

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΥΠΕΡΤΑΧΕΙΑ ΧΡΟΝΟΑΝΑΛΥΟΜΕΝΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ
ΛΕΙΖΕΡ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΙΝΩΝ FMN ΚΑΙ FAD,
ΣΥΜΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ P450**

Μαρία Πολυχρονάκη

Υπεύθυνος Καθηγητής: Δημήτριος Άγγλος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2019

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

TITLE OF POSTGRADUATE PROGRAMME



Master Thesis

**ULTRAFAST TIME RESOLVED SPECTROSCOPY FOR
ANALYSIS OF FLAVINS FMN AND FAD, COFACTORS OF
CYTOCHROME P450 OXIDOREDUCTASE**

Maria Polychronaki

Master Thesis Supervisor: Demetrios Anglos

HERAKLION 2019

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Άγγλος

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Παναγιώτης Λουκάκος

Ερευνητής, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Νικόλαος Χατζάκης

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο της Κοπεγχάγης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα εργασία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Δημήτριο Άγγλο που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή έρευνα, καθώς και για την συνολική στήριξη και καθοδήγηση, που μου παρέχει όλο αυτά τα χρόνια. Τον κ. Παναγιώτη Λουκάκο για την συνεργασία και την φιλοξενία στο εργαστήριό του. Τον κ. Νικόλαο Χατζάκη για τη συνεργασία και την παροχή των δειγμάτων. Τον υποψήφιο διδακτορικό του εργαστηρίου Δημήτρη Καρανικολόπουλο για τη βοήθεια στην διεκπεραίωση των πειραμάτων και στην ανάλυση των δεδομένων. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Νίκο και Σούλα, και τα αδέρφια μου Ελένη, Χάρη και Ανδρέα, που με στηρίζουν σε κάθε μου βήμα με κάθε τρόπο. Τέλος, ευχαριστώ, από καρδιάς, τις φίλες μου Βασιλική Κ., Μαντώ Αλ. και Μαριλένα Κ.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Εισαγωγικό

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με εργαστηριακή εμπειρία στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) με έδρα το Ηράκλειο Κρήτης.

Εκπαίδευση

2016–2019 Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (Μ. Δ. Ε.) με κατεύθυνση Φυσικοχημεία, από τη Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κρήτης

2012–2016 Πτυχίο Χημείας, από τη Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Κρήτης

Βαθμολογία: 7.89/10

Σχετική εμπειρία

06/2017–06/2019: Διπλωματική άσκηση στο Πανεπιστήμιο Κρήτης και το Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του ΙΤΕ στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού

Τίτλος διπλωματικής εργασίας: Υπερταχεία Χρονοαναλυόμενη Φασματοσκοπία Λείζερ στη Μελέτη των Φλαβινών FMN και FAD, Συμπαράγοντων της Οξειδοαναγωγής του Κυτοχρώματος P450.

- Χρήση της τεχνικής υπερταχεία χρονοαναλυόμενη φασματοσκοπία λείζερ.

10/2016–12/2016: Βοηθός εργαστηρίου Φυσικοχημείας στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης

- Παράλληλη στήριξη στη διδακτική του υπευθύνου του εργαστηρίου κ. Ν. Στρατηγάκη κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών ασκήσεων και επίβλεψη φοιτητών 2^{ου} έτους κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

10/2015–7/2016: Διπλωματική άσκηση στο Πανεπιστήμιο Κρήτης και το Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του ΙΤΕ (Βαθμός 9.5/10)

Τίτλος διπλωματικής εργασίας: Φασματοσκοπία πλάσματος επαγόμενου από λείζερ ως μέθοδος επιφανειακής ανάλυσης μονωτήρων υψηλής τάσης.

- Χρήση των τεχνικών φασματοσκοπία πλάσματος επαγόμενου από λείζερ (LIBS), FT-IR και Raman.

10/2015–01/2016: Βοηθός εργαστηρίου Φυσικοχημείας στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης

- Παράλληλη στήριξη στη διδακτική του υπευθύνου του εργαστηρίου κ. Ν. Στρατηγάκη κατά τη διάρκεια των εργαστηριακών ασκήσεων και επίβλεψη φοιτητών 2^{ου} έτους κατά τη διεξαγωγή του πειράματος.

7/2015–10/2015: Πρακτική άσκηση στο Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του ΙΤΕ (Βαθμός 9.5/10)

Τίτλος πρακτικής εργασίας: Μελέτη οργανικών υλικών και νανο-υλικών με φασματοσκοπία υπέρυθρου

- Μελέτη έργων τέχνης με φασματοσκοπία υπέρυθρου χρησιμοποιώντας την τεχνικές FT-IR και Raman
- Μελέτη με τις ίδιες τεχνικές ακρυλικών χρωμάτων
- Πειραματική χρήση της τεχνικής FT-IR σε υγρά

01/2014–05/2014: Βοηθός εργαστηρίου Γενικής Χημείας στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης

- Παρασκευή αντιδραστηρίων που θα χρησιμοποιούνταν από φοιτητές του 1^{ου} έτους για σχετικά πειράματα υπό την επίβλεψη του υπευθύνου του εργαστηρίου κ. Σπ. Κορνήλιου

Υποτροφίες

02/2019-12/2019: Μεταπτυχιακή υποτροφία από το Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας στο πλαίσιο του έργου Εθνικών Υποδομών Λείζερ, HELLAS-CH του ΙΤΕ.

07/2018-12/2018: Μεταπτυχιακή υποτροφία από το Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας στα πλαίσια του προγράμματος Έρευνας και Ανάπτυξης του ΙΤΕ.

Δημοσιεύσεις

- N. Mavrikakis, E. Koudoumas, K. Siderakis, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, O. Kokkinaki, A. Klini, C. Kalpouzos, M. Polychronaki, D. Anglos. (2017). Insulators' pollution problem : Experience from the coastal transmission system of Crete. Published in 2017 52nd International Universities Power Engineering Conference (UPEC). pp. 1-6. [doi: 10.1109/UPEC.2017.8231893](https://doi.org/10.1109/UPEC.2017.8231893)

Παρουσιάσεις σε Συνέδρια (Poster)

- **M. Πολυχρονάκη**, Δ. Καρανικολόπουλος, Κ. Μπαλάνος, Ι. Μπιτζήλου και Π. Α. Λουκάκος. Αρχές Οπτικής Φασματοσκοπίας και Απεικόνισης. 2018 Βραδιά του Ερευνητή, 28 Οκτωβρίου 2018, Ηράκλειο, Ελλάδα.
- D. Karanikolopoulos, **M. Polychronaki**, and P. A. Loukakos. Time-Resolved Femtosecond Laser Spectroscopy in Condensed Matter. 11^η Επιστημονική Δημερίδα ΙΤΕ, 13-14 Οκτωβρίου 2017, Ηράκλειο, Ελλάδα.
- O. Kokkinaki, A. Klini, **M. Polychronaki**, N. Mavrikakis, K. Siderakis, E. Koudoumas, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, C. Kalpouzos, D. Anglos. Remote LIBS for Assessing the Condition of Field-Aged Composite HV Outdoor Insulators. 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA-2017), 17-21 Σεπτεμβρίου 2017, Ηράκλειο, Ελλάδα.

Συνέδρια

- Nordic Training School for Potential Users “Luminescence Dynamics: analyzing relaxation processes”, 10-12 Απριλίου 2019, Ρίγα, Λετονία
- 11^η Επιστημονική Δημερίδα ΙΤΕ, 13-14 Οκτωβρίου 2017, Ηράκλειο, Ελλάδα.
- 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA-2017), 17-21 Σεπτεμβρίου 2017, Ηράκλειο, Ελλάδα.

Σεμινάρια

- Ασφάλεια Εργαστηρίου IMBB-ΙΤΕ, «Πυρασφάλεια-Ασφαλείς Συνθήκες στους Εργαστηριακούς Χώρους», «Ασφαλής Χρήση Χημικών», «Θέματα Ασφάλειας σε Πειράματα με Ζωντανούς Οργανισμούς», 23 Ιανουαρίου 2017, ΙΤΕ, Ηράκλειο, Κρήτη.

Διδακτικές Ικανότητες

Ως προπτυχιακή φοιτήτρια πρόθυμη στην βοήθεια και διδασκαλία εργαστηρίων κατόπιν αναθέσεως της ευθύνης από τους αρμόδιους καθηγητές και εργαστηριακούς βοηθούς του τμήματος. Οξυμένη διδακτική ευθύνη και οργάνωση.

Οργανωτικές και επικοινωνιακές δεξιότητες

Προετοιμασία και παρουσίαση πειραμάτων για το εργαστήριο Femtosecond Laser Spectroscopy in Solid State στα πλαίσια της βραδιά του ερευνητή 2018.

Έγκαιρη παράδοση αναφορών των εργαστηρίων του τμήματος, επιτυχείς βαθμολογίες κατόπιν της αξιολόγησης των καθηγητών, συνεχής συνεργασία τόσο με τους καθηγητές του τμήματος όσο και με τους προπτυχιακούς φοιτητές.

Γνώση Χρήσης Η/Υ

Χρήση λογισμικού MATLAB για την τεχνική υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ.

Χρήση λογισμικού Lab Spec για την τεχνική φασματοσκοπίας Raman

Χρήση λογισμικού Andor και Avast για την τεχνική LIBS (Αξιοποίηση του προγράμματος για την διπλωματική εργασία)

Χρήση λογισμικού Origin για την διεξαγωγή πειραματικών αποτελεσμάτων (Αξιοποίηση του λογισμικού κατά την διάρκεια ολόκληρου του κύκλου σπουδών)

Χειμερινό εξάμηνο 2012-2013: Επιτυχής εξέταση στο μάθημα Εισαγωγή στους Ηλεκτρονικούς Υπολογιστές (Microsoft Word, Excel, Power point, Access, Lab View) (Βαθμός 9/10)

Γλώσσες

Ελληνική: Μητρική

Αγγλικά: TOEFL

Ενδιαφέροντα

Χημεία με έμφαση στην Φυσικοχημεία και τις εφαρμογές της τόσο στην πρακτική καθημερινή ζωή όσο και στην ακαδημαϊκή έρευνα, διεθνή ερευνητικά προγράμματα, ταξίδια

CURRICULUM VITAE

Introductory

Chemistry graduate student with laboratory experience in the Chemistry Department of the University of Crete and the Institute of Electronic Structure and Laser, Foundation for Research and Technology-Hellas (FORTH) in Heraklion, Crete.

Education

2016-2019 MSc in Chemistry, Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete

2012-2016 BSc in Chemistry, Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete

GPA: 7.89/10

Relevant experience

06/2017-06/2019: MSc Dissertation at the Institute of Electronic Structure and Laser, FORTH

Title of dissertation: Ultrafast Time Resolved Spectroscopy for Analysis of Flavins FMN and FAD, Cofactors of Cytochrome P450 Oxidoreductase.

- Techniques: Ultrafast Time Resolved Spectroscopy

10/2016-12/2016: Graduate Teaching Assistant in Physical Chemistry Lab, Department of Chemistry, University of Crete. Supervisor: N. Stratigakis

10/2015-7/2016: Undergraduate thesis at the Institute of Electronic Structure and Laser of FORTH (grade 9.5/10)

Thesis title: Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for Surface Analysis of Synthetic High-Voltage Insulators

- Use techniques: Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), FT-IR and Raman.

10/2015-01/2016: Undergraduate Teaching Assistant in the Physical Chemistry Lab, Department of Chemistry, University of Crete. Supervisor: N. Stratigakis

7/2015-10/2015: Internship at the Institute of Electronic Structure and Laser of FORTH (grade 9.5/10)

- Study of painted artworks and icons through vibrational spectroscopies, FT-IR and Raman techniques
- Experimental use of FT-IR technique in liquids

01/2014-05/2014: General Chemistry Laboratory Undergraduate Assistant in the Department of Chemistry, University of Crete

- Preparation of reagent solutions to be used by 1st year students under the supervision of Mr. Sp. Kornilios

Scholarships

02/2019-12/2019: Graduate student scholarship from the Foundation for Research and Technology–Hellas (FORTH), Project HELLAS-CH

07/2018-12/2018: Graduate student scholarship from the Foundation for Research and Technology–Hellas (FORTH)

Publications

- N. Mavrikakis, E. Koudoumas, K. Siderakis, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, O. Kokkinaki, A. Klini, C. Kalpouzos, **M. Polychronaki**, D. Anglos. (2017). Insulators' pollution problem : Experience from the coastal transmission system of Crete. Published in 2017 52nd International Universities Power Engineering Conference (UPEC). pp. 1-6. [doi: 10.1109/UPEC.2017.8231893](https://doi.org/10.1109/UPEC.2017.8231893)

Poster Presentations

- **M. Polychronaki**, D. Karanikolopoulos, K. Balanos, J. Bitzilou and P. A. Loukakos. Principles of Optical Spectroscopy and Imaging. 2018 Βραδιά του Ερευνητή, 28 October 2018, Heraklion, Greece.
- D. Karanikolopoulos, **M. Polychronaki**, and P. A. Loukakos. Time-Resolved Femtosecond LASER Spectroscopy in Condensed Matter. 11th Επιστημονική Δημερίδα ITE, 13-14 October 2017, Heraklion, Greece.
- O. Kokkinaki, A. Klini, **M. Polychronaki**, N. Mavrikakis, K. Siderakis, E. Koudoumas, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, C. Kalpouzos, D. Anglos. Remote LIBS for Assessing the Condition of Field-Aged Composite HV Outdoor Insulators. 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA-2017), 17-21 September 2017, Heraklion, Crete.

Conferences-Workshops

- Nordic Training School for Potential Users “luminescence Dynamics: analyzing relaxation processes”, 10-12 April 2019 Riga, Latvia
- 11th Scientific Conference of Foundation for Research and Technology–Hellas (FORTH), 13-14 October 2017, Heraklion, Crete.
- 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA-2017), 17-21 September 2017, Heraklion, Greece.

Seminars

- Laboratory Safety Seminar, organized by IMBB-FORTH, «Laboratory Safety: General Aspects», «Safe Use of Chemicals. Chemical Waste», «Biosafety», 23 January 2017, Heraklion, Greece.

Software skills

MATLAB for data processing in ultrafast time resolved spectroscopy

LabSpec, Raman spectrometer

Andor software for controlling an ICCD detector in LIBS experiments

Origin, Data processing and analysis

Fall semester 2012-2013: Successful examination in Introduction to Computers (Microsoft Word, Excel, PowerPoint, Access, LabVIEW) (Grade 9/10)

Languages

Greek: Mother Language, native in both oral and written skills.

English: TOEFL

Interests

Chemistry, with emphasis on Physical Chemistry and on applications in both daily life and academic research.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η κινητική συμπεριφορά των φλαβινών: φλαβινομονονουκλεοτίδιο (Flavin Mononucleotide-FMN) και φλαβινοαδενινοδινουκλεοτίδιο (Flavin Adenine Dinucleotide-FAD), συμπαραγόντων του ενζύμου οξειδοαναγωγάση του κυτοχρώματος P450 (P450 oxidoreductase-POR).

Το ένζυμο POR συμμετέχει σε πληθώρα βιοχημικών μονοπατιών και ως εκ τούτου είναι σημαντικός ο προσδιορισμός του ακριβούς μηχανισμού λειτουργίας του στις διάφορες οξειδοαναγωγικές διεργασίες.

Η μελέτη των συγκεκριμένων φλαβινών και ειδικότερα των φωτοφυσικών και φωτοχημικών διεργασιών στις οποίες αυτοί οι συμπαραγόντες συμμετέχουν οδηγεί στην εξαγωγή μηχανιστικών πληροφοριών που συνεισφέρουν στην κατανόηση της λειτουργίας του ενζύμου POR.

Για τη διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υπερταχείας χρονοαναλύμενης φασματοσκοπίας λέιζερ (Ultrafast Time-Resolved Laser Spectroscopy). Χαρακτηριστικό της τεχνικής είναι η χρήση παλμού λέιζερ μέσω του οποίου επιτυγχάνεται διέγερση των μορίων της φλαβίνης εντός εξαιρετικά μικρού χρονικού διαστήματος (30×10^{-15} s). Ο περιορισμένος χρόνος της διαδικασίας διαταραχής του συστήματος επιτρέπει την ανίχνευση και φασματοσκοπική παρακολούθηση υπερταχείων διαδικασιών μέσω μεταβολών στην απορρόφηση που προκύπτουν από το σχηματισμό και αλληλο-μετατροπή διεγερμένων καταστάσεων και ενδιάμεσων. Ειδικότερα, για τη διέγερση των φλαβινών χρησιμοποιήθηκαν παλμοί λέιζερ, μήκους κύματος $\lambda = 400$ nm, οι οποίοι οδηγούν σε διέγερση των ενώσεων στις ηλεκτρονιακές καταστάσεις S_1 και S_2 .

Τα χρονοαναλυόμενα φάσματα απορρόφησης του FMN, που καταγράφονται αμέσως μετά τη διέγερση και για διάφορες χρονικές στιγμές σε εύρος μέχρι και 50×10^{-12} s, εμφανίζουν τέσσερις χαρακτηριστικές ταινίες οι οποίες οφείλονται στη μετάβαση $S_0 \rightarrow S_1$ (450 nm), στην εξαναγκασμένη εκπομπή $S_1 \rightarrow S_0$ (560 nm), καθώς και σε απορρόφηση της κατάστασης S_1 προς ανώτερες διεγερμένες καταστάσεις, $S_1 \rightarrow S_n$ (505 nm και 600 nm). Από τα χρονοαναλυόμενα φάσματα προκύπτουν κινητικές καμπύλες, που αποτυπώνουν την κινητική των καταστάσεων S_0 και S_1 του FMN. Το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία, στην οποία αναφέρεται αργή αποδιέγερση της S_1 προς S_0 με χρόνο ζωής της τάξης των μερικών νανοδευτερολέπτων

(5.4×10^{-9} s). Επιπροσθέτως η ανάλυση των κινητικών καμπυλών φανερώνει μια ταχεία διεργασία με χρόνο ζωής της τάξης των 1-2 πικοδευτερολέπτων (1×10^{-12} s) και αποδίδεται στην αποδιέγερση (εσωτερική μετατροπή) της διεγερμένης κατάστασης S_2 προς την S_1 .

Στην περίπτωση του FAD παρατηρήθηκαν οι αντίστοιχες μεταβάσεις ως προς το FMN, με όμοια φασματικά χαρακτηριστικά. Η ανάλυση των δεδομένων αποκαλύπτει δυο κινητικές συνιστώσες, μια υπερταχεία με χρόνο ζωής της τάξης των 5-12 πικοδευτερολέπτων (1×10^{-12} s) ακολουθούμενη από μια πολύ αργή που δεν αναλύεται περαιτέρω λόγω του μικρού χρονικού διαστήματος της μέτρησης αλλά αποδίδεται στην αργή αποδιέγερση της S_1 προς S_0 . Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την βιβλιογραφία, στην οποία ο υπερταχύς χρόνος ζωής, $5-10 \times 10^{-12}$ s, συνδέεται με την παρουσία διαμόρφωσης του FAD στην οποία ο δακτύλιος της ισοαλλοξαζίνης ευρίσκεται σε μικρή απόσταση από το δακτύλιο αδενίνης με αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των δυο μέσω διεργασίας μεταφοράς ηλεκτρονίου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν τις δυνατότητες της υπερταχείας χρονοαναλύμενης φασματοσκοπίας λέιζερ για τη λεπτομερή διερεύνηση κινητικών φαινομένων σε υψηλή χρονική ανάλυση. Η μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη και κατανόηση των φωτοφυσικών διεργασιών σε απλά συστήματα φλαβινών, αλλά κυρίως σε πιο πολύπλοκα βιολογικά μόρια όπως το POR.

ABSTRACT

In the current research, we study the dynamics of two flavins: flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD), which are cofactors of the enzyme P450 oxidoreductase (POR). The POR enzyme contributes to a wide variety of biological systems, thus it is important to understand the mechanism of this enzyme. The study of these flavins and in particular the photophysical and photochemical processes in which these cofactors participate leads to acquiring useful information about the biological mechanism of the POR enzyme.

Ultrafast time-resolved laser spectroscopy is used in order to conduct the current study. The main characteristic of this technique is the use of an ultrafast pulse in order to excite the flavin's molecules (30×10^{-15} s). The limited duration of the system's perturbation allows the detection of the ultrafast processes by observing changes in the absorption spectrum, which may involve spectral characteristics (new transitions appearing under perturbation) and/or absorbance characteristics (increase or decrease of the optical density). The wavelength of the pump pulse is $\lambda = 400$ nm and excites the flavins in the excited states S_1 and S_2 .

The transient absorption spectra of the FMN, which are recorded after the excitation at many different time delays, consist of four characteristic bands. The transitions that induce bands' formation are $S_0 \rightarrow S_1$ (450 nm), stimulated emission $S_1 \rightarrow S_0$ (560 nm) and excited-state absorptions $S_1 \rightarrow S_n$ (505 nm and 600 nm). Decay dynamics arise from the transient absorption spectra, which indicate the kinetics of FMN's states S_0 and S_1 . The current results are in agreement with previously published data, in which a slow 5.4×10^{-9} s lifetime process is presented. Moreover, the analysis of the decay dynamics reveals an ultrafast dynamic with lifetime $1-2 \times 10^{-12}$ s, which results from the internal conversion of the higher excited state S_2 to S_1 .

Concerning FAD spectra, we observe same transitions as FMN and same spectral characteristics. The data analysis reveals two dynamics, one ultrafast with $5-12 \times 10^{-12}$ s lifetime and one slow, which cannot be calculated because the time range is limited. This dynamic attributes to the transition $S_1 \rightarrow S_0$. These results are also in agreement with previously reported data, in which the lifetime of the ultrafast dynamics is $5-10 \times 10^{-12}$ s. This dynamic is associated with conformation of FAD, in which the isoalloxazine ring is in close proximity to the adenine ring. This fast quenching of the flavin's excited state is proposed to be attributed to the

photoinduced intramolecular electron transfer from the isoalloxazine moiety to the adenine ring of FAD.

The aforementioned results demonstrate the capabilities of the ultrafast time-resolved laser spectroscopy in the analysis of the dynamics. It also indicate the application of the current method in further studies in order to understand photophysical processes of flavins and several other complex molecules such as the POR enzyme.

Περιεχόμενα

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	5
CURRICULUM VITAE	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	12
ABSTRACT	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	18
<i>Χρονοαναλύσιμη Υπερταχεία Φασματοσκοπία Λείζερ</i>	18
1.1 Εισαγωγή	18
1.2 Ιστορική Αναδρομή	19
1.3 Βασική Αρχή Λειτουργίας Υπερταχείας Χρονοαλύσιμης Φασματοσκοπίας	21
1.4 Παλμός «Probe»	23
1.4.1 Αυτοδιαμόρφωση Φάσης (Self-Phase Modulation-SPM)	24
1.5 Παλμός «Pump»	26
1.5.1 Γένεση Δεύτερης Αρμονικής	26
1.6 Καταγραφόμενο σήμα.....	28
1.7 Βιβλιογραφία	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	33
<i>Θεωρητικό Υπόβαθρο Φλαβινών</i>	33
2.1 Φλαβίνες	33
2.2 Φλαβοένζυμα	34
2.3 Ιδιότητες των Φλαβινών	38
2.4 Η Κινητική του Φλάβινο-μονονουκλεοτιδίου (FMN) και του Φλαβινο-αδενινουκλεοτιδίου (FAD)	40
2.5 Βιβλιογραφία	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	44
<i>Πειραματική Διαδικασία και Οργανολογία</i>	44
3.1 Πειραματική Διαδικασία.....	44
3.1.1 Παρασκευή Ρυθμιστικού Διαλύματος (Buffer: Tris-HCl)	44
3.1.2 Παρασκευή Διαλυμάτων FMN και FAD	44

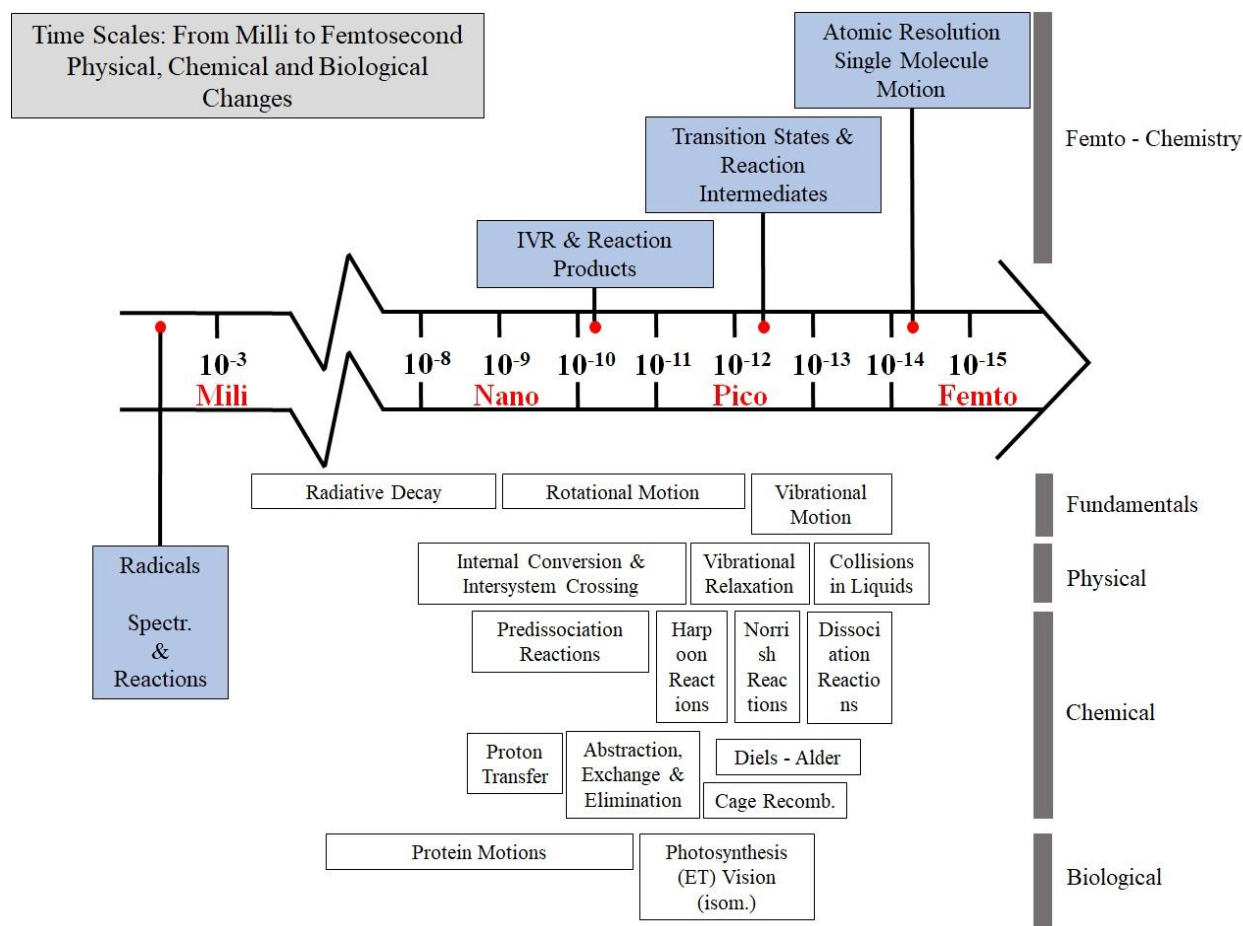
3.2 Πειραματική Διάταξη της Τεχνικής Χρονοαναλύμενη Υπερταχεία Φασματοσκοπία Λείζερ	45
3.2.1 Λείζερ	46
3.2.2 Φασματογράφος Andor Shamrock SR-303i	55
3.2.3 Ανιχνευτής CCD Newton.....	56
3.3 Τυπική Μέτρηση με την Τεχνική της Χρονοαναλύμενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λείζερ	58
3.4 Βιβλιογραφία	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	60
<i>Αποτελέσματα και Συζήτηση Αποτελεσμάτων</i>	<i>60</i>
4.1 Εισαγωγή	60
4.2 2D Απεικονίσεις Χρονοαναλύμενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λείζερ	62
4.3 Υπερταχεία Δυναμική του FMN.....	64
4.4 Υπερταχεία Δυναμική του FAD.....	71
4.5 Βιβλιογραφία	77
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Χρονοαναλυόμενη Υπερταχεία Φασματοσκοπία Λείζερ

1.1 Εισαγωγή

Ως φασματοσκοπία ορίζεται η μελέτη της αλληλεπίδρασης του φωτός (ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας) με την ύλη. Η απορρόφηση φωτός οδηγεί στο σχηματισμό διεγερμένων καταστάσεων και ενεργών ενδιάμεσων, του υπό μελέτη συστήματος, οι οποίες μελετώνται μέσω δυο διαφορετικών προσεγγίσεων: τη στατική και τη χρονοαναλυόμενη φασματοσκοπία. Η στατική φασματοσκοπία επιτρέπει την καταγραφή του φάσματος απορρόφησης/ φθορισμού των φωτοενεργών ειδών και προσδιορισμό της ενεργειακής διαφοράς μεταξύ θεμελιώδους και διεγερμένων καταστάσεων και της πιθανότητας απορρόφησης του φωτός, δεν προσφέρεται, ωστόσο, για την καταγραφή κινητικών διαδικασιών οι οποίες είναι ταχείες ή υπερταχείες. Η συνεχής ακτινοβολία του συστήματος οδηγεί σε ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών διέγερσης και αποδιέγερσης, οδηγώντας το σύστημα σε στάσιμη κατάσταση (steady state) στην οποία κυριαρχεί η θεμελιώδης κατάσταση και κατά συνέπεια λαμβάνονται φασματικές μετρήσεις που αντανακλούν τη συγκέντρωση αυτής. Στη χρονοαναλυόμενη φασματοσκοπία, μικρής διάρκειας διέγερση, του υπό μελέτη συστήματος, παράγει τις διεγερμένες καταστάσεις, των οποίων η χρονική εξέλιξη καταγράφεται με την πάροδο του χρόνου. Η καταγραφή των κινητικών διαδικασιών είναι εφικτή καθώς η διέγερση υφίσταται μόνο «στιγμιαία». Συνεπώς, με τη χρονοαναλυόμενη φασματοσκοπία είναι δυνατή η καταγραφή του φάσματος απορρόφησης των διεγερμένων ειδών και ο προσδιορισμός των σταθερών ταχύτητας των διαδικασιών στις οποίες αυτά συμμετέχουν. Τέτοιες διαδικασίες αφορούν ενδιάμεσες καταστάσεις φωτοχημικών αντιδράσεων, διαδικασίες μεταφοράς φορτίου ή ηλεκτρονίου, διαμορφωτικές αλλαγές μορίων, διαδικασίες φθορισμού ή φωσφορισμού κ.α. Απαραίτητη προϋπόθεση για την καταγραφή των κινητικών φαινομένων είναι η χρήση παλμών χρονικά μικρότερων από την προς μελέτη κινητική [1], [2].



Σχήμα 1.1: Χρονική κλίμακα και πεδίο δράσης των υπερταχειών φαινομένων στη φυσική, τη χημεία και τη βιολογία. Άνωθεν της κλίμακας αναφέρονται τα θεμελιώδη στοιχεία για τη δυναμική του χημικού δεσμού (ενδομοριακή δονητική χαλάρωση (IVR), μεταβατικά επίπεδα, και η κίνηση μεμονωμένου μορίου). Κάτωθεν της κλίμακας παρουσιάζονται οι περιστροφικές και οι δονητικές κινήσεις, καθώς και παραδείγματα μελετών φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών [3].

1.2 Ιστορική Αναδρομή

Στα τέλη του προπροηγούμενου αιώνα, άρχισε να απασχολεί την επιστημονική κοινότητα η έννοια της χρονικής ανάλυσης. Οι πρώτες πληροφορίες σχετικά με την κλίμακα των σταθερών ταχύτητας των αντιδράσεων δόθηκαν από τον Arrhenius (1889) [4], ενώ σημαντική ήταν και η συνεισφορά των Eyring και M. Polanyi (1931) [5]. Συστηματικές μελέτες των σταθερών ταχύτητας αντιδράσεων ήταν δύσκολο να πραγματοποιηθούν έως τα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Η πρώτη μέτρηση σταθεράς ταχύτητας έγινε από τον L. Wilhelmy (1850), ο οποίος κατάφερε να μετρήσει ποσοτικά τη σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης υδρόλυσης διαλύματος σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη [6]. Το 1901 δόθηκε το βραβείο Nobel στον van't Hoff

για τις θεωρητικές εκφράσεις του σχετικά με τη χημική δυναμική [7], ενώ βραβείο Nobel έλαβε και ο Arrhenius το 1903.

Την ίδια περίοδο γίνεται η πρώτη αναφορά στη σημασία του συγχρονισμού σε πειράματα τύπου pump-probe. Συγκεκριμένα, το 1899 ο Abraham και ο Lemoine πραγματοποίησαν ένα «έξυπνο» πείραμα, κατά το οποίο ρύθμισαν τις χρονικές καθυστερήσεις με χρήση μιας μεταβλητής οδού για το φως [8].

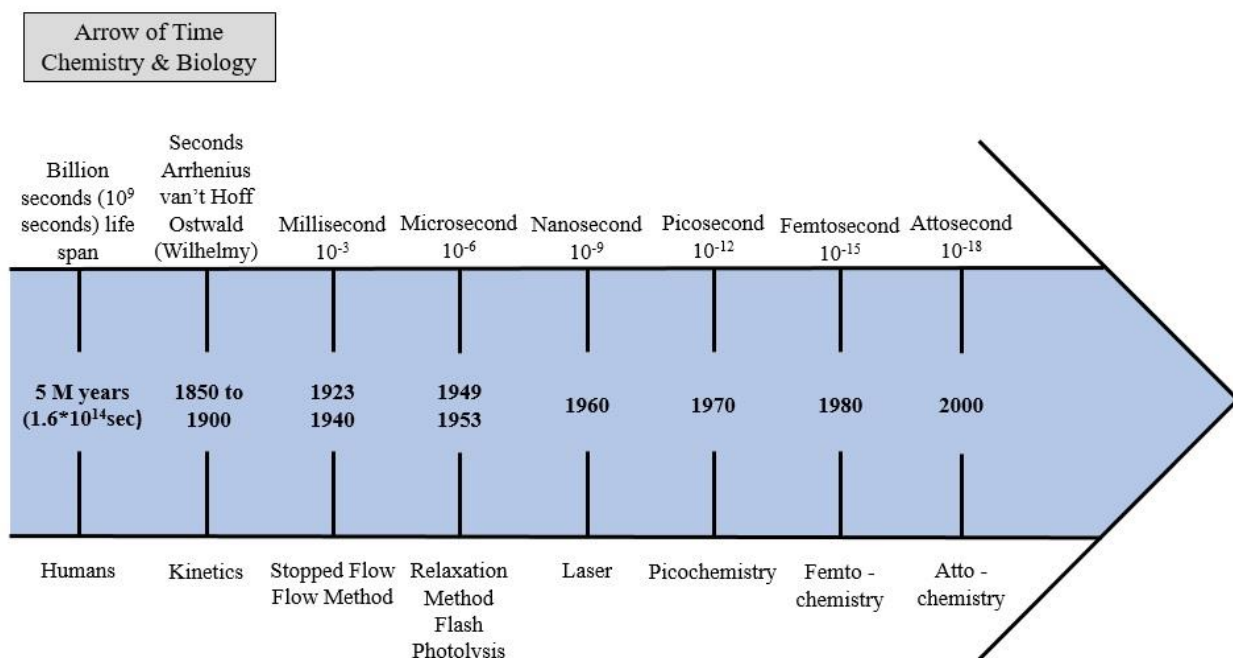
Ο M. Eigen [9], από τη Γερμανία, και οι R. G. W. Norrish και G. Porter [10], από την Αγγλία, το 1950, ανέπτυξαν τεχνικές που επέτρεπαν τη διεξαγωγή φασματοσκοπικών μετρήσεων σε χρονική κλίμακα μικρο-δευτερολέπτων (μs) και για τις εργασίες αυτές τους απονεμήθηκε το βραβείο Nobel το 1967. Ο Eigen ανέπτυξε τη «μέθοδο χαλάρωσης» (relaxation method), η οποία κυμαινόταν στην κλίμακα του χρόνου από μικρο-δευτερόλεπτα (μs) έως νανο-δευτερόλεπτα (ns). Η βασική αρχή της μεθόδου ήταν η διατάραξη της ισορροπίας του διαλύματος τη χρονική στιγμήν $t = 0 \text{ s}$ και έπειτα η καταγραφή της κινητικής, έως ότου το σύστημα επιστρέψει σε ισορροπία.

Η ανάπτυξη του πρώτου λέιζερ ρουμπινίου, το 1960, από τον Maiman άνοιξε νέους δρόμους για την ανάπτυξη της χρονικής διακριτικής ικανότητας [11]. Η ανάπτυξη παλμικών πηγών λέιζερ έγινε δυνατή, το 1961, από τον Hellwarth [12], αν και με μεγάλη διάρκεια παλμού, εν συγκρίσει με τα σημερινά δεδομένα (παλμοί με χρονική διάρκεια νανο-δευτερολέπτων (ns)). Παλμοί λέιζερ μικρής χρονικής διάρκειας δημιουργήθηκαν το 1966 από τον De Maria (χρονική διάρκεια πικο-δευτερολέπτων (ps)) [13]. Το 1974 ο C. Shank και ο E. Ippen παρήγαγαν παλμούς διάρκειας μικρότερης από 1 ps από λέιζερ χρωστικών [14]. Ο πρώτος παλμός λέιζερ με διάρκεια 6 φεμτο-δευτερολέπτων (fs) δημιουργήθηκε το 1987. Αξιοσημείωτη είναι η παραγωγή παλμών λέιζερ με διάρκεια φεμτο-δευτερολέπτων (fs) χρησιμοποιώντας λέιζερ στερεάς κατάστασης, το 1991 από τον Sibbett [15]. Ο παλμός λέιζερ, της τάξης των φεμτο-δευτερολέπτων, μικρότερης χρονικής διάρκειας, που έχει καταγραφεί, είναι 4 fs και κατέχει μία θέση στο βιβλίο παγκοσμίων ρεκόρ Guinness (D. Wiersma) [16].

Τα όρια της διακριτικής ικανότητας για τη μελέτη διαδικασιών που ακτινοβολούν μειώθηκαν στην τάξη των φεμτο-δευτερολέπτων (fs) χάρη στην ανάπτυξη των λέιζερ, γεγονός που έδωσε, το 1999, το βραβείο Nobel στον A. H. Zewail [3].

Η πρώτη καταγραφή τρένων παλμών χρονικής διάρκειας υπο-φεμτο-δευτερολέπτων έγινε το 1999 από το N. Παπαδογιάννη και τους συνεργάτες του (ΙΗΔΛ-ΙΤΕ και Πανεπιστήμιο

Κρήτης) ενώ η παραγωγή μεμονωμένων παλμών διάρκειας 650 αττο-δευτερολέπτων (as) πραγματοποιήθηκε, το 2001, από τον Hentschel (Σχ. 1.2) [17], [18].

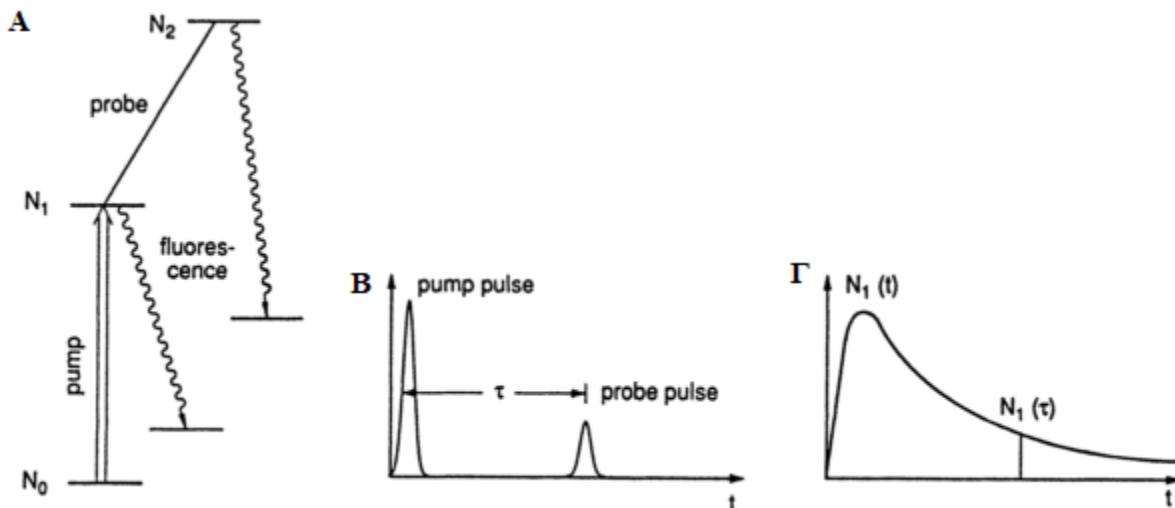


Σχήμα 1.2: Το βέλος του χρόνου με σημαντικά γεγονότα στην ανάπτυξη της χρονικής διακριτικής ικανότητας [3].

1.3 Βασική Αρχή Λειτουργίας Υπερταχείας Χρονοαλυόμενης Φασματοσκοπίας

Στη φασματοσκοπία η χρονική ανάλυση, για την παρακολούθηση υπερταχειών φαινομένων, πραγματοποιείται με χρήση παλμών λέιζερ με διάρκεια μικρότερη από το συνολικό χρόνο πραγματοποίησης του φαινομένου. Η τεχνική της υπερταχείας χρονοαλυόμενη φασματοσκοπία λέιζερ βασίζεται στη χρήση δυο παλμών λέιζερ, του παλμού άντλησης (pump) και του παλμού ανίχνευσης (probe). Ο παλμός άντλησης προκαλεί τη διαταραχή του δείγματος (διέγερση των μορίων) ενώ ο παλμός ανίχνευσης καταφθάνει στο δείγμα με χρονική καθυστέρηση, ως προς τον παλμό άντλησης, επιτρέποντας την καταγραφή της μεταβολής στην απορρόφηση, που προκλήθηκε από τη διέγερση [1], [19]. Σε ένα τυχαίο σύστημα κατά την διέγερση με τον παλμό άντλησης ένας αριθμός μορίων εγκαταλείπουν τη θεμελιώδη κατάσταση και μεταφέρονται σε μια διεγερμένη. Κατά συνέπεια η συγκέντρωση της θεμελιώδους κατάστασης μειώνεται, οδηγώντας σε αντίστοιχη μείωση του σήματος στο φάσμα απορρόφησης. Αντίστοιχα, η αύξηση του πληθυσμού στη διεγερμένη κατάσταση οδηγεί σε αύξηση του

σήματος στο φάσμα απορρόφησης, το οποίο με την πάροδο του χρόνου φθίνει λόγω της αποδιέγερσης των μορίων.



Σχήμα 1.3: A) Ενεργειακές μεταβολές που προκαλούνται από τους παλμούς pump και probe, για παράδειγμα σε ένα τυχαίο δείγμα. B) Χρονική καθυστέρηση μεταξύ παλμού pump και παλμού probe. Γ) Μεταβολή της πυκνότητας πληθυσμού της διεγερμένης κατάστασης με το χρόνο [19].

Η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας (optical density-OD, ισοδύναμη της χρονοανεξάρτητης απορρόφησης) έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων μεταβάσεων ή την εξαφάνιση προϋπαρχουσών. Η χρονική ανάλυση παρέχει πληροφορίες σχετικά με την δυναμική των αλλαγών αυτών.

Ο ανιχνευτής καταγράφει την ένταση του παλμού probe πριν ($I_0(\nu)$) και μετά ($I(\nu, \Delta t)$) τη διαταραχή του συστήματος. Με βάση το νόμο του Beer-Lambert:

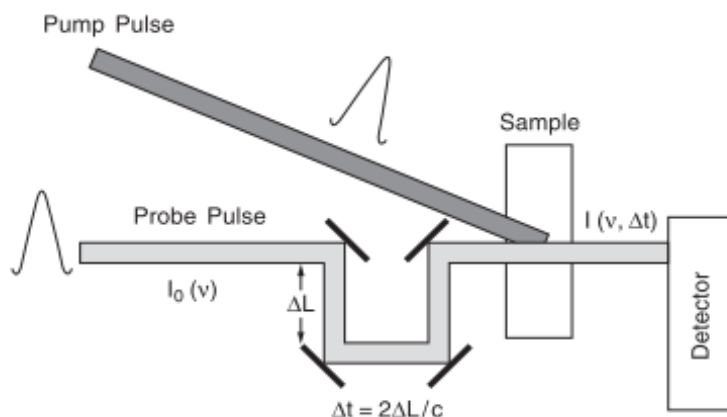
$$I(\nu, \Delta t) = I_0(\nu) * 10^{-\epsilon_\nu N(\Delta t)l} \quad (1.1)$$

Όπου ϵ_ν είναι ο συντελεστής απορροφητικότητας του δείγματος σε συχνότητα ν , $N(\Delta t)$ ο πληθυσμός που απορροφάει σε χρόνο Δt και συχνότητα ν και l η οπτική διαδρομή (το μήκος του δείγματος που διεγείρεται). Η οπτική πυκνότητα OD, δίνεται από τη σχέση:

$$OD(\nu, \Delta t) = \log \frac{I_0(\nu)}{I(\nu, \Delta t)} = \epsilon_\nu N(\Delta t)l \quad (1.2)$$

Στη σχέση (1.2) φαίνεται η εξάρτηση της οπτικής πυκνότητας από την συχνότητα (ν), καθώς και από τη μεταβολή του χρόνου (Δt). Η συσχέτιση αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη καταγραφή των φασμάτων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και των κινητικών συμπεριφορών του συστήματος σε διαφορετικά μήκη κύματος.

Μεταβολή της χρονικής καθυστέρησης μεταξύ των δύο παλμών αποδίδει την χρονοεξαρτώμενη μεταβολή της απορροφητικότητας. Ο παλμός άντλησης είναι μεγαλύτερης έντασης ώστε να προκαλέσει τη διέγερση του δείγματος, εν αντιθέσει με τον παλμό ανίχνευσης που επιδιώκεται μικρή ένταση δέσμης, ώστε να επηρεάσει όσο το δυνατό λιγότερο το δείγμα.



Σχήμα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής pump-probe. Παλμός «άντλησης» (pump) (σκούρο γκρι) και ο χρονικώς καθυστερημένος παλμός «ανίχνευσης» (probe) (ανοιχτό γκρι) [1].

Η μεταβολή που προκαλεί ο παλμός pump στο δείγμα μπορεί να αναλυθεί με δυο τρόπους με τη βοήθεια του παλμού probe: 1) συγκρίνοντας τα χαρακτηριστικά του παλμού probe (ένταση, φάση, διάνυσμα κύματος) αφού διέλθει από το δείγμα, πριν και μετά τη δράση του παλμού pump (τεχνική απορρόφησης με βάση το χρόνο) και 2) παρατηρώντας τυχόν νέες μεταβολές που προκαλούνται από τον παλμό probe πριν και μετά την επίδραση του παλμού pump (τεχνική σκέδασης Raman, για τεχνική φθορισμού επαγόμενο από λέιζερ (LIF), κλπ) [1].

1.4 Παλμός «Probe»

Το φασματικό εύρος του παλμού probe ποικίλει από εκτενές σε μονοχρωματικό. Οι παλμοί probe μεγάλου φασματικού εύρους χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις που δεν είναι γνωστή η ακριβής περιοχή απορρόφησης του συστήματος. Η παραγωγή των παλμών probe μεγάλου φασματικού εύρους λαμβάνονται: 1) από τη παραγωγή υπερσυνεχούς λευκού φωτός (white light super continuum generation) με εστίαση ενός παλμού υψηλής ισχύος σε ένα μέσο (υγρό, γυαλί, κλπ) προκαλώντας την φυσική διεργασία της αυτοδιαμόρφωσης φάσης (self-phase modulation-SPM) και 2) από τη χρήση ευρυφασματικού λέιζερ χρωστικών (broadband laser) μέσω ενισχυμένης αυθόρμητης εκπομπής (amplified spontaneous emission-ASE). Το φασματικό

εύρος της ενισχυμένης αυθόρμητης εκπομπής είναι μικρότερο σε σχέση με εκείνο του υπερσυνεχούς λευκού φωτός, αλλά εμφανίζει υψηλότερη ένταση. Στην περίπτωση της γένεσης ενισχυμένης αυθόρμητης εκπομπής, το σχήμα και η διάρκεια των παλμών probe που προκύπτουν, επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες άντλησης [1].

1.4.1 Αυτοδιαμόρφωση Φάσης (Self-Phase Modulation-SPM)

Η διάδοση ενός παλμού λείζερ σε ένα ιστροπικό μέσο μπορεί να περιγραφεί από την κυματοσυνάρτηση ενός επίπεδου κύματος:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} - \frac{n_0^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2}\right) E = \frac{4\pi}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} P^{(3)} \quad (1.3)$$

όπου:

$$E = E(z, t) \exp(ik_0 z - i\omega_0 t),$$

$$P^{(3)} = \chi^{(3)} |E|^2 E$$

και n_0 είναι ο γραμμικός δείκτης διάθλασης του μέσου. Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση του αργού μεταβαλλόμενου πλάτους, η εξίσωση (1.3) γίνεται:

$$\left(\frac{\partial}{\partial z} - \frac{n_0}{c} \frac{\partial}{\partial t}\right) E = -\frac{4\pi\omega_0^2}{i2k_0 c^2} \chi^{(3)} |E|^2 E \quad (1.4)$$

Η προσέγγιση αυτή υποθέτει επιπλέον μια στιγμιαία απόκριση του $\chi^{(3)}$, οπότε ισχύει $z' \equiv z + ct/n_0$ και $E = |E| \exp(i\varphi)$, άρα από την παραπάνω εξίσωση λαμβάνουμε τα εξής:

$$\frac{\partial |E|}{\partial z'} = 0$$

$$\frac{\partial \varphi}{\partial z'} = \frac{2\pi\omega_0^2}{k_0 c^2} \chi^{(3)} |E|^2 \quad (1.5)$$

Οπότε προκύπτει η λύση:

$$|E| = |E(t)| \quad (1.6)$$

$$\varphi(z, t) = \varphi_0 + \frac{2\pi\omega_0^2}{k_0 c^2} \chi^{(3)} |E(t)|^2 z \quad (1.7)$$

Η εξίσωση (1.6) υποδηλώνει ότι ο παλμός του λείζερ διαδίδεται στο μέσο χωρίς να προκληθεί κάποια παραμόρφωση στο σχήμα του παλμού, ενώ η εξίσωση (1.7) δείχνει ότι η επαγόμενη αλλαγή φάσης $\Delta\varphi(t) = \varphi(z, t) - \varphi_0$ αντιστοιχεί στην επιπρόσθετη μετατόπιση φάσης που παρατηρείται στο κύμα κατά την διάδοση του από το 0 έως το z , λόγω της παρουσίας του επαγόμενου δείκτη διάθλασης $\Delta n = (2\pi/n_0)\chi^{(3)}|E|^2$, και προκύπτει από την σχέση

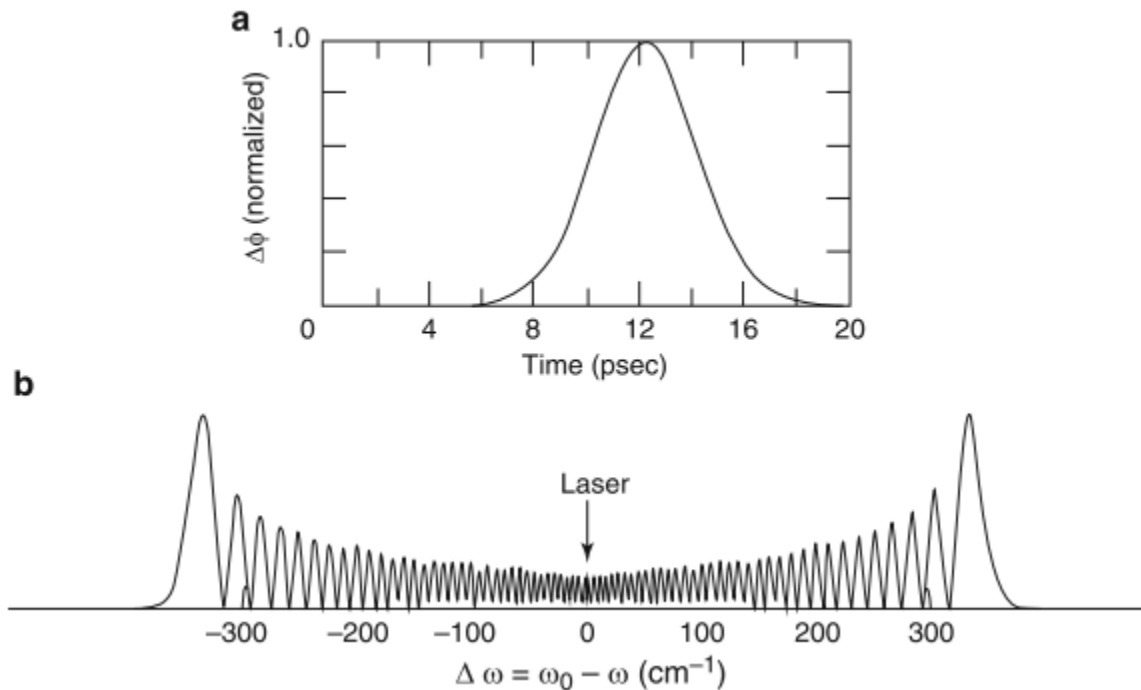
$\Delta\varphi = \left(\frac{\omega}{c}\right) \int_0^z \Delta n dz$. Δεδομένου ότι η συχνότητα του κύματος είναι $\omega = \omega_0 \left(\frac{\partial \Delta\varphi}{\partial t}\right)$, η διαμόρφωση φάσης $\Delta\varphi(t)$ οδηγεί σε μια διαμόρφωση συχνότητας:

$$\Delta\omega(t) = -\frac{\partial(\Delta\varphi)}{\partial t} = -\frac{2\pi\omega_0^2}{k_0 c^2} \chi^{(3)} \frac{\partial|E|^2}{\partial t} z \quad (1.8)$$

Κατά συνέπεια, το φάσμα του πεδίου με αυτοδιαμόρφωση φάσης αναμένεται να είναι διευρυμένο. Από τον μετασχηματισμό Fourier μπορεί να πραγματοποιηθεί ο υπολογισμός αυτού [20]:

$$|E(\omega)|^2 = \left| \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} E(t) e^{-i\omega_0 t + i\omega_0 t} dt \right|^2 \quad (1.9)$$

Από έναν παλμός 4.5 ps (picosecond), με προφίλ Gauss, ο οποίος διαδίδεται σε ένα μη γραμμικό μέσο, το οποίο αποδίδει μια αυτοδιαμόρφωση φάσης με μέγιστη διαμόρφωση φάσης $\Delta\varphi_{max} = 72\pi$ rad, προκύπτει ένα φάσμα με διεύρυνση μερικών εκατοντάδων cm^{-1} με μια ψευδο-περιοδική ταλάντωση. Το σχήμα του παλμού με αυτοδιαμόρφωση φάσης σε σχέση με το χρόνο, καθώς και το προκύπτον φάσμα του παλμού απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχ. 1.5):



Σχήμα 1.3: Θεωρητικό φάσμα που λαμβάνεται ως αποτέλεσμα στιγμιαίας απόκρισης του δείκτη διάθλασης στη μεταβολή της έντασης $|E(t)|^2$, έτσι ώστε η διαμόρφωση φάσης $\Delta\varphi(t)$ να είναι ανάλογη του $|E(t)|^2$. α) Διαμόρφωση φάσης $\Delta\varphi$ έναντι της διάρκειας του παλμού t , β) φάσμα του παλμού που έχει υποστεί αυτοδιαμόρφωση φάσης [20].

Το φάσμα είναι συμμετρικό ως προς την εισερχόμενη συχνότητα λείζερ, όπως συμμετρικός είναι και ο παλμός αυτοδιαμόρφωσης φάσης. Το αρχικό τμήμα του παλμού με αυτοδιαμόρφωση φάσης είναι υπεύθυνο για την διεύρυνση Stokes ενώ το τελικό τμήμα είναι υπεύθυνο για την διεύρυνση Anti-Stokes. Η δομή του φάσματος γίνεται πιο κατανοητή αν παρατηρηθεί προσεκτικά η καμπύλη της αυτοδιαμόρφωσης φάσης που έχει σχήμα «καμπάνας». Η ύπαρξη συμμετρίας έχει σαν αποτέλεσμα αντιδιαμετρικά σημεία να έχουν την ίδια κλίση, με εξαίρεση την περίπτωση του σημείου καμπής. Δεδομένου ότι $\frac{\partial\varphi}{\partial t} = -\omega$ τα αντιδιαμετρικά αυτά σημεία περιγράφουν κύματα ακτινοβολίας ίδιας συχνότητας, αλλά διαφορετικής φάσης. Από την συμβολή των κυμάτων αυτών προκύπτει ενισχυτική συμβολή αν η διαφορά φάσης, $\Delta\varphi_{12}$, είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του 2π , ενώ καταστρεπτική εάν το $\Delta\varphi_{12}$ είναι περιττό πολλαπλάσιο του π . Η απεικόνιση του είδους της συμβολής στο φάσμα γίνεται μέσω κορυφών και κοιλάδων. Τα σημεία καμπής όπου εμφανίζεται η μέγιστη κλίση εμφανίζονται στις δύο εξώτατες κορυφές για τις οποίες ισχύει $|\omega_{max}| \sim \left| \frac{\partial\varphi}{\partial t} \right|_{max}$. Ο αριθμός των κορυφών του φάσματος προκύπτει από το φ_{max} , από το οποίο, επίσης, υπολογίζεται ο αριθμός των ζευγών ενισχυτικών και καταστροφικών συμβολών ή, αλλιώς, το $N \sim \varphi_{max}/2\pi$ για κάθε πλευρά του φάσματος. Λόγω του γεγονότος ότι το $\Delta\varphi(t)$ είναι ανάλογο του $|E(t)|^2$ και του ότι ο παλμός είναι συμμετρικός [20] το διευρυμένο φάσμα έχει συμμετρία Stokes–Anti–Stokes.

1.5 Παλμός «Pump»

Η διέγερση των υπό μελέτη μορίων απαιτεί ισχυρούς παλμούς άντλησης (pump). Η γένεση συνεχούς (continuum generation) λευκού φωτός δεν ενδείκνυται για τη χρήση ως παλμός pump λόγω αδυναμίας παροχής υψηλής ενέργειας. Συνεπώς, γίνεται χρήση μη γραμμικών κρυστάλλων για την παραγωγή παλμών διαφορετικών μηκών κύματος, και συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη μέσω του φαινομένου της γένεση 2^{ης} αρμονικής[1].

1.5.1 Γένεση Δεύτερης Αρμονικής

Η μη γραμμική πόλωση, που επάγεται σε ένα άτομο ή μόριο δρα ως μια πηγή νέων κυμάτων με συχνότητες $\omega = \omega_1 \pm \omega_2$, με το ω_1 και το ω_2 να αντιστοιχούν στις κυκλικές συχνότητες των συνιστωσών του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, οι οποίες προκύπτουν από την διάδοση του πεδίου στο μη γραμμικό μέσο. Οι συχνότητες (ω) έχουν ταχύτητα φάσης

$v_{ph} = \omega/k = c/n(\omega)$. Οι μικροσκοπικές συνιστώσες που δημιουργούνται από τα άτομα σε διαφορετικές θέσεις (x, y, z) στο μη γραμμικό μέσο, προστίθενται σε ένα μακροσκοπικό κύμα με σημαντική ένταση, μόνο εάν τα διανύσματα των ταχυτήτων φάσης των προσπιπτόντων επαγόμενων κυμάτων και τα κύματα πόλωσης ταιριάζουν κατάλληλα. Αυτή η συνθήκη ταύτισης φάσης (phase-matching condition) γράφεται ως εξής:

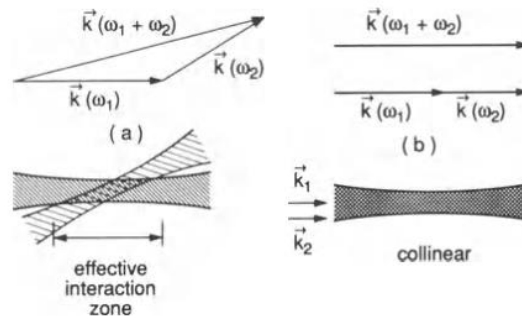
$$k = (\omega_1 \pm \omega_2) = k(\omega_1) \pm k(\omega_2) \quad (1.10)$$

και μπορεί να ερμηνευτεί ως η διατήρηση της ορμής για τα 3 φωτόνια που συμμετέχουν στην διαδικασία ανάμειξης [18], [19].

Η συνθήκη ταύτισης φάσης απεικονίζεται στο Σχήμα 1.6. Εάν οι γωνίες μεταξύ των τριών διανυσμάτων κύματος είναι εξαιρετικά μεγάλες η περιοχή αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των εστιασμένων δεσμών μειώνεται προκαλώντας αντίστοιχη μείωση στην απόδοση της γένεσης συχνοτήτων αθροίσματος και διαφοράς. Η μέγιστη αλληλοεπικάλυψη επιτυγχάνεται κατά την παράλληλη διάδοση των τριών κυμάτων, δηλαδή $k_1 \parallel k_2 \parallel k_3$, και δεδομένου ότι $c/n = \omega/k$ και $\omega_3 = \omega_1 \pm \omega_2$ προκύπτει η συνθήκη:

$$n_3 \omega_3 = n_1 \omega_1 \pm n_2 \omega_2 \Rightarrow n_3 = n_1 = n_2 \quad (1.11)$$

για τους δείκτες διάθλασης n_1 , n_2 και n_3 .



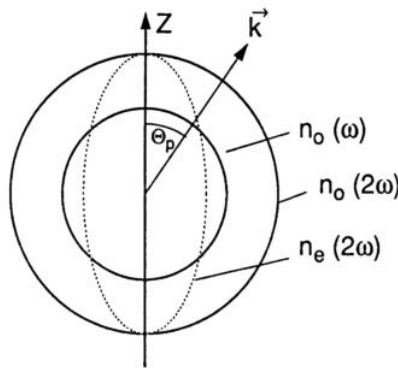
Σχήμα 1.6: Συνθήκη ταύτισης φάσης (phase matching condition) α) για μη παράλληλη και β) για παράλληλη διάδοση των τριών κυμάτων [19].

Η συνθήκη ταύτισης φάσης σε ένα μέσο που έχει διασπορά μπορεί να επιτευχθεί με διπλοθλαστικούς κρυστάλλους, οι οποίοι διαθέτουν δυο διαφορετικούς δείκτες διάθλασης n_o και n_e για τα τακτικά και τα έκτακτα κύματα, αντίστοιχα. Ο τακτικός δείκτης διάθλασης n_o δεν εξαρτάται από την κατεύθυνση διάδοσης του κύματος (k) και από το διάνυσμα της πόλωσης (E) ενώ ο έκτακτος δείκτης διάθλασης εξαρτάται και από τα δυο.

Στην περίπτωση της γένεσης δεύτερης αρμονικής (Second Harmonic Generation-SHG) έχουμε την υπόθεση $\omega_1 = \omega_2 = \omega$ και η συνθήκη ταύτισης φάσης γίνεται:

$$k(2\omega) = 2k(\omega) \Rightarrow v_{ph}(2\omega) = v_{ph}(\omega) \quad (1.12)$$

από όπου προκύπτει ότι οι ταχύτητες φάσης του εισερχόμενου κύματος και του κύματος δεύτερης αρμονικής είναι ίσες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί σε μια συγκεκριμένη κατεύθυνση θ_p σε σχέση με τον οπτικό άξονα, στην οποία ο έκτακτος δείκτης διάθλασης, $n_e(2\omega)$, για το κύμα δεύτερης αρμονικής, ισούται με τον τακτικό δείκτη διάθλασης, $n_o(\omega)$, του θεμελιώδους κύματος σε έναν αρνητικό διπλοθλαστικό κρύσταλλο με έναν άξονα (Σχ. 1.7).

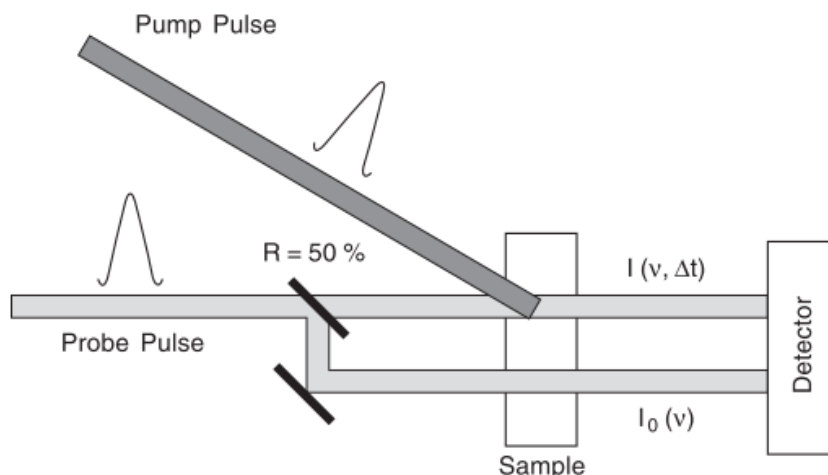


Σχήμα 1.7: Ταύτιση τιμών δείκτη διάθλασης για τη γένεση δεύτερης αρμονικής σε ένα αρνητικό διπλοθλαστικό κρύσταλλο με μόνο έναν άξονα [19].

Όταν το εισερχόμενο κύμα διαδίδεται στην κατεύθυνση θ_p μέσα στο κρύσταλλο, οι τοπικές συνεισφορές της επαγόμενης μη γραμμικής πόλωσης $P(2\omega, r)$ προστίθενται σε φάση και προκύπτει μακροσκοπικό κύμα δεύτερης αρμονικής με συχνότητα 2ω . Η κατεύθυνση πόλωσης του κύματος, αυτού, δεύτερης αρμονικής είναι ορθογώνια ως προς αυτή του θεμελιώδους κύματος [19].

1.6 Καταγραφόμενο σήμα

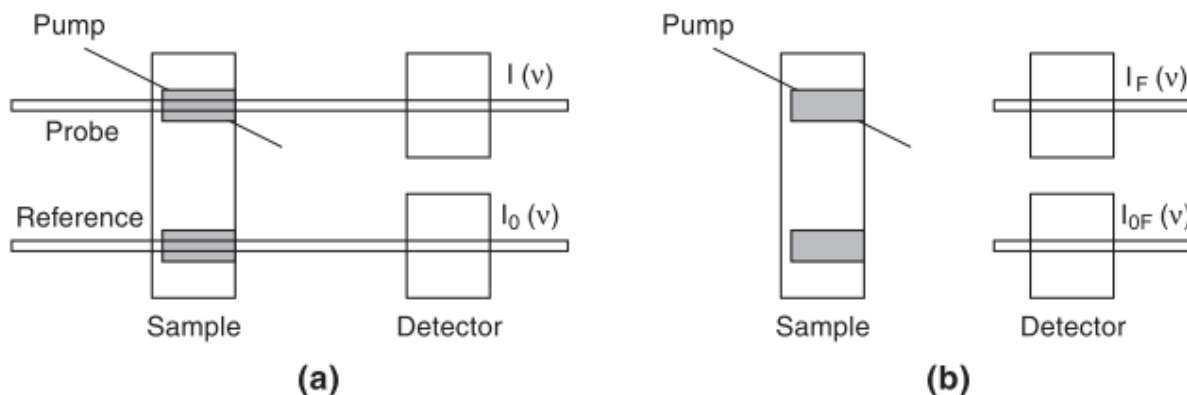
Η οπτική πυκνότητα (OD) ορίζεται ως ο λογαριθμικός λόγος της έντασης του παλμού πριν και μετά το διαταραγμένο δείγμα. Η ευαισθησία της μέτρησης ενισχύεται με την ταυτόχρονη καταγραφή της φασματικής κατανομής του παλμού probe παρουσία και απουσία της διαταραχής του συστήματος. Η ενίσχυση αυτή επιτυγχάνεται με τη διαίρεση της δέσμης probe, σε δύο δέσμες, όπως φαίνεται (Σχ. 1.8).



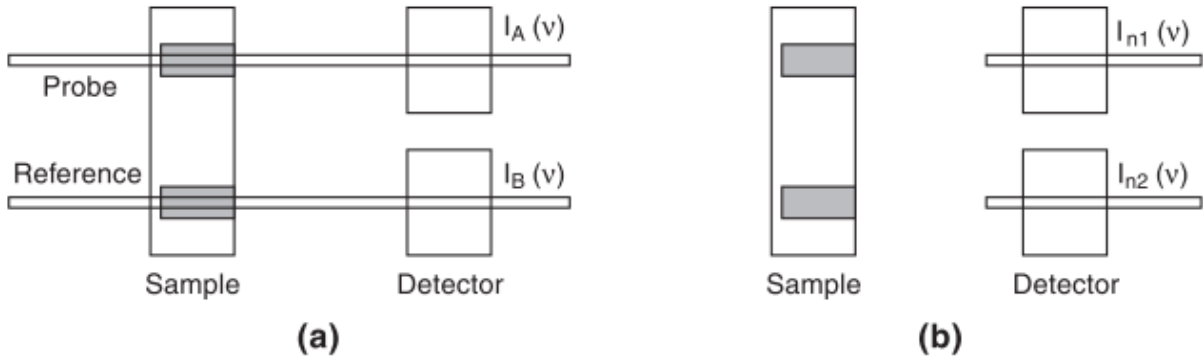
Σχήμα 1.8: Pump-probe πείραμα διπλής δέσμης [1].

Η δέσμη του αναλύτη, που συμπίπτει με τη δέσμη άντλησης, διασχίζει μια διαταραγμένη περιοχή του δείγματος, ενώ η δέσμη αναφοράς διασχίζει μια μη διαταραγμένη περιοχή. Οι δυο δέσμες καταγράφονται από κάμερα CCD (Charged Coupled Devices) [1].

Η άμεση καταγραφή της αναλογίας $I_0(v)/I(v, \Delta t)$ αυξάνει την ευαισθησία της μέτρησης. Η καταγραφή επιπλέον σημάτων, όπως παράσιτη ακτινοβολία, ηλεκτρονικός θόρυβος, φθορισμός, κ.α επιτρέπουν τη διόρθωση της οπτικής πυκνότητας. Στα σχήματα 1.9 και 1.10 απεικονίζεται η καταγραφή των επιπλέον σημάτων.



Σχήμα 1.9: α) Καταγραφή των σημάτων της δέσμης probe και της δέσμης αναφοράς (reference) παρουσία της δέσμης pump β) Καταγραφή της εκπομπής φθορισμού κατόπιν άντλησης του δείγματος [1].



Σχήμα 1.10: α) Καταγραφή σημάτων που επιτρέπουν τη διόρθωση των φασματικών διαφορών μεταξύ της δέσμης probe και της δέσμης αναφοράς απουσία διέγερσης β) Καταγραφή του θορύβου (φως περιβάλλοντος και ηλεκτρονικός θόρυβος) [1].

Οι ποσότητες που καταγράφονται είναι οι εξής:

- $I(v)$ και $I_0(v)$, που αντιστοιχούν στη φασματική κατανομή των καταγεγραμμένων σημάτων παρουσία των παλμών pump, probe και αναφοράς στο δείγμα (Σχ. 1.9 α).
- $I_F(v)$ και $I_{0F}(v)$, που αντιστοιχούν στις φασματικές κατανομές των καταγεγραμμένων σημάτων παρουσία του παλμού pump και απουσία των παλμών probe και αναφοράς (Σχ. 1.9 β). Στην περίπτωση, αυτή, ο ανιχνευτής καταγράφει την εκπομπή του δείγματος και τον θόρυβο.
- $I_A(v)$ και $I_B(v)$, που αντιστοιχούν στις φασματικές κατανομές των καταγεγραμμένων σημάτων απουσία του παλμού pump και παρουσία των παλμών probe και αναφοράς (Σχ. 1.10 α). Στην περίπτωση αυτή ο ανιχνευτής καταγράφει τις φασματικές κατανομές της δέσμης probe και της δέσμης αναφοράς που υπερκαλύπτονται από το θόρυβο.
- $I_{n1}(v)$ και $I_{n2}(v)$, που αντιστοιχούν σε καταγεγραμμένα σήματα απουσία όλων των παλμών (Σχ. 1.10β). Σε αυτή την περίπτωση οι ανιχνευτές καταγράφουν μόνο ηλεκτρονικό και περιβαλλοντικό θόρυβο.

Με βάση τις πιο πάνω ποσότητες που καταγράφονται για μια συγκεκριμένη καθυστέρηση μεταξύ δέσμης pump και δέσμης probe (Δt), η οπτική πυκνότητα, διορθωμένη από τη παράσιτη ακτινοβολία και τις πιθανές αλλαγές στην φασματική κατανομή, υπολογίζεται από την σχέση [1]:

$$OD(v, \Delta t) = \log \left(\frac{I_0(v) - I_{0F}(v)}{I(v) - I_F(v)} \right) \left(\frac{I_B(v) - I_{n2}(v)}{I_A(v) - I_{n1}(v)} \right) \quad (1.13)$$

1.7 Βιβλιογραφία

- [1] Rulliere, C. Femtosecond Laser Pulses Principles and Experiments. Springer. New York. USA. (2005).
- [2] Dantus, M., Gross, P. (1998). Ultrafast Spectroscopy. Encyclopedia of Applied Physics, 22, 431-456. [https://doi.org/10.1016/S0030-4018\(98\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S0030-4018(98)00086-8).
- [3] Zewail, A. H. (2000). Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical Bond. The Journal of Physical Chemistry A, 104 (24), 5660-5694. <https://doi.org/10.1021/jp001460h>.
- [4] Arrhenius, S. (1887). Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Z. Phys. Chem. (Leipzig), 4, 226.
- [5] Eyring, B. H., Polanyi, M. (1931). On Simple Gas Reactions. Z. Phys. Chem. 227, 1221-1245. <https://doi.org/10.1524/zpch.2013.9023>.
- [6] Laidler, K. J. (1987). Chemical Kinetics, Pearson Ottawa, Canada.
- [7] Van 't Hoff, M. J. H. (1884). Etudes de dynamique chimique. p 333-336.
- [8] Abraham, H., Lemoine, T. (1899). Disparition instantanée du phénomène de Kerr. Compt. Rend. (Paris), 129, 206.
- [9] Eigen, M. (1954). Methods for Investigation of Ionic Reactions in Aqueous Solutions with Half-Times as Short as 10^{-9} sec, M. Discuss. Faraday Soc., 17, 194.
- [10] Norrish, R. G. W., Porter, G. (1949). Chemical Reactions Produced by Very High Light Intensities. Nature, 164, 658.
- [11] Maiman, T. H. (1960) Stimulated Optical Radiation in Ruby. Nature. 493-494.
- [12] Hellwarth, R.W. (1961) Control of fluorescent pulsations, in Advances in Quantum Electronics, R. Singer, Ed., New York Columbia University Press, pp. 334-341.
- [13] De Maria, A. J., Stetser, D. A., Heynau, H. (1966). Self mode-locking of lasers with saturable absorbers, 174, 74-77. <https://doi.org/10.1063/1.1754541>.
- [14] Shank, C. V, Ippen, E. P. (1978). Subpicosecond kilowatt pulses from a modelocked cw dye laser Subpicosecond kilowatt pulses from a mode-locked cw dye laser, 373 (1974), 26-29. <https://doi.org/10.1063/1.1655222>.
- [15] Spence, D. E., Kean, P. N., Sibbett, W. (1991). 60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti : sapphire laser, 16 (1), 42-44.

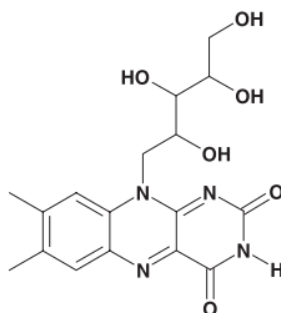
- [16] Pshenichnikov, M. S., Wiersma, D. A. (1998). Amplitude and phase characterization of 4.5-fs pulses by frequency-resolved optical gating, 23 (18), 1474-1476.
- [17] Papadogiannis, N. A., Witzel, B., Kalpouzos, C., Charalambidis, D. (1999). Observation of attosecond light localization in higher order harmonic generation. Physical Review Letters, 83 (21), 4289-4292. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.83.4289>.
- [18] Hentschel, M., Kienberger, R., Spielmann, C., Reider, G. A., Milosevic, N., Brabec, T., Krausz, F. (2001). Attosecond metrology. Nature, 414 (6863), 509-513. <https://doi.org/10.1038/35107000>.
- [19] Demtröder W. Laser Spectroscopy: Basic Concepts and Instrumentation, Springer, New York, USA, (1996).
- [20] Alfano R. R. The Supercontinuum Laser Source: The Ultimate White Light, Springer, New York, USA, (2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Θεωρητικό Υπόβαθρο Φλαβινών

2.1 Φλαβίνες

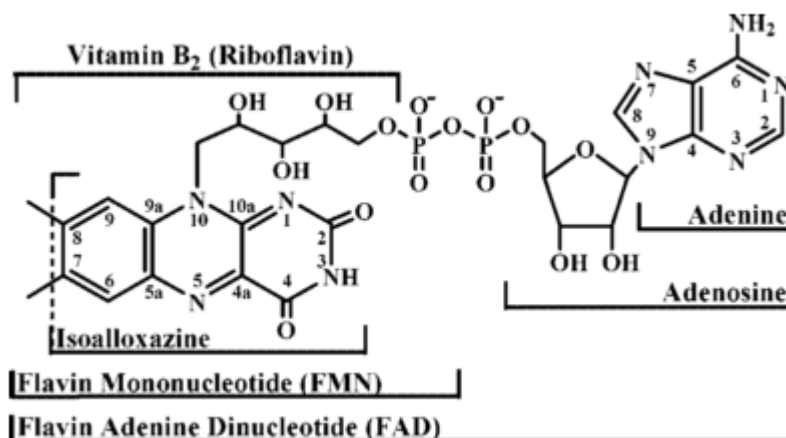
Ο όρος φλαβίνη προέρχεται από τη λατινική λέξη *flavus*, που σημαίνει κίτρινο, και χαρακτηρίζει οργανικές ενώσεις κίτρινου χρώματος με βασική δομή την 7,8-διμεθυλο-10-άλκυλο ισοαλλοξαζίνη. Η ριβοφλαβίνη (Riboflavin, RF), το όνομα της οποίας οφείλεται στην πλευρική αλυσίδα ριβιτόλη (ribityl), αποτελεί την πρόδρομη ένωση των φλαβινών. Αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1879 ως λακτοφλαβίνη (lactochrome), λόγω της απομόνωσης της από το γάλα αγελάδας [1]. Στις αρχές της δεκαετίας του 1930 αναγνωρίστηκε ότι η ριβοφλαβίνη είναι βασικό συστατικό του συμπλόκου της βιταμίνης Β. Η δομή της ριβοφλαβίνης αποσαφηνίστηκε κατά τη διάρκεια πειραμάτων στην προσπάθεια της χημικής σύνθεσης της ένωσης (Σχ. 2.1) [2], [3], [4].



Σχήμα 2.1: Χημική δομή της Ριβοφλαβίνης [4].

Οι φλαβίνες αποτελούν συμπαραγόντες ή φωτουπόδοχείς ενζύμων λειτουργώντας ως δέκτες και δότες ηλεκτρονίων στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις κατάλυσης. Συναντώνται σε ιστούς διαφόρων οργανισμών κατά κύριο λόγο με τη μορφή συμπαραγόντων σε ένζυμα ενώ μικρό είναι το ποσοστό των ελεύθερων φλαβινών. Το φλάβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (Flavin Adenine Dinucleotide-FAD) και φλάβινο-μονονουκλεοτιδίου (Flavin Mononucleotide-FMN) που λειτουργούν και ως συμπαραγόντες (Σχ. 2.2) χαρακτηρίζονται ως νουκλεοτίδια,

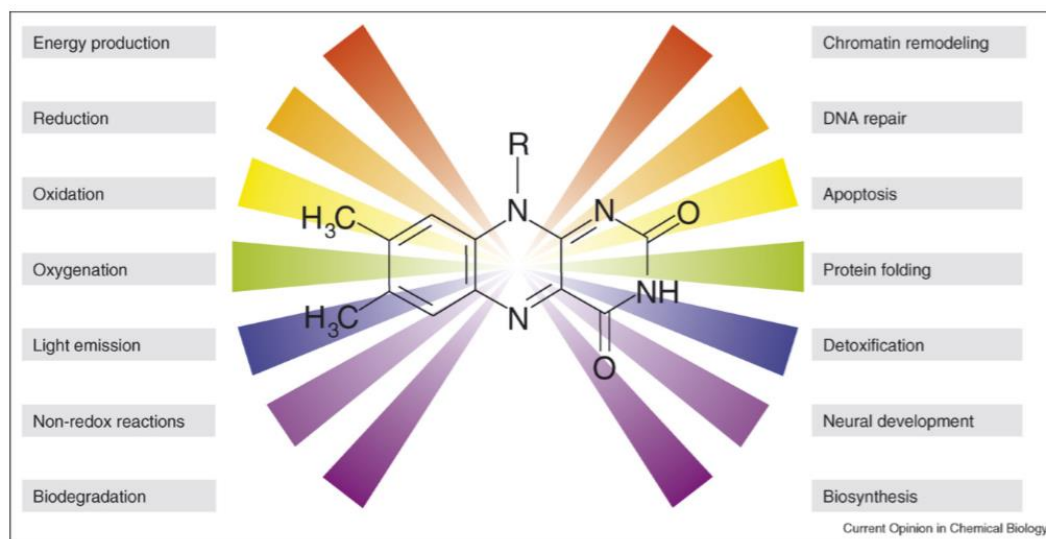
παραβλέποντας την απουσία γλυκοζιτικού δεσμού, δηλαδή δεσμού N-C-O, μεταξύ της αλυσίδας της ριβιτόλης και του αζώτου 10 (N10) της φλαβίνης [4].



Σχήμα 2.2: Χημική δομή του φλάβινο-μονονουκλεοτιδίου (FMN) και του φλάβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (FAD) [5].

2.2 Φλαβοένζυμα

Τα φλαβοένζυμα διαθέτουν ως συμπάραγοντα¹ φλαβίνη και συμμετέχουν σε πληθώρα βιολογικών διαδικασιών (Σχ. 2.3), όπως ο αερόβιος μεταβολισμός, κατά τον οποίο καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ενός και δυο ηλεκτρονίων.



Σχήμα 2.3: Βιολογικές λειτουργίες φλαβοενζύμων [6].

¹Ένωση που υπάρχει στα ένζυμα και είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους

Οι καταλυτικές αντιδράσεις των φλαβοενζύμων περιλαμβάνουν δυο ξεχωριστές ημι-αντιδράσεις: μια ημι-αντίδραση αναγωγής κατά την οποία μεταφορά ενός ή δύο ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα προκαλεί αναγωγή της φλαβίνης και μια ημι-αντίδραση οξειδωσης στην οποία η ανηγμένη φλαβίνη οξειδώνεται μεταφέροντας ένα ή δύο ηλεκτρόνια στο υπόστρωμα. Με βάση το είδος του υποστρώματος που συμμετέχει στις ημι-αντιδράσεις οξειδωσης ή αναγωγής, αντίστοιχα, ο Hemmerich πρότεινε, το 1977, ένα σύστημα κατηγοριοποίησης που διακρίνεται σε πέντε τάξεις φλαβοενζύμων [4]:

1. Τρανσυδρογονάσες (Transhydrogenase), που καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων, μέσω μεταφοράς δύο υδρογόνων, από ένα οργανικό υπόστρωμα σε ένα δεύτερο.
2. Αφυδρογονάσες-οξειδάσες (Dehydrogenase-Oxidase), στις οποίες δυο ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην φλαβίνη από ένα οργανικό υπόστρωμα και, στη συνέχεια, η οξείδωση της φλαβίνης ανάγει το μοριακό οξυγόνο (O_2) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).
3. Αφυδρογονάσες-μονοοξυγονάσες (Dehydrogenase-Monooxygenase), στις οποίες η φλαβίνη ανάγεται γενικά από ένα ανηγμένο νουκλεοτίδιο πυριδίνης και κατά την οξείδωση της με οξυγόνο (O_2), παρουσία ενός συνυποστρώματος, το ένα άτομο οξυγόνου δεσμεύεται από το συνυπόστρωμα και το άλλο ανάγεται σε νερό (H_2O).
4. Αφυδρογονάσες-τρανσφεράσες ηλεκτρονίου (Dehydrogenase-electron Transferase), στις οποίες η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων, από το υπόστρωμα, ανάγει τη φλαβίνη η οποία, ακολούθως, οξειδώνεται προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο τη φορά, στους αποδέκτες.
5. Τρανσφεράσες ηλεκτρονίου (electron Transferase), στις οποίες η φλαβίνη ανάγεται και επαναοξειδώνεται με βήματα ενός ηλεκτρονίου.

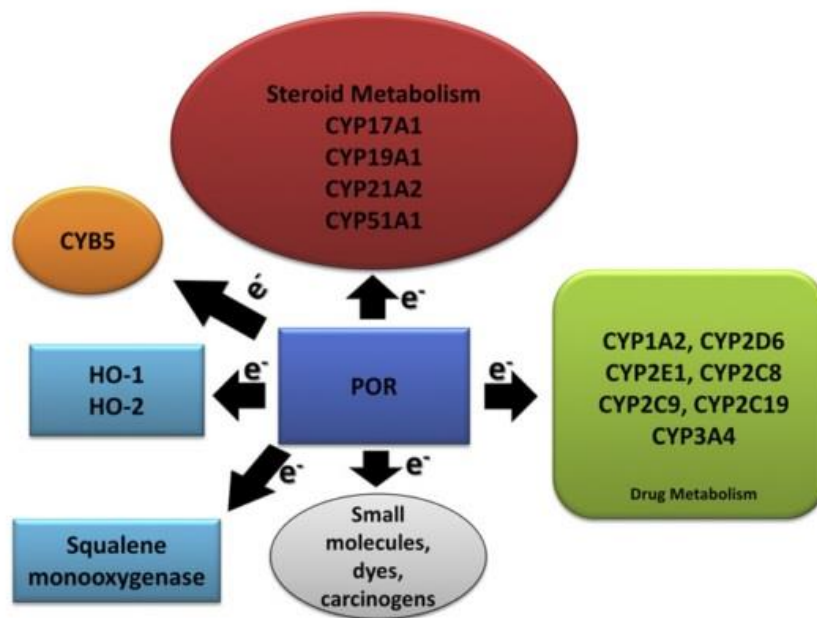
Οι ημι-αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής ενδέχεται να οδηγούν στη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου ή δυο ηλεκτρονίων, στον καταλυτικό κύκλο, κατηγοριοποιώντας τα φλαβοένζυμα με βάση το λόγο m/n , όπου m είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταφέρονται στην αναγωγική και n στην οξειδωτική ημι-αντίδραση. Οι προκύπτουσες κατηγορίες αντιστοιχούν σε τιμές $1/1$, $1/2$, $2/1$, $2/2$ ωστόσο, έως σήμερα, δεν έχουν καταγραφεί, ένζυμα της κατηγορίας $1/2$ (Πίνακας 2.1) [7].

Πίνακας 2.1: Κατηγοριοποίηση m/n και αναδιάταξη της κατηγοριοποίησης με βάση τα υποστρώματα και τις αντιδράσεις [7].

Classification	Example [a]
Class 2/2	Transhydrogenase
	Glutathione reductase
	NADPH-thioredoxin reductase
	Lipoamide dehydrogenase
	d-Lactate dehydrogenase
	Dehydrogenase / oxidase
	d-Amino acid oxidase
	Glucose oxidase
	Glycolate oxidase
	Acyl-CoA oxidase
	Dehydrogenase / oxygenase
	p-Hydroxybenzoate hydroxylase
	Phenol hydroxylase
	Bacterial luciferase
Class 2/1	Dehydrogenase / electron-transferase
	Acyl-CoA dehydrogenase
	NADPH-cytochrome P450 reductase
Class 1/1	Ferredoxin-NADP reductase
	Pure electron-transferase
	Flavodoxin
	DNA photolyase
	Electron-transferring flavoprotein

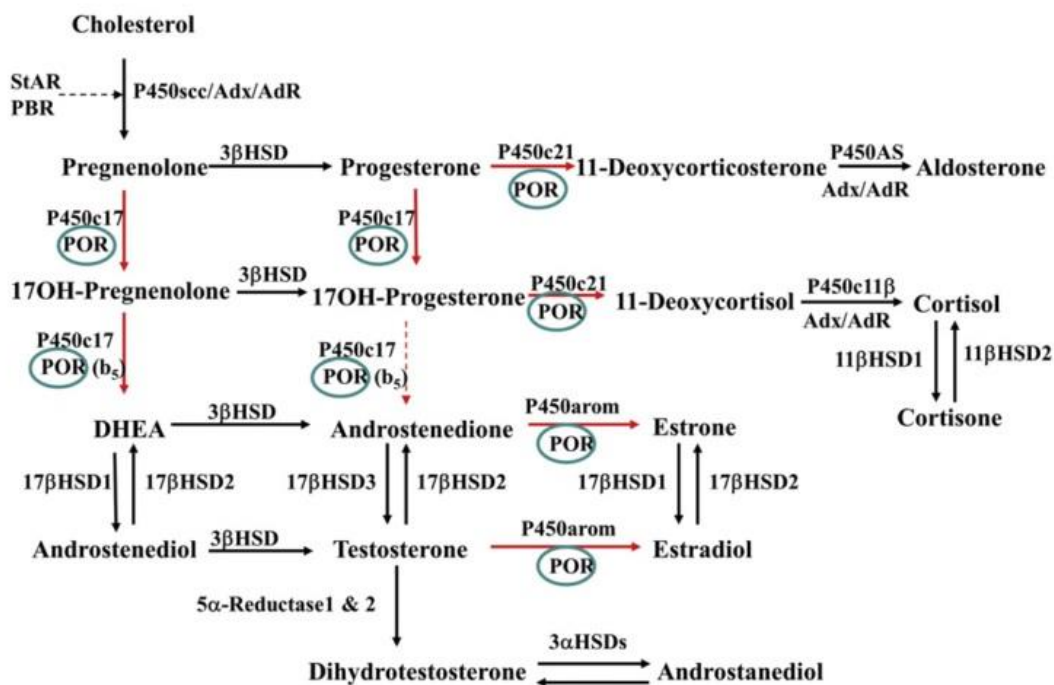
Στην κατηγορία 2/1, η φλαβίνη λαμβάνει δύο ηλεκτρόνια και, στη συνέχεια, οξειδώνεται προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο τη φορά. Την παρούσα μελέτη απασχόλησε η λειτουργία του ενζύμου, οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος P450 (POR), το οποίο ευρίσκεται στα ζώα και στα φυτά [8]. Η οικογένεια των οξειδοαναγωγών διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στα βιολογικά συστήματα καθώς τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών, ελέγχοντας κυτταρικές διεργασίες, ζωτικής σημασίας, όπως η μετατροπή της ενέργειας της φωτοσύνθεσης και η αναπνοή.

Η οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος P450 (POR) διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στον μεταβολισμό των φαρμάκων και των στεροειδών, παρέχοντας ηλεκτρόνια σε διάφορες βιοχημικές οδούς (Σχ. 2.4).



Σχήμα 2.4: Η εμπλοκή του POR σε διάφορες βιοχημικές οδούς [9].

Η δράση του POR βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων στις πρωτεΐνες του κυτοχρώματος P450, στο κυτόχρωμα b5, στις αιμοξυγενάσες, στην σκουαλενική μονοοξυγενάση και άλλα μικρά μόρια. Ακόμη, πραγματοποιεί την υδροξυλίωση φαρμάκων, σημαντική για το μεταβολισμό τους. Καθοριστικός είναι ο ρόλος του ενζύμου στην ανάπτυξη των γενετικών οργάνων των δύο φύλων. Η τεστοστερόνη και η διυδροτεστοστερόνη συντίθενται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων που απαιτούν το POR. Απουσία των δυο στεροειδών οδηγεί στην ανάπτυξη των γυναικείων γενετικών οργάνων, ενώ η παρουσία τους οδηγεί στην ανάπτυξη των ανδρικών γενετικών οργάνων. Στο Σχήμα 2.5 φαίνονται οι βασικές βιοσυνθετικές οδοί στεροειδών, που απαιτούν την ύπαρξη του POR:



Σχήμα 2.5: Βιοσυνθετική οδός στεροειδών [9].

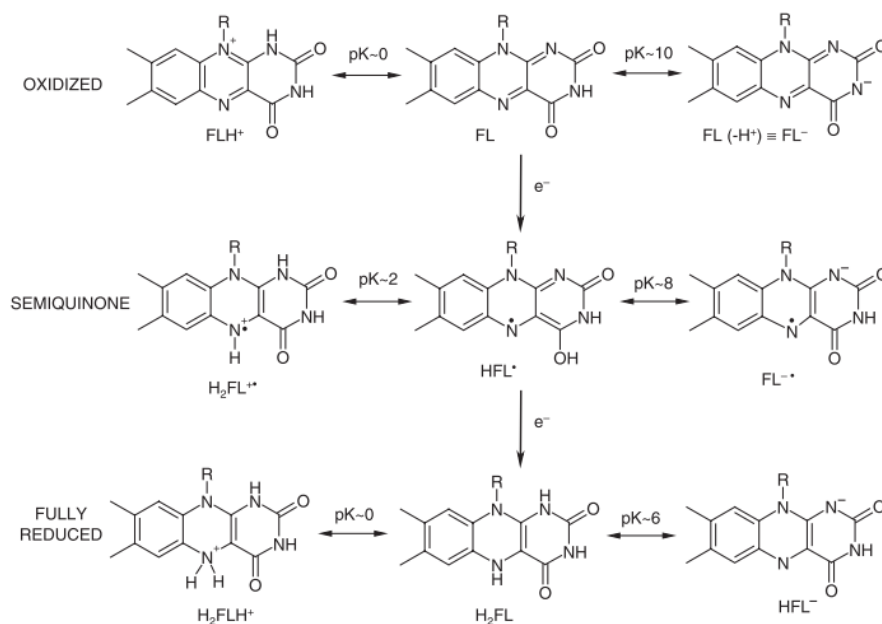
Έχουν καταγραφεί αρκετές περιπτώσεις μετάλλαξης της οξειδοαναγωγής του κυτοχρώματος P450, αρκετές από τις οποίες σχετίζονται με σοβαρές ασθένειες. Δυσλειτουργία του POR προκαλεί σκελετικές δυσπλασίες, όπως είναι το ωλένιο κύρτωμα (το κόκκαλο της ωλένης έχει κλίση), η κλίση του μηριαίου οστού (τα κόκαλα του ποδιού αποκλίνουν) και η κρανιοσυνόστωση (τα κόκαλα του κρανίου είναι ενωμένα και υπάρχει παραμόρφωση στο πρόσωπο) και ασθένειες που σχετίζονται με τα γενετικά όργανα, όπως οι πολυκιστικές ωοθήκες, η αμηνόρροια, καθώς και η γέννηση μεσοφυλικών ατόμων, ατόμων, δηλαδή, με γυναικεία και αντρικά γενετικά όργανα [9].

2.3 Ιδιότητες των Φλαβινών

Το δυναμικό οξειδοαναγωγής της φλαβίνης με αναγωγή δυο ηλεκτρονίων ανέρχεται στα -200 mV. Η τιμή αυτή ποικίλει στις φλαβοπρωτεΐνες από -400 mV έως +60 mV, εξαιτίας του κρίσιμου ρόλου του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος στις ιδιότητες των φλαβινών. Γενικά, η ύπαρξη ενός θετικού φορτίου στο περιβάλλον της φλαβίνης αναμένεται να αυξάνει το δυναμικό, ενώ η ύπαρξη ενός αρνητικού φορτίου ή ενός υδρόφιλου περιβάλλοντος αναμένεται να το μειώνει. Η

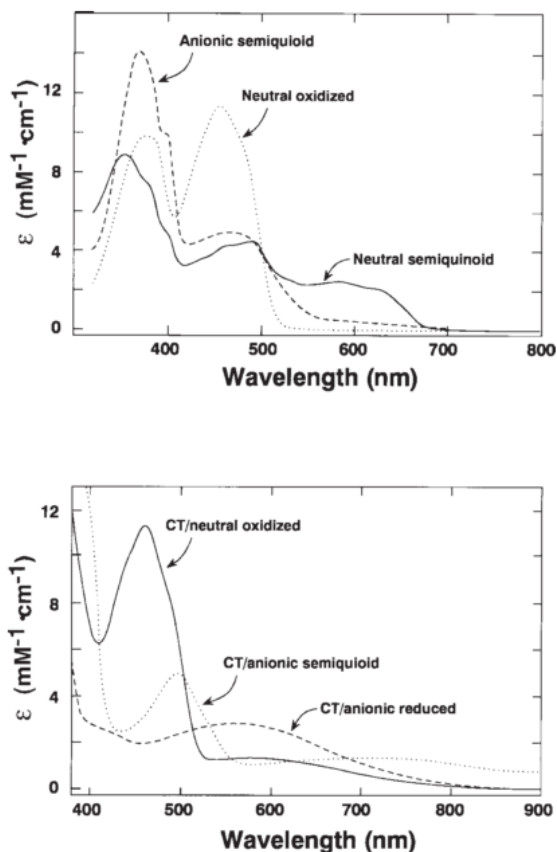
ομοιοπολική σύνδεση του συμπράγοντα FAD στις φλαβοπρωτεΐνες οδηγεί στην αύξηση της οξειδωτικής ισχύς της φλαβίνης [10].

Τα μόρια φλαβίνης εμφανίζουν τρεις διαφορετικές οξειδοαναγωγικές καταστάσεις: την οξειδωμένη, την ημικινόνη (ανηγμένη κατάσταση ενός ηλεκτρονίου) και την πλήρως ανηγμένη (ανηγμένη κατάσταση δύο ηλεκτρονίων). Οι φλαβίνες έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων, ατόμων υδρογόνου και υδρογονούχων ιόντων. Η ικανότητα των φλαβινών να συμμετέχουν πέρα από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ενός σταδίου, σε κλιμακωτές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις επιτρέπει την αλληλεπίδραση των φλαβοενζύμων με πληθώρα υποστρωμάτων, έναντι άλλων ενζύμων [4]. Η ισορροπία μεταξύ των διαφόρων μορφών της ελεύθερης φλαβίνης (μη δεσμευμένες στο ένζυμο) σε διάλυμα, εξαρτάται από το pH (Σχ. 2.6) [11], [12].



Σχήμα 2.6: Οξειδοαναγωγικές και οξεο-βασικές ισορροπίες φλαβινών [4].

Το κίτρινο χρώμα που χαρακτηρίζει τις φλαβίνες αντιστοιχεί στην οξειδωμένη μορφή της ένωσης, η οποία επικρατεί σε διαλύματα με pH 5-10, που χαρακτηρίζει μεγάλο εύρος των ουδέτερων βιολογικών διαλυμάτων. Η εμφάνιση χαρακτηριστικών χρωμάτων από την αλληλεπίδραση της φλαβίνης με το υπόστρωμα οφείλεται σε μεταπτώσεις μεταξύ των σχηματιζόμενων ηλεκτρονιακών καταστάσεων, γνωστές φασματικά ως ταινίες μεταφοράς φορτίου [13]. Η παρατήρηση των φασματικών χαρακτηριστικών των μεταπτώσεων, αυτών, παρέχει πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό λειτουργίας του ενζύμου (Σχ. 2.7) [4].

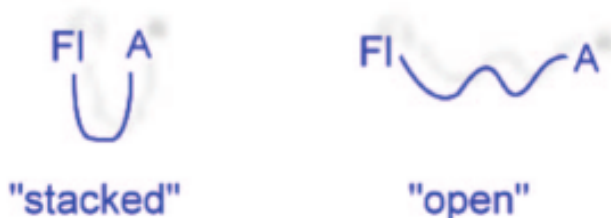


Σχήμα 2.7: Φάσματα απορρόφησης φλαβίνης σε διαφορετικές καταστάσεις οξειδωσης. Πάνω: ουδέτερη οξειδωμένη φλαβίνη (διακεκομμένη γραμμή με τελείες), ανιοντική ημικινόνη (διακεκομμένη γραμμή με παύλες) και ουδέτερη ημικινόνη (συνεχής γραμμή). Κάτω: καταστάσεις μεταφοράς φορτίου για την ουδέτερη οξειδωμένη φλαβίνη (διακεκομμένη γραμμή με τελείες), για την ανιοντική ημικινόνη (διακεκομμένη γραμμή με τελείες) και για την ουδέτερη ημικινόνη (συνεχής γραμμή) [7].

2.4 Η Κινητική του Φλάβινο-μονονουκλεοτιδίου (FMN) και του Φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (FAD)

Η αποσαφήνιση των φωτοφυσικών και φωτοχημικών διεργασιών των διεγερμένων καταστάσεων των FMN και FAD συνεισφέρει στην κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας των ενζύμων. Η χαμηλότερη διεγερμένη κατάσταση μιας φλαβίνης είναι εντοπισμένη στο τμήμα της ισοαλλοξαζίνης, με βάση δεδομένα από φάσματα απορρόφησης και φθορισμού, καθώς και υπολογιστικές μελέτες. Στην περίπτωση του FAD, ο χρόνος ζωής της κατάστασης π, π^* είναι εξαιρετικά μικρός, της τάξης των μερικών ps, λόγω της ύπαρξης μιας ιδιαίτερης διαμόρφωσης μεταξύ του δακτυλίου ισοαλλοξαζίνης και του δακτυλίου αδενίνης. Ειδικότερα σε υδατικό διάλυμα, το FAD, έχει προταθεί ότι ευρίσκεται σε δυο διαμορφώσεις: μια «κλειστή»

διαμόρφωση στην οποία ο δακτύλιος της ισοαλλοξαζίνης και ο δακτύλιος της αδενίνης είναι αρκετά κοντά και μια «ανοικτή» διαμόρφωση, στην οποία οι δύο δακτύλιοι είναι απομακρυσμένοι (Σχ. 2.8) [14].



Σχήμα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της «ανοικτής» και της «κλειστής» διαμόρφωσης του FAD [14].

Η «κλειστή» διαμόρφωση σταθεροποιείται από τις αλληλεπιδράσεις, τύπου π-π, που σχηματίζονται μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και από τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, που αναπτύσσονται κατά μήκος του σκελετού. Η αναλογία «ανοικτής» : «κλειστής» διαμόρφωσης είναι 1:4, σε ουδέτερο διάλυμα, και μεταβάλλεται με αλλαγή του pH. Ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης στην «ανοικτή» διαμόρφωση είναι 2.6 ns, ενώ στην «κλειστή» (κατάσταση ππ*) είναι 10 ps [15]. Ο μικρός χρόνος ζωής έχει παρατηρηθεί ότι οφείλεται σε φωτοεπαγόμενη ενδομοριακή μεταφορά ηλεκτρονίου από το τμήμα της αδενίνης στο τμήμα της ισοαλλοξαζίνης. Ο ισχυρισμός αυτός ενισχύεται από την καταγραφή των ενδιάμεσων της διαδικασίας (κατιόν αδενίνης, ανιόν ισοαλλοξαζίνης). Μελέτες της δομής των φλαβινών συναρτήσει του pH υποστηρίζουν ότι σε χαμηλό και υψηλό pH το FAD υιοθετεί μια κλειστή διαμόρφωση, η οποία θεωρείται ότι σχηματίζεται από την πρωτονίωση της αδενίνης σε pH = 3 και από την αποπρωτονίωση της φλαβίνης σε pH = 10. Όσον αφορά το FMN έχει καταγραφεί ένας χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης 5.4 ns, ο οποίος οφείλεται στην διεργασία της διασυστηματικής διασταύρωσης και σε μια μεταφορά ηλεκτρονίου από την αλυσίδα ριβιτόλης στο δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του Lumichrome [14].

Παρόλο που και οι δυο φλαβίνες (FMN και FAD) έχουν μελετηθεί εκτενώς, με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών, μόνο ένας μικρός αριθμός δημοσιεύσεων αναφέρονται σε τεχνικές που παρακολουθούν τις φωτοφυσικές διεργασίες σε πολύ μικρή χρονική κλίμακα που εκτείνεται από fs (femtosecond) έως ps (picosecond) [5], [14], [16], [17]. Τέτοιες τεχνικές παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες στην καταγραφή των κινητικών διεργασιών κατά την διάρκεια ενός

καταλυτικού κύκλου φλαβοενζύμων. Με στόχο την διεξαγωγή τέτοιων ερευνών μελετήθηκαν οι συμπαράγοντες των ενζύμων με χρήση της μεθόδου χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λείζερ.

2.5 Βιβλιογραφία

- [1] Wynter Blyth A. (1879). The composition of cows' milk in health and disease, *J. Chem. Soc. Trans.*, 35, 530-538.
- [2] Kuhn, R., Weygand, F. (1934). Synthetisches Vitamin B₂. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 67(12), 2084–2085.
- [3] Karrer P., Schopp K. Benz F. (1935). Synthesis of flavins, IV, *Helvetica Chim. Acta*, 18, 426- 429.
- [4] Häder D. P, Jori G. *Flavins: Photochemistry and Photobiology*. Royal Society of Chemistry Publishing. UK. (2006).
- [5] Kao, Y., Saxena, C., He, T., Wang, L., Sancar, A., Zhong, D., Guo, L. (2008). Ultrafast Dynamics of Flavins in Five Redox States *Ultrafast Dynamics of Flavins in Five Redox States. Topics In Current Chemistry*, (12), 13132-13139. <https://doi.org/10.1021/ja8045469>.
- [6] Joosten, V., Van Berkel, W. J. H. (2007). Flavoenzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 11, 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.010>.
- [7] Miura, R. (2000). Versatility and Specificity in Flavoenzymes : Control Mechanisms of Flavin Reactivity, 183-194.
- [8] Laursen, T., Singha, A., Rantzau, N., Tutkus, M., Borch, J., Stamou, D., Hatzakis, N. S. (2014). Single Molecule Activity Measurements of Cytochrome P450 Oxidoreductase Reveal the Existence of Two Discrete Functional States.
- [9] Pandey, A. V., Flück, C. E. (2013). NADPH P450 oxidoreductase: Structure, function, and pathology of diseases. *Pharmacology and Therapeutics*, 138 (2), 229-254. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.010>.
- [10] Fraaije M. W., van den Heuvel R. H., van Berkel W.J. Mattevi A. (1999). Covalent flavinylation is essential for efficient redox catalysis in vanillyl-alcohol oxidase, *J. Biol. Chem.*, 274, 35514-35520.
- [11] Heelis, P. F. (1982). The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines), *Chem. Soc. Rev.*, 11, 15-39.

- [12] Hammes G. Φυσικοχημεία για τις βιολογικές επιστήμες. Εκδόσεις Κωσταράκη. Αθήνα. (2007).
- [13] Miura, R. (2001). Versatility and specificity in flavoenzymes: control mechanisms of flavin reactivity, *Chem. Rec.*, 1, 183-194.
- [14] Li, G., Glusac, K. D. (2008). Light-triggered proton and electron transfer in flavin cofactors. *Journal of Physical Chemistry A*, 112 (20), 4573-4583. <https://doi.org/10.1021/jp7117218>.
- [15] Chosrowjan, H., Taniguchi, S., Mataga, N., Tanaka, F., Visser, A. J. W. G. (2003). The stacked flavin adenine dinucleotide conformation in water is fluorescent on picosecond timescale. *Chemical Physics Letters*, 378 (3-4), 354-358. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(03\)01339-3](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(03)01339-3).
- [16] Stanley, R. J., Mac Farlane, A. W. I. (2000). Ultrafast Excited State Dynamics of Oxidized Flavins: Direct Observations of Quenching by Purines. *Journal of Physical Chemistry A*, 104 (30), 6899-6906. <https://doi.org/10.1021/jp000003y>.
- [17] Sengupta, A., Khade, R. V., Hazra, P. (2011). pH dependent dynamic behavior of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) in femtosecond to nanosecond time scale. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 221 (1), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.04.033>.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πειραματική Διαδικασία και Οργανολογία

3.1 Πειραματική Διαδικασία

Τα αντιδραστήρια και ο εξοπλισμός, που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία του ρυθμιστικού διαλύματος και των δειγμάτων είναι τα εξής:

- Tris (hydromethyl)-aminomethane ($\geq 99\%$), από την Merck (Darmstadt, Germany).
- HCl (αραιωμένο από αρχικό διάλυμα HCl 0.5 M).
- Flavin Mononucleotide (FMN), από την Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Flavin adenine dinucleotide disodium salt hydrate (FAD) ($\geq 95\%$, HPLC), από την Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Υπερκάθαρο νερό (nanopure).
- Πεχάμετρο.
- Ζυγός ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.
- Ζυγός ακρίβειας πέντε δεκαδικών ψηφίων.

3.1.1 Παρασκευή Ρυθμιστικού Διαλύματος (Buffer: Tris-HCl)

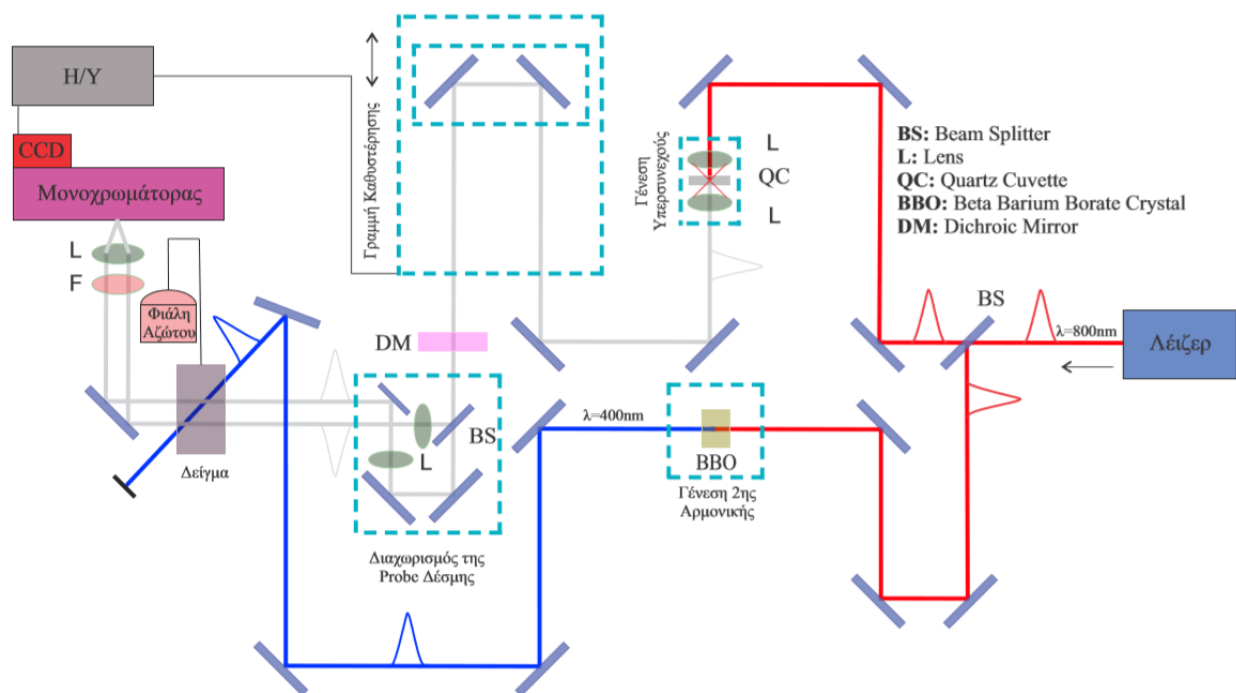
Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος διαλύθηκαν 24 mg Tris σε 200 ml υπερκάθαρου νερού ($C = 1 \text{ mM}$). Για την ρύθμιση του pH, προστέθηκε στάγδην μικρή ποσότητα HCl συγκέντρωσης 0.05 M. Το τελικό pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων ήταν μεταξύ 7-8.

3.1.2 Παρασκευή Διαλυμάτων FMN και FAD

Για τη μελέτη του FMN παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 0.1 mM με διάλυση 1 mg FMN σε 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για την παρασκευή διαλύματος FAD, ίδιας συγκέντρωσης με διάλυση 1.2 mg σε 15 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Η ζύγιση των στερεών έγινε με χρήση ζυγού ακριβείας πέντε δεκαδικών ψηφίων. Το pH των διαλυμάτων ελέγχεται ώστε να παραμένει σταθερό, μεταξύ των τιμών 7 και 8.

3.2 Πειραματική Διάταξη της Τεχνικής Χρονοαναλύμενη Υπερταχεία Φασματοσκοπία Λείζερ

Η πειραματική διάταξη της τεχνικής της χρονοαναλύμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, διαθέτει ως πηγή φωτός παλμικό λέιζερ FEMTOPOWER COMPACT PRO, Ti:sapphire, χρονικής διάρκειας fs, φασματογράφο SR-303i για την ανάλυση του φάσματος του φωτός και ανιχνευτή CCD Newton για την μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό.



Σχήμα 3.1: Σχηματικό διάγραμμα της πειραματικής διάταξης χρονοαναλύμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας.

Η δέσμη που παράγεται από το λέιζερ κατευθύνεται σε διαχωριστή δέσμης (beam splitter), παράγοντας δύο νέες δέσμες, που θα αποτελέσουν τη δέσμη άντλησης (pump) και τη δέσμη ανίχνευσης (probe). Η δέσμη ανίχνευσης οδηγείται μέσω κατόπτρων σε κυψελίδα με απιονισμένο ύδωρ, με αποτέλεσμα τη γένεση του υπερσυνεχούς λευκού φωτός. Στη συνέχεια, το υπερσυνεχές λευκό φως κατευθύνεται σε οπισθοανακλαστή (back reflector), ο οποίος είναι τοποθετημένος σε κινούμενο μοτέρ προκαλώντας τη χρονική καθυστέρηση της δέσμης. Η χρονικά καθυστερημένη δέσμη διαχωρίζεται με χρήση διαχωριστή δέσμης παράγοντας τη δέσμη του αναλύτη και τη δέσμη αναφοράς. Οι δύο δέσμες εστιάζονται μέσω φακών στο δείγμα και

διαπερνώντας το, καταλήγουν στο φασματογράφο και στη συνέχεια τον ανιχνευτή. Η δέσμη άντλησης οδηγείται μέσω κατόπτρων σε κρύσταλλο BBO (Beta Barium Borate Crystal-BBO) για τη γένεση της δεύτερης αρμονικής και εστιάζεται μέσω κατόπτρων στο δείγμα, ώστε να συμπίπτει με τη δέσμη του αναλύτη (Σχ. 3.1).

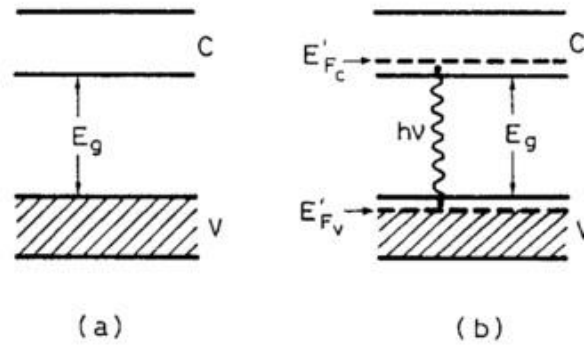
3.2.1 Λείζερ

Η παραγωγή του παλμού γίνεται από σύστημα λείζερ Ti:sapphire, FEMTOPOWER COMPACT PRO, που εκπέμπει ακτινοβολία σε περιοχή $\lambda = 800 \pm 40$ nm. Η χρονοδιάρκεια του παλμού είναι $\tau \leq 30$ fs ενώ η τιμή της ενέργεια εξόδου $E \geq 0.8$ mJ/pulse. Η συχνότητα επανάληψης των παλμών (pulse repetition rate) είναι $1 \text{ kHz} \pm 5\%$, η διάμετρος της δέσμης είναι 15 mm και η πόλωση είναι οριζόντια. [1].

Το FEMTOPOWER COMPACT PRO αποτελείται από ένα λείζερ διόδων, το οποίο αντλεί ένα κρύσταλλο Nd:YLF για την παραγωγή ακτινοβολίας χαρακτηριστικής συχνότητας, ικανής να αντλεί τον κρύσταλλο Ti:sapphire. Τα βασικά τμήματα του λείζερ είναι ο ταλαντωτής (oscillator), ο διαπλατυντής (stretcher), ο ενισχυτής (amplifier) και ο συμπιεστής (compressor). Η παραγωγή του παλμού λείζερ πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της εγκλείδωσης των ρυθμών.

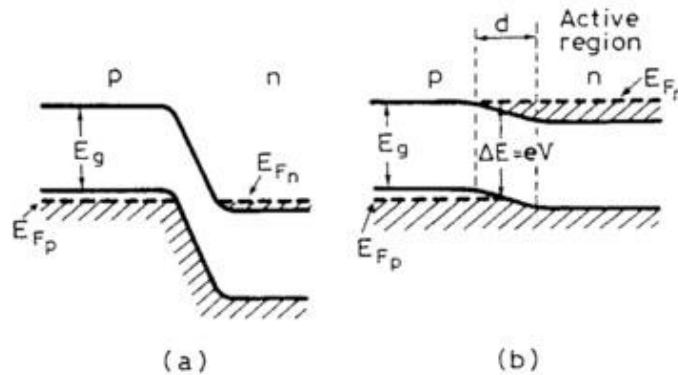
Λείζερ διόδων

Έστω ένας ημιαγωγός με συμπληρωμένη τη ζώνη σθένους (V) και κενή τη ζώνη αγωγιμότητας (C), η οποία απέχει ενεργειακά από την ζώνη σθένους, E_g . Μερικά ηλεκτρόνια διεγείρονται από την ζώνη σθένους στην ζώνη αγωγιμότητας και, έπειτα, πολύ γρήγορα (~ 1 ps) τα ηλεκτρόνια, που θα βρίσκονται στην ζώνη αγωγιμότητας θα επιστρέψουν στα χαμηλότερα μη κατειλημμένα ενεργειακά επίπεδα της ζώνης αυτής. Παράλληλα το ίδιο θα συμβεί και με τις οπές της ζώνης σθένους, οι οποίες θα συσσωρευθούν στα υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα της ζώνης αυτής. Η εκπομπή φωτός επιτυγχάνεται με την επανασύνδεση των ηλεκτρονίων από τη ζώνη αγωγιμότητας με μια οπή από τη ζώνη σθένους. Ο μηχανισμός αυτός για την παραγόμενη ακτινοβολία από επανασύνδεση είναι ο μηχανισμός εκπομπής φωτός από μια δίοδο LED (Light Emitting Diode).



Σχήμα 3.2: Αρχή λειτουργίας ενός λέιζερ ημιαγωγού. α) Απεικόνιση ζώνης σθένους (V), ζώνης αγωγιμότητας (C) και ενεργειακής απόστασης των ζωνών (E_g). β) Απεικόνιση της διέγερσης των ηλεκτρονίων στην ζώνη αγωγιμότητας και της επανασύνδεσης ηλεκτρονίου-οπής [2].

Στην περίπτωση που ο παραπάνω μηχανισμός γίνει εξαναγκασμένα μπορεί να οδηγήσει στην ακτινοβολία λέιζερ. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος εξαναγκασμένης παραγωγής της ακτινοβολίας του λέιζερ είναι η εφαρμογή διαφοράς δυναμικού (τάσης) στην επαφή του ημιαγωγού.



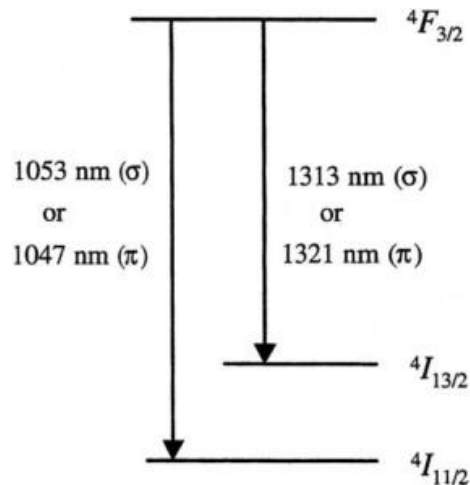
Σχήμα 3.3: α) Δομή ενεργειακών ζωνών μιας επαφής p-n ενός λέιζερ ημιαγωγού σε μηδενικό εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο. β) Η αλλαγή των ενεργειακών ζωνών του α) υπό την επίδραση εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου [2].

Το επίπεδο Fermi των ενεργειακών ζωνών μιας επαφής p-n ευρίσκεται στην ζώνη σθένους για την περιοχή p (E_{Fp}) και στην ζώνη αγωγιμότητας για την περιοχή n (E_{Fn}). Απουσία εξωτερικού πεδίου τα δυο ενεργειακά επίπεδα Fermi, των δυο περιοχών, είναι ευθυγραμμισμένα (Σχ. 3.3α). Εφαρμόζοντας, μια τάση V στην επαφή p-n προκύπτει διαχωρισμός των επιπέδων Fermi, με ενέργεια ΔE μεταξύ τους. Ως αποτέλεσμα αυτού, στην περιοχή της επαφής, τα ηλεκτρόνια από την ζώνη σθένους της περιοχής n μεταφέρονται στην ζώνη αγωγιμότητας της και οι οπές από την ζώνη αγωγιμότητας της περιοχής p περνούν στην ζώνη σθένους της

(Σχ. 3.3β). Εξαιτίας των φαινομένων αυτών ικανοποιείται η συνθήκη αναστροφής πληθυσμών για την παραγωγή λέιζερ.

Nd:YLF

Η χημική δομή του κρυστάλλου Nd:YLF είναι $\text{Nd}^{3+}:\text{LiYF}_4$. Ο κρύσταλλος εμφανίζει τρία μέγιστα απορρόφησης στα 792, 797 και 806 nm, με μέγιστη απορρόφηση στα 792 nm, ωστόσο, τα περισσότερα λέιζερ δίδουν, που αντλούν τον κρύσταλλο, παράγουν ακτινοβολία στα 806 nm και λιγότερα στα 792 nm.

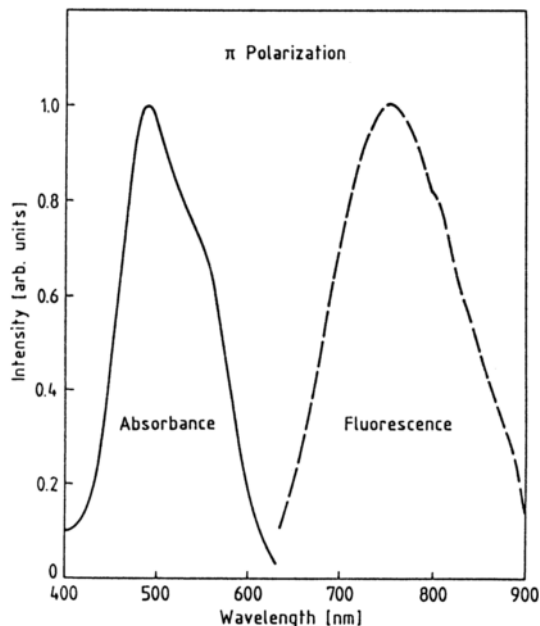


Σχήμα 3.4: Απλοποιημένο διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων του Nd:YLF [3].

Οι εκπομπές της ακτινοβολίας λέιζερ αντιστοιχούν σε μεταβάσεις από το επίπεδο $4F_{3/2}$ σε ενεργειακά χαμηλότερα επίπεδα, δύο μεταβάσεις περίπου στα 1.05 μm και δύο περίπου στα 1.3 μm , όπως παρατηρείται και από το διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων του Nd:YLF (Σχ. 3.4). Ο κρύσταλλος του Nd:YLF είναι διπλοθλαστικό υλικό προκαλώντας την επιθυμητή μετάβαση με ρύθμιση της πόλωσης. Για παράδειγμα, τοποθετώντας έναν εσωτερικό πολωτή στην κοιλότητα μπορεί να γίνει επιλογή είτε των 1047 nm (έκτακτη δέσμη) είτε των 1053 nm (τακτική δέσμη). Το ίδιο ισχύει και για τις δυο μεταβάσεις γύρω από τα 1.3 μm , με τη διαφορά ότι είναι απαραίτητη η καταστολή των μεταβάσεων λέιζερ στα 1.05 μm . Η χρήση των μεταβάσεων λέιζερ στα 1.3 μm γίνεται για την παραγωγή κόκκινου φωτός ενώ η διπλάσια συχνότητα λέιζερ του Nd:YLF, περίπου στα 0.65 μm , χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την άντληση του λέιζερ Ti:sapphire [3].

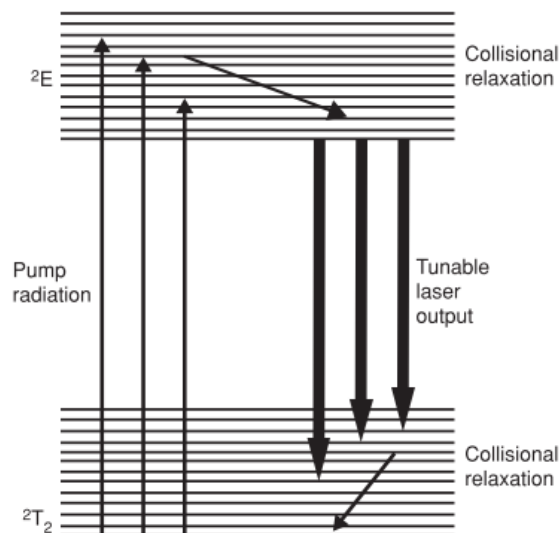
Ti:sapphire

Το υλικό Ti:sapphire σχηματίζεται κατά την αντικατάσταση ιόντος Al^{3+} με Ti^{3+} στο πλέγμα του Al_2O_3 . Ο κρύσταλλος, αποτελείται από ζαφείρι με προσμίξεις 0.1% Ti^{3+} κατά βάρος.



Σχήμα 3.5: Φάσματα απορρόφησης και φθορισμού του ιόντος Ti^{3+} σε Al_2O_3 (ζαφείρι) [3].

Οι κρύσταλλοι $Ti:Al_2O_3$ παρουσιάζουν μια ευρεία ζώνη απορρόφησης στην κυανη-πράσινη περιοχή του ορατού φάσματος με μέγιστο απορρόφησης περίπου στα 500 nm. Η δεύτερη αρμονική συχνότητα του λέιζερ Nd:YLF εμπίπτει σε αυτή την περιοχή μηκών κύματος και χρησιμοποιείται ως πηγή άντλησης του κρύσταλλου Ti:sapphire. Η εκπομπή του λέιζερ Ti:sapphire αναμένεται στα 780 nm με εύρος περίπου 180 nm (FWHM), όπως πιστοποιείται και από το φάσμα φθορισμού.



Σχήμα 3.6: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων του Ti:sapphire [3].

Η μετάβαση λέιζερ πραγματοποιείται από το διεγερμένο επίπεδο 2E στο θεμελιώδες επίπεδο 2T_2 . Η οπτική άντληση διεγείρει τα ιόντα Ti^{3+} στο ανώτατο επίπεδο λέιζερ και έπειτα μέσω δονητικής χαλάρωσης, αυτά, καταλήγουν στο κατώτερο δονητικό επίπεδο από όπου πραγματοποιείται η μετάβαση λέιζερ. Μέσω αποδιέγερσης τα ιόντα οδηγούνται στο κατώτερο δονητικό επίπεδο του θεμελιώδους επιπέδου. Η ισχυρή αλληλεπίδραση των ατόμων Ti και του κρύσταλλου ξενιστή σε συνδυασμό με την μεγάλη ηλεκτρονιακή κατανομή μεταξύ των δυο ενεργειακών επιπέδων, καθιστά την κορυφή ευρεία.

Η δομή των ενεργειακών επιπέδων του ιόντος Ti^{3+} διαφέρει από αυτή των μεταβατικών μετάλλων, λόγω της απουσίας ενεργειακών επιπέδων d, υψηλότερης ενέργειας από το επίπεδο λέιζερ. Αυτή η απλή δομή ενεργειακών επιπέδων (διαμόρφωση $3d^1$) εκμηδενίζει την πιθανότητα πραγματοποίησης του φαινομένου της απορρόφησης διεγερμένης κατάστασης (excited-state absorption-ESA), το οποίο περιορίζει την λειτουργία των λέιζερ, που περιέχουν μέταλλα μετάπτωσης [3].

Ταλαντωτής (Oscillator)

Ο ταλαντωτής (oscillator) του λέιζερ αποτελεί ένα συνδυασμό δυο βασικών συνιστωσών, ενός οπτικού ενισχυτή (optical amplifier) και ενός οπτικού αντηχείου (optical resonator). Το οπτικό αντηχείο περιλαμβάνει δυο επίπεδα ή κοίλα κάτοπτρα, που βρίσκονται σε κατάλληλη

γωνία σε σχέση με τον άξονα του ενεργού υλικού. Ο ρόλος του αντηχείου είναι να συζευγνύει την φάση του σήματος, που προκύπτει από το ενισχυμένο μέσο.

Η άντληση προκαλεί την αναστροφή του πληθυσμού των ηλεκτρονίων του υλικού λέιζερ οδηγώντας σε αποθήκευση της ενέργειας στο υψηλότερο επίπεδο λέιζερ. Μόλις αυτή η ενέργεια απελευθερωθεί στην οπτική δέσμη μέσω της διαδικασίας της εξαναγκασμένης εκπομπής, ξεκινά η διαδικασία της ενίσχυσης. Το σύστημα θα ξεκινήσει να ταλαντώνεται μόνο αν αντισταθμιστούν οι εσωτερικές απώλειες του συστήματος από την ανάδραση (η διαδικασία κατά την οποία μια ταλάντωση ενισχύεται και έπειτα η νέα ενισχυμένη ταλάντωση ενισχύεται ξανά). Το πόσο της ανάδρασης καθορίζεται από την ανακλαστικότητα των καθρεφτών του αντηχείου. Όσο μειώνεται η ανακλαστικότητα των καθρεφτών τόσο μειώνεται ο συντελεστής ανάδρασης. Ο καθρέφτης στην έξοδο του λέιζερ είναι εν μέρει διαπερατός, για ένα κλάσμα της ακτινοβολίας, ώστε να μπορεί να διαφύγει η ακτινοβολία από τον ταλαντωτή (oscillator) [3].

Πιο αναλυτικά, ο ρόλος του αντηχείου είναι η διατήρηση μιας διαμόρφωσης του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, του οποίου οι απώλειες αναπληρώνονται από το μέσο ενίσχυσης, μέσω της επαγόμενης εκπομπής. Με αυτό τον τρόπο, το αντηχείο ορίζει τα φασματικά, κατευθυντικά και χωρικά χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας λέιζερ και το μέσο ενίσχυσης χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας.

Διαπλατυντής (Stretcher)

Η δέσμη, που εξέρχεται από τον ταλαντωτή οδηγείται στον διαπλατυντή, ύαλο SF57 με γωνία Brewster. Η αρχή λειτουργίας ενός διαπλατυντή είναι ο χωρικός και χρονικός διαχωρισμός των διαφόρων μηκών κύματος μιας δέσμης λέιζερ, όταν αυτή τον διαπερνά. Η ακτινοβολία με το μικρότερο μήκος κύματος (μικρότερη ταχύτητα) θα πραγματοποιήσει μεγαλύτερη οπτική διαδρομή συγκριτικά με την ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος (μεγαλύτερη ταχύτητα), οδηγώντας στον διαχωρισμό τους, στο χώρο και στο χρόνο. Η δέσμη έπειτα από τον διαπλατυντή οδηγείται στον ενισχυτή [1].

Οπτικός ενισχυτής (Optical Amplifier)

Η αρχή λειτουργίας του ενισχυτή είναι η παραγωγή υψηλότερης πυκνότητας φωτονίων καθώς η δέσμη λέιζερ διαπερνά το μέσο ενίσχυσης (gain medium). Ο ενισχυτής, που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία είναι ένας ενισχυτής πολλαπλών διελεύσεων (multi pass

amplifier), που αποτελείται από δυο φακούς, το μέσο ενίσχυσης και από δυο ζεύγη όπισθο-ανακλαστών (retroreflectors). Το μέσο ενίσχυσης είναι κρύσταλλος Ti:sapphire σε θάλαμο κενού που ψύχεται μέσω συστήματος Peltier. Όταν δέσμη λέιζερ περνά μέσα από το ενεργό υλικό (μέσο απολαβής) καταλήγει στους όπισθο-ανακλαστές, και μετατοπίζεται οριζόντια, ώστε να πραγματοποιηθεί το επόμενο πέρασμα [1]. Η διαδικασία της ενίσχυσης πραγματοποιείται σε δυο μέρη:

1. Αρχικά πραγματοποιούνται τέσσερις διελεύσεις μέσα από το κρύσταλλο και έπειτα η δέσμη καταλήγει στη κυψελίδα Pockels (Pockels Cell).
2. Στην κυψελίδα Pockels επιλέγεται ένας παλμός από το τρένο παλμών για να ενισχυθεί περαιτέρω. Ο παλμός αυτός πραγματοποιεί επιπλέον τέσσερα περάσματα μέσα από το μέσο ενίσχυσης και έπειτα καταλήγει στους φακούς mode-matching, οι οποίοι ρυθμίζουν το μέγεθος της δέσμης, ώστε να πραγματοποιηθεί το τελευταίο πέρασμα μέσα από το μέσο ενίσχυσης.

Συμπιεστής (Compressor)

Η ενισχυμένη δέσμη, που καταλήγει στο συμπιεστή, οδηγείται σε δυο ζεύγη πρισμάτων, μέσω οπτικών. Η αρχή λειτουργίας των ζευγών πρισμάτων Brewster βασίζεται στην μικρότερη οπτική διαδρομή που θα διανύσει ακτινοβολία μικρότερου μήκους κύματος (μικρότερη ταχύτητα) συγκρίσει με ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος (μεγαλύτερη ταχύτητα) επιτυγχάνοντας μείωση της χρονικής και χωρικής διαφοράς των διάφορων μηκών κύματος της δέσμης [1].

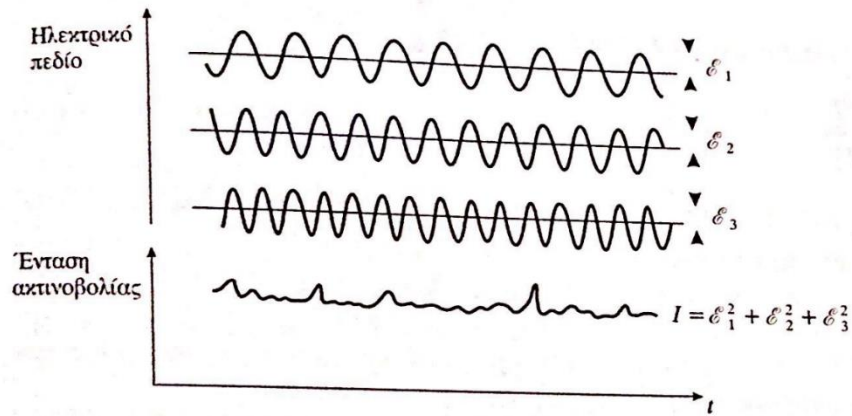
Εγκλείδωση Ρυθμών (Mode-Locking)

Η εγκλείδωση ρυθμών χρησιμοποιείται για την παραγωγή περιοδικών, υψηλής ισχύος και μικρής χρονικής διάρκειας παλμών λέιζερ. Μια τυπική μη-ομογενώς διευρυμένη κοιλότητα λέιζερ υποστηρίζει ταλαντώσεις σε πολλούς ρυθμούς ταυτόχρονα. Η έξοδος λέιζερ ως συνάρτηση του χρόνου, εξαρτάται από τις σχετικές φάσεις, τις συχνότητες και τα πλάτη των ρυθμών. Το ηλεκτρικό πεδίο συναρτήσει του χρόνου δίνεται από την σχέση:

$$E(t) = \sum_{n=0}^{N-1} (E_0)_n \exp[i(\omega_n t + \delta_n)] \quad (3.1)$$

όπου $(E_0)_n$ είναι το πλάτος, ω_n είναι η γωνιακή συχνότητα και δ_n είναι η φάση του νιοστού ρυθμού. Οι παράμετροι αυτοί μεταβάλλονται έχοντας σαν αποτέλεσμα οι ρυθμοί να είναι

ασύμφωνοι και η ολική ένταση της ακτινοβολίας να είναι το άθροισμα των εντάσεων ακτινοβολίας των ανεξάρτητων ρυθμών (Σχ. 3.7) [4].



Σχήμα 3.7: Μη εγκλειδωμένοι ρυθμοί, που οι εντάσεις ακτινοβολίας έχουν τυχαίες διακυμάνσεις [4].

Η ολική ένταση ακτινοβολίας δίδεται από τη σχέση:

$$I = NE_0^2 \quad (3.2)$$

όπου έχει θεωρηθεί ότι όλοι οι ρυθμοί N έχουν πλάτος E_0 . Η ένταση της ακτινοβολίας παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις στην περίπτωση που δυο ή τρεις ρυθμοί είναι σε φάση κάποια χρονική στιγμή.

Εξαναγκάζοντας τους διάφορους ρυθμούς να διατηρήσουν την ίδια φάση δ ο ένας με τον άλλον (κλείδωση των παλμών λείζερ), δηλαδή $\delta_n = \delta$, η ολική ένταση ακτινοβολίας υπολογίζεται προσθέτοντας τα ανεξάρτητα ηλεκτρικά πεδία. Η νέα ολική έντασης ακτινοβολίας δίνεται από τον τύπο:

$$E(t) = E_0 \exp(i\delta) \sum_{n=0}^{N-1} \exp(i\omega_n t) \quad (3.3)$$

Αντικαθιστώντας το ω_n με $\omega - n\delta\omega$, όπου ω είναι η γωνιακή συχνότητα του ρυθμού με την μεγαλύτερη συχνότητα και $\delta\omega$ ($\delta\omega = \pi c/L$) είναι η γωνιακή συχνότητα μεταξύ των ρυθμών η εξίσωση (3.3) γίνεται:

$$E(t) = E_0 \exp(i\delta) \sum_{n=0}^{N-1} \exp[i(\omega - n\delta\omega)t] = E_0 \exp[i(\omega t + \delta)] \sum_{n=0}^{N-1} \exp\left(-\frac{\pi i n c t}{L}\right)$$

ή

$$E(t) = E_0 \exp[i(\omega t + \delta)] \{1 + \exp(-i\varphi) + \exp(-2i\varphi) + \dots + \exp[-(N-1)i\varphi]\} \quad (3.4)$$

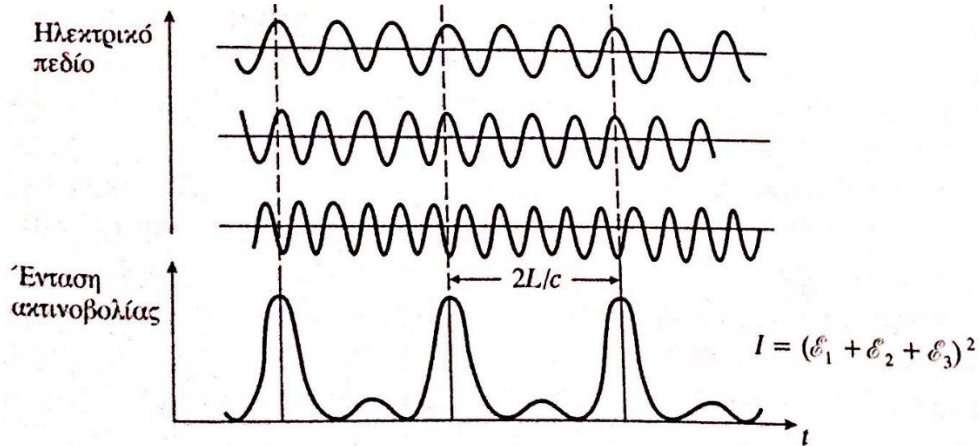
όπου $\varphi = \pi c t/L$. Ο όρος που ευρίσκεται στην αγκύλη είναι γεωμετρική πρόοδος και η εξίσωση (3.4) μετατρέπεται [4]:

$$E(t) = E_0 \exp[i(\omega t + \delta)] \frac{\sin(\frac{N\varphi}{2})}{\sin(\frac{\varphi}{2})} \quad (3.5)$$

Η νέα ένταση ακτινοβολίας I δίνεται από τον τύπο:

$$I = E_0^2 \frac{\sin(\frac{N\varphi}{2})}{\sin(\frac{\varphi}{2})} \quad (3.6)$$

Η μορφή της εξίσωσης (3.6), για $N=3$, απεικονίζεται στο Σχήμα 3.8:



Σχήμα 3.8: Εγκλειδωμένοι ρυθμοί, που οι σχέσεις των φάσεων των ρυθμών κρατιούνται σταθερές και οι παλμοί που παράγονται είναι μικρής χρονικής διάρκειας και ισχυροί. Η χρονική απόσταση των παλμών είναι $2L/c$ και η χρονική διάρκεια $(1/N)(2L/c)$ [4].

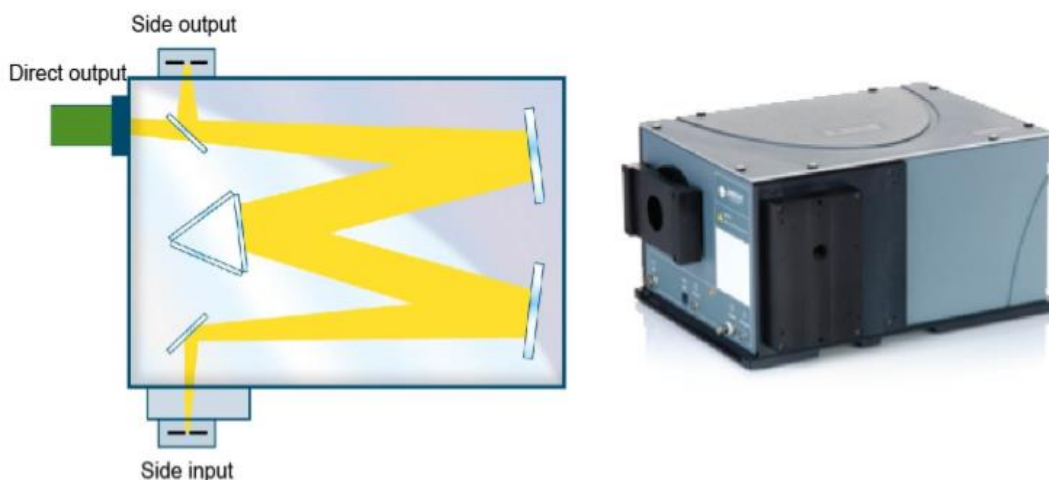
Η ένταση ακτινοβολίας $I(t)$ είναι περιοδική ($\Delta\varphi = 2\pi$) για το χρονικό διάστημα $t = 2L/c$, το οποίο είναι ο χρόνος που χρειάζεται η ακτινοβολία για να πραγματοποιήσει έναν πλήρη κύκλο μέσα στην κοιλότητα. Η μέγιστη τιμή της έντασης είναι $N^2 E_0^2$ και προκύπτει για τιμές $\varphi = 0$ ή $p\pi$, όπου p είναι ένας ακέραιος για τον οποίο η τιμή της συνάρτησης $\sin^2(N\varphi/2)/\sin^2(\varphi/2)$ ισούται με N^2 . Παρομοίως, η ελάχιστη τιμή της ακτινοβολίας, το μηδέν, προκύπτει όταν $N\varphi/2 = p\pi$, όπου p είναι ένας μη μηδενικός ακέραιος, γεγονός που πραγματοποιείται όταν $\varphi = 2p\pi/N$ ή $t = (1/N)(2L/c)p$. Επομένως, η χρονική διάρκεια των μεγίστων, η οποία είναι ο χρόνος που απαιτείται για να πέσει η ένταση της ακτινοβολίας από την μέγιστη τιμή της σε μια σχεδόν μηδενική ($p = 1$), είναι $(1/N)(2L/c)$. Η έξοδος ενός λέιζερ εγκλειδωμένων ρυθμών αποτελείται από μια σειρά παλμών μικρής χρονικής διάρκειας, οι οποίοι απέχουν χρονικά $2L/c$ και ο καθένας έχει ισχύ κορυφής ίση με N φορές τη μέση ισχύ. Ο λόγος της χρονικής απόστασης των παλμών ως προς το εύρος του παλμού είναι προσεγγιστικά ίσος με τον αριθμό των ρυθμών, δηλαδή $(2L/c)/[(2L/c)(1/N)] = N$. Για να αποκτηθούν υψηλής ισχύος, μικρής

χρονικής διάρκειας παλμοί ο αριθμός των ρυθμών πρέπει να είναι μεγάλος, γεγονός που προκύπτει από μια διευρυμένη μετάβαση μετάβαση λέιζερ και μια κοιλότητα μεγάλου μήκους [4].

3.2.2 Φασματογράφος Andor Shamrock SR-303i

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος περιθλαστικού φράγματος τύπου Czerny-Turner (Andor Technologies) Shamrock SR-303i. Ο φασματογράφος έχει εστιακό μήκος $f = 30.3 \text{ cm}$ και περιέχει περιθλαστικό φράγμα διακριτικής ικανότητας 150 grooves/mm . Η αντίστροφη γραμμική διασπορά $d\lambda/dy$ του φράγματος είναι 21.56 , όταν η γωνία περίθλασης είναι $\theta = 45^\circ$ και η διακριτική ικανότητα $\Delta\lambda$ για $\lambda = 300 \text{ nm}$ είναι 0.87 [5].

Η ακτινοβολία που εισέρχεται στο φασματογράφο μέσω της σχισμής εισόδου κατευθύνεται στο πρώτο κάτοπτρο, το οποίο ευθυγραμμίζει (παραλληλίζει) το φως και το κατευθύνει στο φράγμα περίθλασης. Ιδανικά το φως προβάλλεται σε όλο το μήκος του φράγματος, επιτυγχάνοντας τη μέγιστη δυνατή ανάλυση. Στην συνέχεια η ακτινοβολία ανακλάται σε διαφορετικές γωνίες, βάση του μήκους κύματος της, και οδηγείται σε ένα δεύτερο κάτοπτρο, το οποίο την εστιάζει στον ανιχνευτή (Σχ. 3.9).



Σχήμα 3.9: Σχηματική αναπαράσταση της ροής της ακτινοβολίας εντός του φασματογράφου και φωτογραφία του φασματογράφου Andor Shamrock SR-303i [5].

Η αντίστροφη διασπορά δίνεται από τον τύπο:

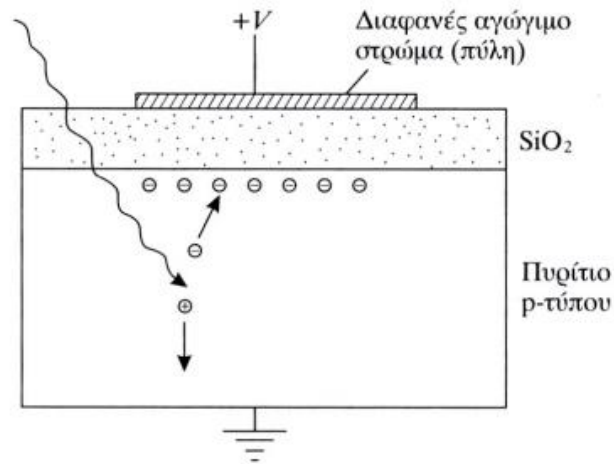
$$\frac{d\lambda}{dy} = \frac{\alpha_N \cdot \cos\theta}{n_d \cdot f} \quad (3.7)$$

όπου α_N είναι η απόσταση διαγραμμισμού, το αντίστροφο του αριθμού των αυλακώσεων ανά

μονάδα μήκους, θ είναι η γωνία μεταξύ της κάθετα προσπίπτουσας δέσμης στο φράγμα και της περιθλώμενης, n_d είναι η τάξη περίθλασης και f είναι η εστιακή απόσταση του κατόπτρου [5].

3.2.3 Ανιχνευτής CCD Newton

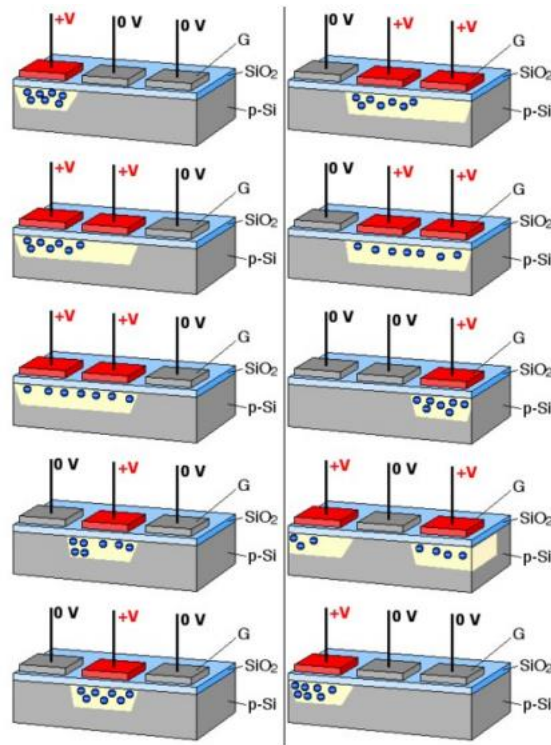
Η διάταξη συζευγμένου φορτίου (Charged Coupled Devices-CCD) αποτελείται από ένα πυκνωτή μετάλλου-οξειδίου(μονωτής)-ημιαγωγού (Metal Oxide Semiconductor-MOS), στο οποίο ως μονωτής χρησιμοποιείται SiO_2 . Ο ημιαγωγός είναι τύπου p και το μέταλλο είναι ένα ηλεκτρόδιο.



Σχήμα 3.10: Πυκνωτής MOS [4].

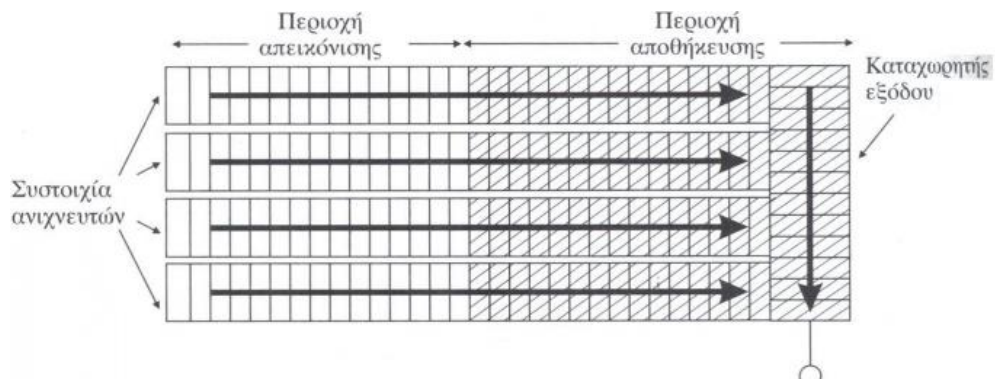
Στο σύστημα εφαρμόζεται ορθή πόλωση σε σχέση με το πυρίτιο. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία δημιουργεί ζεύγη ηλεκτρονίων και οπών. Τα ηλεκτρόνια θα διαχωριστούν από τις οπές λόγω του δυναμικού με αποτέλεσμα να συγκεντρωθούν στο κάτω μέρος του πυριτίου. Το ποσό του φορτίου που θα φτάσει κοντά στο πυρίτιο είναι ανάλογο προς την ολική φωτεινή ροή που προσπίπτει στην διάταξη κατά την διάρκεια της μέτρησης [4].

Η χρήση συστοιχίας CCD, που αποτελείται από μια σειρά τριών πυκνωτών MOS βοηθά στην σειριακή σάρωση του σήματος. Εφαρμόζοντας δυναμικό στη πρώτη πύλη συσσωρεύεται το φορτίο κάτω από το πρώτο ηλεκτρόδιο. Έπειτα, γίνεται εφαρμογή δυναμικού στη δεύτερη πύλη και μηδενίζεται το δυναμικό στη πρώτη έτσι ώστε το φορτίο από το πρώτο ηλεκτρόδιο να μεταφερθεί κάτω από το δεύτερο. Τέλος, με την ίδια διαδικασία το φορτίο συσσωρεύεται κάτω από το 3^ο ηλεκτρόδιο. Με αυτό τον τρόπο έχει πραγματοποιηθεί η σειριακή σάρωση.



Σχήμα 3.11: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επίτευξης της σειριακής σάρωσης [4].

Λόγω αδυναμίας της διάταξης να πραγματοποιεί 2^η σάρωση πριν την ολοκλήρωση της 1^{ης} σάρωσης, δημιουργήθηκε διάταξη στην οποία μια συστοιχία CCD λαμβάνει το σήμα και, ακριβώς δίπλα της, μια άλλη συστοιχία, χρησιμεύει για την αποθήκευση. Το σήμα αφού διέλθει από τις υπάρχουσες συστοιχίες καταλήγει στον καταχωρητή εξόδου. Η όλη διάταξη ονομάζεται μεταφορά μεταξύ γραμμών [4].

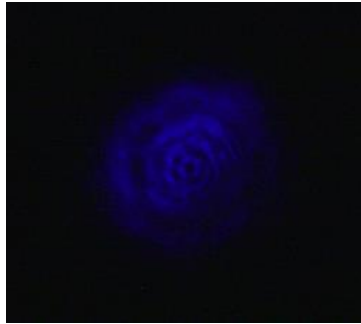


Σχήμα 3.12: Μεταφορά σήματος μεταξύ γραμμών [4].

Η διάταξη μεταφοράς σήματος μεταξύ γραμμών επιτρέπει τη γρήγορη και συνεχόμενη ανάλυση του σήματος που καταφθάνει από τον ενισχυτή εικόνας [4].

3.3 Τυπική Μέτρηση με την Τεχνική της Χρονοαναλυόμενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λείζερ

Το πρώτο βήμα για την λήψη μιας μέτρησης με την τεχνική της χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λείζερ είναι η ευθυγράμμιση του συστήματος (ευθυγράμμιση δεσμών λείζερ). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η μέτρηση των προφίλ των δεσμών λείζερ (παλμός άντλησης (pump), παλμός ανίχνευσης (probe), η οποία γίνεται με την χρήση κάμερας DCC 1645C της εταιρείας Thorlabs.



Σχήμα 3.13: Προφίλ του παλμού άντλησης (pump).

Χρησιμοποιώντας το λογισμικό Origin 9.0 γίνεται μέτρηση του πλάτους στο ήμισυ του μεγίστου (Full width at half maximum-FWHM) για το ύψος και το πλάτος του προφίλ, τα οποία πολλαπλασιάζονται με την τιμή $\sqrt{\frac{1}{2\ln 2}}$. Η μονάδα μέτρησης των οντοτήτων αυτών είναι pixel και για την μετατροπή τους σε cm χρησιμοποιείτε ως δεδομένο ότι 1 pixel, της κάμερας, αντιστοιχεί σε $3.6 \cdot 10^{-6}$ cm. Με βάση τον τύπο του εμβαδού της έλλειψης υπολογίζεται το εμβαδόν του προφίλ του παλμού άντλησης:

$$E_{\text{έλλειψης}} = \pi * FWHM_x * FWHM_y \quad (3.8)$$

όπου $FWHM_x$ είναι το πλάτος στο ήμισυ του μεγίστου, ως προς τον άξονα των x , πολλαπλασιασμένο με $\sqrt{\frac{1}{2\ln 2}}$, και $FWHM_y$ είναι το πλάτος στο ήμισυ του μεγίστου, ως προς τον άξονα των y , πολλαπλασιασμένο με $\sqrt{\frac{1}{2\ln 2}}$ σε cm.

Επόμενο βήμα είναι ο υπολογισμός της ισχύος της δέσμης άντλησης (pump), που απορροφάτε από το δείγμα και πραγματοποιείται με βάση την παρακάτω σχέση:

$$I_A = I_0 - I_T - I_R \quad (3.9)$$

όπου I_A είναι η ισχύς που απορροφάτε, I_0 είναι η ισχύς της δέσμης άντλησης, I_T είναι η ισχύς που διαπερνά το δείγμα και I_R είναι η ισχύς που ανακλάται από το δείγμα. Οι μετρήσεις αυτών των παραμέτρων πραγματοποιούνται με την χρήση του Powermeter της εταιρίας Thorlabs. Μέσω υπολογισμών και δεδομένου ότι ο ρυθμός επανάληψης των παλμών είναι 1 kHz, υπολογίζεται η ενέργεια του παλμού λέιζερ:

$$\text{Ενέργεια παλμού λέιζερ} = \frac{\text{Ισχύς δέσμης λέιζερ}}{\text{ρυθμός επανάληψης παλμών}} \quad (3.10)$$

και η πυκνότητα της ενέργειας (Fluence):

$$\text{Πυκνότητα της ενέργειας} = \frac{\text{Ενέργεια του παλμού λέιζερ}}{\text{Προφιλ του παλμού λέιζερ}} \quad (3.11)$$

Η ρύθμιση της ροής του αζώτου γίνεται με την χρήση μειωτήρα, ώστε να διατηρείται σταθερή και επαρκώς γρήγορη ανάδευση του δείγματος, αποφεύγοντας το φαινόμενο της φωτόλυσης των δειγμάτων.

Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το χρονικό παράθυρο για τη λήψη της μέτρησης και τα «βήματα» που θα πραγματοποιήσει η οπτική βάση (μοτέρ), στο συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο. Η αύξηση του αριθμού των «βημάτων» βελτιώνει τη χρονική διακριτική ικανότητα της μέτρησης, με τον περιορισμό ότι δεν μπορεί να γίνει μικρότερη από την χρονική διάρκεια του παλμού. Ακόμη, ρυθμίζονται οι επαναλήψεις (iterations), των μετρήσεων.

Τέλος, ο ανιχνευτής καταγράφει οχτώ διαφορετικά σήματα για τον υπολογισμό της μεταβολής της οπτικής πυκνότητας.

3.4 Βιβλιογραφία

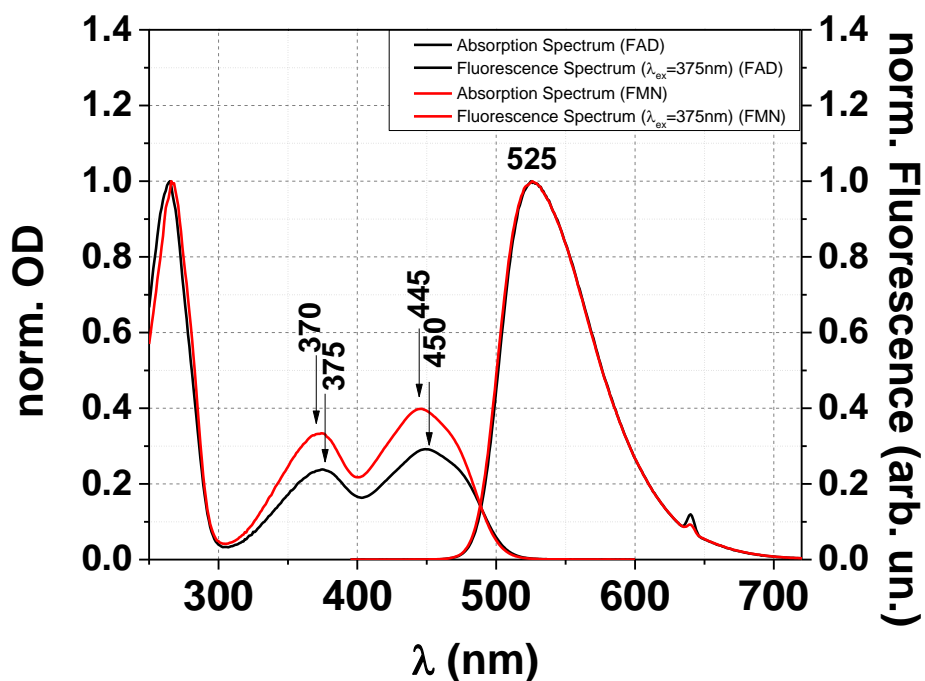
- [1] FEMTO LASERS. FEMTOPOWER COMPACT PRO. USER'S MANUAL.
- [2] Μπενής Μ. Φυσική Των Laser. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα. (2014).
- [3] Koechner, W. (2014). Solid-State Laser Engineering-6th Edition. Igarss 2014. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.
- [4] Wilson J., Hawkes J. Οπτοηλεκτρονική: μια εισαγωγή, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Αθήνα. (2007).
- [5] Andor Shamrock SR-303i. User's Guide.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Αποτελέσματα και Συζήτηση Αποτελεσμάτων

4.1 Εισαγωγή

Φάσματα απορρόφησης των ενώσεων, φλαβινομονοκλεοτίδιο (FMN) και φλαβινοαδενοδινουκλεοτίδιο (FAD), λήφθηκαν για την εύρεση των μηκών κύματος στα οποία απορροφούν τα, υπό μελέτη, μόρια, ώστε να προσδιοριστεί το μήκος κύματος του παλμού άντλησης. Τα φάσματα φθορισμού των δύο ενώσεων λήφθηκαν για την εξακρίβωση των μηκών κύματος στα οποία αναμένεται η εκπομπή των ενώσεων.

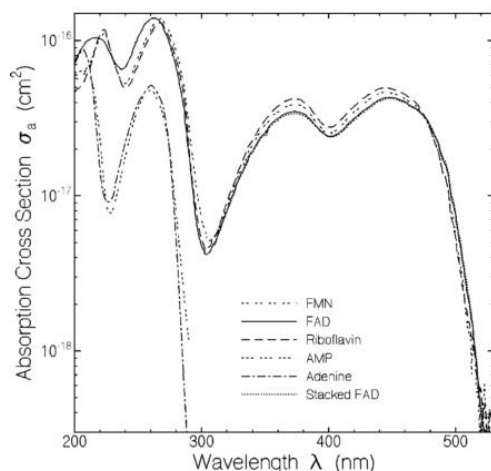


Σχήμα 4.1: Φάσματα απορρόφησης και φθορισμού του φλαβινομονοκλεοτιδίου (FMN) και του φλαβινοαδενοδινουκλεοτιδίου (FAD).

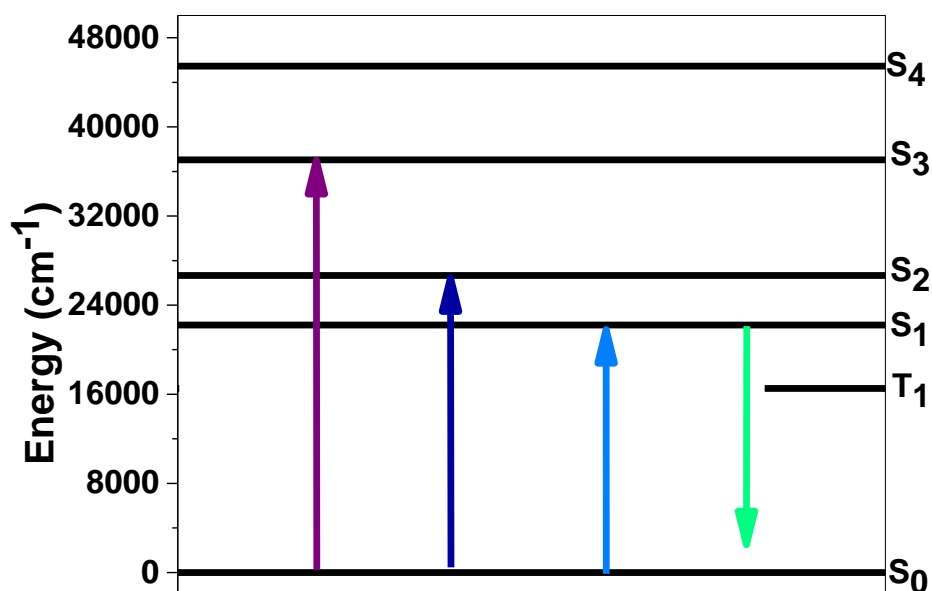
Όπως προκύπτει από το φάσμα (Σχ. 4.1), οι δυο ενώσεις εμφανίζουν τρεις ταινίες απορρόφησης στα ~450 nm, ~370 nm και 265 nm, που αντιστοιχούν στις μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_1$, $S_0 \rightarrow S_2$ και $S_0 \rightarrow S_3$. Η ταινία που προκύπτει στο φάσμα φθορισμού εντοπίζεται στα 525 nm και αντιστοιχεί στη μετάβαση $S_1 \rightarrow S_0$. Αποδοτική απορρόφηση του φωτός από τα μόρια επιτυγχάνεται με την χρήση παλμού άντλησης με μήκος κύματος 400 nm, το οποίο ευρίσκεται

μεταξύ των δυο κορυφών του φάσματος απορρόφησης (Σχ. 4.1) και συμπίπτει με τη συχνότητα της δεύτερης αρμονικής του βασικού κύματος εκπομπής του λέιζερ, επομένως μπορεί να παραχθεί με μια σχετική ευκολία.

Τα δεδομένα από το φάσμα απορρόφησης συμφωνούν με την βιβλιογραφία (Σχ. 4.2).



Σχήμα 4.2: Φάσμα ενεργούς διατομής απορρόφησης σε ουδέτερο υδατικό διάλυμα του FAD, του FMN, της ριβοφλαβίνης, του AMP, της αδενίνης και της κλειστής μορφής του FAD, που προέκυψε από υπολογισμούς [1].



Σχήμα 4.3: Διάγραμμα Jablonski του φλαβινομονοκλεοτιδίου (FMN) και του φλαβινοαδενοδινουκλεοτιδίου (FAD).

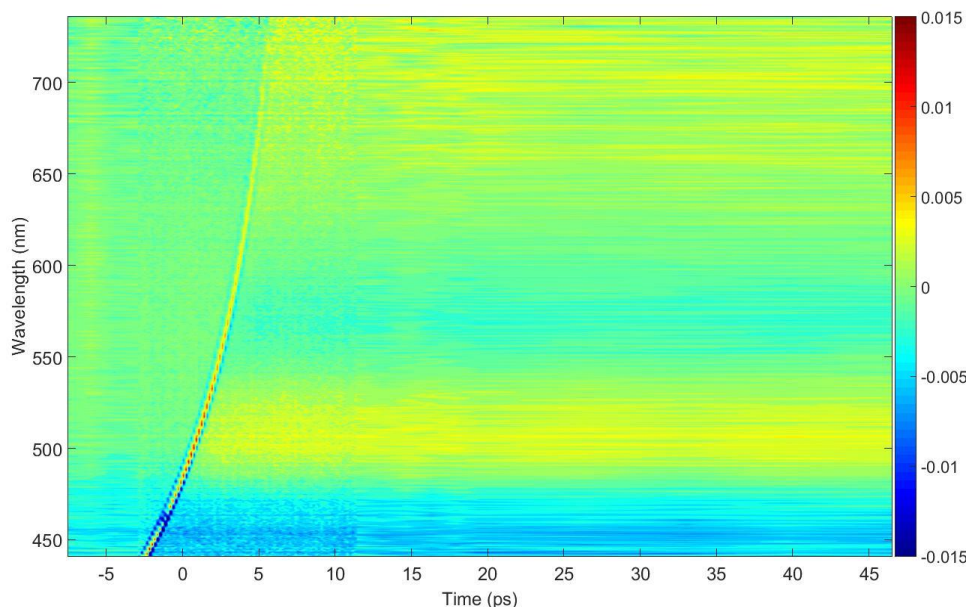
Η περιγραφή των διαδικασιών απορρόφησης και εκπομπής ενός φωτονίου, καθώς και όλων των διαδικασιών που μεσολαβούν, γίνονται με το διάγραμμα Jablonski (Σχ. 4.3). Τα διαγράμματα αυτά χρησιμοποιούνται ως σημείο αναφοράς για τη μελέτη της απορρόφησης και

της εκπομπής του φωτός και πιο συγκεκριμένα για την απεικόνιση όλων των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στα μόρια. Το διάγραμμα Jablonski αποτελείται από τις απλές καταστάσεις (singlet), S_0 , S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , που αντιστοιχούν στην θεμελιώδη, την πρώτη, δεύτερη, τρίτη και τέταρτη διεγερμένη κατάσταση, και την τριπλή κατάσταση (triplet). Παράλληλα, απεικονίζονται οι ηλεκτρονιακές μεταβάσεις που προκύπτουν από το φάσμα απορρόφησης και εκπομπής των ενώσεων.

4.2 2D Απεικονίσεις Χρονοαναλυόμενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λείζερ

Με την τεχνική της χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λείζερ πραγματοποιείται η καταγραφή φασμάτων σε διαφορετικές χρονικές καθυστερήσεις μεταξύ του παλμού άντλησης και ανίχνευσης. Το διάγραμμα που προκύπτει είναι μια 2D απεικόνιση των φωτοφυσικών και φωτοχημικών διεργασιών και της κινητικής αυτών. Ο άξονας y αντιστοιχεί στο μήκος κύματος του φασματικού εύρους του παλμού ανίχνευσης, ο άξονας x αντιστοιχεί στη χρονική διαφορά άφιξης των δυο παλμών στο δείγμα (pump και probe) και η ψευδοχρωματική απεικόνιση (χρωματική κλίμακα) υποδεικνύει την μεταβολή της οπτικής πυκνότητας, για διαφορετικά μήκη κύματος, με την πάροδο του χρόνου.

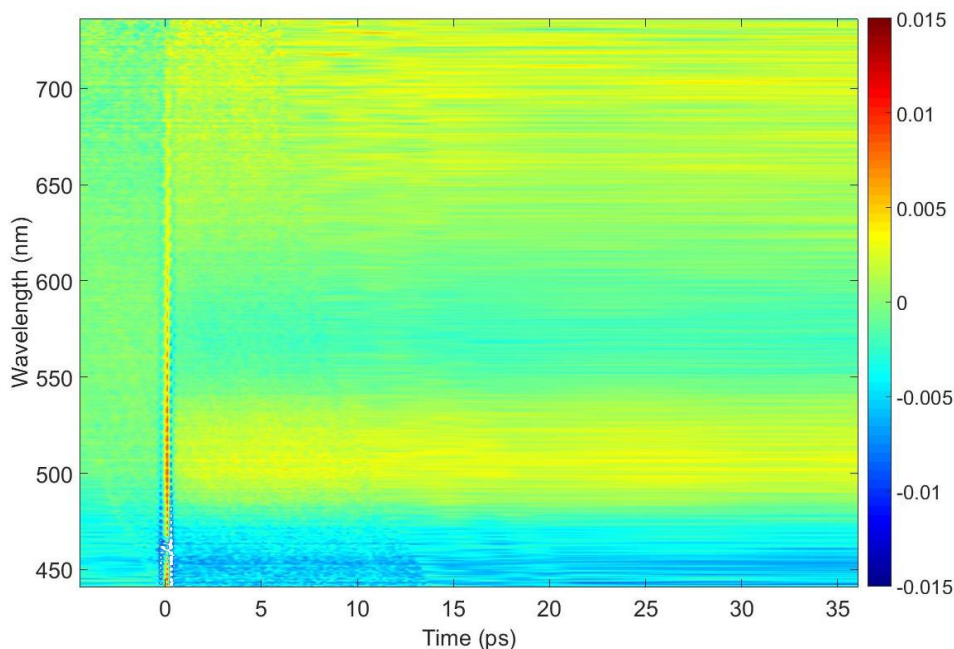
Οι 2D απεικονίσεις από τη μελέτη του FMN και του FAD έχουν μικρές διαφορές. Ενδεικτικά παρατίθενται οι 2D απεικονίσεις του FMN (Σχ. 4.4, 4.5). Το γράφημα (Σχ. 4.4) εμφανίζει μια παραβολοειδή καμπύλη, η οποία εκτείνεται από τη χρονική στιγμή -2 ps (κάτω αριστερά) έως τη χρονική στιγμή 5 ps (πάνω δεξιά). Η καμπύλη δηλώνει το χρόνο σύμπτωσης των διαφορετικών μηκών κύματος της δέσμης probe με την δέσμη pump. Η γένεση λευκού φωτός (WL generation), από την οποία προκύπτει η δέσμη ανίχνευσης, λόγω διασποράς της ταχύτητας ομάδας (Group velocity dispersion-GVD), εμφανίζει χρονική καθυστέρηση, η οποία είναι ανάλογη του μήκους κύματος και είναι υπεύθυνη για το χρονικό εύρος της καμπύλης. Σε αρνητικού χρόνου (αριστερά από την καμπύλη) η διαφορά της οπτικής πυκνότητας είναι μηδέν, εφόσον δεν έχει πραγματοποιηθεί διέγερση του δείγματος, ενώ στους θετικούς χρόνους (δεξιά της καμπύλης) εμφανίζονται έγχρωμες ζώνες, οι οποίες υποδηλώνουν την πραγματοποίηση των φωτοχημικών διεργασιών.



Σχήμα 4.2: 2D απεικόνιση του FMN (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.95 mJ/cm^2 , χρονικό παράθυρο 46 ps).

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων η παραβολοειδής καμπύλη μετατρέπεται σε ευθεία γραμμή (Σχ. 4.5), ανεξάρτητη πλέον του μήκους κύματος, ώστε να διευκολυνθεί η κινητική μελέτη για τα διάφορα μήκη κύματος. Η διόρθωση του φαινομένου, στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε με χρήση αλγορίθμου, που δημιουργήθηκε στο πρόγραμμα MATLAB.

Στους αρνητικούς χρόνους η οπτική πυκνότητα είναι $\Delta OD = 0$ (πράσινο) υποδηλώνοντας απουσία φωτοχημικής διαδικασίας. Στο εύρος μηκών κύματος από περίπου 440-500 nm παρατηρείται μείωση της οπτικής πυκνότητας, που οφείλεται στο φαινόμενο της φωτόλυσης. Το φαινόμενο αυτό αντιμετωπίζεται, εν μέρει, με ανάδευση του δείγματος. Εντονότερη ανάδευση, ενδεχομένως οδηγούσε σε εξάλειψη του φαινομένου, αλλά θα ενίσχυε το θόρυβο στις μετρήσεις, λόγω σχηματισμού δινών. Οπότε, πρέπει να υπάρξει μια βελτιστοποίηση στις συνθήκες που επηρεάζουν το φαινόμενο της φωτόλυσης (ένταση ανάδευσης, ένταση διέγερσης), γεγονός αρκετά επίπονο και πιθανώς μη αποτελεσματικό, καθώς εκ φύσεως το σήμα δεν πρόκειται να εκμηδενιστεί.

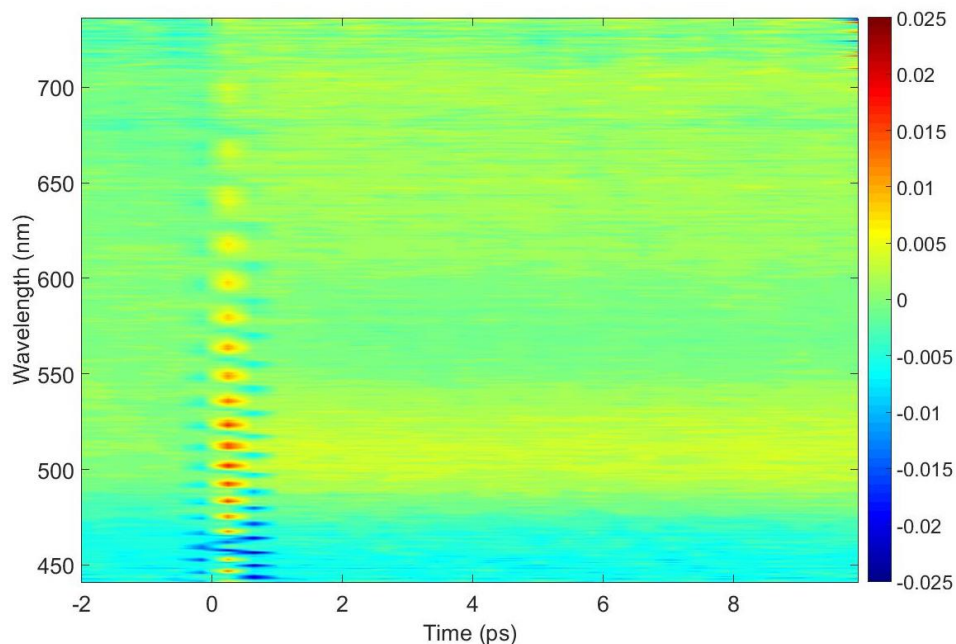


Σχήμα 4.3: Διορθωμένη 2D απεικόνιση του FMN (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.95 mJ/cm², χρονική παράθυρο 46 ps).

4.3 Υπερταχεία Δυναμική του FMN

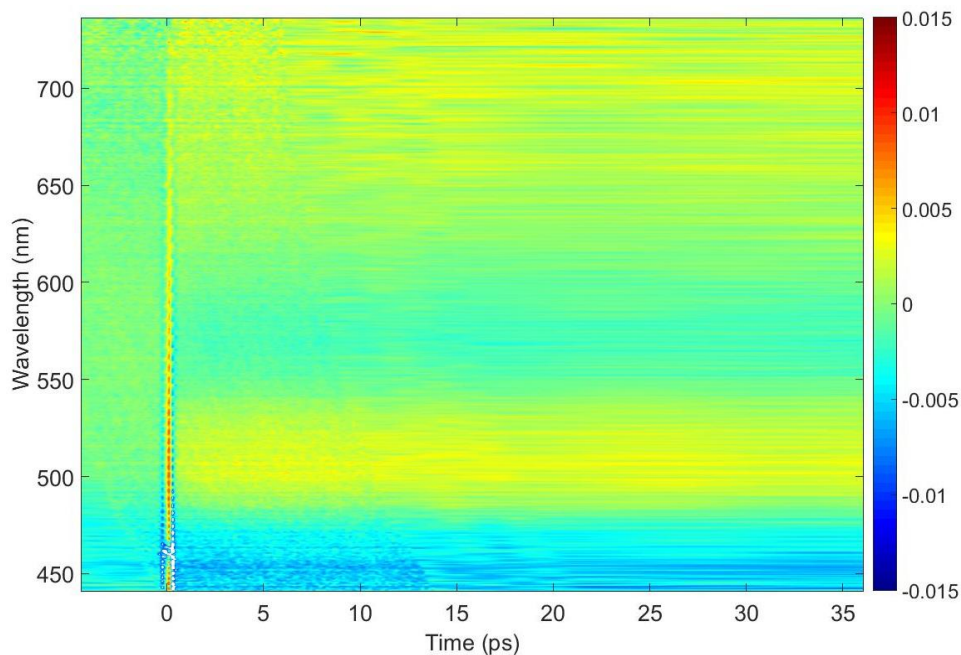
Για τη μελέτη των κινητικών φαινομένων της ένωσης του FMN λήφθηκαν 2D απεικονίσεις διαφορετικού χρονικού εύρους -2-20 ps, -5-46 ps και -5-500 ps. Η χρονική διαίρεση, σε επιμέρους χρονικά παράθυρα, πραγματοποιείται για την αύξηση της διακριτικής ικανότητας στη μελέτη των φαινομένων.

Στο πρώτο χρονικό παράθυρο από -2 έως 20 ps (Σχ. 4.6) παρατηρείται ότι στους αρνητικού χρόνου (< 0 ps) η οπτική πυκνότητα είναι $\Delta OD = 0$, με εξαίρεση το εύρος μηκών κύματος 440-500 nm, όπου εντοπίζεται το φαινόμενο της φωτόλυσης. Στους θετικούς χρόνους εμφανίζονται τέσσερις φασματικές ζώνες, όπου στα ~440 nm έως ~500 nm και ~550 nm έως τα ~620 nm παρατηρείται αρνητική μεταβολή της οπτικής πυκνότητας ενώ στα ~500 nm έως τα ~550 nm και ~620 nm έως τα ~700 nm η μεταβολή είναι θετική. Η ζώνη, που κυμαίνεται από ~440 nm έως τα ~500 nm, συμπίπτει με τη πρώτη κορυφή (450 nm) του φάσματος απορρόφησης (Σχ. 4.1).



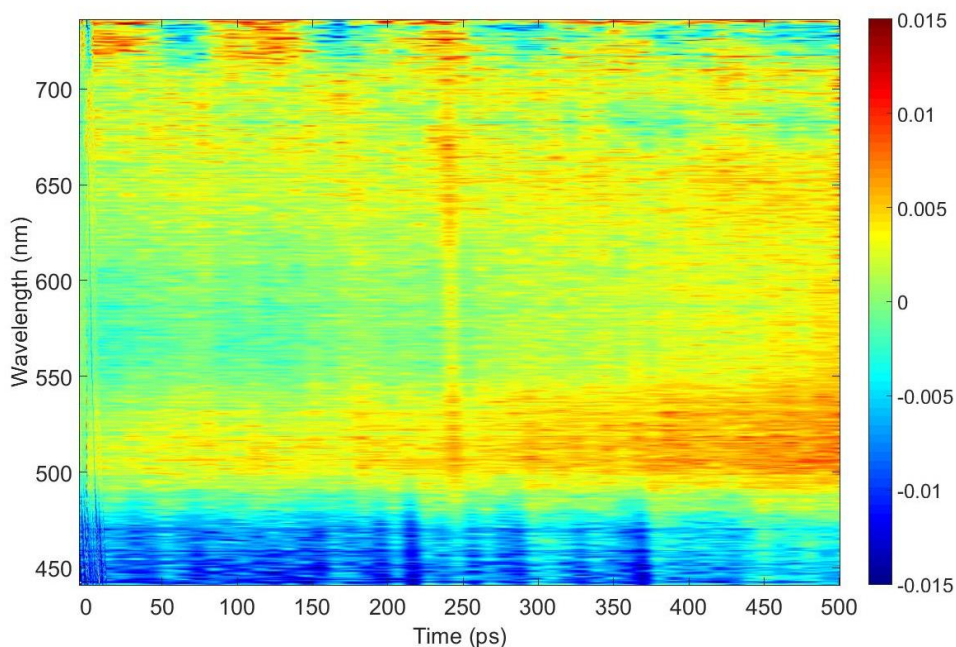
Σχήμα 4.4: 2D απεικόνιση του FMN σε χρονικό παράθυρο 20 ps (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.82 mJ/cm²).

Το χρονικό παράθυρο μεταξύ -5 και 46 ps εμφανίζει τα ίδια χαρακτηριστικά με το πρώτο χρονικό παράθυρο για τους αρνητικούς και θετικούς χρόνους (Σχ. 4.7).



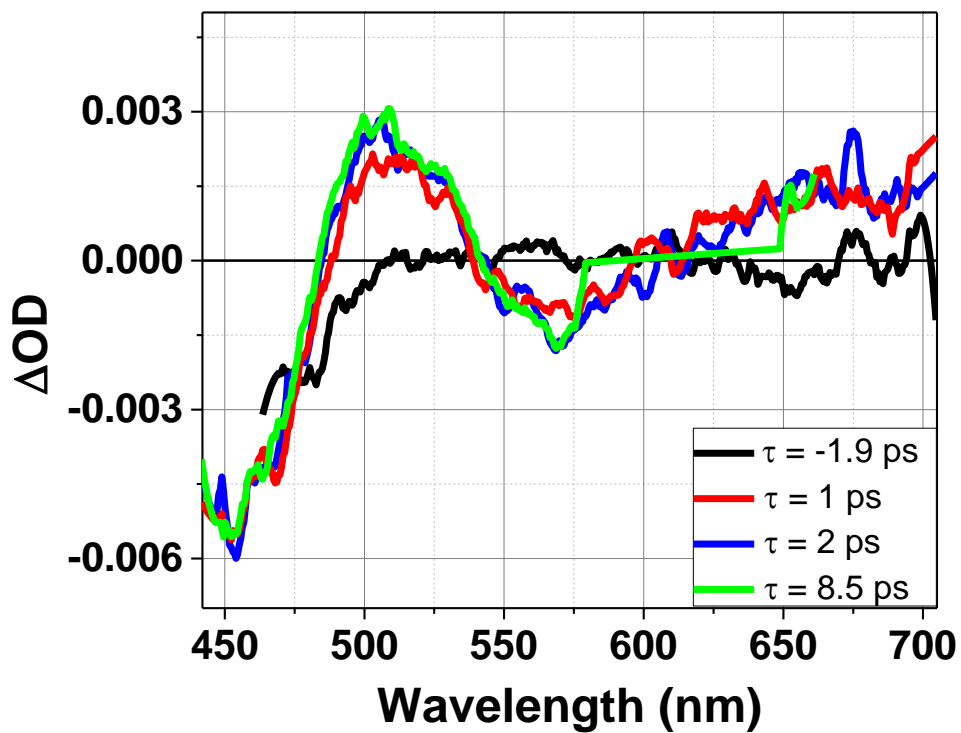
Σχήμα 4.5: 2D απεικόνιση του FMN σε χρονικό παράθυρο 46 ps (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.95 mJ/cm²).

Η 2D απεικόνιση με χρονικό παράθυρο από -5 έως 500 ps (Σχ. 4.8) εμφανίζει έντονο θόρυβο και παρουσιάζει μια «φαινομενική» αύξηση της οπτικής πυκνότητας, καθώς αυξάνεται ο χρόνος. Το φαινόμενο προκύπτει λόγω τεχνικών ζητημάτων πέρα από την φυσική απόκριση του υπό μελέτη συστήματος, όπως πιθανή αστάθεια της έντασης της δέσμης λέιζερ, γεγονός αναπόφευκτο δεδομένου του μεγάλου χρονικού διαστήματος της μέτρησης και μετατόπιση της δέσμης κατά την κίνηση της οπτικής βάσης. Η απειροελάχιστη εκτροπή στην γωνία ανάκλασης της δέσμης στον οπισθοανακλαστικό καθρέπτη συνεπάγεται μια σχετικά μεγάλη χωρική μετατόπιση της δέσμης, ικανή να προκαλέσει την απευθυγράμμιση της αλληλεπικάλυψης των δεσμών pump και probe επάνω στο δείγμα και άρα την μεταβολή του σήματος. Δεδομένου αυτού η περαιτέρω ανάλυση θα πραγματοποιηθεί στην απεικόνιση με χρονικό παράθυρο 46 ps.



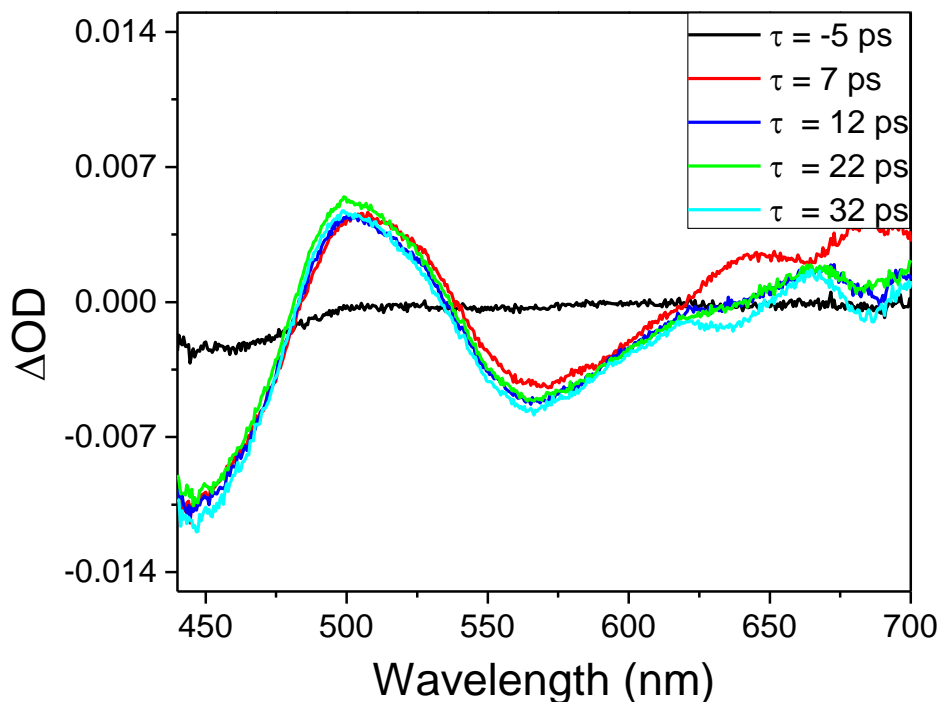
Σχήμα 4.6: 2D απεικόνιση του FMN σε χρονικό παράθυρο 500 ps (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.84 mJ/cm²).

Φασματικές τομές από τις 2D απεικονίσεις λήφθηκαν για τους χρόνους $\tau = -1.9$ ps, $\tau = 1$ ps, $\tau = 2$ ps και $\tau = 8.5$ ps για τη μελέτη της χρονικής εξέλιξης των μεταβάσεων, καθώς και τον ακριβή καθορισμό του μήκους κύματος αυτών (Σχ. 4.9).

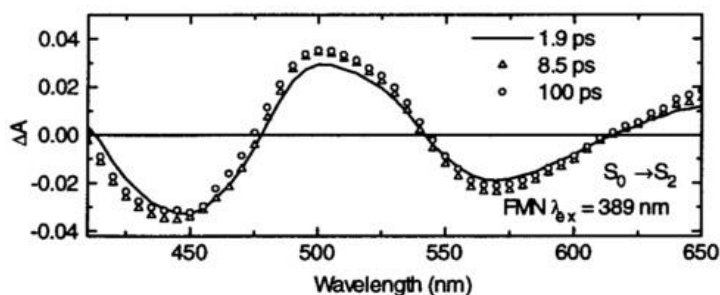


Σχήμα 4.7: Φάσματα παροδικής απορρόφησης του FMN (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.95 mJ/cm²).

Προς βελτίωση του καταγραφόμενου σήματος και εξάλειψη του θορύβου λήφθηκαν 100 επαναλήψεις, του καταγραφόμενου φάσματος, στους χρόνους χρόνους $\tau = -5$ ps, $\tau = 7$ ps, $\tau = 12$ ps, $\tau = 22$ ps και $\tau = 32$ ps (Σχ. 4.10).



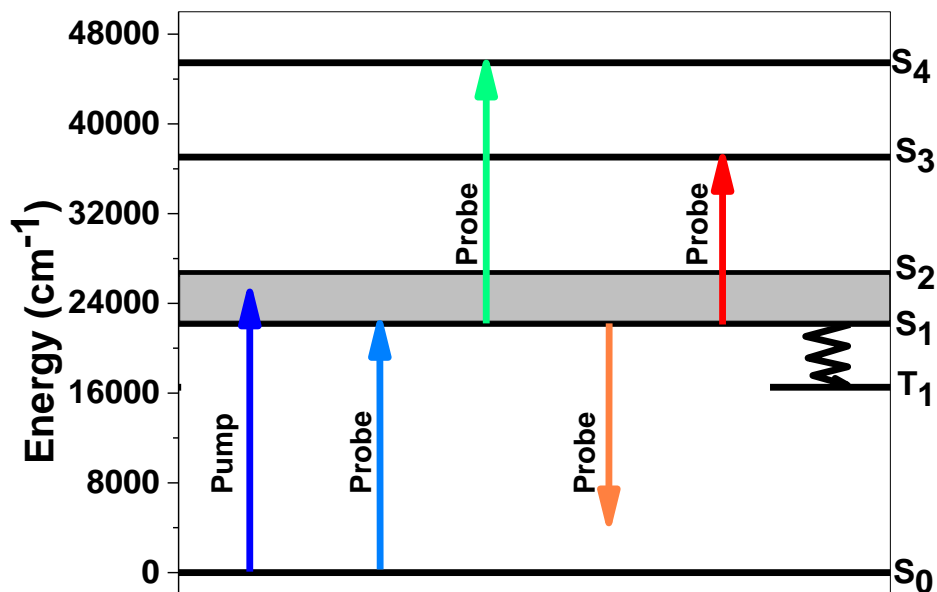
Σχήμα 4.8: Φάσματα παροδικής απορρόφησης του FMN (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.57 mJ/cm^2).



Σχήμα 4.9: Φάσματα χρονοαναλύμενης φασματοσκοπίας υποπικοδευτερολέπτων του FMN ($250 \mu\text{M}$), που λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης 389 nm στα 1.9 ps , στα 8.5 ps και στα 100 ps μετά την διέγερση [2].

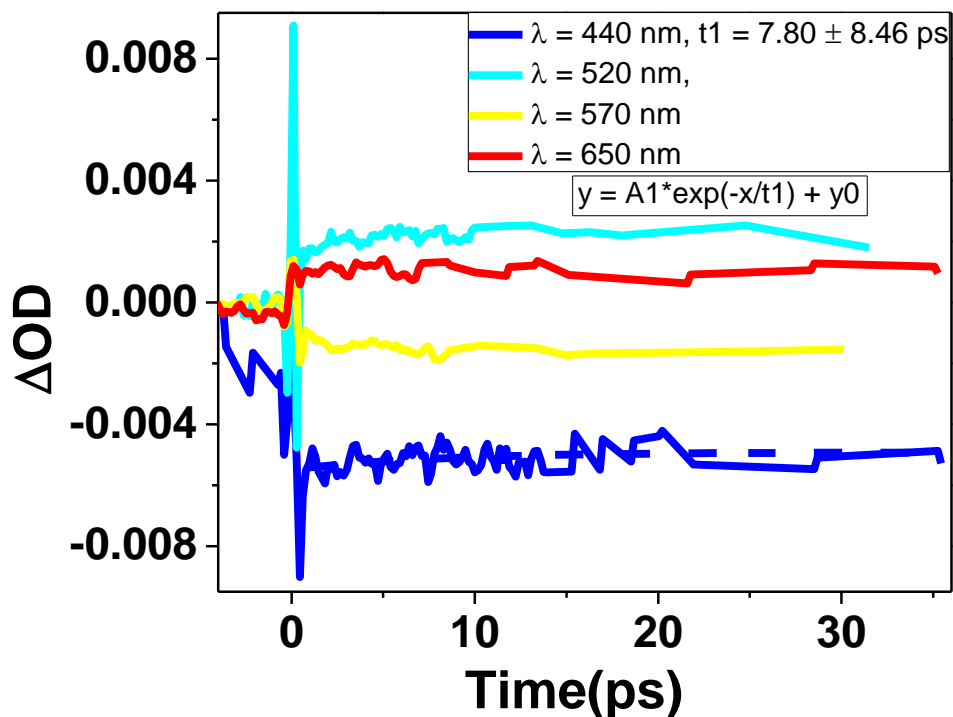
Οι διορθωμένες φασματικές τομές εμφανίζουν τέσσερις χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες συμφωνούν και με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Σχ. 4.11). Η πρώτη κορυφή στα 450 nm προέρχεται από το bleaching της θεμελιώδους κατάστασης, δηλαδή τη μετάβαση από το επίπεδο S_0 στο επίπεδο S_1 . Η δεύτερη κορυφή στα 505 nm οφείλεται σε μια απορρόφηση διεγερμένης κατάστασης (excited-state absorption, ESA, $S_1 \rightarrow S_n$) και πιθανώς στην μετάβαση από το S_1 επίπεδο στο S_4 . Η τρίτη κορυφή στα 560 nm αντιστοιχεί σε εξαναγκασμένη εκπομπή από το επίπεδο S_1 στο επίπεδο S_0 . Τέλος, η κορυφή που ξεκινάει να σχηματίζεται στα 600 nm αντιστοιχεί σε απορρόφηση διεγερμένης κατάστασης (excited-state absorption, ESA, $S_1 \rightarrow S_n$),

που πιθανώς οφείλεται στη μετάβαση $S_1 \rightarrow S_3$ [2]. Η μεταβάσεις αυτές πραγματοποιούνται κατά την πρόσπτωση της δέσμης ανίχνευσης στο δείγμα, εφόσον αυτό έχει διεγερθεί από την δέσμη άντλησης (Σχ. 4.12).



Σχήμα 4.10: Διάγραμμα Jablonski του FMN.

Η κινητική συμπεριφορά του FMN μελετήθηκε με λήψη χρονικών τομών από τις 2D απεικονίσεις για τα μήκη κύματος $\lambda = 440 \text{ nm}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$, $\lambda = 570 \text{ nm}$ και $\lambda = 650 \text{ nm}$, ώστε να καθοριστεί ο χρόνος ζωής των διεργασιών. Οι χρονικές τομές δείχνουν ότι στους αρνητικούς χρόνους η οπτική πυκνότητα είναι $\Delta OD = 0$, ωστόσο την χρονική στιγμή που φτάνει ο παλμός άντλησης στο δείγμα παρατηρείται μια μεταβολή στην οπτική πυκνότητα. Μετά την χρονική στιγμή $t = 0$ παρατηρούμε ότι η οπτική πυκνότητα είναι αρνητική για τα μήκη κύματος 440 nm και 570 nm, τα οποία εκφράζουν τις μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_1$ (bleaching θεμελιώδους κατάστασης) και $S_1 \rightarrow S_0$ (εξαναγκασμένη εκπομπή), αντίστοιχα. Η οπτική πυκνότητα είναι θετική για τα μήκη κύματος 520 nm και 650 nm, που εκφράζουν τις απορροφήσεις διεγερμένης κατάστασης.



Σχήμα 4.11: Κινητικές καμπύλες FMN (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.95 mJ/cm²).

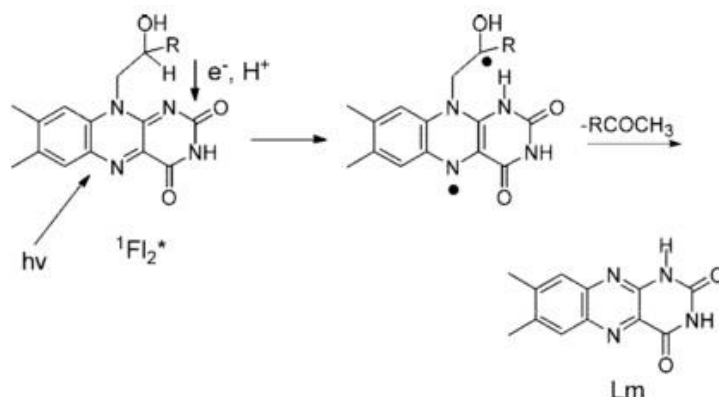
Παρατηρώντας τις κινητικές καμπύλες για το FMN εντοπίζεται αρχικά μία αύξηση του σήματος και έπειτα διατήρηση, γεγονός που υποδηλώνει την πραγματοποίηση δυο διαφορετικών φαινομένων. Ο προσδιορισμός του χρόνου ζωής των δύο φαινομένων πραγματοποιήθηκε με βάση την εξίσωση 4.1.

$$y = y_0 + A_1 * e^{(-x/t_1)} \quad (4.1)$$

όπου, το y_0 είναι η τιμή της οπτικής πυκνότητας τη χρονική στιγμή $t = 0$, το y είναι η τιμή της οπτικής πυκνότητας σε διάφορες χρονικές στιγμές, το t_1 είναι ο χρόνος ζωής της κατάστασης και το A_1 είναι ένας προεκθετικός παράγοντας. Η συγκεκριμένη συνάρτηση χρησιμοποιήθηκε για το χρονικό εύρος από $t = 0$ έως το τέλος του χρονικού παραθύρου της μέτρησης με στόχο τον υπολογισμό του χρόνου ζωής των διεργασιών. Ο χρόνος ζωής για το μήκος κύματος 440 nm είναι 7.80 ± 8.46 ps οφείλεται σε εσωτερική μετατροπή από την κατάσταση S_2 στην S_1 . Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται και από την αύξηση του σήματος, για το χρονικό διάστημα 1-10 ps, στις τομές για τα μήκη κύματος $\lambda = 520$ nm, $\lambda = 570$ nm και $\lambda = 650$ nm μέσω των οποίων γίνεται παρατήρηση των μεταβολών του πληθυσμού της κατάστασης S_1 .

Ο χρόνος ζωής του φαινομένου στο οποίο το σήμα παραμένει σταθερό δεν υπολογίζεται λόγω αδυναμίας του χρονικού παραθύρου της μέτρησης να προσεγγίσει το χαρακτηριστικό

χρόνο του φαινομένου, δηλαδή το χρόνο όπου η τιμή της έντασης αντιστοιχεί στο $1/e$ της αρχικής έντασης. Με βάση την βιβλιογραφία ο χρόνος αυτός είναι της τάξης των ns [3] και αποδίδεται σε δυο πιθανές οδούς αποδιέγερσης του FMN, από την κατάσταση S_1 . Η πρώτη οδός είναι η πραγματοποίηση μιας διασυστηματική διασταύρωση (μετάβαση από τη singlet κατάσταση στην triplet κατάσταση). Η σταθερά ταχύτητας της διεργασίας αυτής είναι $k_{isc}=2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ (η μετάβαση αυτή φαίνεται στο Σχήμα 4.12). Η δεύτερη οδός προκύπτει από διαμορφώσεις του FMN, στις οποίες ο σκελετός του σακχάρου είναι πολύ κοντά στον δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης. Σε αυτή την διαμόρφωση υπάρχει η πιθανότητα πραγματοποίησης μεταφοράς ηλεκτρονίου συζευγμένου με πρωτόνιο (H^+), από το σκελετό του σακχάρου στο δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης (Σχ. 4.14). Η σταθερά ταχύτητας αυτής της διαδικασίας είναι $5.4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$.

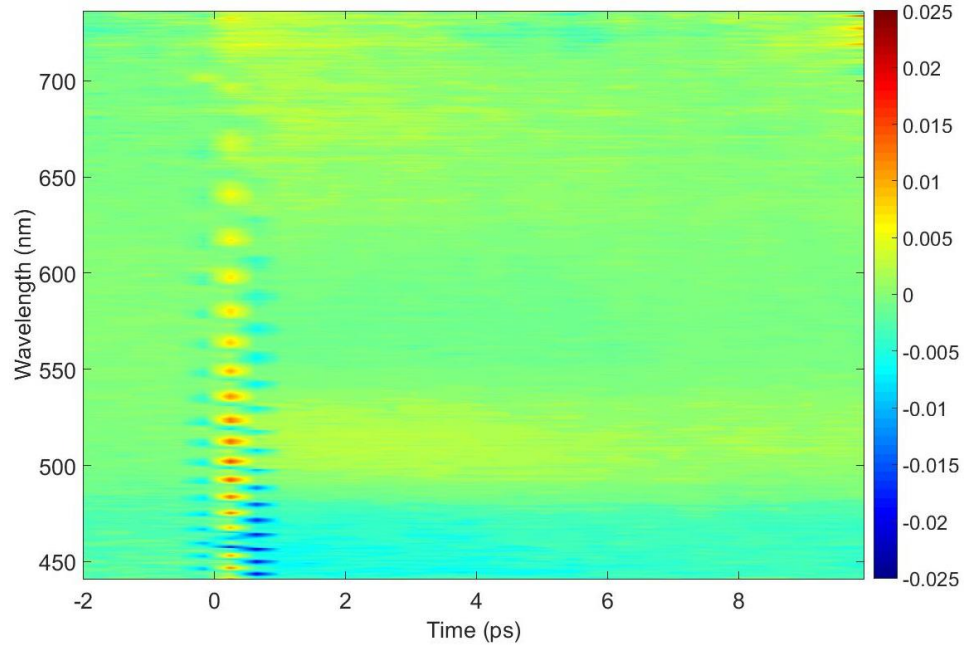


Σχήμα 4.12: Φωτοαναγωγή του FMN σε Lumichrome [3].

4.4 Υπερταχεία Δυναμική του FAD

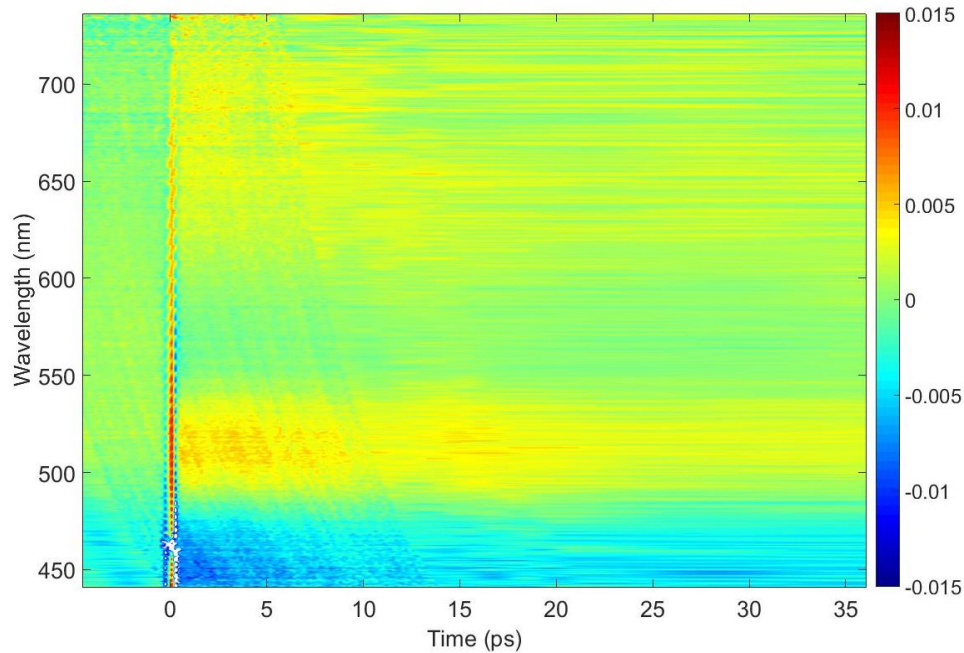
Για τη μελέτη του FAD ακολουθείται η ίδια διαδικασία με το FMN. Οι φασματικές τομές διακρίνονται σε τρία χρονικά παράθυρα με χρόνους -2-20 ps, -5-46 ps και -5-500 ps.

Για το χρονικό παράθυρο -2-20 ps (Σχ. 4.15) παρατηρούμε την ύπαρξη τεσσάρων ζωνών, που η πρώτη εκτείνεται από τα ~440 nm έως τα ~500 nm με αρνητική μεταβολή της οπτικής πυκνότητας, η δεύτερη από τα ~500 nm έως τα ~550 nm με θετική μεταβολή της οπτικής πυκνότητας, η τρίτη από ~550 nm έως τα ~600 nm με αρνητική μεταβολή της οπτικής πυκνότητας και η τέταρτη από τα ~600 nm έως τα ~750 nm με θετική οπτική πυκνότητα. Όπως και στο FMN έτσι και στο FAD η πρώτη ζώνη, που κυμαίνεται από ~440 nm έως τα ~500 nm, συμπίπτει με τη κορυφή στα 450 nm του φάσματος απορρόφησης του FAD.



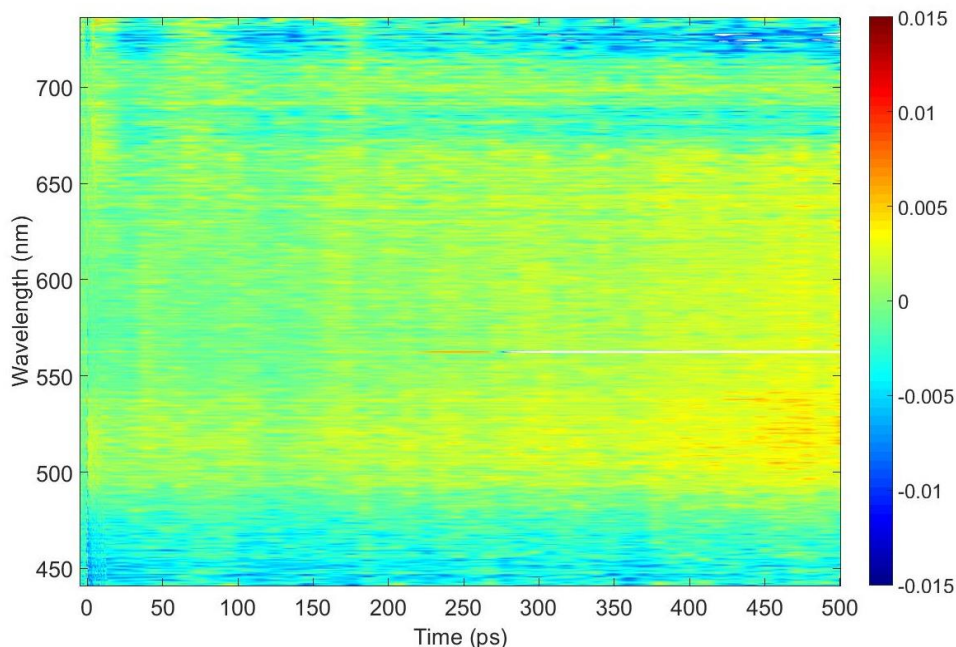
Σχήμα 4.13: 2D απεικόνιση του FAD σε χρονικό παράθυρο 20 ps (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.75 mJ/cm^2).

Η 2D απεικόνιση του FAD στο χρονικό παράθυρο -5-46 ps εμφανίζει τα ίδια χαρακτηριστικά με το χρονικό παράθυρο -2-20 ps.



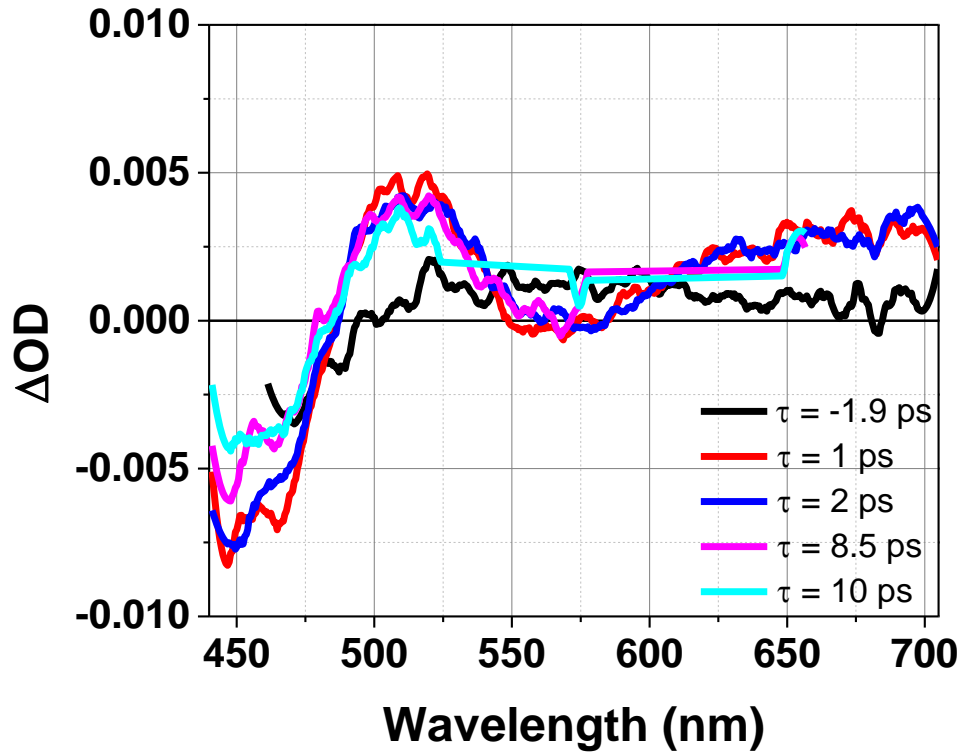
Σχήμα 4.14: 2D απεικόνιση του FAD σε χρονικό παράθυρο 46 ps (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 1.11 mJ/cm^2).

Στην 2D απεικόνιση του FAD με χρονικό παράθυρο 500 ps παρατηρούμε ότι παρουσιάζεται μια «φαινομενική» αύξηση της οπτικής πυκνότητας, καθώς κατευθυνόμαστε προς τους μεγάλους χρόνους, όπως παρατηρήθηκε και στην αντίστοιχη 2D απεικόνιση του FMN. Και σε αυτή την περίπτωση, για την καλύτερη δυνατή παρουσίαση των αποτελεσμάτων θα χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα της 2D απεικόνισης σε εύρος 46 ps για την ανάλυση.

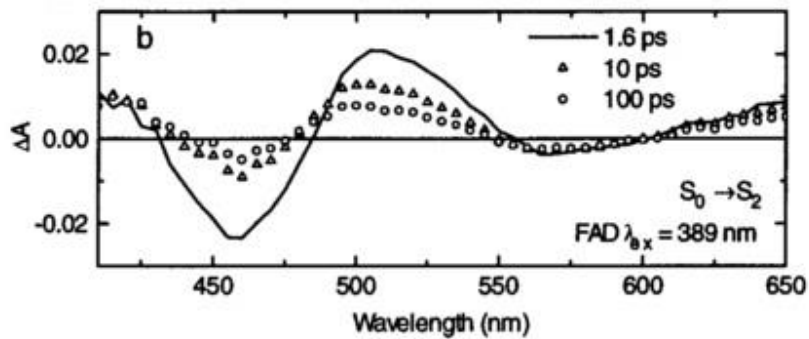


Σχήμα 4.15: 2D απεικόνιση του FAD σε χρονικό παράθυρο 500 ps (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 0.73 mJ/cm²).

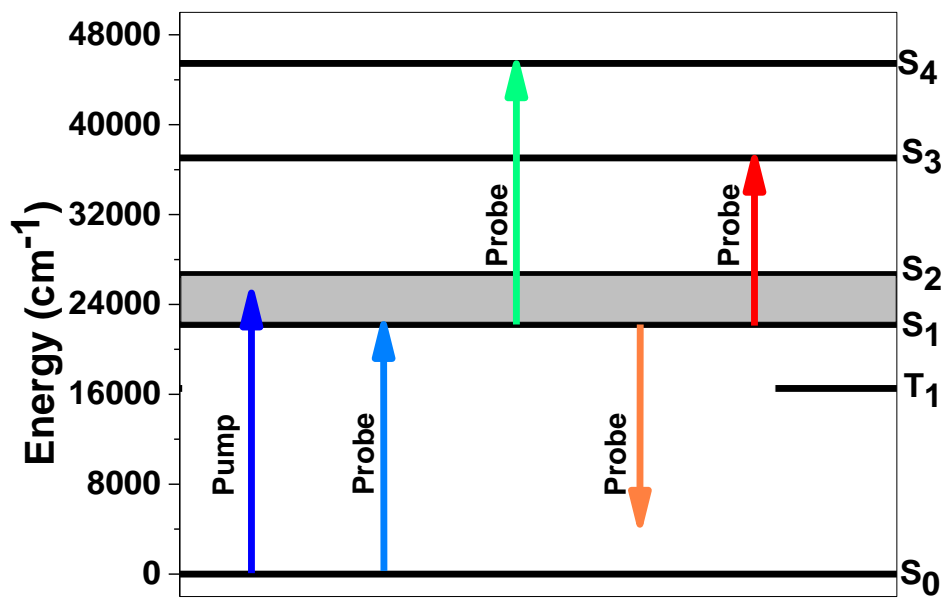
Οι χρονικές τομές των 2D απεικονίσεων, για το FAD, για τους χρόνους $\tau = -1.9$ ps, $\tau = 1$ ps, $\tau = 2$ ps, $\tau = 8.5$ ps και $\tau = 10$ ps τέσσερις ταινίες στα 450 nm που αποδίδεται στο bleaching της θεμελιώδους κατάστασης ($S_0 \rightarrow S_1$), στα 505 nm που αποδίδεται σε απορρόφηση διεγερμένης κατάστασης (excited-state absorption, ESA, $S_1 \rightarrow S_n$, πιθανώς $S_1 \rightarrow S_4$), στα 560 nm λόγω εξαναγκασμένης εκπομπής και περίπου στα 600 nm λόγω απορρόφησης διεγερμένης κατάστασης (excited-state absorption, ESA, $S_1 \rightarrow S_n$, πιθανώς $S_1 \rightarrow S_3$) [2]. Οι μεταβάσεις αυτές φαίνονται στο διάγραμμα Jablonski του FAD (Σχ. 4.20) και τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Σχ. 4.19).



Σχήμα 4.16: Φάσματα παροδικής απορρόφησης του FAD (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 1.11 mJ/cm^2).

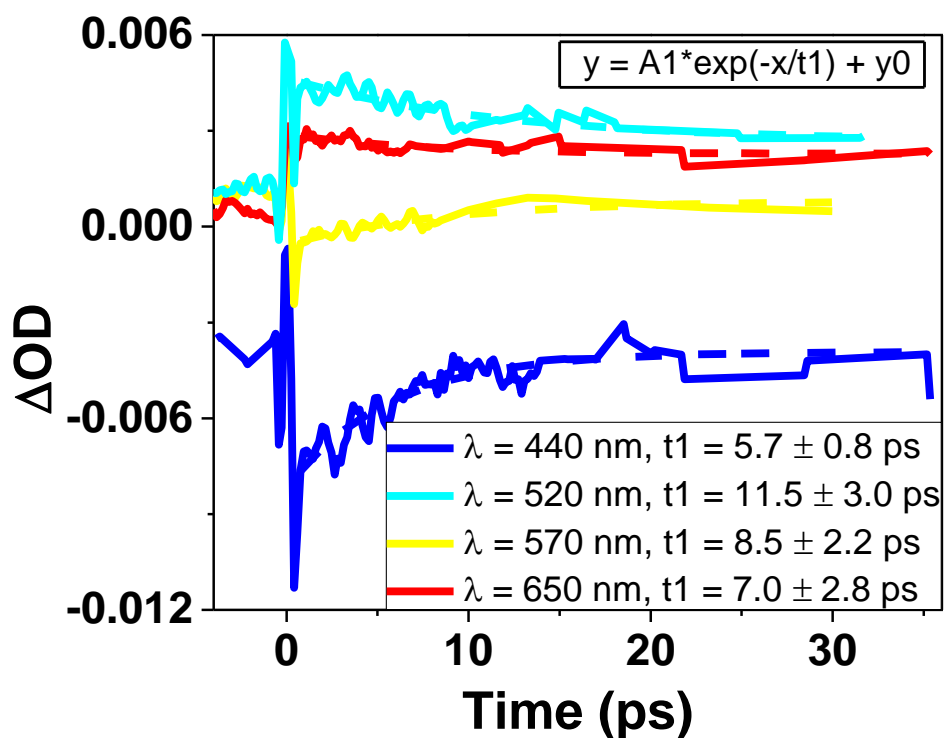


Σχήμα 4.17: Φάσματα χρονοαναλύομενης φασματοσκοπίας υποπικοδευτερολέπτων του FAD ($250 \mu\text{M}$), που λήφθηκαν με μήκος κύματος διέγερσης 389 nm στα 1.6 ps , στα 10 ps και στα 100 ps μετά την διέγερση [2].



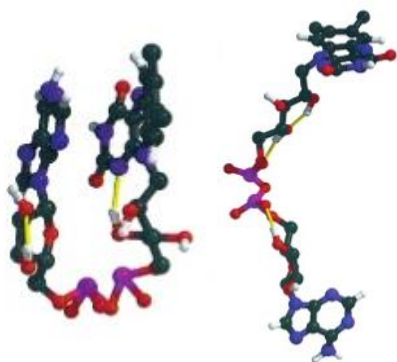
Σχήμα 4.18: Διάγραμμα Jablonski του FAD.

Οι κινητικές καμπύλες του FAD λήφθηκαν για τα μήκη κύματος $\lambda = 440 \text{ nm}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$, $\lambda = 570 \text{ nm}$ και $\lambda = 650 \text{ nm}$, ώστε να καθοριστεί ο χρόνος ζωής των διεργασιών. Οι κινητικές καμπύλες του FAD παρουσιάζουν στους αρνητικούς χρόνους $\Delta OD = 0$, ωστόσο τη χρονική στιγμή έλευσης του παλμού άντλησης στο δείγμα παρατηρείται μια μεταβολή στην οπτική πυκνότητα. Μετά την χρονική στιγμή $t = 0$ πάλι στα μήκη κύματος 440 nm και 570 nm η οπτική πυκνότητα είναι αρνητική και τα μήκη κύματος αυτά εκφράζουν τις μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_1$ (bleaching θεμελιώδης κατάστασης) και $S_1 \rightarrow S_0$ (εξαναγκασμένη εκπομπή), αντίστοιχα. Στα μήκη κύματος 520 nm και 650 nm παρατηρείται θετική οπτική πυκνότητα και τα μήκη κύματος αυτά εκφράζουν τις απορροφήσεις διεγερμένης κατάστασης. Τα σήματα αυτά με το πέρασ του χρόνου εμφανίζουν μια ταχεία απόσβεση και έπειτα μια πολύ αργή διαδικασία επαναφοράς του σήματος. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι υπάρχουν δυο χαρακτηριστικοί χρόνοι ζωής, ένας μερικόν ps και ένας της τάξης των ns [4]. Θέλοντας να προσδιοριστεί ο χρόνος ταχείας απόσβεσης χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση για την προσαρμογή της καμπύλης (4.1), από την οποία προέκυψαν χρόνοι από 5-12 ps για τα διάφορα μήκη κύματος (Σχ. 4.21). Με βάση τα δεδομένα αυτά παρατηρείται συμφωνία με τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας [4], όσο αφορά την ταχεία απόσβεση. Ο χρόνος ζωής της πολύ αργής διαδικασίας δεν μπορεί να υπολογιστεί, καθώς το χρονικό παράθυρο της μέτρησης δεν είναι επαρκές, ώστε να καταγράψει ο χαρακτηριστικός χρόνος.



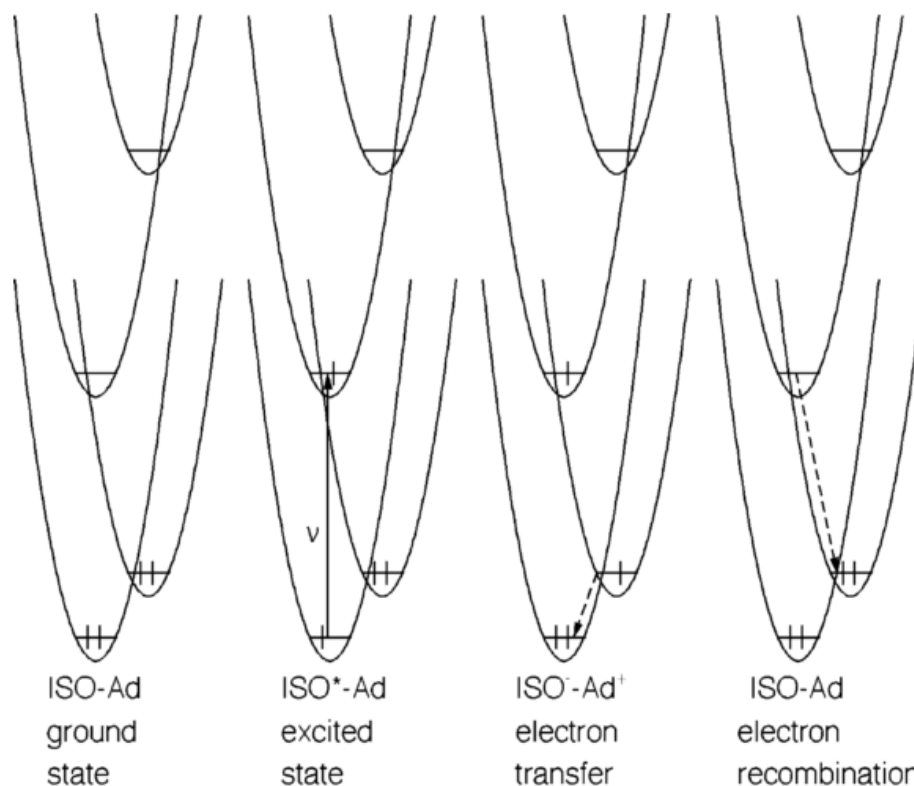
Σχήμα 4.19: Κινητικές καμπύλες FAD (Απορροφώμενη πυκνότητα ενέργειας 1.11 mJ/cm²).

Δεδομένου ότι τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφία [4], αιτιολογούμε ότι η ταχεία διεργασία οφείλεται στην «κλειστή» διαμόρφωση του FAD, που ο δακτύλιος ισοαλλοξαζίνης βρίσκεται κοντά στο δακτύλιο αδενίνης, ενώ ο χρόνος ζωής της πολύ αργής διεργασίας αντιστοιχεί στην ανοιχτή διαμόρφωση, που δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δακτυλίων. Στο Σχήμα 4.22 φαίνονται οι διαμορφώσεις του FAD:



Σχήμα 4.20: Στιγμιότυπο κλειστής (αριστερά) και ανοιχτής διαμόρφωσης (δεξιά) που παρατηρήθηκαν σε προσομοιάσεις μοριακής δυναμικής [5].

Η διαδικασία, που πραγματοποιείται στην «κλειστή» διαμόρφωση είναι η μεταφορά φορτίου από το δακτύλιο της αδενίνης στο δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης, ενώ για στην «ανοιχτή» διαμόρφωση θεωρούμε ότι πραγματοποιούνται παρόμοιες διεργασίες με το FMN [4]. Στο Σχήμα 4.23 φαίνονται οι διεργασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων, που πραγματοποιούνται στην «κλειστή» διαμόρφωση του FAD:



Σχήμα 4.21: Απεικόνιση της ανοιγμένης φωτο-επαγόμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων υδατικού διαλύματος FAD [1].

4.5 Βιβλιογραφία

- [1] Islam, S. D. M., Susdorf, T., Penzkofer, A., Hegemann, P. (2003). Fluorescence quenching of flavin adenine dinucleotide in aqueous solution by pH dependent isomerisation and photo-induced electron transfer. *Chemical Physics*, 295 (2), 137-149. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2003.08.013>
- [2] Stanley, R. J., MacFarlane, A. W. I. (2000). Ultrafast Excited State Dynamics of Oxidized Flavins: Direct Observations of Quenching by Purines. *Journal of Physical Chemistry A*, 104 (30), 6899-6906.

- [3] Li, G., Glusac, K. D. (2008). Light-triggered proton and electron transfer in flavin cofactors. *Journal of Physical Chemistry A*, 112 (20), 4573-4583. <https://doi.org/10.1021/jp7117218>
- [4] Kao, Y., Saxena, C., He, T., Wang, L., Sancar, A., Zhong, D., Guo, L. (2008). Ultrafast Dynamics of Flavins in Five Redox States Ultrafast Dynamics of Flavins in Five Redox States. *Topics In Current Chemistry*, (12), 13132-13139. <https://doi.org/10.1021/ja8045469>
- [5] Van den Berg, P. A. W., Feenstra, K. A., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C., Visser, A. J. W. G. (2002). Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: Simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics. *Journal of Physical Chemistry B*, 106 (34), 8858-8869. <https://doi.org/10.1021/jp020356s>

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος P450 (P450 oxidoreductase-POR) είναι σημαντικό ένζυμο για το μεταβολισμό φαρμάκων και στεροειδών. Το POR παρέχει ηλεκτρόνια στο κυτόχρωμα P450, καθώς και στο κυτόχρωμα b5, τα οποία εμπλέκονται στην υδροξυλίωση των φαρμάκων και των στεροειδών. Η συμμετοχή του σε όλα αυτά τα βιοχημικά μονοπάτια το καθιστούν ιδιαίτερα σημαντικό και ο ακριβής καθορισμός των φυσικοχημικών μηχανισμών λειτουργίας του είναι απαραίτητος.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι συμπαράγοντες του ενζύμου, φλαβινομονονουκλεοτίδιο (FMN) και φλαβινοαδενινωδινουκλεοτίδιο (FAD) με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ (Ultrafast Time-Resolved Laser Spectroscopy). Η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κινητική των μορίων, που θα οδηγήσουν στην εξακρίβωση των μηχανισμών διέγερσης-αποδιέγερσης τους. Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι η διάρκεια της διαταραχής είναι πολύ μικρή, λόγω της χρήσης υπερβραχέως παλμού άντλησης (pump), παρέχοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης υπερταχειών διεργασιών αποφεύγοντας την υπερκάλυψη από τη διαδικασία της διαταραχής. Δεδομένου αυτού, η χρονική ανάλυση είναι βελτιωμένη γιατί ο χρόνος απόκρισης του συστήματος περιορίζεται στη χρονική διάρκεια του παλμού.

Η μελέτη του FMN παρέχει τα χρονικά φάσματα του μορίου, τα οποία παρουσιάζουν δυο αρνητικές μεταβολές την οπτικής πυκνότητας και δυο θετικές. Η πρώτη αρνητική μεταβολή της οπτικής πυκνότητας εμφανίζεται στα 450 nm και προκύπτει από τη μετάβαση $S_0 \rightarrow S_1$, ενώ η δεύτερη αρνητική μεταβολή της οπτικής πυκνότητας εμφανίζεται στα 560 nm και προκύπτει από την εξαναγκασμένη εκπομπή $S_1 \rightarrow S_0$. Οι δυο θετικές μεταβολές της οπτικής πυκνότητας (505 nm και 600 nm) προκύπτουν από απορροφήσεις διεγερμένης κατάστασης ($S_1 \rightarrow S_n$) και συμφωνούν με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Όσο αναφορά την κινητική του μορίου παρατηρούμε την ύπαρξη δύο χρόνων ζωής ενός ταχύ, 8 ps, και ενός μεγάλου χρόνου ζωής της τάξης των ns, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο οποίος δεν υπολογίζεται λόγω αδυναμίας του χρονικά περιορισμένου παράθυρου καταγραφής των 2D απεικονίσεων. Ο μικρός χρόνος ζωής αποδίδεται σε εσωτερική μετατροπή από το επίπεδο S_2 στο επίπεδο S_1 , ενώ ο βραχύς χρόνος ζωής οφείλεται σε δυο διεργασίες αποδιέγερσης, από την κατάσταση S_1 , στο FMN. Η πρώτη διεργασία είναι η διασυστηματική διασταύρωση ($k_{isc}=2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$) και η δεύτερη μια μεταφορά ηλεκτρονίου

συνοδευόμενη με μεταφορά πρωτονίου (H^+), που συμβαίνει σε μια διαμόρφωση του FMN ($k = 5.4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$). Η δεύτερη διεργασία οδηγεί στην παραγωγή του Lumichrome.

Η μελέτη του FAD παρείχε παρόμοια χρονικά φάσματα, στα οποία οι μεταβολές της οπτικής πυκνότητας αντιστοιχούσαν στις ίδιες μεταβάσεις με του FMN και επιβεβαιώθηκαν από την βιβλιογραφία. Όσο αναφορά την κινητική του FAD μετρήσαμε δύο χαρακτηριστικούς χρόνους ζωής, έναν 5-12 ps και έναν της τάξης των μερικών ns. Ωστόσο, δεν μπορέσαμε να υπολογίσουμε ακριβώς το μεγαλύτερο, εκ των δύο, χρόνο λόγο του μικρού χρονικού παράθυρου της μέτρησης. Ο μικρός χρόνος ζωής επιβεβαιώθηκε και βιβλιογραφικά όπου σημειώνονται δυο χρόνοι ζωής, ένας 5-10 ps και ένας δεύτερος της τάξης των ns. Οι χρόνοι αυτοί αντιστοιχούν στις διαμορφώσεις του FAD, ο μικρός χρόνος ζωής αντιστοιχεί στην «κλειστή» μορφή (ο δακτύλιος ισοαλλοξαζίνης βρίσκεται κοντά με το δακτύλιο της αδενίνης) και ο μεγάλος χρόνος ζωής αντιστοιχεί στην «ανοιχτή» μορφή (ο δακτύλιος ισοαλλοξαζίνης είναι απομακρυσμένος από το δακτύλιο της αδενίνης). Θεωρείται ότι η διεργασία που πραγματοποιείται στον μικρό χρόνο ζωής είναι η μεταφορά φορτίου από το δακτύλιο της αδενίνης στο δακτύλιο της ισοαλλοξαζίνης.

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε μια πλήρης χρονική-δυναμική μελέτη των συμπαραγόντων του ενζύμου οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος P450 και λήφθηκαν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την λειτουργία των μορίων αυτών. Οι πληροφορίες αυτές, χρειάζονται περαιτέρω διερεύνηση με, ταυτόχρονη, βελτιστοποίηση των συνθηκών λήψης των δεδομένων (ανάδευση, χρονικό παράθυρο και πυκνότητα της ενέργειας). Η παρούσα μελέτη είναι μεγάλης σημασίας στην προβλεπόμενη συνέχεια, που θα επεκταθεί στο ένζυμο οξειδοαναγωγή του κυτοχρώματος P450, στο οποίο οι φλαβίνες έχουν αναπόσπαστο ρόλο, καθώς συμμετέχουν στην λειτουργία του.