953,294</b> | <b>Sem</b>       | <b>9796,1</b>   |

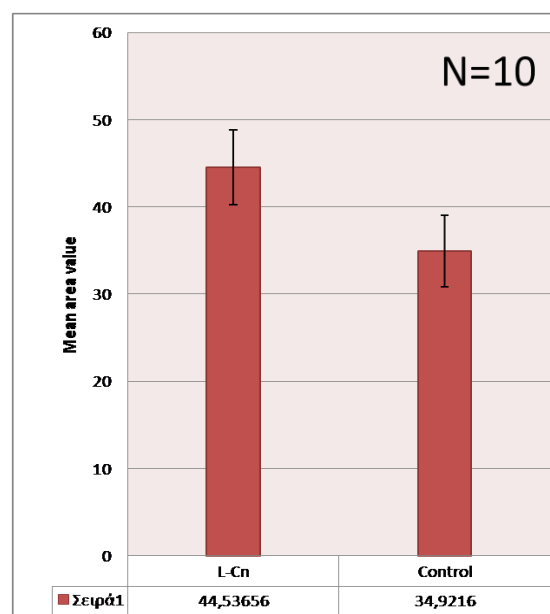
**Πίνακας 1.** Μέτρηση του συνολικού εμβαδού των λιπιδικών κυστιδίων σε ζυγώτες μετά από χορήγηση ή μη L-καρνιτίνης για 7 ημέρες μέσω καταγραφής σήματος THG.



**Διάγραμμα 1.** Σύγκριση συνολικού εμβαδού μετά από χορήγηση ή μη L-καρνιτίνης

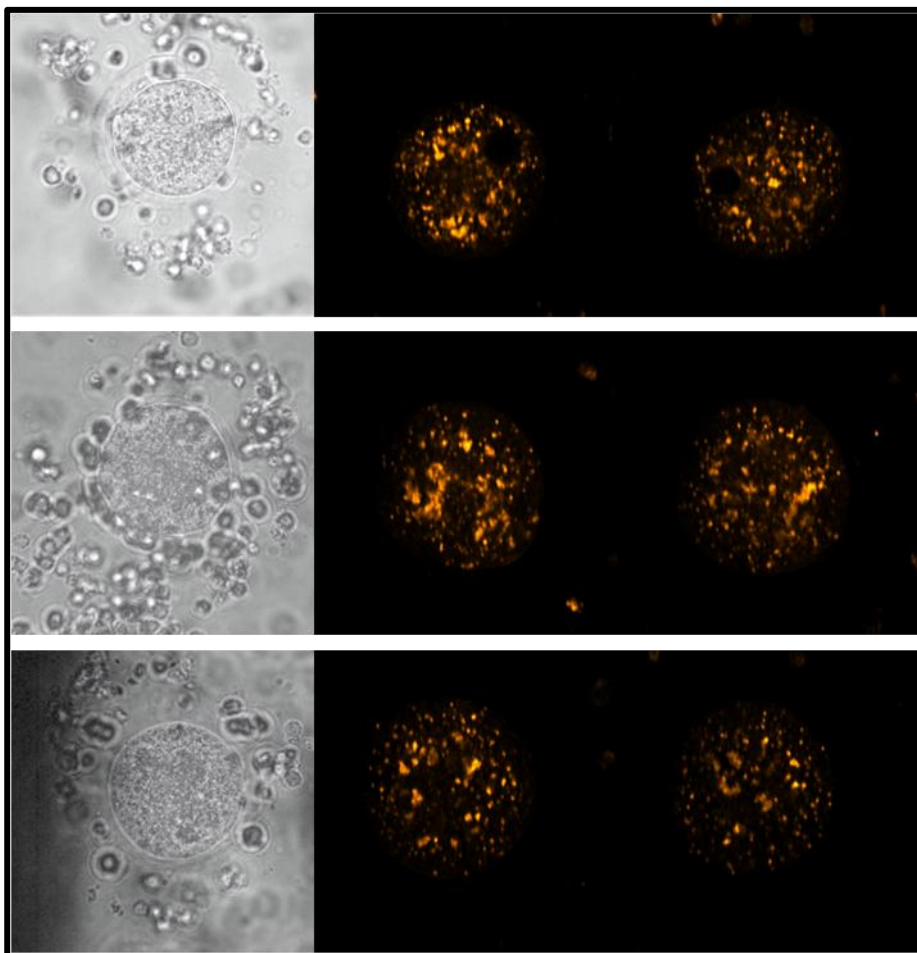
|                  | L-Cn               |                  | Control            |
|------------------|--------------------|------------------|--------------------|
| Cell2 (2/10)     | 47,4992            | Cell1(6/11)      | 24,0563            |
| Cell3 (2/10)     | 42,4627            | Cell2(6/11)      | 20,9639            |
| Cell5 (2/10)     | 52,5753            | Cell11(6/11)     | 30,5696            |
| Cell1 (6/12)     | 20,5678            | Cell1(6/12)      | 23,211             |
| Cell2 (6/12)     | 27,7394            | Cell4(6/12)      | 37,9375            |
| Cell3 (6/12)     | 36,7156            | Cell5(6/12)      | 21,6945            |
| Cell5 (6/12)     | 47,9101            | Cell6(6/12)      | 45,7313            |
| Cell6 (6/12)     | 57,1035            | Cell8(6/12)      | 57,8534            |
| Cell7 (6/12)     | 45,4662            | Cell9(6/12)      | 49,6168            |
| Cell8 (6/12)     | 67,3258            | Cell10(6/12)     | 37,5817            |
| <b>MeanValue</b> | <b>44,53656</b>    | <b>MeanValue</b> | <b>34,9216</b>     |
| <b>StDev</b>     | <b>13,68306078</b> | <b>StDev</b>     | <b>12,9903559</b>  |
| <b>Sem</b>       | <b>4,326963742</b> | <b>Sem</b>       | <b>4,107911226</b> |

**Πίνακας 2.** Μέτρηση του μέσου εμβαδού των λιπιδικών κυστιδίων σε ζυγώτες μετά από χορήγηση ή μη L-καρνιτίνης για 7 ημέρες μέσω καταγραφής σήματος THG.



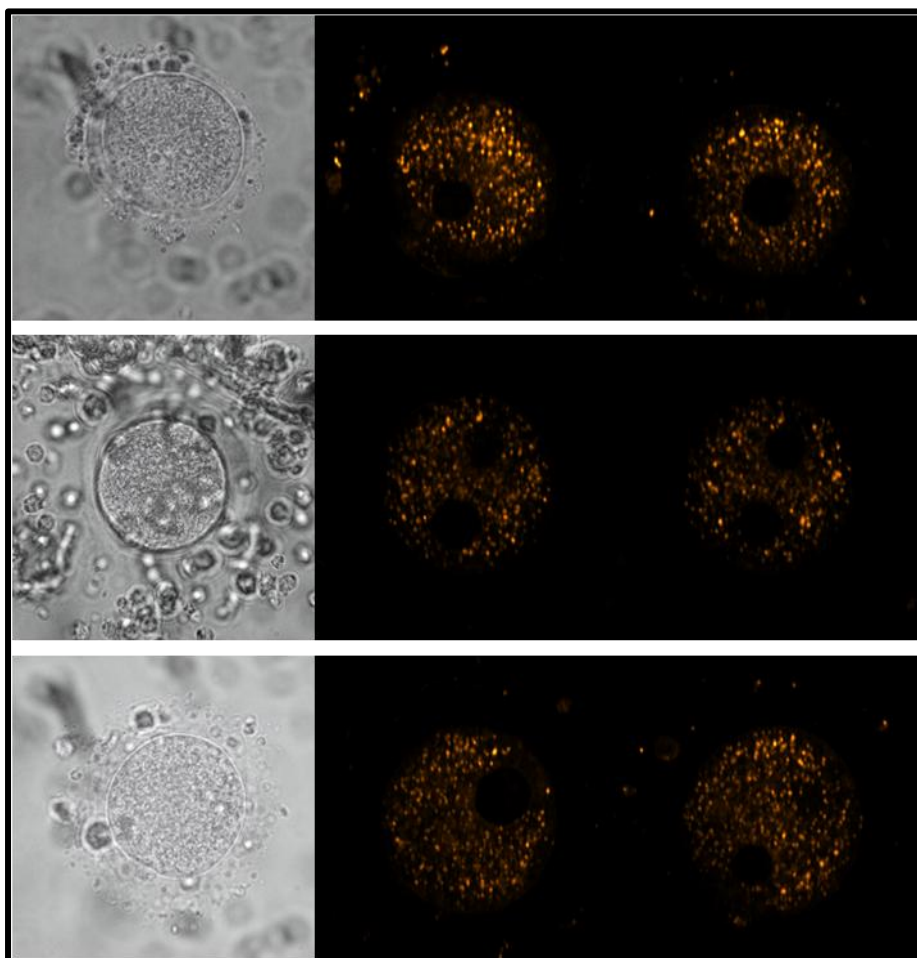
**Διάγραμμα 2.** Σύγκριση μέσου εμβαδού μετά από χορήγηση ή μη L-καρνιτίνης





**Εικ. 11.**

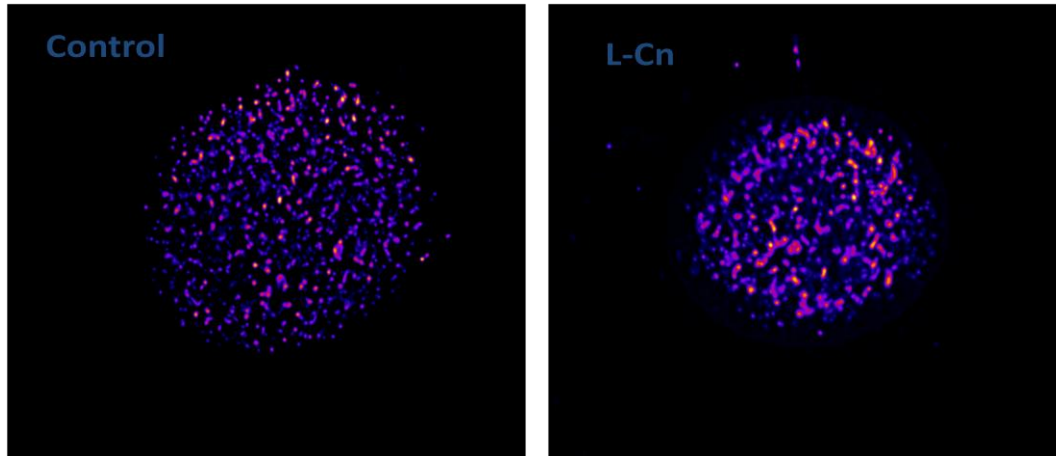
Παρατήρηση εμβρύων στο στάδιο του ζυγώτη μετά από in vivo χορήγηση L-καρνιτίνης για 7 ημέρες με την τεχνική της THG μικροσκοπίας. Πρώτη στήλη: white light Δεύτερη και Τρίτη :κεντρικές τομές του εμβρύου



**Εικ. 12.**

Παρατήρηση control εμβρύων στο στάδιο του ζυγώτη με την τεχνική της THG μικροσκοπίας Πρώτη στήλη: white light Δεύτερη και Τρίτη :κεντρικές τομές του εμβρύου

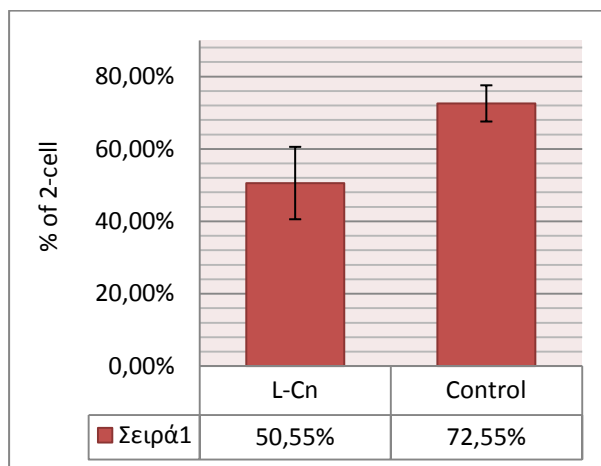
Στην εικόνα 13 έχουμε την τρισδιάστατη απεικόνιση ενός φυσιολογικού κυττάρου (Control) και ενός μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης (L-Cn) για επτά ημέρες πριν την γονιμοποίηση. Είναι εμφανής η διαφορά στο μέσο εμβαδόν των λιπιδικών κυστιδίων, όπως είδαμε στο διάγραμμα 2, με την καρνιτίνη να εμφανίζει μεγαλύτερες δομές.



**Εικόνα 13:** Διαφορά στην κατανομή των λιπιδίων μεταξύ φυσιολογικών (control) και εμβρύων ποντικών μετά από χορήγηση L-καρνιτίνης για επτά ημέρες

Στα *in vitro* πειράματα ελέγχθηκε η αναπτυξιακή ικανότητα των εμβρύων παρουσία ή απουσία της L-καρνιτίνης καθώς και η παρουσία λιπιδικών κυστιδίων στο εσωτερικό τους με τεχνικές συνεστιακής μικροσκοπίας και με την χρήση της μικροσκοπίας γένεσης τρίτης αρμονικής.

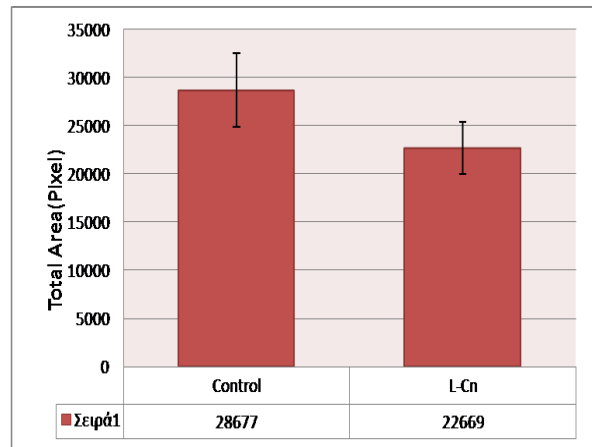
Στις καλλιέργειες των εμβρύων η παρουσία της L-καρνιτίνης προκάλεσε 22% μείωση της ανάπτυξης των εμβρύων από το στάδιο του ζυγώτη στο στάδιο των 2 κυττάρων (διάγραμμα 2) ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε μείωση του συνολικού εμβαδού των λιπιδικών κυστιδίων σε σχέση με τα control όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3, μετά από ποσοτικοποίηση του σήματος που καταγράφηκε με την χρήση της THG μικροσκοπίας, αλλά και στις εικόνες 13 και 14.



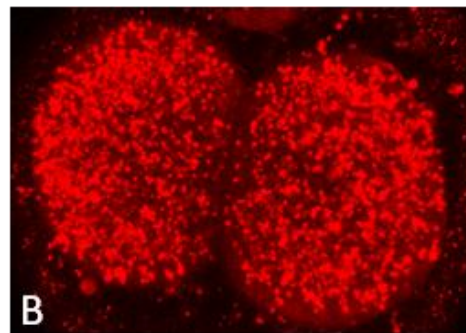
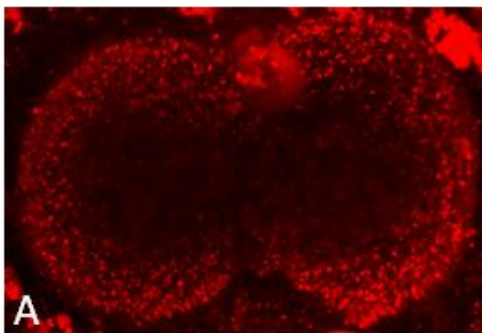
**Διαγρ. 3.** Ανάπτυξη εμβρύων από το στάδιο του ζυγώτη έως το στάδιο των 2-κυττάρων παρουσία ή απουσία L-καρνιτίνης

|            | Control |            | L-Cn  |
|------------|---------|------------|-------|
| Cell 1     | 27684   | Cell 1     | 27329 |
| Cell 3     | 29479   | Cell 3     | 28708 |
| Cell 4     | 15008   | Cell 4     | 32447 |
| Cell 5     | 37190   | Cell 5     | 16589 |
| Cell 6     | 34022   | Cell 6     | 19741 |
|            |         | Cell 7     | 21489 |
|            |         | Cell 8     | 12377 |
| Mean Value | 28677   | Mean Value | 22669 |
| STDEV      | 8508    | STDEV      | 7149  |
| SEM        | 3805    | SEM        | 2702  |

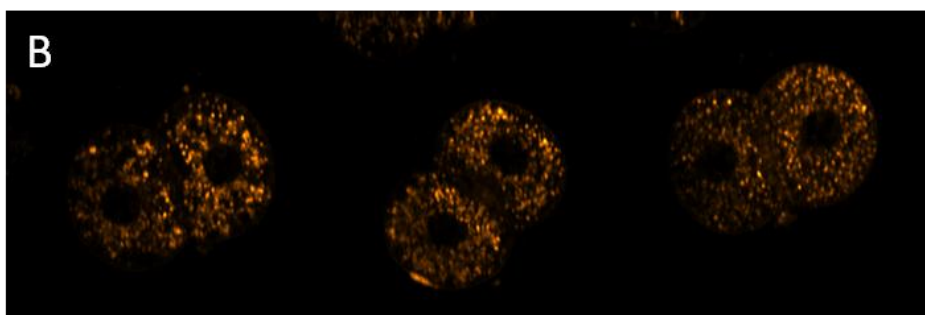
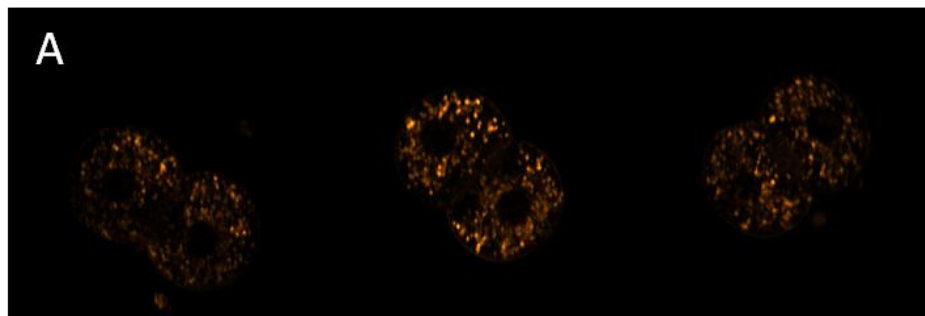
**Διαγρ. 3.** Μέτρηση του συνολικού εμβαδού των λιπιδικών κυστιδίων σε έμβρυα 2-κυττάρων τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία L-καρνιτίνης μέσω καταγραφής σήματος THG



**Διαγρ. 4.** Σύγκριση του συνολικού εμβαδού των λιπιδικών κυστιδίων σε έμβρυα 2-κυττάρων τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία L-καρνιτίνης μέσω καταγραφής σήματος THG



**Εικ. 14:** Έμβρυα 2-κυττάρων τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία (A) ή απουσία (B) L-καρνιτίνης μετά από χρώση με Nile Red (χρωστική ειδική για την ανίχνευση λιπιδικών κυστιδίων) και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού



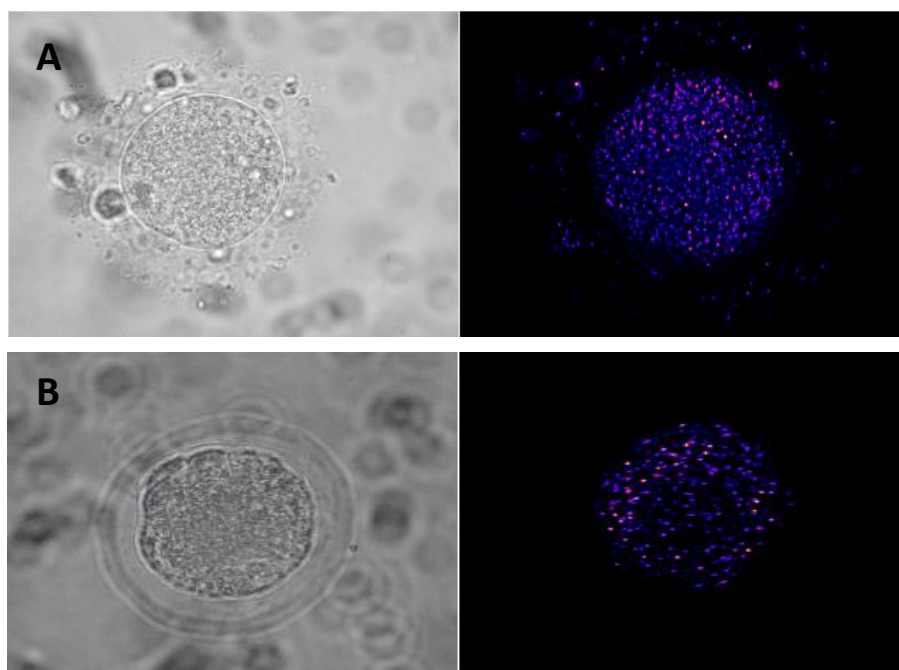
**Εικ. 15:** Έμβρυα 2-κυττάρων τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία (A) ή απουσία (B) L-καρνιτίνης μετά από παρατήρηση τους με THG μικροσκοπία. Κεντρικές τομές του εμβρύου όπου φαίνονται οι πυρήνες και στα δύο βλαστομερίδια.

Παρατηρούμε λοιπόν, πως η παρουσία της L-καρνιτίνης στο καλλιεργητικό υγρό των εμβρύων μειώνει την ανάπτυξη τους από το στάδιο του ζυγώτη στο στάδιο των 2-κυττάρων ενώ ταυτόχρονα προκαλεί μείωση του αριθμού των λιπιδικών κυστιδίων στο εσωτερικό των εμβρύων. In vivo, χορήγηση της L-καρνιτίνης για 4 ή 5 ημέρες δεν φαίνεται να επηρεάζει την γονιμότητα των ζώων, ούτε και την ποιότητα των εμβρύων που παράγονται από αυτά. Αντίθετα, μετά από 7 ημέρες χορήγησης η μορφολογία των εμβρύων επηρεάζεται τόσο ως προς την φυσιολογική τους ανάπτυξη, καθώς παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός μη-φυσιολογικών εμβρύων, όσο και ως προς το μέγεθος των λιπιδικών κυστιδίων στο εσωτερικό τους. Ζυγώτες από θηλυκά στα οποία είχε χορηγηθεί L-καρνιτίνη φαίνεται να σχηματίζουν είτε μεγαλύτερες από τα control δομές λιπιδικών κυστιδίων, είτε συσσωματώματα αυτών στην εικόνα 13 μπορούμε να διακρίνουμε τη διαφορά αυτή. Παρόλα αυτά, τα θηλυκά ήταν ικανά να αναπτύξουν έμβρυα μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την απουσία μετέπειτα εγκυμοσύνης θα μπορούσε να υποδεικνύει πως η L-καρνιτίνη προκαλεί τόσο αλλαγές στα λιπιδικά κυστίδια των εμβρύων όσο και στην φυσιολογία της μητέρας καθιστώντας αδύνατη την εμφύτευση βλαστοκυστών στο ενδομήτριο.

Οι εικόνες και τα πειραματικά αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στο 11th Congress of the European Society for Immunology of Reproduction (ESRI), Budapest, Hungary με τίτλο "L-carnitine alters lipid body content in pre-implantation embryos leading to infertility" C. Kyvelidou, G. Tserevelakis, G. Filippidis, **M. Tsagkaraki**, A. Tsouko, C. Fotakis, I. Athanassakis

### 3.4 Φυσιολογικά και μη ανεπτυγμένα έμβρυα

Στα πειράματά μας συναντήσαμε αρκετές φορές μη ανεπτυγμένα έμβρυα που όπως βλέπουμε και στην εικόνα 15 διαφέρουν στην κατανομή του σήματος καθώς τα μη ανεπτυγμένα έχουν σημαντικά μικρότερο αριθμό λιπιδίων από τα φυσιολογικά. Επομένως, με την μικροσκοπία τρίτης αρμονικής είμαστε σε θέση να διαχωρίσουμε φυσιολογικά από μη ανεπτυγμένα έμβρυα, δυνατότητα που μπορεί να είναι εξαιρετικά σημαντική στην επιλογή, σε μια εξωσωματική γονιμοποίηση, των υγιών κυττάρων σε πρώιμο στάδιο.

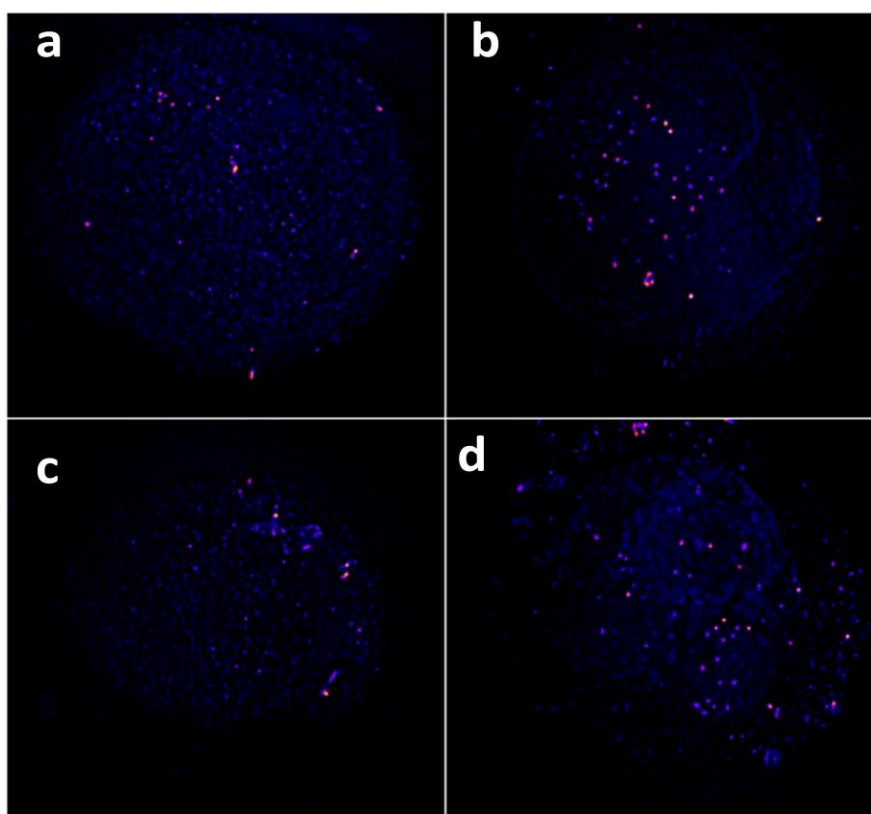


**Εικ. 16:** 3D εικόνες από φυσιολογικό (A) και μη ανεπτυγμένο έμβρυο (B)

### 3.5 Μελλοντικοί Στόχοι

Είναι σημαντικό να διερευνηθούν περαιτέρω οι επιδράσεις της καρνιτίνης τόσο στα λιπιδικά κυστίδια των εμβρύων όσο και στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλυκών ποντικών στην περίπτωση που χορηγείται ενέσιμα. Η αποτυχία της ολοκλήρωσης της κύησης μετά από παρατεταμένη χορήγηση καρνιτίνης ανοίγει νέες προοπτικές για την χρήση της ουσίας αυτής. Η χορήγηση υψηλών συγκεντρώσεων καρνιτίνης θα πρέπει ίσως να αποφεύγεται σε περιπτώσεις γυναικών που προσπαθούν να τεκνοποιήσουν, ενώ ίσως οι ιδιότητες αυτές να μπορούν να βρουν χρησιμότητα στις μεθόδους αντισύλληψης ή/και επείγουσας αντισύλληψης. Επίσης, πρέπει να συνεχιστούν τα πειράματα που αφορούν τις καλλιέργειες ώστε να επιβεβαιώσουμε το αποτέλεσμα που βρήκαμε με ένα μεγαλύτερο στατιστικό δείγμα.

Τελικός σκοπός είναι πάντα η διερεύνηση του ρόλου των λιπιδικών κυστιδίων στην εμβρυική ανάπτυξη και η επιλογή του καταλληλότερου εμβρύου για εμφύτευση στη μήτρα που θα μας εξασφαλίσει σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας σε μια εξωσωματική γονιμοποίηση. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα που έχουμε μέχρι στιγμής στο μοντέλο των εμβρύων του ποντικού μπορούμε να εφαρμόσουμε την μεθοδολογία αυτή και σε ανθρώπινα έμβρυα (Εικ.17).



**Εικόνα 17:** a,b,c Ανθρώπινα μη γονιμοποιημένα ωάρια, d ανθρώπινο έμβρυο μη φυσιολογικής ανάπτυξης, 3D εικόνες μέσω μικροσκοπίας THG

## Βιβλιογραφία

- Hecht E. Optics. San Francisco: Addison Wesley, 2002
- Boyd R. Nonlinear Optics. Burlington: Academic Press, 2008
- Τραχανάς Σ. Κβαντομηχανική Ι. Ηράκλειο Κρήτης: ΠΕΚ, 2005
- Christiana Kyvelidou, George J. Tserevelakis, George Filippidis, Anthi Ranella, Anastasia Kleovoulou, Costas Fotakis, Irene Athanassakis, 2011. Following the course of pre-implantation embryo patterning by non-linear microscopy
- G.J. Tserevelakis, “Non Linear Microscopy”, ELMO notes, IESL/FORTH, 2010
- G. Filippidis, “Non linear imaging of biological structures by employing femtosecond lasers”, IESL/FORTH.
- C. K. Sun, S. W. Chu, S. Y. Chen, T. H. Tsai, T. M. Liu, C. Y. Lin, and H. J. Tsai, ‘Higher harmonic generation microscopy for developmental biology’, *J. Struct. Biol.* **147**, 19–30 (2004)
- W. Supatto, D. Debarre, B. Moulia, E. Brouzes, J. L. Martin, E. Farge, and E. Beaurepaire, ‘In vivo modulation of morphogenetic movements in Drosophila embryos with femtosecond laser pulses’, *Proceedings of National Academy of Science* **102**, 1047–1052 (2005)

